



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Respuestas biológicas de *Scenedesmus ovalternus* y *Chlorella vulgaris* inmovilizadas en alginato de calcio, ante diferentes concentraciones de nutrientes en condiciones de laboratorio

Ibeth Paola Delgadillo Rodríguez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología
Bogotá, Colombia

2014

Respuestas biológicas de *Scenedesmus ovalternus* y *Chlorella vulgaris* inmovilizadas en alginato de calcio, ante diferentes concentraciones de nutrientes en condiciones de laboratorio

Ibeth Paola Delgadillo Rodríguez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Biológicas

Director:

Dr. Luis Carlos Montenegro Ruíz

Codirector:

Dr. Gabriel Antonio Pinilla Agudelo

Grupo de Investigación:

“Biodiversidad, biotecnología y conservación de ecosistemas”

“Fisiología del estrés y biodiversidad en plantas y microorganismos”

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología
Bogotá, Colombia

2014

*"Están los que usan siempre la misma ropa.
Están los que llevan amuletos,
los que hacen promesas
los que imploran mirando el cielo,
los que creen en supersticiones.
Y están los que siguen corriendo cuando les
tiemblan las piernas,
los que siguieron jugando cuando se acaba el
aire.
Los que siguen luchando cuando todo parece
perdido.
Como si cada vez fuera la última vez.
Convencidos de que la vida misma es un desafío.
Sufren, pero no se quejan.
Porque saben que el dolor pasa.
El sudor se seca. El cansancio termina.
Pero hay algo que nunca desaparecerá:
la satisfacción de haberlo logrado.
En sus cuerpos hay la misma
cantidad de músculos.
En sus venas corre la misma sangre.
Lo que los hace diferentes
es su espíritu.
La determinación de alcanzar la cima.
Una cima a la que no se llega superando a los
demás,
sino superándose a uno mismo"*

Vicente Van Gogh a su hermano Theo.

Agradecimientos

A mis padres Sabina y Luis Miguel: gracias por ser mis dos mosqueteros... A toda mi familia por brindarme apoyo.

A mis maestros, mis modelos a seguir: Luis Carlos Montenegro: gracias por tu orientación, tu ayuda, tu amistad y tus enseñanzas; Gabriel Pinilla: gracias por tu paternalismo y por retarme a pensar más a fondo para discutir; Luz Marina Melgarejo: gracias por mostrarme el valor de la disciplina y la constancia en la labor científica. A los tres gracias por su comprensión y paciencia.

A todos los profes y compañeros que de alguna manera contribuyeron a que pudiera vivir la U en un nuevo nivel. Especialmente a Alfonso y a Mario por su amistad y brindarme un par para discutir la tesis.

A mi Universidad Nacional de Colombia, especialmente al Departamento de Biología, por permitirme participar en el alma de la investigación y hacerme crecer como profesional y persona.

A los laboratorios de Cultivo de Algas, Fisiología y Bioquímica Vegetal, y Ecología, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, donde desarrollé todos los experimentos y mediciones.

A la cofinanciación entre la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá y COLCIENCIAS; por el apoyo brindado ya que sin él no hubiese sido posible alcanzar los objetivos propuestos en esta investigación.

Resumen

El objetivo de este estudio fue analizar el efecto de diferentes concentraciones de nutrientes (Nitrógeno y Fósforo) en poblaciones de *Scenedesmus ovalternus* y *Chlorella vulgaris* inmovilizadas en alginato de calcio y ver su utilidad como método de biomonitorio, bajo condiciones de laboratorio. Para ello, se inmovilizaron las dos especies por separado y mixtas. Se simularon tres niveles de estado trófico (oligotrófico, mesotrófico y eutrófico), se utilizó Medio Básico Bold como control y como base de los medios simulados. Se midió, el crecimiento poblacional, la eficiencia fotosintética y el contenido de clorofilas. Los resultados permitieron adecuar la metodología para la medición de la fluorescencia de la clorofila *a* en algas encapsuladas, evaluar el efecto: del encapsulamiento en las algas, establecer la concentración inicial óptima de células cultivadas, valorar el efecto de la condición artificial o natural del agua sobre el cultivo y analizar los cambios ante la concentración diferencial de nutrientes en el medio, tanto para las dos especies ensayadas por separado como para los cultivos mixtos. Estos resultados proporcionan valores diferenciales claros que permiten identificar el estado trófico de un sistema acuático y brindan herramientas para la toma de decisiones acerca del uso, recuperación y conservación de los recursos hídricos.

Palabras clave: estado trófico, biomonitorio, cápsulas de alginato de calcio, fluorescencia de la clorofila *a*, microalgas.

Abstract

The aim of this study was to analyze the effect of different concentrations of nutrients (Nitrogen and Phosphorus) in populations of *Scenedesmus ovalternus* and *Chlorella vulgaris* immobilized in calcium alginate and its usefulness as a bio monitoring method under laboratory conditions. To do this, the two species were immobilized separately and mixed. Three levels of trophic state were simulated (oligotrophic, mesotrophic and

eutrophic), Basic Bold Medium was used as control and as the basis of the simulated media. Three variables, (population growth, photosynthetic efficiency and chlorophyll *a* content) were measured. The results obtained were: the adequacy of the method for measuring the chlorophyll *a* fluorescence in encapsulated algae, the evaluation of the effect of encapsulation on algae, the establishment of initial concentration of cultured cells, the effects of natural or artificial water condition over algae growing, and the effects of differential concentration of nutrients, on the two species growing separately and mixed. These results provide clear differential values that identify the trophic status of a water system and offer tools for making decisions about the use, restoration and conservation of water resources.

Keywords: trophic status, biomonitoring, calcium alginate capsules, chlorophyll *a* fluorescence, microalgae.

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Lista de figuras	XI
Lista de tablas	XIV
Introducción	1
1. Objetivos	3
1.1 General.....	3
1.2 Específicos	3
2. Marco Teórico	5
2.1 Trofía de los sistemas acuáticos.....	5
2.1.1 Eutróficos:	5
2.1.2 Oligotróficos:	6
2.2 Nutrientes en <i>Scenedesmus ovalternus</i> y <i>Chlorella vulgaris</i>	6
2.3 Bioindicación y Biomonitoreo	10
2.4 Técnicas de inmovilización con alginato	11
2.5 Eficiencia fotosintética:	13
3. Antecedentes	17
3.1 <i>Scenedesmus ovalternus</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> como bioindicadores.....	17
3.2 Biomonitoreo de la trofía de sistemas acuáticos	18
3.3 Inmovilización de algas para biomonitoreo	20
4. Metodología	23
4.1 Hipótesis.....	23
4.2 Constantes	23
4.3 Cápsulas de alginato de calcio	24
4.4 Montajes.....	26
4.5 Tratamientos.....	27
4.5.1 En condiciones de cultivo óptimas (control):.....	27
4.5.2 Con diferentes concentraciones de nutrientes simuladas (oligotrofía, mesotrofía y eutrofía):	28
4.5.3 Con agua de sistemas acuáticos con diferente nivel de trofía:	29
4.6 Experimentos.....	29
4.7 Variables.....	31
4.7.1 Crecimiento poblacional:	31
4.7.2 Eficiencia fotosintética:	32

4.7.3	Contenido de clorofilas:	33
4.8	Análisis estadístico	34
5.	Resultados y Discusión.....	35
5.1	Adecuación de la metodología para medir la fluorescencia de la clorofila <i>a</i> en algas encapsuladas	35
5.2	Efecto del encapsulamiento de las células sobre las dos especies	41
5.3	Efecto de la concentración diferencial de nutrientes en el medio de cultivo, sobre las dos especies inmovilizadas en esferas de alginato.....	56
5.4	Efecto de la concentración inicial (baja) de células cultivadas, en las dos especies inmovilizadas en esferas de alginato:.....	71
5.5	Efecto de las aguas de los sistemas acuáticos escogidos en las dos especies inmovilizadas en esferas de alginato.....	80
6.	Conclusiones y recomendaciones	89
6.1	Conclusiones.....	89
6.2	Recomendaciones.....	95
A.	Anexo: Análisis de varianza (ANOVA) de los experimentos.....	97
	Bibliografía	106

Lista de figuras

	Pág.
Figura 2-1: Lago eutrófico (izquierda) y lago oligotrófico (derecha). (http://www.tecnun.es).....	5
Figura 2-2: Clasificación taxonómica de las especies algales estudiadas.....	7
Figura 5-1: Medición de la fluorescencia de la clorofila <i>a</i> en las dos especies encapsuladas y libres con variación del nivel de ampliación de la intensidad del haz de luz actínica.	36
Figura 5-2: Medición de la fluorescencia de la clorofila <i>a</i> en las dos especies encapsuladas y libres con variación del tiempo de exposición a la luz actínica.	37
Figura 5-3: Cinética de Kautsky (González <i>et al.</i> , 2008).	38
Figura 5-4: Medición de la fluorescencia de la clorofila <i>a</i> en las dos especies encapsuladas y libres con variación del tiempo de preadaptación a la oscuridad.....	39
Figura 5-5: Crecimiento poblacional de <i>S. ovalternus</i> en condiciones de cultivo libres. Las barras verticales indican la desviación estándar.	42
Figura 5-6: Crecimiento poblacional de <i>S. ovalternus</i> en condiciones de cultivo encapsuladas. Las barras verticales indican la desviación estándar.	42
Figura 5-7: Crecimiento poblacional de <i>C. vulgaris</i> en condiciones de cultivo libres. Las barras verticales indican la desviación estándar.....	44
Figura 5-8: Crecimiento poblacional de <i>C. vulgaris</i> en condiciones de cultivo encapsuladas. Las barras verticales indican la desviación estándar.	44
Figura 5-9: Eficiencia fotosintética de <i>S. ovalternus</i> en condiciones libres. Las barras verticales indican la desviación estándar.....	48
Figura 5-10: Eficiencia fotosintética de <i>S. ovalternus</i> en condiciones de encapsulamiento. Las barras verticales indican la desviación estándar.	48
Figura 5-11: Eficiencia fotosintética de <i>C. vulgaris</i> en condiciones libres. Las barras verticales indican la desviación estándar.....	49
Figura 5-12: Eficiencia fotosintética de <i>C. vulgaris</i> en condiciones de encapsulamiento. Las barras verticales indican la desviación estándar.	50
Figura 5-13: Contenido de clorofilas de <i>S. ovalternus</i> libres y encapsuladas. Las barras verticales indican la desviación estándar.....	53
Figura 5-14: Contenido de clorofilas de <i>C. vulgaris</i> libres y encapsuladas. Las barras verticales indican la desviación estándar.....	54
Figura 5-15: Crecimiento poblacional de <i>S. ovalternus</i> monocultivada en diferentes niveles de trofía simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.	57

Figura 5-16: Crecimiento poblacional de <i>C. vulgaris</i> monocultivada en diferentes niveles de trofía simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.	58
Figura 5-17: Crecimiento poblacional de <i>S. ovalternus</i> en cultivos mixtos, en diferentes niveles de trofía simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.....	60
Figura 5-18: Crecimiento poblacional de <i>C. vulgaris</i> en cultivos mixtos, en diferentes niveles de trofía simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.....	61
Figura 5-19: Eficiencia fotosintética de <i>S. ovalternus</i> monocultivada, en diferentes niveles de trofía simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.	63
Figura 5-20: Eficiencia fotosintética de <i>C. vulgaris</i> monocultivada, en diferentes niveles de trofía simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.	64
Figura 5-21: Eficiencia fotosintética de las dos especies en cultivo mixto, en diferentes niveles de trofía simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.....	65
Figura 5-22: Contenido de clorofilas de <i>S. ovalternus</i> monocultivada, en diferentes niveles de trofía simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.....	67
Figura 5-23: Contenido de clorofilas de <i>C. vulgaris</i> monocultivada, en diferentes niveles de trofía simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.	68
Figura 5-24: Contenido de clorofilas de las dos especies en cultivo mixto, en diferentes niveles de trofía simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.....	69
Figura 5-25: Crecimiento poblacional de <i>S. ovalternus</i> en monocultivo con baja concentración inicial de células, en diferentes niveles de trofía simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.....	72
Figura 5-26: Crecimiento poblacional de <i>C. vulgaris</i> en monocultivo con baja concentración inicial de células, en diferentes niveles de trofía simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.....	73
Figura 5-27: Crecimiento poblacional de <i>S. ovalternus</i> en cultivo mixto con baja concentración inicial de células, en diferentes niveles de trofía simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.....	74
Figura 5-28: Crecimiento poblacional de <i>C. vulgaris</i> en cultivo mixto con baja concentración inicial de células, en diferentes niveles de trofía simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.....	74
Figura 5-29: Eficiencia fotosintética de <i>S. ovalternus</i> con baja concentración inicial de células. Las barras verticales indican la desviación estándar.....	77
Figura 5-30: Eficiencia fotosintética de <i>C. vulgaris</i> con baja concentración inicial de células. Las barras verticales indican la desviación estándar.....	78
Figura 5-31: Eficiencia fotosintética de las dos especies en cultivos mixtos con baja concentración inicial de células. Las barras verticales indican la desviación estándar. ...	78
Figura 5-32: Crecimiento poblacional de <i>S. ovalternus</i> en monocultivo, con alta concentración inicial de células en aguas provenientes de tres lagos con diferente nivel	

de trofía. Oligotrófico: San Rafael; Mesotrófico: Santa María del Lago; Eutrófico: Juan Amarillo. Las barras verticales indican la desviación estándar.	82
Figura 5-33: Crecimiento poblacional de <i>C. vulgaris</i> en monocultivo, con alta concentración inicial de células en aguas provenientes de tres lagos con diferente nivel de trofía. Oligotrófico: San Rafael; Mesotrófico: Santa María del Lago; Eutrófico: Juan Amarillo. Las barras verticales indican la desviación estándar.	83
Figura 5-34: Crecimiento poblacional de <i>S. ovalternus</i> en cultivo mixto con alta concentración inicial de células, en aguas provenientes de tres lagos con diferente nivel de trofía. Oligotrófico: San Rafael; Mesotrófico: Santa María del Lago; Eutrófico: Juan Amarillo. Las barras verticales indican la desviación estándar.	84
Figura 5-35: Crecimiento poblacional de <i>C. vulgaris</i> en cultivo mixto con alta concentración inicial de células, en aguas provenientes de tres lagos con diferente nivel de trofía. Oligotrófico: San Rafael; Mesotrófico: Santa María del Lago; Eutrófico: Juan Amarillo. Las barras verticales indican la desviación estándar.	85

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 4-1: Concentraciones iniciales de los inóculos de <i>S. ovalternus</i> y <i>C. vulgaris</i> utilizados para los experimentos.	25
Tabla 4-2: Medio Basal de Bold (BBM) (Andersen, 2005).	27
Tabla 4-3: Concentraciones de fósforo y nitrógeno en sus distintas formas de acuerdo a la clasificación de Vollenweider (1968). En negrilla los valores que se simularon en los.	28
Tabla 4-4: Concentraciones simuladas de fósforo y nitrógeno en los reactivos de BBM de acuerdo a los valores tomados de la clasificación de Vollenweider (1968).....	28
Tabla 4-5: Características de cada uno de los experimentos de acuerdo a los tratamientos, montajes y réplicas.	30
Tabla 5-1: Medición de la fluorescencia de la clorofila <i>a</i> en las dos especies encapsuladas y libres con variación de la intensidad de la luz del Fluorómetro no modulado.	35
Tabla 5-2: Comparación de medias del crecimiento poblacional en <i>S. ovalternus</i> . Valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba Tukey HSD, $P > 0.05$).	43
Tabla 5-3: Comparación de medias del crecimiento poblacional en <i>C. vulgaris</i> . Valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba Tukey HSD, $P > 0.05$).	45
Tabla 5-4: Comparación de medias de la eficiencia fotosintética en <i>S. ovalternus</i> (izq.) y en <i>C. vulgaris</i> (der.). Valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba Tukey HSD, $P > 0.05$).....	52
Tabla 5-5: Comparación de medias del contenido de clorofilas en <i>S. ovalternus</i> (izq.) y en <i>C. vulgaris</i> (der.). Valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba Tukey HSD, $P > 0.05$).....	55
Tabla 5-6: Comparación de medias del crecimiento poblacional en monocultivos de <i>S. ovalternus</i> (izq.) y de <i>C. vulgaris</i> (der.). Valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba Tukey HSD, $P > 0.05$).	59
Tabla 5-7: Comparación de medias del crecimiento poblacional en cultivos mixtos de <i>S. ovalternus</i> (izq.) y de <i>C. vulgaris</i> (der.). Valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba Tukey HSD, $P > 0.05$).	62
Tabla 5-8: Comparación de medias de la eficiencia fotosintética en <i>S. ovalternus</i> monocultivada (izq.), en <i>C. vulgaris</i> monocultivada (cen.) y en ambas especies en cultivo mixto (der.). Valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba Tukey HSD, $P > 0.05$).	66

Tabla 5-9: Comparación de medias del contenido de clorofilas en <i>S. ovalternus</i> monocultivada (izq.), en <i>C. vulgaris</i> monocultivada (cen.) y en ambas especies en cultivo mixto (der.). Valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba Tukey HSD, $P > 0.05$).	70
Tabla 5-10: Comparación de medias del crecimiento poblacional en <i>S. ovalternus</i> monocultivada (izq.), en <i>C. vulgaris</i> monocultivada (cen-izq.), en <i>S. ovalternus</i> cultivada mixta (cen-der.), en <i>C. vulgaris</i> cultivada mixta (der.). Valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba Tukey HSD, $P > 0.05$).	76
Tabla 5-11: Comparación de medias de la eficiencia fotosintética en <i>S. ovalternus</i> monocultivada (izq.), en <i>C. vulgaris</i> monocultivada (cen.) y en ambas especies en cultivo mixto (der.). Valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba Tukey HSD, $P > 0.05$).	80
Tabla 5-12: Comparación de medias del crecimiento poblacional en <i>S. ovalternus</i> monocultivada (izq.), en <i>C. vulgaris</i> monocultivada (cen-izq.), en <i>S. ovalternus</i> cultivada mixta (cen-der.) y en <i>C. vulgaris</i> cultivada mixta (der.) con alta concentración inicial de células, en aguas provenientes de tres lagos con diferente nivel de trofía. Valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba Tukey HSD, $P > 0.05$).	85

Introducción

En Colombia los procesos de eutrofización de los sistemas acuáticos se han acelerado debido al desarrollo urbano que ha tenido el país, lo que implica un fuerte deterioro de estos sistemas, en especial en las zonas más pobladas como las ciudades. Esta problemática se estudia intensamente a fin de hallar el valor ecológico de este tipo de ecosistemas, que son fundamentales para el mantenimiento del equilibrio en una región. Para ello, se utilizan diferentes métodos para la valoración del estado trófico de los ecosistemas, los cuales permiten el seguimiento de la contaminación y brindan herramientas para la toma de decisiones acerca del uso, recuperación y conservación de los recursos hídricos.

En este sentido, el uso de algas inmovilizadas en el monitoreo de las concentraciones de nutrientes en los sistemas acuáticos constituye una alternativa útil que podría subsanar varias de las carencias de otros métodos, como por ejemplo la reducción en la incertidumbre en cuanto a los resultados obtenidos. Esto permitiría un seguimiento constante de las condiciones del ecosistema que mostraría los cambios en períodos cortos (días o semanas). A pesar de que existen algunos estudios que utilizan la inmovilización de algas con variados objetivos, aún son escasas las investigaciones a nivel mundial que consideren la inmovilización como un método para valorar los procesos de eutrofización. En Colombia no se reportan antecedentes de trabajos relacionados con este uso.

Mientras que algunos de los estudios basados en la inmovilización de microalgas están más dirigidos hacia los procesos de biorremediación, aspecto que empieza a tomar fuerza aunque aún con algunas carencias, otros trabajos han mostrado que las algas inmovilizadas permiten detectar y cuantificar varios agentes contaminantes en el agua, de manera que se constituye como un método muy eficaz, estable y sensible. Entonces, esta investigación cobra importancia, ya que las algas utilizadas en el biomonitoreo de la contaminación de los sistemas acuáticos, se convierten en un instrumento de gestión

ambiental que podría dar elementos para el manejo sostenible y la conservación adecuada de los recursos acuáticos.

En resumen, existen vacíos de conocimiento sobre la metodología de inmovilización de microalgas y su consecuente uso para valorar la eutrofización, lo que llevó a la formulación de algunas preguntas de investigación y que fueron abordadas en la presente investigación, las cuales se pueden enunciar de la siguiente manera:

- “¿Cómo influyen diferentes concentraciones de nutrientes (nitrógeno y fósforo específicamente) en el crecimiento poblacional, la eficiencia fotosintética y el contenido de clorofilas de las algas *Scenedesmus ovalternus* y *Chlorella vulgaris* en condiciones de inmovilización?”
- “¿Cuáles deben ser los parámetros de medición para las variables de eficiencia fotosintética y contenido de clorofilas, para las algas *Scenedesmus ovalternus* y *Chlorella vulgaris* dentro de las cápsulas de alginato de calcio para que sirvan en el biomonitoreo de la trofia de un sistema acuático?”

Este trabajo hace parte del proyecto de investigación “Biomonitoreo del estado trófico de ecosistemas acuáticos lénticos con microalgas inmovilizadas”, financiado por COLCIENCIAS y la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, contrato 462-2011, y llevado a cabo por los grupos de investigación “Biodiversidad, biotecnología y conservación de ecosistemas” y “Fisiología del estrés y biodiversidad en plantas y microorganismos” del Departamento de Biología.

1. Objetivos

1.1 General

Analizar el efecto de diferentes concentraciones de nutrientes en poblaciones de *Scenedesmus ovalternus* y *Chlorella vulgaris* inmovilizadas en alginato de calcio bajo condiciones de laboratorio y su probable utilidad como método de biomonitoreo.

1.2 Específicos

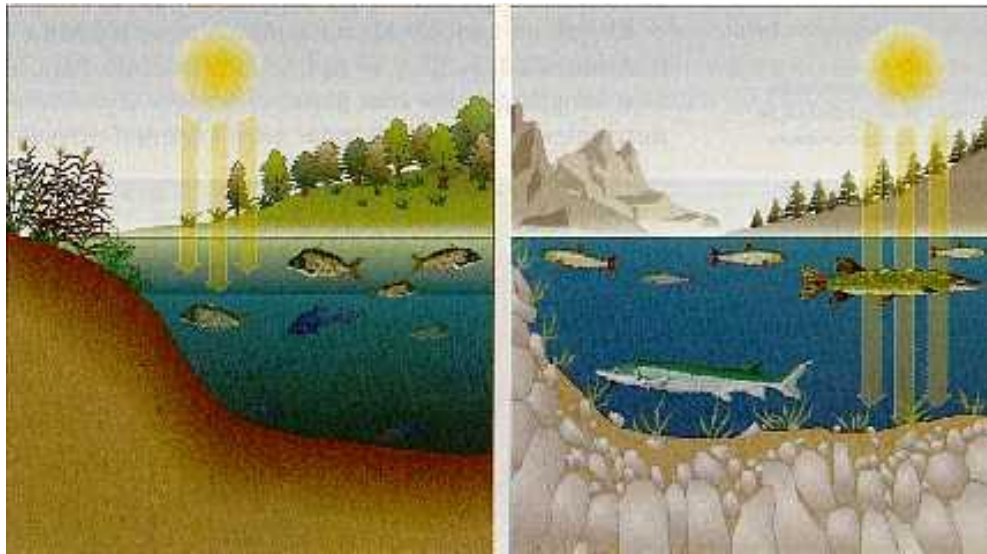
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo en el crecimiento de *Scenedesmus ovalternus* y *Chlorella vulgaris* inmovilizadas en alginato de calcio en monocultivos y en cultivos mixtos, en condiciones experimentales.
- Evaluar el efecto de diferentes niveles tróficos de aguas provenientes de lagos sobre el crecimiento de *Scenedesmus ovalternus* y *Chlorella vulgaris* inmovilizadas en alginato de calcio en monocultivos y en cultivos mixtos, bajo condiciones de laboratorio.
- Evaluar la utilización de *Scenedesmus ovalternus* y *Chlorella vulgaris* inmovilizadas en alginato de calcio, bajo condiciones de laboratorio, como biosensores del estado trófico.

2.Marco Teórico

2.1 Trofía de los sistemas acuáticos

Existen diferentes tipos de clasificación para los sistemas acuáticos, pero tal vez la más importante por lo que implica en términos ecológicos es la del estado trófico, que se basa en la abundancia de nutrientes (fosfatos y nitratos principalmente) que tenga el ecosistema como se ilustra en la figura 2-1; entonces existen dos grandes tipos:

Figura 2-1: Lago eutrófico (izquierda) y lago oligotrófico (derecha). (<http://www.tecnun.es>)



2.1.1 Eutróficos:

Son sistemas donde hay alta producción primaria, debida a la constante regeneración de nutrientes y materia orgánica, ya que son aguas enriquecidas por fósforo y nitrógeno principalmente, lo que facilita la proliferación de microalgas y macrófitas. Esta gran producción puede causar turbidez en las aguas, por la gran cantidad de organismos suspendidos, se dificulta la entrada de luz al sistema y reduce la capa fótica en donde se encuentran la mayoría de los seres fotoautótrofos. Con ello se disminuye la producción de oxígeno y se aumentan las tasas de mortalidad de los organismos. Estos son

descompuestos por las bacterias en procesos aeróbicos, lo que además conlleva a una alta demanda biológica de oxígeno. Los organismos que se encuentran en los ambientes eutróficos son característicos de las aguas pobres en oxígeno, pero al transcurrir el tiempo, cuando se empieza a terminar el oxígeno, continúan procesos anaeróbicos sobre los restos orgánicos que quedan, produciendo diferentes gases que originan malos olores y un mal aspecto en los casos de hipereutrofización. Al restringirse la actividad biológica el sistema se comienza a sedimentar y colmatar y puede derivar a su desaparición total (Roldán & Ramírez, 2008; Margalef, 1983).

2.1.2 Oligotróficos:

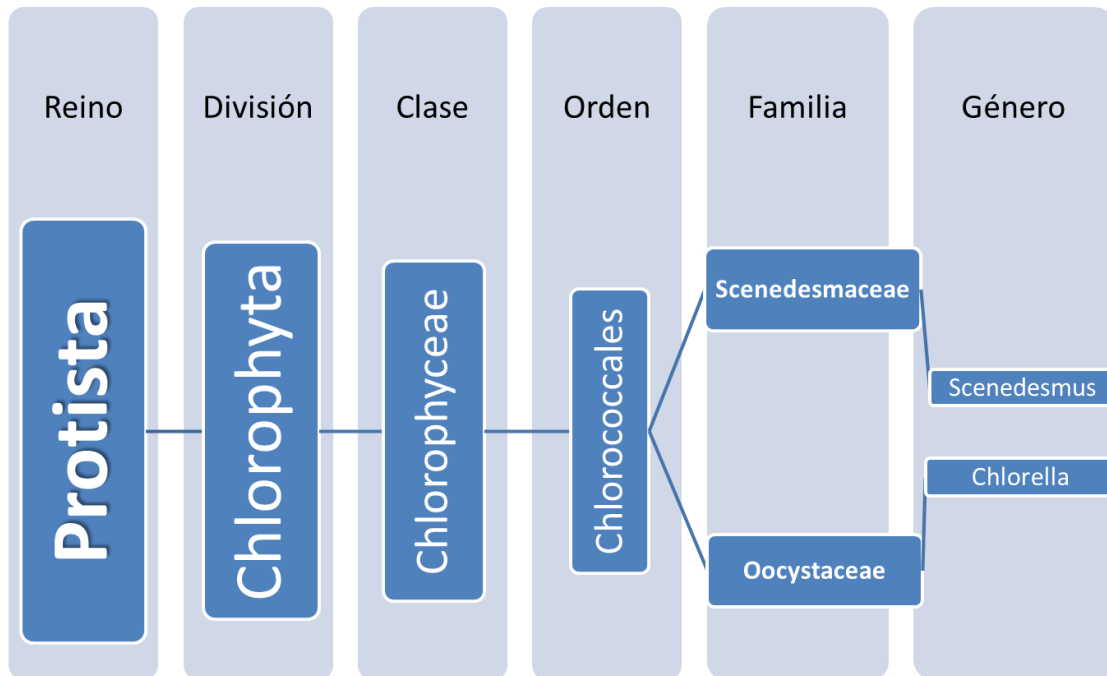
Las aguas de estos ecosistemas son pobres en nutrientes por lo que los organismos autótrofos no proliferan excesivamente, con lo cual hay una baja producción de materia orgánica al igual que bacteriana. Debido a los pocos organismos y reducidos sólidos disueltos, las aguas son claras y permiten que la luz penetre con facilidad. Hay oxígeno en abundancia y la flora y la fauna es típica de aguas bien oxigenadas. Aunque el número de organismos es bajo, la diversidad es elevada. La producción primaria en estos ecosistemas suele depender de la naturaleza química de la cuenca y de los aportes que le llegan por afluentes o desde el fondo. Los sistemas someros tienden a ser más fértiles, porque a más profundidad hay menos producción. Sin embargo, en Colombia las actividades humanas generan grandes cantidades de químicos y nutrientes que van a parar a los diversos sistemas acuáticos, los cuales se ven afectados por dicho aumento en sustancias contaminantes. Esto puede causar la transición del estado de un ecosistema acuático desde la oligotrofía a la mesotrofía, y en últimas a la eutrofía, con sus respectivas consecuencias (Roldán & Ramírez, 2008; Margalef, 1983).

2.2 Nutrientes en *Scenedesmus ovalternus* y *Chlorella vulgaris*

Estas dos especies se han estudiado ampliamente dadas sus características en cuanto a la facilidad de cultivo, el rápido crecimiento y sus propiedades como fuente de alimento. Ambas especies pertenecen al orden Chlorophyceae y se clasifican taxonómicamente como se muestra en la figura 2.

Por un lado *Chlorella vulgaris* es un alga esférica, ovoide o elipsoide, unicelular, eucariota y que presenta clorofilas *a* y *b*. Vive en medios marinos, en el agua dulce e incluso en suelos encharcados. Es frecuente que aparezca en simbiosis con esponjas, hydras y paramecios (González, 2010). Es una especie adaptada a sistemas acuáticos bajos en nutrientes, es decir, de condiciones oligotróficas a ultraoligotróficas. Gracias a numerosos estudios se cree que el género *Chlorella* puede servir como una fuente potencial de alimento y de energía debido a su eficiencia fotosintética, comparable con la tasa de otros cultivos como el de caña de azúcar. Además, tiene una alta proporción de proteína y de otros nutrientes esenciales para el humano. También se propone como agente de bioabsorción especialmente para metales pesados (Tam *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1998; Chen, 2001; Al-Rub *et al.*, 2004; Hameed, 2006; Luan *et al.*, 2006; Akhtar *et al.*, 2008; Katircioglu *et al.*, 2008; Ruiz-Marin & Mendoza-Espinosa, 2008; Ruiz-Marin *et al.*, 2010).

Figura 2-2: Clasificación taxonómica de las especies algales estudiadas.



Por otro lado, *Scenedesmus ovalternus* es un alga cenobial que se organiza en múltiplos de dos, las células son elipsoides, ovoides o en forma de media luna, la pared celular es lisa y no presenta espinas (González, 2010). Es una especie adaptada a condiciones opuestas a las de *Chlorella vulgaris*, es decir condiciones de eutrofia hasta hipereutrofia donde abundan los nutrientes. Ecológicamente, las especies de este género suelen ser

importantes en la remoción de algunos elementos químicos que se encuentran en grandes cantidades dentro de los sistemas acuáticos, especialmente el nitrógeno (Wehr & Sheath, 2003).

Como en cualquier ecosistema, el crecimiento y mantenimiento de una población está determinado principalmente por los recursos disponibles. En el caso de las algas, entre los recursos necesarios para el equilibrio en su dinámica poblacional se resaltan los nutrientes, y dentro de estos a su vez, el nitrógeno y el fósforo como los principales, debido al aporte específico que hacen para el crecimiento poblacional y el desarrollo de sus funciones vitales (Reynolds, 2006). Adicionalmente, la competencia por estos recursos es otro factor determinante en la riqueza y abundancia de las especies en dicho ecosistema. Las algas compiten por la toma del material inorgánico del medio, de donde asimilan los nutrientes para su funcionamiento. Esta característica junto con la producción primaria, hacen de las algas los principales organismos en las cadenas tróficas de los sistemas acuáticos (Reynolds, 2006).

Los nutrientes inorgánicos pueden dividirse en dos grupos: macronutrientes, requeridos en grandes cantidades y micronutrientes, requeridos en concentraciones muy bajas. Los macronutrientes (incluyen compuestos de nitrógeno, fósforo, y azufre) son componentes fundamentales de las macromoléculas y tienen un papel clave en la estructura celular. Por su parte, los micronutrientes tienen un papel metabólico específico en la fisiología de las microalgas (Reynolds, 2006; González, 2010).

Las diferentes especies algales se encuentran bien adaptadas a condiciones particulares del medio, existiendo algunas generalistas y otras especialistas en los rangos de tolerancia a los factores ambientales. En este sentido la presencia o ausencia de nutrientes y las cantidades en las que se presentan en el sistema son aspectos determinantes en la estructura de una comunidad algal establecida en dicho ambiente. Entonces, cuando uno o varios nutrientes se encuentran en mínimas cantidades, se convierten en “factores limitantes”, concepto desarrollado por Liebig y conocido como la “ley del mínimo”, según el cual el crecimiento de las poblaciones está supeditado a la concentración del nutriente que esté en mínima cantidad (Graham & Wilcox, 2000).

Droop (1973) propuso un modelo en el que el crecimiento poblacional en las microalgas es función de las reservas internas del nutriente limitante, de manera que cuando el nutriente se encuentra disponible en el medio, su abundancia es la que determina la asimilación y el almacenamiento por parte de las células algales. Entonces, el almacenamiento de los nutrientes no limitantes cobraría un rol fundamental en la regulación del crecimiento microalgal.

Por lo tanto, no solo se trata de las concentraciones de nutrientes que se encuentran en el sistema acuático, sino también de las que se encuentran almacenados en las células algales. Es decir, que tanto la disponibilidad de los nutrientes como la demanda de los mismos por los organismos, son factores que determinan la diversidad de algas en un sistema, así como su abundancia y distribución. La proporción a la cual ningún nutriente es limitante se define como la proporción óptima o relación de Redfield, y es particular para cada especie (Stevenson *et al.*, 1996). Puede variar según crecimiento poblacional, la radiación incidente, la temperatura ambiental y la disponibilidad de CO₂, entre otros factores ambientales (Lagus, 2009).

En general, esta proporción óptima para el fitoplancton es de 106:16:1 en átomos de carbono, nitrógeno y fósforo respectivamente, la cual permite el balance adecuado de los procesos fisiológicos de crecimiento. Las variaciones en esta proporción pueden derivar en limitación o exceso de nutrientes (Lagus, 2009). Así mismo, la relación N:P es un valor que permite conocer el estado nutricional del fitoplancton, de manera que valores mayores a 20 indican una deficiencia en fósforo mientras que valores menores de 10 indican deficiencia en nitrógeno (Stevenson *et al.*, 1996).

Por un lado, el nitrógeno es uno de los componentes esenciales de muchas biomoléculas clave como aminoácidos, nucleótidos y proteínas, por lo cual, el incremento en su concentración normalmente genera un aumento en los productores primarios, esto sin exceder cierta concentración que puede llegar a causar daños en organismos poco tolerantes a esta condición. Por otro lado, la limitación de este nutriente influye directamente en la tasa de fotosíntesis y en la tasa de respiración, debido a que 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 (Barsanti & Gualtieri, 2006).

De otra parte, 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 (Stewart, 1974). Es así como la limitación de este elemento en un sistema conlleva a la disminución del crecimiento algal, ya que se da una restricción en la síntesis de ácidos nucleicos, la cual puede darse a nivel de la replicación del genoma o al nivel de la síntesis de RNA. Además, la limitación puede afectar la conversión de energía lumínica y reducir la tasa de síntesis de proteínas en el aparato fotosintético, lo que produce una reducción en el proceso fotoquímico (Barsanti & Gualtieri, 2006; González, 2010).

2.3 Bioindicación y Biomonitoreo

Durante años se ha llevado a cabo la evaluación de la calidad del agua a partir de las variables fisicoquímicas, que si bien son un buen agente para analizar el comportamiento de la contaminación en los ecosistemas acuáticos, es un método que solo permite identificar los efectos a corto plazo. Esto ha llevado a explorar nuevas metodologías en la limnología que superen las dificultades de los métodos tradicionales, y es así como desde los años 1950s se han perfeccionado los análisis de contaminación a partir de las respuestas de los organismos a esas variaciones en las condiciones de su medio, lo que permite reconocer los efectos en los ecosistemas en un tiempo más prolongado.

La bioindicación se basa en el hecho de que los organismos muestran las condiciones del medio en el que viven, ya que su presencia en un sistema está determinada por la capacidad de adaptación a las particularidades del medio (Pinilla, 2000). Sin embargo, como lo explica Odum (1972), la definición de un indicador biológico está más orientada a una especie particular cuya presencia demuestra la existencia de ciertas condiciones en el medio, mientras que su ausencia es la consecuencia de la alteración de tales condiciones.

El uso de especies para detectar procesos y factores en los ecosistemas acuáticos tiene varias ventajas, como las mencionadas por Pinilla (2000):

- Las especies y las comunidades bióticas responden a efectos acumuladores intermitentes que en determinado momento un muestreo de variables químicas o físicas pasa por alto.
- La vigilancia biológica evita la determinación regular de un número excesivo de parámetros químicos y físicos, ya que en los organismos se sintetizan o confluyen muchas de estas variables.
- Los indicadores biológicos permiten detectar la aparición de elementos contaminantes nuevos e insospechados.
- Puesto que muchas sustancias se acumulan en el cuerpo de ciertos organismos, su concentración en esos indicadores puede reflejar el nivel de contaminación ambiental.
- Como no es factible tomar muestras de toda la biota de un sistema acuático, la selección de algunas pocas especies indicadoras simplifica y reduce los costos de la valoración sobre el estado del ecosistema, a la vez que se obtiene sólo la información pertinente, desechando un cúmulo de datos difícil de manejar e interpretar.

Usualmente, el seguimiento de la contaminación en los ecosistemas se lleva a cabo mediante bioindicadores, dadas las grandes ventajas anteriormente mencionadas que ofrecen para este tipo de estudios, entre las que se cuentan su especificidad y fácil monitoreo. Existen numerosos ejemplos del uso de microalgas para determinar la calidad de lagos y ríos, permitiendo conocer las fluctuaciones del sistema mediante la caracterización de especies tolerantes o afines a la materia orgánica y que tienen capacidad de descomponerla (Griffit *et al.*, 2002). En este variado grupo, las algas de la clase Bacillariophyceae son las más utilizadas para monitoreo ya que son dominantes en muchos sustratos dado que algunas especies son muy sensibles, mientras que otras son muy tolerantes; además son fáciles y rápidas para muestrear, cultivar y determinar en comparación con otros grupos (Toro *et al.*, 2003).

2.4 Técnicas de inmovilización con alginato

En cualquier técnica que pretenda inmovilizar algas vivas, el aspecto más importante es que el medio permita la absorción o el paso de la luz, dado el carácter autotrófico de estas células. Moreno-Garrido (2008) divide los métodos de inmovilización en “pasivos” y

“activos”, los primeros basados en la capacidad que tienen algunas microalgas para adherirse a superficies tales como estropajos (Akhtar *et al.*, 2008), esponjas u otros materiales artificiales (polivinilo, poliuretano). Estos métodos pasivos incluyen el uso de sustratos colonizados por algas perifíticas.

Los segundos, los métodos “activos”, son de tres tipos: la floculación, la fijación química y el atrapamiento con geles. En el primer caso, las algas se tratan con quitosano (un polímero natural derivado de la quitina) a fin de precipitar las células. Este método tiene el inconveniente de ser muy poco estable, de manera que la inmovilización es temporal. En el segundo caso, la fijación química, se utiliza glutaraldehído o resinas, pero existe la desventaja de que la interacción química con las células causa daños en su superficie y reduce drásticamente su viabilidad (Moreno-Garrido, 2008).

En el atrapamiento con geles, que es la técnica de más amplio uso dado sus beneficios y relativa facilidad de aplicación, se utilizan polímeros sintéticos (acrilamida, resinas transparentes, poliuretanos, sílica), proteínas (gelatina, colágeno, clara de huevo) o polisacáridos naturales (agares, carrageninas o alginatos). Estos últimos se prefieren porque no ocasionan destrucción celular, no son tóxicos y existen numerosos antecedentes que demuestran ser exitosos, ya que no son termo-reversibles como el agar ni tan inestables como las carrageninas (Moreno-Garrido, 2008).

Los alginatos constituyen una familia de polisacáridos de copolímeros binarios no ramificados de los ácidos D-manurónico y L-galurónico en diferentes proporciones y secuencias (Ertesbåg & Valla, 1998; Lee, 2008). Comercialmente se extrae de algas pardas, principalmente de especies de los géneros *Laminaria* y *Sargassum*. La mayor ventaja de los geles basados en alginatos es que las células inmovilizadas no sufren cambios en sus condiciones físico-químicas durante el proceso de inmovilización. Estos polímeros naturales son solubles en agua y en combinación con cationes como Na^+ y Ca^{2+} , forman geles termo-estables (Barsanti & Gualtieri, 2006). El gel se puede disolver con citrato de sodio o con fosfato, sustancias que desestabilizan su estructura. Por otra parte, los alginatos son relativamente baratos, no son tóxicos, son suficientemente transparentes, son bastante estables y son fáciles de usar. En las cápsulas de alginato, las células están protegidas contra el estrés mecánico, pero los nutrientes y los

metabolitos pueden difundirse a través de la matriz semipermeable que constituye el alginato (Ertesbåg & Valla, 1998). Chen (2001) señala que las células de *Scenedesmus quadricauda* atrapadas en alginato, conservadas en oscuridad a 4 °C, permanecen viables después de 3 años.

A pesar de los múltiples beneficios de la técnica de inmovilización con alginato, algunos autores señalan que la matriz de este polisacárido es vulnerable a la presencia de agentes quelantes presentes en las aguas residuales, tales como el fosfato y el citrato, lo cual afecta la fortaleza de la matriz de gel y en últimas la disuelve (Ruiz-Marin *et al.*, 2010). Sin embargo, este problema se puede resolver con una recalcificación de las cápsulas de alginato. En el caso de aguas marinas Moreira-Santos *et al.*, (2006) encontraron que se obtiene una menor degradación de las cápsulas a la alta salinidad cuando se tratan con una solución de estroncio. Otros investigadores señalan sin embargo que las matrices poliméricas reducen el área de contacto de las algas con el medio acuático y restringen la difusión (Akhtar *et al.*, 2008).

2.5 Eficiencia fotosintética:

La fluorescencia de la clorofila *a* es un método muy eficiente para identificar la influencia de agentes externos en los organismos vegetales, debido a que los diferentes elementos físicos o químicos del ambiente pueden provocar estrés para los organismos. Es así como las altas temperaturas, las heladas, la sequía, los cambios en la intensidad luminosa, la salinidad, las deficiencias nutricionales, la presencia de metales pesados, de detergentes, de herbicidas y de ozono entre otros, afectan la función del fotosistema II de manera directa o indirecta, lo cual modifica la emisión de la fluorescencia. Por ello, los cambios en la emisión de este parámetro pueden revelar mecanismos de respuesta y permiten cuantificar el cambio ante el estrés. Incluso se pueden identificar ciertos contaminantes y sus fuentes (González *et al.*, 2008).

Durante el proceso fotosintético, al absorber luz, las moléculas de clorofila *a* colectoras, excitadas tienen varias vías potenciales para volver a su estado anterior, es decir para perder su energía: Primero, puede utilizarse en una reacción química como en la fotosíntesis, mediante la transferencia de energía a otras moléculas de clorofila *a*. Segundo, la puede perder de manera inmediata, en forma de calor; es decir, se convierte

por completo en energía de translación, de vibración o de rotación. Tercero, puede perderse de manera parcial en forma de calor, y la que queda es emitida como luz visible de cualquier longitud de onda (un fotón de menor energía) distinta a la absorbida, lo que es llamado fluorescencia (Govindjee & Coleman, 1990; Salisbury & Ross, 1994).

Entonces, la fluorescencia de la clorofila *a* es la producción de luz que acompaña a la rápida disminución en la energía de los electrones que se encuentran en estado excitado. Esto se debe a que de la totalidad de la luz que absorbe la hoja, solo una parte de la luz que excita electrones, puede ser recibida por la plastoquinona (primer aceptor de electrones del fotosistema II) y el resto de la energía será llevada por otras vías (Melgarejo *et al.*, 2010).

La fluorescencia de la clorofila *a*, proporciona información sobre cambios en la eficiencia de la fotoquímica (luz usada por el fotosistema II) y la disipación de calor (Maxwell & Johnson, 2000). Por esto, los cambios que se producen en el rendimiento de fluorescencia de la clorofila *a* después de un cambio simple, un destello actínico brillante, constituyen una herramienta muy poderosa para investigar la reacción del fotosistema II (Salisbury & Ross, 1994).

Los fluorómetros modulados o no modulados permiten medir la fluorescencia de la clorofila *a*, y por tanto dan una idea de la actividad fotosintética de la planta a nivel del fotosistema II. El fluorómetro no modulado funciona a partir de la programación de flashes de luz saturantes que generan la consecuente respuesta fluorescente instantánea en la muestra, la cual es detectada por el equipo. Por medio de niveles diferentes de fluorescencia, obtenidos a partir de la aplicación de dichos destellos de luz se pueden obtener variados parámetros con los cuales se calcula la eficiencia. Los parámetros son fluorescencia mínima (F_0), fluorescencia máxima (F_m) que es la fluorescencia cuando todos los centros de reacción del fotosistema II están cerrados, y fluorescencia variable (F_v), que es la diferencia entre la F_0 y la F_m (Melgarejo *et al.*, 2010).

A partir de las anteriores medidas el fluorómetro calcula la eficiencia fotosintética como la relación F_v/F_m , que es un estimativo del rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (máxima eficiencia en la cual la luz absorbida por el PSII es utilizada para reducción de

QA). La ecuación es $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$. Los cambios en la fluorescencia por iluminación de hojas preadaptadas a oscuridad están cualitativamente correlacionados con cambios en la asimilación de CO₂ y en la tasa fotosintética (Maxwell & Johnson, 2000; Baker, 2008),

El valor obtenido es una medida potencial del desempeño fotosintético del fotosistema II, siendo de gran utilidad debido a que el fotosistema II es uno de los más sensibles al estrés. De esta manera, al disminuir F_v/F_m hay un posible estrés sobre el organismo (Maxwell & Johnson, 2000). Valores en el rango de 0.780 a 0.850, se asocian con plantas sanas y no estresadas. Valores inferiores indican estrés (Maxwell & Johnson, 2000). No obstante se ha visto que las plantas presentan disminución considerable de F_v/F_m solo cuando hay un estrés severo, ya que cuentan con un 50% extra de fotosistemas II (Lee *et al.*, 1999, citado en Melgarejo *et al.*, 2010). Esta redundancia asegura que el proceso fotosintético pueda llevarse a cabo aún bajo condiciones no óptimas para las plantas.

3. Antecedentes

3.1 *Scenedesmus ovalternus* y *Chlorella vulgaris* como bioindicadores

En los sistemas acuáticos son varios los grupos utilizados como indicadores biológicos, dentro de los cuales se destaca la comunidad fitoplanctónica debido a su alta sensibilidad a los cambios del medio en que viven, además de su importancia ecológica como primer eslabón de las redes tróficas en estos sistemas (Pinilla, 2000). Pero no solo es la presencia y ausencia de especies algales lo que permite reconocer las condiciones del medio. Otras características tanto a nivel poblacional (abundancia, crecimiento y mortalidad), como a nivel individual (fisiología y morfología) son aspectos relevantes que muestran las variaciones en los factores ambientales, siendo algunas de las especies particularmente sensibles al deterioro del sistema por contaminantes como detergentes, colorantes, pesticidas y otras sustancias tóxicas (Roldán & Ramírez, 2008).

Desde este punto de vista, la composición de la comunidad de algas es relevante en el diagnóstico del estado trófico de los sistemas acuáticos, donde la disponibilidad de nutrientes se presenta como un factor determinante para la conformación de los distintos ensamblajes algales (González, 2010). Son numerosos los estudios realizados en el mundo acerca de los sistemas acuáticos teniendo como referente las algas como bioindicadores del estado trófico del ecosistema en el que viven (Tam *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1998; Chen, 2001; Al-Rub *et al.*, 2004; Hameed, 2006; Luan *et al.*, 2006; Akhtar *et al.*, 2008; Katircioglu *et al.*, 2008; Ruiz-Marin & Mendoza-Espinosa, 2008; Ruiz-Marin *et al.*, 2010; Wehr & Sheath, 2003). Como resultado de estos estudios, ahora se conoce que cuanto mayor es la diversidad de especies algales presentes en el medio, la calidad de las aguas es mejor (Lampert & Sommer, 1997).

Uno de los grupos más utilizados en el mundo para la bioindicación en sistemas acuáticos son las algas del orden Bacillariophyceae, ya que se encuentran en todos los ambientes y además tienen la particularidad de que permanecen en el tiempo incluso después de muertas, pues sus paredes silíceas no se degradan, por lo que se usan en el biomonitoreo de ambientes actuales y fósiles (Luján, 2000). También se ha reconocido que el aumento en la mortalidad de especies poco tolerantes a excesos en los nutrientes y el aumento en el crecimiento de especies de sistemas con altos contenidos de nutrientes (eutróficos), demuestran un incremento en las sustancias contaminantes en un sistema acuático (Wehr & Sheath, 2003).

Las respuestas de estos organismos frente a los cambios en las condiciones de su medio los convierten en sensores finos de la calidad del agua y en referentes del estado ecológico del ambiente. Sin embargo, es necesario tener en cuenta otras variables relacionadas con la biología de los organismos algales, como las características morfológicas, fisiológicas, ecológicas, etc. (Pinilla, 2000). En conjunto, estas variables pueden ser aspectos que demuestren la presencia de factores adversos al crecimiento y desarrollo de las algas, tales como los metales pesados, que provocan malformaciones celulares en casi todas las especies (Luján, 2000).

3.2 Biomonitoreo de la trofía de sistemas acuáticos

Como ya se ha mencionado, el estado trófico de los sistemas acuáticos ha sido punto de interés de numerosas investigaciones, dada la preocupación del rápido deterioro que están teniendo estos ecosistemas y sus implicaciones en el equilibrio ambiental (Reynolds, 2006). Es así como se han utilizado diferentes técnicas para el seguimiento de dicho deterioro en los sistemas acuáticos, entre los cuales se resalta la medición de variables físico-químicas como el método más antiguo y más utilizado mundialmente (Roldán & Ramírez, 2008). La valoración físico-química se considera de fácil manejo e interpretación, y se basa en la medición de elementos que se encuentran en el agua como material en suspensión, sólidos disueltos, conductividad, turbiedad, alcalinidad, dureza, iones mayoritarios, fosfatos, nitratos, transparencia, temperatura del agua, pH, oxígeno disuelto, etc. Sin embargo, puede implicar costos relativamente elevados.

Otro de los métodos usados frecuentemente son las mediciones menos directas de las concentraciones de nutrientes en los sistemas, a partir de componentes orgánicos. Ejemplo de ello es el monitoreo de la demanda biológica de oxígeno (DBO), la demanda química de oxígeno (DQO), los sólidos disueltos particulados, sedimentables y totales, la materia orgánica (MO), el carbono orgánico total (COT) (en sedimentos y aguas) y la cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias heterótrofas mediante cultivos en placa, entre otros (Roldán & Ramírez, 2008).

También existe un método más sofisticado y recientemente utilizado, que es el monitoreo espacial y temporal mediante sensores remotos. Es un poco más costoso que los anteriores, pero brinda algunas ventajas, por ejemplo para el estudio de sistemas de difícil acceso, o de ambientes extensos y complejos como las planicies de inundación. Este método se basa en el uso de series temporales de imágenes MODIS, MERIS y LANDSAT para el monitoreo de sedimento, distribución del fitoplancton, distribución de clorofila *a* y calidad del agua (Mendoza *et al.*, 2011).

Mientras que estos últimos métodos tienen problemas en cuanto a los altos costos, la falta de acceso a los materiales necesarios y algunas falencias en los datos que arrojan o la dificultad de interpretación de los mismos, la medición directa de variables fisicoquímicas es una buena herramienta de evaluación de la calidad del agua. Sin embargo, este acercamiento analiza básicamente los efectos de la contaminación a corto plazo (Roldán & Ramírez, 2008), razón por la cual los métodos biológicos han tomado fuerza y se han venido desarrollando desde la década de los cincuenta como herramientas que evalúan las respuestas que ofrecen plantas y animales a la contaminación. Se ha encontrado que estos organismos indicadores determinan los efectos de los impactos en el ecosistema acuático a través de un tiempo más prolongado (Vásquez *et al.*, 2006).

El uso de indicadores biológicos como las comunidades fitoplanctónicas, zooplanctónicas, de macroinvertebrados, macrófitas e incluso algunos peces, se ha extendido en todo el mundo (Pinilla, 2000). En Colombia, se adelantan numerosas investigaciones tendientes a perfeccionar los métodos de monitoreo con indicadores biológicos (Pinilla, 2000). Inicialmente se comenzaron a aplicar índices bióticos de clasificación como los de Kolkwitz y Marsson, Pantle y Buck, Palmer, Patrick, Wurtz,

Sládecek, Nygaard, Beck, Trent, y Chandler, entre otros; todos ellos tienen como común denominador el uso de organismos para determinar el estado de trofia o saprobiedad de los sistemas acuáticos (Pinilla, 2000). Se destaca el índice de macroinvertebrados BMWP/Col adaptado para el país por Roldán (2003)

Como ya se ha visto, existen numerosos métodos para evaluar el estado trófico de los sistemas acuáticos. Estas metodologías van desde las mediciones directas de nutrientes en el agua hasta la utilización de indicadores biológicos que señalan el grado de trofia del sistema. Dentro de este último tipo de metodologías, el monitoreo biológico de la eutrofización con microalgas inmovilizadas es una técnica reciente que no se ha evaluado suficientemente a nivel internacional y que en Colombia no tiene antecedentes.

3.3 Inmovilización de algas para biomonitoreo

El uso de microalgas inmovilizadas en diferentes medios para la investigación acuática ambiental se ha incrementado recientemente. Estos trabajos abordan temas que van desde técnicas nuevas de inmovilización (Moreno-Garrido, 2008), hasta el uso de las algas como bioindicadores dentro de mecanismos electrónicos diseñados para medir la toxicidad de sustancias y de efluentes contaminantes (Faafeng *et al.*, 1994; Frense *et al.*, 1998; Podola *et al.*, 2004; Védrine *et al.*, 2003; Shitanda *et al.*, 2005).

En este mismo sentido, se han utilizado microalgas en condiciones de inmovilización para cuantificar el grado de contaminación de ríos y embalses alterados por aguas de drenaje, herbicidas (Moreira-Santos *et al.*, 2006; Peña-Vázquez *et al.*, 2009) o específicamente con nutrientes (Twist *et al.*, 1998) valorando el grado de eutrofización del agua o haciendo estudios comparativos en diferentes sistemas acuáticos oligotróficos y eutróficos (Correa *et al.*, 2009). Otras aplicaciones incluyen el ámbito pedagógico (para enseñar el proceso de fotosíntesis) (Eldridge, 2004) y el tratamiento de aguas residuales con sistemas mixtos de bacterias-algas inmovilizadas (Abdel & Hammouda, 2007; Moreno-Garrido, 2008).

En el país son escasas las experiencias con la técnica de inmovilización de algas microscópicas. De-Bashan *et al.*, (2002) y de-Bashan & Bashan (2003) reportan el

atrapamiento en alginato de células de *Chlorella vulgaris* coinmovilizadas con la bacteria *Azospirillum brasilense*, a fin de promover el crecimiento de dichas microalgas y optimizar su capacidad de remoción de nutrientes. Los resultados de estos trabajos mostraron muy buenas perspectivas para utilizar esta técnica en el tratamiento de aguas contaminadas.

En el grupo de investigación “Fisiología del estrés y biodiversidad en plantas y microorganismos” de la Universidad Nacional también se han tenido algunas experiencias en la inmovilización celular en alginato. Se han realizado trabajos de grado en temas como la caracterización bioquímica (clorofilas y carotenoides) de cianobacterias del género *Nostoc* y en la inmovilización de bacterias usando alginato de sodio, k-carragenina e hidrogel. En dicho grupo se ha trabajado también la influencia de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en las interacciones competitivas entre *Scenedesmus ovalternus* y *Chlorella vulgaris* (González, 2010). Los estudios realizados recientemente por el grupo de investigación “Biodiversidad, biotecnología y conservación de ecosistemas” sobre el desarrollo de un índice limnológico (Pinilla, 2010), la construcción de un índice de diatomeas perifíticas para evaluar el estado de los humedales de Bogotá (Castro, 2009) y la adaptación de la técnica de inmovilización de *Scenedesmus ovalternus* y *Chlorella vulgaris* en esferas de alginato de sodio (Forero, 2011), contribuyen igualmente al desarrollo del presente proyecto, ya que brindan puntos de comparación, análisis y discusión en cuanto a las especies y las variables a utilizar, y al propósito de la experimentación con algas inmovilizadas con fines de biomonitorio.

4. Metodología

4.1 Hipótesis

Al someter las poblaciones de algas inmovilizadas en alginato de calcio a diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo, se esperaba que:

- El crecimiento poblacional de *Scenedesmus ovalternus* y *Chlorella vulgaris* disminuyera proporcionalmente con la disponibilidad de nutrientes en el medio.
- La eficiencia de la clorofila en medios eutróficos y mesotróficos estuviera en valores cercanos o iguales a F_v/F_m 0.780, en ambas especies, disminuyendo por efecto de estrés en medios oligotróficos.
- El contenido de clorofilas de ambas especies disminuyera proporcionalmente con el contenido de nutrientes en el medio.
- En cápsulas de alginato conteniendo las dos especies, *Chlorella vulgaris* fuera más eficiente que *S. ovalternus*, a medida que se disminuyera la concentración de nutrientes.

4.2 Constantes

De acuerdo a los objetivos del presente trabajo, las especies utilizadas fueron *Scenedesmus ovalternus* (LAUN-001) y *Chlorella vulgaris* (LAUN-002). Las cepas, los materiales y los equipos necesarios fueron suministrados por el Laboratorio de Cultivo de Algas, el Laboratorio de Ecología y el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Vegetal, pertenecientes al Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, en donde se desarrollaron

Figura 4-1: Montaje de las botellas de cultivo según cada experimento.



todos los experimentos. Es importante aclarar que las metodologías planteadas están basadas en lo reportado en la bibliografía. Sin embargo, algunos aspectos específicos de cada una de ellas se adecuaron durante la experimentación, dado que el uso de estos métodos para microalgas inmovilizadas en alginato de calcio, han sido muy poco trabajados en el país.

Con base en los trabajos realizados por González (2010) y Forero (2011), los cultivos se mantuvieron con iluminación artificial, con lámparas fluorescentes de 39 W, 1400 lux, con una intensidad lumínica de $60 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, a una temperatura de 22°C en promedio, con un sistema de aireación y agitación con aire del ambiente y un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad. Para los experimentos se estableció un sistema de cultivo en batch en botellas de 500 ml, un volumen de cultivo total de 250 ml y una duración promedio de doce días para cada ensayo.

4.3 Cápsulas de alginato de calcio

Se inmovilizaron las algas en cápsulas de alginato de calcio, siguiendo la metodología descrita por Forero (2011), para la cual se realizó un solución de alginato con algas (en adelante preparado algal) de relación 1 a 1, entre la solución que define la concentración algal (mezcla del inóculo de concentración conocida por conteo de células, y el BBM), y alginato de sodio al 4%. Adicionalmente, se preparó cloruro de calcio en una solución de 0.66gr por 200 ml de agua destilada.

Figura 4-2: Endurecimiento de las esferas de alginato en el Cloruro de Calcio.

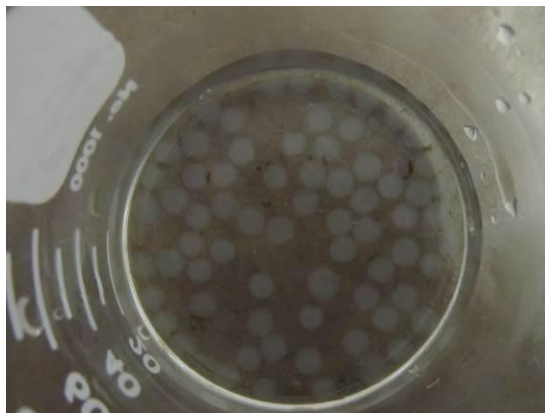


Figura 4-3: Esferas de Alginato de Calcio.

El cloruro de calcio se mantuvo a una temperatura de 4°C en una cama de hielo; con una jeringa de 1ml, se tomó el preparado algal y se dejaron caer gotas al cloruro de calcio, para conseguir 25 +/- 5 esferas por cada mililitro; con un volumen aproximado de 0.04 +/- 0.01ml por esfera. Luego las cápsulas se dejaron reposar en el cloruro de calcio durante 12 horas aproximadamente, manteniendo la

temperatura de 4°C para estabilizar las membranas y endurecer las esferas.

Las concentraciones iniciales de los inóculos utilizados para los diferentes experimentos se muestran en la tabla 4-1. Cabe anotar, que la variación en las concentraciones iniciales de células entre los ensayos realizados, se debe a la necesidad de establecer la concentración inicial óptima de cultivo, que surgió durante los experimentos a raíz de las observaciones y resultados encontrados. Además, estos resultados debían permitir tomar decisiones frente a los experimentos de campo que se realizarían posteriormente en la otra tesis de grado que enmarca el proyecto de investigación “Biomonitoreo del estado trófico de ecosistemas acuáticos lénticos con microalgas inmovilizadas”.

Tabla 4-1: Concentraciones iniciales de los inóculos de *S. ovalternus* y *C. vulgaris* utilizados para los experimentos.

Experimento	<i>Scenedesmus ovalternus</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
1. Adecuación de la metodología para medir la fluorescencia de la clorofila <i>a</i> en algas encapsuladas.	7.100.000 células por mililitro	26.300.000 células por mililitro
2. Efecto del encapsulamiento de las células en las dos especies.	7.100.000 células por mililitro	26.300.000 células por mililitro
3. Efecto de la concentración diferencial de nutrientes en el medio de cultivo, en las dos especies.	5.900.000 células por mililitro	6.300.000 células por mililitro

4. Efecto de la concentración inicial (baja) de células cultivadas, en las dos especies.	1.500.000 células por mililitro	1.400.000 células por mililitro
5. Efecto de las aguas de los sistemas acuáticos escogidos y concentración inicial alta de células, en las dos especies.	32.400.000 células por mililitro	66.800.000 células por mililitro

4.4 Montajes

Entendidos como las especies utilizadas y las formas de cultivo desarrolladas dentro de los experimentos, y sobre las cuales se determina el efecto de los tratamientos a partir de las variables medidas. En general, se realizaron tres tipos de montajes, de acuerdo a la distribución de las especies en las cápsulas, de manera que los montajes fueron: *Scenedesmus ovalternus* individual, *Chlorella vulgaris* individual y las dos especies mezcladas dentro de las esferas o también llamadas mixtas. Cabe señalar, que en los dos primeros experimentos hubo un factor adicional de los montajes que fue el cultivo de las algas de manera libre, es decir, en líquido disuelto en el medio de cultivo, en este caso se utilizaron cultivos individuales únicamente. Estos cultivos libres con el fin de ser un punto de comparación de las variables de interés, frente a las mismas algas encapsuladas.

Figura 4-4: Botella con cultivo de algas encapsuladas en alginato de calcio.



4.5 Tratamientos

Se refieren a las condiciones que se manipularon, para determinar su influencia sobre las variables medidas. Para el caso de esta investigación, los tratamientos están dados por las concentraciones diferenciales de nitrógeno y fósforo, así como por si es un medio simulado o natural.

4.5.1 En condiciones de cultivo óptimas (control):

Se utilizó Medio Básico Bold (BBM por sus siglas en inglés) preparado con las concentraciones que se muestran en la Tabla 4-2, manteniendo el pH en 6.6.

Tabla 4-2: Medio Basal de Bold (BBM) (Andersen, 2005).

Componente final	Solución stock (g/L dH ₂ O)	Cantidad usada (mL/L)	Concentración final en el medio (M)
Macronutrientes			
NaNO ₃	25.00	10	2.94 x 10 ⁻³
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2.50	10	1.70 x 10 ⁻⁴
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7.50	10	3.04 x 10 ⁻⁴
K ₂ HPO ₄	7.50	10	4.31 x 10 ⁻⁴
KH ₂ PO ₄	17.50	10	1.29 x 10 ⁻³
NaCl	2.50	10	4.28 x 10 ⁻⁴
Solución EDTA alcalina			
		1	
EDTA	50.00		1.71 x 10 ⁻⁴
KOH	31.00		5.53 x 10 ⁻⁴
Solución ácida de hierro			
		1	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	4.98		1.79 x 10 ⁻⁵
H ₂ SO ₄		1	
Solución de boro			
		1	
H ₃ BO ₃	11.42		1.85 x 10 ⁻⁴
Solución de metales traza			
		1	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.82		3.07 x 10 ⁻⁵
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.44		7.28 x 10 ⁻⁶
MoO ₃	0.71		4.93 x 10 ⁻⁶
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.57		6.29 x 10 ⁻⁶
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.49		1.68 x 10 ⁻⁶

4.5.2 Con diferentes concentraciones de nutrientes simuladas (oligotrofia, mesotrofia y eutrofia):

A partir de la metodología descrita por González (2010), se utilizó medio BBM modificado en las concentraciones de nitrógeno y fósforo; simulando los valores más altos dados para cada uno de los estados tróficos según la clasificación de Vollenweider (1968, citado por Roldán & Ramírez, 2008), que se muestra en la tabla 4-3. Aunque dicha clasificación se hace para lagos europeos o zonas templadas, es razonable aplicarla en buena parte de las zonas tropicales, basados en lo que hasta ahora se conoce y tomarla transitoriamente como punto de partida (Roldán & Ramírez, 2008).

Tabla 4-3: Concentraciones de fósforo y nitrógeno en sus distintas formas de acuerdo a la clasificación de Vollenweider (1968). En negrilla los valores que se simularon en los.

Estado trófico	Fosfatos (mgL ⁻¹)	Nitratos (mgL ⁻¹)	Nitritos (mgL ⁻¹)
Oligotrófico	0.005 a 0.01	0 a 1	0 a 0.5
Mesotrófico	0.01 a 0.03	1 a 5	0.5 a 5
Eutrófico	0.03 a 0.1	5 a 50	5 a 15

A partir de estos valores, las concentraciones de los componentes finales del BBM utilizadas, para conseguir las cantidades necesarias de nitrógeno y fósforo de los medios simulados, se muestran en la Tabla 4-4, manteniendo el pH en 6.6.

Tabla 4-4: Concentraciones simuladas de fósforo y nitrógeno en los reactivos de BBM de acuerdo a los valores tomados de la clasificación de Vollenweider (1968).

Estado trófico	Componente final	Solución stock (g/L dH ₂ O)	Cantidad usada (ml/L)	Concentración final en el medio (M)
Oligotrófico	NaNO ₃	2.31	1	2.71 x 10 ⁻⁵
	K ₂ HPO ₄	0.46	0.01	2.63 x 10 ⁻⁸
	KH ₂ PO ₄	1.08	0.01	7.91 x 10 ⁻⁸
Mesotrófico	NaNO ₃	16.56	1	1.95 x 10 ⁻⁴
	K ₂ HPO ₄	1.37	0.01	7.88 x 10 ⁻⁸
	KH ₂ PO ₄	3.23	0.01	2.37 x 10 ⁻⁷

Eutrófico	NaNO ₃	99.06	1	1.16 x10 ⁻³
	K ₂ HPO ₄	4.57	0.01	2.63 x10 ⁻⁷
	KH ₂ PO ₄	10.76	0.01	7.91 x10 ⁻⁷

4.5.3 Con agua de sistemas acuáticos con diferente nivel de trofía:

Los sistemas acuáticos para el estudio del proyecto de investigación en el que se enmarca esta tesis de grado, fueron escogidos con base en información bibliográfica con posterior comprobación fisicoquímica, que tuvieran condiciones tróficas contrastantes y se ubicarán en Bogotá. Se tomó en cuenta el estudio realizado por Rodríguez (2012), en el que se hizo una caracterización del fitoplancton y el estado trófico de los siguientes ecosistemas: Embalse de San Rafael (oligotrófico), Humedal Santa María del Lago (mesotrófico) y Humedal Juan Amarillo (eutrófico). El agua obtenida de los distintos ecosistemas se mantuvo por algunos días a temperatura ambiente y sin ningún tratamiento físico o químico, para luego realizar el montaje. Es importante resaltar que el agua tampoco fue esterilizada ni filtrada para mantener las condiciones lo más naturales posibles.

4.6 Experimentos

En total se realizaron cinco experimentos que se discuten en el presente documento, esto de acuerdo tanto a los objetivos formulados, así como a observaciones en el laboratorio que luego se transformaron en necesidades de estudio. Se hizo un diseño completamente al azar, la unidad experimental fue cada botella de 500ml con 250ml de medio y 250 esferas por botella. Los experimentos fueron los siguientes: 1. Adecuación de la metodología para medir la fluorescencia de la clorofila a

Figura 4-5: Extracción de las algas encapsuladas en alginato de calcio para mediciones diarias.



en algas encapsuladas. 2. Efecto del encapsulamiento de las células en las dos especies. 3. Efecto de la concentración diferencial de nutrientes en el medio de cultivo, en las dos especies. 4. Efecto de la concentración inicial (baja) de células cultivadas, en las dos especies. 5. Efecto de las aguas de los sistemas acuáticos escogidos y concentración inicial alta de células, en las dos especies. Es importante mencionar, que en cada uno de los experimentos se realizaron tres réplicas o unidades experimentales por cada tratamiento y montaje.

Es así como, dependiendo del experimento, se utilizaban los tratamientos y montajes en combinaciones diferentes. En la tabla 4-5, se resumen las características de cada experimento.

Tabla 4-5: Características de cada uno de los experimentos de acuerdo a los tratamientos, montajes y réplicas.

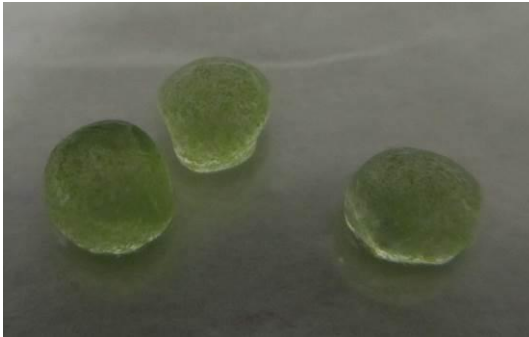
Experimento	Tratamiento	Montaje	N° de réplicas	N° de botellas
1. Adecuación de la metodología para medir la fluorescencia de la clorofila <i>a</i> en algas encapsuladas.	BBM	<i>Scenedesmus ovalternus</i> Libres <i>Chlorella vulgaris</i> Libres <i>Scenedesmus ovalternus</i> Encapsuladas <i>Chlorella vulgaris</i> Encapsuladas	1	4
2. Efecto del encapsulamiento de las células en las dos especies.	Oligotrófico simulado Mesotrófico simulado Eutrófico simulado	<i>Scenedesmus ovalternus</i> Libres <i>Chlorella vulgaris</i> Libres <i>Scenedesmus ovalternus</i> Encapsuladas <i>Chlorella vulgaris</i> Encapsuladas	3	36
3. Efecto de la concentración diferencial de nutrientes en el medio de cultivo, en las dos especies.	Oligotrófico simulado Mesotrófico simulado Eutrófico simulado BBM	<i>Scenedesmus ovalternus</i> Encapsuladas <i>Chlorella vulgaris</i> Encapsuladas Mixtas (ambas especies encapsuladas)	3	36

4. Efecto de la concentración inicial (baja) de células cultivadas, en las dos especies.	Oligotrófico simulado Mesotrófico simulado Eutrófico simulado BBM	<i>Scenedesmus ovalternus</i> Encapsuladas <i>Chlorella vulgaris</i> Encapsuladas Mixtas (ambas especies encapsuladas)	3	36
5. Efecto de las aguas de los sistemas acuáticos escogidos y concentración inicial alta de células, en las dos especies.	Oligotrófico muestreado Mesotrófico muestreado Eutrófico muestreado BBM	<i>Scenedesmus ovalternus</i> Encapsuladas <i>Chlorella vulgaris</i> Encapsuladas Mixtas (ambas especies encapsuladas)	3 BBM = 2	33

4.7 Variables

4.7.1 Crecimiento poblacional:

Figura 4-6: Microalgas encapsuladas en alginato de calcio después de 10 días de cultivo.



A partir de la metodología descrita por González (2010) y Forero (2011), se tomaron diariamente dos esferas en los tres primeros experimentos y cinco esferas en los otros dos experimentos, por cada unidad experimental. Se disolvieron las esferas en tubos eppendorf con 1ml de bicarbonato de sodio al 4%, por 24 horas a 4°C. Posteriormente se hizo conteo celular con cámara de Neubauer. Con los datos resultantes se determinó el crecimiento

poblacional para cada uno de los montajes y se realizó un análisis descriptivo, comparando los datos entre tratamientos. Cabe anotar, que el número de células está dado en términos de esferas, es decir número de células por esfera, más no por mililitro, esto teniendo en cuenta la conversión necesaria, basada en el volumen de las mismas.

4.7.2 Eficiencia fotosintética:

La importancia de adecuar la metodología para la medición de la fluorescencia de la clorofila *a* en algas encapsuladas en alginato de calcio radica en que las técnicas utilizadas hasta ahora se enfocan principalmente en la medición en plantas superiores o fases líquidas para lo cual ya existen instrumentos especializados que permiten la preadaptación a la oscuridad de las muestras y su posterior medición con flashes de luz actínica. En este aspecto se han desarrollado investigaciones que miden la eficiencia fotosintética de algas inmovilizadas, luego de ser des-inmovilizadas, mediante espectrofotómetros, espectrofluorímetros, y fluorómetros, y en algunos casos especiales fluorómetros específicos de clorofila IMAGEN-PAM (Frense *et al.*, 1998; Podola *et al.*, 2004; Védrine *et al.*, 2003). Sin embargo, en ninguno de los estudios encontrados se realiza la medición de la fluorescencia de la clorofila *a* de manera directa sobre las algas inmovilizadas y mucho menos en alginato.

Dadas las características de las muestras, para realizar dicha adecuación, se partió de la metodología descrita para plantas superiores, por Melgarejo *et al.*, (2010). Para ello, se realizó un cultivo en condiciones óptimas de las dos especies por separado, libres y encapsuladas. Entre los días 4 y 6 del cultivo, durante los cuales se encuentran en crecimiento exponencial y sin factores causantes de estrés, se tomaron las mediciones de la fluorescencia, haciendo variaciones en la intensidad de la luz del Fluorómetro (entre 1000 y 3500 $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$), el nivel de ampliación de la intensidad del haz de luz actínica (x0.25, x0.5 y x1.0), el tiempo de exposición a la luz actínica (1, 2 y 5 s) y el tiempo de preadaptación a la oscuridad (10, 15 y 30 min), a la que eran sometidas, tanto las dos especies, como en las dos condiciones de cultivo: libres y encapsuladas.

Figura 4-7: Medición diaria de Fluorescencia de la Clorofila de las algas encapsuladas.



La determinación de los valores en cada uno de los parámetros variados se basa en el método de calibración que indica el instructivo del fluorómetro no modulado, así como la teoría con respecto a la medición de la eficiencia fotosintética a través de la fluorescencia de la clorofila *a*. En este se pide tomar varias muestras y medir con los diferentes valores en aumento para cada parámetro a calibrar. Se toma como valor, aquel que arroje la mayor señal de F_v/F_m y después del cual se mantenga o disminuya la señal al modificar el valor del parámetro (Hansatech Instruments, 2006).

Bajo este esquema, se desarrollaron varios ensayos para definir los parámetros necesarios y adecuados para realizar la medición de la fluorescencia de la clorofila *a* de manera directa en las algas inmovilizadas en alginato de calcio. Se utilizó un fluorómetro no modulado marca Handy PEA de Hansatech, Inglaterra; con un adaptador de fase líquida (HPEA/LPA2) que provee un haz de luz actínica (fotosintética) en LED de color rojo de 637nm. A partir de esto, se logró determinar la configuración necesaria del fluorómetro no modulado y del adaptador de fase líquida, así como la metodología específica para realizar las mediciones correspondientes, aspectos que se presentarán en el capítulo 5.1.

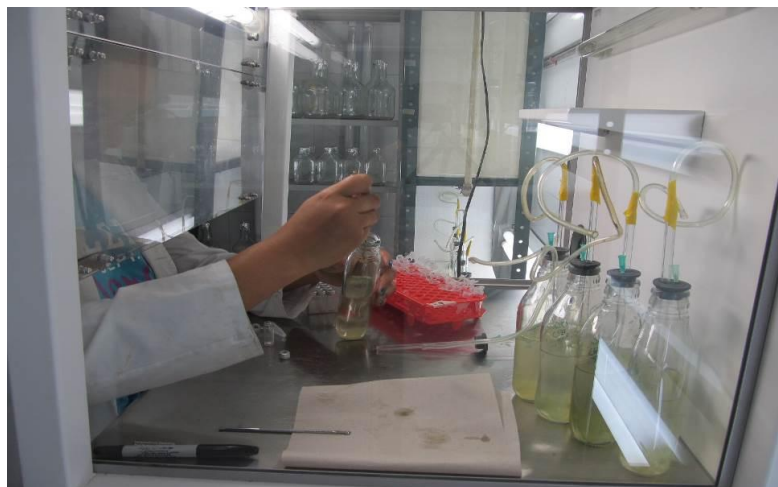
4.7.3 Contenido de clorofilas:

Se tomaron diez cápsulas por cada unidad experimental, se disolvieron cada una de las muestras en 2ml de bicarbonato de sodio al 4% y se refrigeraron a 4°C, oscurecidas con papel aluminio, por 24 horas, hasta su completa dilución. Con base en las metodologías referidas por Lichtenthaler (1987) y Melgarejo *et al.*, (2010) se continuó con el proceso de cuantificación. Para ello, la solución resultante se mantuvo en oscuridad y se pasó a través de papel filtro de microfibra de vidrio, marca Whatman grado GF/C, con un diámetro de 47mm y poro de 1.2 micras; el líquido se extrajo mediante una bomba de vacío.

Luego, cada papel filtro se maceró en 2ml de acetona al 90% y se puso en un tubo eppendorf nuevamente en oscuridad, en la nevera por 18 horas. Posteriormente se centrifugó la solución durante 10min a 1400rpm. Para separar el contenido de clorofilas. Se extrajo el sobrenadante en otro tubo eppendorf, que se aforó a 2ml con acetona al 90% v/v. Al líquido resultante se le midió la absorbancia a diferentes longitudes de onda

(647nm y 664nm) con un espectrofotómetro y se determinaron los contenidos de clorofila a y b que luego se sumaron, de acuerdo a Jeffrey & Humphrey (1975).

Figura 4-8: Extracción de las algas encapsuladas en la cámara de flujo laminar para mediciones diarias.



4.8 Análisis estadístico

Se verificó la naturaleza gaussiana de los datos de las tres variables medidas, mediante pruebas de normalidad y de homocedasticidad. En los casos de crecimiento poblacional y contenido de clorofilas, los datos fueron transformados a Log_{10} ; mientras que para fluorescencia de la clorofila a, los datos fueron transformados a raíz cuadrada; todo esto para cumplir con los supuestos del análisis de varianza y evitar coeficientes altos de variación (Zar, 1996). Se hizo un análisis de varianza (ANOVA) a una vía con nivel de significancia de 0.05, para determinar diferencias significativas entre tratamientos, tomando como fuentes de variación la condición de cultivo (libres o encapsuladas para el primer experimento) y el estado trófico del medio de cultivo (simulado o muestreado), para ambas especies dispuestas en las cápsulas por separado y mezcladas. Adicionalmente, se realizaron pruebas post hoc de comparaciones múltiples de Tukey HSD, con el objetivo de encontrar diferencias entre las medias con un $\alpha \leq 0.05$. Se agruparon conjuntos de tratamientos estadísticamente similares (por medias), mediante valores transformados seguidos por la misma letra, en las tablas que se muestran en los resultados y discusión. En el anexo B se incluyen los datos crudos correspondientes en cada análisis estadístico.

5. Resultados y Discusión

5.1 Adecuación de la metodología para medir la fluorescencia de la clorofila *a* en algas encapsuladas

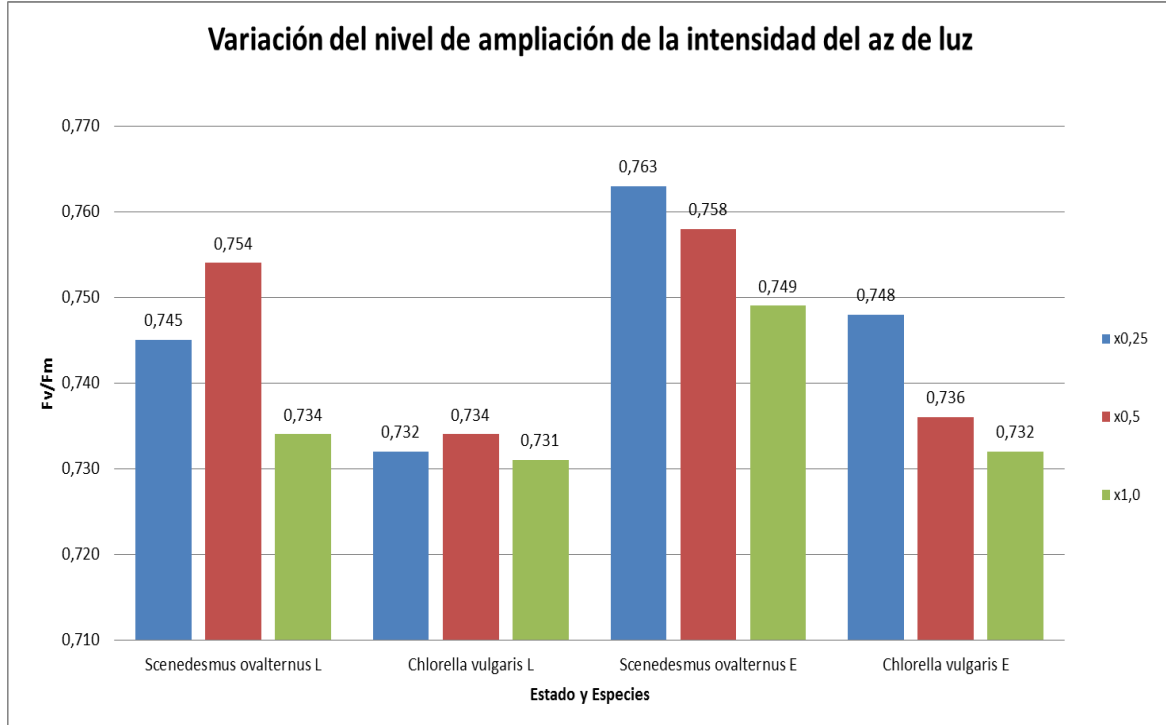
El primer parámetro establecido fue el de la intensidad de la luz del Fluorómetro no modulado. A partir del método de calibración que se establece en el manual Hansatech Instruments (2006), se obtuvieron los valores que se muestran en la tabla 5-1. De acuerdo a las señales de Fv/Fm arrojadas por el fluorómetro, se estableció una intensidad de 3000 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$, por ser la que arrojó el valor más alto de Fv/Fm.

Tabla 5-1: Medición de la fluorescencia de la clorofila *a* en las dos especies encapsuladas y libres con variación de la intensidad de la luz del Fluorómetro no modulado.

Intensidad de luz ($\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$)	1000	1500	2000	2500	3000	3500
Fv/Fm	0.491	0.542	0.660	0.727	0.764	0.758

La variación del nivel de ampliación de la intensidad del haz de luz actínica se realizó mediante el adaptador de fase líquida, haciendo mediciones a intensidades de x0.25, x0.5 y x1.0, manteniendo constante el tamaño de la señal en x0.8 para el fluorómetro no modulado dado por el autoajuste del mismo. Las mediciones se realizaron tanto para *Scenedesmus ovalternus* como para *Chlorella vulgaris* en condiciones de cultivo libres (L en las figuras) y encapsuladas (E en las figuras). Además se mantuvieron constantes el tiempo de exposición a la luz actínica en 1s y la preadaptación a la oscuridad en 10min. Como resultado (figura 5-1), se obtuvo un mayor valor de la fluorescencia de la clorofila *a* en las especies cultivadas de manera libre con un nivel de señal de x0.5, mientras que en las especies cultivadas de manera encapsulada, los valores más altos se registraron con un nivel de señal de x0.25, siendo corroborados como los valores más altos al variar el tiempo de exposición a la luz actínica, a 2 y 5s.

Figura 5-1: Medición de la fluorescencia de la clorofila *a* en las dos especies encapsuladas y libres con variación del nivel de ampliación de la intensidad del haz de luz actínica.

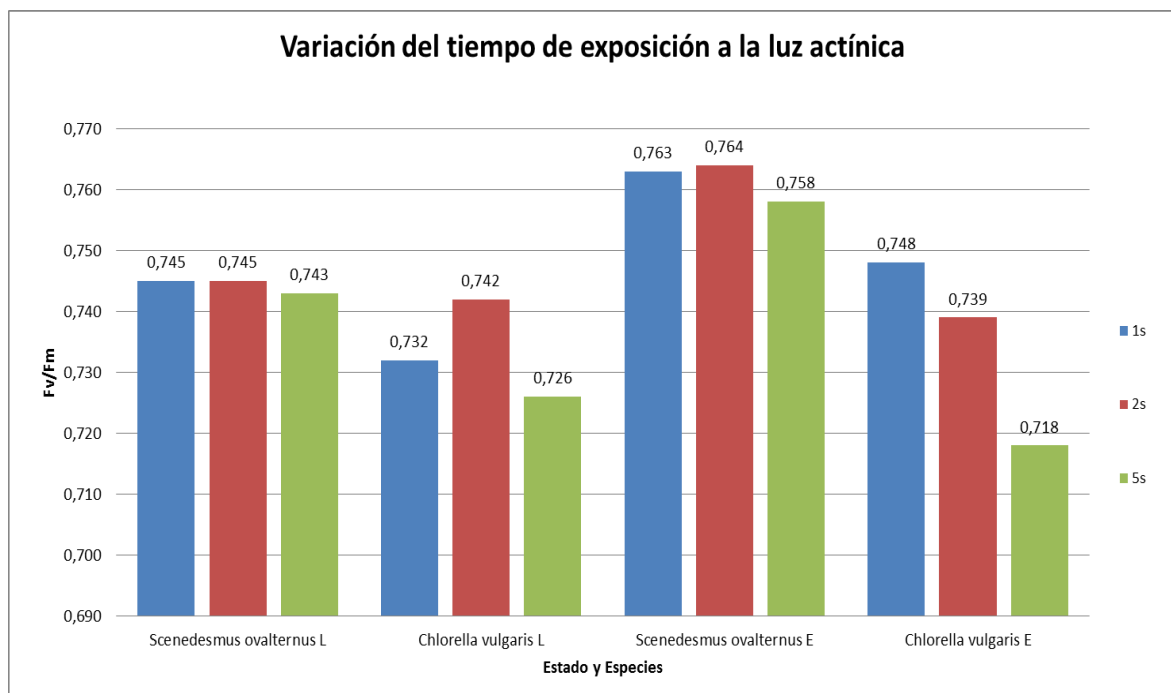


Como lo explica el manual del fluorómetro, esta función está diseñada para maximizar el tamaño de la señal durante la medición, al tiempo que garantiza que las muestras no sobrepasen la escala del instrumento. Entonces, determinar el tamaño del nivel de intensidad del haz de luz actínica dada, garantiza el máximo aprovechamiento de los niveles de la señal y al mismo tiempo que el nivel de señal de Fm se mantenga por dentro de la gama del instrumento, sin influir en las medidas por efectos en otros parámetros como el tiempo de exposición a la luz actínica o el tiempo de preadaptación a la oscuridad.

Por otra parte, el tiempo de exposición a la luz actínica se varió mediante el fluorómetro no modulado directamente, haciendo mediciones con tiempos de 1, 2 y 5s, tanto para *Scenedesmus ovalternus* como para *Chlorella vulgaris* en condiciones de cultivo libres y encapsuladas. Además se mantuvieron constantes el nivel de ampliación de la intensidad del haz de luz en x0.25 y la preadaptación a la oscuridad en 10min. Con lo anterior, se

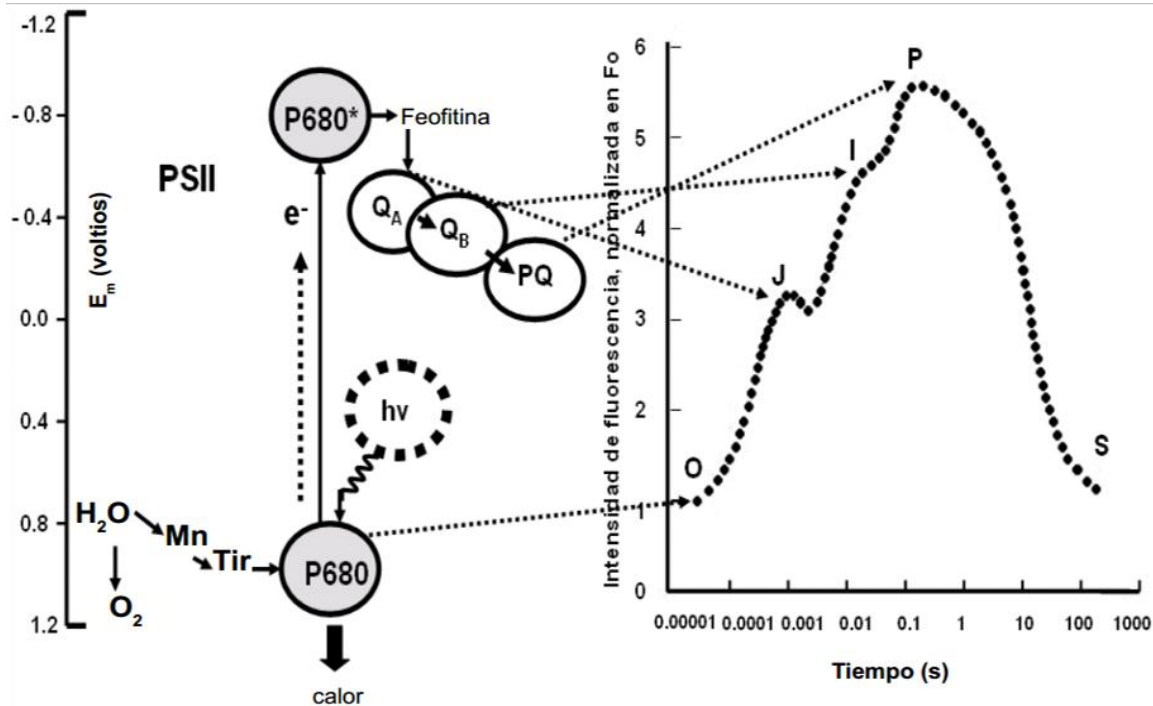
obtuvo un mayor valor de la fluorescencia de la clorofila *a* en las especies cultivadas de manera libre con un tiempo de exposición a la luz actínica de 1 y 2s para *S. ovalternus* y de 2s para *C. vulgaris*, mientras que en las especies cultivadas de manera encapsulada, los valores más altos se registraron con un tiempo de exposición a la luz actínica de 2s para *S. ovalternus* y de 1s para *C. vulgaris* (figura 5-2). Se corroboró que los valores más altos se obtuvieron en 1 y 2s, al variar el nivel de ampliación de la intensidad del haz de luz actínica.

Figura 5-2: Medición de la fluorescencia de la clorofila *a* en las dos especies encapsuladas y libres con variación del tiempo de exposición a la luz actínica.



Estos valores concuerdan con lo que se establece en la teoría, representado mediante la curva de inducción de fluorescencia o cinética de Kautsky (figura 5-3), que explica cómo la fluorescencia aumenta rápidamente en el primer segundo de iluminación, lo que es conocido como "fase rápida", con sus inflexiones O-J-I-P, y se relaciona principalmente con eventos primarios del PSII. Sigue una fase de declive durante varios minutos, denominada "fase lenta", con sus inflexiones P-S-M-T, que está asociada principalmente con interacciones entre procesos de las membranas de los tilacoides y procesos metabólicos en el estroma del cloroplasto, relacionados con un incremento en la asimilación de CO₂ (González *et al.*, 2008).

Figura 5-3: Cinética de Kautsky (González *et al.*, 2008).



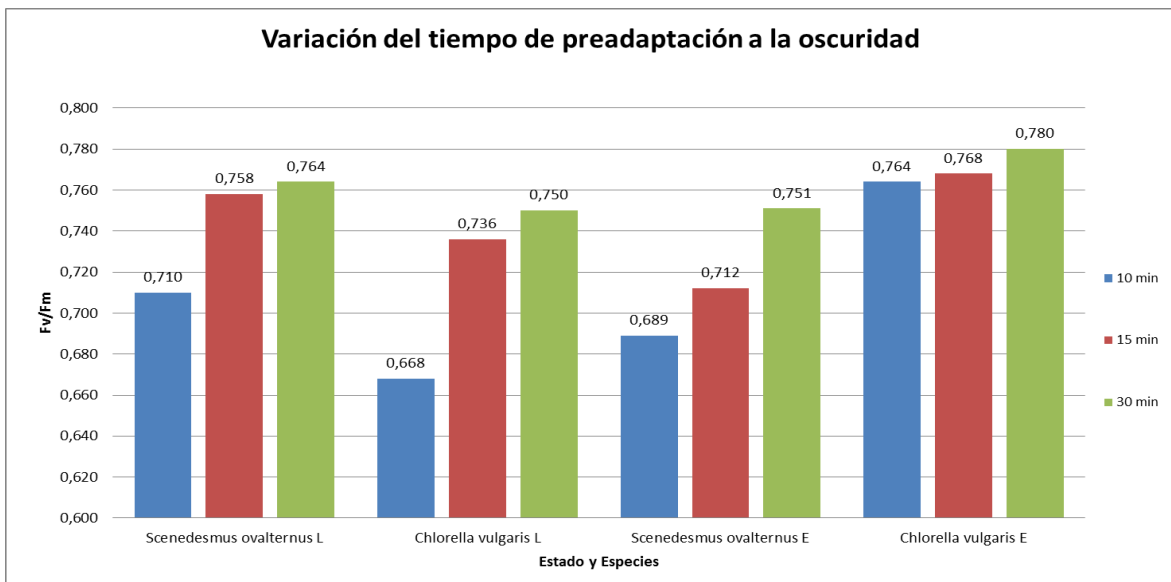
Las diferentes inflexiones de la fase rápida ocurren de manera secuencial. Se inician con la inflexión O que usualmente se expresa como la fluorescencia inicial o basal, es decir, la mínima (F_0), y ocurre cuando la quinona A está en su mayoría oxidada, es decir, es el momento en que todos los centros de reacción están oxidados o “abiertos”; aparece alrededor de los 50 μ s. El siguiente punto J, corresponde parcialmente a la reducción de la quinona A y se desarrolla a los 2ms. Continúa, el declive, I, que es un indicativo de la oxidación de la quinona A en la transferencia de electrones de la quinona A a la B y se desarrolla a los 20ms. Finalmente, en la fase rápida ocurre el punto P, que corresponde a la reducción de la plastoquinona y su intensidad normalmente se denomina F_m o fluorescencia máxima por ser el valor máximo que esta alcanza. El tiempo en el que se alcanza depende del protocolo experimental aunque en condiciones fisiológicas normales se alcanza alrededor de 1s, y es el momento en el que todos los centros de reacción están reducidos o “cerrados” (González *et al.*, 2008).

De acuerdo a lo anterior, el tiempo mínimo de exposición a la luz actínica no puede ser inferior a 1 segundo, ya que es el tiempo necesario para que se pueda dar la medición de

la fluorescencia máxima, sin embargo, ésta varía de acuerdo a la especie que se estudie siendo mínimo el tiempo mencionado, como lo ha demostrado la fase lenta de la cinética de Kautsky. Esto concuerda con lo que muestran los resultados de este estudio, que orientan a considerar los 2 segundos como un tiempo promedio de exposición a la luz actínica adecuado para la medición de la fluorescencia de la clorofila *a* en algas inmovilizadas en alginato de calcio.

De otro lado, la duración de la preadaptación a la oscuridad de las muestras se modificó manualmente, haciendo mediciones con tiempos de 10, 15 y 30 minutos, tanto para *S. ovalternus* como para *C. vulgaris* en condiciones de cultivo libres y encapsuladas. Además se mantuvieron constantes la intensidad del haz de luz en $\times 0.25$ y el tiempo de exposición a la luz actínica en 2s. Es así como, se obtuvo un mayor valor de la fluorescencia de la clorofila *a* en las especies cultivadas tanto de manera libre como encapsulada, con un tiempo de preadaptación a la oscuridad de 30min (figura 5-4), tiempo que mantuvo los valores más altos, aún con las variaciones del lapso de exposición a la luz actínica a las que se sometieron las muestras.

Figura 5-4: Medición de la fluorescencia de la clorofila *a* en las dos especies encapsuladas y libres con variación del tiempo de preadaptación a la oscuridad.



El tiempo de preadaptación a la oscuridad de 30 minutos concuerda con lo que se establece como mínimo para las plantas. Esto se debe a que, como se mencionó

anteriormente, la cinética de Kautsky explica una fase rápida y una fase lenta de la inducción de la fluorescencia. En esta última ocurren las inflexiones P-S-M-T y es durante esta fase de decaimiento, también llamada extinción de la fluorescencia, que hay un aumento en la tasa a la cual los electrones son transportados lejos del PSII. Esto obedece principalmente a la activación inducida por la luz de las enzimas implicadas en el metabolismo del carbono y en la apertura de los estomas. Dicho enfriamiento se conoce como “enfriamiento o apagamiento fotoquímico”. Al mismo tiempo, hay un aumento en la eficiencia con la que la energía se convierte en calor. Este último proceso se denomina “extinción no fotoquímica” (NPQ). En un vegetal típico, los cambios en estos dos procesos se completan dentro de aproximadamente 15 a 20 min cuando se alcanza un estado estacionario, aunque el tiempo requerido para alcanzar este estado puede variar significativamente entre especies de plantas (González *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 1990).

Cabe resaltar las diferencias en las mediciones de la fluorescencia de la clorofila *a* entre las mismas dos especies de algas cultivadas de manera libre y encapsulada. Sin embargo, estos y otros efectos del encapsulamiento de las algas se discutirán en la siguiente sección. Finalmente, las condiciones modificadas para la medición de la eficiencia fotosintética en las algas cultivadas (libres y encapsuladas) fueron las siguientes: a) Intensidad de la luz del fluorómetro no modulado de $3000\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$; b) el nivel de ampliación de la intensidad del haz de luz actínica de $\times 0.25$ dado en el adaptador de fase líquida, manteniendo constante el tamaño de la señal en $\times 0.8$ para el fluorómetro no modulado dado por el autoajuste del mismo; c) el tiempo de exposición a la luz actínica de 2s dado en el fluorómetro no modulado; y d) el tiempo de preadaptación a la oscuridad de 30min controlado manualmente.

Una conclusión inicial es que la adecuación de la metodología para la medición y estudio de la fluorescencia de la clorofila *a*, permite generar análisis fisiológicos importantes para el objetivo de este estudio. Como lo mencionan González *et al.*, (2008), “el análisis de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del fotosistema II del aparato fotosintético de plantas terrestres, acuáticas y algas permite estudiar la respuesta de los ecosistemas ante cambios globales y la dinámica de cultivos de hortalizas y especies forestales”. Igualmente hace posible valorar la utilización de algas y plantas como biorremediadores

de aguas y suelos contaminados. Es un método aplicable a las plantas o algas intactas *in situ* e *in vivo* o a cloroplastos aislados, además de ser no invasivo o destructivo, rápido y sensible.

5.2 Efecto del encapsulamiento de las células sobre las dos especies

En las observaciones y resultados de los primeros experimentos realizados, fueron evidentes las diferencias entre las microalgas cultivadas de manera libre y encapsulada, esto sumado a algunos artículos que demuestran el efecto del encapsulamiento en las células y que se retoman más adelante. En este sentido, se vio la necesidad de realizar un experimento que permitiera identificar las diferencias entre estos dos tipos de cultivo bajo las mismas condiciones planteadas como objetivos del presente trabajo, más aún bajo la intención de establecer un método de biomonitorio del estado trófico de los sistemas acuáticos, que implica un punto de comparación real con las dinámicas de estos ecosistemas.

Entonces, en este segundo experimento se cultivaron las dos especies por separado tanto en condiciones libres como encapsuladas. Se realizaron las mediciones de crecimiento poblacional y eficiencia fotosintética a diario, así como de contenido de clorofilas al final del experimento. Se encontró un comportamiento similar en ambas especies al comparar las dos condiciones de cultivo. Sin embargo existen varios efectos del encapsulamiento de las células en el crecimiento y desarrollo de las dos especies, que se discutirán en esta sección.

El crecimiento poblacional de *S. ovalternus* en condiciones de cultivo libres dio como resultado una clara diferenciación de la curva de crecimiento del tratamiento eutrófico, que estuvo por encima de los tratamientos mesotrófico y oligotrófico, como se puede observar en la figura 5-5. Estos últimos fueron bastante variables en el transcurso de los días, aunque con una tendencia a ser mayor el crecimiento en el medio oligotrófico que en el mesotrófico, de acuerdo a la observación de los valores registrados.

Figura 5-5: Crecimiento poblacional de *S. ovalternus* en condiciones de cultivo libres. Las barras verticales indican la desviación estándar.

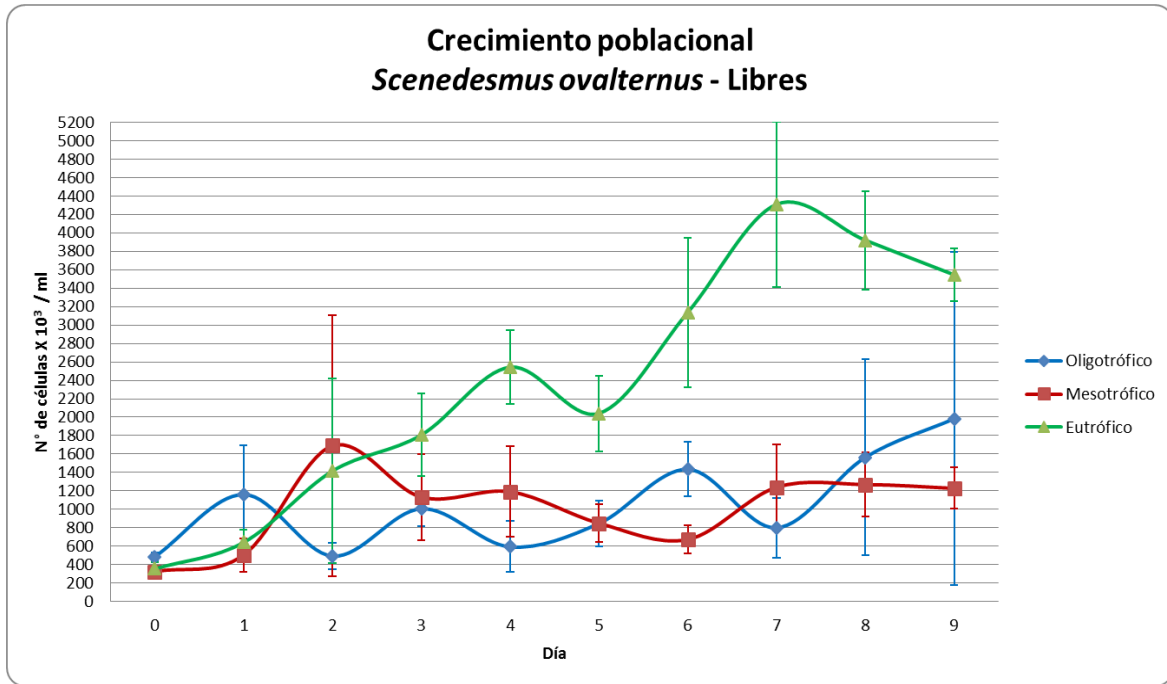
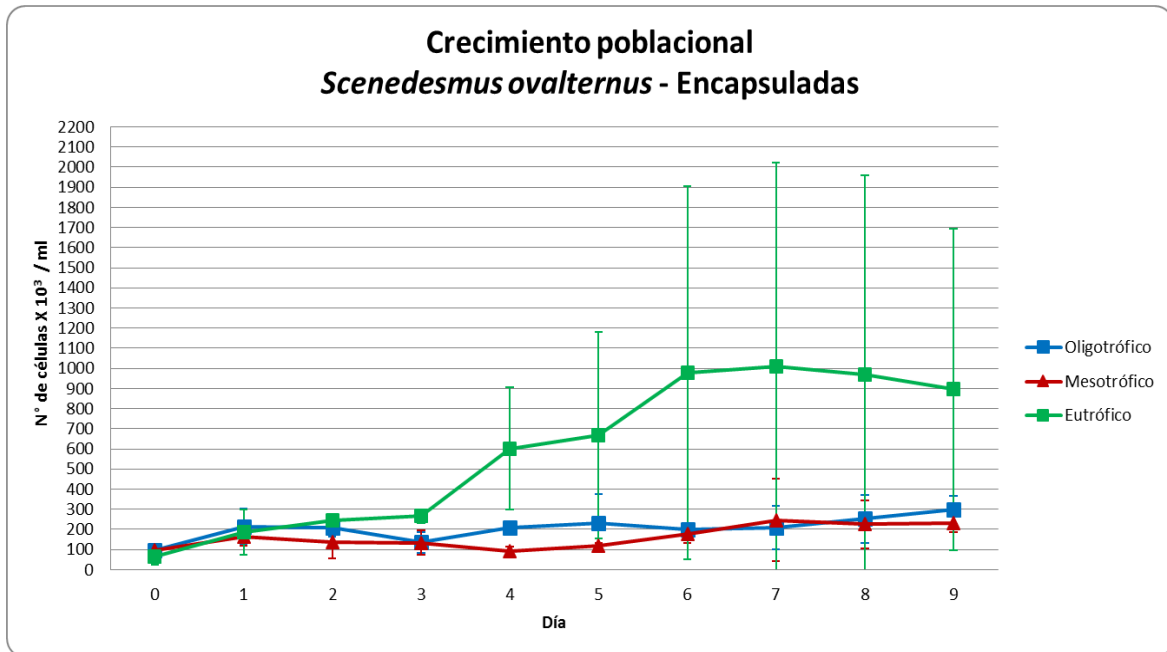


Figura 5-6: Crecimiento poblacional de *S. ovalternus* en condiciones de cultivo encapsuladas. Las barras verticales indican la desviación estándar.



Por su parte, la misma especie cultivada en condiciones encapsuladas, mostró una evidente disminución del crecimiento en todos los tratamientos, como se muestra en la figura 5-6. Aun así se mantuvo la diferencia entre los tres niveles tróficos, con un mayor crecimiento en condiciones eutróficas, seguido por las de oligotrofia y luego las de mesotrofia. Se evidencia igualmente una variación diaria en el crecimiento poblacional en las últimas dos condiciones que se comportan de manera semejante entre ellas, al contrario de la variabilidad que se muestra en el cultivo libre en la figura 5-5.

Tabla 5-2: Comparación de medias del crecimiento poblacional en *S. ovalternus*. Valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba Tukey HSD, $P > 0.05$).

Condición	<i>Scenedesmus ovalternus</i>	
Estado	Libres	Encapsuladas
Oligotrófico	5.93953 B	5.26648 D
Mesotrófico	5.93615 B	5.15263 D
Eutrófico	6.26382 A	5.54021 C

El análisis de varianza realizado a los datos del crecimiento poblacional de *S. ovalternus* monocultivada (véase anexo A), no muestra diferencias significativas teniendo como fuente de variación el estado por la condición ($Pr>F= 0.4380$), aunque si existen estas diferencias al analizar por separado los estados tróficos y las condiciones de cultivo (ambos con $Pr>F= <0.0001$), lo que respalda lo observado en las gráficas. Además, la prueba Tukey realizada (tabla 5-2) muestra que la diferencia entre el crecimiento poblacional de *S. ovalternus* en medio oligotrófico y mesotrófico es mínima en ambas condiciones de cultivo ya que no presentan letras diferentes. También es evidente (por la primera letra: A) que la condición más favorable para el crecimiento de esta especie es en el medio eutrófico en condiciones de cultivo libre; mientras que la condición encapsulada, en todos los medios, disminuye completamente el crecimiento poblacional de la especie, aunque mantiene el comportamiento diferencial entre los estados, aspecto que es de gran interés para los fines de este estudio.

Figura 5-7: Crecimiento poblacional de *C. vulgaris* en condiciones de cultivo libres. Las barras verticales indican la desviación estándar.

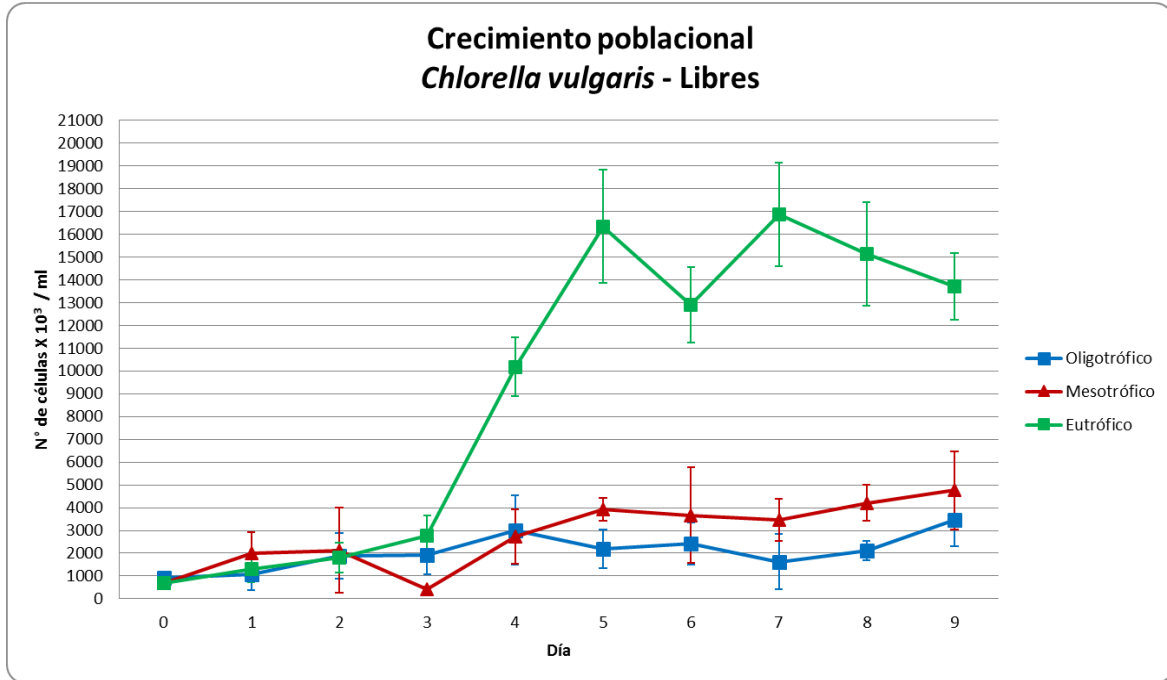
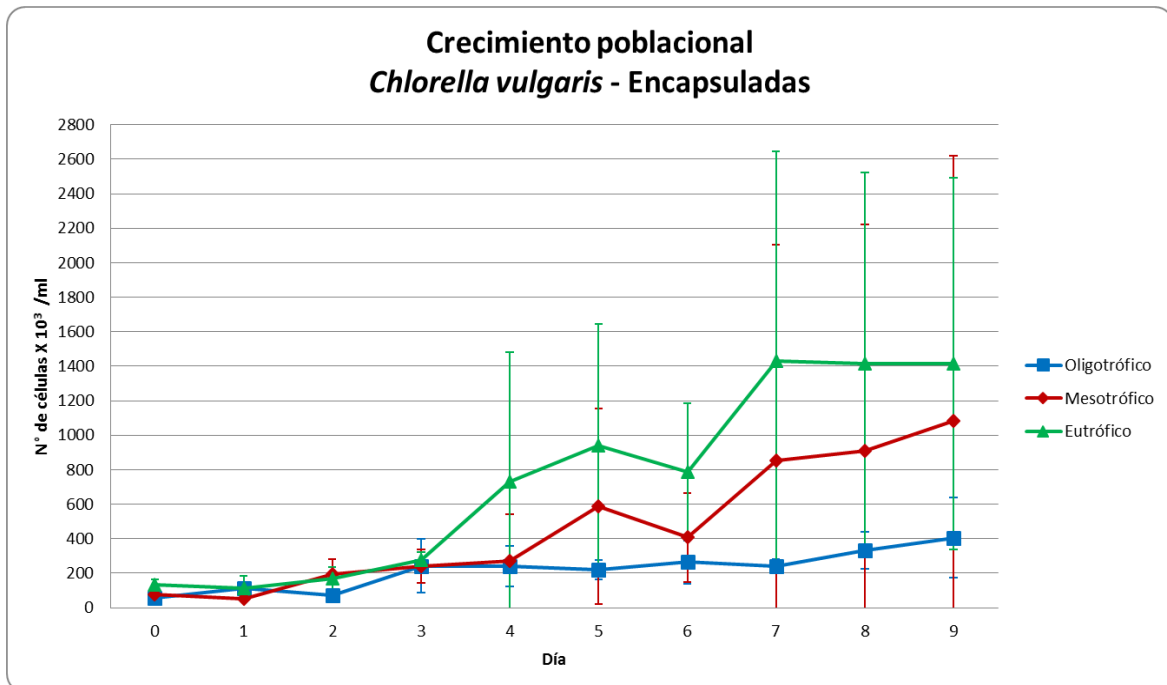


Figura 5-8: Crecimiento poblacional de *C. vulgaris* en condiciones de cultivo encapsuladas. Las barras verticales indican la desviación estándar.



Los resultados encontrados para *C. vulgaris* en ambas condiciones de cultivo no fueron muy diferentes en comparación con los de la otra especie. *Chlorella* mostró un mayor crecimiento poblacional en condiciones de cultivo libre que encapsuladas, como se puede evidenciar en las figuras 5-7 y 5-8. También se presenta un crecimiento mayor en el estado eutrófico. Sin embargo en esta especie es mucho más clara la diferenciación entre el crecimiento en estado mesotrófico y oligotrófico siendo menor en este último.

El análisis de varianza realizado a los datos del crecimiento poblacional de *C. vulgaris* monocultivada (véase anexo A), no muestra diferencias significativas teniendo como fuente de variación el estado por la condición ($Pr > F = 0.3624$), aunque si existen estas diferencias al analizar por separado los estados tróficos y las condiciones de cultivo (ambos con $Pr > F = < 0.0001$), lo que respalda lo observado en las gráficas. Además, en la prueba Tukey realizada para *C. vulgaris* (tabla 5-3) es evidente que el crecimiento poblacional es mayor en condiciones de cultivo libre y en estado eutrófico, al igual que en *S. ovalternus*. Existe una diferenciación entre el crecimiento de *C. vulgaris* en el medio mesotrófico y oligotrófico siendo menor en este último en ambas condiciones de cultivo, lo que coincide con lo esperado según la bibliografía, pero esta diferencia no es estadísticamente significativa al agruparse con la misma letra. Es importante recalcar que en ambas especies se evidenció una menor curva de crecimiento en la condición encapsulada que en la libre, lo que también es notorio en la prueba Tukey. No obstante se conserva la diferenciación del crecimiento entre los estados tróficos, lo que es fundamental para el objetivo de este estudio.

Tabla 5-3: Comparación de medias del crecimiento poblacional en *C. vulgaris*. Valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba Tukey HSD, $P > 0.05$).

Condición Estado	<i>Chlorella vulgaris</i>	
	Libres	Encapsuladas
Oligotrófico	6.25071 B	5.24089 D
Mesotrófico	6.32339 B	5.33473 D
Eutrófico	6.74673 A	5.62151 C

Estas tendencias evidentes en el crecimiento de las dos especies influidas por las concentraciones de nutrientes dispuestas en el medio, se discutirán más detenidamente

en la siguiente sección. Por lo pronto hay que señalar que los efectos de la inmovilización sobre el crecimiento de las células de estas dos especies son positivos y negativos. Por una parte, la membrana externa, así como la matriz de alginato que componen la esfera, ofrecen un ambiente propicio para las algas, brindándoles estabilidad y protección frente a las condiciones variables del medio (Abdel & Hammouda, 2007). Esto puede ser más importante en sistemas acuáticos donde se presenten fuertes variaciones en tiempos cortos, ya que el flujo de agua, los nutrientes, otros organismos, la cantidad e intensidad de la luz y los gases disueltos, entre otros factores, están regulados por el alginato que disminuye así el efecto de la variación ambiental sobre las algas.

Sin embargo, esto a su vez es la causa de los efectos negativos en las algas, ya que la regulación que brinda el alginato para las células también puede ser un agente que convierta a los factores ambientales en limitantes para el crecimiento de la población algal, especialmente al pasar los días cuando la población ha crecido de manera que se empieza a agotar el espacio ocupable en las cápsulas. Estudios realizados de ultraestructura demuestran que las células de las microalgas se distribuyen uniformemente dentro de la matriz del alginato en las cavidades formadas durante el proceso de solidificación (Lebsky *et al.*, 2001). Esto permite que la distribución de los recursos sea aproximadamente equitativa y que se dé un crecimiento uniforme de las algas encapsuladas. A pesar de lo anterior, el tamaño de las esferas de alginato limita el crecimiento poblacional de ambas especies, debido a la falta de espacio para expandirse por la matriz del polímero (Forero, 2011).

Adicionalmente, existe una clara disminución del crecimiento poblacional frente a las algas cultivadas de manera libre, como se observa claramente en las figuras 5-7 y 5-8. Este fenómeno es corroborado en otras investigaciones (Bailliez *et al.*, 1985; Robinson *et al.*, 1985; Abdel Hameed, 2002). Aunque también algunos estudios han demostrado tasas de crecimiento de algas inmovilizadas iguales o incluso mayores que en algas libres (Chevalier & de la Noue, 1985; Tam *et al.*, 1994; Lau *et al.*, 1998; Kobbai *et al.*, 2000; Rai & Mallick, 1992). En dichos trabajos se han registrado crecimientos iguales en la fase exponencial y mayores en la fase final (después de 15 días), lo que concuerda con lo explicado anteriormente frente a la estabilidad que proporciona el alginato. Un

factor adicional podría ser la disminución del metabolismo de las células, lo cual estaría más relacionado con la actividad fotosintética de las algas.

De acuerdo a los efectos negativos del encapsulamiento en las algas ya mencionados, existen condiciones particulares y limitantes que influyen en el rendimiento metabólico de las algas, haciéndolo más lento. A este respecto se han desarrollado algunos estudios relacionados con la frecuencia respiratoria y la evolución del oxígeno en las algas inmovilizadas. Por ejemplo se encontró que la evolución de oxígeno fue mayor en el estado de inmovilización, lo que sugiere un cambio fundamental del metabolismo (Bailliez *et al.*, 1988; Garnham *et al.*, 1992; Abdel Hameed, 2002). Robinson *et al.*, (1985) encontraron un menor ritmo respiratorio medio en *Chlorella* encapsulada que libre, lo que sugiere que sólo una proporción de las células inmovilizadas en las esferas son metabólicamente activas. Por su parte Tam *et al.*, (1994) hallaron que la actividad metabólica de *Chlorella* indicada a través de la frecuencia respiratoria de la célula a baja densidad, era similar a la de las células libres pero que la actividad de las células inmovilizadas se reducía a medida que aumentaba la densidad de la población.

Frente a la medición de la eficiencia fotosintética y de acuerdo a lo discutido en la sección anterior, se pudo evidenciar que a pesar de la adecuación de la metodología, el rango de valores que se asocian con un estado sano y de no estrés para las algas es de 0.730 a 0.780 F_v/F_m . El cual es menor que para las plantas (0.780 a 0.850) (Maxwell & Johnson, 2000). Esta diferencia puede deberse al cambio de las condiciones externas e internas de las algas, que tendrían una menor eficiencia fotosintética que la de los organismos vegetales superiores. Algunas causas posibles son el medio líquido en que se desarrollan, la presencia de algo especial a nivel de los fotosistemas, la predominancia de un fotosistema sobre el otro, la evolución de estos vegetales primitivos u otros aspectos. Sin embargo, como se explicó en el marco teórico, esta medida es importante en cuanto a la disminución de F_v/F_m , ya que se detecta un posible estrés sobre el organismo (Maxwell & Johnson, 2000). No obstante se ha visto que el vegetal presenta disminución considerable de F_v/F_m sólo cuando hay un estrés severo ya que cuenta con un 50% extra de fotosistemas II (Lee *et al.*, 1999, citado en Melgarejo *et al.*, 2010). Es por esta razón que se ha establecido que valores de F_v/F_m inferiores a 0.600 sugieren que el organismo vegetal está en condiciones de estrés (Ritchie, 2006).

Figura 5-9: Eficiencia fotosintética de *S. ovalternus* en condiciones libres. Las barras verticales indican la desviación estándar.

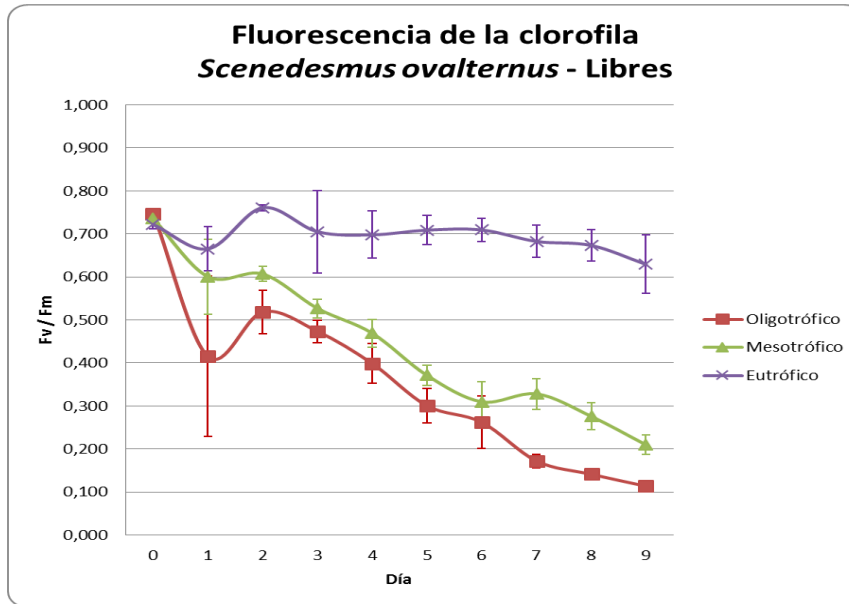
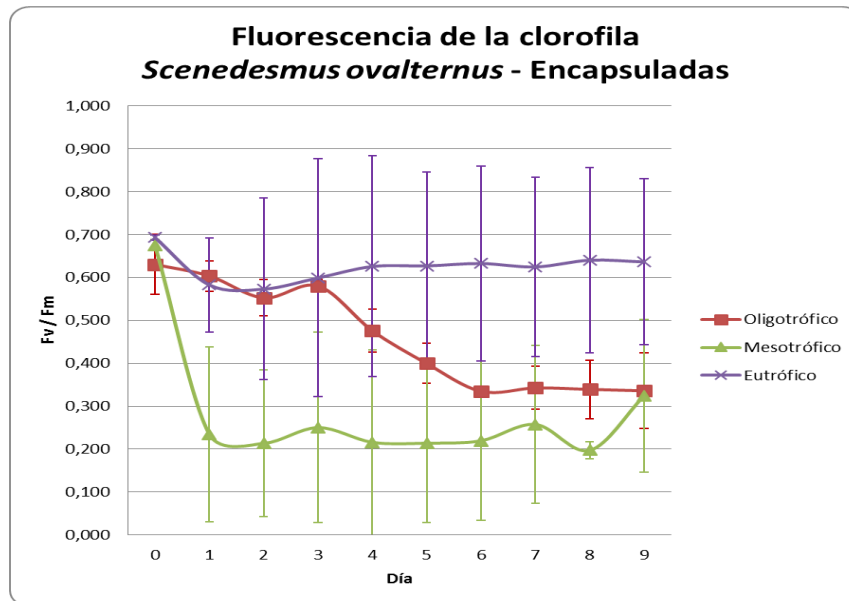


Figura 5-10: Eficiencia fotosintética de *S. ovalternus* en condiciones de encapsulamiento. Las barras verticales indican la desviación estándar.

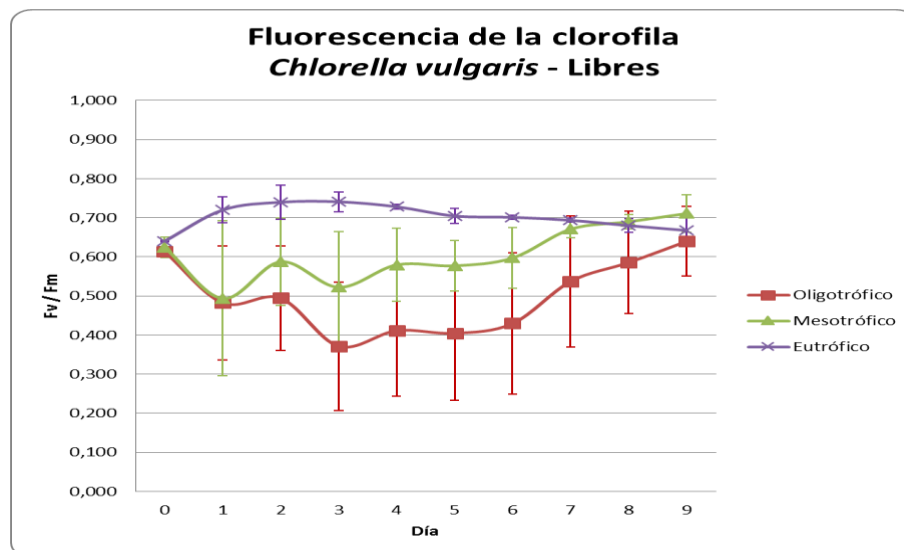


El comportamiento de la eficiencia fotosintética de *S. ovalternus* es congruente con lo que se espera de acuerdo al estado trófico que simulan los medios (figura 5-9). Se entiende que las algas al tener mayor cantidad de nutrientes, en este caso nitrógeno y

fósforo, presentan un mayor crecimiento poblacional y son más eficientes en su metabolismo y en su productividad, teniendo una mayor actividad fotosintética que se refleja en valores más altos de fluorescencia de la clorofila *a*. Este hecho parece especialmente cierto para especies como *S. ovalternus* que se asocian con estenotolerancia a condiciones eutróficas (Reynolds, 1998b). Esta tolerancia, también explica la tendencia que tienen los valores de eficiencia fotosintética a disminuir al pasar los días, más fuertemente evidente en los medios mesotrófico y oligotrófico, debido a la progresiva limitación que se presenta de nutrientes para las algas, dado su agotamiento paulatino.

Por otra parte, la eficiencia fotosintética de *S. ovalternus* en condiciones de cultivo encapsuladas tiende a mostrar una mayor estabilidad en los valores, a pesar de ser bastante bajos para condiciones oligotróficas y mesotróficas. En estos medios menos enriquecidos la eficiencia es notablemente menor como se muestra en la figura 5-10. En cuanto al comportamiento de la curva en el medio mesotrófico, se pudieron establecer problemas de medición de la fluorescencia de la clorofila *a*, por lo que los valores obtenidos no son fiables como es notorio en la figura 5-10.

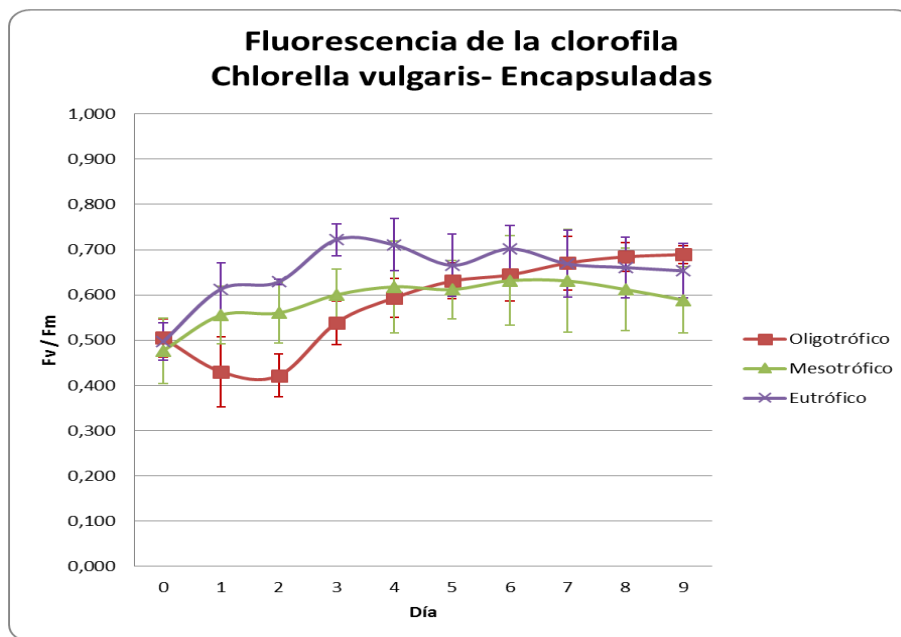
Figura 5-11: Eficiencia fotosintética de *C. vulgaris* en condiciones libres. Las barras verticales indican la desviación estándar.



En la figura 5-11 se puede observar una tendencia a la estabilidad en los valores de eficiencia fotosintética para *C. vulgaris* en condiciones de cultivo libres. Esto concuerda

con las características propias de la especie, ya mencionadas en el marco teórico, entre las cuales están sus altos rangos de tolerancia a la variabilidad en las concentraciones de nutrientes en el medio (Reynolds, 1998b), lo que le permite encontrarse frecuentemente en cualquier tipo de estado trófico. A su vez esto se refleja en el aumento de la fluorescencia después del día 4 para las condiciones mesotróficas y oligotróficas, con una propensión a estabilizar los valores hacia los últimos días del experimento.

Figura 5-12: Eficiencia fotosintética de *C. vulgaris* en condiciones de encapsulamiento. Las barras verticales indican la desviación estándar.



La tendencia a la estabilidad de la eficiencia en esta especie se mantiene para las condiciones de encapsulamiento. Sin embargo, en la figura 5-12 se muestra cómo los valores de fluorescencia de estas algas no tienden a disminuir tanto como en condiciones libres. Esto se puede atribuir al efecto de estabilidad que brinda el alginato y que reduce la influencia de los factores del entorno sobre la fisiología de los individuos (Abdel & Hammouda, 2007). A pesar de esta tendencia, es clara la disminución de la eficiencia fotosintética al aumentar el crecimiento poblacional. Tam *et al.*, (1994) y Robinson *et al.*, (1985) hallaron resultados similares para *C. vulgaris* inmovilizada; estos autores sugieren que la actividad metabólica celular de *Chlorella* encapsulada disminuye al aumentar su densidad poblacional.

La estabilidad que puede llegar a brindar el alginato a las células encapsuladas es un aspecto clave para los objetivos del presente trabajo, sin embargo, es importante retomar el efecto de la limitación por luz que ya se había mencionado, teniendo en cuenta que no parece ser un factor que cause profundos cambios, al menos bajo las condiciones en que se realizó este trabajo. Sin embargo, la magnitud de éste efecto podría aumentar dentro de las esferas al aumentar la densidad celular con el tiempo. No solo se limita el crecimiento poblacional de la especie dentro de las cápsulas sino también su eficiencia fotosintética, ya que las microalgas situadas en el centro de las esferas tienen un acceso menor a la luz y como consecuencia, no les es posible mantener una actividad fisiológica normal (Chevalier & de la Noüe, 1985; Tam *et al.*, 1994). En este sentido es adecuado considerar que el tiempo de cultivo de las especies encapsuladas no debe ser muy alto, para evitar que esta limitación sea mayor, como se demuestra con los experimentos del presente trabajo, en donde la limitación por la luz no fue un factor limitante para las algas dado el tiempo de cultivo y con ello la densidad poblacional alcanzada.

Así mismo, es importante determinar la cantidad adecuada de luz para evitar la inhibición de la fotosíntesis o alcanzar los máximos niveles de biomasa, de absorción de nutrientes o de contenido de proteína, según sea el objetivo del trabajo que se pretenda realizar. Chevalier & de la Noüe (1985) reportaron que un mayor número de células dentro de las esferas reduce la eficiencia de remoción de nutrientes y el crecimiento algal debido al efecto de auto-sombreado. Por su parte, Panel *et al.*, (1998) señalan que la limitación de luz por este mismo efecto es una de las principales causas que afecta el contenido de proteína de las algas en los sistemas inmovilizados. Además, aunque pareciera que los efectos de sombreado se podrían resolver aumentando la luz en la superficie, la alta irradiación inhibe la fotosíntesis, lo cual no es deseable en cultivos inmovilizados.

El análisis de varianza para la eficiencia fotosintética (véase anexo A) de las dos especies se hizo por separado aunque en ambos casos arroja diferencias significativas ($Pr > F = < 0.0001$ y 0.0001). En la tabla 5-4 se incluyen los resultados de la prueba de Tukey para cada especie, evidenciando el comportamiento que ya se había descrito anteriormente apoyado en las figuras 5-9 a 5-12. Además, es evidente la diferencia con el análisis de crecimiento poblacional, en cuanto a la similitud de los valores entre las condiciones de cultivo, además de ser menores los valores para las algas encapsuladas, lo que no ocurría en el análisis del crecimiento poblacional. Lo anterior, podría deberse a

que la eficiencia fotosintética depende más de las características fisiológicas del alga que de las condiciones externas (Bjorkman & Demming, 1987), sin dejar de lado que el tamaño de la población puede generar variaciones notorias en la eficiencia fotosintética como se ha evidenciado en los experimentos de este estudio.

La tabla 5-4 demuestra el aspecto fundamental que se había mencionado también en el análisis del crecimiento poblacional, esto es, que a pesar de existir un claro efecto del encapsulamiento en las algas, su comportamiento diferencial como respuesta a la concentración de nutrientes en el medio se mantiene. Esto será determinante en las siguientes secciones de este trabajo, ya que de ello depende el objetivo de este estudio, en cuanto a analizar el efecto de diferentes concentraciones de nutrientes en poblaciones de *Scenedesmus ovalternus* y *Chlorella vulgaris* inmovilizadas en alginato de calcio y su utilidad como método de biomonitorio, bajo condiciones de laboratorio.

Tabla 5-4: Comparación de medias de la eficiencia fotosintética en *S. ovalternus* (izq.) y en *C. vulgaris* (der.). Valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba Tukey HSD, $P > 0.05$).

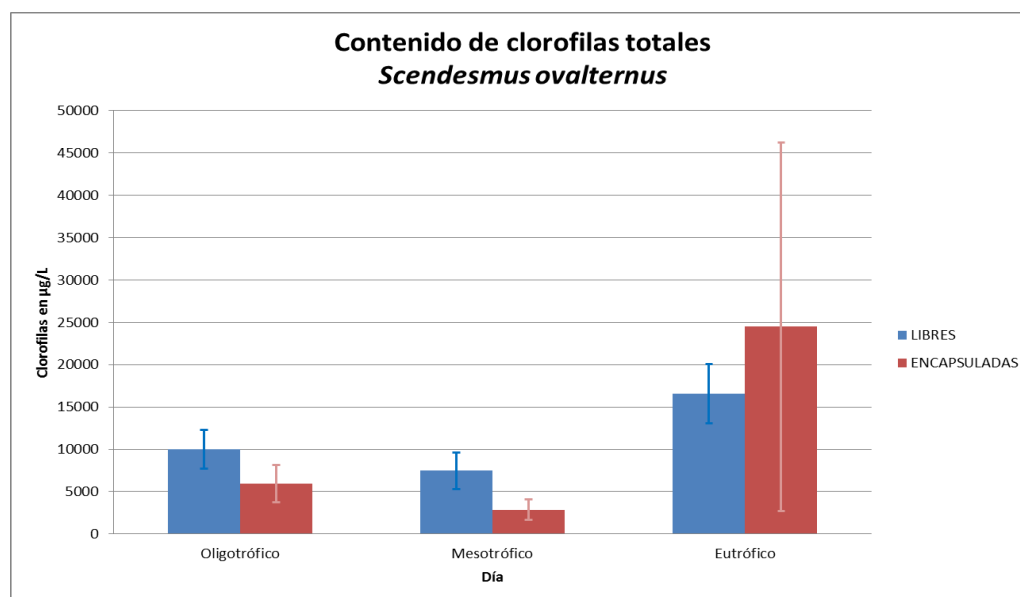
Condición	<i>Scenedesmus ovalternus</i>		Condición	<i>Chlorella vulgaris</i>	
	Libres	Encapsuladas		Libres	Encapsuladas
Oligotrófico	0.91855 C	0.97748 B	Oligotrófico	0.99561 D	1.03840 C
Mesotrófico	0.96764 B	0.87677 C	Mesotrófico	1.05016 BC	1.04268 BC
Eutrófico	1.09315 A	1.05658 A	Eutrófico	1.09610 A	1.07281 AB

Al igual que para el caso de la determinación de la eficiencia fotosintética, no existe un método diseñado para extraer la clorofila en algas encapsuladas. Por lo tanto, se tomó como base la técnica planteada por Jeffrey & Humphrey (1975) y la de plantas superiores citada por Melgarejo *et al.*, (2010), se hicieron adecuaciones manifestadas en la metodología del presente documento.

Se vio un comportamiento en el contenido de clorofilas de ambas especies acorde con lo encontrado en el crecimiento poblacional. Los resultados también muestran coherencia con lo planteado en la bibliografía, ya que se espera que a mayor densidad poblacional haya un mayor contenido de clorofilas (Jeffrey & Humphrey, 1975). De acuerdo a lo

anterior, para *S. ovalternus* la concentración de clorofilas es mayor tanto en las algas libres como en las encapsuladas, en el estado eutrófico, seguido por el oligotrófico y por último el mesotrófico (figura 5-13), lo que concuerda con los resultados del crecimiento poblacional. Igualmente, es importante evidenciar en la misma figura, que al comparar los tres estados tróficos en las dos condiciones de cultivo por separado, se encuentra un comportamiento similar, lo que apunta de manera favorable al cumplimiento de los objetivos del proyecto macro al que pertenece este trabajo.

Figura 5-13: Contenido de clorofilas de *S. ovalternus* libres y encapsuladas. Las barras verticales indican la desviación estándar.

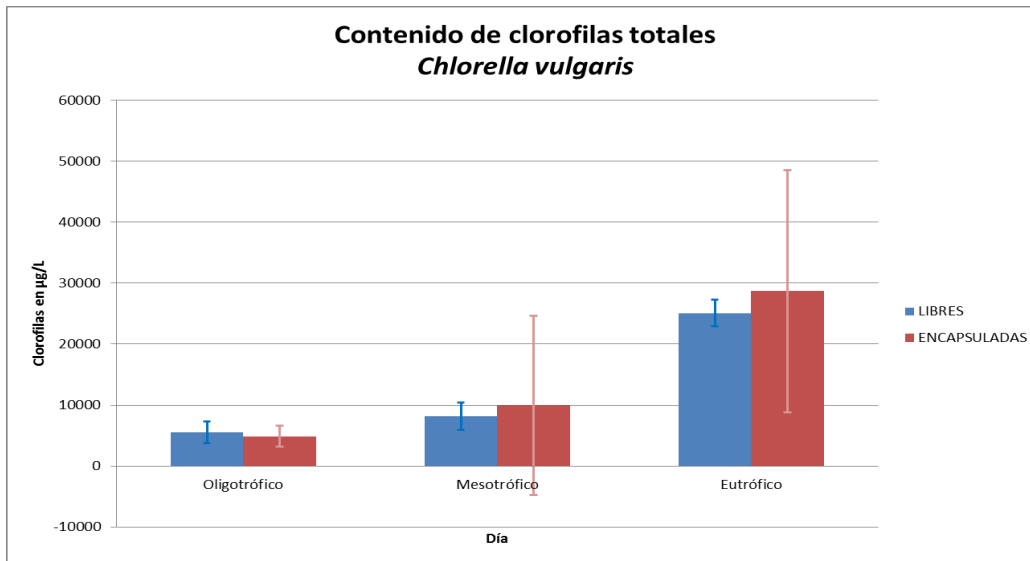


Sin embargo, al comparar las dos condiciones de cultivo en cada uno de los estados de manera independiente, se hace evidente un comportamiento contradictorio, en cuanto a que en el estado eutrófico el contenido de clorofilas es mayor en las algas encapsuladas, mientras que en los estados oligo y mesotrófico este valor es mayor en condiciones de cultivo libres. Esto se puede explicar por el efecto de la densidad de células en las esferas que es mucho mayor en el estado eutrófico, lo que trae como consecuencia, como ya se mencionó antes, un efecto de auto-sombreado para las algas, en donde la reducción de la luz incidente en las células causa un aumento en la cantidad de pigmentos fotosintéticos que sintetizan las algas para contrarrestar la disminución de luz disponible. Esto se ha comprobado en algunos estudios (Robinson *et al.*, 1985; Bailliez *et al.*, 1986; Abdel Hameed, 2002), en los que se encontró que el contenido de clorofilas de

las células inmovilizadas generalmente es mayor que la de las células libres, aduciéndolo al efecto del auto-sombreado.

Aunque de manera no tan evidente, en *C. vulgaris* existe un mayor contenido de clorofilas en las algas encapsuladas en condiciones mesotróficas y eutróficas, opuesto al resultado en condiciones de oligotrofia, aunque la diferencia es mucho menor que en la otra especie estudiada (figura 5-14). Al contrastar los resultados de esta variable con los del crecimiento poblacional, se observa que el único resultado que concuerda es el del estado oligotrófico, ya que es allí donde la densidad poblacional es mayor en condiciones libres que encapsuladas. Frente a esta dicotomía de los resultados, existen dos aspectos importantes a tener en cuenta; por un lado el efecto del auto-sombreado que también se menciona para la otra especie; y como segundo aspecto, la adecuación de la metodología de extracción del fotopigmento que puede tener la interferencia del alginato y por ello mostrar los resultados contradictorios.

Figura 5-14: Contenido de clorofilas de *C. vulgaris* libres y encapsuladas. Las barras verticales indican la desviación estándar.



El análisis de varianza realizado a los datos del contenido de clorofilas de cada especie monocultivadas de manera libre y encapsulada, no muestra diferencias significativas teniendo como fuente de variación el estado por la condición, o cada uno de estos por aparte ($Pr > F = > 0.05$; véase anexo A). Sin embargo, en la prueba Tukey realizada (tabla

5-5) se muestran valores acordes con los encontrados en las figuras ya discutidas. Sin embargo cabe mencionar dos aspectos relevantes a la luz de la prueba Tukey. En primer lugar la incongruencia de los resultados del contenido de clorofilas en el estado eutrófico que es mayor en condiciones encapsuladas, se puede explicar por el efecto del auto-sombreado a partir del análisis estadístico. Este demuestra una mayor densidad de células en esta condición, lo que daría más peso a este argumento. En segundo lugar, a diferencia de lo presentado en la figura 5-14, los valores de clorofilas en estado eutrófico concuerdan con los del crecimiento poblacional, siendo estadísticamente mayor en condiciones de cultivo libre que en encapsulada, aunque la diferencia es mínima.

Tabla 5-5: Comparación de medias del contenido de clorofilas en *S. ovalternus* (izq.) y en *C. vulgaris* (der.). Valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba Tukey HSD, $P > 0.05$).

Condición	<i>Scenedesmus ovalternus</i>		Condición	<i>Chlorella vulgaris</i>	
	Libres	Encapsuladas		Libres	Encapsuladas
Oligotrófico	3.9934 AB	3.7553 AB	Oligotrófico	3.7293 BC	3.6738 C
Mesotrófico	3.8597 AB	3.4313 B	Mesotrófico	3.9025 ABC	4.0635 ABC
Eutrófico	4.2128 A	4.2309 A	Eutrófico	4.3983 A	4.3803 AB

Como se ve, los resultados del análisis estadístico de *C. vulgaris* cultivada en estado eutrófico son contradictorios con respecto a los que muestra la figura 5-14. Los posibles errores en la adecuación de la metodología hace necesario analizar de manera objetiva los resultados, y sugiere la necesidad de realizar estudios adicionales que pongan a prueba la metodología de extracción de clorofilas en algas encapsuladas y su correspondiente análisis estadístico. Esto permitirá en futuros trabajos determinar la validez de estos resultados, ya que el argumento del efecto del auto-sombreado en el aumento del contenido de clorofilas puede ser discutible, a la luz de su magnitud y del tiempo de cultivo necesario para que la población desarrolle esta estrategia fisiológica en respuesta a la disminución de luz. En cambio, el incremento de la densidad poblacional sí parece ser una explicación sólida del aumento del contenido de clorofilas en uno u otro estado trófico. Sin embargo, de acuerdo a la finalidad de la discusión en esta sección, los resultados en condiciones de cultivo con encapsulamiento muestran un comportamiento similar al de los cultivos libres, aunque con una magnificación en la cantidad de clorofilas en las algas encapsuladas en la medida en que sea mayor el estado trófico.

Todo lo anterior demuestra que hay diferencias en el crecimiento de las algas cuando están encapsuladas y libres, sin embargo en ambos casos se ven afectadas de forma similar, por efecto de la influencia de los estados tróficos simulados, permitiendo un análisis equivalente a la condición de cultivo libre. Por lo tanto se puede medir el efecto de la concentración diferencial de los nutrientes sobre las especies. Con ello, se concluye que es posible usar las algas encapsuladas para el biomonitoreo del estado trófico de los sistemas acuáticos.

5.3 Efecto de la concentración diferencial de nutrientes en el medio de cultivo, sobre las dos especies inmovilizadas en esferas de alginato

En este experimento se obtuvieron los resultados más completos de los montajes realizados, ya que fue posible medir las tres variables de interés, en las dos especies cultivadas por separado y mixtas, y en los cuatro tipos de tratamiento (BBM, Oligotrófico, Mesotrófico y Eutrófico). Esto permitió identificar el comportamiento de las variables en cada una de las condiciones expuestas, lo que a su vez contribuye significativamente para establecer las características básicas del sistema de biomonitoreo basado en algas inmovilizadas, que es el objetivo fundamental de esta investigación.

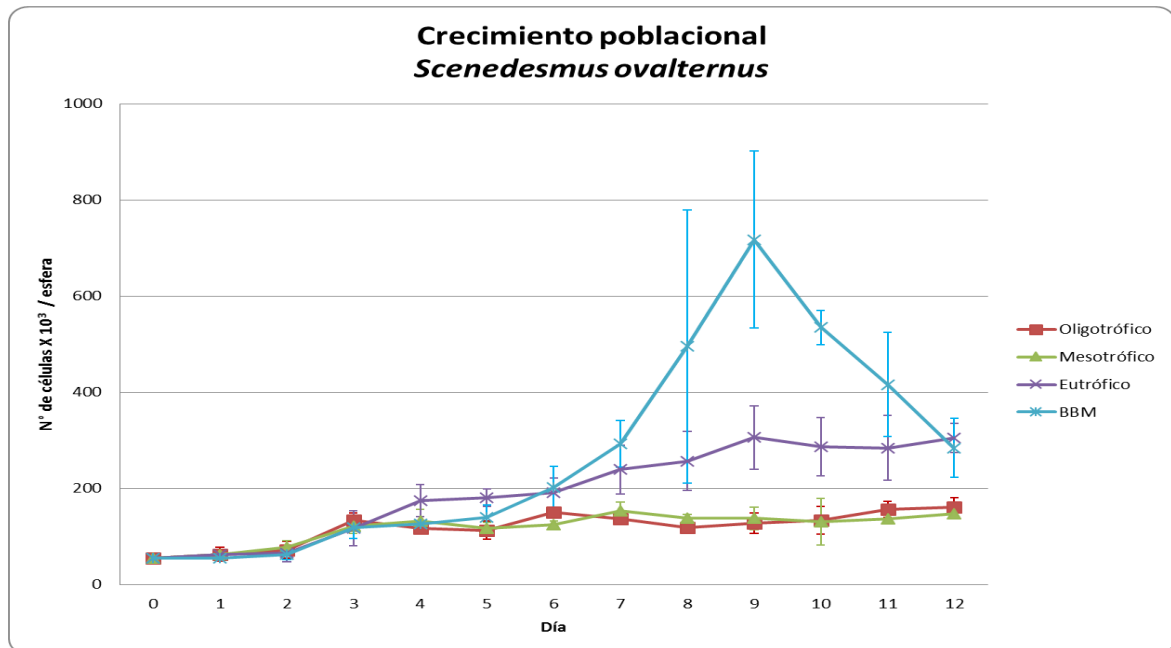
Al medir el crecimiento poblacional diario en ambas especies inmovilizadas hasta la estabilización de la curva de crecimiento, se pudo corroborar que la fase estacionaria en estas especies comienza entre los 8 y 10 días, completándose hacia los 15 o 16 días, cuando empieza a descender la curva. Si bien hay diferencias según el tipo de cultivo (encapsuladas o libres), el comportamiento es el mismo, aunque con respuestas ligeramente menores en la condición de encapsulamiento que en la de libertad. Aun así las curvas de crecimiento se manifiestan de manera similar.

Como se muestra en las figuras 5-15 a 5-18, existe una distinción entre el crecimiento de las especies en los diferentes medios de cultivo. El mayor valor correspondió al medio BBM que ofrece no solo las concentraciones ideales de todos los nutrientes para las algas, sino también las proporciones adecuadas entre ellos, que optimizan su rápido crecimiento y reproducción. El comportamiento de las curvas fue acorde a la cantidad de

nutrientes que ofrece cada uno de los medios simulados, como lo indica la bibliografía (Roldán & Ramírez, 2008; Margalef, 1983). El orden en el crecimiento después del BBM, fue: eutrófico, mesotrófico y oligotrófico. Este último tuvo el menor crecimiento por ser el de menor concentración de nutrientes.

El crecimiento poblacional de ambas especies tanto en monocultivos como cultivadas de manera mixta (figuras 5-15 a 5-18), muestra una alta similaridad entre los primeros días del cultivo, a pesar de que la concentración de nutrientes es diferente. Esto se explica porque el tamaño de la población inicial es baja lo que limita el crecimiento poblacional y esto a su vez el consumo de los recursos disponibles en el medio (Lebsky *et al.*, 2001). Adicionalmente, se muestra una etapa de adaptación al medio por parte de las algas, que se completa hacia el tercer día cuando empieza a aumentar el crecimiento y es desde allí donde se comienzan a diferenciar las curvas de cada especie en cada tipo de medio de cultivo.

Figura 5-15: Crecimiento poblacional de *S. ovalternus* monocultivada en diferentes niveles de trofia simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.

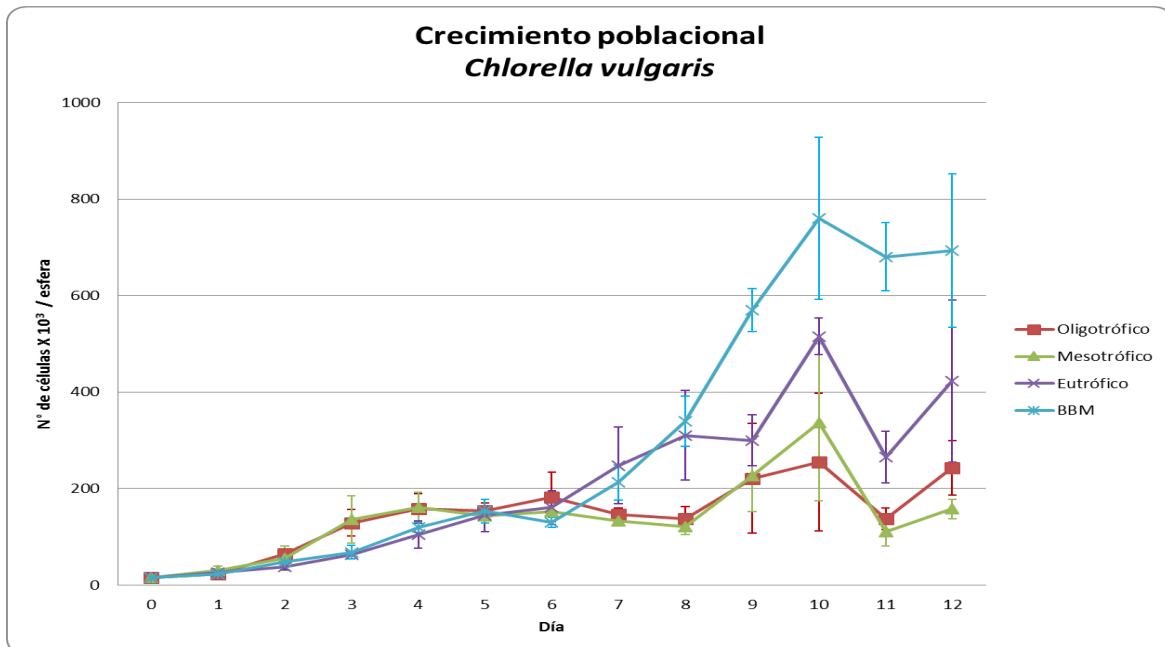


Scenedesmus ovalternus es una especie muy abundante y frecuentemente reportada en aguas ricas en nutrientes (principalmente ricas en nitrógeno) (Wehr & Sheath, 2003). Esto explica el comportamiento de sus curvas de crecimiento en estado eutrófico y en

BBM, aunque en éste último se haya presentado un brusco descenso desde el día noveno. De acuerdo a las observaciones realizadas durante el experimento, dicho descenso correspondió al comienzo para este día de una rápida dilución de las esferas en el medio. En consecuencia las algas que se encontraban en las esferas se dispersaron en el recipiente.

Las curvas de crecimiento de *S. ovalternus* en los medios oligotróficos y mesotróficos presentaron un comportamiento similar y menor que en los medios con mayor cantidad de nutrientes. Esto puede deberse a lo que ya se mencionó con respecto al rango de tolerancia que tiene la especie, que permite que se encuentre más frecuentemente en sistemas acuáticos con altos contenidos de nutrientes, pero que además dificulta tener un alto grado de sensibilidad entre condiciones con bajas concentraciones de nutrientes. Esto explicaría la similaridad de la curva en condiciones de oligo y mesotrofia que, independientemente de la diferencia entre ambos estados, serían medio limitante para *S. ovalternus*. Se requerirán estudios más detallados en el futuro para establecer con precisión los límites de estos elementos a partir de los cuales el alga empieza a mostrar cambios detectables en su crecimiento poblacional.

Figura 5-16: Crecimiento poblacional de *C. vulgaris* monocultivada en diferentes niveles de trofia simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.



Por su parte, *Chlorella vulgaris* tiene un amplio rango de tolerancia frente a la concentración de nutrientes, lo que le permite encontrarse en cualquier estado trófico. No obstante, comúnmente se reporta como frecuente y abundante en aguas con baja concentración de nutrientes (Wehr & Sheath, 2003). En la figura 5-16 es evidente este comportamiento, que además de mostrar un mayor crecimiento poblacional en condiciones de oligo y mesotrofía que *S. ovalternus*; muestra una adaptación y crecimiento más temprano en los primeros días de cultivo, lo que finalmente genera una diferenciación entre los cuatro tratamientos desde el día 7 cuando inicia la fase estacionaria. Tales resultados permiten inferir contrastes entre los estados tróficos del medio de manera más clara que con el alga cenobial.

Tabla 5-6: Comparación de medias del crecimiento poblacional en monocultivos de *S. ovalternus* (izq.) y de *C. vulgaris* (der.). Valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba Tukey HSD, $P > 0.05$).

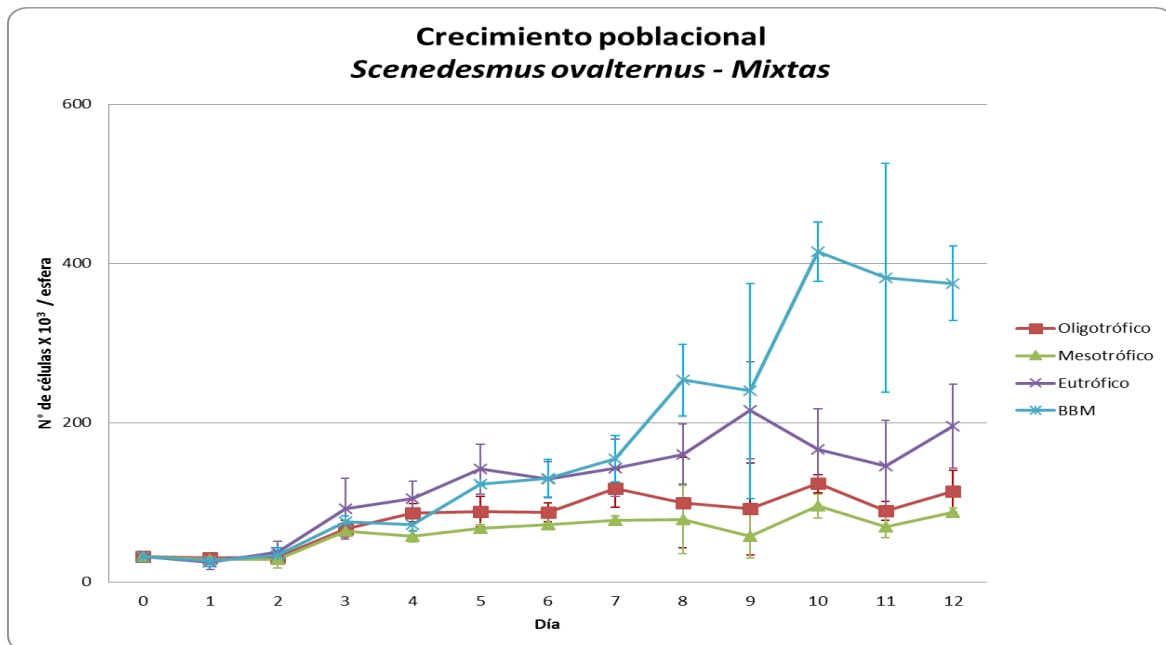
Especie	<i>Scenedesmus ovalternus</i>	Especie	<i>Chlorella vulgaris</i>
Estado		Estado	
Oligotrófico	5.04682 B	Oligotrófico	5.04295 B
Mesotrófico	5.04886 B	Mesotrófico	5.02133 B
Eutrófico	5.21403 A	Eutrófico	5.10642 AB
BBM	5.27838 A	BBM	5.19662 A

El análisis de varianza realizado a los datos del crecimiento poblacional en monocultivos tanto de *S. ovalternus* como de *C. vulgaris* (véase anexo A), muestran diferencias significativas entre los estados tróficos (ambas con $Pr>F = <0.0001$), lo que respalda lo observado en las gráficas. La prueba Tukey realizada (tabla 5-6) dio como resultado una diferenciación significativa entre los tratamientos agrupados en parejas de altas (BBM y Eutrófico) y bajas (Mesotrófico y Oligotrófico) concentraciones de nutrientes representados por letras iguales en la tabla.

Este comportamiento diferenciado del crecimiento de *S. ovalternus* y *C. vulgaris* entre los estados tróficos simulados en los medios de cultivo, permite evidenciar el grado de influencia de la concentración de los nutrientes sobre las especies. La deficiencia de un nutriente específico en el medio puede influir de manera determinante en un taxón más que en otro, debido a los rangos de tolerancia diferentes frente a cada factor ambiental (Graham & Wilcox, 2000). Muchos organismos acuáticos tienen requerimientos similares

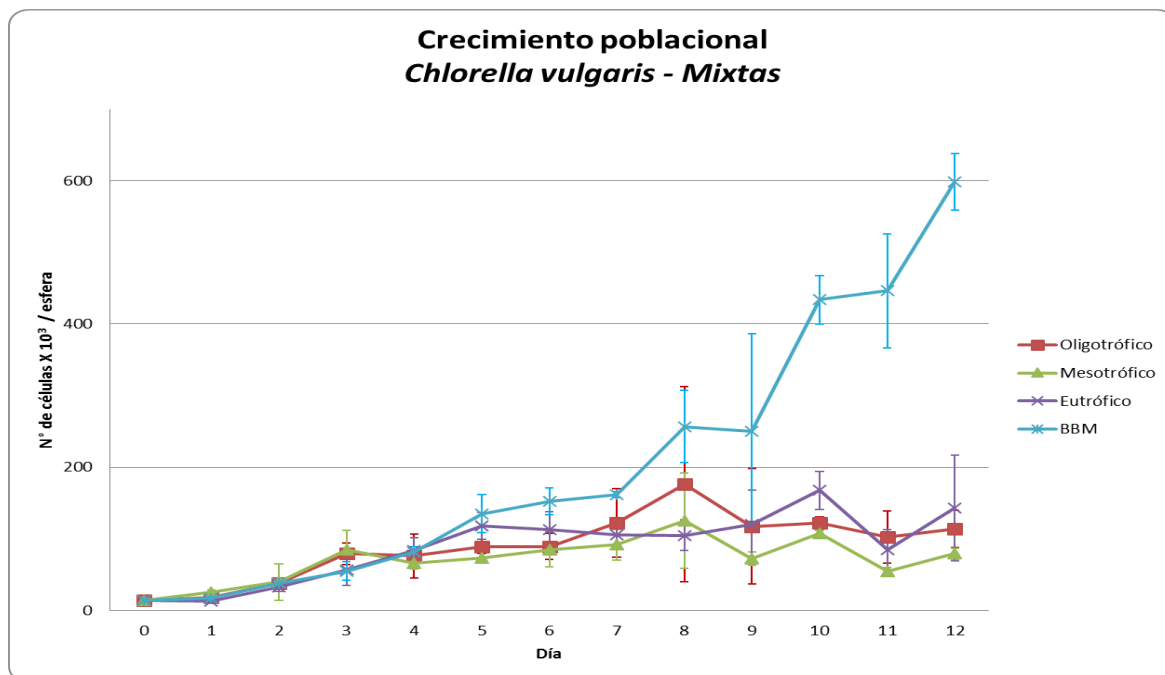
y por lo tanto se espera encontrar competencia por deficiencia de recursos si las circunstancias físicas permanecen uniformes durante un buen periodo de tiempo, lo cual se da en las condiciones del cultivo en laboratorio de este estudio. Como lo explica Dodds (2002), el tiempo requerido para que la competencia llegue a ser importante dependerá del crecimiento poblacional y reproducción del potencial competidor, así como de la tasa de suministro relativo de recursos. Para el caso de las algas estudiadas, dicho tiempo es corto dadas sus elevadas cinéticas de crecimiento poblacional.

Figura 5-17: Crecimiento poblacional de *S. ovalternus* en cultivos mixtos, en diferentes niveles de trofia simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.



El crecimiento poblacional de *S. ovalternus* en cultivo mixto (figura 5-17) muestra la misma tendencia que en el monocultivo, con excepción de los estados oligo y mesotrófico que se comportan de manera contraria a lo que se espera según la bibliografía. Sin embargo es de resaltar la clara diferenciación que se da entre los cuatro tratamientos durante todo el cultivo. Parecería que hay un efecto de competencia interespecífica en el crecimiento de la población, mayor que la competencia entre los individuos de la misma especie, ya que el crecimiento poblacional es notorio. Un crecimiento reducido haría sospechar que puede presentarse competencia por recursos entre algas del mismo taxón (Modelo de competencia Lotka-Volterra).

Figura 5-18: Crecimiento poblacional de *C. vulgaris* en cultivos mixtos, en diferentes niveles de trofía simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.



El crecimiento poblacional de *C. vulgaris* en cultivo mixto también demuestra la misma tendencia que en el monocultivo. Sin embargo, las diferencias entre los cuatro tratamientos no son tan claras como en la otra especie. Por el contrario, el crecimiento en BBM está muy por encima de los otros, pero en estado eutrófico, mesotrófico y oligotrófico no presentan diferencias significativas, como se muestra en la figura 5-18. Este crecimiento similar en los tres tratamientos puede obedecer a los amplios rangos de tolerancia que tiene esta especie frente a la concentración de nutrientes en el medio, lo que hace que pueda crecer en cualquier condición. A esto se suma el efecto de la competencia que en condiciones de cultivo mixto permite ver más claramente la curva de crecimiento de *C. vulgaris*. En este caso, la competencia interespecífica también parece ser mayor que la intraespecífica, haciendo evidente el efecto de los nutrientes sobre la especie en cada una de las concentraciones simuladas. En posteriores estudios habrá que analizar con mayor detenimiento el efecto que pueda tener *S. ovalternus* sobre *C. vulgaris* en cuanto a la competencia, la cual podría provocar que en respuesta a la presencia de la otra especie *C. vulgaris* compita más de manera intraespecífica que interespecífica, a fin de limitar su población y con esto racionar los recursos disponibles.

El análisis de varianza realizado a los datos del crecimiento poblacional de cada especie en el cultivo mixto (véase anexo A), muestra diferencias significativas entre los estados tróficos (ambas con $Pr > F = < 0.0001$). La prueba Tukey realizada refuerza el panorama frente al crecimiento de cada especie en cultivo mixto (Tabla 5-7), que muestra un mayor crecimiento de *S. ovalternus* de manera general. En este sentido, hay que tener en cuenta que en la competencia existe un “trade-off” entre las habilidades diferenciales de las especies para crecer con diferentes niveles de concentración de cada nutriente. Esto les permite ser dominantes en la competencia en diferentes momentos de acuerdo a la disponibilidad del nutriente. Incluso al incluir otros nutrientes u otros recursos se explica la diferenciación de nichos para cada especie que puede determinar la forma de competencia, coexistencia o exclusión que se dé entre las especies que solapan sus nichos en alguna dimensión (Dodds, 2002). Al respecto, cabe mencionar lo reportado por González (2010), quien sugiere que si las dos especies responden mejor ante la deficiencia de fósforo, podría darse una coexistencia, y si son más susceptibles a la deficiencia de nitrógeno se aumenta la competencia interespecífica, lo que puede terminar en la exclusión de uno de los dos taxones.

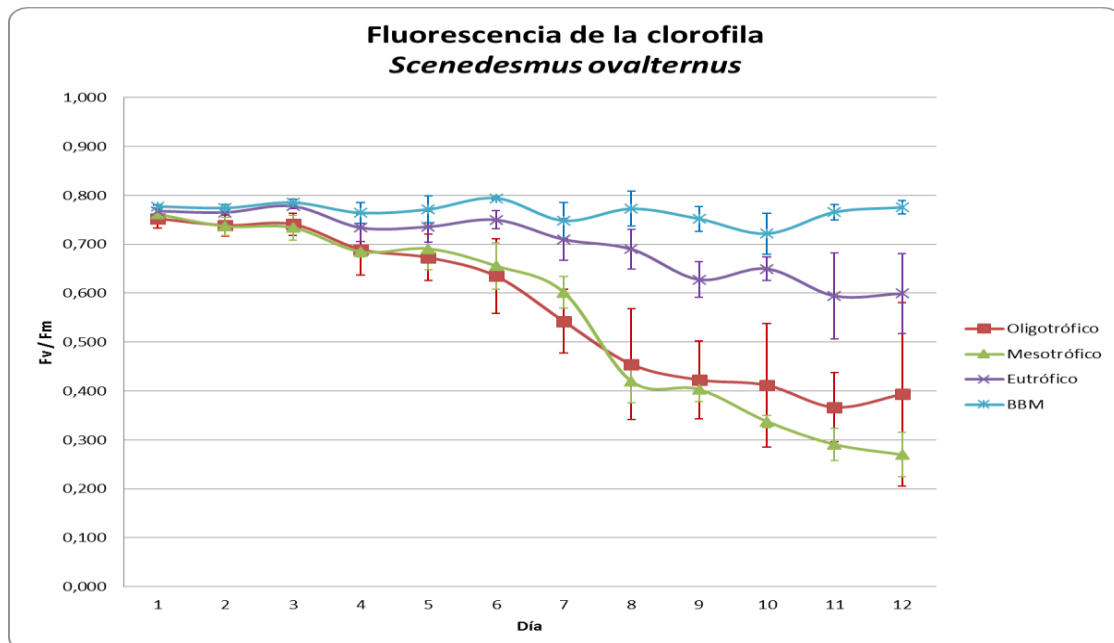
Tabla 5-7: Comparación de medias del crecimiento poblacional en cultivos mixtos de *S. ovalternus* (izq.) y de *C. vulgaris* (der.). Valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba Tukey HSD, $P > 0.05$).

Especie Estado	<i>S. ovalternus Mixta</i>	Especie Estado	<i>C. vulgaris Mixta</i>
Oligotrófico	4.85425 BC	Oligotrófico	4.84180 B
Mesotrófico	4.75492 C	Mesotrófico	4.77573 B
Eutrófico	4.99274 AB	Eutrófico	4.83388 B
BBM	5.07950 A	BBM	5.06877 A

A partir de la adecuación de la metodología para la medición de fluorescencia de la clorofila *a*, se obtuvieron datos que también explican el efecto de la concentración de nutrientes en el medio sobre las especies estudiadas. Se hallaron tendencias particulares para cada uno de los estados tróficos simulados, así como para cada una de las especies y su forma de cultivo.

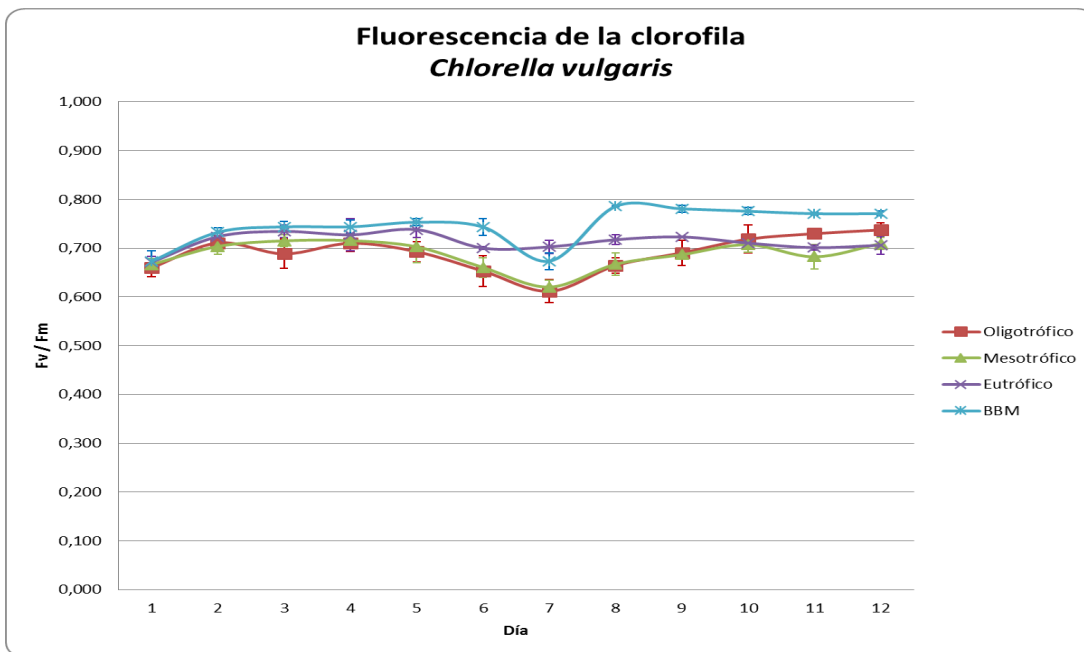
S. ovalternus mostró claramente su preferencia por altas concentraciones de nutrientes en la medición de eficiencia fotosintética (Figura 5-19), generando para el BBM una curva estable por encima de 0.700 Fv/Fm. La curva del medio eutrófico simulado tuvo también una buena eficiencia fotosintética que fue menor a la del BBM y que presentó una declinación al pasar los días, aunque nunca llegó a estar por debajo de 0.600 Fv/Fm. Sin embargo, en los estados mesotrófico y oligotrófico se presentaron curvas que a partir del sexto día estuvieron por debajo de 0.600 Fv/Fm, lo que de acuerdo a lo mencionado en el marco teórico, muestra estrés en las células vegetales en respuesta a la poca tolerancia de esta especie a las bajas concentraciones de nutrientes, esto sumado a la fase de decrecimiento en la que entra la población después del séptimo día. Este estrés a su vez puede causar problemas en el crecimiento y desarrollo normal, ya que la deficiencia de nitrógeno y fósforo se asocia con problemas estructurales y fisiológicos en los organismos fotosintéticos, dada su participación en la formación de la clorofila y en la creación del ATP necesario para otros procesos metabólicos (Barsanti & Gualtieri, 2006; Stewart, 1974). Al cabo de 10 días de cultivo, la eficiencia fotosintética de *S. ovalternus* mostró cambios importantes entre los estados tróficos simulados, lo que hace pensar que esta variable podría ser un indicativo del grado de trofía del agua, al menos con base en la respuesta fisiológica de esta especie.

Figura 5-19: Eficiencia fotosintética de *S. ovalternus* monocultivada, en diferentes niveles de trofía simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.



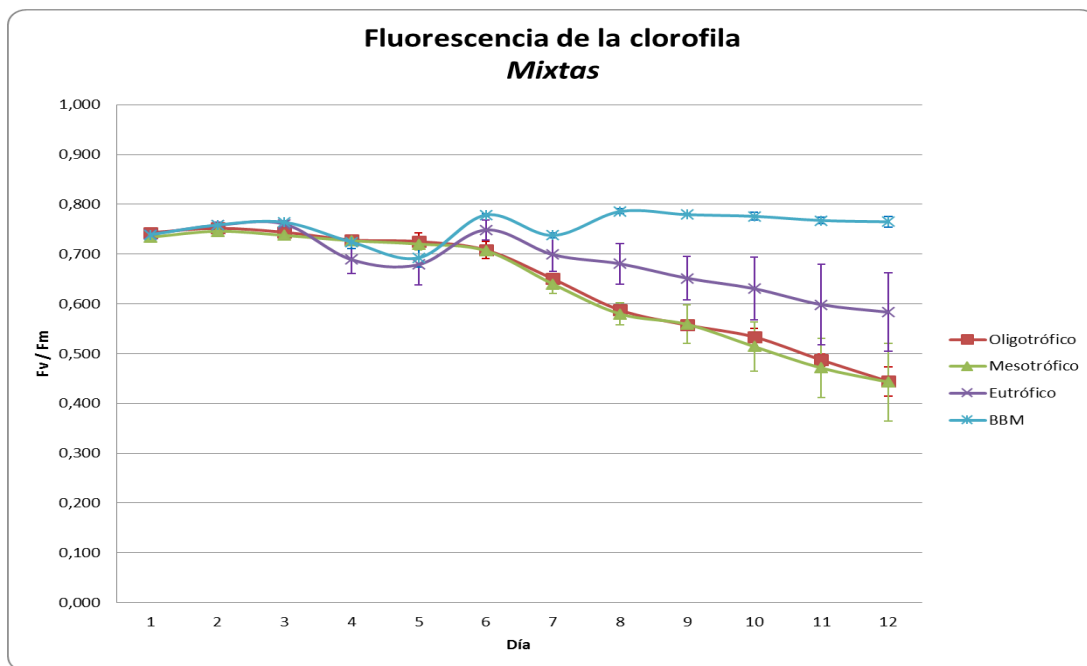
C. vulgaris por su parte, demostró su euritolerancia a las diferentes concentraciones de nutrientes en el medio, como se observa en la figura 5-20. La eficiencia fotosintética se mantuvo estable en valores entre los 0.650 y 0.800 Fv/Fm, para todos los estados tróficos simulados y para el BBM. Esto muestra un desarrollo sin estrés de las células de esta especie, dada su fuerte capacidad fisiológica adaptativa frente a diferentes concentraciones de nutrientes en el medio donde se encuentre (Reynolds, 1998b; Wehr & Sheath, 2003). Cabe recalcar que las curvas de los medios BBM y eutrófico alcanzaron a sobresalir un poco por encima de las otras dos curvas debido probablemente a las condiciones adecuadas que genera la alta disponibilidad de nutrientes. Sin embargo, las curvas de los medios mesotrófico y oligotrófico se mantuvieron estables por encima del valor que delimita el estrés de las algas. Este resultado también deja ver que la eficiencia fotosintética no parece ser un buen indicador para diferenciar el estado trófico del agua a partir de cultivos de *C. vulgaris* en esferas de alginato solamente, lo que a su vez demuestra las ventajas de considerar más de una especie en el diseño del método de biomonitoreo.

Figura 5-20: Eficiencia fotosintética de *C. vulgaris* monocultivada, en diferentes niveles de trofía simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.



En el cultivo mixto, la medición de fluorescencia de la clorofila *a* presentó variaciones definidas por ambas especies, por lo que es importante tener en cuenta el comportamiento de cada taxón monocultivado que se discutió anteriormente. Como se muestra en la figura 5-21, existió una estabilidad de los valores de F_v/F_m durante los primeros tres días, lo que fue común a todos los experimentos, por las condiciones primarias de las cápsulas de alginato de calcio que proveen recursos iguales en todos los tratamientos. Esto permitiría la adaptación de las células a las condiciones del medio y evitaría una mortandad inicial importante (Lebsky *et al.*, 2001). Posteriormente, desde el día 6 en adelante hubo una estabilidad en las algas en el BBM, ya que ambas especies tienen un buen desarrollo bajo las condiciones óptimas de nutrientes que ofrece este tipo de medio de cultivo.

Figura 5-21: Eficiencia fotosintética de las dos especies en cultivo mixto, en diferentes niveles de trofía simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.



En el medio eutrófico la curva de fluorescencia mostró una disminución al pasar los días que pudo estar influenciada por el comportamiento poblacional de *S. ovalternus*; éste a su vez estuvo dado por la disminución del crecimiento poblacional y el efecto de la cantidad de nutrientes disponibles en el medio. A pesar de lo anterior, esta disminución de F_v/F_m no alcanzó a estar por debajo de 0.600, lo que indica que las especies

cultivadas de manera mixta no llegan a sufrir de estrés en este medio eutrófico simulado. Por el contrario, las curvas de los medios mesotrófico y oligotrófico descendieron por debajo de 0.600 Fv/Fm después del séptimo día, posiblemente también por la disminución del crecimiento poblacional de las especies. Este comportamiento de la eficiencia fotosintética parece señalar procesos de estrés en las algas por deficiencia de nutrientes (Maxwell & Johnson, 2000), ya que *S. ovalternus* presenta dificultades para mantenerse en estas condiciones. Cabe mencionar que el nivel más bajo de eficiencia fotosintética en éstos estados tróficos simulados fue de 0.450 Fv/Fm, un valor mucho mayor que el reportado para *S. ovalternus* en monocultivo que fue de 0.280 Fv/Fm, lo que podría indicar que la eficiencia en el cultivo mixto se debería más a la actividad de *C. vulgaris*.

Tabla 5-8: Comparación de medias de la eficiencia fotosintética en *S. ovalternus* monocultivada (izq.), en *C. vulgaris* monocultivada (cen.) y en ambas especies en cultivo mixto (der.). Valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba Tukey HSD, $P > 0.05$).

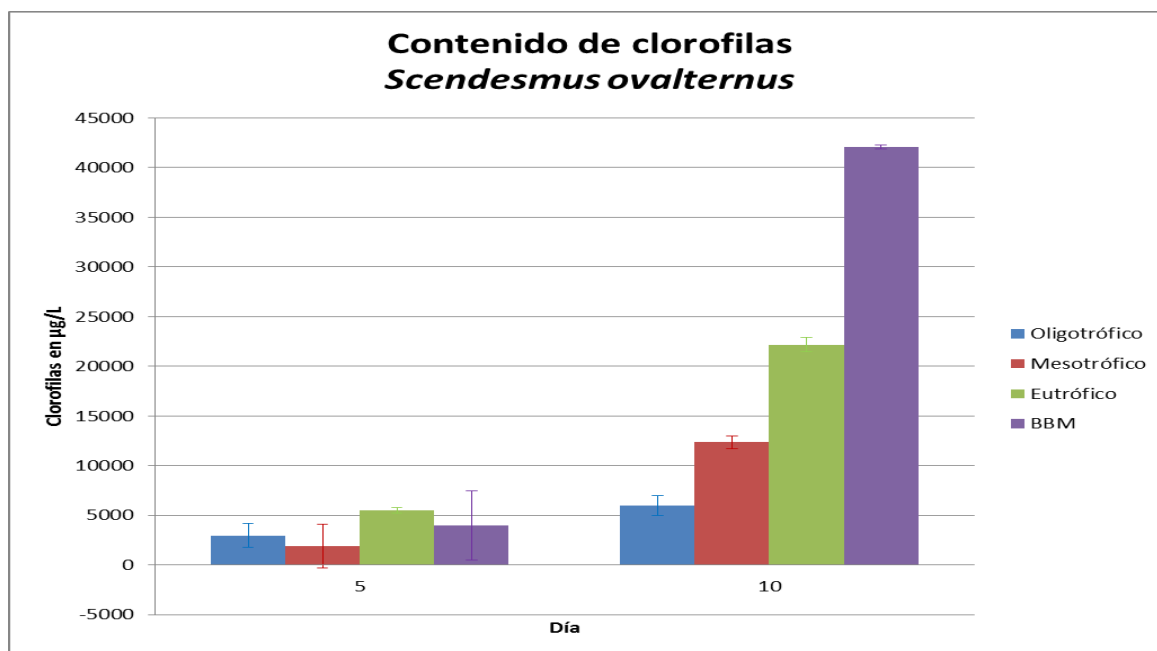
Especie Estado	<i>Scenedesmus ovalternus</i>	Especie Estado	<i>Chlorella vulgaris</i>	Especie Estado	Mixtas
Oligotrófico	1.04983 B	Oligotrófico	1.098695 B	Oligotrófico	1.080842 B
Mesotrófico	1.03960 B	Mesotrófico	1.097437 B	Mesotrófico	1.075954 B
Eutrófico	1.10297 A	Eutrófico	1.106319AB	Eutrófico	1.090119 B
BBM	1.11999 A	BBM	1.119691 A	BBM	1.114524 A

El análisis de varianza realizado a los datos de la eficiencia fotosintética (véase anexo A), muestra diferencias significativas entre los estados tróficos (todas con $Pr > F = < 0.0001$), lo que corrobora lo mostrado en las figuras 5-19 a 5-21, en cuanto al comportamiento general de la eficiencia fotosintética de las dos especies en cultivos individuales y mixtos. La prueba Tukey realizada (tabla 5-8) ayuda a dilucidar estas diferencias, a la vez que sustenta las discusiones planteadas anteriormente, a partir de un agrupamiento particular de los valores (dado por las letras iguales en la tabla) en cada una de las especies, que ponen en evidencia la falta de diferenciación estadística entre los resultados de algunos tratamientos. Es así como los tratamientos de BBM y eutrófico se encuentran en el primer grupo ya que no afectan de manera considerable la eficiencia fotosintética de las algas, mientras que los medios mesotrófico y oligotrófico se encuentran en el segundo grupo al generar una disminución considerable de los valores de Fv/Fm, hasta el punto de señalar

un posible estrés sobre los organismos ya que la eficiencia desciende significativamente al pasar los días, por debajo de los 0.600 Fv/Fm (Maxwell & Johnson, 2000).

Se realizó la medición del contenido de clorofilas en los días 5 y 10 del cultivo en cada una de las especies y tratamientos. En el monocultivo de *S. ovalternus* (figura 5-22) para el día 5 las diferencias entre los estados se hacen notorias. Existen dos grupos, el primero entre oligo y mesotrofia y el segundo entre eutrofia y BBM. El segundo grupo tiene más contenido de clorofilas que el primero, lo que es coherente con lo esperado. Finalmente, para el décimo día se encuentra una diferenciación clara y escalonada de acuerdo a lo esperado para los cuatro estados, siendo mayor el contenido de clorofilas cuando hay un elevado número de células en el medio, lo que a su vez está dado por una mayor concentración de nutrientes.

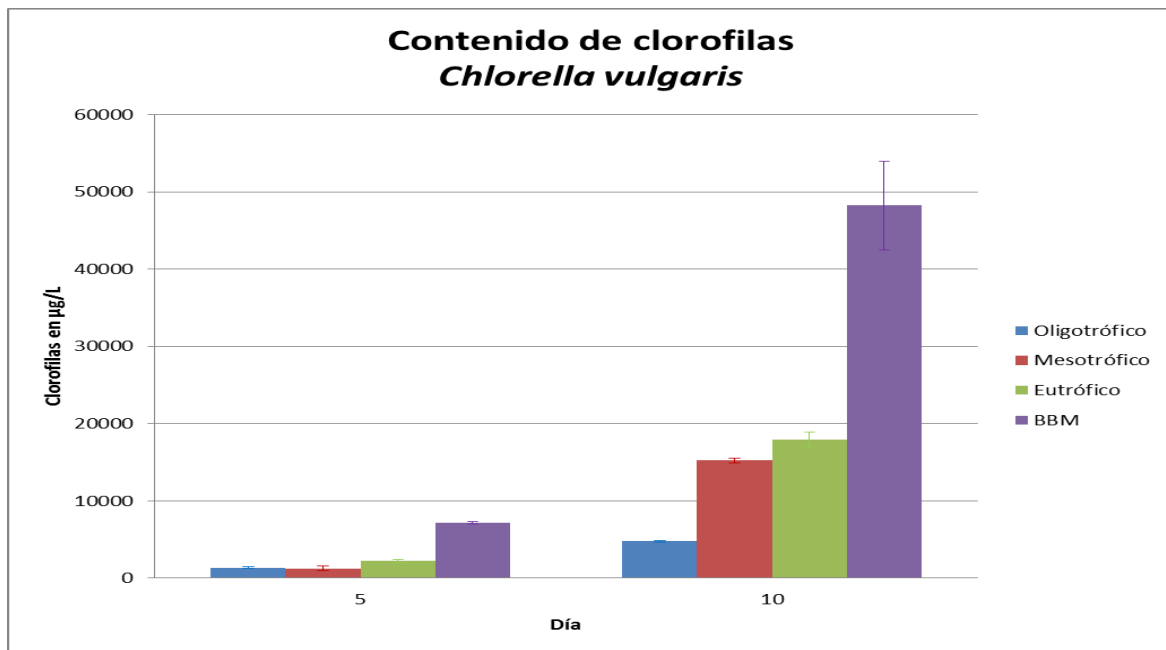
Figura 5-22: Contenido de clorofilas de *S. ovalternus* monocultivada, en diferentes niveles de trofia simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.



Para el monocultivo de *C. vulgaris* (figura 5-23) se encontró en el día 5 que las diferencias entre los estados tróficos no son muy notorias, ya que el tratamiento oligotrófico es muy similar al mesotrófico, lo que concuerda con el análisis estadístico realizado para el crecimiento poblacional donde se demuestra la inexistencia de diferencias significativas entre estos medios de cultivo. En el medio eutrófico y en el BBM

sí hubo más cantidad del ftopigmento, lo cual estaría acorde con la mejor disponibilidad y proporcionalidad de los nutrientes en estos medios. Finalmente, para el décimo día se encontró una diferenciación clara y escalonada de acuerdo a lo esperado para los cuatro estados, con mayor contenido de clorofilas en la medida en que aumentó la concentración de nutrientes. Es evidente la elevada respuesta de la clorofila en el medio BBM. Posiblemente como respuesta al auto-sombreado. Por supuesto, el hecho de que el medio BBM tenga una proporcionalidad ideal de los nutrientes hace que ninguno de ellos sean limitantes, lo que favorece el aumento algal y por ende el incremento en la clorofila. También es de destacar la pequeña diferencia entre el tratamiento eutrófico y el mesotrófico, indicativo de que en los dos medios se presentó un crecimiento poblacional similar.

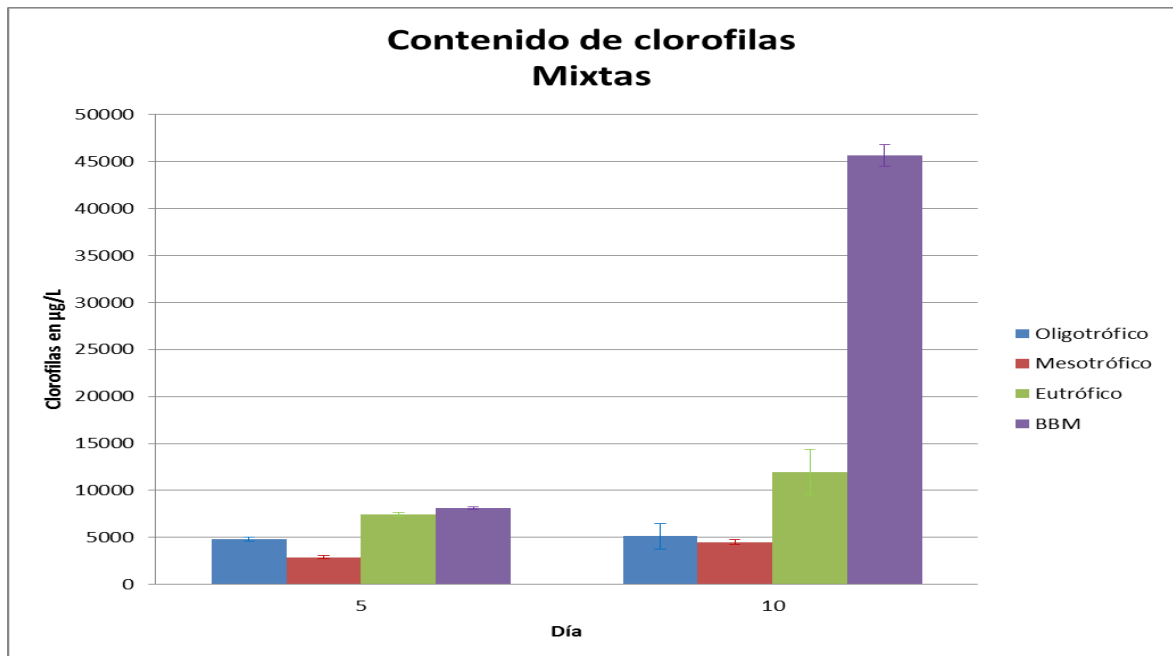
Figura 5-23: Contenido de clorofilas de *C. vulgaris* monocultivada, en diferentes niveles de trofía simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.



Para el cultivo mixto de ambas especies (figura 5-24) se encontró en el quinto día la misma tendencia que para *C. vulgaris* y para el décimo día se repitió el comportamiento del día 5, aunque con valores mucho más altos. Fue evidente la gran cantidad de clorofilas en el medio BBM, posiblemente debido a los aspectos señalados en párrafos anteriores (auto-sombreado, mejor proporcionalidad en los nutrientes). En este caso de

los cultivos mixtos se hace más difícil la interpretación de los resultados debido a que estos son la respuesta conjunta de las dos especies y no se pueden separar los efectos individuales.

Figura 5-24: Contenido de clorofilas de las dos especies en cultivo mixto, en diferentes niveles de trofía simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.



De acuerdo a la literatura disponible, independientemente de la especie o del medio de cultivo, en el quinto día, se esperaría encontrar una tendencia a la diferenciación de los datos, donde el mayor contenido de clorofilas estuviera dado en el tratamiento BBM, seguido por los estados eutrófico, mesotrófico y oligotrófico, respectivamente. Sin embargo, esta diferencia debería ser poco notoria entre los tratamientos, ya que solo habrían pasado pocos días de influencia del medio en las células, después de los tres días durante los que utilizan los recursos de la cápsula y se adaptan al medio (Abdel & Hammouda, 2007). Los datos hallados en el presente trabajo señalan que este patrón no es tan claro, en lo que posiblemente pueden influir los mismos aspectos señalados en el párrafo anterior, sin embargo existe una clara coherencia con lo encontrado tanto en las curvas como en el análisis estadístico del crecimiento poblacional.

Para el décimo día se esperaría encontrar la gradualidad de los datos ya nombrada de manera consolidada, es decir con grandes diferencias entre los tratamientos, con valores

de mayor a menor en BBM, eutrofia, mesotrofia y oligotrofia. No solo el número de células dentro de las esferas en cada tratamiento influye directamente en el contenido de clorofilas, teniendo en cuenta que el crecimiento poblacional debe ser directamente proporcional a la concentración de nutrientes en el medio, sino también se potencializa por el efecto de auto-sombreado que se genera en las cápsulas de alginato de calcio y que se ha discutido en la sección anterior. Este patrón se cumple claramente para los cultivos individuales y es menos evidente para los cultivos mixtos. Aunque el estudio de las causas de dicho comportamiento en los cultivos mixtos no era objeto de este trabajo, es probable que influyan aspectos como la capacidad de cada especie para usar de manera diferente los recursos nutricionales espaciales y lumínicos. Se requerirán estudios posteriores para aclarar estos temas.

El auto-sombreado ocurre cuando la mayor densidad de células en las esferas hace que las algas ubicadas en la parte superficial de la esfera crezcan más, impidiendo el paso de la luz hacia el centro de la misma (Panel *et al.*, 1998; Chevalier & de la Noüe, 1985; Tam *et al.*, 1994). Algunos estudios de microscopía electrónica inmovilizando *Chlorella* en alginato, han encontrado que a pesar de que existe una distribución inicial equitativa de las células en la esfera, el crecimiento de las algas se limita en gran medida a la periferia de las perlas (Day & Codd, 1985; Robinson *et al.*, 1986a). El efecto de auto-sombreado, genera simultáneamente una disminución en la actividad fotosintética de las células que no se encuentran en la periferia y en respuesta adaptativa pueden generar un mayor contenido de clorofilas que les permita contrarrestar esta deficiencia (Robinson *et al.*, 1985; Bailliez *et al.*, 1985; Abdel Hameed, 2002).

Tabla 5-9: Comparación de medias del contenido de clorofilas en *S. ovalternus* monocultivada (izq.), en *C. vulgaris* monocultivada (cen.) y en ambas especies en cultivo mixto (der.). Valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba Tukey HSD, $P > 0.05$).

Especie Estado	<i>Scenedesmus ovalternus</i>	Especie Estado	<i>Chlorella vulgaris</i>	Especie Estado	Mixtas
Oligotrófico	3.56666 B	Oligotrófico	3.39973 B	Oligotrófico	3.63188 C
Mesotrófico	3.58456 B	Mesotrófico	3.47885 B	Mesotrófico	3.51323 C
Eutrófico	3.73888 AB	Eutrófico	3.54483 B	Eutrófico	3.80009 B
BBM	4.02144 A	BBM	3.92438 A	BBM	4.05602 A

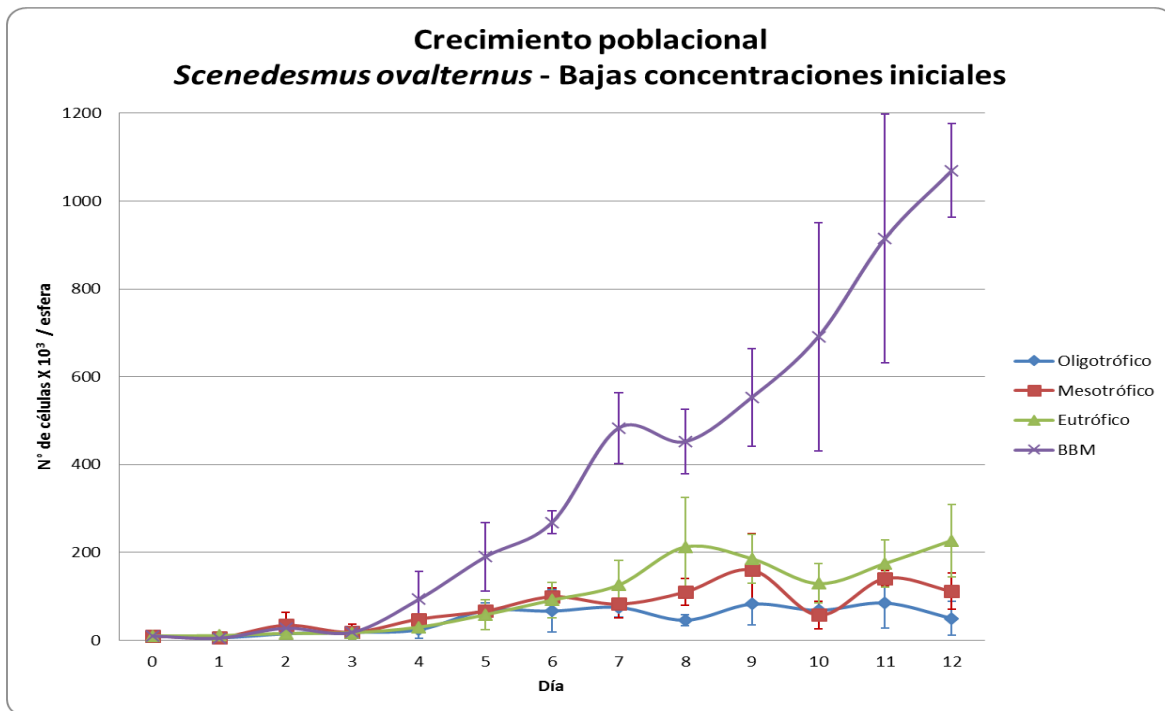
El análisis de varianza realizado a los datos del contenido de clorofilas de cada especie monocultivada y en cultivo mixto (véase anexo A), muestra en cada caso diferencias significativas entre los tratamientos (todas $Pr > F = < 0.0001$), de acuerdo a la tendencia general observada en las gráficas. En principio, vale la pena resaltar que en la prueba Tukey realizada (tabla 5-9), se da un comportamiento escalonado entre los tratamientos, lo que de manera preliminar merece asumirse como efecto de las concentraciones de nutrientes en el medio. Esto podría utilizarse como una medición adicional en el sistema de biomonitorio del estado trófico de los sistemas acuáticos que se busca desarrollar. Para ello se reitera la necesidad de la adecuación de la metodología que podría hacer evidentes efectos relevantes de los tratamientos en la fisiología de las algas. Al respecto, Chu (1943) observó que en medios deficientes en nitrógeno puede darse una reducción en la síntesis de clorofila, ya que la concentración de nitrógeno determina en gran medida la cantidad del fotopigmento que es sintetizada.

5.4 Efecto de la concentración inicial (baja) de células cultivadas, en las dos especies inmovilizadas en esferas de alginato:

Cuando se hizo el tratamiento de los datos, se vio que los resultados de este experimento eran comparables con los discutidos en la sección anterior. Por esta razón se incluyen los resultados de este ensayo con el fin de discutir un aspecto importante para el objetivo de este estudio, que consiste en conocer la influencia de la concentración inicial de células cultivadas sobre los datos que arrojan las mediciones de las variables. Con ello se quiso determinar la concentración inicial de células adecuada para alcanzar más claramente el objetivo de este estudio. En este sentido, se midió el crecimiento poblacional y la eficiencia fotosintética. Se emplearon las dos especies cultivadas (*S. ovalternus* y *C. vulgaris*) por separado y mixtas, y en los cuatro tipos de tratamiento (BBM, eutrofia, mesotrofia y oligotrofia simuladas). De acuerdo a lo anterior, la discusión de esta sección se centra en la comparación con los resultados del experimento de la sección anterior (5.3), y por ello se referenciará constantemente. Cabe señalar que dicho experimento tuvo una concentración inicial de células cultivadas mayor a la del presente ensayo, como se puede ver en la tabla 4-1 de la metodología.

En *S. ovalternus* cultivada individualmente, se presentaron resultados escalonados en el crecimiento poblacional de acuerdo a la proporcionalidad que se espera tengan con la concentración de nutrientes en el medio, como ya se ha mencionado (Figura 5-25). Se observó un crecimiento poblacional de mayor a menor valor en BBM, medio eutrófico, medio mesotrófico y medio oligotrófico, respectivamente. Es importante resaltar que esta organización de los resultados fue mucho más clara aquí que en el experimento de la sección anterior, en donde las curvas de crecimiento poblacional en los tratamientos oligo y mesotrófico eran confusas y entrelazadas. Una concentración inicial de células más baja hace notorias las diferencias entre las diversas curvas de crecimiento.

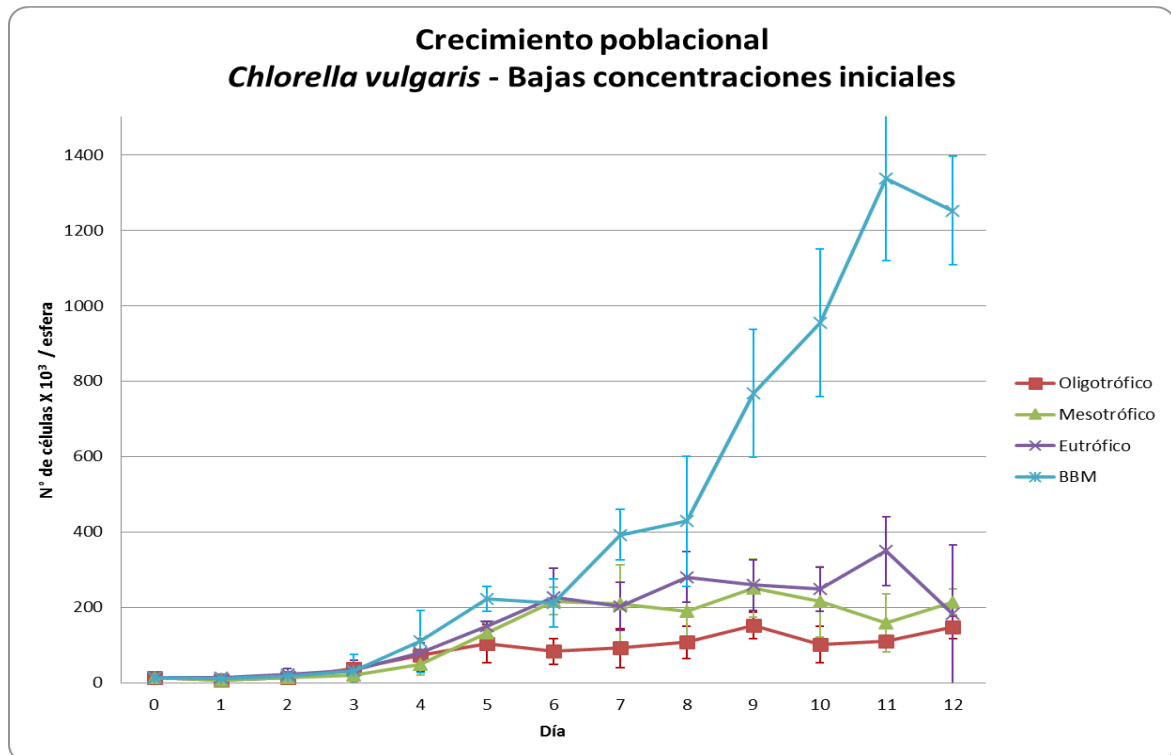
Figura 5-25: Crecimiento poblacional de *S. ovalternus* en monocultivo con baja concentración inicial de células, en diferentes niveles de trofía simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.



En *C. vulgaris* (figura 5-26) se vio entre los días 4 a 6 una clara tendencia a la diferenciación de las curvas. Sin embargo, cabe anotar que en comparación con el experimento anterior, esta separación no se registró durante los mismos días. Incluso en los días posteriores la diferenciación entre las curvas no fue tan evidente, particularmente en los tratamientos oligo y mesotróficos, contrario a lo que pasó en los cultivos con una

concentración inicial baja de células cultivadas. En estos últimos hubo una clara discrepancia entre los cuatro tratamientos, aunque se registraron valores similares en algunos días entre los tratamientos mesotrófico y eutrófico.

Figura 5-26: Crecimiento poblacional de *C. vulgaris* en monocultivo con baja concentración inicial de células, en diferentes niveles de trofía simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.



El crecimiento de *S. ovalternus* en condiciones de cultivo mixto (figura 5-27) disminuyó significativamente ante la presencia de la otra especie, lo que también se presentó en el experimento discutido en la sección anterior. Hubo diferencias notorias en cuanto al comportamiento general de las curvas entre los dos experimentos. En el ensayo de la sección 5.3 se vio una clara diferenciación entre los tratamientos con las curvas de oligo y mesotrofía pero de manera invertida (mayor crecimiento en el medio oligotrófico), mientras que en el presente experimento ocurrió el comportamiento esperado con respecto a los nutrientes (mayor crecimiento en el medio mesotrófico). A pesar de esto, la diferenciación entre las curvas de los tres estados tróficos simulados fue mínima y el crecimiento en el medio BBM estuvo muy por encima de las otras curvas.

Figura 5-27: Crecimiento poblacional de *S. ovalternus* en cultivo mixto con baja concentración inicial de células, en diferentes niveles de trofía simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.

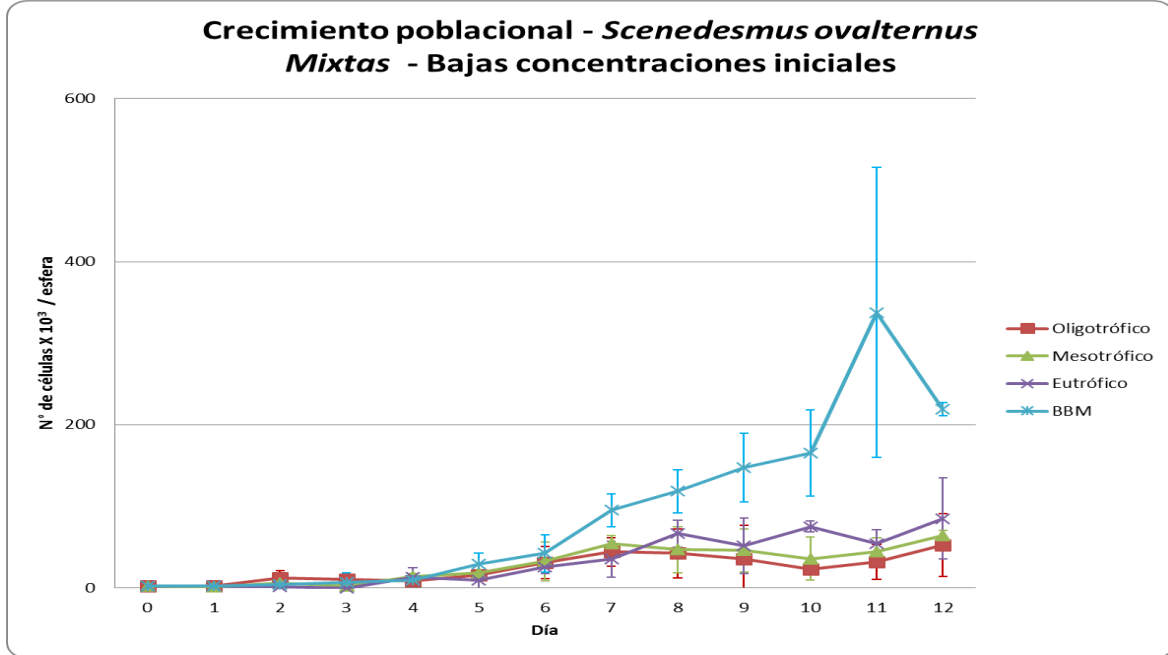
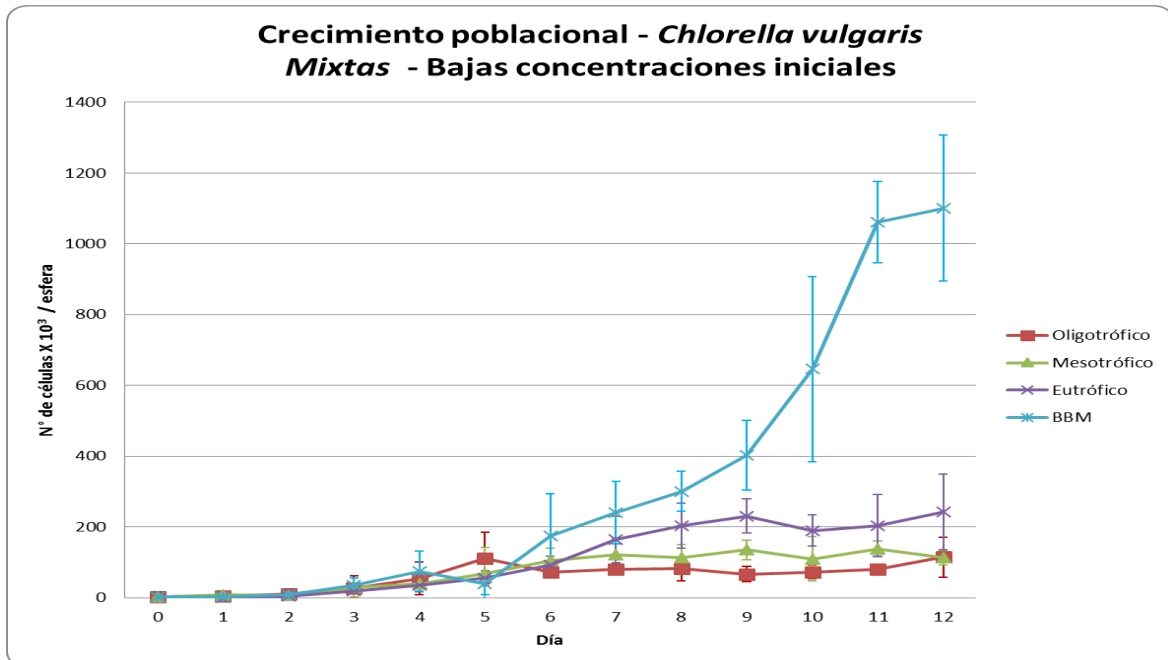


Figura 5-28: Crecimiento poblacional de *C. vulgaris* en cultivo mixto con baja concentración inicial de células, en diferentes niveles de trofía simulados en laboratorio. Las barras verticales indican la desviación estándar.



Por su parte, el crecimiento de *C. vulgaris* en cultivo mixto (Figura 5-28), mostró una diferenciación un poco más clara entre los tratamientos. En el experimento de la sección 5.3 no fue tan ostensible dicha diferenciación entre los estados tróficos. El crecimiento poblacional en el BBM es bastante evidente por encima del resto de medios iniciando con cualquiera de las dos concentraciones de células, esto debido a la cantidad y proporcionalidad de nutrientes que proporciona el medio, como ya se ha mencionado.

Es importante mencionar los factores que pudieron afectar los resultados de este ensayo que partió de densidades bajas en los cultivos, los cuales son similares a los ya discutidos en la sección 5.3. Entre ellos están: 1) la adaptación de las células durante los primeros días de cultivo, en los cuales el tamaño poblacional es mínimo y los recursos se encuentran en exceso en el medio, por tanto las curvas de las especies y variables medidas no muestran diferencias entre los tratamientos en esos primeros momentos; 2) la tendencia hacia la diferenciación de las curvas durante los días 4 a 6 o 7, que no es muy clara dado que la fase exponencial del crecimiento aún se está dando; 3) el efecto de auto-sombreado como consecuencia de una alta densidad de células en la periferia de las cápsulas, que potencializan el incremento en el contenido de clorofilas proporcional al crecimiento poblacional de las algas en las esferas (Chevalier & de la Noüe, 1985; Tam *et al.*, 1994); 4) finalmente, la respuesta esperada de crecimiento de manera proporcional a la concentración de nutrientes en el medio de cultivo, aspecto sobre el cual influyen las características adaptativas de las dos especies, siendo *S. ovalternus* estenotolerante a condiciones de eutrofia especialmente y *C. vulgaris* euritolerante con mayor afinidad a condiciones de oligotrofia (Reynolds, 1998b; Wehr & Sheath, 2003).

Es necesario hacer una observación adicional sobre los resultados del crecimiento poblacional en este experimento. En los experimentos anteriores se estableció que entre el día 0 y el 3 hay una adaptación de las algas a las condiciones del medio facilitada por los recursos que se encuentran en abundancia frente al bajo tamaño poblacional; entre los días 4 y 8 se establece la fase de crecimiento exponencial de las algas; entre los días 8 y 15 se da la fase estacionaria en el crecimiento; del día 15 o 16 en adelante ocurre el declive de las curvas de crecimiento dada por la mortandad de los individuos y el posterior recambio generacional de la población. Sin embargo, en el presente ensayo se

pudo observar que la fase exponencial del crecimiento de las algas se extendió más días debido al menor número de células inicial en las esferas. Esto podría conllevar una serie de ventajas importantes en cuanto a la disminución de los efectos de la densidad en las algas, como por ejemplo la reducción del auto-sombreado y la posibilidad de dejar por más tiempo las esferas en el medio trófico, ya que habría más disponibilidad de nutrientes y espacio dentro de las cápsulas.

Tabla 5-10: Comparación de medias del crecimiento poblacional en *S. ovalternus* monocultivada (izq.), en *C. vulgaris* monocultivada (cen-izq.), en *S. ovalternus* cultivada mixta (cen-der.), en *C. vulgaris* cultivada mixta (der.). Valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba Tukey HSD, $P > 0.05$).

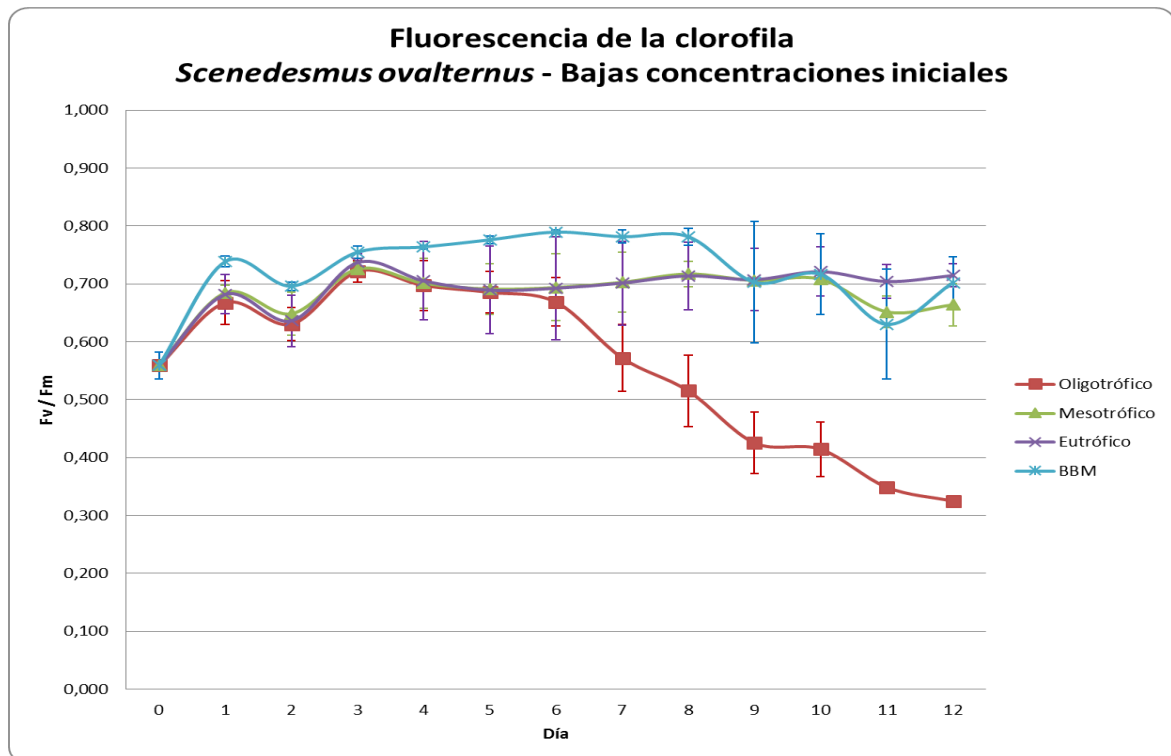
Especie Estado	<i>Scenedesmus ovalternus</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>S. ovalternus Mixta</i>	<i>C. vulgaris Mixta</i>
Oligotrófico	4.59640 B	4.76699 C	4.24442 C	4.63929 C
Mesotrófico	4.73510 B	4.89016 BC	4.34896 BC	4.74794 BC
Eutrófico	4.80756 B	5.02356 B	4.50087 AB	4.89705 B
BBM	5.22734 A	5.26024 A	4.67675 A	5.12254 A

El análisis de varianza realizado a los datos del crecimiento poblacional de cada especie monocultivada o en cultivo mixto (véase anexo A), muestra diferencias significativas teniendo como fuente de variación el estado trófico (en todas $Pr>F = <0.0001$). Además, la prueba Tukey realizada para definir estas diferencias (tabla 5-10) muestra la diferenciación gradual esperada entre los tratamientos, de acuerdo con lo observado en las figuras 5-25 a 5-28. Es importante apreciar que las diferencias entre los cuatro tratamientos se comprobaron estadísticamente mediante la prueba de Tukey en *C. vulgaris* cultivada de manera individual y mixta, así como en *S. ovalternus* en cultivo mixto. Esto debe resaltarse, ya que de todos los análisis estadísticos realizados, este fue el único que mostró tales diferencias estadísticas, que pueden tener implicaciones en la definición de lo que serían las condiciones ideales para el método de biomonitorio que se pretende establecer.

En cuanto a la eficiencia fotosintética, vale la pena recordar algunos aspectos ya discutidos anteriormente, que también son evidentes en estos resultados. De esta manera, los valores de eficiencia inferiores a 0.600 F_v/F_m muestran estrés en las células

que puede darse por la escasez de nutrientes (González *et al.*, 2008). En el cultivo mixto del presente ensayo la eficiencia fotosintética está influenciada por la presencia de ambas especies, por lo que es importante tener en cuenta el comportamiento de cada una de ellas en los monocultivos.

Figura 5-29: Eficiencia fotosintética de *S. ovalternus* con baja concentración inicial de células. Las barras verticales indican la desviación estándar.



En las curvas de eficiencia fotosintética de *S. ovalternus* que se muestran en la figura 5-29, se ve un comportamiento extraño al pasar el noveno día, en especial para el tratamiento en BBM (reducción de F_v/F_m). Esto se debe a que a partir del octavo día las algas entran en fase estacionaria, además de la dilución de las esferas que afectó de manera directa la medición de esta variable. Adicionalmente, en contraste con el experimento de la sección anterior, las curvas de eficiencia de las algas en BBM y en los estados eutrófico y mesotrófico fueron estables con un F_v/F_m por encima de 0.600. El estado oligotrófico presentó en cambio una curva declinante a partir del sexto día, lo cual revela condiciones de estrés fisiológico causado muy posiblemente por la deficiencia de nutrientes. En el experimento de la sección 5.3 la curva tanto del cultivo mesotrófico también descendía por debajo de 0.600 F_v/F_m .

Figura 5-30: Eficiencia fotosintética de *C. vulgaris* con baja concentración inicial de células. Las barras verticales indican la desviación estándar.

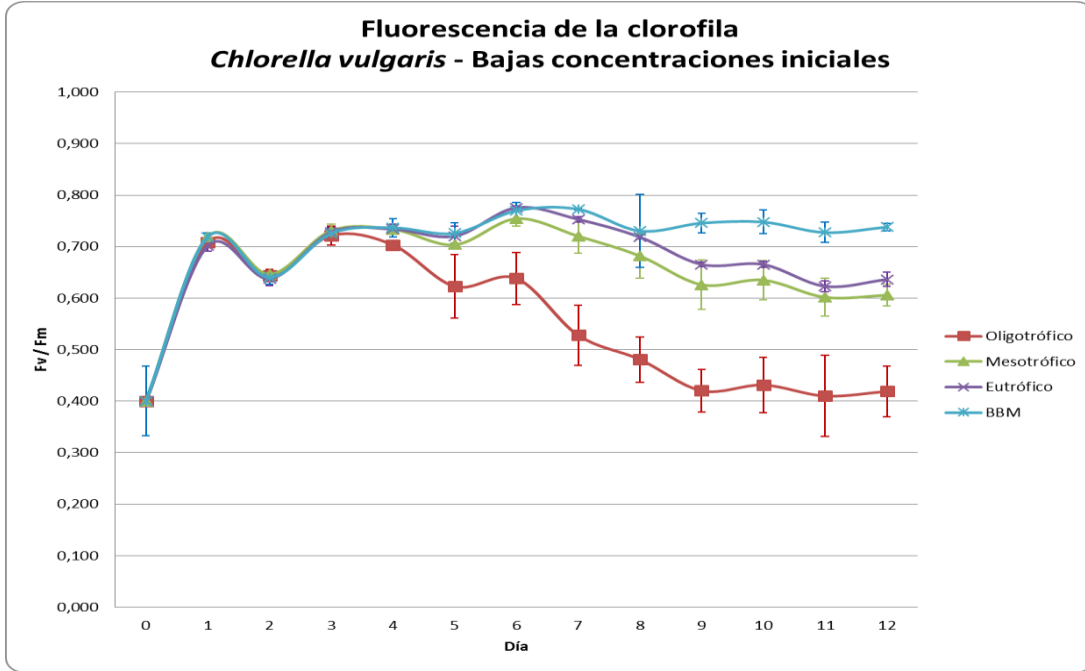
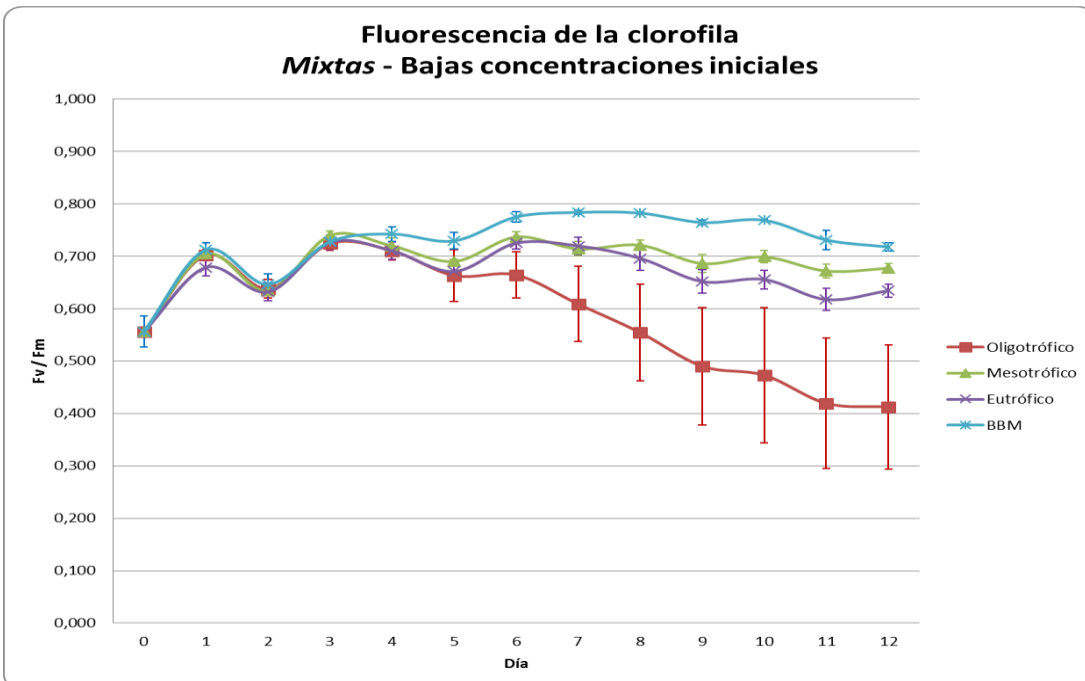


Figura 5-31: Eficiencia fotosintética de las dos especies en cultivos mixtos con baja concentración inicial de células. Las barras verticales indican la desviación estándar.



Para el comportamiento de las curvas de eficiencia fotosintética en *C. vulgaris* (Figura 5-30) también se vieron divergencias con lo encontrado en el experimento de la sección 5.3. En aquel, los resultados demostraban la euritolerancia de la especie a las diferentes concentraciones de nutrientes en el medio, mientras que en el presente ensayo se evidencian valores para Fv/Fm por debajo de 0.600 para el tratamiento oligotrófico en estas condiciones de inóculo inicial. Sin embargo se encuentran las diferencias de tratamientos en función de la concentración de nutrientes que se manifiesta claramente en la figura 5-30, lo que no fue evidente en el experimento de la sección anterior.

En la figura 5-31 se presentan las curvas de eficiencia fotosintética para cada uno de los tratamientos con las dos especies cultivadas de manera mixta. Es evidente la separación de la respuesta fotosintética entre tratamientos. Sin embargo la posición de la curva de oligotrofia por debajo de 0.600 Fv/Fm llama la atención. Este aspecto puede explicarse por el comportamiento de las dos especies en los monocultivos. En ellos la curva de oligotrofia estuvo también por debajo de 0.600 Fv/Fm. En contraste con el experimento anterior, los resultados fueron muy diferentes, ya que para dicho ensayo solo las algas en BBM y en condiciones de eutrofia presentaron una estabilidad de las curvas por encima del límite que define el estrés en los organismos. Las curvas en oligo y mesotrofia en cambio estuvieron por debajo de dicho límite y fueron muy similares entre ellas.

El análisis de varianza de la eficiencia fotosintética para este ensayo con bajas densidades iniciales (véase anexo A), muestra diferencias significativas teniendo como fuente de variación el estado trófico (en todas $Pr > F = < 0.0001$). En la tabla 5-11 se presentan los resultados de la prueba Tukey realizada para cada especie por separado en monocultivo y en cultivo mixto. Los valores fueron coherentes con lo que se observó en las figuras 5-29 a 5-31. Sin embargo, no hubo un agrupamiento de Tukey determinante que mostrara diferencias significativas entre los tratamientos. Al igual que en las figuras, en el análisis estadístico existen resultados muy disímiles a los encontrados en el experimento anterior. Sin embargo el comportamiento de la medición de la eficiencia fotosintética en el tratamiento de mesotrofia no corresponde a lo esperado según la bibliografía. Todo lo anterior muestra que la concentración inicial de las esferas afecta los resultados encontrados y por lo tanto se debe tener muy en cuenta para el diseño del biomonitoreo.

Tabla 5-11: Comparación de medias de la eficiencia fotosintética en *S. ovalternus* monocultivada (izq.), en *C. vulgaris* monocultivada (cen.) y en ambas especies en cultivo mixto (der.). Valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba Tukey HSD, $P > 0.05$).

Especie Estado	<i>Scenedesmus ovalternus</i>	Especie Estado	<i>Chlorella vulgaris</i>	Especie Estado	Mixtas
Oligotrófico	1.02511 B	Oligotrófico	1.028045 B	Oligotrófico	1.04131 B
Mesotrófico	1.09122 A	Mesotrófico	1.085923 A	Mesotrófico	1.09504 A
Eutrófico	1.09528 A	Eutrófico	1.093660 A	Eutrófico	1.08450 A
BBM	1.11140 A	BBM	1.109619 A	BBM	1.11344 A

5.5 Efecto de las aguas de los sistemas acuáticos escogidos en las dos especies inmovilizadas en esferas de alginato

El último experimento realizado durante esta investigación se presenta en esta sección. Se utilizaron aguas provenientes de los sistemas acuáticos escogidos (Oligotrófico: San Rafael; Mesotrófico: Santa María del Lago; Eutrófico: Juan Amarillo). El control se mantuvo con medio BBM como en el resto de experimentos. Adicionalmente, el experimento tuvo otras variaciones: se realizó en la sede piscícola La Terraza de la Universidad Nacional de Colombia, ubicada en la ciudad de Villavicencio; la temperatura se mantuvo en 24°C; el fotoperiodo se modificó a 12 horas luz / 12 horas oscuridad, para simular aún más las condiciones ambientales de un sistema acuático; y se realizaron las mediciones durante 10 días.

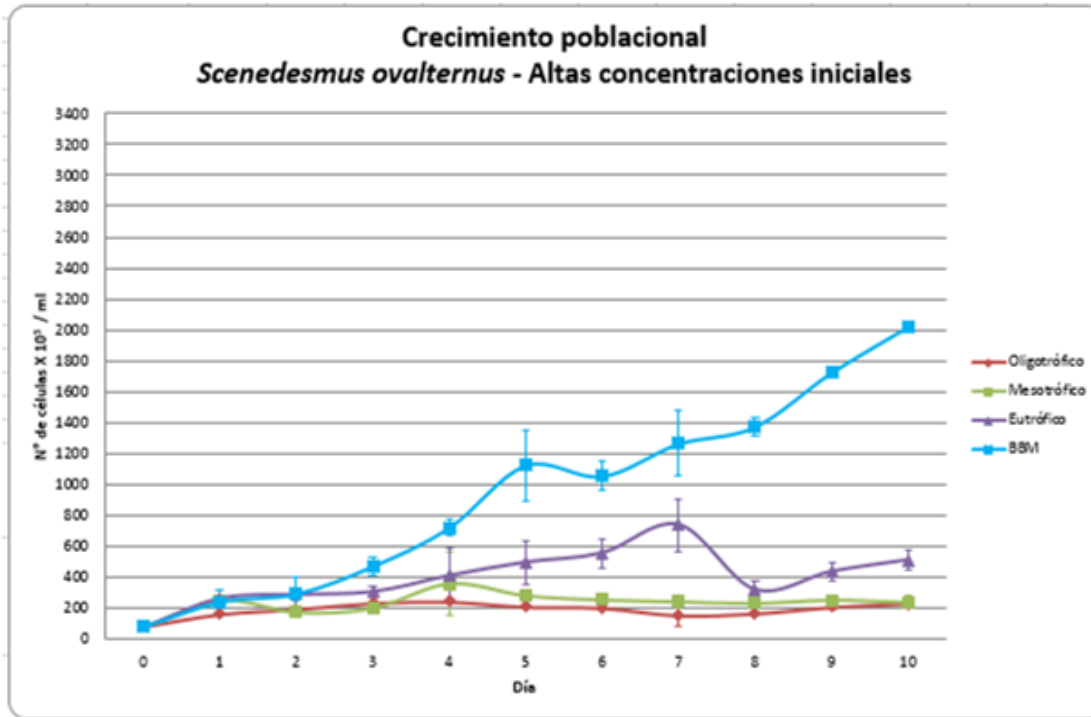
Como ya se había mencionado al inicio del presente documento, esta investigación hace parte de un proyecto para establecer un método de biomonitorio del estado trófico de los sistemas acuáticos con algas inmovilizadas. Dicho proyecto contempla dos etapas: una de experimentación en laboratorio y la otra en campo. Ambas evalúan el efecto de diferentes concentraciones de nutrientes sobre las dos especies encapsuladas en alginato de calcio en monocultivos y en cultivos mixtos. Por esta razón el presente experimento se desarrolló con aguas provenientes de los sistemas acuáticos escogidos para la fase de campo, que además presentan los tres estados tróficos. De esta manera se pretende hacer un acercamiento, desde las condiciones controladas en el laboratorio, al comportamiento de las dos especies frente a los estados tróficos de las aguas

naturales. En este mismo sentido, la concentración inicial de células cultivadas en este experimento se aumentó considerablemente, previendo la concentración a utilizar en los experimentos en campo, en donde las bajas temperaturas de algunos sistemas acuáticos como el embalse de San Rafael pueden influir determinadamente en el crecimiento poblacional de las algas. Al estar en bajas concentraciones las especies podrían no sobrevivir, por lo que se aumentó la concentración inicial de las células cultivadas dentro de las esferas a una cantidad mayor que los experimentos de las secciones anteriores, como se observa en la tabla 4-1 de la metodología.

De acuerdo a lo anterior, en el presente experimento se midió el crecimiento poblacional. No se midió la eficiencia fotosintética debido a la carencia del fluorómetro no modulado en la sede donde se desarrolló el experimento, durante todos los días de medición. El ensayo se hizo con las dos especies (*S. ovalternus* y *C. vulgaris*) cultivadas por separado y mixtas, y en los cuatro tipos de tratamiento (BBM, eutrofía, mesotrofía y oligotrofía). Con base en este diseño, la discusión de esta sección se centra en las variaciones de las tendencias de las curvas por el efecto de los tratamientos, a raíz de las modificaciones metodológicas realizadas. Esto no obvia la comparación con los experimentos anteriores (especialmente los de las secciones 5.3 y 5.4), y por ello se referenciarán constantemente. Cabe indicar que dichos ensayos tuvieron una concentración inicial de células cultivadas media (5.900.000 células/ml para *S. ovalternus* y 6.300.000 células/ml para *C. vulgaris*) y baja (1.500.000 células/ml para *S. ovalternus* y 1.400.000 células/ml para *C. vulgaris*), con respecto a este experimento (32.400.000 células/ml para *S. ovalternus* y 66.800.000 células/ml para *C. vulgaris*).

En *S. ovalternus* cultivada individualmente (Figura 5-32), se presentaron resultados organizados gradualmente en relación proporcional entre el crecimiento poblacional y la concentración de nutrientes en el medio como ya se ha mencionado. Se observó un crecimiento poblacional de mayor a menor valor en BBM, agua eutrófica, agua mesotrófica y agua oligotrófica. Fue evidente por una parte, el crecimiento mayor en el medio BBM dadas las condiciones óptimas que ofrece a las algas y por otra parte, la similitud entre las curvas de las aguas mesotróficas y eutróficas. A pesar de la alta densidad celular, esta gradación de los resultados fue bastante clara, en contra de lo que se esperaría de acuerdo a la comparación que se realizó de los otros dos experimentos.

Figura 5-32: Crecimiento poblacional de *S. ovalternus* en monocultivo, con alta concentración inicial de células en aguas provenientes de tres lagos con diferente nivel de trofía. Oligotrófico: San Rafael; Mesotrófico: Santa María del Lago; Eutrófico: Juan Amarillo. Las barras verticales indican la desviación estándar.

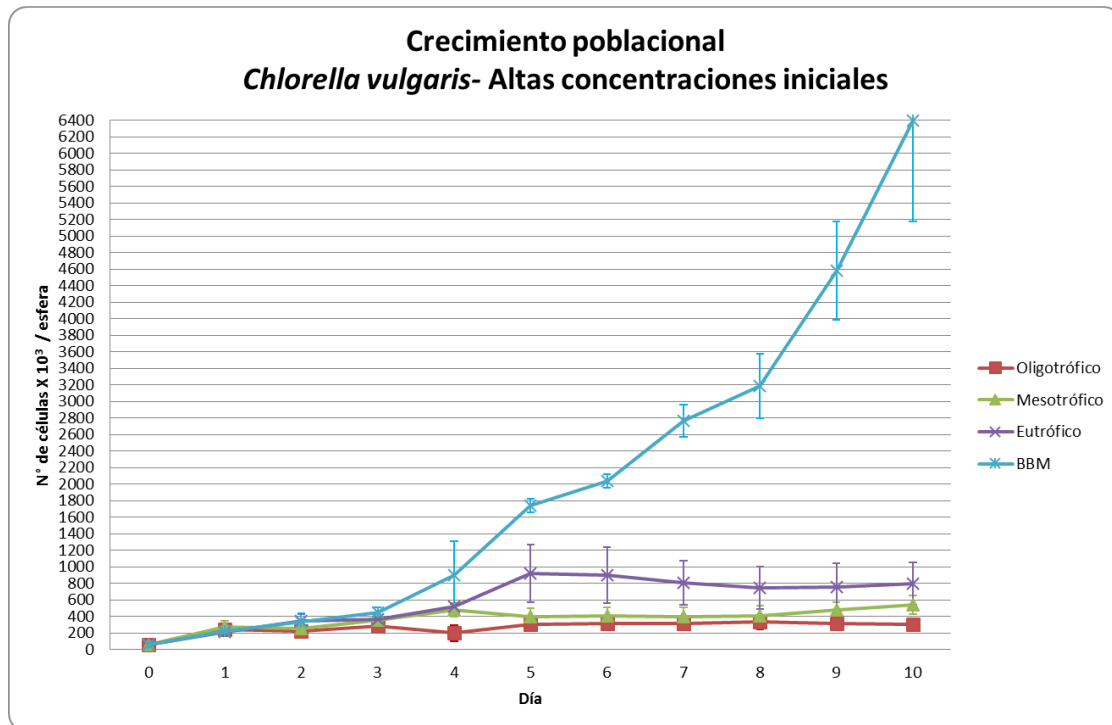


En *C. vulgaris* cultivada individualmente (figura 5-33) se repitió el comportamiento de la especie anterior. Se presentó la misma tendencia gradual del crecimiento según los tratamientos, con una curva ascendente mucho mayor en BBM que la de *S. ovalternus*. También se vio la misma similitud entre las curvas de aguas mesotróficas y eutróficas que se explicó anteriormente.

Al igual que en los experimentos pasados, el crecimiento de *S. ovalternus* en condiciones de cultivo mixto disminuyó significativamente ante la presencia de la otra especie (figura 5-34). Parecería confirmarse que *S. ovalternus* pierde la competencia con *C. vulgaris* (González, 2010). Sin embargo, la diferenciación entre las curvas de los distintos tratamientos siguió siendo bastante clara, con la gradualidad esperada según el grado de trofía. Se mantuvo el orden mostrado en las especies monocultivadas, que es acorde al que menciona la bibliografía (Roldán & Ramírez, 2008; Margalef, 1983). Es evidente que la curva de BBM sigue siendo muy superior a la de los otros medios y que hay una gran

similitud entre las curvas de oligotrofia y mesotrofia. Esta última tuvo valores menores durante los días 5 y 6 y posiblemente después del décimo día, lo que se explica a partir de las características adaptativas de la especie de ser estenotolerante a condiciones oligotróficas y mesotróficas (Wehr & Sheath, 2003) y de ganar aparentemente la competencia con la otra especie, lo cual podría explicar el comportamiento alternante entre estas dos curvas.

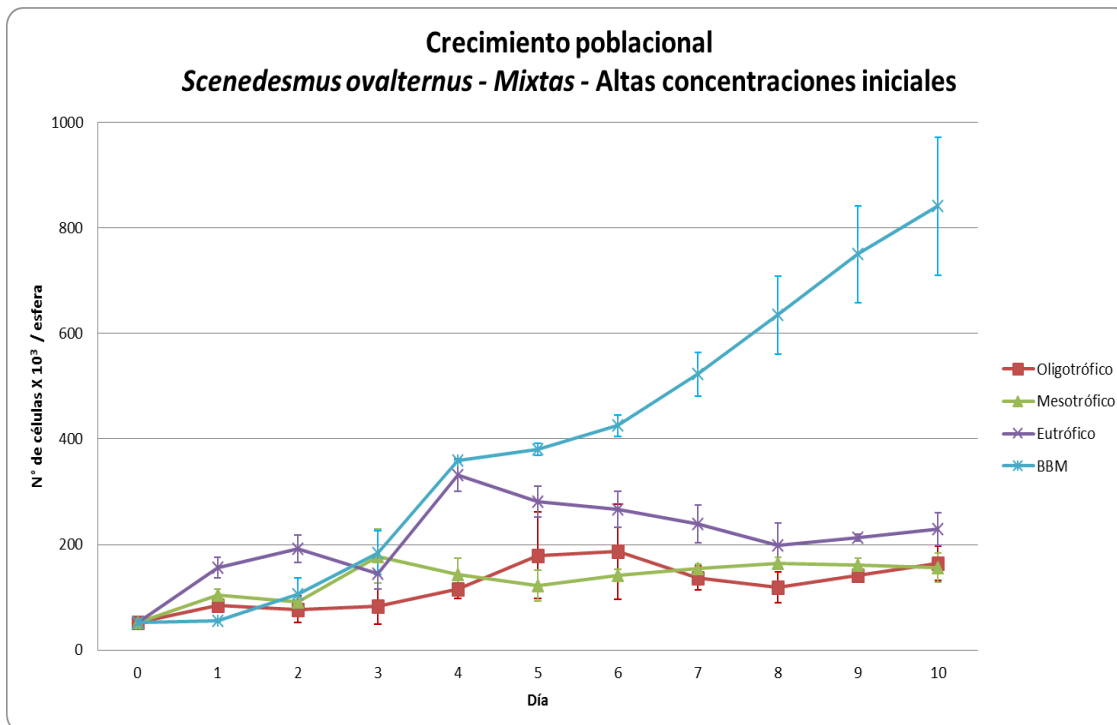
Figura 5-33: Crecimiento poblacional de *C. vulgaris* en monocultivo, con alta concentración inicial de células en aguas provenientes de tres lagos con diferente nivel de trofia. Oligotrófico: San Rafael; Mesotrófico: Santa María del Lago; Eutrófico: Juan Amarillo. Las barras verticales indican la desviación estándar.



El crecimiento de *C. vulgaris* en cultivo mixto (Figura 5-35) mostró exactamente las mismas tendencias de *S. ovalternus* en condiciones de cultivo mixto. Se mantuvo el crecimiento mayor para el tratamiento BBM, y hubo alternación entre las curvas de oligotrofia y mesotrofia. Cabe mencionar que a pesar de ser menor el crecimiento de ambas especies en el cultivo mixto como consecuencia de la posible competencia entre las dos poblaciones, el crecimiento poblacional en los cuatro tratamientos fue mayor para *C. vulgaris*, lo que parece demostrar su superioridad competitiva al ser euritolerante a las

concentraciones de nutrientes en el medio (Wehr & Sheath, 2003), como se había discutido en la sección 5.3.

Figura 5-34: Crecimiento poblacional de *S. ovalternus* en cultivo mixto con alta concentración inicial de células, en aguas provenientes de tres lagos con diferente nivel de trofía. Oligotrófico: San Rafael; Mesotrófico: Santa María del Lago; Eutrófico: Juan Amarillo. Las barras verticales indican la desviación estándar.



El análisis de varianza realizado a los datos del crecimiento poblacional de cada especie monocultivada o en cultivo mixto en aguas naturales (véase anexo A), muestra diferencias significativas en todos los casos teniendo como fuente de variación el estado trófico ($Pr > F = < 0.0001$), lo que respalda lo observado en las gráficas. Además, la prueba Tukey realizada (tabla 5-12) muestra el escalonamiento esperado entre los tratamientos en todas las especies y formas de cultivo, de acuerdo con lo mostrado por las figuras anteriores. A pesar de ser grandes las diferencias entre los valores de cada tratamiento, la prueba de Tukey no siempre señala que haya dicha gradación. Esto puede deberse a otros factores que enmascaran las diferencias entre los tratamientos y que por el alcance de esta investigación no se hacen evidentes. De nuevo, se requerirán más estudios detallados en los que se pongan a prueba otras variables para aclarar estos resultados.

Figura 5-35: Crecimiento poblacional de *C. vulgaris* en cultivo mixto con alta concentración inicial de células, en aguas provenientes de tres lagos con diferente nivel de trofía. Oligotrófico: San Rafael; Mesotrófico: Santa María del Lago; Eutrófico: Juan Amarillo. Las barras verticales indican la desviación estándar.

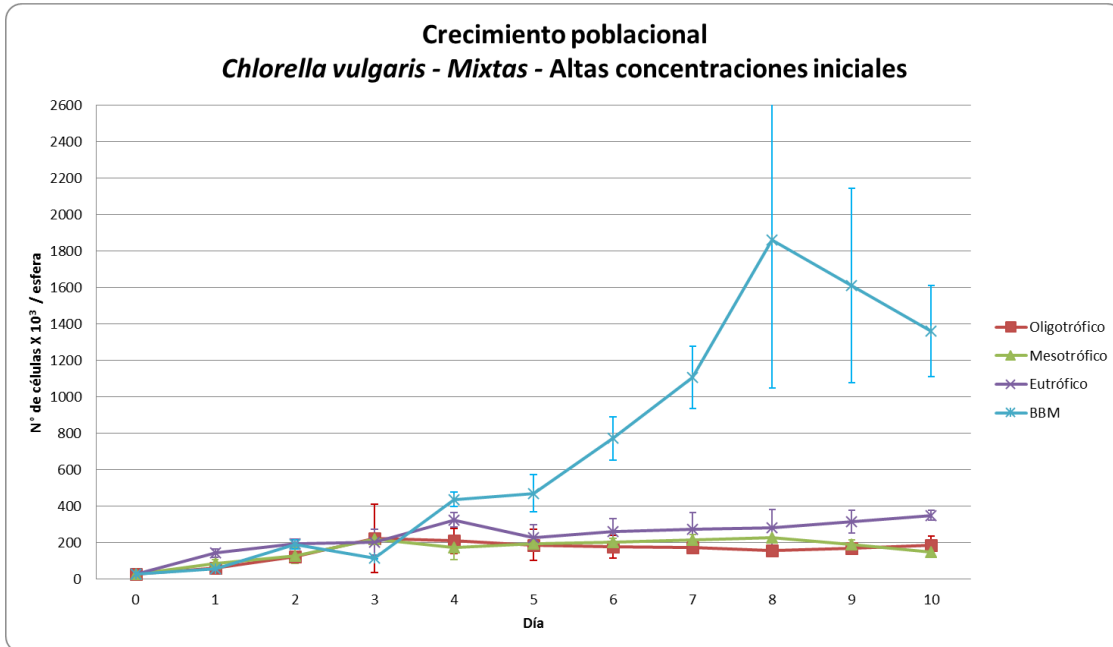


Tabla 5-12: Comparación de medias del crecimiento poblacional en *S. ovalternus* monocultivada (izq.), en *C. vulgaris* monocultivada (cen-izq.), en *S. ovalternus* cultivada mixta (cen-der.) y en *C. vulgaris* cultivada mixta (der.) con alta concentración inicial de células, en aguas provenientes de tres lagos con diferente nivel de trofía. Valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba Tukey HSD, $P > 0.05$).

Especie Estado	<i>Scenedesmus ovalternus</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>S. ovalternus Mixta</i>	<i>C. vulgaris Mixta</i>
Oligotrófico	5.25527 C	5.36959 C	5.04437 C	5.11001 B
Mesotrófico	5.33767 C	5.49965 BC	5.10029 C	5.15509 B
Eutrófico	5.54270 B	5.65177 B	5.28036 B	5.28968 B
BBM	5.82506 A	6.00710 A	5.43656 A	5.57518 A

Las variaciones en las tendencias de las curvas de crecimiento se pueden atribuir al efecto de las aguas provenientes de los sistemas acuáticos escogidos. Se destaca en primer lugar, el inicio del crecimiento poblacional desde el primer día de cultivo, a diferencia de otros estudios (Lebsky *et al.*, 2001; Abdel & Hammouda, 2007) y de los resultados de los otros experimentos de esta investigación. En ellos las células

inmovilizadas mostraron periodos de aclimatación más largos, lo que llevó a que las curvas de los cuatro tratamientos fueran iguales durante los primeros tres días. En segundo lugar, en el presente ensayo la diferenciación entre los tratamientos se hizo más notoria a partir del tercer o cuarto día. En tercer lugar, hubo una diferenciación marcada entre las curvas de cada uno de los tratamientos, que se mantuvo durante todo el experimento. Estas diferencias en resultados de los cultivos en las aguas provenientes de los sistemas acuáticos escogidos se podrían deber a las características de estas aguas naturales, que no solo tienen nitrógeno y fósforo, sino otros minerales y elementos que no tienen los medios en que se simulaban los distintos estados tróficos. Las aguas usadas en este experimento no se modificaron de ninguna manera (ni esterilización, ni filtración), conteniendo exactamente las mismas partículas que en el lago de donde se extrajeron, lo que implica que haya diferencias químicas marcadas con los medios de cultivo. También otros organismos presentes (virus, bacterias, protozoos), podrían influir. Estos aspectos requerirán futuros estudios detallados para abordar a profundidad sus efectos en la clasificación de los sistemas acuáticos según su nivel trófico (Roldán & Ramírez, 2008; Margalef, 1983).

De acuerdo a lo anterior, los tiempos de la cinética de crecimiento de las dos especies cultivadas por separado y mixtas se modificó lo que además de ser el resultado de las condiciones del medio de cultivo que ya se explicaron, tiene también que ver con la concentración inicial elevada de las células cultivadas. Al parecer, se presentan efectos dados por esta concentración inicial, tal como sucedió cuando se usó una concentración inicial baja de células cultivadas (experimento de la sección 5.4). En los otros experimentos se estableció que entre el día 0 y el 3 hay una adaptación de las algas a las condiciones del medio facilitada por los recursos que se encuentran en abundancia frente al bajo tamaño poblacional; entre los días 4 y 8 se establece la fase de crecimiento exponencial de las algas; entre los días 8 y 15 se da la fase estacionaria en el crecimiento y del día 15 o 16 en adelante se da el declive de las curvas de crecimiento dada por la mortandad de los individuos y el posterior recambio generacional de la población.

En el presente experimento sin embargo, dicha concentración elevada generó que las curvas de crecimiento poblacional en todos los tratamientos, especies y formas de

cultivo, presenten una estabilidad notoria, lo que llevó a una fase estacionaria entre los días 4 y 10 (según lo observado, aunque puede ser muchos más después del décimo día). Por lo tanto, la fase de crecimiento exponencial de las algas se daría entre los primeros tres días, aunque en las figuras se demuestra un crecimiento bajo. Esto se explica por el efecto de la elevada densidad poblacional en las esferas, que al ser alta desde el inicio impide un gran crecimiento, dada la deficiencia de espacio disponible para las células. Como lo menciona Forero (2011), el tamaño de las esferas de alginato limita el crecimiento poblacional de ambas especies, debido a la falta de espacio para expandirse a través de la matriz del polímero. Esta fase estacionaria permanente durante el cultivo da la posibilidad de observar las tendencias de las curvas entre los tratamientos con respecto al efecto de los nutrientes dado durante la fase de crecimiento exponencial, más claramente y durante más días, lo que beneficia el uso de estas algas encapsuladas para el biomonitorio, ya que permite notar fácilmente el efecto diferencial del estado trófico del medio sobre las especies algales.

Otro efecto evidente de la alta densidad poblacional en las esferas es el de la acelerada dilución de las mismas, aspecto que ya se había mencionado, aunque no se había abordado ampliamente. En este sentido cabe mencionar que existen diferentes factores que influyen en la dilución de las esferas cuando se encuentran en el medio de cultivo. Uno es la alta densidad de células, que podrían afectar a través de sus exudados al alginato de calcio donde se encuentran. Igualmente, es posible que la gran cantidad de algas tengan algunos procesos de absorción de los componentes con los que está construida la cápsula. Al empezar el proceso de dilución, las esferas tienden a presentar características notorias, como bordes irregulares, mayor blandura y textura gelatinosa. Además, se hace evidente la mezcla de la matriz del polímero con las algas que se liberan en el medio porque este se torna de color blancuzco-verdoso.

Ante este evento de dilución de las esferas, se hacen las siguientes recomendaciones para disminuir el efecto de estos factores, de acuerdo a los correctivos realizados en la presente investigación y a lo señalado en otros estudios: 1) al construir las esferas es adecuado mantenerlas un tiempo mayor a 30 minutos en el cloruro de calcio, lo que permite una mayor estabilidad y fortaleza de las membranas del polímero; 2) disminuir la aireación de las botellas hasta el punto de evitar turbulencias fuertes que muevan las esferas dentro del medio de cultivo, evitando el choque mecánico entre estas; 3) evitar

aumentar el número de esferas por encima de 250 por botella (250ml de medio de cultivo), ya que se evita el efecto del peso y el contacto entre las esferas y con ello su deformación; 4) determinar la concentración inicial de células cultivadas de acuerdo a los días de cultivo en que se pretenden mantener, teniendo en cuenta el efecto de la densidad poblacional en la dilución, que se mencionó en párrafos anteriores (Forero, 2011).

Cabe anotar que la desviación estándar de los datos en este ensayo fue mucho menor que en los experimentos anteriores. Es posible que la heterogeneidad entre los tratamientos fuese mayor que entre las réplicas de un mismo tratamiento, lo que parece deberse a las características particulares de los medios de cultivo. Estas aguas contienen exactamente los mismos elementos y partículas que en el lago de donde se extrajeron. Esto implica que no haya diferencias marcadas en las concentraciones de los nutrientes, ni en la fisicoquímica o características propias del agua entre las réplicas de un mismo ecosistema (Roldán y Ramírez, 2008; Margalef, 1983). Todo lo anterior demuestra que el uso de las algas encapsuladas para el biomonitoreo del estado trófico de los sistemas acuáticos, no solo sería factible, sino también exitoso en términos de las posibilidades de medición con las múltiples variables y los resultados gráficos y estadísticos diferenciados que resultan en la interacción de éstas algas con el medio.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

Las variables escogidas para el presente estudio fueron el crecimiento poblacional, la eficiencia fotosintética y el contenido de clorofilas, que después del análisis de los resultados obtenidos, se confirman como variables adecuadas para identificar el efecto de la concentración de nutrientes del medio en las algas encapsuladas, ya que permiten hacer relaciones importantes con el comportamiento de la población, la fisiología celular y las capacidades adaptativas de las especies.

Las **curvas de crecimiento** de las especies son diferentes independientemente de la concentración inicial de células cultivadas, el tipo de cultivo, o incluso el tratamiento. *Chlorella vulgaris* crece más rápido y alcanza mayores tamaños poblacionales que *Scenedesmus ovalternus*. Esto parece deberse a las características adaptativas de ambas especies en cuanto a su medio. Por una parte, *C. vulgaris* tiene un amplio rango de tolerancia frente a la concentración de nutrientes, lo que le permite encontrarse en cualquier estado trófico, siendo más comúnmente reportada y frecuentemente abundante en aguas con baja concentración de nutrientes. Por otra parte, *S. ovalternus* es una especie muy abundante y frecuentemente reportada en aguas ricas en nutrientes, ya que es estenotolerante a esta condición. Este contraste en sus características, permite observar tendencias en el comportamiento frente a las condiciones del medio. De esta manera las curvas de crecimiento de ambas especies se acercan proporcionalmente a medida que aumenta el contenido de nutrientes en el medio.

Como *S. ovalternus* es más sensible a la concentración de nutrientes en el medio (por el efecto negativo que pueden generar los valores bajos de esta variable sobre su fisiología) su comportamiento poblacional podría servir como referente de altas y bajas concentraciones de manera general. Es decir, mostraría un buen crecimiento en los

tratamientos con mayores nutrientes y un bajo crecimiento en los oligotróficos. A pesar de lo anterior, al tratar de diferenciar entre un estado mesotrófico y otro oligotrófico, puede haber deficiencias al utilizar únicamente *S. ovalternus*, ya que a veces las curvas en estos dos tratamientos son muy similares. Esto se debe a que tanto la condición oligotrófica como la mesotrófica constituyen un medio limitante para esta especie. Cabe recalcar entonces el papel de *C. vulgaris* para acompañar el análisis de los datos, ya que a pesar de ser una especie generalista, muestra variaciones en su crecimiento poblacional que son proporcionales a la cantidad de nutrientes disponibles más específicamente. Además, al tener el crecimiento de las dos especies se generan puntos de comparación entre las curvas de las dos poblaciones, que en conjunto permiten identificar el tipo de estado trófico en el que se encuentran.

A partir de la adecuación de la **metodología de la fluorescencia de la clorofila a**, se establecieron como condiciones para la medición de la eficiencia fotosintética en las algas encapsuladas en alginato de calcio las siguientes: a) Intensidad de la luz del fluorómetro no modulado de $3.000\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$; b) el nivel de ampliación de la intensidad del haz de luz actínica de $\times 0.25$ dado en el adaptador de fase líquida y de $\times 0.8$ dado en el fluorómetro no modulado; c) el tiempo de exposición a la luz actínica de 2s dado en el fluorómetro no modulado; y d) el tiempo de preadaptación a la oscuridad de 30min controlado manualmente. Con esto, el rango de valores que se podría asociar con un estado sano y de no estrés para las algas es de 0.730 a 0.780 Fv/Fm.

Para la **eficiencia fotosintética** se pudo observar que *C. vulgaris* tiene curvas mucho más estables con valores por encima de los 0.700 Fv/Fm, dada su capacidad adaptativa frente a las diferentes concentraciones de nutrientes. En cambio, en los tratamientos oligotróficos y mesotróficos *S. ovalternus* muestra curvas que después de un punto descienden por debajo de 0.600 Fv/Fm, lo que señala algún grado de estrés fisiológico sufrido por las algas allí presentes. Cabe mencionar que las bajas concentraciones de nutrientes en el medio y la reducida cantidad de células cultivadas inicialmente pueden causar también un decaimiento inicial de la curva de crecimiento de cualquiera de las especies ya que la población no es lo suficientemente grande para soportar la mortalidad que se presenta por la deficiencia de nutrientes.

En cuanto al **contenido de clorofilas**, se puede establecer que las diferencias en la concentración de clorofilas entre los estados tróficos simulados solo es evidente una vez las algas dentro de las esferas de alginato han pasado de la fase de crecimiento exponencial, lo cual ocurre después del día 7, evidenciado en las mediciones del presente estudio hacia el día 10 de los cultivos. Sin embargo, los resultados arrojan datos importantes en cuanto a las respuestas fisiológicas de las algas, que complementan el análisis de los resultados para el sistema de monitoreo, ya que existen relaciones interesantes entre la deficiencia de nutrientes y la síntesis de clorofilas, como la producción en términos de biomasa y el efecto de auto-sombreado, por ejemplo. En principio, vale la pena resaltar que en el contenido de clorofilas obtenido en los ensayos se dio un comportamiento escalonado entre los tratamientos, lo que de manera preliminar merece asumirse como efecto de las concentraciones de nutrientes en el medio y es correspondiente con lo encontrado en el crecimiento poblacional.

El encapsulamiento de *S. ovalternus* y *C. vulgaris* por separado o mixtas, causa diferencias en el crecimiento poblacional, la eficiencia fotosintética y el contenido de clorofilas de las algas. Por una parte las esferas tienen un efecto de estabilidad dado por el ambiente regulado que proporcionan para las células. Por otro lado, al aumentar el tamaño de la población se aumenta el efecto de auto-sombreado sobre las células. Sin embargo, estas condiciones internas de las cápsulas no afectan el comportamiento diferencial de las variables en cuanto a la influencia de los estados tróficos simulados, permitiendo un análisis equivalente a la condición de cultivo libre. Por lo tanto es posible observar el efecto de las distintas concentraciones de nutrientes sobre las especies, lo que da la posibilidad de usarlas para el biomonitoreo del estado trófico de los sistemas acuáticos.

Es notable el **efecto de estabilidad** que parece ofrecer la matriz de alginato sobre las algas a partir de los resultados en las tres variables medidas. Tanto la membrana externa como la matriz de alginato que componen las esferas ofrecen un ambiente propicio para las algas, brindándoles estabilidad frente a las condiciones variables del medio, las cuales son reguladas por las cápsulas. Este aspecto es positivo y fundamental en el método de biomonitoreo que se pretende establecer, ya que las mediciones se ven menos afectadas por variaciones repentinas, fuertes o complejas en el medio, lo que

permite centrar la atención y el análisis de los datos en el seguimiento del nivel trófico del sistema acuático.

Otro factor importante que influye sobre el desarrollo de las algas, dado por la condición de encapsulamiento, es el llamado **efecto de auto-sombreado**. Este fenómeno ocurre cuando la mayor densidad de células en la periferia de las esferas, genera un auto-sombreado hacia el interior de la cápsula. En consecuencia, las algas ubicadas en la parte superficial de la esfera presentan un mayor crecimiento poblacional y reducen el paso de la luz hacia el centro de la misma. Sin embargo, el efecto de auto-sombreado se da con una alta densidad de células en las esferas y un cultivo con alta duración; también podría verse como una ventaja para el sistema de biomonitorio, ya que además de no afectar en los resultados diferenciales entre los tratamientos, magnifica estas diferencias en la medición del contenido de clorofilas y de la eficiencia fotosintética, generando curvas claramente escalonadas en proporción a la concentración de los nutrientes existentes en el medio.

En cuanto a los **cultivos mixtos**, es evidente que el crecimiento poblacional de ambas especies, es mucho menor que cuando se encuentran en cultivos por separado. Esto se puede atribuir a la competencia interespecífica que se presenta entre las dos poblaciones por los recursos del medio. Parecería que en esta interacción *C. vulgaris* resulta ser una mejor competidora, ya que es generalista en cuanto a la concentración de nutrientes, mientras que *S. ovalternus* solo presenta un buen crecimiento en medios con alto contenido de nutrientes. Por supuesto, habría que tener en cuenta otros recursos que influyen en dicha competencia y que pueden explicar la diferenciación de nichos para cada especie.

A pesar de la reducción en cuanto al crecimiento poblacional, los cultivos mixtos no influyen en la tendencia de las curvas, es decir que *C. vulgaris* sigue estando por encima de *S. ovalternus*, de la misma manera que ocurre con las curvas de estas dos especies en los monocultivos. Por lo tanto, para el sistema de biomonitorio es cuestionable el uso de las dos especies en cultivos mixtos y al mismo tiempo en monocultivos, ya que se obtienen los mismos resultados al cultivarlas solamente en una de las dos condiciones. En este sentido, vale la pena revisar en estudios posteriores qué condición puede

generar mayor información, ya que al revisar los resultados en cultivos mixtos a la luz de la competencia y los modelos Lotka-Volterra, podrían surgir análisis interesantes que mejorarían el sistema de biomonitorio. Por lo pronto sería tal vez más sencillo utilizar las algas en cultivos independientes, a fin de que los posibles efectos de competencia no enmascaren la respuesta ante los diferentes grados de trofía del agua.

La concentración inicial de células cultivadas influye de manera determinante en el comportamiento de las curvas tanto de crecimiento poblacional como de eficiencia fotosintética. En este sentido, después de experimentar con tres concentraciones iniciales diferentes de células cultivadas, se puede concluir que con una mayor concentración las condiciones para un sistema de biomonitorio son más adecuadas. Aunque con cualquiera de las concentraciones iniciales de células cultivadas en los ensayos realizados se observó un crecimiento poblacional de mayor a menor valor en BBM, medio eutrófico, medio mesotrófico y medio oligotrófico, respectivamente. Es importante resaltar que esta organización de los resultados es mucho más clara en las concentraciones bajas y altas donde se hacen notorias las diferencias entre las diversas curvas de crecimiento.

Adicionalmente, en el experimento con una baja concentración inicial se presenta una fase exponencial del crecimiento poblacional más extendida con 7 días, frente a los otros experimentos en donde se dan solo de 3 a 5 días, lo que podría conllevar una serie de ventajas importantes en cuanto a la posibilidad de evidenciar cada pequeña variación que se genere por otras variables que puedan llegar a ser de interés en el monitorio del sistema acuático. Es factible de esta manera observar los cambios en períodos cortos (días), porque las variables señalan las variaciones drásticas que provoca el medio sobre el crecimiento algal. Así mismo podría conllevar ventajas en cuanto a la disminución de los efectos de la densidad en las algas, como por ejemplo la reducción del auto-sombreado y la posibilidad de dejar por más tiempo las esferas en el medio trófico, ya que habría más disponibilidad de nutrientes y espacio dentro de las cápsulas.

A pesar de lo anterior, en los cultivos con una alta densidad inicial, la cinética de crecimiento muestra desde el primer día de cultivo un inicio de la fase exponencial. Esta dura los primeros tres días aproximadamente y luego se pasa a la fase estacionaria, que según lo observado va desde el día 4 hasta el 10 (terminación del cultivo, pero podría ser

mucho más duradera). Esta fase estacionaria “permanente” muestra una estabilidad de las curvas que permite ver claramente las diferencias entre los tratamientos como resultado de la diferenciación dada por la influencia del medio en la fase de crecimiento exponencial de la población, lo que representa una gran ventaja en el sistema de biomonitorio, no solo por la claridad de las diferencias, sino también porque es más eficiente para hacer un seguimiento constante de las condiciones del ecosistema.

El **efecto de la concentración diferencial de nutrientes** sobre las dos especies cultivadas por separado o mixtas fue evidente y coherente con lo expuesto en la bibliografía. Se presentó una gradualidad en los datos, de manera proporcional a la concentración de nutrientes en el medio de cultivo, es decir que el mayor crecimiento poblacional, la mayor eficiencia fotosintética y el mayor contenido de clorofilas de las algas ocurrió en el BBM por ser este el de mejores condiciones de cantidad y proporcionalidad de nutrientes; le siguieron los tratamientos eutrófico, mesotrófico y oligotrófico, en ese orden. Además, hubo una clara tendencia de *Chlorella vulgaris* a crecer por encima de *Scenedesmus ovalternus*. El contraste en sus características adaptativas permite observar tendencias en el comportamiento frente a las condiciones del medio. Sin embargo, las curvas de crecimiento de ambas especies se acercan proporcionalmente en la medida en que aumenta el contenido de nutrientes.

El efecto del estado trófico sobre las algas es **más notorio en condiciones naturales que artificiales**. Los tratamientos con aguas naturales se diferencian no sólo en la concentración de nitrógeno y fósforo, sino en otros factores propios del estado trófico correspondiente y su efecto en la dinámica del sistema acuático. Entre tales factores se encuentran aspectos fisicoquímicos como la turbidez, la salinidad, el oxígeno disuelto, la conductividad, la profundidad de la capa fótica, la alcalinidad y la concentración de cada nutriente. También hay atributos biológicos como la abundancia y el tipo de microorganismos y la proporción entre los tipos de eslabones en la red trófica que podrían influenciar las condiciones de estas aguas. Otros procesos como la producción primaria, la respiración y la recirculación de nutrientes y materia orgánica también pueden afectar las características tróficas de estos ambientes. Los experimentos en laboratorio en los que se busca ver el efecto de la variación solo en la concentración de nitrógeno y fósforo del BBM demuestran que el uso de las dos especies inmovilizadas es

adecuado para determinar el estado trófico de un medio; pero el ensayo con aguas naturales confirma que el sistema de biomonitoreo puede ser veraz, eficiente y sencillo, ya que las respuestas de las algas muestran diferencias más marcadas entre los distintos estados tróficos.

Los aspectos antes mencionados son fundamentales para el establecimiento del **método de biomonitoreo**. Se busca evidenciar los efectos de los diferentes grados de trofia sobre las algas, al tiempo que se quiere reducir la interferencia que puedan ocasionar variaciones repentinas fuertes o complejas en el medio. El método de biomonitoreo debe entonces centrarse en el seguimiento de las concentraciones diferenciales de los nutrientes en el sistema acuático bajo las condiciones establecidas, que han demostrado ser adecuadas para diferenciar los estados tróficos a partir de la medición de las variables estudiadas en *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus ovalternus* inmovilizadas en alginato de calcio durante el presente estudio.

6.2 Recomendaciones

A lo largo del presente documento se han venido explicitando algunas recomendaciones que se deberían tener en cuenta para estudios posteriores, que abordan aspectos metodológicos y analíticos. Sin embargo a continuación se mencionan cuatro sugerencias que se considera importante resaltar:

- Para el cultivo de algas encapsuladas en alginato de calcio es necesario tener en cuenta la composición de las esferas (proporción de alginato y preparación algal) y su mantenimiento, de manera que su fragilidad o dureza, así como su proceso de dilución, no afecte en los resultados que se quieran obtener en el estudio.
- Para el establecimiento de un sistema de biomonitoreo con algas inmovilizadas, es adecuado utilizar especies contrastantes en su capacidad adaptativa frente al factor a evaluar, ya que esto enriquece los análisis. Así mismo, se recomienda establecer una concentración inicial de células cultivadas que permitan tener una cinética de crecimiento donde la fase exponencial no sea muy amplia y se pueda acceder durante más días a la fase estacionaria, lo que permite evidenciar mucho más fácilmente los cambios en el medio.
- Los principales temas evidenciados durante el presente estudio y que requieren mayor investigación hacia el futuro son:

- Poner a prueba la metodología para la extracción de clorofilas en algas encapsuladas, con el fin de obtener datos más confiables para un análisis mucho más productivo en el marco del sistema de biomonitoreo o de cualquier otro estudio con este tipo de cultivo.
- Establecer con precisión los límites de nitrógeno y fósforo a partir de los cuales el alga empieza a mostrar cambios detectables en su crecimiento poblacional, para darle mayor sensibilidad al sistema de biomonitoreo.
- Optimizar las respuestas de cada especie al modificar más específicamente la concentración de los nutrientes en el medio, ya que unas especies son más sensible a la deficiencia de un nutriente específico.
- El efecto que pueda tener *S. ovalternus* sobre *C. vulgaris* o viceversa, en cuanto a la competencia, la cual podría provocar que en respuesta a la presencia de la otra especie *C. vulgaris* compita más de manera intraespecífica que interespecífica, a fin de limitar su población y con esto racionar los recursos disponibles.
- A partir de un error metodológico de una medición de la eficiencia fotosintética registrada solo hasta después de tener las esferas en oscuridad durante 22 horas por mantenimiento del fluorómetro, fue notable la poca variación que se da a pesar de que las células estuvieron durante tanto tiempo en preadaptación a la oscuridad, lo que puede deberse a que las algas podrían entrar en un periodo de dormancia dentro de las esferas. Aunque esta es apenas una conjetura y requerirá posteriores confirmaciones, podría ser una característica útil para el uso de la especie en campo en localidades de difícil acceso donde se requiera algún tiempo para iniciar las mediciones.
- El comportamiento de cada variable en cada especie en los cultivos mixtos, ya que es probable que influyan aspectos adicionales a la competencia, como la capacidad de cada especie para usar de manera diferente los recursos nutricionales espaciales y lumínicos.
- La influencia de otras variables fisicoquímicas o biológicas de las aguas provenientes de los sistemas acuáticos escogidos y que no tienen los medios en que se simulaban los distintos estados tróficos, en las variables medidas y también en la clasificación de los sistemas acuáticos según su nivel trófico.

A. Anexo: Análisis de varianza (ANOVA) de los experimentos

A continuación se presentan mediante tablas, los valores correspondientes a cada experimento, resultantes del análisis de varianza que se realizó como parte del análisis estadístico. En la primera tabla se incluye la información general que se tuvo en cuenta para dicho ANOVA. A partir de estos valores se pudo definir la existencia de diferencias significativas estadísticamente entre los valores de acuerdo a la fuente de variación, es decir, la variable frente a la que se deseaba comparar. Con las diferencias significativas demostradas con el ANOVA se decidió hacer las pruebas post hoc de comparaciones múltiples de Tukey HSD, con el fin de identificar y analizar dichas diferencias más específicamente entre pares de valores.

Información general			
Clase	Equivalente	Niveles	Valores
Variables	Variables	3	Crecimiento poblacional, Eficiencia fotosintética, Contenido de clorofilas
Especies	Especies	4	<i>Scenedesmus ovalternus</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>S. ovalternus mixta</i> , <i>C. vulgaris mixtas</i>
Tiempo	Días	10 - 12	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Condición	Tipo de cultivo	2	Encapsuladas, Libres
Estado	Tratamiento	4	BBM, Eutrófico, Mesotrófico, Oligotrófico
Rep	Réplica	3	1 2 3

Análisis de varianza del experimento de la sección 5.2: Efecto del encapsulamiento de las células sobre las dos especies:

<i>Scenedesmus ovalternus</i> monocultivada			
Fuente de variación	Crecimiento poblacional	Eficiencia fotosintética	Contenido de clorofilas
Estado	<0.0001	<0.0001	0.0774

Condición	<0.0001	0.0142	0.0041
Estado * Condición	0.4380	<0.0001	0.2992
Promedio	5.683139	0.981697	3.913896
Coefficiente de variación	4.133806	6.272204	6.064200
<i>Chlorella vulgaris</i> monocultivada			
Fuente de variación	Crecimiento poblacional	Eficiencia fotosintética	Contenido de clorofilas
Estado	<.0001	<.0001	0.8183
Condición	<.0001	0.5312	0.0010
Estado * Condición	0.3624	0.0001	0.7245
Promedio	5.919662	1.049290	4.022318
Coefficiente de variación	4.753238	4.079765	5.674006

Análisis de varianza del experimento de la sección 5.3: Efecto de la concentración diferencial de nutrientes en el medio de cultivo, sobre las dos especies:

Fuente de variación: Estado				
Especie	Variable	Crecimiento poblacional	Eficiencia fotosintética	Contenido de clorofilas
<i>Scenedesmus ovalternus</i> monocultivada		<.0001	<.0001	<.0001
Promedio		5.147021	1.076899	3.719498
Coefficiente de variación		1.431035	2.100990	3.065390
<i>Chlorella vulgaris</i> monocultivada		<.0001	<.0001	<.0001
Promedio		5.091831	1.105536	3.586947

Coeficiente de variación	2.040298	0.525473	4.389010
<i>Scenedesmus ovalternus</i> cultivo mixto	<.0001	<.0001	<.0001
Promedio	4.920352	1.090360	3.750306
Coeficiente de variación	2.302023	1.184811	2.034993
<i>Chlorella vulgaris</i> cultivo mixto	<.0001	<.0001	<.0001
Promedio	4.880046	1.090360	3.750306
Coeficiente de variación	2.494224	1.184811	2.034993

Análisis de varianza del experimento de la sección 5.4: Efecto de la concentración inicial (baja) de células cultivadas, en las dos especies:

Fuente de variación: Estado			
Especie	Variable	Crecimiento poblacional	Eficiencia fotosintética
<i>Scenedesmus ovalternus</i> monocultivada		<.0001	<.0001
Promedio		4.845053	1.080754
Coeficiente de variación		4.487088	1.324538
<i>Chlorella vulgaris</i> monocultivada		<.0001	<.0001
Promedio		4.985239	1.079312
Coeficiente de variación		5.426074	1.008172
<i>Scenedesmus ovalternus</i> cultivo mixto		<.0001	<.0001
Promedio		4.437422	1.083573
Coeficiente de variación		5.438885	1.447919

<i>Chlorella vulgaris</i> cultivo mixto	<.0001	<.0001
Promedio	4.849809	1.083573
Coeficiente de variación	5.894541	1.447919

Análisis de varianza del experimento de la sección 5.5: Efecto de las aguas de los sistemas acuáticos escogidos en las dos especies

Fuente de variación: Estado			
Especie	Variable	Crecimiento poblacional	Contenido de clorofilas
<i>Scenedesmus ovalternus</i> monocultivada		<.0001	0.0109
Promedio		5.490173	3.799590
Coeficiente de variación		1.522059	12.01974
<i>Chlorella vulgaris</i> monocultivada		<.0001	0.0001
Promedio		5.632029	3.657958
Coeficiente de variación		1.746439	11.33501
<i>Scenedesmus ovalternus</i> cultivo mixto		<.0001	0.0020
Promedio		5.215396	3.731459
Coeficiente de variación		1.593152	8.558384
<i>Chlorella vulgaris</i> cultivo mixto		<.0001	0.0020
Promedio		5.282490	3.731459
Coeficiente de variación		1.751035	8.558384

B. Anexo: Valores de la comparación de medias en cada experimento

A continuación se presentan mediante tablas, los valores correspondientes a cada experimento, utilizados y resultantes de la comparación de medias que se realizó como parte del análisis estadístico. Los valores “originales” hacen referencia a los promedios totales según la especie, condición y estado; mientras que los valores “estadísticos” hacen referencia a los promedios arrojados en el análisis estadístico después de haber sido transformados los valores como se explicó en la metodología.

Los valores originales tienen como unidad de medida:

- Crecimiento poblacional: Número de células por mililitro (experimento de la sección 5.2) y Número de células por esfera (en el resto de experimentos).
- Eficiencia fotosintética: Fluorescencia de la clorofila (F_v/F_m).
- Contenido de clorofilas: Clorofilas totales en $\mu\text{g/L}$ (Como resultado de sumar las clorofilas *a* y las *b*).

Los valores estadísticos están acompañados de una letra, dada por las pruebas post hoc de comparaciones múltiples de Tukey HSD, con el objetivo de encontrar diferencias entre las medias con un $\alpha \leq 0.05$. Valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente.

Comparación de medias en valores originales y transformados del experimento de la sección 5.2: Efecto del encapsulamiento de las células sobre las dos especies:

Crecimiento Poblacional								
Especie	Scenedesmus ovalternus				Chlorella vulgaris			
Condición	Libres		Encapsuladas		Libres		Encapsuladas	
Estado	Originales	Estadísticos	Originales	Estadísticos	Originales	Estadísticos	Originales	Estadísticos
Oligotrófico	1037167	5.93953 B	204667	5.26648 D	2062167	6.25071 B	218333	5.24089 D
Mesotrófico	1010667	5.93615 B	162000	5.15263 D	2799500	6.32339 B	466667	5.33473 D
Eutrófico	2371667	6.26382 A	588000	5.54021 C	9174333	6.74673 A	740667	5.62151 C

Eficiencia fotosintética								
Especie	Scenedesmus ovalternus				Chlorella vulgaris			
Condición	Libres		Encapsuladas		Libres		Encapsuladas	
Estado	Originales	Estadísticos	Originales	Estadísticos	Originales	Estadísticos	Originales	Estadísticos
Oligotrófico	0.354	0.91855 C	0.460	0.97748 B	0.497	0.99561 D	0.581	1.03840 C
Mesotrófico	0.444	0.96764 B	0.280	0.87677 C	0.605	1.05016 BC	0.589	1.04268 BC
Eutrófico	0.696	1.09315 A	0.623	1.05658 A	0.702	1.09610 A	0.652	1.07281 AB

Contenido de Clorofilas								
Especie	Scenedesmus ovalternus				Chlorella vulgaris			
Condición	Libres		Encapsuladas		Libres		Encapsuladas	
Estado	Originales	Estadísticos	Originales	Estadísticos	Originales	Estadísticos	Originales	Estadísticos
Oligotrófico	10027	3.9934 AB	5937	3.7553 AB	5531	3.7293 BC	4891	3.6738 C
Mesotrófico	7462	3.8597 AB	2860	3.4313 B	8179	3.9025 ABC	9947	4.0635 ABC
Eutrófico	16571	4.2128 A	24495	4.2309 A	25080	4.3983 A	28685	4.3803 AB

Comparación de medias en valores originales y transformados del experimento de la sección 5.3: Efecto de la concentración diferencial de nutrientes en el medio de cultivo, sobre las dos especies:

Crecimiento Poblacional								
Especie	Scenedesmus ovalternus		Chlorella vulgaris		S. ovalternus Mixtas		C. vulgaris Mixtas	
Estado	Originales	Estadísticos	Originales	Estadísticos	Originales	Estadísticos	Originales	Estadísticos
Oligotrófico	118031	5.04682 B	143600	5.04295 B	81272	4.85425 BC	88974	4.84180 B
Mesotrófico	117897	5.04886 B	136985	5.02133 B	62595	4.75492 C	70472	4.77573 B
Eutrófico	193990	5.21403 A	200913	5.10642 AB	122185	4.99274 AB	88923	4.83388 B
BBM	269231	5.27838 A	293262	5.19662 A	177877	5.07950 A	203005	5.06877 A

Fluorescencia de la Clorofila						
Especie	Scenedesmus ovalternus		Chlorella vulgaris		Mixtas	
Estado	Originales	Estadísticos	Originales	Estadísticos	Originales	Estadísticos
Oligotrófico	0.569	1.04983 B	0.689	1.098695 B	0.639	1.080842 B
Mesotrófico	0.549	1.03960 B	0.686	1.097437 B	0.632	1.075954 B
Eutrófico	0.700	1.10297 A	0.713	1.106319AB	0.685	1.090119 B
BBM	0.767	1.11999 A	0.746	1.119691 A	0.756	1.114524 A

Contenido de Clorofilas						
Especie	Scenedesmus ovalternus		Chlorella vulgaris		Mixtas	
Estado	Originales	Estadísticos	Originales	Estadísticos	Originales	Estadísticos
Oligotrófico	4081	3.56666 B	2874	3.39973 B	4467	3.63188 C
Mesotrófico	5789	3.58456 B	6014	3.47885 B	3366	3.51323 C
Eutrófico	9712	3.73888 AB	226488	3.54483 B	7462	3.80009 B
BBM	16578	4.02144 A	19160	3.92438 A	19267	4.05602 A

Comparación de medias en valores originales y transformados del experimento de la sección 5.4: Efecto de la concentración inicial (baja) de células cultivadas, en las dos especies:

Crecimiento Poblacional								
Especie	Scenedesmus ovalternus		Chlorella vulgaris		S. ovalternus Mixtas		C. vulgaris Mixtas	
Estado	Originales	Estadísticos	Originales	Estadísticos	Originales	Estadísticos	Originales	Estadísticos
Oligotrófico	47244	4.59640 B	79897	4.76699 C	23910	4.24442 C	59872	4.63929 C
Mesotrófico	72756	4.73510 B	129962	4.89016 BC	28333	4.34896 BC	75769	4.74794 BC
Eutrófico	99231	4.80756 B	158551	5.02356 B	32500	4.50087 AB	111154	4.89705 B
BBM	367500	5.22734 A	442269	5.26024 A	90705	4.67675 A	314359	5.12254 A

Fluorescencia de la Clorofila						
Especie	Scenedesmus ovalternus		Chlorella vulgaris		Mixtas	
Estado	Originales	Estadísticos	Originales	Estadísticos	Originales	Estadísticos
Oligotrófico	0.497	1.02511 B	0.525	1.028045 B	0.541	1.04131 B
Mesotrófico	0.658	1.09122 A	0.633	1.085923 A	0.679	1.09504 A
Eutrófico	0.691	1.09528 A	0.655	1.093660 A	43711.982	1.08450 A
BBM	0.698	1.11140 A	0.709	1.109619 A	0.721	1.11344 A

Comparación de medias en valores originales y transformados del experimento de la sección 5.5: Efecto de las aguas de los sistemas acuáticos escogidos en las dos especies:

Crecimiento Poblacional								
Especie	Scenedesmus ovalternus		Chlorella vulgaris		S. ovalternus Mixtas		C. vulgaris Mixtas	
Estado	Originales	Estadísticos	Originales	Estadísticos	Originales	Estadísticos	Originales	Estadísticos
Oligotrófico	188515	5.25527 C	261545	5.36959 C	121788	5.04437 C	153485	5.11001 B
Mesotrófico	233182	5.33767 C	365424	5.49965 BC	133485	5.10029 C	164091	5.15509 B
Eutrófico	401424	5.54270 B	581606	5.65177 B	209455	5.28036 B	235636	5.28968 B
BBM	941788	5.82506 A	2059636	6.00710 A	391970	5.43656 A	728273	5.57518 A

Bibliografía

- Abdel M. & Hammouda, E. (2007). Biotechnological potential uses of immobilized algae. *International Journal of Agriculture & Biology*, 9(1), 183 – 192.
- Akhtar, N., Iqbal, M., Zafar, S. & Iqbal, J. (2008). Biosorption characteristics of unicellular green alga *Chlorella sorokiniana* immobilized in loofa sponge for removal of Cr (III). *Journal of Environmental Sciences*, 20, 231–239.
- Al-Rub, A., El-Naas, M., Benyahia, F. & Ashour, I. (2004). Biosorption of nickel on blank alginate beads, free and immobilized algal cells. *Process Biochemistry*, 39, 1767–1773.
- Andersen, R. (2005). *Algal culturing techniques*. USA: Elsevier Academic Press.
- Baker, N. (2008). Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 89-113.
- Barbero, M. (2011). Tesis de Pregrado no publicada, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia.
- Barsanti, L. & Gualtieri. (2006). *Algae. Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. USA: CRC Press.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Castro, D. (2009). Desarrollo de un índice de diatomeas perifíticas para evaluar el estado de los Humedales de Bogotá. Tesis de Maestría no publicada, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia.
- Chen, Y. (2001). Immobilized microalga *Scenedesmus quadricauda* Chlorophyta, Chlorococcales for long-term storage and for application for water quality control in fish culture. *Aquaculture*, 195, 71–80.

- Correa, A., Tamanaha, M., Horita, C., Radetski, M., Correa, R. & Radetski, C. (2009). Natural impacted freshwaters: in situ use of alginate immobilized algae to the assessment of algal response. *Ecotoxicology*, 18, 464–469.
- Day, J.G. and G.A. Codd, 1985. Photosynthesis and glycollate excretion by immobilized *Chlorella emersonii*. *Biotechnol. Let.*, 7: 573–6
- de-Bashan, L. & Bashan, Y. (2003). Bacterias promotoras de crecimiento de microalgas: una nueva aproximación en el tratamiento de aguas residuales. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(2), 85 – 90.
- de-Bashan, L., Moreno, M., Hernandez, J. & Bashan, Y. (2002). Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research*, 36, 2941–2948.
- Droop, M. (1973). Some thoughts on nutrient limitation in algae. *J. Phycol.*, 9, 264-272.
- Eldridge, D. (2004). A novel approach to photosynthesis practicals. *School Science Review*, 85(312), 37-45.
- Ertesbåg H & Valla S. (1998). Biosynthesis and applications of alginates. *Polymer Degradation and Stability* 59: 85-91.
- Faafeng, B., van Donk, E. & Källqvist, S. (1994). In situ measurement of algal growth potential in aquatic ecosystems by immobilized algae. *Journal of Applied Phycology*, 6, 301-308.
- Forero, M. (2011). Tesis de Pregrado no publicada, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia.
- Frense, D., Müller, A. & Beckmann, D. (1998). Detection of environmental pollutants using optical biosensor with immobilized algae cells. *Sensors and Actuators B*, 51, 256–260.
- González, L. (2010). Influencia de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acuttus*. Tesis

de Maestría no publicada, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia.

- González, S., Perales, H., & Salcedo, M. (2008). La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de educación bioquímica*, 27(4), 119 – 129. México.
- Govindjee & W.J. Coleman. (1990). How plants make oxygen. *Scientific American*. 262 (2).
- Graham, L. & Wilcox, L. (2000). *Algae*. USA: Prentice Hall.
- Griffit, M., Hill, B., Herlihy, A. & Kaufmann, P. (2002). Multivariate analysis of periphyton assemblages in relation to environmental gradients in Colorado rocky mountain streams. *J. Phycol.*, 38, 83-95.
- Hameed, A. (2006). Continuous removal and recovery of lead by alginate beads, free and alginate-immobilized *Chlorella vulgaris*. *African Journal of Biotechnology*, 5(19), 1819-1823.
- Hansatech Instruments (2006). *Operations Manual Setup, Installation & Maintenance*. England.
- Jeffrey, S. & Humphrey, G. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen*. 167: 191 -194.
- Katircioglu, H., Aslim, B., Türker, A., Atici, A. & Beyatli, Y. (2008). Removal of cadmium (II) ion from aqueous system by dry biomass, immobilized live and heat-inactivated *Oscillatoria* sp. H1 isolated from freshwater (Mogan Lake). *Bioresource Technology*, 99, 4185–4191.
- 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. (1997). *Limnoecology*. Oxford University Press.
- Lee, R. (2008). *Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge. 547 p.

- Luan, T., Jin, J., Chan, S., Wong, Y. & Tam, N. (2006). Biosorption and biodegradation of tributyltin (TBT) by alginate immobilized *Chlorella vulgaris* beads in several treatment cycles. *Process Biochemistry*, 41, 1560–1565.
- Luján, A. (2000). Las algas, indicadores de la calidad del agua. *Interciencia*, UNRC, Río Cuarto, 4(4). Extraído el 25 de Mayo de 2011 desde www.produccion-animal.com.ar
- Margalef, R. (1983). *Limnología*. Barcelona: Ediciones Omega.
- Maxwell, K. & Johnson, G. (2000). Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51, 659-668.
- Melgarejo, L. M.; Romero, M.; Hernández, S.; Barrera, J.; Solarte, M. E.; Suárez, D.; Pérez, L. V.; Rojas, A.; Cruz, M.; Moreno, A. L.; Crespo, S. C.; Pérez, W. H. (2010). *Experimentos en Fisiología Vegetal*. 1th ed., Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Mendoza, M., Martínez, J., Moreira-Turcq, P., Bonnet, M., Espinoza, R., Villagra, A., Abril, G. & Seyler, P. (2011, Mayo). Monitoreo espacial y temporal del estado trófico de los lagos de planicies de inundación en la Amazonía central mediante sensores remotos. *Anais XV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*. Brasil: INPE.
- Moreira-Santos, M., Soares, A. & Ribeiro, R. (2006). Immobilization of the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* in alginate for in situ experiments: Bead stability and suitability. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 135–141.
- Moreno-Garrido, I. (2008). Microalgae immobilization: Current techniques and uses. *Bioresource Technology*, 99, 3949–3964.
- Odum, E. (1972). *Ecología*. México: Interamericana.
- Ospina, N. & Peña, E. (2004). Alternativas de Monitoreo de Calidad de Aguas: Algas como Bioindicadores. *Acta Nova*, 4, 513 – 517.
- Peña, E., Palacios, M. & Ospina, N. (2005). *Algas como indicadores de contaminación*. Colombia: Universidad del Valle.

- Peña-Vázquez, E., Maneiro, E., Pérez-Conde, C., Moreno-Bondi, M. & Costas, E. (2009). Microalgae fiber optic biosensors for herbicide monitoring using sol-gel technology. *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 3538–3543.
- Pinilla, G. (2000). Indicadores biológicos en ecosistemas acuáticos continentales de Colombia. Colombia: Universidad Jorge Tadeo Lozano.
- Pinilla, G. (2010). An index of limnological conditions for urban wetlands of Bogotá city, Colombia. *Ecological Indicators*, 10(4), 848-856.
- Podola, B., Nowack, E. & Melkonian, M. (2004). The use of multiple-strain algal sensor chips for the detection and identification of volatile organic compounds. *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 1253–1260.
- Reynolds, C. (1998). What factors influence the species composition of phytoplankton in lakes of different trophic status? *Hydrobiologia* 369/370:11-26.
- Reynolds, C. (2006). *The ecology of phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ritchie, G. (2006). National Proceedings: Forest and Conservation Nursery Associations. RMRS-P-43. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. 160 p. Available at: <http://www.rngr.net/nurseries/publications/proceedings>
- Rivera C, Zapata A, Pinilla G, Donato J, Chaparro B y Jiménez P. (2005). Comparación de la estimación de la clorofila-a mediante el método espectrofotométrico y fluorométrico. *ACTA BIOLÓGICA COLOMBIANA*. Vol. 10, No 2, pp 95-103.
- Rodríguez, L. 2012. Determinación del estado trófico de tres ecosistemas lénticos de la Sabana de Bogotá con base al fitoplancton, en dos periodos climáticos contrastantes. Tesis Bióloga, Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá. 69 p.
- Roldán, G. 2003. Bioindicación de la Calidad del Agua en Colombia. Uso del Método BMWP/Col. Ed Universidad de Antioquia. 170pp.
- Roldán, G. & Ramírez, J. (2008). *Fundamentos de limnología neotropical (Segunda Edición)*. Colombia: Universidad de Antioquia.

- Ruiz-Marin, A. & Mendoza-Espinosa, L. (2008). Ammonia removal and biomass characteristics of alginate-immobilized *Scenedesmus obliquus* cultures treating real wastewater. *Fresenius Environmental Bulletin*, 17(9), 1236–1241.
- Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L. & Stephenson, T. (2010). Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology* 101, 58–64.
- Salisbury F.B. & Ross C.W. (1994). *Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamericana S.A. México.
- Shitanda, I., Takada, K., Sakai, Y. & Tatsuma, T. (2005). Compact amperometric algal biosensors for the evaluation of water toxicity. *Analytica Chimica Acta*, 530, 191–197.
- Stevenson, R., Bothwell, M. & Lowe, R. (1996). *Algal Ecology, Freshwater Benthic Ecosystems*. USA: Elsevier Academic press.
- Stewart, W. (1974). *Algal physiology and biochemistry*. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd.
- Suzuki, T., Yamaguchi, T. & Ishida, M. (1998). Immobilization of *Prototheca zopfii* in calcium-alginate beads for the degradation of hydrocarbons. *Process Biochemistry*, 33(5), 541-546.
- Tam, N., Wong, Y. & Simpson, C. (1998). Repeated removal of copper by alginate beads and the enhancement by microalgae. *Biotechnology Techniques*, 12(3), 187–190.
- Toro, J., Schuster, J., Kurosawa, J., Araya, E. & Contreras, M. (2003). Diagnóstico de la calidad del agua en sistemas lóticos utilizando diatomeas y macroinvertebrados bénticos como bioindicadores Río Maipo (Santiago de Chile). *Memorias XVI Congreso Chileno en Ingeniería Hidráulica*. Sociedad Chilena de Ingeniería Hidráulica. 1-11.
- Twist, H., Edwards, A. & Codd, G. (1998). A novel in-situ biomonitor using alginate immobilised algae (*Scenedesmus subspicatus*) for the assessment of eutrophication in flowing surface waters. *Water Resource*, 31(8), 2066-2072.

- Vásquez, G., Castro, G., González, I., Pérez, R. & Castro, T. (2006). Bioindicadores como herramientas para determinar la calidad del agua. *Contactos*, 60, 41 – 48.
- Védrine, C., Leclerc, J., Durrieu, C. & Tran-Minh, C. (2003). Optical whole-cell biosensor using *Chlorella vulgaris* designed for monitoring herbicides. *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 457-463.
- Vollenweider, R. A. 1968. *Scientific Fundamentals of the Eutrophication of Lakes and Flowing Waters, with Particular Reference to Nitrogen and Phosphorus as Factors in Eutrophication*. Paris, Rep. Organization for Economic Cooperation and Development, DAS/CSI/68.27, 192 pp.; Annex, 21 pp.; Bibliography, 61 pp.
- Wehr, J. & Sheath, R. (2003). *Freshwater algae of North America. Ecology and classification*. USA: Academic Press.
- Zar JH. 1996. *Biostatistical analysis*, 867 pp. Prentice Hall, Englewood Cliffs.