

ENSAYOS DE BIOESTIMULACIÓN ALGAL CON DIFERENTES RELACIONES NITRÓGENO: FÓSFORO, BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO

•
Néstor J. Aguirre Ramírez¹
Jaime A. Palacio Baena^{1,2}
Isabel C. Correa Ochoa^{1,3}
Esnedy Hernández Atilano^{1,4}

•

Recibido: 01/08/2007

Aceptado: 25/09/2007

Resumen

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar el crecimiento del alga *Chlorella vulgaris* ante diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo, a través de ensayos de bioestimulación en una cámara ambiental. Las variables respuesta fueron la densidad algal y la turbidez, evaluadas por conteo en una cámara de Neubauer y por espectrofotometría, empleando un equipo NOVA 60.

Para los ensayos de bioestimulación se utilizó el medio de cultivo Estándar Métodos, sugerido por APHA, AWWA (1995) con diferentes concentraciones de nitrógeno y de fósforo. En general, se concluyó que la bioestimulación del crecimiento de *Chlorella vulgaris* depende de la relación estequiométrica entre el nitrógeno y el fósforo. En síntesis, cuando el fósforo se hace menos limitante se presentó una mayor tasa de crecimiento poblacional. Sin embargo, el nitrógeno es también esencial y ambos nutrientes no pueden ser analizados independientemente. Por lo

¹ Profesor Departamento de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Grupo de Investigación en Gestión y Modelación Ambiental (GAIA), Universidad de Antioquia, Apartado 1226, telefax: 210 65 64. Oficina: Sede de Investigaciones Universitarias (SIU) Calle 62 N° 52-29 (Torre 2, laboratorio 230). Medellín, Colombia. Correo: naguirre@jaibana.udea.edu.co

^{1,2} Profesor Departamento de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Grupo de Investigación en Gestión y Modelación Ambiental (GAIA), Universidad de Antioquia, Apartado 1226, telefax: 210 65 64. Oficina: Sede de Investigaciones Universitarias (SIU) Calle 62 N° 52-29 (Torre 2, laboratorio 230). Medellín, Colombia. Correo: japalaci@jaibana.udea.edu.co

^{1,3 y 1,4} Grupo de Investigación en Gestión y Modelación Ambiental (GAIA), Universidad de Antioquia, Apartado 1226, telefax: 210 65 64. Sede de Investigaciones Universitarias (SIU) Calle 62 N° 52-29 (Torre 2, laboratorio 230). Medellín, Colombia. correos: isabelco79@gmail.com, esheat@jaibana.udea.edu.co

tanto, el aumento o la disminución de las concentraciones de estos nutrientes en los ambientes acuáticos deben ser estudiados conjuntamente a través de sus relaciones estequiométricas.

Palabras clave

Densidad algal, nitrógeno, fósforo, estimulación algal.

ASSAYS OF ALGAL BIO-STIMULATION WITH DIFFERENT NITROGEN-PHOSPHORUS RELATIONS UNDER LABORATORY CONDITIONS

Abstract

The main objective of this work was to evaluate the growth of algal population *Chlorella vulgaris* in different concentrations from nitrogen and phosphorus, through tests of algal stimulation in an environmental camera. The answer variables were algal density and turbidity, evaluated by count in a camera of Neubauer and with a photometric method (# 077, using NOVA 60 equipment). For the algal stimulation tests, methods suggested by APHA, AWWA (1995) with different phosphorus and nitrogen concentrations were used. In general we concluded that the algal stimulation of the population growth of *C. vulgaris* depends on the stoichiometric relation between nitrogen and phosphorus. In synthesis when phosphorus becomes a less limit, a greater rate of population growth, appears; nevertheless nitrogen is also essential and both nutrients cannot be analyzed independently. Therefore increase or lessening of concentrations of these nutrients in aquatic ecosystems should be jointly studied through a stoichiometric relationship.

Key Words

Density algal, growth, nitrogen, phosphorus, algal stimulation.

INTRODUCCIÓN

A partir de la carga de nutrientes en el agua, se han propuesto modelos empíricos y de simulación para el estudio de la eutroficación (UNESCO, 1992). Los trabajos realizados por Vollenweider (1968, en CEPIS 1990), EEPMP (1983, 1989 a y b) y Wetzel y Linkens (1991) se orientaron hacia la modelación del proceso de enriquecimiento del agua como un instrumento para establecer correctivos o medidas de control de problemas relacionados con el crecimiento masivo de algas.

La absorción de nutrientes inorgánicos, especialmente a partir de las formas del nitrógeno y el fósforo, es crítica para el crecimiento y reproducción de algas acuáticas. La producción de algas en el medio de cultivo así como en el medio natural es frecuentemente limitada por uno de estos dos elementos (Boyle, 1984).

El papel del nitrógeno y el fósforo como elementos limitantes del crecimiento de la biomasa vegetal constituye un elemento esencial en el conocimiento de la ecofisiología de los organismos autótrofos y su relación con los biotopos terrestres (Liebig, 1840), y en los últimos años en los ecosistemas acuáticos.

Si un nutriente es limitante para niveles máximos de biomasa de algas, al suministrarlo al cultivo se provocará un aumento de la biomasa proporcional a la cantidad de nutrientes añadidos (UNESCO, 1992). Este exceso de nutrientes puede producir un rápido crecimiento y multiplicación de las algas en el agua. De no existir una restricción a este proceso, se produce un cambio en las poblaciones blooms algales y dominancia de algunas poblaciones, con el consiguiente aumento de materia orgánica; esta condición incide sobre el deterioro de la calidad del agua. Por lo tanto, los ensayos algales son muy útiles en la determinación de la disponibilidad biológica de nitrógeno y fósforo.

Los ensayos de inhibición con algas limnéticas están incluidos en los ensayos ecotoxicológicos recomendados por la Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo (OECD). También son legalmente requeridos en la Comunidad Económica Europea (CEE) para los nuevos químicos que se produzcan en cantidades superiores a 100 toneladas por año.

Los resultados de las pruebas de laboratorio con algas pueden servir como base para definir estrategias de manejo ambiental o también para detectar cambios en la calidad de los efluentes e identificar eventos de toxicidad por encima de los límites permitidos. En Colombia el empleo de algas en ensayos de crecimiento es incipiente y, por lo tanto, es necesaria la estandarización del procedimiento del bioensayo utilizando *Chlorella vulgaris* como organismo prueba (Correa *et al.*, 2003).

Actualmente, existen dos formas generales de interpretar los procesos relacionados con el enriquecimiento de nutrientes en los ecosistemas acuáticos. Una corriente sostiene que la relación nitrógeno-fósforo es determinante en el comportamiento de la biomasa, la composición y la estructura del plancton en el agua (Bulgakov y Levich, 1999; Smith y Bennet, 1999). La otra escuela sostiene que no existe una relación de causalidad entre la concentración de nutrientes nitrógeno-fósforo y la biomasa, composición y la estructura del plancton (Reynolds, 1999). Con el objeto de establecer el resultado de la relación nitrógeno-fósforo sobre la producción de la biomasa de la Chlorophyceae *Chlorella vulgaris*, esta investigación plantó la siguiente pregunta: ¿Cuál es el efecto de pruebas de bioestimulación, utilizando diferentes proporciones de nitrógeno-fósforo sobre una población de *Chlorella Vulgaris*? De esta manera el estudio pretende evaluar el efecto de la relación entre los nutrientes biodisponibles (nitrógeno y fósforo) y el crecimiento poblacional de *Chlorella vulgaris* en condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especie de prueba. Según Wu *et al.* (2000), las especies de *Chlorella* son algas unicelulares muy simples, fáciles de cultivar y ampliamente usadas en estudios ecofisiológicos.

Además de su facilidad de cultivo en el laboratorio, uno de los aspectos más importantes para la realización de ensayos de bioestimulación con *C. vulgaris* es su sensibilidad a los cambios ambientales.

Obtención de la población de *Chlorella vulgaris*. La cepa de *C. vulgaris* se obtuvo de una charca cerca del río Porce. El aislamiento previo de esta cepa se ejecutó por medio de recambios periódicos del cultivo hasta obtener una población aisla-

da. Esta fase inicial se llevó a cabo en una cámara ambiental donde se dispusieron recipientes de ensayo, controlando la temperatura, el fotoperíodo y la intensidad lumínica. Para este asilamiento se utilizaron 249 ml de la solución estándar del medio de cultivo recomendado por el “estándar métodos” (APHA, AWWA, 1995) y 1 ml del inóculo de algas.

Preparación de las soluciones estándar de macronutrientes y micronutrientes

Las soluciones tanto de macronutrientes como de micronutrientes fueron preparadas según el Estándar Métodos (1995), teniendo como fuentes de nutrientes el Nitrato de Sodio (NaNO_3) y Fosfato Acido de Potasio (K_2HPO_4), las proporciones de estos nutrientes pueden ser observadas en la tabla 1.

Tabla 1. Composición y fracciones bajo las cuales se prepara el medio Estándar Métodos.

	COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
MACRONUTRIENTES	NaNO_3	25.5 mg/L
	NaHCO_3	15 mg/L
	K_2HPO_4	1.04 mg/L
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	14.7 mg/L
	MgCl_2	5.70 mg/L
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	4.41 mg/L
MICRONUTRIENTES	H_3BO_3	186 ug/L
	MnCl_2	264 ug/L
	ZnCl_2	3.27 ug/L
	CoCl_2	0.780 ug/L
	CuCl_2	0.009 ug/L
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	7.26 ug/L
	FeCl_3	96 ug/L
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	300 ug/L

Preparación del medio de cultivo y sus diferentes concentraciones.

Las soluciones necesarias para el montaje del medio de cultivo fueron preparadas en el laboratorio de análisis instrumental del Centro de

Investigaciones Ambientales y de Ingeniería de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia. Las diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo definidas para la realización de los ensayos se referencian en la tabla 2.

Tabla 2. Diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo evaluadas con respecto al control.

Nitrógeno	NaNO ₃ []	N []	Porcentaje con respecto al control	Relación N:P (con respecto al Fósforo)*
C1	2,55 mg/l	0,42 mg/l	10% del control	2,33 : 1
C2	12,75 mg/l	2,10 mg/l	50% del control	11,67: 1
Control	25,50 mg/l	4,20 mg/l	-	23,33 : 1
C3	51,00 mg/l	8,40 mg/l	200% del control	46,67 : 1
Fósforo	K ₂ HPO ₄ []	P []	Porcentaje con respecto al control	Relación N:P (con respecto al Fósforo)
C1	0,11 mg/l	0,02 mg/l	10% del control	233,33 : 1
C2	0,52 mg/l	0,09 mg/l	50% del control	47,67 : 1
Control	1,04 mg/l	0,18 mg/l	-	23,33 : 1
C3	2,08 mg/l	0,36 mg/l	200% del control	11,67 : 1

* La relación se expresa haciendo a la concentración de Fósforo 1 para ambos nutrientes, por lo cual la relación es con respecto al fósforo para los dos casos.

Como se mencionó, el medio de cultivo propuesto por el estándar métodos se tomó como la concentración control; este medio fue analizado por Correa *et al.*, (2003), donde se evaluaron a su vez dos medios de cultivo, el CHU (1942) (Schwörbel, 1994) y el propuesto por el estándar métodos, de lo cual se concluyó que este último era el óptimo para el crecimiento de *C. vulgaris*.

Procedimiento de siembra. Una vez obtenido el inóculo puro se cultivó el alga en recipientes esterilizados en autoclave. Se sembró un inóculo de *C. vulgaris* en el medio de cultivo dentro de la cámara ambiental durante 5 días, tiempo en el cual se garantizó la fase exponencial de la población y, por lo tanto, el 90 % de las células son viables (Correa *et al.*, 2003). Para sembrar el inóculo se emplearon 249 ml de agua destilada, 0,133 ml de micronutrientes, 0,266 ml de macronutrientes (nitrógeno y fósforo) y 1ml del inóculo de *C. vulgaris*.

Adicionalmente, se agregó un mililitro de solución de amoxicilina para controlar la contaminación del cultivo con bacterias y protozoos. La cámara ambiental se mantuvo desinfectada

mediante limpieza profunda con hipoclorito de sodio.

Condiciones ambientales del ensayo. Las condiciones de acondicionamiento del ensayo dentro de la cámara ambiental fueron las siguientes: 23 ± 2 °C de temperatura, luz continua a $2450 \pm 10\%$ Luxes y pH monitoreado diariamente.

Ensayos de bioestimulación. La evaluación de las concentraciones de nitrógeno y fósforo más adecuadas para el óptimo crecimiento de *C. vulgaris* se efectuó a través de un seguimiento de la densidad algal y la turbidez diario durante 10 días, evaluando 3 diferentes concentraciones con respecto al control para cada nutriente (tabla 2).

Se construyeron curvas de crecimiento poblacional para evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo sobre la tasa de crecimiento algal, para ello se acondicionó el cultivo con el fin de que al inicio del experimento el 90% de las algas fueran viables o en fase de reproducción. Dicho acondicionamiento constó de una concentración algal inicial suficiente a (1×10^4 - 1×10^5 células/ml)

y un tiempo 5 días para garantizar la viabilidad del cultivo.

Durante los ensayos definitivos se midieron el pH y la temperatura de diez frascos por día durante diez días, para un total de 107 frascos por cada ensayo incluyendo el día cero.

Densidad algal y turbidez. El conteo de la población algal de *C.vulgaris* se realizó a través de una cámara de Neubauer, en la cual se dispuso por medio de una micropipeta un volumen de 20 μ l de solución. Después del conteo en cinco áreas del campo visual de la cámara en el microscopio se verificó el número de células por mililitro. El anterior procedimiento se realizó en un microscopio invertido Leica DMIN provisto de reglilla ocular. Para obtener la turbidez se empleó un espectrofotómetro Spectro-quant Nova 60 de Merck, el cual registró la medición bajo la unidad de FAU.

Tratamiento de resultados. Se construyeron figuras de la concentración algal y la turbidez en función del tiempo. A cada una de las curvas obteni-

das les fue aplicada la línea de tendencia exponencial, con su respectiva ecuación y valor R^2 , estas variables se transformaron a logaritmo natural y, adicionalmente, se obtuvo una figura del porcentaje de bioestimulación para evaluar los posibles efectos de las diferentes concentraciones de nutrientes sobre la población de *C. vulgaris*.

RESULTADOS

Crecimiento poblacional. Con el fin de apreciar las tasas de crecimiento poblacional de *C. vulgaris* en el medio de cultivo “estándar métodos” se asociaron los valores a la tasa unitaria de reacción k , la cual se halla dentro de la ecuación ($y= m.e^{kx}$) que describía la línea de tendencia exponencial para las variables densidad algal y turbidez con valores 0,2458 y 0,1164, respectivamente. Con respecto a la curva de crecimiento se observó que a lo largo del tiempo, la línea se ajustó a una tendencia (figura 1). Es decir que *C. vulgaris* responde al medio propuesto por el “estándar métodos” de manera óptima y esto fue representado adecuadamente por ambas variables respuesta.

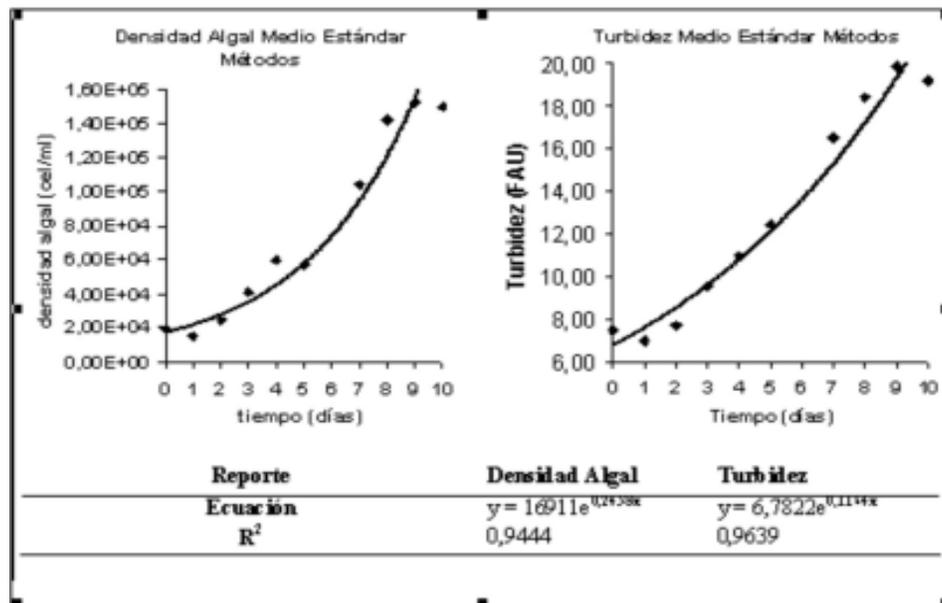


Figura 1. Crecimiento poblacional de *Chlorella vulgaris*, en el medio de cultivo Estándar Métodos bajo condiciones de laboratorio.

Variables control. De acuerdo con los resultados relacionados con las variables control (pH y temperatura) se observó un satisfactorio cumplimiento de la estabilidad de estas variables en el tiempo, evidencia de ello fue la obtención de

bajos valores de la desviación estándar, siendo los mayores 0,4 para el pH y 0,7 para la temperatura (Tabla 3). Por consiguiente, los ensayos fueron ejecutados bajo condiciones controladas de laboratorio.

Tabla 3. Valores máximos, mínimos, media y desviación estándar del pH (unidades pH) y la temperatura (°C) en el ensayo para cada concentración de nitrógeno y fósforo evaluadas.

Variable/Estadígrafo		[] Ensayos nitrógeno				[] Ensayos fósforo			
		C ₁	C ₂	C ₀	C ₃	C ₁	C ₂	C ₀	C ₃
pH	Máx.	7,35	8,25	7,81	7,43	7,14	7,40	7,81	7,61
	Mín.	7,12	7,34	7,11	6,44	6,75	7,22	7,11	7,35
	Media	7,25	7,82	7,34	7,16	6,89	7,29	7,34	7,47
	Des. Est	0,08	0,33	0,23	0,40	0,13	0,07	0,23	0,08
Temperatura	Máx.	24,00	22,94	23,02	23,70	23,86	23,80	23,02	24,00
	Mín.	22,00	22,00	22,60	23,00	23,56	21,40	22,60	21,50
	Media	22,33	22,72	22,90	23,21	23,73	22,74	22,90	22,86
	Des. Est	0,71	0,29	0,16	0,23	0,09	0,68	0,16	0,69

Ensayos de bioestimulación. La densidad algal inicial estuvo dentro del rango 1×10^4 - 1×10^5 células/ml, lo que permite concluir de manera confiable que los resultados del ensayo son comparables con estudios de la misma naturaleza que sean recomendados por el CETESB.

Con respecto a las variables respuesta, densidad algal y turbidez, se puede afirmar que su comportamiento en el tiempo fue similar, por lo tanto la turbidez es una variable efectiva en la medición de este tipo de pruebas (figura 2). Resultados similares se han encontrado en ensayos de toxicidad (Correa et al., 2003).

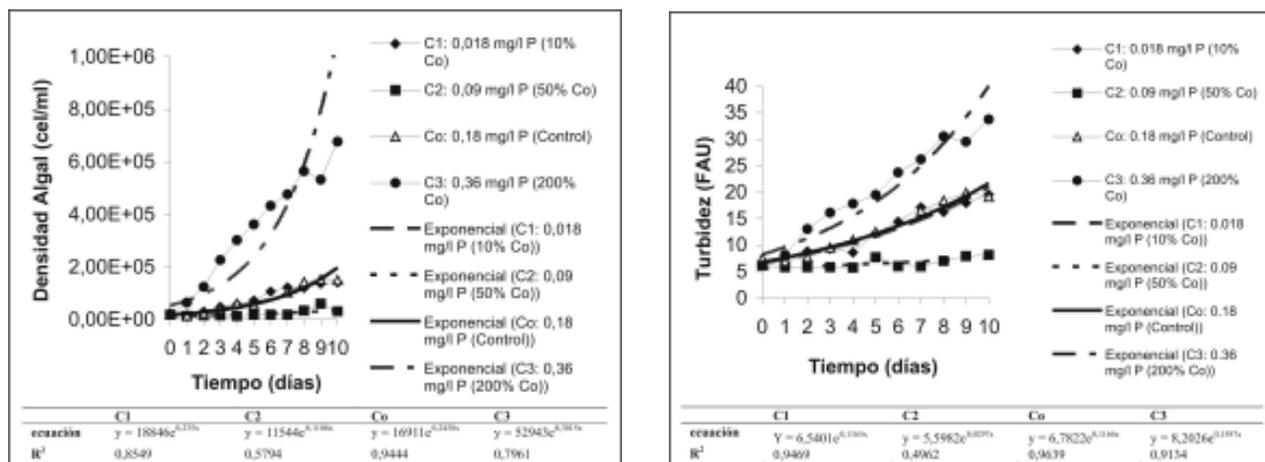


Figura 2. Variación con líneas de tendencia exponencial de la densidad algal y la turbidez en el tiempo para cada una de las concentraciones de fósforo evaluadas.

En cuanto a la variación en las concentraciones de nitrógeno se encontró su incidencia sobre el crecimiento poblacional de *Chlorella vulgaris*, mostrando que a mayor concentración de nitrógeno existió una menor tasa de crecimiento poblacional. Lo anterior se sustentó en el ensayo correspondiente a la concentración de 8,4 mg/l N (200% del control), el cual presentó un crecimiento menor con respecto al control, de 4,2 mg/l N (figura 3A). Fue así como las concentraciones bajas frente al control tuvieron un crecimiento poblacional mayor, por lo cual se podría deducir que existe una limitación en el crecimiento poblacional de *C. vulgaris* al aumentar la proporción del nitrógeno con respecto al fósforo.

Los mayores valores para los coeficientes de determinación del nitrógeno correspondieron al control y los menores a la concentración 8,4mg/l N.

Lo anterior significa que la concentración control se ajustó mejor a un comportamiento exponencial, mientras que la concentración más alta es la que menos se aproxima a esta tendencia (figura 3A). Esto corrobora que la relación entre la tasa de crecimiento poblacional de *C. Vulgaris* y la concentración de nitrógeno fue inversa.

Por otro lado, se encontró que a diferencia del nitrógeno las variaciones en las concentraciones de fósforo afectan el crecimiento de *C. Vulgaris* en forma directa, lo cual demuestra que a mayor concentración de fósforo se presentó una mayor tasa de crecimiento poblacional, (figura 3B). En contraste, las concentraciones menores que el control presentaron crecimientos bajos. Estos resultados demuestran que el fósforo limita el crecimiento poblacional del alga al disminuir su proporción con respecto al nitrógeno.

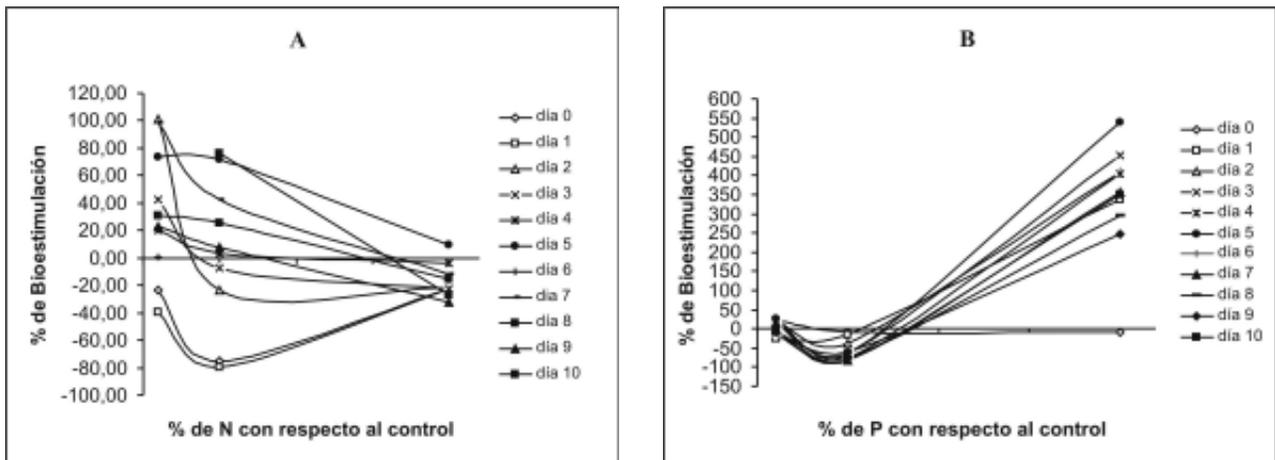


Figura 3. A. Porcentaje % de bioestimulación para las diferentes concentraciones de nitrógeno; el eje x corresponde al porcentaje del nutriente en las siguientes concentraciones C1: 10% (0.42 mg/l N); C2: 50% (2.1 mg/l N); y C3: 200% (8.4mg/l N). B. Porcentaje de bioestimulación para las diferentes concentraciones de fósforo; el eje x corresponde al porcentaje del nutriente en las siguientes concentraciones C1: 10% (0.018 mg/l P); C2: 50% (0.09 mg/l P); y C3: 200% (0.36 mg/l P).

Al igual que para el nitrógeno, los mayores coeficientes de determinación del fósforo correspondieron al control y, por su parte, los menores a la concentración 200% del Control. Para ambos nutrientes la concentración control se ajustó mejor a un comportamiento exponencial de acuerdo

con sus coeficientes de determinación, mientras que las concentraciones más altas son las que menos se aproximaron a esta tendencia. Así mismo, esto demuestra que a mayor cantidad tanto de nitrógeno como de fósforo las respuestas algales expresadas por las curvas exponenciales de densi-

dad y turbidez se encuentran más alejadas del comportamiento del control.

El término bioestimulación se refiere al grado en el cual se presenta un crecimiento de las poblaciones expuestas a cada concentración del nutriente con respecto al control. Esto se demuestra en las figuras *Porcentaje % de bioestimulación* (figura 3), las cuales representan el punto fundamental de discusión y análisis de los resultados obtenidos, en estos esquemas se puede apreciar que los porcentajes de carácter positivo representan estimulación, mientras los negativos inhibición.

En la figura 3A se puede observar que la concentración más alta correspondiente al 200% del control (8,4 mg/l N) presentó una inhibición de hasta un 40%, mientras las demás concentraciones presentaron estimulación. Sin embargo, en el 10% del control la estimulación fue mayor. También se puede apreciar cómo las curvas confluyen hacia un mismo punto por debajo del eje X, correspondiente al 200% del control, describiendo una pendiente negativa. Lo anterior permite confirmar lo planteado en el análisis de resultados con respecto a la densidad algal y la turbidez para los ensayos de nitrógeno, lo cual plantea que menores concentraciones de nitrógeno menores con respecto al control presentan estimulación y, a su vez, concentraciones mayores presentan inhibición. Este comportamiento se aprecia gráficamente para la mayoría de los días considerados en el ensayo, exceptuando los primeros, los cuales presentan un comportamiento atípico, probablemente atribuido a la etapa de aclimatación al medio.

Es importante resaltar el comportamiento del quinto día, el cual presenta en términos generales para el nitrógeno una mayor estimulación; esto significa que cerca del quinto día *C. vulgaris* presenta una mayor tasa de crecimiento y que probablemente después de ese momento la población se renueva. Lo anterior sustenta los ensayos de Correa *et al.* (2003), en los cuales se evaluaron los

medios de cultivo CHU (1942) y Estándar Métodos para *Chlorella vulgaris*, dando como resultado que aproximadamente entre el cuarto y quinto día la población alcanzó las mayores tasas de crecimiento para ambos medios.

En la figura 3B se puede apreciar que las curvas correspondientes al ensayo de fósforo presentaron un patrón semejante para cada concentración con respecto al control, destacándose el hecho de que la concentración más alta (0,36 mg/l: 200% del control) exhibe una importante estimulación. Adicionalmente, las demás concentraciones menores con respecto al control presentaron un estancamiento en el crecimiento. Cabe resaltar que la concentración del 50% del control no fue tomada en cuenta en el análisis de estos ensayos, pues como ya se había mencionado anteriormente su comportamiento fue atípico. Por lo tanto, la figura demuestra que una concentración por debajo del control (10% del control) presenta inhibición y que una concentración mayor (200% del control), presenta sobreestimulación. Es de notar que la concentración de 0,36 mg/l de fósforo (200% del control) registra diferentes valores de % de estimulación dependiendo del día evaluado; es así como las mayores estimulaciones fueron exhibidas durante el tercer, cuarto y quinto día, siendo este último el mayor, tendencia similar a la del nitrógeno, lo que igualmente demuestra que la población de *C. vulgaris* presenta las tasas más altas de crecimiento poblacional, aproximadamente entre el cuarto y quinto día, cuando se renueva la población y se puede garantizar que aproximadamente el 90% de células son viables (Correa *et al.*, 2003).

DISCUSIÓN

Para una proporción de N:P de 46,67:1, correspondiente al 200% del control de nitrógeno (8,4 mg/l N) se presentó inhibición, mientras para una proporción de N:P de 11,67:1, correspondiente al 200% del control de fósforo (0,36 mg/l P) se pre-

sentó estimulación. Este contraste implica que el fósforo es el nutriente limitante, sin embargo, el fósforo no debe ser analizado independientemente; su estudio debe ser realizado en términos de la relación estequiométrica con respecto a la concentración del nitrógeno; por lo tanto, al aumentar estequiométricamente el nitrógeno la concentración el fósforo se hace limitante; es por ello que existe una inhibición en el crecimiento de la población cuando la relación N:P estequiométricamente favorece al nitrógeno; a su vez, cuando la cantidad de fósforo es mayor su condición no es limitante puesto que proporcionalmente la relación N:P favorece en este caso a dicho nutriente y en consecuencia la tasa de crecimiento poblacional aumenta.

El hecho de que se haya presentado sobreestimulación en el ensayo de fósforo mientras que la inhi-

bición para el ensayo de nitrógeno no haya sido tan alta, demuestra que en el caso de los ensayos de laboratorio realizados en este estudio, el fósforo es el nutriente limitante para *C. vulgaris* bajo las condiciones ambientales contempladas, por lo tanto, el crecimiento de esta especie algal depende estrechamente de la disponibilidad de este nutriente en el sistema y dicha disponibilidad está dada por la relación con el nitrógeno (proporción N:P). Sin embargo, cuando la proporción N:P está teóricamente de forma excesiva a favor del fósforo, tal como fue el caso de la relación 2,33:1 evaluada como el 10% del control para el ensayo de nitrógeno, éste se convierte en el nutriente limitante, lo que demuestra que a pesar de que en la naturaleza el fósforo es considerado el nutriente más limitante, las concentraciones de nitrógeno deben conservar una proporción mayor en relación al fósforo.

BIBLIOGRAFÍA

- APHA, AWWA. 1995. Standard methods for examination of water and wastes water. WPCF. 19th edition.
- BOYLE. 1984. The effect of environmental contaminants on aquatic algae. En: Shubert (ed). Algae as ecological indicators. Edition Academic Press, Inc. Londres.
- BULGAKOV, N. G., LEVICH, A. P. 1999. Forum: The nitrogen: phosphorus ratio as a factor regulating phytoplankton community structure. Arch. Hydrobiol, 146-1:august.
- CEPIS. 1990. Proyecto de eutroficación en lagos cálidos tropicales - modelo de predicción de la eutroficación. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria. Lima.
- CORREA, I. C., AGUIRRE, N.J. ., PALACIO, J. A., ARROYAVE, M. P. 2003. Efecto del cromo, mercurio y cadmio sobre el crecimiento poblacional de *Chlorella vulgaris*. Trabajo de grado. Ingeniería Ambiental, Escuela de Ingeniería de Antioquia-Universidad de Antioquia. Medellín.
- EEPPM. 1983. Embalse del Río Grande. Estudio de calidad del agua. Civil, hidráulica y sanitaria, Camp, Dresser & Mckee. Medellín.
- EEPPM. 1989a. Efectos del hierro en el sistema de refrigeración de la central Guatapé. Unidad de Planeación Saneamiento Hídrico. Medellín.
- EEPPM. 1989b. Resultados fisicoquímicos del embalse y sistema de refrigeración de la central Guatapé. Departamento Control de Calidad de Materiales. Medellín.

- LIEBIG, J. 1840. Die organische chemie in ihrer anwendung auf agrikultur und physiologie. Justus Liebig Universität. Giessen.
- REYNOLDS, C. S. 1999. Forum: Non-determinism to probability, or N:P in the community ecology of phytoplankton. Arch. Hydrobio, 146-1, august.
- SCHWOERBEL, J. 1994. Methoden der suesswasser hidrobiologie. UTW. Verlag Seutschland. P. 316-317. 1994.
- SMITH, V. H., BENNETT, S. J. 1999. Forum: Nitrogen-phosphorus supply ratios and phytoplankton community structure in lakes. Arch. Hydrobiol, 146-1, august.
- UNESCO. 1992. El control de la eutroficación de lagos y pantanos. Ediciones Pirámide, S. A. Madrid.
- VOLLENWEIDER, R. A. 1968. Scientific fundamentals of the eutrophication of lakes and flowing waters, with particular reference to nitrogen and phosphorus as factor in eutrophication. Organization for Economic Cooperation and development. Paris.
- WETZEL, R., LIKENS, G. 1991. Limnological analysis. W.B. Saunders Company. Philadelphia.
- WU, H. L., HSEU, R.S., LIN, L. P. 2000. Identification of Chlorella spp. isolates using ribosomal DNA sequences. Institute of Agricultural Chemistry, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, Republic of China. <<http://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/2001/2/bot422-05.html>>.