



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
I Z T A C A L A

EVALUACION EXPERIMENTAL DE LAS CONSTANTES CINETICAS
DE LA RELACION NUTRIMENTOS-CRECIMIENTO FITOPLANCTONICO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
SUSANA RUIZ CASTILLO

VER DECLAR

BO 981/94

331 981/22



MEXICO, D.F. 1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue desarrollado en el Area de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del M. en I. Jorge L. de Victorica Almeida.

ASUMO PUES LA RESPONSABILIDAD DE LO ESCRITO
Y DISFRUTO EL PLACER DE VERLO LANZADO A LA
VIDA PUBLICA CON TODAS SUS CONSECUENCIAS.

DEDICATORIAS

A mis Padres:

Evangelina y David, quienes han templado mi corazón con amor, fuerza, valentía, dedicación y trabajo; para ellos todo mi amor y admiración.

A mis Hermanos:

Bertha y David, por su apoyo y comprensión y para que sigamos trabajando en la realización plena de nuestras vidas.

A mis Sobrinos:

Bertha, David, Angela, Roberto y Tabatha, con quienes comparto este logro, esperando compartir los suyos.

A mis Cuñados:

Guadalupe y Luis Gabriel, por ser parte importante de mi familia.

A mi Amigo:

Francisco, por ser mi compañero en esta aventura y por enseñarme a sonreír en los momentos más difíciles de la misma.

Al M. en C.:

Juan Carlos Olvera SanMiguel, por tener la gracia Divina de saber escuchar.

AGRADECIMIENTOS

A la Biol. Ma. Guadalupe Oliva M., a la Biol. Gloria Garduño S., al M. en C. Javier Alcocer D., al M. en I. Jorge Luis de Victorica A. y al Biol. Roberto Moreno C., por la revisión de este trabajo.

A todas y cada una de las personas que de alguna manera obstaculizaron este trabajo, ya que me impulsaron a crecer aún más como persona y profesionista para así poder vencer dichos obstáculos.

INDICE

LISTA DE TABLAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
RESUMEN	III
1. INTRODUCCION	1
1.1 <i>Generalidades</i>	1
1.2 <i>Nutrimientos</i>	3
1.3 <i>Descripción de los modelos matemáticos</i>	4
1.3.1 <i>Crecimiento Exponencial y Logístico</i>	4
1.3.2 <i>Efecto de la concentración de un nutriente sobre la tasa de crecimiento específica</i>	5
2. ANTECEDENTES	7
2.1 <i>Nitrógeno</i>	8
2.2 <i>Fósforo</i>	10
2.3 <i>Modelos cinéticos combinados</i>	13
3. OBJETIVOS	16
3.1 <i>Objetivo General</i>	16
3.2 <i>Objetivos Particulares</i>	16
4. METODOLOGIA	17
4.1 <i>Procedencia de la comunidad fitoplanctónica</i>	17
4.1.1 <i>Reconocimiento del Fitoplancton</i>	17
4.1.2 <i>Pretratamiento y Conservación del Cultivo Patrón</i>	18
4.2 <i>Diseño del Sistema de Incubación</i>	18
4.3 <i>Concentraciones nutricionales del medio de cultivo y selección de las variables de respuesta</i>	19
4.4 <i>Bioensayos</i>	21
4.5 <i>Evaluación Experimental</i>	22
5. RESULTADOS Y DISCUSION	25
5.1 <i>Influencia de la relación N:P sobre el crecimiento fitoplanctónico</i>	25

5.2	<i>Relación entre la tasa de crecimiento y el tiempo de duplicación</i>	26
5.3	<i>Constantes de saturación media</i>	26
5.4	<i>Efecto de la relación N:P sobre la tasa de crecimiento específica</i>	28
5.5	<i>Influencia de la relación N:P sobre la capacidad fotosintética</i>	29
5.6	<i>Efecto de la relación N:P sobre la fijación de carbono orgánico</i>	30
5.7	<i>Influencia de los nutrimentos sobre la producción de oxígeno</i>	31
5.8	<i>Fijación de Nitrógeno y Fósforo</i>	33
5.9	<i>Relación clorofila "a":Carbono orgánico</i>	34
6.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	36
6.1	<i>Conclusiones</i>	36
6.2	<i>Recomendaciones</i>	37
7.	BIBLIOGRAFIA	47

LISTA DE TABLAS

Tabla No.

1	Medio de cultivo para algas de agua dulce	20
2	Concentraciones utilizadas en la experimentación	21
3	Periodicidad y condiciones de muestreo durante los bioensayos algales	23
4	Métodos analíticos empleados en la evaluación de las variables de respuesta	24
5	Constantes de saturación media del N y del P obtenidas por el gráfico de Lineweaver-Burk de los datos experimentales	26
6	Influencia de la concentración externa de nitrógeno (NO_3^-) y fósforo (PO_4^{3-}) sobre la fijación de carbono orgánico (C.O.), en una población mixta natural	31
7	Relación entre la μ_e (d^{-1}) y la tasa de asimilación de N y P (mg/l), en un cultivo mixto influenciado por la proporción N:P	34
8	Respuesta de la comunidad fitoplanctónica, a diferentes proporciones de N:P sobre las relaciones clorofila "a":C.O. y C.O.:clorofila "a".	35

LISTA DE FIGURAS

Figura No.

1	Esquema del sistema de incubación	38
2	Incremento de la densidad celular como respuesta a una proporción diferencial de N:P	39
3	Relación entre la tasa de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (t_d).	40
4	Tasas de crecimiento máximas específicas de un cultivo mixto por influencia de la relación N:P	41
5	Comportamiento característico de la relación cinética propuesta por Michaelis-Monod; en la que se observa una región de máxima respuesta alcanzada en un ámbito de 0.001-0.1 mg/l de PO_4^{3-} y una zona de mínima respuesta a partir de 0.1 mg/l de PO_4^{3-}	42
6	Comportamiento característico de la relación cinética propuesta por Michaelis-Monod; en la que se observa una región de máxima respuesta alcanzada en un ámbito de 0.041-2.4 mg/l de NO_4^{3-} y una zona de mínima respuesta a partir de 2.4 mg/l de NO_4^{3-}	43
7	Respuesta fotosintética de la población mixta natural, resultado de las diferentes relaciones N:P en el tiempo	44
8	Producción de oxígeno disuelto con respecto del tiempo, por la influencia de las diferentes proporciones de N:P	45
9	Comportamiento de la tasa de asimilación del N y P como una función del estado nutricional en un cultivo mixto	46

RESUMEN

Dentro de los principales parámetros que definen la magnitud de la productividad primaria, están las constantes de saturación (K_s), definidas como aquellas concentraciones de los nutrimentos externos en las que la magnitud de la tasa de crecimiento celular es la mitad de su valor máximo.

La importancia de lo anterior, ha inducido a diversos investigadores a determinar la magnitud de tales constantes de saturación; sin embargo, aunque la literatura cita un gran número de valores para estas constantes, su aplicación no puede ser de carácter general, dado que han sido obtenidos trabajando con cultivos puros y en condiciones ambientales diferentes a las que prevalecen en nuestro país.

Esta situación indujo a realizar el presente estudio con el fin de determinar las constantes de saturación del nitrógeno (N) y del fósforo (P) para una población fitoplanctónica mixta, procedente de un cuerpo de agua local, lo que se asemeja más a lo que se presenta en la naturaleza.

La experimentación se realizó con un cultivo algal obtenido de un lago eutrofizado, procesado con técnicas convencionales para desarrollar y mantener el cultivo mixto patrón en condiciones controladas de nutrimentos, luz y temperatura. De este cultivo patrón se tomaron las

alícuotas adecuadas que se incubaron a temperatura de 25°C e intensidad luminosa de 6,000 lux, suministrándoles diferentes concentraciones de los nutrimentos N y P, cuyos ámbitos fueron de 0.8 a 4.2 mg/l para el N, y de 0.032 a 0.186 mg/l para el P. Las tasas de crecimiento y constantes de saturación se determinaron mediante el recuento de los organismos y la aplicación del modelo cinético de Michaelis-Monod. También se evaluó la influencia de la variación de las concentraciones de N y P sobre el metabolismo celular, medido en términos de *clorofila "a"*, oxígeno disuelto (OD) y carbón orgánico (CO), utilizando metodologías establecidas y confiables.

Los resultados mostraron que la tasa máxima de crecimiento (μ_{\max}) fue de 1.886 d⁻¹ cuando las concentraciones de N y P fueron, respectivamente, de 4.2 mg/l y 0.186 mg/l; la constante de saturación de N (K_N) fue de 0.188 y la del P (K_P) de 0.0094. En cuanto a los parámetros *clorofila "a"*, OD, CO, las respuestas obtenidas fueron de diversa índole y magnitud, lo que indica la necesidad de evaluar más de un parámetro para caracterizar a una comunidad en función de la concentración de nutrimentos en el medio.

Finalmente, cabe señalar que los resultados obtenidos de este trabajo son de utilidad práctica en la formulación de modelos matemáticos para simular, de manera más real, la evolución de un ecosistema acuático en respuesta a cambios en los factores abióticos.

1. INTRODUCCION

1.1 Generalidades

La importancia del agua en la economía humana no cesa de crecer y el abastecimiento de agua dulce se hace así cada vez más difícil, tanto en razón al crecimiento de la población y de su nivel de vida como del desarrollo acelerado de las técnicas industriales modernas. Bajo la presión de las considerables necesidades de la civilización moderna, se está pasando del empleo de las aguas de manantiales y acuíferos, a una utilización más intensa de las aguas superficiales.

Paralelamente se desarrollan investigaciones sobre las aguas superficiales y los métodos de recuperación. Simultáneamente las causas de la contaminación son muy extensas; ésta se hace más masiva, más variada, más perjudicial, por lo que se ha escrito que << el tiempo de los ríos ha acabado, el de las alcantarillas comienza >> (Rodier, 1990).

La contaminación permanente está ligada a los desechos industriales, a las aguas residuales de origen urbano, al empleo en la agricultura de plaguicidas y abonos; se añade además la contaminación ocasional debida a los vertidos intermitentes; todo esto provoca la contaminación de las aguas del país y plantea graves problemas, tanto por la insuficiencia de los recursos acuáticos como por la degradación de las condiciones de

vida de este medio natural fundamental, lo cual se traduce en profundas modificaciones de la flora y fauna acuáticas y en una serie de trastornos de diversa índole.

Uno de los aspectos actuales más frecuentes de la alteración de los lagos es el que se conoce con el nombre de eutrofización, que se define como un proceso evolutivo natural o provocado, por el que un lago experimenta un progresivo aumento de nutrientes (nitratos y fosfatos especialmente), dando lugar por tanto, a un incremento de la cantidad de materia orgánica producida por los organismos autótrofos, lo que la UNESCO (1973) ha definido como "producción primaria", mientras que la cantidad producida por unidad de tiempo (sobre una base de área o volumen) se conoce como "productividad primaria" de acuerdo a Marshall (1987) y Flynn (1988).

Es por lo anterior, la importancia de analizar la productividad primaria de manera general y de los factores que la afectan; por lo tanto en la consideración del desarrollo del fitoplancton en los cuerpos de agua, como en la imitación y análisis de las situaciones naturales por medio de experiencias de laboratorio, los factores más frecuentemente estudiados son la luz, la temperatura y la concentración de nutrientes, ya que estos factores afectan directamente a las algas (Vollenweider, 1974).

La luz es una de las variables reguladoras de la productividad primaria que junto con la temperatura guarda estrecha relación en los sistemas acuáticos y es difícil evaluarla como un factor separado de ella (Margalef, 1983).

Por otra parte, los elementos esenciales para el desarrollo del fitoplancton señalados por Hutchinson (1957) incluyen al carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, potasio, magnesio y calcio. Además de los anteriores las algas requieren otros elementos para crecer y reproducirse; estos elementos se definen como microelementos por la concentración requerida por los organismos, y aunque no se consideran factores limitantes tan importantes como el nitrógeno (N) y el fósforo (P), en ocasiones pueden comportarse como limitantes del crecimiento, ya sea por deficiencia o por excesos que pueden presentarse en niveles tóxicos (Marshall, 1987).

En general, la limitación de la productividad primaria se establece en relación con el nitrógeno y el fósforo.

1.2 Nutrientes

Nitrógeno (N)

El nitrógeno es sumamente importante en la nutrición, debido a que es un elemento necesario para la estructura de proteínas, clorofila, ARN, ADN, varias coenzimas y algunas vitaminas.

Así el N es esencial para funciones tan importantes como la fotosíntesis, respiración, síntesis de proteínas, formación de material genético y crecimiento. El N se encuentra en el medio bajo formas químicas diferentes: NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , N_2 cuya asimilación debe esperarse sea diferencial, en el sentido de que el estado menos oxidado ha de requerir menos energía y, presumiblemente, será el preferido (Lewin, 1967; Margalef, 1983).

Fósforo (P)

El P es uno de los nutrientes más importantes requeridos para un crecimiento adecuado de las algas. Como en todos los organismos vivos, los compuestos que contienen P desempeñan un papel importante necesariamente en todas las fases del metabolismo, particularmente en las reacciones de transformación energética. El P está presente en los sistemas acuáticos en formas que van desde iones de fosfato inorgánico a moléculas orgánicas como los azúcares y ADN. El papel del P en el metabolismo fitoplanctónico ha atraído la atención, ya que este elemento es frecuentemente un factor limitante del crecimiento algal en la naturaleza (Lewin, 1967). El papel ecológico de este elemento ha sido revisado por Hutchinson (1957), Wetzel (1981) y Margalef (1983), entre otros, encontrando que un buen crecimiento ocurre en una solución nutritiva con 0.7-2 ppm de fósforo; las concentraciones menores de 0.05 ppm limitan el crecimiento y se observa un efecto de inhibición cuando el P excede 20 ppm (Lewin, 1967).

1.3 Descripción de los Modelos Matemáticos

1.3.1 Crecimiento Exponencial y Logístico

El propósito del desarrollo de algunas herramientas matemáticas simples pero poderosas es el que se pueden considerar útiles para la resolución de problemas ambientales (Masters, 1991).

En el estudio del crecimiento poblacional existen varias funciones matemáticas; dos de éstas son la exponencial y la logística o sigmoide, cuyas representaciones expresan que la relación de cambio de la densidad poblacional con respecto del tiempo será igual a una tasa de crecimiento específica multiplicada por la densidad poblacional.

Al igual que en la formulación exponencial, existe en la representación logística una fase de crecimiento similar en donde las condiciones para el desarrollo son óptimas, y por consiguiente sobreviene un periodo de crecimiento rápido durante el cual el número de organismos se incrementa exponencialmente con el tiempo, hasta alcanzar un máximo. Sin embargo, en la medida en que la densidad poblacional (N) se incrementa, la tasa de crecimiento baja y eventualmente el crecimiento permanece constante hasta que se estabiliza la población; esta estabilización es referida con un término llamado capacidad de carga, definido como la capacidad del ambiente de soportar una densidad poblacional determinada (Masters, 1991).

Uno de los propósitos de este trabajo es el de determinar el crecimiento máximo para cada condición nutricional establecida sin tomar en consideración la determinación de la capacidad de carga de la comunidad en estudio; de acuerdo a lo anterior ambas representaciones matemáticas son de igual utilidad en el punto en el que el crecimiento se incrementa exponencialmente hasta alcanzar un máximo, determinándose por lo anterior la utilización de la ecuación exponencial (Bailey, 1986).

La ecuación diferencial que representa el crecimiento exponencial es la siguiente: (Bailey, 1986)

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \quad (1)$$

cuya forma integrada es:

$$N = N_0 e^{\mu \cdot t} \quad (2)$$

En las ecuaciones 1 y 2, N es el número de organismos presentes después de que ha transcurrido un tiempo t; N_0 , es el número de organismos iniciales; y μ es la tasa de crecimiento, d^{-1} .

La ecuación que describe la tasa de crecimiento, μ , está definida por (Bailey, 1986):

$$\mu = \frac{\ln (N/N_0)}{t - t_0} \quad (3)$$

Posteriormente, de la ecuación 3 se obtiene el tiempo que debe transcurrir para que una población duplique su número.

$$t_d = \frac{0.693}{\mu} \quad (4)$$

1.3.2 Efecto de la concentración de un nutrimento sobre la tasa de crecimiento específica

La necesidad de contar con datos cuantitativos sobre la variación de la tasa de crecimiento fitoplanctónica por efecto de la concentración nutricional es evidente, si se considera el papel que tiene el estado nutricional en lo referente a la productividad primaria.

Los efectos de las condiciones nutricionales sobre el crecimiento, pueden expresarse cuantitativamente mediante la relación cinética de primer orden desarrollada por Michaelis-Monod (Dugdale, 1968; Eppley, 1969; O'Brien, 1974; Brown, 1978; Dortch, 1991).

$$\mu_e = \mu_m \left[\frac{[S]}{K_s + [S]} \right] \quad (5)$$

donde:

μ_e es la tasa de crecimiento específica

μ_m es la tasa de crecimiento máxima

[S] es la concentración de nutrientes en el medio externo (masa por unidad de volumen)

K_s es la constante de saturación, referida a la concentración del nutriente a la cual la tasa de crecimiento es la mitad de su valor máximo, expresada en masa por unidad de volumen.

La suposición básica que gobierna el uso de este modelo es que la tasa de crecimiento de un alga es dependiente sólo de la concentración de un nutriente limitante particular.

A bajas concentraciones de S, ($K_s \gg S$), el crecimiento del fitoplancton es directamente proporcional a la disponibilidad del nutriente y cuando se tienen altas concentraciones de nutrientes tales que $S \gg K_s$, el crecimiento queda limitado por la capacidad del fitoplancton para utilizarlo y por las condiciones de iluminación y temperatura prevalecientes.

2. ANTECEDENTES

Justus Liebig en 1840 es el primero en formular la idea de que "el crecimiento de una planta depende de la concentración de alimento el cual está presente en una cantidad mínima" (Masters, 1974).

Si se considera una lista de nutrimentos requeridos para el crecimiento algal: carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, calcio, magnesio, potasio, sodio, hierro, manganeso, zinc, cobre, boro y otros, el crecimiento puede estar limitado por los estados "mínimos" de concentraciones de los nutrimentos requeridos por las algas. En una aplicación práctica referente a la productividad primaria este concepto hace alusión a que la tasa de productividad puede estar controlada por la limitación de uno de los nutrimentos requeridos potencialmente asimilable.

La línea de investigación sobre el tema de la productividad primaria ha sido abordada de diversas formas; una de estas es la evaluación del crecimiento fitoplanctónico mediante la cinética de Michaelis-Monod. En esta ecuación los parámetros que determinan el comportamiento celular están dados por las constantes de saturación y el crecimiento específico que reflejan las condiciones nutricionales presentes (Brown, 1978; Caperon, 1972; Droop, 1973; Eppley, 1969; Keller, 1989).

Es por esto que las investigaciones están usualmente dirigidas principalmente a elementos cuantitativamente más importantes como el nitrógeno y el fósforo.

2.1 Nitrógeno

En la investigación realizada por Eppley y Coatsworth en 1968, enfocan su atención a la cinética de los procesos metabólicos de una diatomea marina (*Ditylum brigghellii*) concluyendo que la aparente inhibición "competitiva" de la asimilación del NO_2^- por el NO_3^- en el medio es el resultado de la competición por los sitios activos de la superficie celular o por la competición de los sitios de cofactores o enzimas involucradas en la reducción intracelular. Otro punto referente a su estudio es el hecho de haber comparado las constantes de saturación del NO_2^- y el NO_3^- con otras constantes de algas unicelulares; la comparación mostró que los valores de las constantes de saturación son mayores para las especies de agua dulce que para las oceánicas, apoyándose en la idea de que los valores de K_s para la asimilación de nitrato proporcionan una clave para la comprensión de la sucesión de especies, cuando esto es debido a la declinación de la concentración de nitrato en el mar.

La realización de investigaciones referentes a la concentración de nitrato y amonio en el mar por MacIsaac y Dugdale (1969), muestran que el nitrato y el amonio se comportan de acuerdo a la expresión de Michaelis-Menten; esto es, un comportamiento hiperbólico que describe la relación entre la concentración de nitrato y amonio y la tasa de crecimiento; los valores de las constantes de saturación obtenidas en zonas oligotróficas y eutróficas concluyen que la magnitud de éstas, es mayor en las primeras que en las segundas.

En ese mismo año (1969), Eppley y Thomas elaboran una investigación similar a la planteada por MacIsaac y Dugdale en la que comparan las constantes de saturación de NO_3^- y las tasas de crecimiento para dos especies de diatomeas marinas (*Chaetoceros gracilis* y *Asterionella japonica*) deduciendo que la diferencia en las constantes de saturación es característica para cada especie y que, en lo concerniente a las tasas de crecimiento, ambas se comportaban de manera hiperbólica.

Fitzgerald en 1970 evalúa la disponibilidad de las fuentes de nitrógeno

y fósforo para el alga verde *Selenastrum capricornutum* bajo condiciones de luz-obscuridad y pH en un ámbito de 7-9; concluyendo por sus resultados que el efecto del pH y la obscuridad no afectaba la capacidad de absorción tanto del nitrógeno como del fósforo; por consiguiente los nutrimentos pueden ser absorbidos por las algas en áreas donde existe una baja penetración de luz.

El esfuerzo para predecir el crecimiento fitoplanctónico a partir de factores ambientales, incluyendo la consideración de la concentración de nutrimentos, fue abordado en un trabajo realizado por Caperon y Meyer en 1972, en el que realizan una descripción cuantitativa de la tasa de crecimiento limitada por la fijación de nitrógeno, usando parámetros como lo son el carbono, nitrógeno, *clorofila "a"* y el número celular. Sus resultados sobre el contenido de nitrógeno interno para poblaciones limitadas en nitrógeno muestran sistemáticamente la variación de la tasa de crecimiento, la cual implica una relación hiperbólica entre la tasa de crecimiento y el estado nutricional, además de observarse una relación directa con el contenido de *clorofila "a"* y la concentración de carbono. Concluyen que este tipo de comparaciones de las evaluaciones de carbono, nitrógeno, *clorofila "a"* y el número celular son esenciales en los modelos nutricionales, ya que pueden realizarse predicciones de la cinética nutricional a partir de ellas.

En ese mismo año realizan otra investigación en la que la cinética de asimilación del nitrato y el amonio está descrita por el tipo de hipérbola de Michaelis-Menten, encontrando que existe una variación significativa en los valores obtenidos de las constantes de saturación (K_s) para el nitrato y el amonio, que indica una diferencia del mecanismo de asimilación usado. También concluyen que las especies empleadas (*Monochrysis lutheri*, *Dunaliella tertiolecta*, *Coccochloris stagnina* y *Cyclotella nana*) para las pruebas de asimilación del nitrato presentan una diferencia no significativa entre el promedio de los valores de K_s , lo que sugiere que estas especies, de cuatro órdenes diferentes, presentan un mecanismo similar de asimilación de nitrato.

En 1978 Chapman, en su análisis experimental del efecto de la concentración de nitrato sobre el crecimiento y fisiología de *Laminaria saccharina*, reporta que existe una relación aproximadamente lineal entre el crecimiento y la concentración de nitrato, y que el contenido

de *clorofila "a"* y la capacidad fotosintética se incrementa con un incremento externo de nitratos.

La información sobre el efecto del cambio en la limitación nutricional es escasa, no obstante la importancia en determinar en qué momento uno o varios nutrimentos empiezan a ser limitantes; bajo este tópico Rhee en 1978 realiza una investigación dirigida al efecto de la relación nitrógeno-fósforo sobre el crecimiento algal, utilizando cultivos puros de *Scenedesmus* sp., y se encuentra que el crecimiento es limitado por nitrógeno o fósforo, y no por ambos y que la magnitud de cada limitación será diferente dependiendo del efecto de cada nutrimento sobre la comunidad fitoplanctónica en estudio.

2.2 Fósforo

La cinética de la asimilación del fosfato y el crecimiento en *Scenedesmus* sp. fue estudiada por Rhee en 1973, en cultivos continuos, con particular referencia al cambio de los compuestos celulares del fósforo como una función de la tasa de crecimiento, relacionando la velocidad de asimilación como una función de las concentraciones de sustrato tanto interno como externo, la cual puede ser descrita por la cinética de la inhibición enzimática no competitiva; resultando que el crecimiento está en función de las concentraciones de fósforo celular y polifosfatos mostrando una regulación de la tasa de crecimiento directa o indirectamente.

En ese mismo año Droop aporta con su estudio algunas ideas sobre la limitación de los nutrimentos en las algas, expresando una relación de la tasa de crecimiento específica en un sistema cuyo estado nutricional se ve afectado por más de un nutrimento, propuesta basada en 3 postulados experimentalmente verificables: 1) que la asimilación depende de la concentración de sustrato externo; 2) que el crecimiento depende de la concentración interna del sustrato; y 3) en un sistema de estado estacionario la tasa específica de asimilación (en la ausencia de una excreción significativa) es necesariamente el producto de la tasa de crecimiento específica y la concentración interna de sustrato.

Otras investigaciones han relacionado las concentraciones de fósforo con la producción de *clorofila "a"* en los lagos, como la realizada por

Dillon y Rigler en 1974, en la que muestran datos de *clorofila "a"* y concentraciones de fósforo total de 19 lagos al sur de Ontario y, combinados con datos reportados en la literatura de los lagos del norte de América, realizan una regresión lineal que puede ser usada para predecir el promedio de la concentración de clorofila mediante una medición de la concentración de fósforo.

La ecuación utilizada para tal relación no es significativamente diferente a la forma previamente publicada de la relación fósforo-clorofila derivada de un número de lagos japoneses. La relación entre la clorofila y el fósforo establecida por Sakamoto en 1966 en muchos lagos japoneses, satisface la hipótesis experimental planteada; estableciendo que la determinación de la clorofila es una estimación sencilla y útil del estado del crecimiento fitoplanctónico.

Rhee en 1974 realiza una investigación referente a la asimilación de fósforo en un medio limitante en nitrato y encuentra que, bajo la limitación de nitrógeno, el contenido de fosfatos en *Scenedesmus* sp. muestra una pequeña variación, haciendo caso omiso de la tasa de crecimiento y la relación N:P en el medio. La asimilación del fósforo en limitación de nitrógeno es menor por un factor de alrededor de 8, que la tasa en limitación de fósforo.

Los estudios de la cinética de asimilación también han servido como una base para la separación de nichos, definiéndose como papel, función o sitio de un organismo (Colinvaux, 1986); de esta manera Stross y Pemrick en 1974 realizan un estudio en el que establecen que un análisis cinético de la asimilación de fosfato indica la existencia de 2 velocidades de asimilación por células de *Fragilaria crotonensis* y *Tabellaria fenestrata*, y que las células algales en la estratificación temporal de nutrimentos en el nicho pueden realizar la asimilación por varios mecanismos como la realizada a diferentes horas del día o con velocidades de asimilación variables.

Una comparación del crecimiento exponencial y el estacionario en cultivos con limitación de nutrimentos puede ilustrar la extrema diferencia entre estos dos tipos de poblaciones. Varias de estas diferencias presentan una aplicación potencial como indicadores de la deficiencia de nutrimentos específicos o de la deficiencia de nutrimentos en general; por lo anterior Healey y Hendzel en 1975

estudian el efecto de la deficiencia de nitrógeno en dos algas (*Anabaena variabilis* y *Scenedesmus quadricauda*) relacionando que el grado de deficiencia de nitrógeno sobre varios aspectos de la composición y metabolismo de las 2 algas en estudio, favorece el almacenamiento de carbohidratos y el decremento del contenido de proteínas y *clorofila "a"*; así como también la deficiencia en fósforo presumiblemente afecta la concentración de proteínas y ácidos nucleicos disminuyendo la tasa de crecimiento algal.

Numerosas investigaciones se han realizado bajo la perspectiva de los factores que regulan la producción fitoplanctónica, así que Schindler en 1978 es uno más de los que han estudiado esta relación. El análisis de regresión de los datos globales de la producción fitoplanctónica para especies de agua dulce, la clorofila y varios parámetros nutricionales revelan que una alta proporción de la producción fitoplanctónica anual y la clorofila anual promedio, puede ser explicada por una entrada (carga) de fósforo anual; presentando una buena relación entre la carga de fósforo y la concentración de fósforo total promedio y entre la concentración de fósforo total y la clorofila.

Bajo la misma línea de investigación, Smith en 1982 habla de la dependencia de la biomasa algal en los lagos con respecto de la cantidad de nitrógeno y fósforo; realiza un análisis del crecimiento promedio, la concentración de la clorofila, el fósforo total (PT) y el nitrógeno total (NT) en 228 lagos, confirmando que la producción de la clorofila depende de la concentración de fósforo y de la relación NT/PT.

Las relaciones de las cantidades de fósforo disuelto, la cuota celular del fósforo (contenido de fósforo celular) y la tasa de crecimiento poblacional fueron determinadas en 2 clorofitas (*Chlorella* sp. y *Scenedesmus quadricauda*) por Grover en 1991, bajo diferentes grados de limitación de fósforo; en estas condiciones las ecuaciones aplicadas para la cinética de crecimiento fueron el modelo de Monod describiendo la relación entre la concentración de fósforo disuelto y la tasa de crecimiento poblacional, y el modelo de Droop que describe la relación entre la cuota celular y la tasa de crecimiento poblacional. En conclusión este estudio demuestra que los modelos cinéticos del consumo de nutrientes y el crecimiento poblacional son factibles para

comunidades algales bajo condiciones de estado no estacionario.

2.3 Modelos cinéticos combinados

La necesidad de obtener datos cuantitativos del efecto de la temperatura y la limitación de nutrimentos sobre la tasa de crecimiento algal se ve reflejada en el trabajo realizado por Goldman y Carpenter en 1974, los cuales presentan un modelo matemático simple que incorpora el efecto combinado de ambas variables. La función de la temperatura está descrita por la ecuación de Arrhenius y la relación de nutrimentos mediante el modelo de Monod; la ecuación de Arrhenius se encuentra insertada en el modelo de Monod evaluando así la tasa máxima de crecimiento como un producto de ambas variables en estudio. Este tipo de modelos permite evaluar los coeficientes cinéticos controlados por las interacciones ambientales.

Un estudio similar fue propuesto por Rhee en 1981, considerando el efecto de la temperatura y las interacciones de la temperatura con la limitación de nutrimentos. El estrés combinado de la limitación nutricional y la temperatura subóptima sobre el crecimiento fue estudiado en un cultivo de *Scenedesmus* sp. y *Asterionella formosa*, sugiriendo que el efecto combinado es mucho más drástico que el efecto de uno sólo, ya que la temperatura es uno de los factores más importantes con el que interactúa la limitación de los nutrimentos en la naturaleza, desde la fase de transición de lípidos, la formación de macromoléculas y la cinética de las reacciones fisicoquímicas; establecieron una temperatura de 20° - 25°C para *Scenedesmus* sp. y de 19° - 20°C para *A. formosa* en la que alcanzan su tasa máxima de crecimiento.

Chung-Yuan y Christensen en 1985 unifican una teoría para evaluar el crecimiento bajo la limitación múltiple de nutrimentos, evaluando la división celular de una especie, y encontraron que la dependencia del crecimiento relativo sobre la concentración de un único sustrato puede seguirse por la ecuación de Monod o exponencial (1942).

Los cambios en la tasa de crecimiento son causados por las variaciones en la concentración interna o la cuota celular, establecida mediante el modelo de Droop (1968). Consecuentemente a esto Elrifi y Turpin en 1985 enfocan su trabajo de experimentación a la relación existente

entre la tasa de crecimiento y la cuota celular, y observan una variación en la cuota celular del nitrógeno bajo la limitación de este elemento, y sucediéndose un comportamiento similar con el fósforo, observándose que las bases fisiológicas para la tasa de crecimiento dependen de la relación óptima N:P, esto es, que los requerimientos celulares para el P se incrementan más rápidamente que para el N conforme la tasa de crecimiento se incrementa.

Durante los pasados 35 años se han intensificado las investigaciones bajo la perspectiva de los factores que regulan la productividad primaria cuyos factores potencialmente importantes son la temperatura, la luz y los nutrimentos; bajo este último rubro se cuenta con investigaciones con respecto del nitrógeno y del fósforo, ya que ambos son los nutrimentos más importantes en el contexto del proceso de eutrofización; no obstante, la gran mayoría de la información hace referencia a investigaciones realizadas con monocultivos, bajo diferentes grados nutricionales, obteniendo tasas y factores en condiciones específicas; sin embargo, la existencia en la naturaleza de comunidades fitoplanctónicas, limita la utilización de dichas tasas y constantes que pudieran ser de utilidad en la predicción de la productividad primaria influenciada por los nutrimentos en un sistema acuático natural.

Por lo anterior se refleja la gran necesidad y complejidad que conlleva la realización de investigaciones que representen el comportamiento global de una comunidad, por el hecho de que existen relaciones y procesos que aún se desconocen; de ahí la conveniencia de llevar a cabo investigaciones de laboratorio que permitan la utilización de comunidades fitoplanctónicas, así como también la elaboración de sistemas que regulen algunas de las variables (luz, temperatura) que se encuentren en relación directa con el proceso mismo. De aquí que la determinación de la productividad primaria en laboratorio es de utilidad ya que los datos que se obtienen son empleados para realizar estimaciones mediante la valoración de parámetros específicos como tasas, factores y constantes biológicas, cuyos valores pueden ser utilizados en modelos matemáticos de simulación, los cuales permitan el manejo de manera dinámica; esto es, en espacio y tiempo los factores e interrelaciones involucradas en los procesos físicos, químicos y biológicos que son llevados a cabo, haciendo posible la evaluación de dicho sistema basado en la concentración nutricional; de esta manera

los estudios de la cinética experimental vienen siendo una herramienta de simulación que ayuda no sólo a conocer el comportamiento de un cuerpo de agua, sino a determinar los criterios en el manejo del mismo.

3. OBJETIVOS

3.1 *Objetivo General*

Determinar experimentalmente las constantes de saturación de nitrógeno y fósforo para una comunidad fitoplanctónica, en relación con la concentración nutricional presente en el medio.

3.2 *Objetivos Particulares*

Determinar las concentraciones óptimas de nitrógeno y fósforo para el máximo desarrollo de la comunidad fitoplanctónica en estudio.

Determinar la tasa de crecimiento máxima (μ_m) para cada condición nutricional establecida.

Determinar el efecto de los diferentes niveles nutricionales sobre la comunidad fitoplanctónica, mediante la evaluación de la *clorofila "a"*, oxígeno disuelto, carbono orgánico, nitrógeno total y fósforo total.

4. METODOLOGIA

4.1 *Procedencia de la comunidad fitoplanctónica*

Los microorganismos utilizados para los bioensayos fueron recolectados del lago de Chapultepec de la Ciudad de México; las consideraciones tomadas en cuenta para la selección del sitio de muestreo son que representa un sistema acuático somero con algunas características de hipertrofia (Alcocer *et al.* 1988) como las encontradas en algunos de los cuerpos de agua del país (SARH, 1976), y que son menor diversidad biótica y mayor densidad, así como un alto contenido nutricional; además de por su cercanía con el lugar de estudio donde se realizó la investigación.

4.1.1 Reconocimiento del fitoplancton

De la muestra recolectada se procedió al reconocimiento, hasta el nivel taxonómico máximo posible, de cada una de las especies que se encontraban conformando dicha comunidad; algunos de los autores que se consultaron para tal efecto fueron Gábor Uherkovich (1966), Prescott (1972), Prescott (1973) y Ortega (1984); las algas reconocidas fueron *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus* sp., *Mycrocystis* sp., *Pediastrum* sp. y *Chroococcus* sp.

4.1.2 Pretratamiento y conservación del cultivo patrón

Posterior al reconocimiento del material biológico se procedió a pasar la muestra colectada por una malla de zooplancton con una abertura de poro de 100-120 μm , con la finalidad de reducir al mínimo posible la presencia de zooplancton, además de eliminar la presencia de sólidos suspendidos que pudieran venir en la muestra colectada, y nuevamente se filtró la muestra por una malla de fitoplancton con abertura de poro de 80 μm de diámetro.

Una vez filtrada la muestra se continuó con el lavado del material biológico utilizando un equipo de filtración por vacío; en el embudo se colocó papel Whatman No. 41 para retener al fitoplancton, el cual se lavó con solución de bicarbonato de sodio (0.015 mg/l) APHA *et al.*, (1989), con el objeto de eliminar el contenido nutricional en el que venía suspendido el fitoplancton; y se resuspendió nuevamente en solución de bicarbonato para posteriormente usarse como inóculo.

Se tomaron 4 litros de la resuspensión celular y se transfirieron a un acuario que contenía 20 litros de medio de cultivo, utilizándose la fórmula sugerida por APHA *et al.* (1989), que se muestra en la **Tabla 1**; en lo referente a la intensidad lumínica se aplicaron aproximadamente 4300 lux, intensidad sugerida por APHA *et al.* (1989) para un buen crecimiento fitoplanctónico, además de contar con un ciclo 12:12 h luz-obscuridad y temperatura ambiente; también se utilizó un sistema de burbujeo para mantener en suspensión a toda la comunidad algal.

4.2 Diseño del sistema de incubación

Debido a la necesidad de contar con un sistema capaz de controlar diferentes intensidades lumínicas y temperaturas se planeó y diseñó un sistema de incubación adaptando un refrigerador de 1.55 m de alto por 66 cm de ancho, como se ilustra en la **Fig 1**:

El compartimiento interior se dividió en dos cámaras; en la primera se colocaron 12 focos de 100 W, conectados en paralelo, cuya capacidad de iluminación es de 10,000 lux; mediante un reóstato situado en la parte exterior del aparato se regula la intensidad lumínica.

En este mismo compartimiento se presentan dos aberturas laterales de forma rectangular (31.5 cm x 6.5 cm) cuya finalidad es la de permitir la entrada y salida de aire generado por un ventilador centrífugo de 1/4 H.P., con una capacidad de desplazamiento de aire de 14 m³/seg, permitiendo de esta manera el flujo constante de aire a través de la primera cámara para evitar la acumulación del calor generado por los focos y regular mejor la temperatura e intensidad de luz deseadas.

Las dos cámaras se encuentran divididas por una subcámara, constituida por dos vidrios de 2 mm de espesor cada uno, separados entre sí 2 cm y que funciona como un aislante térmico, para evitar la difusión de calor hacia la parte inferior; en ésta se encuentra una serie de espejos adheridos a las paredes del refrigerador para lograr una iluminación más uniforme.

La cantidad de luz que traspasa esta subcámara se midió con un fotómetro Li-Cor LI-210 SA. Sobre la base del refrigerador se colocó un sistema de agitación que consiste de una plancha con una serie de grapas en las que serán colocadas las botellas para el estudio.

El sistema de regulación de temperatura, al igual que el de la luz, se encuentran colocados por fuera del refrigerador; cabe señalar que el sistema puede manejar ámbitos que van de 5 a 50°C y hasta 10,000 lux.

4.3 Concentraciones nutricionales del medio de cultivo y selección de las variables de respuesta

El papel ecológico que desempeña el nitrógeno y el fósforo, ha sido revisado por numerosos investigadores, entre los que se encuentran Rhee (1978), Kunikane y Kaneko (1984) y Keller (1989), quienes han utilizado ámbitos de concentración diferentes para ambos nutrimentos; por esta razón fue necesario realizar ensayos previos que permitieran decidir aquellas concentraciones que dieran mejores resultados en cuanto a su efecto sobre el crecimiento fitoplanctónico. Además, con el fin de contar con información sobre el metabolismo celular que pudiera verse afectado por la variación de los nutrimentos, se seleccionaron parámetros adicionales como variables de respuesta, que son *clorofila "a"*, producción de oxígeno, carbón orgánico, fósforo total y nitrógeno total.

TABLA 1. MEDIO DE CULTIVO PARA ALGAS DE AGUA DULCE*

Adicionar los macro y micronutrientes en agua desionizada en las concentraciones que se dan en los Cuadros A y B, respectivamente.

Se preparó por separado la solución de cada macronutriente en 1000 veces la concentración final especificada, en agua desionizada. Se combinó los metales traza y EDTA en una única solución patrón en agua desionizada en 1000 veces la concentración final de cada uno.

A. SOLUCION PATRON DE MACRONUTRIMENTOS

Compuesto	Concentración mg/l	Elemento	Concentración resultante mg/l
NaNO ₃	25.5	} N } Na	4.20
			11.0
NaHCO ₃	15.0	C	2.14
K ₂ HPO ₄	1.04	K	0.469
		P	0.186
MgSO ₄ · 7H ₂ O	14.7	} S } Mg	1.91
			2.90
MgCl ₂	5.70		
CaCl ₂ · 2H ₂ O	4.41	Ca	1.20

B. SOLUCION PATRON DE MICRONUTRIMENTOS

Compuesto	Concentración µg/l	Elemento	Concentración resultante µg/l
H ₃ BO ₃	186	B	32.5
MnCl ₂	264	Mn	115
ZnCl ₂	3.27	Zn	1.57
CoCl ₂	0.780	Co	0.354
CuCl ₂	0.009	Cu	0.004
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	7.26	Mo	2.88
FeCl ₃	96.0	Fe	33.0
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	300	--	--

* Tomado de APHA et al., 1989.

Las concentraciones de N y P como NaNO_3 y K_2HPO_4 usadas en el medio de cultivo, se muestran en la Tabla 2; y los demás nutrientes en la Tabla 1, mismas que se consideraron constantes durante el proceso de experimentación.

TABLA 2. CONCENTRACIONES UTILIZADAS EN LA EXPERIMENTACION

N	P	RELACION
mg/l	mg/l	N:P
0.80	0.032	1:0.04
1.729	0.076	1:0.044
4.2	0.186	1:0.044
0.186	0.186	1:1
4.2	0.020	1:0.0048

En la Tabla anterior, se observa que la magnitud de la relación N:P en los tres primeros renglones son muy similares y por tanto, las respuestas del crecimiento fitoplanctónico bajo tales circunstancias, a primera vista, deberían también ser similares; sin embargo como se verá más adelante, esto no sucede así, debido a que tales relaciones, aunque muy similares, son el resultado de concentraciones de N y P diferentes, por lo que el efecto sobre el crecimiento fitoplanctónico, también será diferente.

4.4 Bioensayos

En cada bioensayo el cultivo patrón contó con una edad aproximada de 2-3 semanas, significando con esto que se encontraba en la fase de crecimiento exponencial idóneo para llevar a cabo la experimentación (APHA, 1989).

Del cultivo patrón, se extrajo, previa homogenización por agitación, una muestra que se filtró a través de papel Whatman No. 41, y se lavó con solución de bicarbonatos. Las células lavadas y retenidas en el filtro, fueron desprendidas por arrastre con solución nutritiva y transferidas a un vaso de precipitados, manteniendo la solución algal en continua mezcla con el auxilio de una barra magnética. Previamente se

prepararon 12 litros de medio de cultivo con la concentración nutricional en estudio, tanto de nitrógeno como de fósforo; los 12 litros de medio se colocaron en dos bidones de 10 litros, (colocando en cada uno de ellos 6 litros de medio) y se inocularon ambos con la misma cantidad de suspensión algal que se tenía en el vaso; los bidones se taparon y agitaron vigorosamente para después proceder a la enumeración celular inicial, utilizando una celda de Sedgwick-Rafter (Stein, 1979), previamente fijadas las algas con solución de lugol (Toetz, 1981; APHA *et al.*, 1989). La finalidad de la enumeración previa, es la de contar con una concentración celular en un ámbito de 1×10^4 - 1×10^5 células por mililitro, ya que esta densidad celular es la más recomendable para usarse como inóculo (Fitzgerald, 1970; Brown *et al.*, 1978; APHA *et al.*, 1989; Grover, 1991) para experimentaciones con microalgas en medios de cultivos sintéticos.

Posteriormente se procedió al llenado de 5 botellas de DBO (de 300 ml de capacidad) hasta el tope; se taparon y sellaron con papel parafilm; estas botellas se destinaron a la evaluación del oxígeno disuelto (OD).

Se llenaron otras 25 botellas de DBO hasta un volumen de 250 ml, se taparon y sellaron con papel parafilm.

Las 30 botellas se incubaron durante 5 días, a 6000 lux, con un ciclo 12:12 h de luz-obscuridad y a temperatura de 25°C; el valor fijado de 6,000 lux para la intensidad luminosa fue determinado experimentalmente por Rojas (1992) como el óptimo para el cultivo fitoplanctónico que se utilizó en este trabajo, y los valores fijados para las otras variables representan los óptimos reportados por Eppley (1969), Rhee (1973 y 1974), Chisholm (1976) y Shlesinger (1981) para estudios con cultivos de microalgas; de esta manera, la variación de las tasas de crecimiento se debe únicamente al efecto de los nutrientes, y no a la interferencia de los otros factores.

4.5 Evaluación experimental

La evaluación experimental, como se detalla en la Tabla 3, se realizó cada 6 h durante el lapso de 5 días; el intervalo de 6 h fue fijado con base en la aplicación de la ecuación 4, con la que se obtuvo el tiempo de duplicación de 8 h, suponiendo una tasa de crecimiento máxima de 2 d^{-1} (EPA, 1990).

Los cambios en la densidad celular se evaluaron por la técnica de sedimentación de campos separados (SARH, 1976) utilizando una celda de Sedgwick-Rafter (Stein, 1979), previa fijación de la muestra con solución de lugol (Toetz, 1981; APHA *et al.* 1989).

La descripción del crecimiento algal está dada por la tasa de crecimiento específica (μ), que fue evaluada mediante la ecuación 3 y con la que se obtuvieron las tasas de crecimiento específicas ocurridas durante todo el tiempo de incubación experimental.

TABLA 3. PERIODICIDAD Y CONDICIONES DE MUESTREO DURANTE LOS BIOENSAYOS ALGALES

Días	Número de muestras	Muestreo en horas	Tiempo de muestreo	Intervalo de tiempo ΔT entre cada muestra	Foto periodo	Ciclo en horas
1	1	0:00	7:00	6:00	LUZ	24
	2	6:00	13:00	6:00		
	3	12:00	19:00	12:00	OBSCURIDAD	
2	4	24:00	7:00	6:00	LUZ	24
	5	30:00	13:00	6:00		
	6	36:00	19:00	12:00	OBSCURIDAD	
3	7	48:00	7:00	6:00	LUZ	24
	8	54:00	13:00	6:00		
	9	60:00	19:00	12:00	OBSCURIDAD	
4	10	72:00	7:00	6:00	LUZ	24
	11	78:00	13:00	6:00		
	12	84:00	19:00	12:00	OBSCURIDAD	
5	13	96:00	7:00	6:00	LUZ	24
	14	102:00	13:00	6:00		
	15	108:00	19:00	12:00	OBSCURIDAD	

Los parámetros para evaluar el metabolismo celular se determinaron por las metodologías enlistadas en la Tabla 4; es importante mencionar que se realizó un seguimiento de las concentraciones nutricionales

presentes durante el tiempo que duró cada corrida, a fin de conocer en qué momento empezaban a ser limitantes; para esto, se analizaron nitratos y ortofosfatos cada 6 horas, utilizando los métodos mencionados en la misma tabla.

TABLA 4. METODOS ANALITICOS EMPLEADOS EN LA EVALUACION DE LAS VARIABLES DE RESPUESTA

VARIABLE DE RESPUESTA	TECNICA ANALITICA
DENSIDAD CELULAR	Sedimentación de campos separados (SARH, 1976)
OXIGENO DISUELTO	Oxímetro (YSI 54 ARC)
COLOROFILE "a"	Método espectrofotométrico (Azov, 1982)
CARBONO ORGANICO	Analizador de carbono orgánico (Beckman 915 B)
NITROGENO TOTAL	Micro-Kjeldahl (APHA, 1989)
NITRATOS	Método de la brucina (APHA, 1975)
FOSFORO TOTAL	Método digestión con persulfato (APHA, 1989)
ORTOFOSFATOS	Método del cloruro estannoso (APHA, 1989)

Cabe aclarar que el método usado para determinar las concentraciones de clorofila "a", como puede notarse en la Tabla 4, no es un método estandarizado, sin embargo, tiene la ventaja de que el solvente de extracción (alcohol metílico) no deteriora las celdas de plástico, que ahora comunmente se usan para tales determinaciones. También, es pertinente señalar, que la discrepancia en los resultados usando como solvente de extracción la acetona o el alcohol metílico, es mínima (Margalef (1983)).

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 *Influencia de la relación N:P sobre el crecimiento fitoplanctónico*

La respuesta del cultivo mixto de microalgas a la variación de los niveles de N y P se evaluó mediante los incrementos en el número de organismos, y la ecuación 2 permitió calcular dichos incrementos cada día.

Como se muestra en la Fig 2, se observó una variación en el crecimiento que obedece a un patrón de comportamiento en que las diferencias externas de N y de P actúan de manera directa y diferencial sobre la rapidez del cambio en el número de organismos con respecto del tiempo. La máxima densidad celular alcanzada fue en la relación N:P de 4.2:0.186 mg/l, siendo de 1×10^9 org/ml. La influencia diferencial de la limitación de N y P pudo observarse con la obtención de la densidad celular, presentándose una concentración de 1×10^6 org/ml en un medio deficiente en P y 5×10^6 en la limitación de N evidenciando con lo anterior que el elemento limitante para un buen crecimiento de la comunidad en estudio es el P. Con respecto de las otras dos densidades celulares el comportamiento fue proporcional a la relación balanceada de N:P.

El concepto de nutrimento limitante se basa en la premisa que, dada una determinada estequiometría celular del fitoplancton, el nutrimento que

controlará la máxima cantidad de biomasa fitoplanctónica es aquel que primero se consume o que alcanza un mínimo antes que los otros nutrientes relativos a tal estequiometría.

En lo que concierne a la relación de nitrógeno a fósforo sugeridas para bioensayos, la literatura cita gran cantidad de ellas, de las cuales, la de 25:1 que sugiere Maestrini *et al* (1984) es la más común. Con esta base, se consideró en este trabajo que el medio de cultivo con relación de N:P superior a un valor de 25 fue considerado potencialmente limitado por fósforo, mientras que aquel medio de cultivo cuya razón fue inferior a 25 fue limitado por nitrógeno. Como puede verse en la Tabla 2.

5.2 *Relación entre la tasa de crecimiento y el tiempo de duplicación*

Resolviendo la ecuación 4, se obtiene que la relación entre la tasa de crecimiento y el tiempo de duplicación es inversamente proporcional. Comparando los datos experimentales con los teóricos (Figura 3), se ve que a una tasa de crecimiento de 1.886 d^{-1} el tiempo de duplicación es de 0.366 d (8.8 hr) y a una tasa de crecimiento de 0.498 d^{-1} se obtuvo un tiempo de duplicación de 1.387 d (33.3 hr); el t_d aumenta más de tres veces cuando la limitación de P es considerable, por consiguiente el intervalo de tiempo requerido para que la comunidad inicial se duplique se encuentra caracterizando la cinética del crecimiento; por esta razón, la magnitud de la tasa de crecimiento específico se usa extensamente para describir la influencia del medio nutricional sobre la población mixta natural.

5.3 *Constantes de saturación media*

La mayoría de los modelos de la calidad del agua están establecidos al tipo estequiométrico y estos modelos generalmente se encuentran basados en la cinética de Michaelis-Monod (Droop, 1983). De esta forma la ecuación del crecimiento algal para un nutriente limitante bajo condiciones de temperatura y luz óptimas puede ser expresada por la ecuación 5; en esta ecuación existe un término llamado constante de saturación, referido a la concentración del nutriente a la cual la tasa de crecimiento es la mitad del valor máximo.

Los valores de las constantes de saturación media para el N y el P se

muestran en la Tabla 5; éstas se obtuvieron gráficamente por el doble recíproco ($1/\mu_m$ vs $1/[S]$) de Lineweaver-Burk (1952), en el que la intercepción sobre el eje $1/[S]$ es igual a $-1/K_S$.

TABLA 5. CONSTANTES DE SATURACION MEDIA DEL N Y DEL P OBTENIDAS POR EL GRAFICO DE LINEWEAVER-BURK DE LOS DATOS EXPERIMENTALES.

$-1/K_S$	K_P mg/l	K_N mg/l
- 106	0.0094	*
- 5.3	*	0.188

No obstante que los valores de K_P y K_N mostrados en la tabla anterior, están dentro del ámbito que marca la literatura para cultivos puros, de 0.011-0.364 mg/l para el fósforo (Reynolds, 1984), y de 0.093-1.5 mg/l para el nitrógeno (Eppley y Coastworth, 1963), fue necesario probar la confiabilidad de tales resultados, ya que fueron obtenidos con una población mixta y no con un cultivo puro. Con tal propósito, los valores de K_P y K_N obtenidos se sustituyeron en la ecuación 5, que relaciona el crecimiento fitoplanctónico con la concentración externa nutricional. De lo anterior resultó que para una concentración de nitrógeno de 4.2 mg/l y de 0.186 mg/l de fósforo (N:P de 1.044), las tasas específicas fueron de 1.8 d^{-1} y de 1.79 d^{-1} respectivamente valores muy similares a los obtenidos experimentalmente usando las mismas concentraciones.

Puesto que en la naturaleza se presentan desbalances en la relación N:P, la utilización de modelos matemáticos que involucran a más de un nutrimento son de verdadera utilidad, ya que permiten observar la magnitud del efecto de cada nutrimento sobre la tasa de crecimiento específico (EPA, 1985; Tchobanaglou, 1985).

$$\mu_e = \mu_m \left[\frac{[N]}{K_N + [N]} \right] \cdot \left[\frac{[P]}{K_P + [P]} \right] \quad (6)$$

Con el auxilio de la ecuación 6 la respuesta de comunidades mixtas influenciadas directamente por las concentraciones externas tanto de N como de P puede obtenerse simultáneamente, utilizándose las constantes K_N y K_P determinadas en este estudio.

Cabe señalar que los valores de K_P y K_N determinados, se encuentran dentro del ámbito correspondiente a los valores manejados para regiones eutróficas Reynolds (1984), lo que indica una relación de alta productividad, como lo demuestran las tasas de crecimiento específicas obtenidas por otros investigadores (Keller, 1989; Reynolds, 1984).

5.4 Efecto de la relación N:P sobre la tasa de crecimiento específica

Los valores de las tasas de crecimiento específicas, (μ_g) para cada condición nutricional experimental se obtuvieron resolviendo la ecuación 3; de esta manera la tasa de crecimiento específica se determinó indirectamente por recuento celular, y se obtuvieron, por consiguiente, las tasas máximas para cada relación de N:P utilizadas.

En la Figura 4 se observa que a una relación de 4.2:0.186 mg/l se obtiene la tasa máxima de crecimiento de las cinco relaciones en estudio, la cual fue de 1.886 d^{-1} , teniendo que el efecto de una disminución en la concentración de los nutrientes se refleja en un decremento de la tasa máxima, como puede observarse en la figura antes mencionada.

Las bases fisiológicas para las tasas de crecimiento dependen de las proporciones óptimas de N y P principalmente; esto es, que los requerimientos celulares para el fósforo se ven incrementados más rápidamente que para el nitrógeno conforme se incrementa la comunidad fitoplanctónica. Lo anterior coincide con los trabajos realizados por Rhee (1978) y Elrifi (1985) en el que se expresa que la disminución del crecimiento es estrictamente controlado por aquel nutriente que se encuentre en menor proporción (Ley del mínimo de Liebig). Observándose lo anterior en las relaciones de 4.2:0.020 mg/l y 0.186:0.186 mg/l, cuyas tasas máximas específicas fueron 0.498 y 0.808 d^{-1} respectivamente, en las que se tiene una deficiencia de P en la primera y de N en la segunda.

El crecimiento y el metabolismo de poblaciones naturales mixtas ha

recibido un gran interés en los últimos tiempos (Collos, 1989). Un aspecto importante es la relación entre la concentración de un compuesto requerido para el crecimiento y la tasa de crecimiento resultante o alguna de sus manifestaciones, por ejemplo, la tasa de asimilación del sustrato.

La relación entre la concentración nutricional externa y la tasa de crecimiento está relacionada por la ecuación 5, en dicha ecuación se sustituyeron los valores de K_N y K_P determinados experimentalmente, variando únicamente las concentraciones de N y P.

De lo anterior se observó un comportamiento típico de la modelación de Michaelis-Monod (Tchobanoglous y Schroeder, 1985), Figuras 5 y 6; en las que se observa que, aproximadamente a partir de las concentraciones de 4.2 mg/l de N y 0.186 mg/l de P, la magnitud de los cambios en la μ son pequeños, lo que sugiere que los puntos de saturación para la comunidad en estudio son los valores antes mencionados, valores similares fueron obtenidos experimentalmente, por lo que tales resultados son confiables.

5.5 Influencia de la relación N:P sobre la capacidad fotosintética

Estudios muestran que la tasa fotosintética presenta un decremento por la deficiencia de alguno de los elementos minerales esenciales (Cooper, 1975); este decremento puede ser valorado por el contenido de clorofila.

En la Figura 7 se presenta el comportamiento diferencial por influencia de la relación N:P; observándose que el efecto de la deficiencia de P sobre la tasa fotosintética es substancialmente menos pronunciada que la de N; éste último elemento forma parte estructural de la clorofila y por consiguiente una deficiencia provoca cambios sensibles en la producción de clorofila "a"; como puede observarse en los resultados experimentales en los que se presenta una relación N:P deficiente en N (0.186 mg/l) y que cuya producción clorofílica fue la más baja determinada (0.147 mg/l) de las cinco relaciones en estudio.

La relación N:P deficiente en P (0.020 mg/l) presentó una concentración máxima de 0.572 mg/l, lo que refleja que la comunidad fitoplanctónica puede permanecer por un tiempo determinado con la deficiencia de P sin

que esto actúe de manera inmediata en el contenido de clorofila; los resultados anteriores muestran la magnitud diferencial del efecto de cada uno sobre la producción clorofílica.

Para una proporción de 4.2:0.186 mg/l, la capacidad fotosintética se ve estimulada al máximo (1.078 mg/l de clorofila "a") como resultado de la concentración más alta de N; en lo referente a la relación 1.729:0.076 mg/l se determina una concentración de clorofila "a" de 0.822 mg/l y en la relación 0.80:0.032 mg/l la concentración de la clorofila "a" fue de 0.530 mg/l; los resultados obtenidos en estas proporciones muestran que la concentración de clorofila se afecta más por las deficiencias de nitrógeno que por las de fósforo. Este efecto concuerda con los postulados de Lewis (1967), Cooper (1975) y Chapman (1978); quienes establecen que tal comportamiento se debe a que el nitrógeno es parte estructural de la clorofila.

5.6 Efecto de la relación N:P sobre la fijación de carbono orgánico

Las determinaciones de los bioensayos arrojan resultados que se escalonan sobre una gama amplia de valores de carbono asimilado en función de la relación N:P en estudio.

Se ha observado (Herzing, 1989 y Marshall, 1987) que en un medio deficiente en N se modifica la fijación de carbono fotosintético, esto es debido a que la limitación actúa como un inhibidor fotosintético, afectando directamente a las enzimas (nitro reductasa y la nitrito reductasa) involucradas en las reacciones de fijación del carbono.

Los resultados de carbono orgánico (Tabla 6) muestran un comportamiento de ascenso en un medio limitado por N; por lo que se podría pensar en un comportamiento contradictorio, ya que bajo estas mismas circunstancias se obtuvieron los valores más bajos de clorofila. Sin embargo, este tipo de comportamiento es explicado por Turpin (1991), el cual señala que las células cultivadas bajo la limitación de N acumulan almidón y son capaces de utilizarlo como fuente de carbono para la síntesis de aminoácidos de forma indistinta en la luz u oscuridad. De esta manera las algas acumulan altos niveles endógenos de carbohidratos bajo condiciones de limitación de N; además de esto se tiene que el suministro de carbono para la síntesis de aminoácidos puede no ser enteramente producto de la fijación de carbono vía fotosíntesis; estas

reacciones de carboxilación no fotosintética son la base para el aumento de la fijación de carbono en la obscuridad que acompaña la asimilación de N (Turpin, 1991). Por otro lado, se tiene que bajo concentraciones no limitantes de N, como sucede en la relación 4.2:0.186 mg/l, se presentó la mayor fijación de carbono orgánico (28.78 ppm) resultado de una alta actividad biológica, como lo refleja la determinación de la tasa máxima fotosintética; esto es explicado también por Turpin (1991) manifestando que cuando las algas crecen en un medio con suficiente nitrógeno, la fijación del carbono por el mecanismo fotosintético es suficiente para el desarrollo óptimo de los organismos; esto es, bajo tales circunstancias no se requiere fijar el carbono durante el periodo de obscuridad y almacenarlo como almidón.

TABLA 6. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION EXTERNA DE NITROGENO (NO_3^-) Y FOSFORO (PO_4^{3-}) SOBRE LA FIJACION DE CARBONO ORGANICO (C.O.), EN UNA POBLACION MIXTA NATURAL.

N:P mg/l	T I E M P O (días)				
	1	2	3	4	5
0.80 : 0.032	15.61*	19.09	15.16	16.86	16.17
1.729 : 0.076	12.85	11.27	8.12	12.94	20.35
4.2 : 0.186	23.75	28.78	24.84	21.75	22.08
0.186 : 0.186	14.21	14.41	14.89	20.25	-
4.2 : 0.020	10.14	11.69	12.98	17.85	14.74

* Las unidades de C.O. están dadas en ppm

- No se hizo la medición

5.7 Influencia de los nutrimentos sobre la producción de oxígeno

Los cambios en la concentración de oxígeno disuelto representan la dependencia de la actividad biológica estimulada por las proporciones nutricionales externas, como puede observarse en la Figura 8, en la que

la mayor producción de O.D. se registró en la relación óptima de N:P con un valor de 19.0 mg/l, que concuerda con la concentración máxima de clorofila determinada en esta misma relación, por estar íntimamente acoplado al proceso de la fotosíntesis.

Así como el metabolismo celular aumenta cuando se incrementa la concentración externa nutricional, así también suele aumentar la tasa fotosintética y por consiguiente, la producción de oxígeno disuelto, Cooper (1975).

En la relación 4.2 : 0.020 mg/l (en la que existe una deficiencia de P) se observó un valor constante a partir de las 29 hr con una concentración de O.D. de 13.0 mg/l, a partir de este momento la tasa de respiración es igual a la tasa bruta de fotosíntesis por lo que las células detienen su crecimiento; la fotosíntesis neta es cero (Margalef, 1983). Lo anterior coincide con la tasa de crecimiento específica; siendo esta de 0.498 d^{-1} , la menor determinada en toda la experimentación.

Los resultados obtenidos en la relación 0.186:0.186 m/l presentan pequeños cambios entre cada evaluación, resultado de la afectación del sistema fotosintético por la deficiencia de N.

En las relaciones de 0.80:0.032 mg/l y 1.729:0.076 mg/l se observa que el valor máximo alcanzado en la producción de O.D. es diferencial, ya que para el primero se tiene un valor máximo de 15.0 mg/l alcanzado a las 29 h y para el segundo un valor de 17.4 mg/l a un tiempo de 58 h. La diferencia en magnitud y tiempo es debida a que las comunidades fitoplanctónicas pueden permanecer con un crecimiento en ascenso por más tiempo cuando la concentración nutricional externa es mayor; cuando ésta se ve disminuída con el tiempo, se empiezan a observar cambios en la producción de oxígeno, ya que el metabolismo empieza a sufrir restricciones de índole nutricional (Margalef, 1983). Tales restricciones se dan cuando el sistema empleado, como en este caso, no es continuo; esto es, en tales sistemas no hay un aporte constante de nitrógeno y fósforo que suplan los requerimientos de estos nutrimentos que demandan los incrementos de la población.

5.8 Fijación de Nitrógeno y Fósforo

La concentración de N y P en el medio, es uno de los muchos factores que influyen en la tasa de asimilación de estos elementos. Algunos autores como Dortch (1991), Elrifi (1985), Herzing, (1989), Morel (1987) y Rhee (1978), han estudiado este tipo de relaciones, en las que existen diferentes respuestas a la limitación nutricional por parte de los organismos fitoplanctónicos.

Los resultados obtenidos durante el bioensayo mostraron una disminución en el contenido de fósforo total (P_T), arrojando un valor promedio de 0.026 mg/l correspondiente a un medio limitante en P (Tabla 7); Lewin (1967) hace mención de que en un medio deficiente de P las algas pueden utilizar compuestos orgánicos fosfatados para satisfacer sus requerimientos, sujetándose a la menor cantidad del nutrimento para continuar creciendo.

En contraste, el comportamiento de la comunidad fitoplanctónica con deficiencia de N, presentó una tendencia de aumento en la concentración de N orgánico, cuyo valor promedio fue de 2.552 mg/l; este tipo de comportamiento puede explicarse por lo mencionado por Morel (1987); él nota, que el fitoplancton limitado en N presenta una tasa de asimilación muchas veces en exceso del valor constante necesario para mantener su tasa de crecimiento.

Este tipo de respuestas han sido de interés para algunas teorías en las que se considera la presencia de estrategias por parte de los organismos acuáticos, con la única finalidad de mantener su crecimiento óptimo hasta donde les sea posible (Marshall, 1987).

En lo que concierne a las tres primeras proporciones balanceadas de N:P, se observa un aumento en la asimilación de N como de P en función de la concentración externa de cada elemento (Figura 9).

TABLA 7. RELACION ENTRE LA μ_e (d^{-1}) Y LA TASA DE ASIMILACION DE N Y P (mg/l), EN UN CULTIVO MIXTO INFLUENCIADO POR LA PROPORCION N:P

N:P	μ_e	Asimilación de P	Asimilación de N
mg/l	d^{-1}	mg/l	mg/l
0.80 : 0.032	0.861	0.050	1.852
1.729 : 0.076	0.998	0.091	2.412
4.2 : 0.186	1.886	0.184	3.276
0.186 : 0.186	0.808	0.251	2.552
4.2 : 0.020	0.498	0.026	2.496

5.9 Relación clorofila "a" : carbono orgánico

Otra forma de relacionar la actividad fotosintética, la constituye la Clorofila "a" y el contenido de carbono celular. Esta relación es ampliamente usada, ya que permite analizar el efecto de los cambios de las concentraciones nutricionales externas, sobre la producción de clorofila "a" y la fijación del carbono.

Con base en las relaciones Cl "a":CO, Herzing, (1989) establece que las diferencias entre ellas, está íntimamente relacionada con las concentraciones externas de N y P; particularmente, con lo del nitrógeno.

Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran un comportamiento similar, como puede observarse en la Tabla 8, en donde se observa que el valor mínimo de la relación Cl "a":CO, se obtuvo cuando la relación de N (0.186):P (0.186) es de 1:1 por lo que se tiene una deficiencia en N; como se ha mencionado con anterioridad el N forma parte estructural de la clorofila así como también se ha observado que una deficiencia provoca un incremento en la concentración endógena de carbohidratos; por tal razón el efecto de una deficiencia en N está íntimamente ligada a bajas relaciones de Cl:C.O. (Steele y Baird, 1962). Este hecho se ve reforzado con el resultado obtenido de la proporción 4.2:0.20 en la que

se observa una deficiencia en P, presentándose una relación de 0.038 siendo mayor incluso a las relaciones 0.80:0.032 y 1.729:0.076, ya que en ambas se tienen concentraciones menores de N. La relación más alta determinada corresponde a la relación en la que tanto el N como el P están presentes en una proporción mayor y equilibrada.

TABLA 8. RESPUESTA DE LA COMUNIDAD FITOPLANCTONICA, A DIFERENTES PROPORCIONES DE N:P SOBRE LAS RELACIONES CLOROFILA "a": C.O. Y C.O.: CLOROFILA "a"

N:P mg/l	Clorofila "a" : C.O.	C.O. : Clorofila "a"
0.80 : 0.032	0.033	30.030
1.729 : 0.076	0.035	28.490
4.2 : 0.186	0.051	19.569
0.186 : 0.186	0.025	40.000
4.2 : 0.020	0.038	25.773

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

- El uso del modelo cinético de Michaelis-Monod fue de gran utilidad para analizar las relaciones entre la concentración extracelular nutricional y la tasa de crecimiento del fitoplancton.
- La relación entre las concentraciones de nitrógeno y fósforo (N:P) a la que se obtuvo la tasa máxima de crecimiento (1.886 d^{-1}) fue de 1:0.044 y cualquier desbalance en esa relación se manifestará en un decremento de la tasa de crecimiento, si se experimenta bajo condiciones similares a las usadas en este estudio.
- Dado que la sustitución en la ecuación de Michaelis-Monod, de las constantes de saturación $K_N = 0.188 \text{ mg/l}$ y $K_P = 0.0094 \text{ mg/l}$ determinadas en este trabajo, produjeron valores para la tasa de crecimiento de 1.8 d^{-1} y 1.79 d^{-1} , muy similares al valor de 1.886 d^{-1} obtenido experimentalmente, tales constantes pueden usarse confiablemente en investigaciones que requieran este tipo de información.
- En virtud de que se encontró que a concentraciones de 0.186 mg/l de N y 0.020 mg/l de P la tasa de crecimiento decrece, se consideró que estas concentraciones corresponden a las condiciones

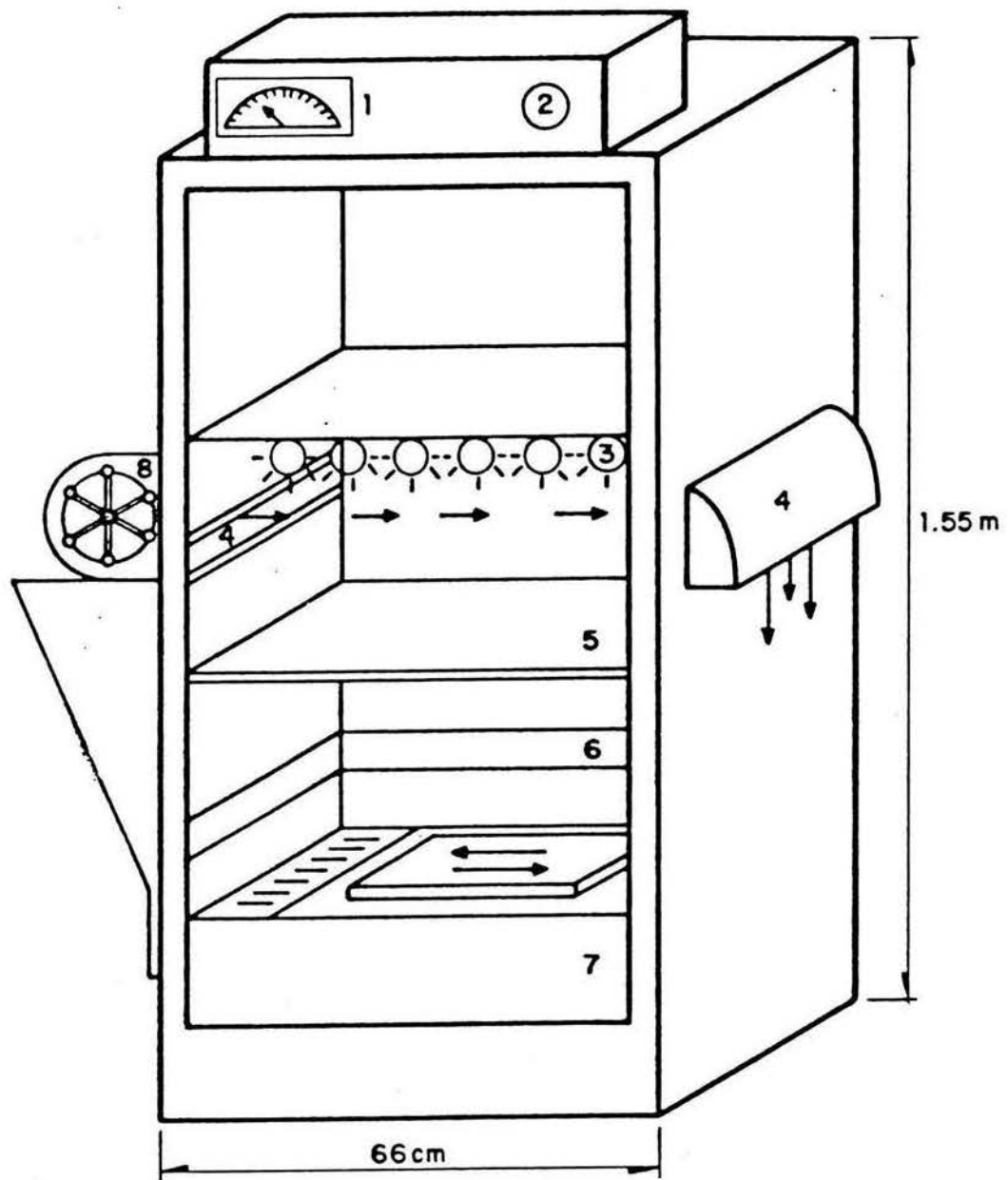
limitantes para la comunidad en estudio.

- Aún con los resultados de las mediciones de nitrógeno total, fósforo total, clorofila "a", oxígeno disuelto y carbono orgánico se observó que las variables de respuesta por ejemplo, el contenido de clorofila "a" no sigue un patrón de comportamiento determinado, aspecto que conlleva a que los estudios de esta naturaleza, es necesario considerar otras variables además de las mencionadas.

6.2 Recomendaciones

- Es recomendable continuar con investigaciones, entorno a la dinámica fitoplanctónica, usando poblaciones mixtas, ya que los resultados obtenidos, ensayando con monocultivos, limitan su aplicación a casos reales.
- Se hace necesario la conveniencia de ampliar y de contar con diseños experimentales que permitan ajustarse a las condiciones ambientales naturales, en la medida de lo posible, para la obtención de resultados más próximos a lo que sucede en la naturaleza.
- El enfoque de este tipo de estudios abren las puertas para la realización de otros, que conlleven a la solución de problemas tales como el crecimiento excesivo de fitoplancton en las estaciones piscícolas, o para determinar la capacidad de carga bajo condiciones experimentales diferentes a las usadas en este trabajo.





1. Termostato 2. Réostato 3. Focos 4. Entrada y salida de aire 5. Aislamiento térmico 6. Espejos 7. Sistema de agitación 8. Ventilador centrífugo.

Fig 1 Esquema del sistema de Incubación

Figura 2. Incremento de la densidad celular como respuesta a una proporción diferencial de N:P.

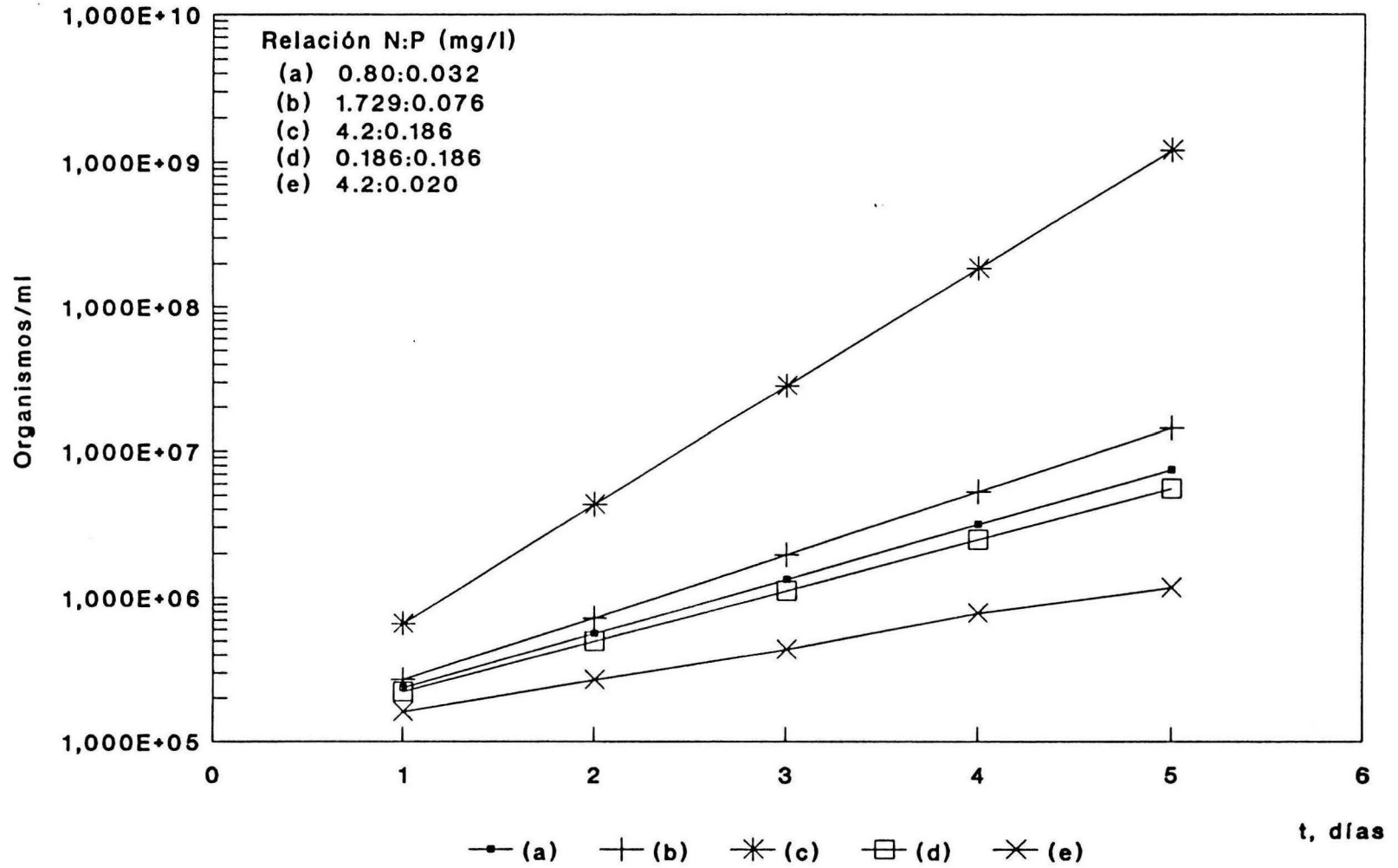


Fig. 3. Relación entre la tasa de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (t_d). Datos experimentales (-); datos teóricos (□)

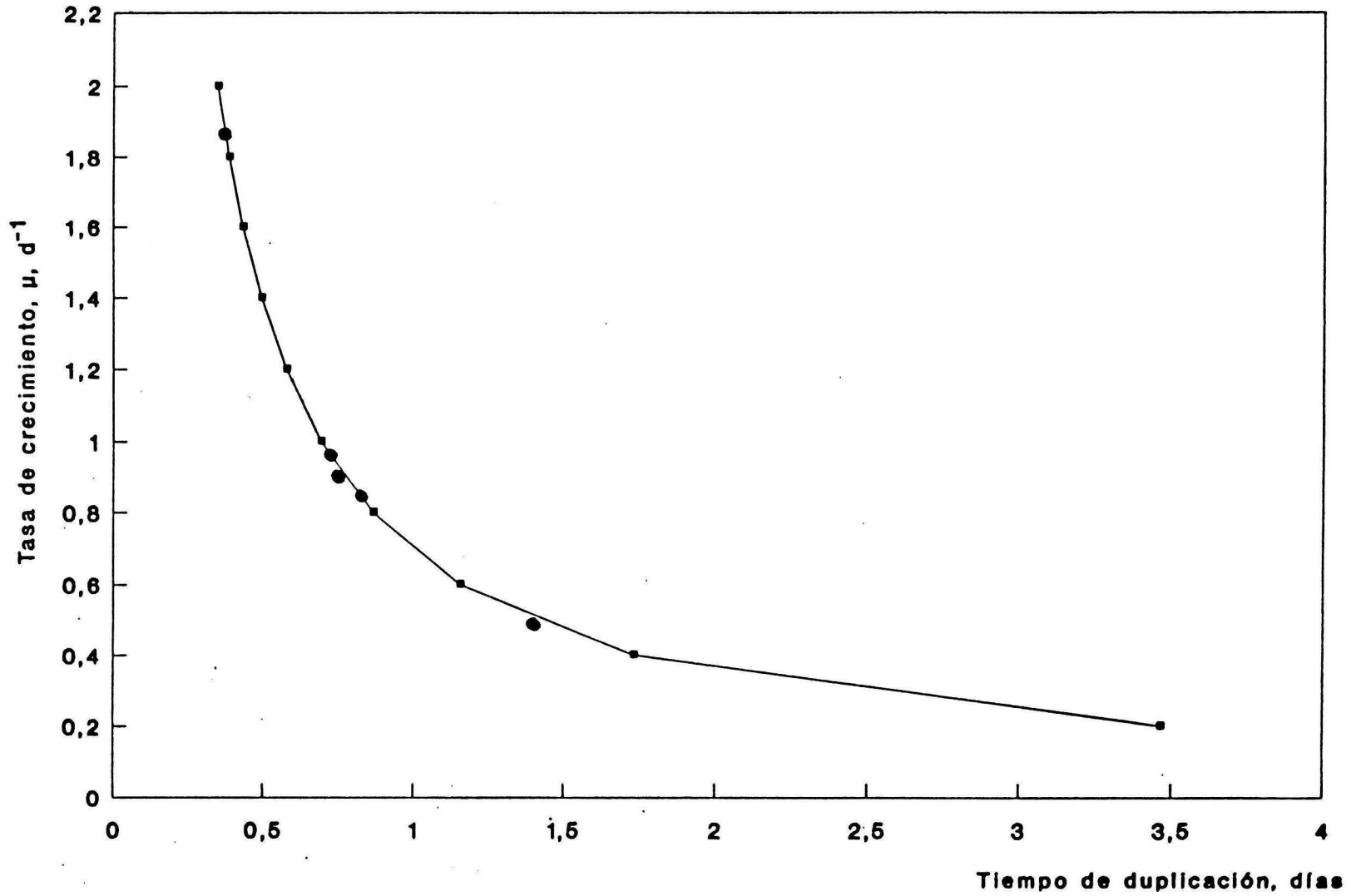


Fig. 4. Tasas de crecimiento máximas específicas de un cultivo mixto por influencia de la relación N:P.

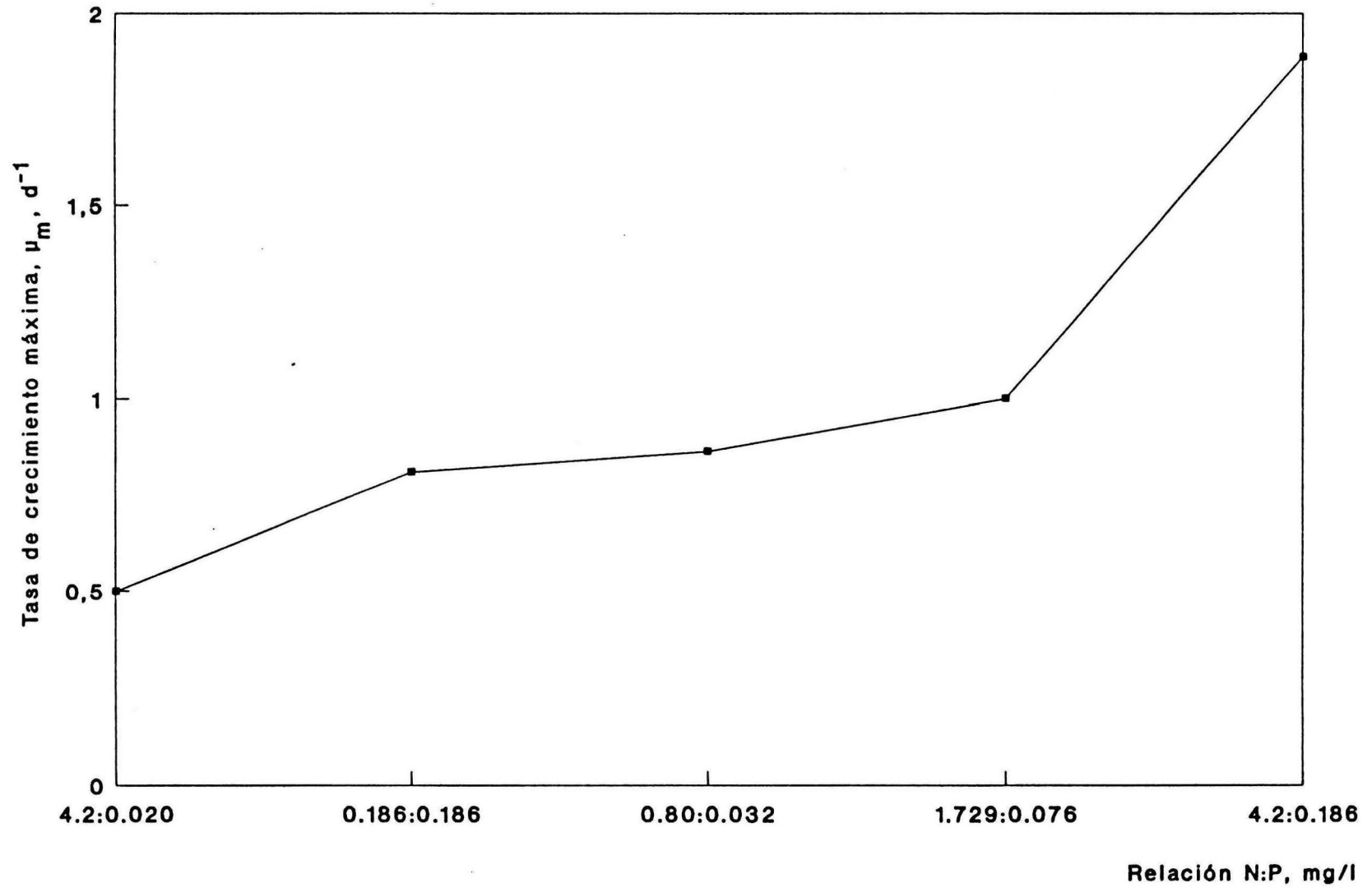


Figura 5. Comportamiento característico de la relación cinética propuesta por Michaelis-Monod; en la que se observa una región de máxima respuesta alcanzada en un ámbito de 0.001-0.1 mg/l de PO_4^{3-} y una zona de mínima respuesta a partir de 0.1 mg/l de PO_4^{3-}

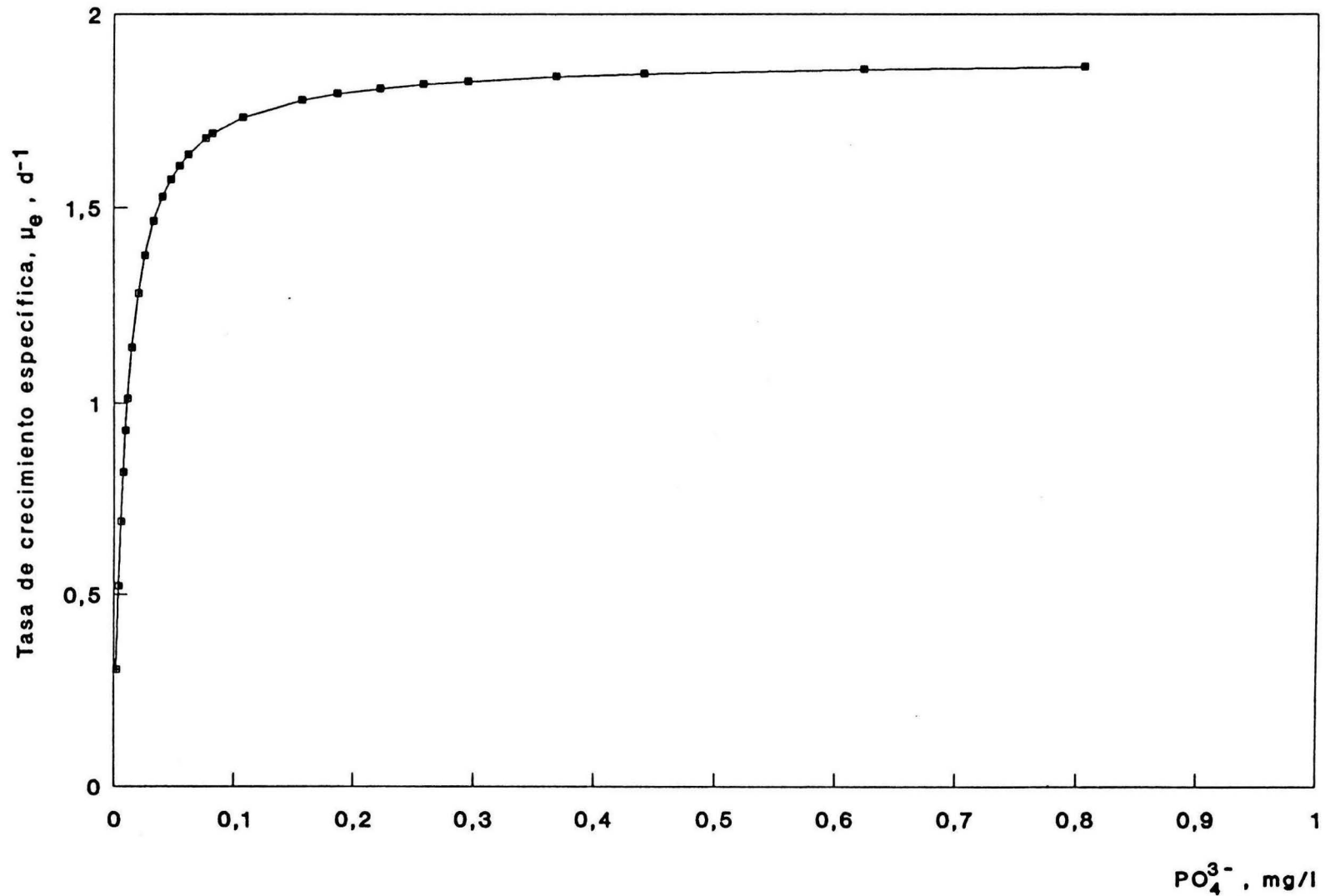


Figura 6. Comportamiento característico de la relación cinética propuesta por Michaelis-Monod; en la que se observa una región de máxima respuesta alcanzada en un ámbito de 0.041-2.4 mg/l de NO_3^- y una zona de mínima respuesta a partir de 2.4 mg/l de NO_3^-

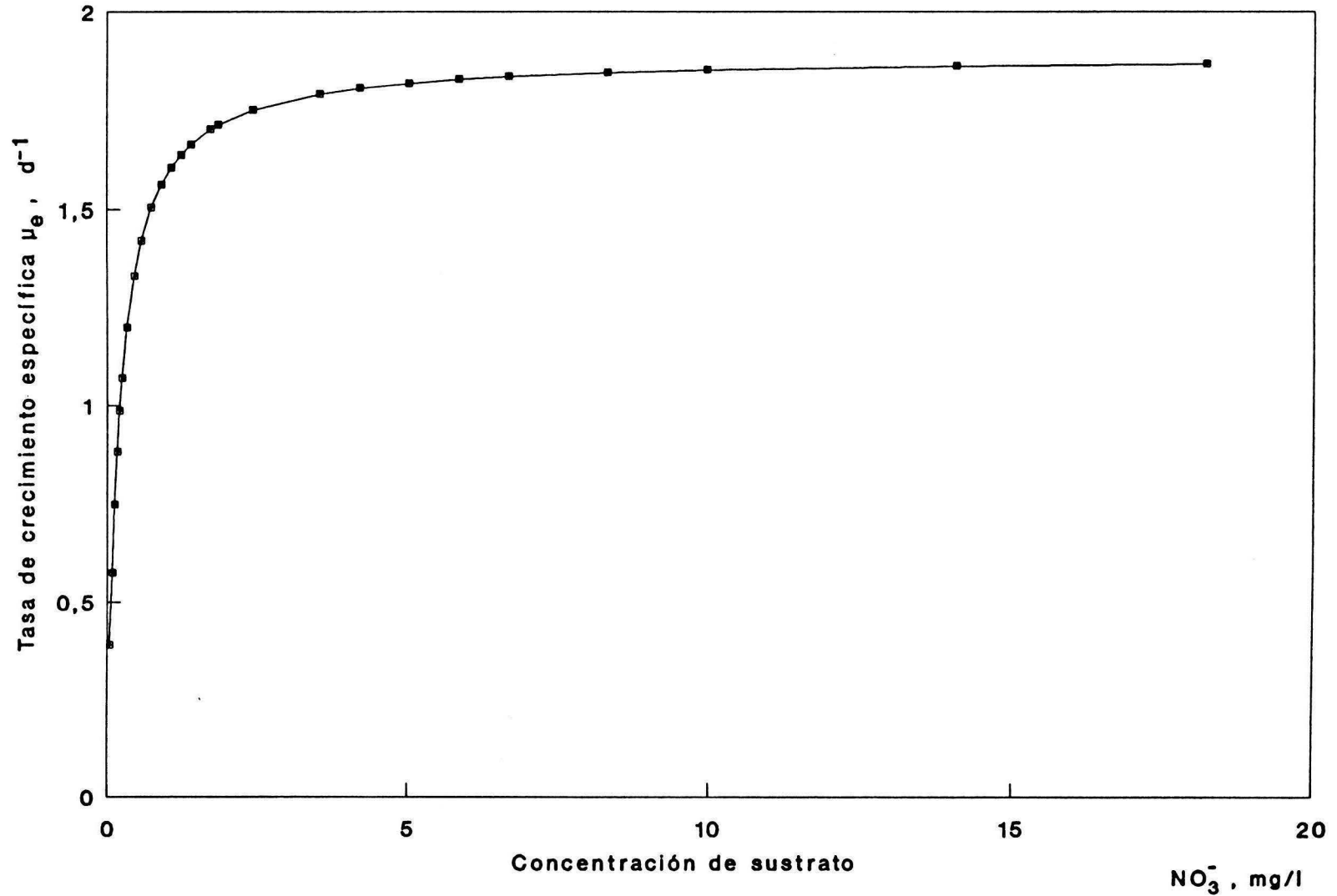


Figura 7. Respuesta fotosintética de la población mixta natural, resultado de las diferentes relaciones N:P en el tiempo.

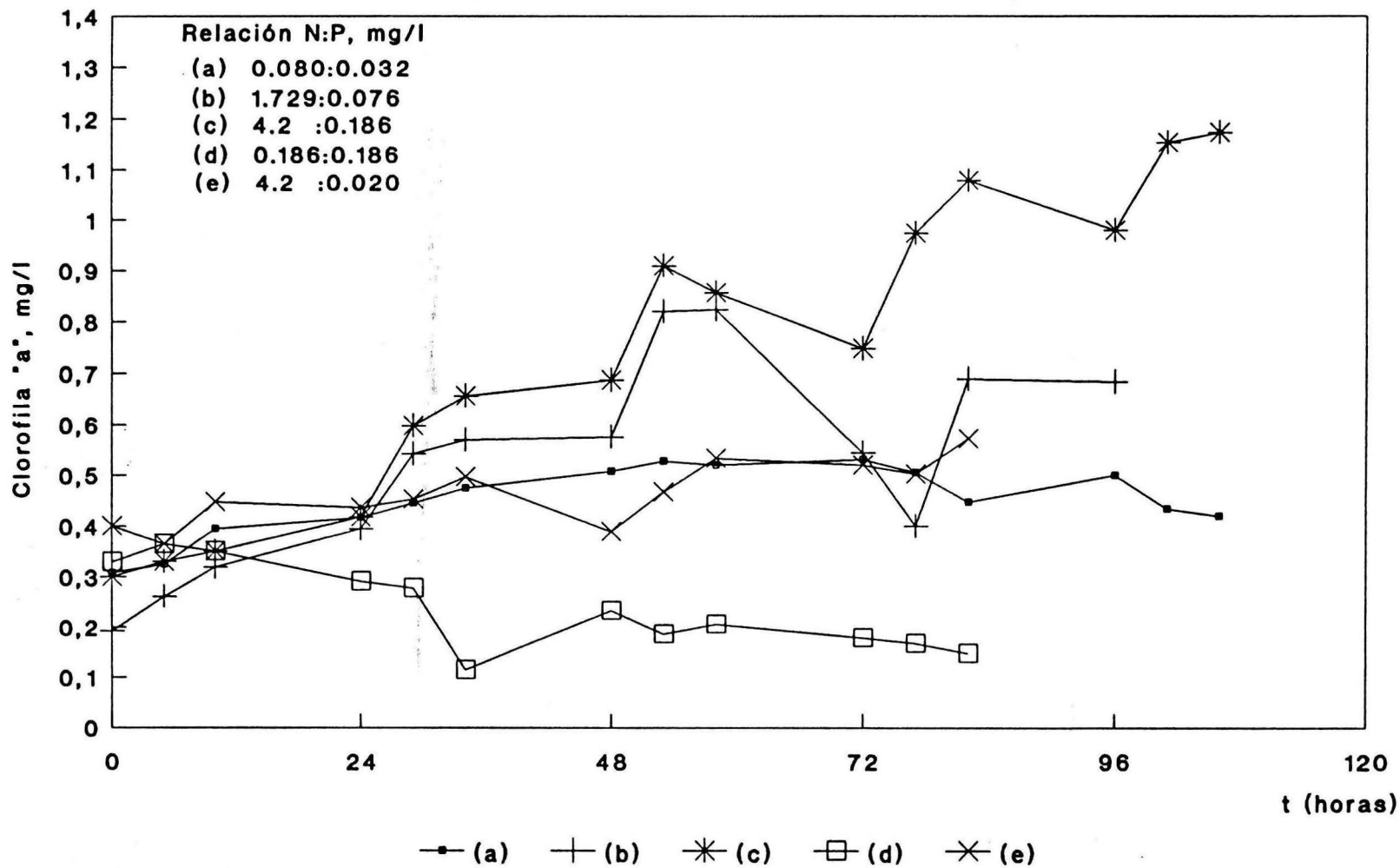


Figura 8. Producción de oxígeno disuelto con respecto del tiempo, por la influencia de las diferentes proporciones de N:P.

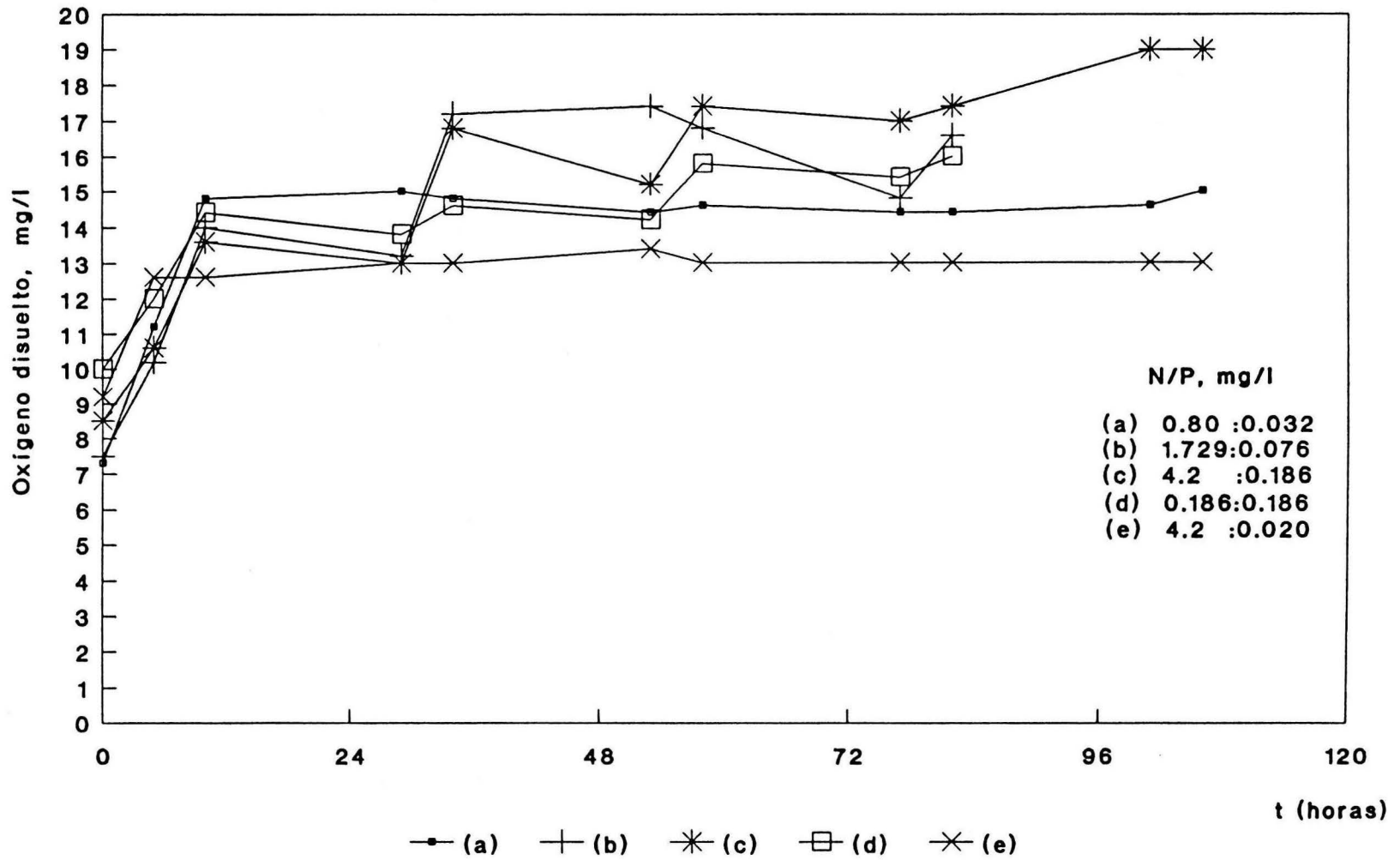
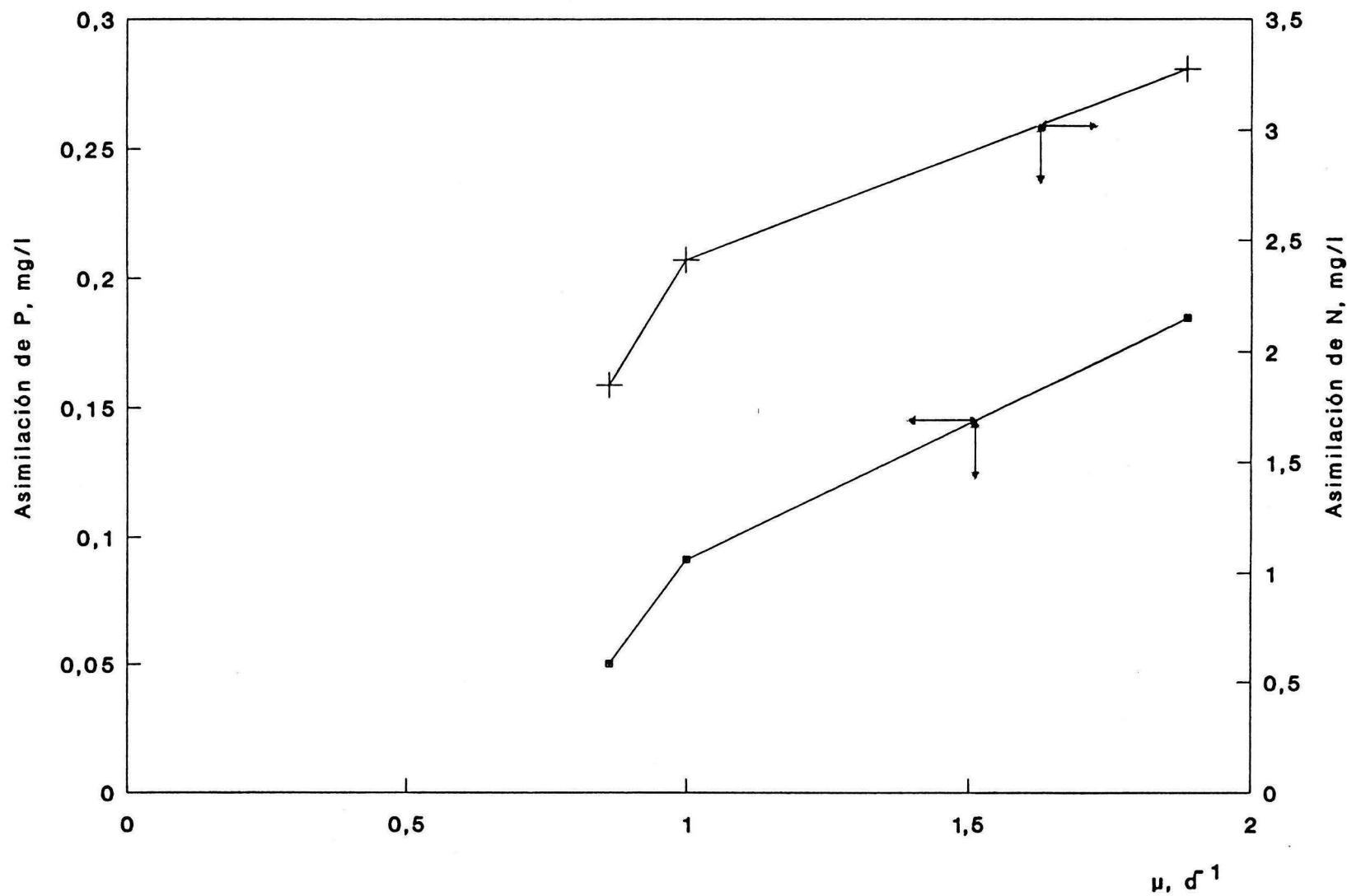


Figura 9. Comportamiento de la tasa de asimilación del N y P como una función del estado nutricional en un cultivo mixto.



7. BIBLIOGRAFIA

ALCOCER, J. Kato, E., Robles, E. y Vilaclara, G. 1988. "Estudio preliminar del efecto del dragado sobre el estado trófico del Lago Viejo de Chapultepec". Contam. Ambient. 4, 43-56.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATERWORKS ASSOCIATION, WATER POLLUTION CONTROL FEDERATIONS. 1989. "Standard methods for the examination of water and wastewater", 17th edition, American Public Health Association, Washington, D.C.

AZOV, Y. 1982. "Effect of pH on inorganic carbon uptake in algal cultures". Appl. Environ. Microbiol. 43:1300-1306.

BAILEY, J.E. and Ollis, D.F. 1986. Biochemical engineering fundamentals, Mc Graw-Hill, Nueva York, 373-454 pp.

BROWN, J.E. and Harris, F.R. 1978. "Kinetics of phosphate uptake by aquatic microorganisms: Deviations from a simple Michaelis-Menten equation". Limnol. Oceanogr. 23:26-34.

CAPERON, J. and Meyer, J. 1972. "Changes in population characteristics with steady-state growth rate". Deep-Sea Res. 19:601-618.

- CAPERON, J. and Meyer, J. 1972. "Uptake and their role in nutrient limited growth of phytoplankton". *Deep-Sea Res.* 19:619-632.
- CHAPMAN, O.R. 1978. "Effects of nitrate concentration on the growth and physiology of *Laminaria saccharina* (Phaeophyta) in culture". *J. Phycol.* 14:195-198.
- CHISHOLM, S.W. and Stross, R.G. 1976. "Phosphate uptake kinetics in *Euglena gracilis* (Euglenophyceae) grown on light/darks cycles". I. synchronized batch cultures. *J. Phycol.* 12:210-217.
- CHUNG-Yuan, C. and Christensen, E.R. 1985. "A unified theory for microbial growth under multiple nutrient limitation". *Water Res.* 19:791-798.
- COLINVAUX, P. 1986. *Ecology*, John Wiley & Sons, New York. 712 pp.
- COLLOS, Y. 1989. A linear model of external interactions during uptake of different forms of inorganic nitrogen by microalgae. *J. Plank. Res.* 11:521-533.
- COOPER, J.P. 1975. "Photosynthesis and productivity in different environments". Cambridge University Press, Great Britian, 537-545 pp.
- DILLON, P.J. and Rigler, F.H. 1974. "The phosphorus-chlorophyll relationship in lakes". *Limnol. Oceanogr.* 19:767-773.
- DORTCH, Q. and Thompson, P.A. 1991. "Variability in nitrate uptake kinetics in *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae)". *J. Phycol.* 27:35-39.
- DROOP, M.R. 1968. "Vitamin B₁₂ and marine ecology". IV The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 48:689-733.
- DROOP, M.R. 1973. "Some thoughts on nutrient limitation in algae". *J. Phycol.* 9:264-272.

- DROOP, M.R. 1983. "25 Years of algal growth kinetics a personal view". Bot. Mar. Vol. XXVI, 99-112.
- DUGDALE, R.C. 1978. "Nutrient limitation in the sea: Dynamics, identification, and significance". Limnol. Oceanogr. 12:685-694.
- ELRIFI, R.I. and Turpin, H.D. 1985. "Steady-state luxury consumption and the concept of optimum nutrient ratios: A study with phosphate and nitrate limited *Selenastrum minutum* (Chlorophyta)". J. Phycol. 21:592-602.
- EPPLEY, R.W. and Coatsworth, L.J. 1968. "Uptake of nitrate and nitrite by *Ditylum brightwellii*-kinetics and mechanisms". J. Phycol. 4:151-156.
- EPPLEY, R.W. and Thomas, W.H. 1969. "Comparison of half-saturation constants for growth and nitrate uptake of marine phytoplankton". J. Phycol. 5:375-379.
- FITZGERALD, P.G. 1970. "Evaluations of the availability of sources of nitrogen and phosphorus for algae". J. Phycol. 6:239-247.
- FLYNN, K.J. 1988. The concept of "Primary production" in aquatic ecology. Limnol. Oceanogr. 33:1215-1216.
- GABOR, U. 1966. "Die Scenedesmus-Arten Ungarns". Akadémiai Kiadó, Budapest. 1973 pp.
- GOLDMAN, J.C. and Carpenter, E.J. 1974. "A kinetic approach to the effect of temperature on algal growth". Limnol. Oceanogr. 19:756-766.
- GROVER, J.P. 1991. "Non-steady state dynamics of algal population growth: Experiments with two Chlorophytes". J. Phycol. 27:70-79.
- HEALEY, F.P. and Hendzel, L.L. 1975. "Effect of phosphorus deficiency on two algae growing in chemostats". J. Phycol. 11:303-309.
- HERZIG, R. and Falkowski, P.G. 1989. "Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (Haptophyceae). I. Photosynthetic energy conversion and growth efficiencies. J. Phycol. 25:462-471.

- HUTCHINSON, G.E. 1957. The phosphorus cycle in lakes. "A treatise on limnology Vol. I", Part 2. Chemistry of lakes. Wiley, New York. 727-1015 pp.
- KELLER, A.A. 1989. "Modeling the effects of temperature, light, and nutrients on primary productivity: An empirical and a mechanistic approach compared". *Limnol. Oceanogr.* 34:82-95.
- KUNIKANE, S. and Kaneko, M. 1984. Growth and nutrient uptake of green alga, *Scenedesmus dimorphus*, under a wide range of nitrogen/phosphorus ratio-II. *Water Res.* 18:1313-1326.
- LEWIN, R.A. 1967. "Physiology and Biochemistry of Algae". Academic Press, New York, 541-550 pp.
- MAESTRINI, S.Y., Bonin, D.J., Droop, M.R. 1984. Water Quality: Bioassay Approaches and protocols. In Shubert, E.L. Algae as ecological indicators. Academic Press, Orlando, Florida, 71-104 pp.
- MacISAAC, J.J. and Dugdale, R.C. 1969. "The kinetics of nitrate and ammonia uptake by natural populations of marine phytoplankton". *Deep-Sea Res.* 16:45-57.
- MASTERS, M.G. 1974. "Introduction to environmental Science and Technology", Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J. 404 pp.
- MASTERS, M.G. 1991. "Introduction to environmental engineering and science", Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J. 134-138 pp.
- MARGALEF, R. 1983. "Limnología". Omega, España, 247-329 pp.
- MARSHALL, D.W. 1987. "Biología de las algas". Limusa, México, 52-69 pp.
- MOREL, F.M.M. 1987. Kinetics of nutrient uptake and growth in phytoplankton. *J. Phycol.* 23:137-150.
- O'BRIEN, W.J. 1974. "The dynamics of nutrient limitation of phytoplankton algae: A model reconsidered". *Ecology* 55:135-141.

- ORTEGA M.M. 1984. Catálogo de las algas continentales recientes de México. UNAM, México, 294 pp.
- PRESCOTT, W.G. 1972. North American Flora, Series II. New York Botanical Garden. 83 pp.
- PRESCOTT, W.G. 1973. Algae. Otto Koeltz Science Publishers, Germany. 977 pp.
- REYNOLDS, C.S. 1984. "The ecology of freshwater phytoplankton". Cambridge University Press. Great Britain, 384 pp.
- RHEE, Y.G. 1973. "A continuous culture study of phosphate uptake, growth rate and polyphosphate in *Scenedesmus* sp." J. Phycol. 9:495-506.
- RHEE, Y.G. 1974. "Phosphate uptake under nitrate limitation by *Scenedesmus* sp. and its ecological implications". J. Phycol. 10:470-475.
- RHEE, Y.G. 1978. "Effects of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition, and nitrate uptake". Limnol. Oceanogr. 23:10-25.
- RHEE, Y.G. and Gotham, I.J. 1981. "The effect of environmental factors on phytoplankton growth: Temperature and the interactions of temperature with nutrient limitation". Limnol. Oceanogr. 26:635-648.
- RODIER, J. 1990. "Análisis de las aguas". Omega, Barcelona, V pp.
- ROJAS, V.M.N. 1992. "Evaluación experimental del efecto de la variación de la luz sobre la productividad fitoplanctónica de un cultivo mixto". Tesis, Biología. ENEP-Iztacala. UNAM. 70 pp.
- SAKAMOTO, M. 1966. "Primary production by phytoplankton community in some Japanese lakes and its dependence on lake Depth". Arch. Hydrobiol. 62:1-28.
- SECRETARIA DE AGRICULTURA Y RECURSOS HIDRAULICOS. 1976. "Análisis de plancton y perifiton". Vol. I, México 259 pp.

SCHINDLER, D.W. 1978. "Factors regulating phytoplankton production and standing crop in the world's freshwaters". *Limnol. Oceanogr.* 23:478-486.

SCHLESINGER, D.A. and Shuter, B.J. 1981. "Patterns of growth and cell composition of freshwater algae in light-limited continuous cultures". *J. Phycol.* 17:250-256.

SMITH, V.H. 1982. "The nitrogen and phosphorus dependence of algal biomass in lakes: An empirical and theoretical analysis". *Limnol. Oceanogr.* 27:1101-1112.

STEELE and Baird, I.E. 1962. "Carbon-chlorophyll relations in cultures". *Limnol. Oceanogr.* 7:101-102.

STEIN, R.D. 1979. "Handbook of phycollogical methods. Culture methods and growth measurements". Cambridge Univ. Press, London, 289-311 pp.

STROSS, R.G. and Pemrick, S.M. 1974. "Nutrient uptake kinetics in phytoplankton: A basis for niche separation". *J. Phycol.* 10:164:169.

TCHOBANOGLOUS G. and Schroeder E.D. 1985. "Water quality". Addison Wesley. Menlo Park, California. 768 pp.

TOETZ, D.W. 1979. "Effects of pH, phosphate and ammonia on the rate of uptake of nitrate and ammonia by freshwater phytoplankton". *Hydrobiol.* 76:23-26.

TURPIN, D.H. 1991. "Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism". *J. Phycol.* 27:14-20.

VOLLENWEIDER, R.A. 1974. "A model on methods for measuring primary production in aquatic environments". Second edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford. London. 225 pp.

WATER QUALITY ANALYSIS PROGRAM: "A hydrodynamic and water quality model. 1987. Model theory user's manual and programmer's guide". EPA/600/3-87/039 corret'd 5/90. U.S. Environmental Protection Agency, Athens. 258 pp.

WATER QUALITY ANALYSIS PROGRAM. "Constants, and kinetics formulations in surface Water quality modeling, 1985", 2nd Edition, EPA/600/3-85/040, U.S. Environmental Protection Agency, Athens.

WETZEL, R.G. 1981. "Limnología". Omega. Barcelona, 169-291 pp.