

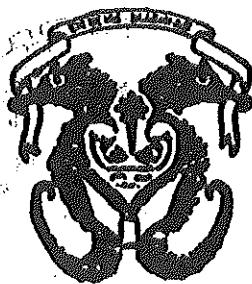
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

"EFECTO EN EL CRECIMIENTO DE LA MICROALGA
Tetraselmis suecica (Kyllin) Butch, 1959 A
DIFERENTES CONCENTRACIONES DE $\text{Na}_2\text{-E. D. T. A.}$ EN
CULTIVO ESTATICO. "

CURSO DE TITULACION:

"BIOLOGIA MARINA"



M E M O R I A
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
O C E A N O L O G O

PRESENTA:

SANTOS VELARDE LLANAS

ENSENADA, B. C., FEBRERO DE 1988.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

"EFECTO EN EL CRECIMIENTO DE LA MICROALGA
Tetraselmis suecica (Kylin) Butch, 1959 A
DIFERENTES CONCENTRACIONES DE $\text{Na}_2\text{-E.D.T.A.}$ EN
CULTIVO ESTATICO. "

CURSO DE TITULACION:

"BIOLOGIA MARINA"

M E M O R I A
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
O C E A N O L O G O

PRESENTA:

SANTOS VELARDE LLAMAS

ENSENADA, B. C., FEBRERO DE 1988.

"EFECTO EN EL CRECIMIENTO DE LA MICROALGA Tetraselmis
suecica (Kyllin) Butch, 1959 A DIFERENTES CONCENTRACIONES
DE Na₂-E. D. T. A. EN CULTIVO ESTATICO. "

CURSO DE TITULACION:

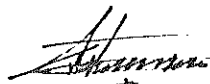
"BIOLOGIA MARINA"

M E M O R I A

QUE PRESENTA:

SANTOS VELARDE LLAMAS

Aprobada por:



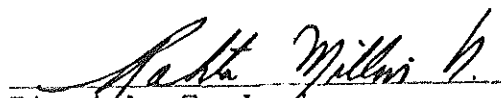
Présidente del Jurado
Ocean. Eduardo Martín Santamaría del Ángel



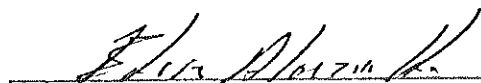
Sinodal Propietario
M.C. Guillermo Torres Moya



Sinodal Propietario
M.C. Guillermo Villarreal Ch.



Sinodal Suplente
M.C. Roberto Millán Nuñez



Sinodal Suplente
Ocean. Eliseo Almanza Heredia

RESUMEN

Se realizó un bioensayo, en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Marinas de la U.A.B.C. en Ensenada, B.C., manteniendo durante 512 horas (7 días) en medios de cultivo estático a nivel Erlensmeyer de 125 ml en agua de mar, a la microalga Tetraselmis suecica, con objeto de estimar la variación del crecimiento a diferentes concentraciones de quelante artificial $\text{Na}_2\text{-EDTA}$. Se prepararon volúmenes de 50 ml del medio "f/2" de Guillard (1975) para quelante y metales traza, así como macronutrientes, vitaminas y TRIS según Matthiessen y Toner (1966). La concentración de quelante se varió porcentualmente partiendo del control con 4.36 g/lit para 100%, y sucesivamente: 3.27 g/lit para 75%, 2.18 g/lit para 50%, 1.09 g/lit para 25% y 0.0 g/lit para 0%. La densidad inicial promedio de los cultivos fue de 6.167×10^4 cel/ml, las densidades celulares máximas se alcanzaron al séptimo día, obteniéndose en el medio control 249.2×10^4 cel/ml, con 75% 222×10^4 cel/ml, con 50% 226.3×10^4 cel/ml, con 25% 198.5×10^4 cel/ml y con 0% 203.1×10^4 cel/ml. Fueron aplicadas pruebas no paramétricas para hacer comparaciones, no encontrándose diferencias significativas al nivel del 5% entre original y réplica al aplicar la prueba de Wilcoxon, la misma prueba se aplicó entre tratamientos a diversas concentraciones de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ no presentándose diferencias significativas en el crecimiento, así mismo, se compararon las densidades al séptimo día con ANOVA de una vía de Kruskal-Wallis, no encontrándose diferencias entre tratamientos. Por lo que es factible para ésta localidad, desarrollar en cultivo estático a T. suecica, sin agregar quelante al medio de cultivo, dado que el agua de mar pudiera poseer quelatos naturales suficientes.

D E D I C A T O R I A

A MIS PADRES

SANTOS Y ENRIQUETA

Por su sencillez, aprensión y afecto

A MIS HERMANOS

MARIA ELENA, JESUS EDUARDO, ENRIQUETA Y CRISTINA

Por la perseverancia que han tenido para conmigo

A LA MUJER QUE ME ACOMPANA EN LA VIDA

MARINA

Con Amor

IN MEMORIAM

GENOVEVA SALAZAR

Abuela insustituible

AGRADECIMIENTOS

Al Ocean. Eduardo Martín Santoméria del Angel por su apoyo, ayuda moral, que me brindó, y su adecuada dirección y aportación intelectual en el desarrollo de este trabajo. A los sinodales: Ocean. Eliseo Almanza Heredia, M.C. Guillermo Torres Moya, M.C. Roberto Millán Nuñez y M.C. Guillermo Villorreal Chávez, por sus atinados comentarios y valiosas sugerencias.

Al Ocean. Francisco Gavidia Medina, por su apoyo en el procesamiento del trabajo, al Ocean. Gilberto Flores Muñoz por sus consideraciones y críticas oportunas, al C. Leonel Flores Muñoz por su orientación gráfica, al Ocean. Javier Gómez Ramírez y al Ecol. Mar. Miguel Flores Hernández por su colaboración en el análisis de datos.

A la Dirección General de Ciencia y tecnología del Mar de la S.E.I.T.-S.E.P. que gestionó el desarrollo del Curso de Titulación: "Biología Marina", y a la Universidad Autónoma de Guerrero, por su decidido apoyo en la realización del presente trabajo.

A mis profesores y compañeros les agradezco su apoyo en mi formación profesional, en especial a la M.C. Ma. del Refugio González Esparza. Así como a todas aquellas personas que me dieron su desinteresada amistad.

A mis padres y hermanos, que con su comprensión y cariño me brindaron siempre un apoyo incommensurable.

Y a mi esposa y compañera Marina de la Torre Nuñez, por caminar conmigo y compartir su vida, entregándonos siempre amor.

I N D I C E

	PAGINA
1. - INTRODUCCION	1
2. - MATERIALES Y METODO	15
3. - RESULTADOS	23
4. - DISCUSION	39
5. - CONCLUSIONES	44
6. - RECOMENDACIONES	45
7. - LITERATURA CITADA	48

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	CONTENIDO	PAGINA
1.-	Curva de crecimiento ideal para microalgas no sincronizadas, en medio de cultivo con volumen limitado.	4
2.-	Patrón de respuesta biológica a la dosis de un elemento esencial.	7
3.-	Antagonismo en la biodisponibilidad de algunos metales pesados.	9
4.-	Curva de crecimiento de <u>Tetraselmis suecica</u> en el medio de cultivo con 100 % de quelante.	27
5.-	Curva de crecimiento de <u>Tetraselmis suecica</u> en el medio de cultivo con 75 % de quelante.	28
6.-	Curva de crecimiento de <u>Tetraselmis suecica</u> en el medio de cultivo con 50 % de quelante.	29
7.-	Curva de crecimiento de <u>Tetraselmis suecica</u> en el medio de cultivo con 25 % de quelante.	30
8.-	Curva de crecimiento de <u>Tetraselmis suecica</u> en el medio de cultivo con 0 % de quelante.	31
9.-	Curvas de crecimiento de <u>Tetraselmis suecica</u> para todos los tratamientos: 100, 75, 50, 25 y 0 %, durante 9 días de cultivo.	33

LISTA DE TABLAS

TABLA	CONTENIDO	PAGINA
I.-	Ejemplos de participación biológica de algunos metales pesados: Co, Cu, Fe, Mn, Mo y Zn.	10
II.-	Soluciones madre de nutrientes para la elaboración del medio de cultivo para las concentraciones de micronutrientes (f/2 de Guillard), macronutrientes, vitaminas y TRIS (Mattiessen y Toner).	16
III.-	Composición porcentual de la concentración (gr/lt) en cada tratamiento con secuestrante y Fe, para la solución stock de metales traza, basado en el medio "f/2" de Guillard.	18
IV.-	Densidades celulares y parámetros poblacionales para el medio de cultivo conteniendo 100 % de quelante.	24
V.-	Densidades celulares y parámetros poblacionales para el medio de cultivo conteniendo 75 % de quelante.	24
VI.-	Densidades celulares y parámetros poblacionales para el medio de cultivo conteniendo 50 % de quelante.	25
VII.-	Densidades celulares y parámetros poblacionales para el medio de cultivo conteniendo 25 % de quelante.	25
VIII.-	Densidades celulares y parámetros poblacionales para el medio de cultivo conteniendo 0 % de quelante.	26
IX.-	Parámetros poblacionales de la fase exponencial para obtener la densidad teórica (D_t) al día t , de la forma: $D_t = D_0 \cdot 2^{A \cdot t}$	34
X.-	Densidad de <u>Tetraselmis suecica</u> en cultivo estático a diferentes concentraciones de Na ₂ -EDTA, a los 7 días de inoculación (densidad inicial $D_0 = 6.167 \times 10^4$ células/ml).	36

XI.- Comparaciones del crecimiento entre los ... 38
cultivos de *Latassalia* que se cultivan con
diferentes concentraciones porcentuales de
Na₂-EDTA, aplicando la prueba no paramétrica
de Wilcoxon para muestras independientes, al
nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

XII.- Componentes orgánicos naturales con poderes ... 40
quelantes presentes en el agua de mar,
indicando las fuentes de referencia.

1. - INTRODUCCION

La importancia del cultivo de microalgas en la acuicultura estriba en la capacidad que poseen de transformar sales inorgánicas en compuestos orgánicos mediante la luz por acción fotosintética, lo que las hace imprescindibles como cultivos anexos para alimento de larvas y adultos de organismos de relevancia económica (Ryther, 1971). Sin embargo, el cuadro fisiológico básico (niveles óptimos de temperatura, luz, nutrientes, salinidad, pH y la interacción entre éstas), para la mayoría de las microalgas dista de haberse completado lo suficiente para comprender y obtener un mejor aprovechamiento de ellas. Un aspecto que actualmente no es completamente conocido aun en la Acuicultura, para la elaboración de medios enriquecidos, es la interrelación entre: [fitoplancton]-[quelantes]-[metales, traza] (Barber y Ryther, 1969; Barber, 1973), siendo factible la utilización del cultivo de microalgas determinando su crecimiento, mediante el cual, llegar a estimar el efecto tóxico de iones metálicos de transición, variando la concentración de quelante artificial, en el medio de cultivo enriquecido.

Con esta finalidad se utilizó la microalga Tetraselmis suecica (Kyllin) Butch, 1959, por ser de fácil

manejo y considerando su interés en la maricultura como alimento en cultivo de crustáceos (Brown, 1972; Griffith et al., 1973; Persoone y Borgeloes, 1975; Jeffrey, 1979), de moluscos bivalvos (Davis y Guillard, 1959; Yanase e Imai, 1968; Walne, 1970; Helm et al., 1973; Helm, 1977; Kinne, 1977; SEAFDE, 1978; Curtin, 1979; Jeffrey, 1979; Nie et al., 1979; Prieur y Carval, 1979; Laing y Helm, 1981), de rotíferos (Griffith et al., 1973; Cirin, 1977; Gatesoupe y Luquet, 1981), de juveniles de abulón (Imai, 1967) y de peces herbívoros (Pilay, 1967).

Fue Stein (1878, En: Guillard, 1975), quien describió originalmente al género Tetraselmis, aunque Kylin (1935) describió por primera vez a Platamonas suecica, siendo finalmente Butch (1959), quien ubicó a la especie P. suecica en el género Tetraselmis.

De ésta especie, se han realizado diversos estudios, entre los que se pueden mencionar: morfológicos (Manton y Parke, 1965; Manton et al., 1973; Christensen, 1967; Parke y Dixon, 1976), fisiológicos (Madux y Jones, 1964; North y Stephens, 1967, 1971; Kinne, 1976, 1977; Ukeles, 1970) y de su composición bioquímica (Parson et al., 1961; Corner y Cowey, 1968; Gatesoupe y Luquet, 1981; Fogg, 1975). Sin embargo, acerca de éste género el cuadro fisiológico básico, no se había completado aun (Aguirre-Muñoz, 1981), sabiendose ya que Tetraselmis

auricula crece bien a una intensidad luminosa de 1000 a 2000 lux, con temperatura de 18 a 22°C, a pH de 7.5 a 8 y salinidad de 25 a 30 ‰, lo cual permite que sea una especie de considerable potencial de cultivo a gran escala (De la Cruz y Alfonso, 1975).

Existen básicamente dos maneras de efectuar una producción de microalgas: cultivo discontinuo (estático) y cultivo continuo (semicontinuo y continuo), la desventaja del primero con respecto a los segundos, es estudiada por diversos autores (Herbert et al., 1956; Fencel, 1966; Ukeles, 1975, 1976; Droop, 1975; Fogg, 1975), aunque su ventaja estriba principalmente en la sencillez metodológica, lo cual es adecuado para experimentos en bioensayos.

El sistema de cultivo discontinuo o estático, parte de inocular las células en un recipiente conteniendo como medio de cultivo, agua de mar enriquecida, permitiendo tan solo su crecimiento por un tiempo de vida limitado, pasando a través de una sucesión de fases que van desde el tiempo del inóculo hasta la muerte del cultivo (Droop, 1969; Kubitschek, 1970), siguiendo ciertas fases habituales, como se muestra en la figura 1. Por esto, la razón de crecimiento y su productividad son dependientes de la edad del cultivo, y mientras el cultivo se hace viejo, puede ser más riesgosa su utilización como alimento

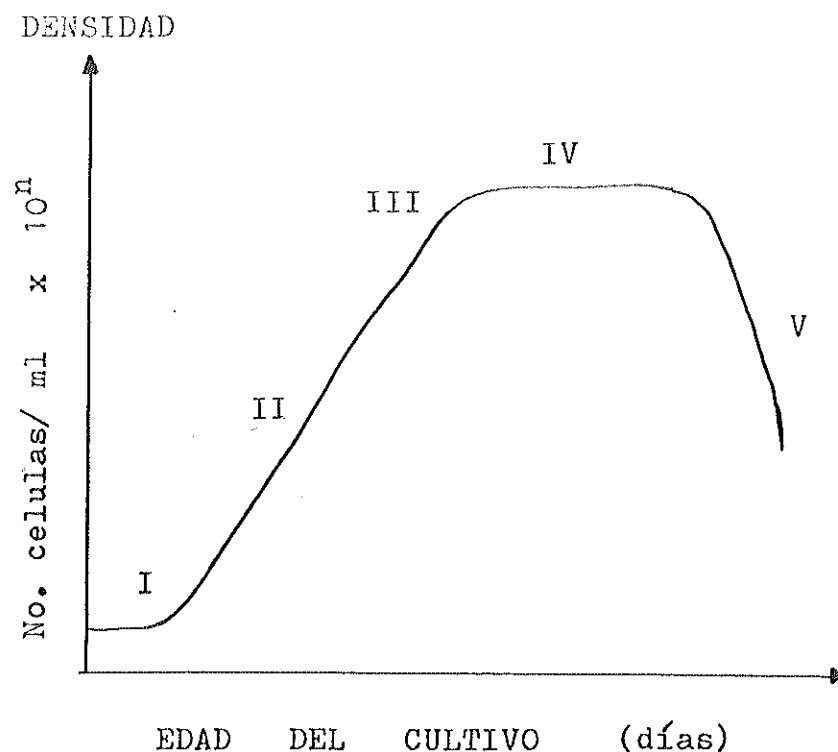


FIGURA 1 .- CURVA DE CRECIMIENTO IDEAL DE MICROALGAS NO SINCRONIZADAS, EN UN MEDIO DE CULTIVO CON VOLUMEN LIMITADO, CON FASES:

I.- Latencia II.- Crecimiento
 III.-Declinamiento IV.-Estacionaria
 V.- Muerte.

de otros organismos, debido a la acumulación de metabolitos y exudados de las propias microalgas, o por acción bacteriana (Palmer *et al.*, 1975; Wilson, 1979). Aunque la presencia de estas últimas, ocasionalmente es favorable en el cultivo (De la Cruz y Alfonso, 1975).

La densidad de microalgas en el cultivo puede ser estimada por conteo directo al microscopio, medición de la densidad óptica, peso seco, volumen, contenido de clorofilas o carbón celular total (Paniagua *et al.*, 1986).

Es claro que para poder cultivar y establecer altas densidades de microalgas en cualquier sistema de cultivo, es necesario proveerles los factores físicos y químicos requeridos en sus niveles óptimos. Estos factores incluyen iluminación, control de temperatura, de aire, características del recipiente de cultivo y aporte de vitaminas, así como de macro y micronutrientes (Guillard, 1973; Ukeles, 1965, 1976; Trotta, 1981; Riley y Roth, 1971; Kroes, 1972; Droop, 1962, 1966; Carlucci, 1974; Carlucci y Bowes, 1970).

Sin embargo, aun en concentraciones adecuadas de nutrientes e irradiancia, excesivas cantidades de metales traza limitarían el crecimiento del fitoplancton (Droop, 1961; Provasoli, 1963; Johnston, 1964).

Acevedo-Chávez (1988), menciona que de todas las enzimas hasta hoy estudiadas aproximadamente un tercio de

ellas requieren de iones metálicos como participantes esenciales en su actividad catalítica óptima, relacionándose a nivel celular principalmente con la actividad biológica enzimática o con otras proteínas, por lo que el hecho de que ellos sean requeridos por los seres vivos en concentraciones muy bajas, no disminuye en absoluto su enorme importancia.

De igual manera, según Anderson et al. (1978), los metales traza con frecuencia actúan como inhibidores o activadores enzimáticos siendo su efecto principal sobre la velocidad de crecimiento y no sobre la producción total.

Diversos experimentos citados por Houghes (1981), Forstner y Wittman (1983) y Acevedo-Chávez (1988), sobre la inducción de cambios en niveles de concentración de elementos traza en sistemas biológicos, revelan patrones de respuesta a la dosis de un metal esencial (Fig. 2), de la manera siguiente:

I.- Bajo una deficiencia absoluta del elemento esencial puede sobrevenir la muerte.

II.- Bajo un suministro limitado, el organismo sobrevive pero puede mostrar insuficiencia marginal.

III.- Bajo un incremento subsecuente de la concentración del elemento, se establece una meseta que representa un funcionamiento óptimo.

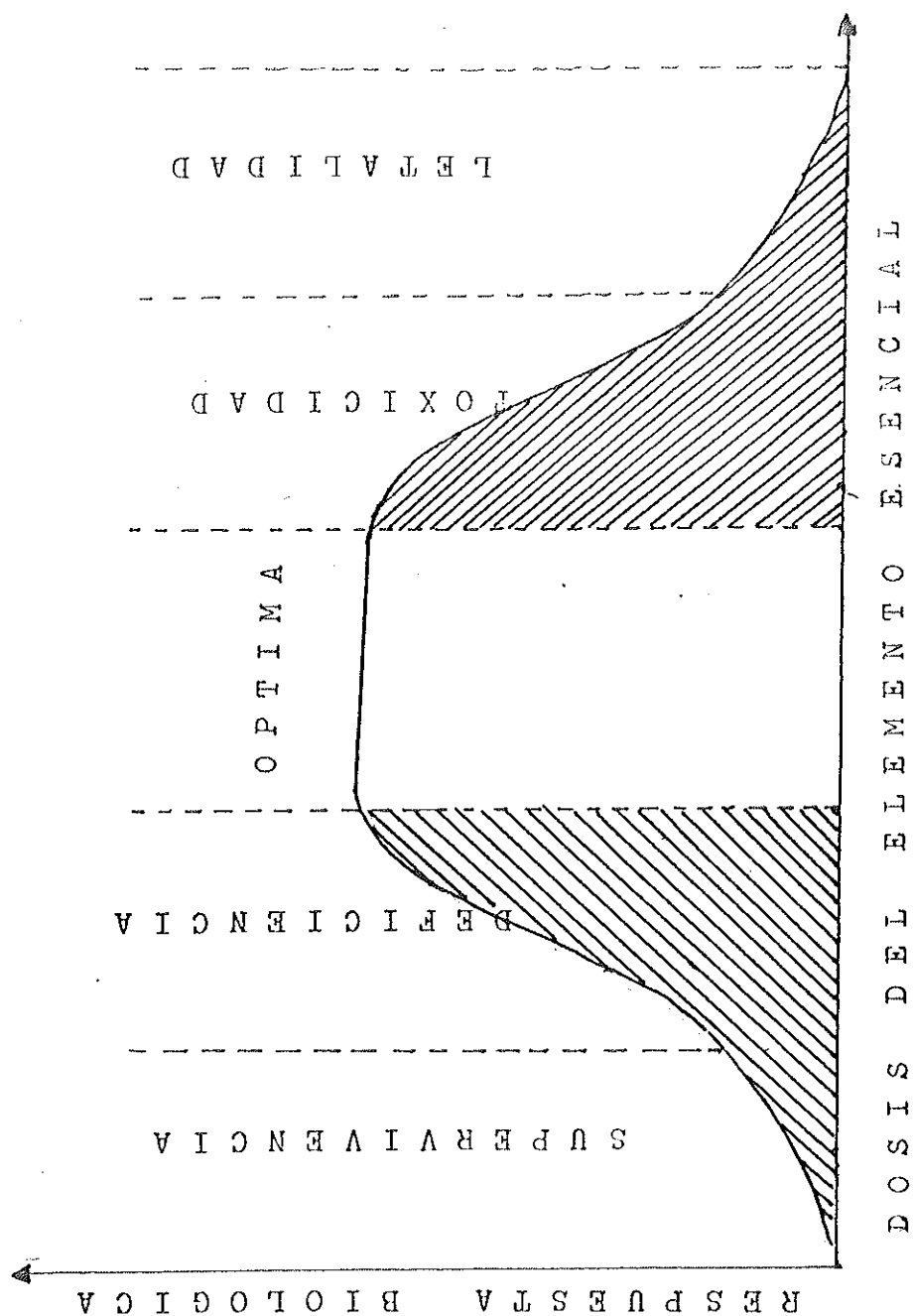


FIGURA 2 .- PATRONES DE RESPUESTA BIOLOGICA A LA DOSIS DE UN ELEMENTO ESENCIAL

IV.- A medida que el elemento esencial es proporcionado en exceso, se establece una toxicidad marginal y

V.- posteriormente una toxicidad letal.

Los iones metálicos de transición como el Cu^{++} , Fe^{+++} y Mo^{++} , actúan como transportadores de electrones y no se consideran como activadores propiamente, dado que forman parte del grupo prostético, mientras que el Mn^{++} y el Zn^{++} actúan como electrofílicos en la catálisis al atraer ciertos grupos de sustratos dando complejos por quelación (Laguna, 1972; Stryer, 1979).

Diversos metales traza esenciales para los sistemas biológicos presentan interacciones complejas en el organismo, tales como efectos de antagonismo y de sinergismo (Fig. 3), donde la absorción de Zn^{++} se ve impedida por el Fe^{+++} , a su vez la concentración elevada de Zn^{++} induce una deficiencia relativa del Cu^{++} ; el Mo^{++} y el S^{--} también antagonizan con el Cu^{++} , el cual es esencial para el metabolismo adecuado para la incorporación del Fe^{+++} (Hughes, 1981).

Diversos iones metálicos desempeñan varias funciones biológicas (Tabla I), entre las que se encuentran el ser integrantes de porciones moleculares complejas que le confieren determinadas actividades biológicas como cofactores: metaloproteínas, metaloenzimas, vitaminas y

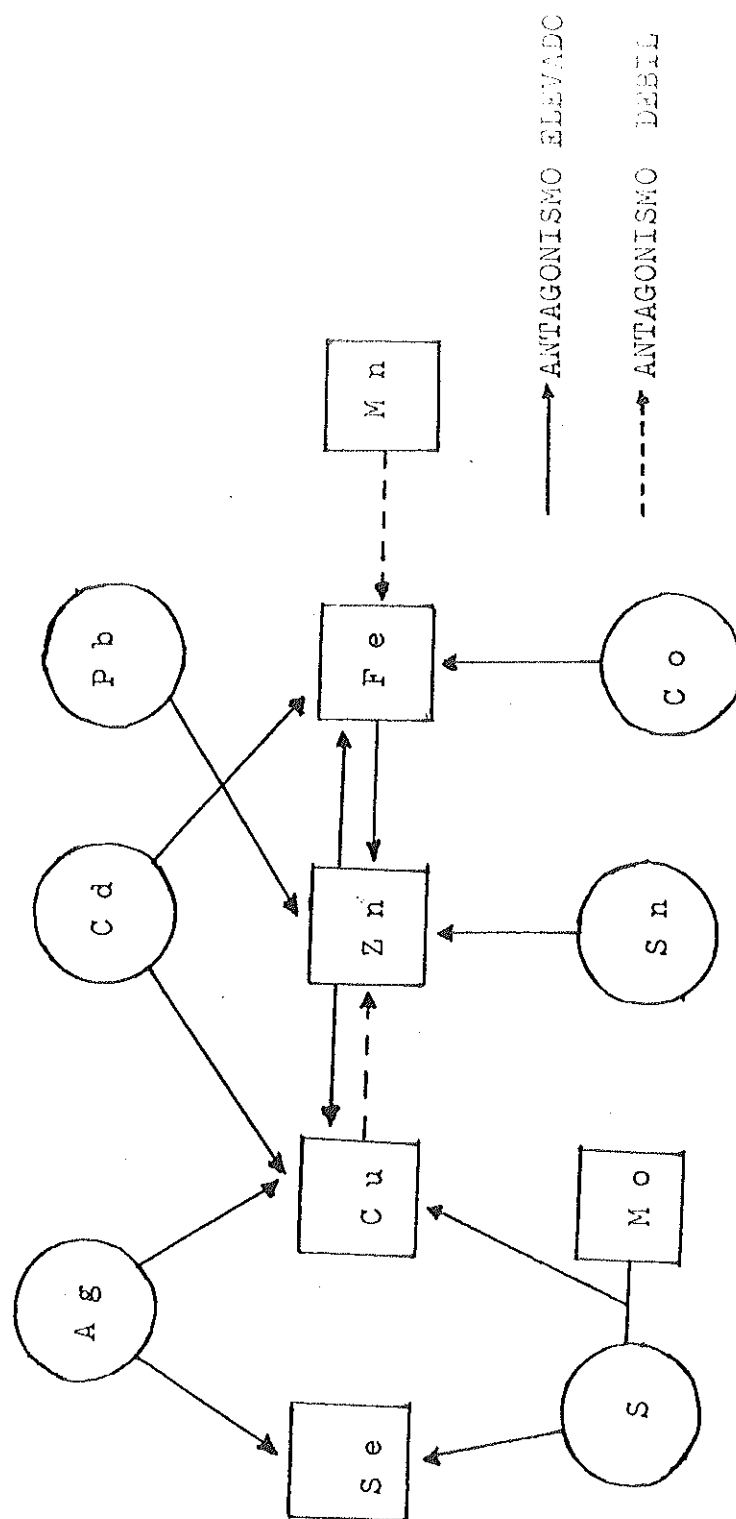


FIGURA 3. - ANTAGONISMO EN LA BIODISPONIBILIDAD DE ALGUNOS METALES.

TABLA I .- EJEMPLOS DE PARTICIPACION BIOLOGICA
DE ALGUNOS METALES PESADOS.

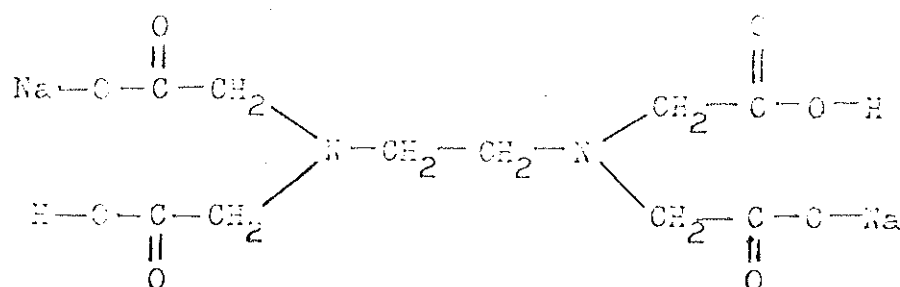
ELEMENTO	SIMBOLO	PARTICIPACION EN SISTEMAS BIOLOGICOS
Cobalto	Co	Componente de coenzimas (cobalaminas), vitaminas, indispensable en reacciones enzimáticas y síntesis de DNA.
Cobre	Cu	Componente de metaloproteínas y metalo enzimas, sinérgico del Fe al facilitar su incorporación.
Fierro	Fe	Constituyente de proteínas, participa en procesos de transferencia de electrones, oxidación aeróbica de carbohidratos y en la fijación de nitrógeno.
Manganeso	Mn	Activador de enzimas, ADN, ARN polimerasas, anhidrasa carbónica, fotosíntesis, transferencia de fosfatos, intercambiable por Mg en sistemas biológicos.
Molibdeno	Mo	Participa en reacciones de transferencia de energía, control de absorción del Cu, componente de enzimas diversas nitrogenasa, sulfito oxidasa, xantina oxidasa, utilización de nitratos, metabolismo de Azufre, Carbono y fijación de nitrógeno.
Zinc	Zn	Participa en la biosíntesis e hidrólisis del ADN y otras polimerasas, cofactor y activador enzimático y electrofílico.

pigmentos fotosintéticos y respiratorios (Provasoli, 1959; Prosser y Brown, 1960; Underwood, 1971; Wood, 1974).

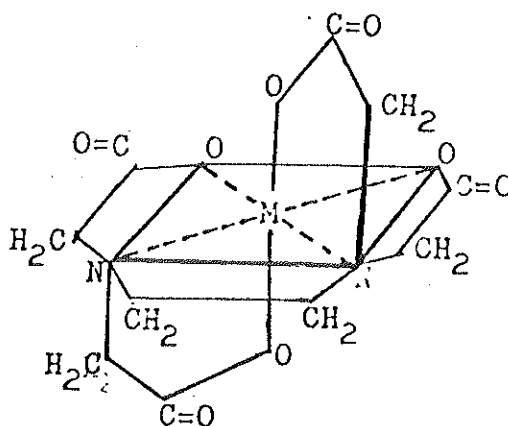
Se ha estudiado suficiente sobre la biodisponibilidad de iones metálicos en el agua de mar por medio de quelación actuando en ambos sentidos, ya que al existir demasiados iones metálicos los captura, y al haber deficiencia los libera (Johnston, 1964; Riley y Roth, 1971; Jackson y Morgan, 1978; Steeman-Nielsen y Nium-Anderson, 1970; Barber, 1973).

La influencia de un quelante en la biodisponibilidad de un metal traza, consiste en la formación de un anillo complejo muy estable entre un componente orgánico y un elemento metálico (Saunders, 1957). Un anillo de quelación es un grupo de átomos unidos cíclicamente por medio de uno o más enlaces covalentes coordinados, donde los átomos que proporcionan los electrones suelen ser Oxígeno, Nitrógeno o Azufre, y el átomo aceptor es el Metal. En un anillo de este tipo, el átomo metálico está atrapado con más firmeza que si estuviera simplemente unido a otros átomos en moléculas independientes (Walton, 1953).

Uno de los mejores agentes quelantes conocidos, es la Sal Disódica del ácido tetracético etilendiamino dihidratada, o ácido etilendiamino tetracetato de sodio ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{-EDTA}$), mostrada su fórmula estructural como sigue:



El EDTA reacciona con la mayoría de los iones metálicos de transición formando quelatos solubles o metales acomplejados, como se muestra en la configuración estérica del complejo, Metal-EDTA:



Los estudios de Smidora (1960), revelaron que los quelantes afectan significativamente el crecimiento y la producción primaria, por estimulación de procesos fisiológicos y bioquímicos asociados con la catálisis respiratoria celular, y la permeabilidad en relación con la incorporación de nutrientes del medio. Por otro lado, Steeman-Nielsen y Wium-Anderson (1970) sugieren que una elevada concentración de Cu⁺⁺, característico de regiones

de surgencia y bajas en quelantes, inhiben el crecimiento del fitoplancton. Provasoli (1963) y Johnston (1964) establecen que la falta de quelante orgánico en el agua de mar es un factor limitante en la productividad del fitoplancton.

Aunque Pratt (1966) encontró que en el agua de mar la identidad química de los quelantes no es muy notoria, Prakash y Rashid (1968, 1969) suponen que son sustancias húmicas, exudados del fitoplancton y metabolitos del zooplancton, resultando por tanto al inicio de una surgencia un lento incremento en la biomasa; también Barber (1973) obtuvo resultados similares con el uso de quelantes artificiales, añadiendo zooplancton molido a un cultivo de Chaetoceros socialis, favoreciendo su crecimiento significativamente. La interacción entre [fitoplancton]-[metales traza]-[quelantes], no es suficientemente clara aun, reportándose resultados poco similares por diversos autores (Barber y Ryther, 1969; Barber, 1973; Galarza-Placencia, 1987).

De igual manera, los resultados obtenidos en otros estudios (Johnston, 1964; Foster y Morris, 1971; Lewis, Ramnarine y Evans, 1971; Azcónate-Capriles, 1981), en el agua de mar, revelan la existencia de quelantes naturales asociados con un incremento en la cantidad de materia orgánica disuelta, lo que indica la existencia intrínseca

de quelantes naturales en el agua de mar. Antiguamente se utilizó el extracto de suelo, como fuente esencial de sustancias húmicas, y reemplazadas posteriormente con la adición de vitaminas, metales traza, quelantes y otros aditivos orgánicos (Provasoli, McLaughlin y Droop, 1957; Sweeney, 1954).

Entre los recursos utilizados, tanto para enriquecer como para hacer medios de cultivo en agua de mar, se encuentran los extractos de tierra de jardín, de macrofitas terrestres y marinas, biodigeridos de estiércol y macroalgas (Paniagua-Michel y Granados-Machuca, 1981; Pillay, 1967; Río et al., 1975), además de aguas de desecho tratadas y harina de pescado (Tenore y Dunstan, 1973).

Dado que se ha demostrado una variación significativa en la velocidad de crecimiento del fitoplancton, en cultivos controlados con la adición de quelantes en agua de mar (Barber et al., 1971; Prakash y Rashid, 1968, 1969; Riley y Roth, 1971; Johnston, 1964; Galarza-Placencia, 1987), el presente trabajo pretende en este sentido, hacer una evaluación del efecto de un quelante artificial ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$), al disminuir su concentración en cultivos estáticos de Tetraselmis suecica, a partir de la concentración recomendada por Guillard (1975) para el medio de cultivo "f/2".

2.- MATERIALES Y METODO

El trabajo descrito a continuación fué llevado a cabo como parte práctica del Curso de titulación: "Biología Marina", en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Marinas y el Instituto de Investigaciones Oceanológicas (I.I.O.) de la Universidad Autónoma de Baja California en Ensenada. Para el cultivo, el agua de mar fué obtenida del sistema general de abastecimiento del Laboratorio de Acuicultura del I.I.O., previamente filtrada y desinfectada con luz ultravioleta, así mismo la cepa utilizada en el experimento, también fué proporcionada por el Instituto proveniente de stock en matraz de 125 ml.

El medio de cultivo utilizado fué el "f/2" de Guillard (1975) en cuanto a los metales traza y quelante, los demás componentes fueron con base en el medio de Matthiessen y Toner, 1966 (Tabla II).

Todos los componentes fueron diluidos de acuerdo a la metodología, a excepción de los metales traza, los cuales se prepararon por separado en una solución primaria en 100 ml de agua destilada cada uno (Co, Cu, Mn, Mo y Zn), aparte en 900 ml de agua destilada se disolvieron 4.36 gr de quelante $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, y 3.15 gr de FeCl_3 (considerando esta concentración como el 100%), se añadió 1 ml de solución primaria de cada metal traza preparado a los 900

TABLA II.- SOLUCIONES MADRE DE NUTRIENTES PARA EL MEDIO DE CULTIVO
ENRIQUECIDO COMBINADO DE GUILLARD "f/2" Y DE MATTHIESSEN
Y TONER.

C O N S T I T U Y E N T E S	F O R M U L A	M E D I O S D E C U L T I V O	
		F/2 Guillard gr/100 ml	Matthiessen-Toner gr/1000 ml
A) <u>NUTRIENTES MAYORES.</u> + Nitrato de Sodio granular + Fosfato de Sodio monobasico	Na NO_3 $\text{Na H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$		150 10
B) <u>METALES TRAZA.</u> + Secuestrante o quelante EDTA + Cloruro Ferrico anhidro + Sulfato Cuprico cristalino + Sulfato de Zinc cristalino + Cloruro de Cobalto crist. + Cloruro Manganeso crist. + Molibdato de Sodio crist.	$\text{Na}_2\text{H}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{FeCl}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.36 3.15 0.98 2.20 1.00 18.00 0.63	
C) <u>AMORTIGUADOR - TRIS.</u> + Hidroximetil amino-metano			200
D) <u>VITAMINAS.</u> + Biotina cristalina + Cianocobalamina crist. (B ₁₂) + Tiamina clorhidrica (B ₁)	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{N}_2\text{S}$ $\text{C}_{63}\text{H}_{88}\text{N}_{14}\text{PCo}$ $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ON}_4\text{ClS}$		1 mg 1 mg 200 mg

el de agua destilada, se mantuvo un pH de 2 para evitar precipitación y se aforsó a 1 litro, finalmente de esta solución stock se utilizó 1 ml para enriquecer 1 litro de agua de mar.

Este mismo procedimiento se llevó a cabo para cada tratamiento, donde se varió de manera porcentual el contenido de quelante y de FeCl_3 , como se muestra en la Tabla III.

En cambio, para el nivel de 0 % de quelante, tan solo se redujo en la mitad del precedente la concentración del FeCl_3 , dado que pudiera llegar a ser limitante el Fe^{+++} y encubrir los resultados al estar ausente el secuestrante (De Kock, 1955). Fogg (1975) considera que en ausencia de EDTA, el ión Fe^{+++} es precipitado como fosfatos en un medio alcalino, lo que causa su desaprovechamiento por las microalgas y su consecuente efecto tóxico.

El cultivo de Tetraselmis suecica fué de tipo estático en matraces Erlenmeyer de 125 ml, conteniendo 50 ml de agua de mar enriquecida, corriéndose cada concentración de EDTA por duplicado.

Posteriormente, los matraces con agua de mar enriquecida fueron esterilizados en un autoclave horizontal a 121°C de temperatura y a 15 Psi de presión durante 15 minutos. Una vez concluido el procedimiento de esterilización, se añadieron las vitaminas a temperatura

TABLA III .- COMPOSICION PORCENTUAL DEL CONTENIDO PARA
CADA TRATAMIENTO CON SECUESTANTE Y Fe
EN gr / Lt, PARA LA SOLUCION STOCK DE
METALES TRAZA, REFERIDO AL MEDIO "f/2"
DE GUILLARD (1975).

%	Na ₂ H ₂ - EDTA • 2 H ₂ O	Fe Cl ₃ • 6 H ₂ O
100	4.36	3.15
75	3.27	2.36
50	2.18	1.575
25	1.09	0.788
0	0	0.394

ambiente.

Todos los matraces fueron inoculados inicialmente con cultivo monoaxénico de una cepa de Tetraselmis suecica en estado de crecimiento en fase exponencial agregándose 2 ml de cepa en cada matraz Erlenmeyer de 125 ml, conteniendo 50 ml de medio de cultivo obteniéndose una densidad inicial (D_0) de 6.1667×10^4 células/ml.

Los matraces permanecieron en el laboratorio, bajo condiciones de iluminación constante proporcionada por tubos fluorescentes de luz blanca fría de 40 Watts, a una intensidad de 1500 pies-candela, a 30 cm de las mismas. La temperatura del laboratorio se mantuvo constante ($18^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$), mediante un aparato de aire acondicionado de tipo doméstico.

Diariamente aproximadamente a la misma hora, se extrajeron alícuotas de 1 ml de cada matraz y fijando con 2 gotas de Lugol. El conteo de células se llevó a cabo utilizando un hematocitómetro tipo Neubauer, por el método indicado por Guillard (1973). El experimento finalizó a las 512 horas (9 días) de haberse inoculado los matraces.

Fueron obtenidos diversos parámetros poblacionales del crecimiento del cultivo de Tetraselmis suecica, según diversos autores citados por Paniagua *et al.* (1986) y con base en el programa de computación en FORTRAN llamado PARPOB para el cálculo de parámetros poblacionales, el

cual se encuentra integrado al sistema en la computadora PRIME-400 del C.I.C.R.S.E., en el paquete denominado ACUALG.

La metodología matemática de los parámetros poblacionales, se calculó de la siguiente manera:

A) DIVISIONES POR DIA (K).

Se obtiene el valor del numero de divisiones por día y se calcula de acuerdo a Guillard (1973) y modificado de De la Cruz y Alfonso (1975):

$$K = 3.322 \times [\text{Log } (D2/D1)] / (t2-t1)$$

donde:

3.322 = Factor de conversión del logaritmo
base 10 en base 2.

D1 = Densidad de células al día t1.

D2 = densidad de células al día t2.

B) TASA DE CRECIMIENTO ESPECIFICO (μ).

Señala la velocidad de crecimiento del cultivo, se determina según recomendaciones de Environmental Protection Agency (1971) y modificado de Guillard (1973), de la forma siguiente:

$$\mu = [\text{Log } (D2/D1)] / (t2-t1) = K / 3.322$$

o tambien:

$$\mu = K \times (\text{Log } 2)$$

C) PRODUCCION DIARIA DE MICRALGAS (PD).

Indica el incremento de células logrado en el cultivo

por unidad de tiempo, se determina segun recomendaciones de De la Cruz y Alfonso (1975):

$$PD = (D2-D1) / (t2-t1)$$

D) TIEMPO MEDIO DE GENERACION (TG).

Resulta el tiempo necesario para crecer la población el doble de la cantidad del período precedente, se determina segun recomendaciones de Eppley y Strickland (1968) y modificaciones de De la Cruz y Alfonso (1975) y Fencel (1966):

$$TG = (\text{Log } 2)(t2-t1) / (3.322)[\text{Log } (D2/D1)]$$

o tambien:

$$TG = (\text{Log } 2) / K$$

E) Y en horas resulta:

$$TGH = (TG) (24)$$

F) VARIACION PORCENTUAL DE LA DENSIDAD (VP).

Indica la variación diaria en la densidad del cultivo dada en porcentaje, se determina segun recomendaciones de De la Cruz y Alfonso, 1975:

$$VP = (100)(D2-D1) / (t2-t1) = (100)(PD)/D1$$

Se obtuvieron tambien los parámetros para la fase exponencial de base 2 (similar al sugerido por Guillard, 1973), de la forma siguiente:

$$Dt = Do \cdot 2^{\mu \cdot t}$$

que linealizado resulta:

$$\text{Log}_2 Dt = \text{Log}_2 Do + \mu \cdot t$$

donde:

D_t = Densidad teórica en el día t .

D_0 = Densidad teórica del inóculo

(si $t=0$, entonces $D_t = D_0$).

μ = Constante de Crecimiento Poblacional.

t = Tiempo en días.

Para comparar las densidades celulares entre las réplicas y entre los tratamientos con Na₂-EDTA, se probó si existían diferencias, mediante estadísticas no paramétricas utilizando la prueba de Wilcoxon (1945) para muestras independientes, además del análisis de varianza de una vía no paramétrico o prueba "H" de Kruskal-Wallis (1952) al comparar las densidades celulares entre los tratamientos con Na₂-EDTA, referidos al día de máximo crecimiento, correspondiente a la fase exponencial. Todas las pruebas estadísticas se llevaron a cabo con una $P=0.05$.

3.- RESULTADOS

Las curvas de crecimiento de todos los cultivos efectuados en matraces Erlenmeyer de 125 ml, se comportaron de acuerdo al modelo de crecimiento ideal para microalgas no sincronizadas en cultivo estático (ver Figura 1), siguiendo las fases descritas habitualmente en su desarrollo:

- I.- LATENCIA, del 1 al 2 día.
- II.- CRECIMIENTO, hasta el 6 y 7 días.
- III.- DECLINAMIENTO, en el 6 y 7 días.
- IV.- ESTACIONARIA, 7 y 8 día (no muy clara).
- V.- MUERTE, a partir del 8 día decae bruscamente la densidad de los cultivos.

Las Tablas IV, V, VI, VII y VIII, resumen los valores de densidades y parámetros poblacionales obtenidos durante 512 horas (9 días) en el cultivo de Tetraselmis suecica para cada tratamiento con diferentes concentraciones porcentuales de Na₂-EDTA (100, 75, 50, 25 y 0 %) en el medio de cultivo, respectivamente.

Así mismo, en las figuras 4, 5, 6, 7 y 8, se muestra el crecimiento de T. suecica representado en densidades celulares por mililitro para cada día, durante el período de cultivo en cada concentración porcentual de quelante, respectivamente.

TABLA IV .- DENSIDAD EN Células/ml $\times 10^4$ Y DIVERSOS
PARAMETROS POBLACIONALES PARA EL MEDIO DE
CULTIVO ENRIQUECIDO COMBINADO, CONTENIENDO
100 % DE QUELANTE, REFERIDO AL MEDIO f/2

TIEMPO (días)	DENSIDAD cél/ml $\times 10^4$	K Div/Día	μ	PD cél/ml $\times 10^4$	TG (días)	VP (%)
0	6.167					
1	6.333	0.0385	0.0116	0.1667	7.8239	3
2	24.257	1.9374	0.5832	17.9237	0.1554	283
3	95.417	1.9759	0.5948	71.1597	0.1524	293
4	146.833	0.6219	0.1872	51.4163	0.4841	54
5	211.000	0.5231	0.1575	64.1670	0.5755	44
6	223.417	0.0825	0.0248	12.4167	3.6490	5.6
7	249.167	0.1574	0.0474	25.7500	1.9128	12
8	204.500	-0.2850	-0.0858	-44.6667	-1.0562	-18
9	172.583	-0.2448	-0.0737	-31.9170	-1.2296	-16

TABLA V .- DENSIDAD EN Células/ml $\times 10^4$ Y DIVERSOS
PARAMETROS POBLACIONALES PARA EL MEDIO DE
CULTIVO ENRIQUECIDO COMBINADO, CONTENIENDO
75 % DE QUELANTE, REFERIDO AL MEDIO f/2

TIEMPO (días)	DENSIDAD cél/ml $\times 10^4$	K Div/Día	μ	PD cél/ml $\times 10^4$	TG (días)	VP (%)
0	6.167					
1	8.167	0.4053	0.1220	2.0000	0.7428	32
2	27.123	1.7317	0.5213	18.9563	0.1738	232
3	90.083	1.7318	0.5213	62.9603	0.1738	232
4	162.417	0.8504	0.2560	72.3334	0.3540	80
5	220.417	0.4405	0.1326	58.0000	0.6833	36
6	223.250	0.0184	0.0055	2.8333	16.3363	1
7	222.000	-0.0081	-0.0024	-1.2500	37.1608	-1
8	193.417	-0.1989	-0.0599	-28.5833	-1.5138	-13
9	168.333	-0.2003	-0.0603	-25.0834	-1.5022	-13

TABLA VI .- DENSIDAD EN Células/ml x 10⁴ Y DIVERSOS
PARAMETROS POBLACIONALES PARA EL MEDIO DE
CULTIVO ENRIQUECIDO COMBINADO, CONTENIENDO
50 % DE QUELANTE, REFERIDO AL MEDIO f/2

TIEMPO (días)	DENSIDAD cél/mlx10 ⁴	K Div/Día	μ	PD cél/mlx10 ⁴	TG (días)	VP (%)
0	6.167					
1	7.333	0.2500	0.0753	1.1667	1.2042	19
2	26.751	1.8671	0.5620	19.4177	0.1612	265
3	97.583	1.8671	0.5620	70.8320	0.1612	265
4	155.917	0.6761	0.2035	58.3336	0.4453	60
5	182.083	0.2238	0.0674	26.1667	1.3449	17
6	207.083	0.1856	0.0559	25.0000	1.6218	14
7	226.250	0.1277	0.0384	19.1667	2.3571	9
8	205.583	-0.1382	-0.0416	-20.6670	-2.1782	-9
9	160.500	-0.3572	-0.1075	-45.0830	-0.8429	-22

TABLA VII.- DENSIDAD EN Células/ml x 10⁴ Y DIVERSOS
PARAMETROS POBLACIONALES PARA EL MEDIO DE
CULTIVO ENRIQUECIDO COMBINADO CONTENIENDO
25 % DE QUELANTE, REFERIDO AL MEDIO f/2

TIEMPO (días)	DENSIDAD cél/mlx10 ⁴	K Div/Día	μ	PD cél/mlx10 ⁴	TG (días)	VP (%)
0	6.167					
1	8.583	0.4771	0.1436	2.4166	0.6310	39
2	29.309	1.7718	0.5333	20.7257	0.1699	241
3	100.083	1.7718	0.5334	70.7743	0.1699	241
4	152.083	0.6037	0.1817	52.0000	0.4987	52
5	192.917	0.3431	0.1033	40.8334	0.8773	27
6	204.083	0.0812	0.0244	11.1666	3.7081	-6
7	198.500	-0.0400	-0.0120	-5.5833	-7.5220	-3
8	187.167	-0.0848	-0.0255	-11.3333	-3.5492	-6
9	133.500	-0.4875	-0.1467	-53.6667	-0.6175	-29

TABLA VIII .- DENSIDAD EN Células/ml $\times 10^4$ Y DIVERSOS
PARAMETROS POBLACIONALES PARA EL MEDIO DE
CULTIVO ENRIQUECIDO COMBINADO CONTENIENDO
O % DE QUELANTE, REFERIDO AL MEDIO f/2

TIEMPO (días)	DENSIDAD cél/ml $\times 10^4$	K Div/Día	μ	PD cél/ml $\times 10^4$	TG (días)	VP (%)
0	6.167					
1	8.333	0.4344	0.1308	2.1667	0.6930	35
2	27.751	1.7356	0.5225	19.4177	0.1734	233
3	92.417	1.7357	0.5225	64.6657	0.1734	233
4	132.750	0.5225	0.1573	40.3333	0.5761	44
5	174.667	0.3959	0.1192	41.9167	0.7604	32
6	187.667	0.1055	0.0318	13.2500	2.8536	8
7	203.083	0.1120	0.0337	15.1666	2.6882	8
8	185.167	-0.1333	-0.0401	-17.9166	-2.2591	-9
9	134.083	-0.4657	-0.1402	-51.0833	-0.6464	-28

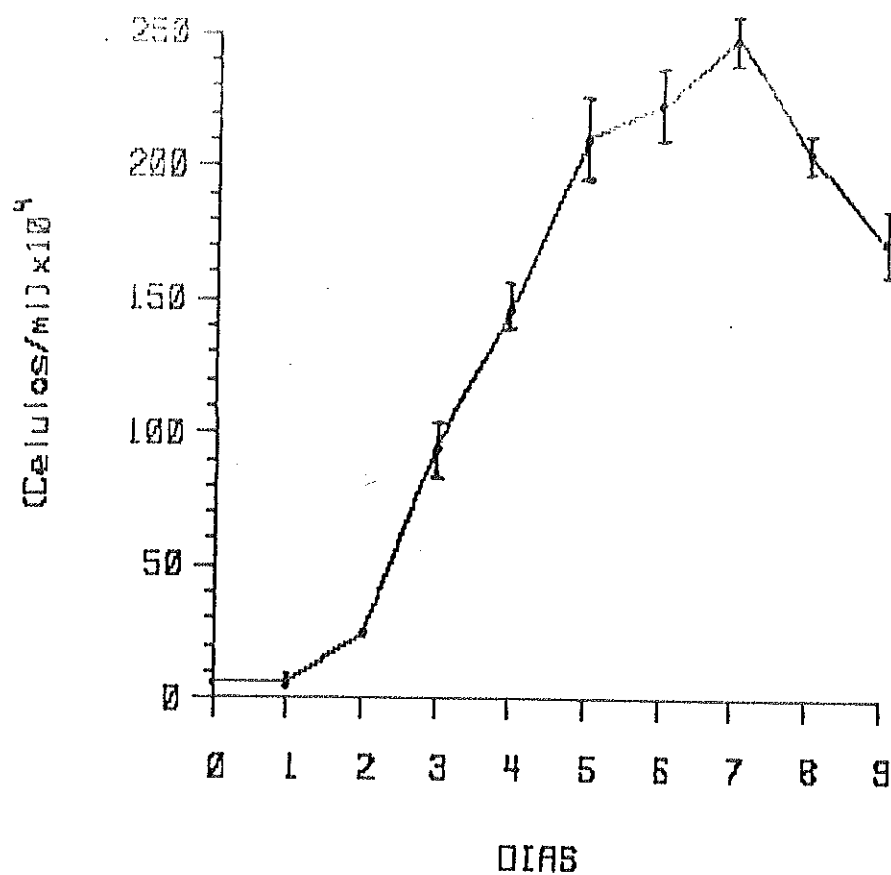


FIGURA 4. - CURVA DE CRECIMIENTO DE *Tetraselmis suecica* EN EL MEDIO DE CULTIVO CON 100 % DE Na₂-EDTA, DURANTE 512 HORAS (9 DIAS) $\alpha=0.05$.

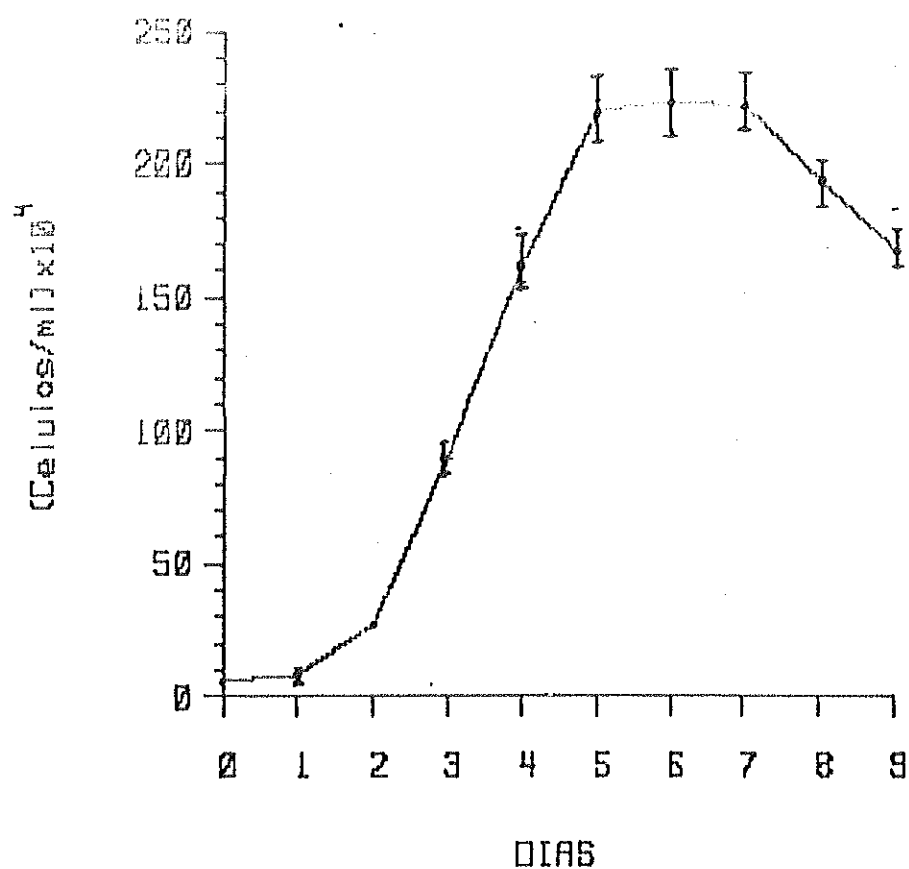


FIGURA 5.- CURVA DE CRECIMIENTO DE Tetraselmis suecica EN EL MEDIO DE CULTIVO CON 75 % DE Na₂-EDTA, DURANTE 512 HORAS (9 DIAS) $\alpha = 0.05$.

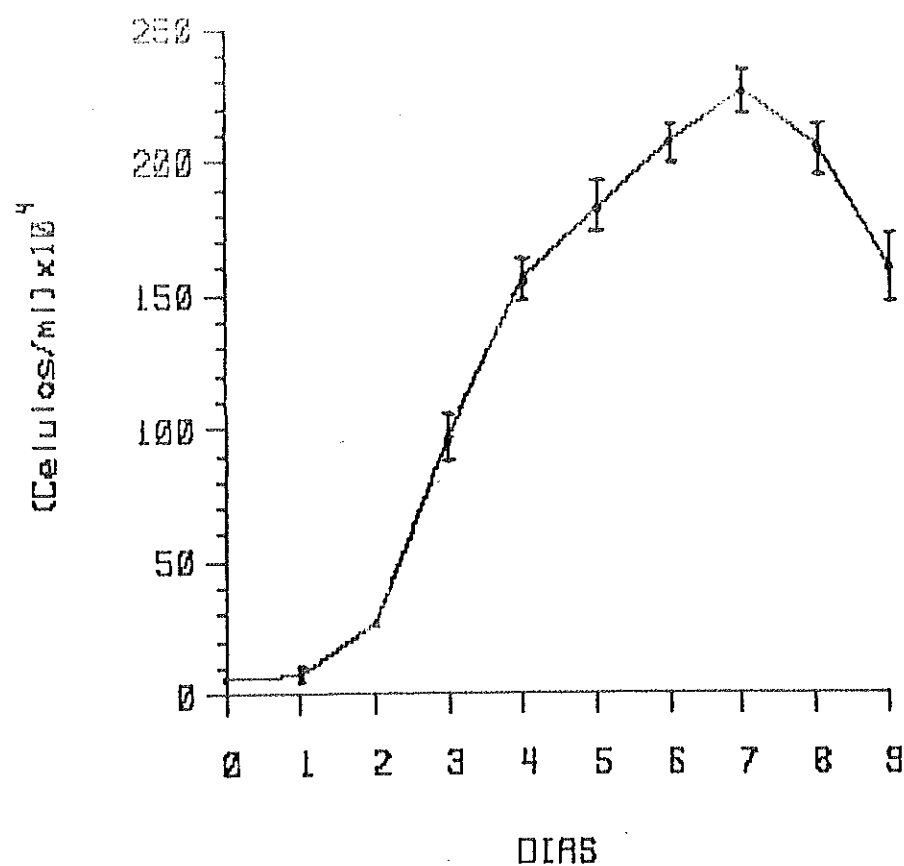


FIGURA 6. - CURVA DE CRECIMIENTO DE Tetraselmis suecica EN EL MEDIO DE CULTIVO CON 50 % DE Na₂-EDTA, DURANTE 512 HORAS (9 DIAS) $\alpha = 0.05$.

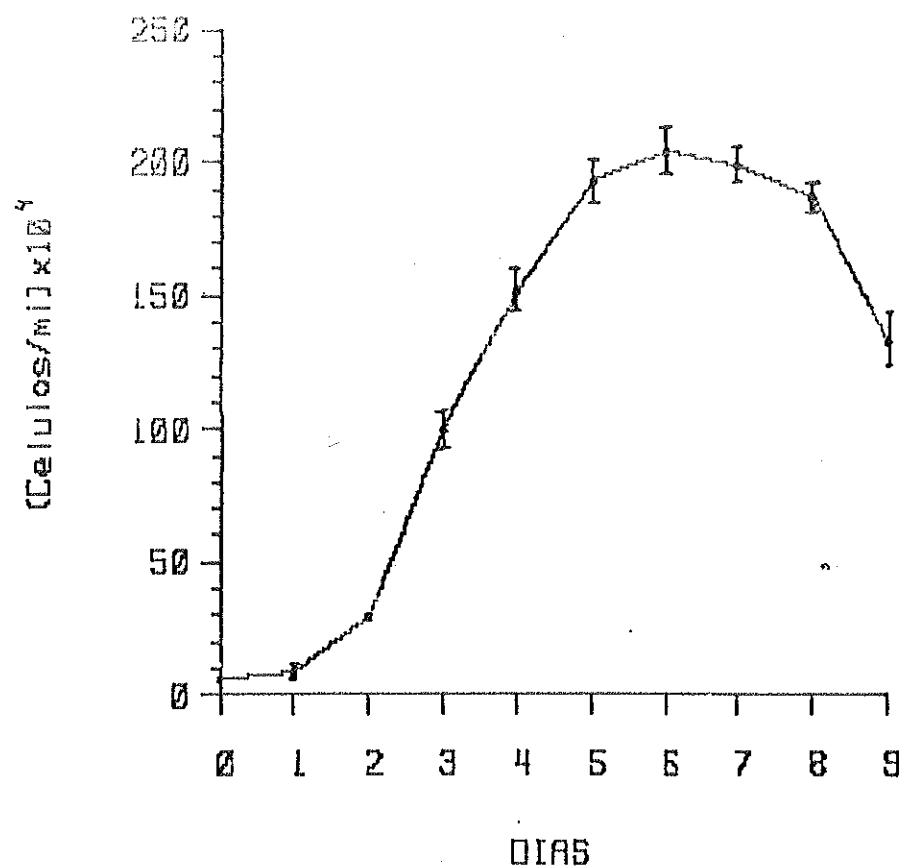


FIGURA 7. - CURVA DE CRECIMIENTO DE Tetraselmis suecica EN EL MEDIO DE CULTIVO CON 25 % DE Na₂-EDTA, DURANTE 512 HORAS (9 DIAS) $\alpha = 0.05$.

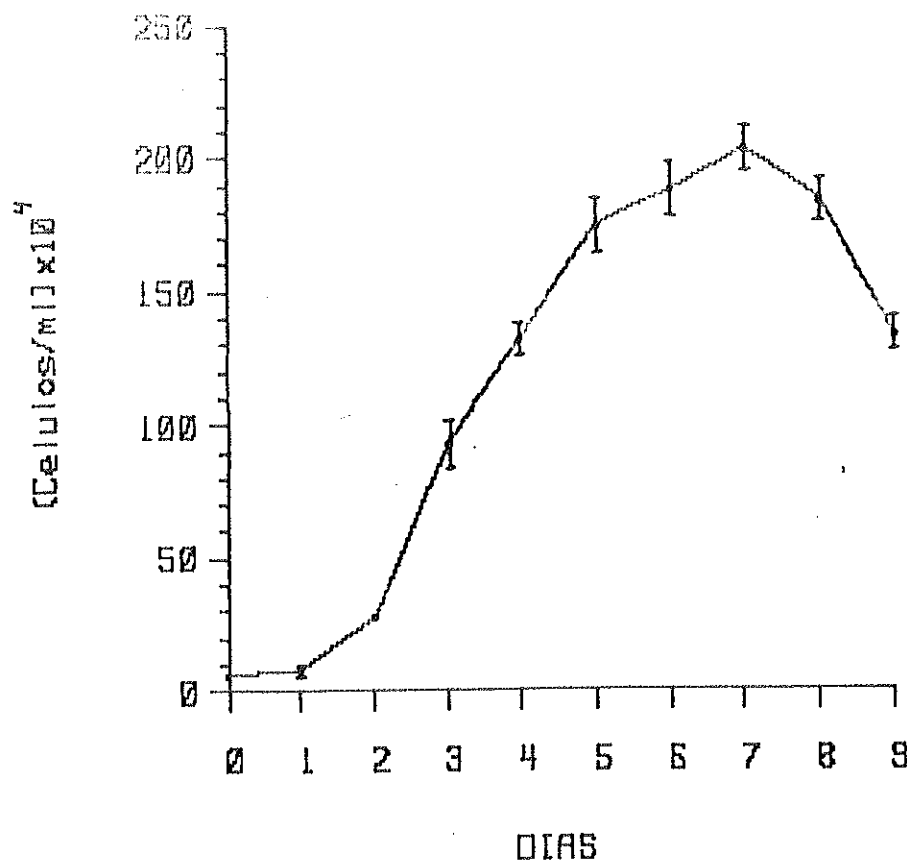


FIGURA 8. - CURVA DE CRECIMIENTO DE Tetraselmis suecica EN EL MEDIO DE CULTIVO CON 0 % DE Na₂-EDTA, DURANTE 512 HORAS (9 DIAS) $\alpha = 0.05$.

El crecimiento de todos los cultivos donde se variaron los tratamientos con secuestrante durante el cultivo, se muestra en la figura 9.

En la Tabla IX, se resumen los valores de los parámetros para la fase exponencial, aplicando el método de mínimos de regresión exponencial de base 2, sugerido por Guillard (1973), de la forma:

$$D_t = D_0 \cdot 2^{kt}$$

donde D_0 es la densidad inicial teórica y k , la constante de crecimiento poblacional.

Los cálculos de los parámetros poblacionales para cada tratamiento, fueron mediante las ecuaciones matemáticas sugeridas por: Guillard, 1973 (K); E.P.A., 1971 y Guillard, 1973 (μ); De la Cruz y Alfonso, 1975 (PD, VP); Eppley y Strickland, 1968 y Fencel 1966 (TG), siendo los siguientes resultados obtenidos:

A) CONCENTRACION CON Na₂-EDTA DE 100 %

La fase de crecimiento se produjo entre los días 3 y 7, con $K=0.6038$; la población se duplicó cada 1.01 días. La máxima PD se obtuvo el día 5 y la concentración máxima alcanzada fue de 249.2 células/ml, con 1.97 div/día.

B) CONCENTRACION CON Na₂-EDTA DE 75 %

La fase de crecimiento se produjo entre los días 3 y 5, con $k=0.5723$; la población se duplicó cada 0.52 días.

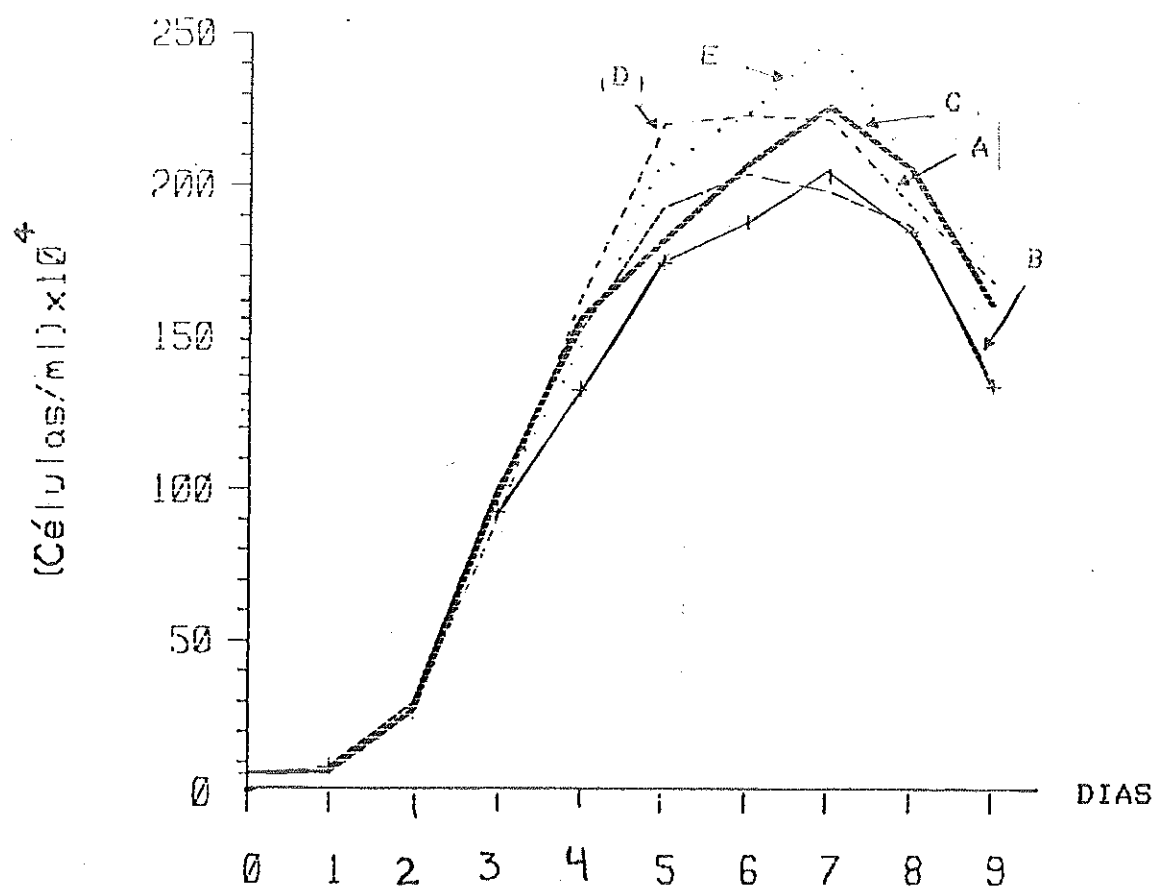


FIGURA 9. - CURVAS DE CRECIMIENTO DE Tetraselmis suecica CON DIFERENTES CONCENTRACIONES PORCENTUALES DE $\text{Na}_2\text{-EDTA}$:
A) 0 %, B) 25 %, C) 50 %, D) 75 %, E) 100 %

TABLA IX .- PARAMETROS POBLACIONALES DE LA FASE
EXPONENCIAL, PARA OBTENER LA DENSIDAD
TEORICA D_t AL DIA t , DE LA FORMA:

$$D_t = D_o \cdot 2^{\mu \cdot t}$$

E.D.T.A. (%)	CONSTANTE DE CRECIMIENTO (μ)	DENSIDAD INICIAL TEORICA (D_o)
100	0.6038	11.349
75	0.5723	12.879
50	0.5749	12.377
25	0.5350	13.856
0	0.5401	13.016

La máxima PD se obtuvo el día 4 y la concentración máxima alcanzada fué de 229.3 células/ml, con 1.73 div/día.

C) CONCENTRACION CON Na₂-EDTA DE 50 %

La fase de crecimiento se produjo entre los días 3 y 7, con $K=0.5749$; la población se duplicó cada 1.2 días. La máxima PD se obtuvo el día 3 y la concentración máxima alcanzada fué de 226.3 células/ml, con 1.86 div/día.

D) CONCENTRACION CON Na₂-EDTA DE 25 %

La fase de crecimiento se produjo entre los días 3 y 6, con $K=0.5350$; la población se duplicó cada 1.3 días. La máxima PD se obtuvo el día 3 y la concentración máxima alcanzada fué de 204.1 células/ml, con 1.77 div/día.

E) CONCENTRACION CON Na₂-EDTA DE 0 %

La fase de crecimiento se produjo entre los días 3 y 7, con $K=0.5401$; la población se duplicó cada 1.4 días. La máxima PD se obtuvo el día 3 y la concentración máxima alcanzada fué de 203.1 células/ml, con 1.73 div/día.

En todos los tratamientos se observó que la VP (Variación Porcentual) se dió el día 3 del cultivo (excepto en el de 75 %, que se dió el 4. día), coincidiendo con los valores máximos de μ , K y PD.

De igual manera, la Tabla X muestran el crecimiento a los 7 días para cada tratamiento, con intervalos de confianza para la media al 95 %.

Se efectuó también el análisis de varianza de una vía

TABLA X. - DENSIDAD DE Tetraselmis suecica EN CULTIVO ESTATICO DEL MEDIO "F/2" A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE Na₂-EDTA, A LOS 7 DIAS DE INOCULACION* LA DENSIDAD INICIAL FUE DE 6.167×10^4 células/ml.

CONCENTRACION DE Na ₂ -E.D.T.A. EN LA ² SOL. STOCK.		PROMEDIO DENSIDAD (células/ml) x 10 ⁴	DESVIACION ESTANDAR (n= 12)	INTERVALO DE CONFIANZA DE $\bar{X}$ (α = 0.05)
%	gr/Lt			
100	4.36	249.17	15.532	(239.3 , 259.0)
75	3.27	222.00	19.131	(209.9 , 234.2)
50	2.18	226.25	13.025	(217.9 , 234.5)
25	1.09	198.50	12.902	(190.3 , 206.7)
0	0.00	203.08	16.138	(192.8 , 213.3)

no paramétrico o prueba "H" de Kruskal-Wallis, para probar si los tratamientos al variar la concentración de EDTA en el medio de cultivo, afecta el crecimiento de Tetraselmis suecica, tomando como referencia para su comparación el nivel máximo de crecimiento registrado en la fase exponencial, el cual se observó el día 7 de la inoculación del cultivo, resultando:

$$H = 7.527 < \chi^2_{0.05, 4} = 9.49$$

Lo cual indica que no existen evidencias estadísticamente significativas para decir que varió el crecimiento de T. suecica por efecto del EDTA el día 7.

Por otro lado, para probar si existían diferencias en el crecimiento entre los cultivos de T. suecica con diversas concentraciones de EDTA, se efectuó la prueba de Wilcoxon (Tabla XI), encontrándose que al nivel de 0.05 de significancia, no hubo evidencias de que existieran diferencias en ninguno de los casos. Lo cual indica que las diferencias observadas en el crecimiento al variar la concentración de quelante no es significativa, aunque se notó un aumento en la densidad del cultivo al incrementar la concentración de secuestrante en el medio, sin embargo esta variación proporcional observado, fué tan solo aparente.

TABLA #1 .- COMPARACIONES DEL CRECIMIENTO ENTRE LOS CULTIVOS DE *Tetraselmis suecica* CON DIFERENTES CONCENTRACIONES PORCENTUALES DE Na₂-EDTA, APLICANDO LA PRUEBA NO PARAMETRICA DE WILCOXON PARA MUESTRAS INDEPENDIENTES AL NIVEL DE SIGNIFICANCIA DE $\alpha = 0.05$

concentración % Na ₂ -EDTA	T calculada T _a - T _u	DECISION (*)
100 Vs. 75	84 - 87	NS
100 Vs. 50	84 - 87	NS
100 Vs. 25	78 - 93	NS
100 Vs. 0	76 - 95	NS
75 Vs. 50	80 - 91	NS
75 Vs. 25	79 - 92	NS
75 Vs. 0	78 - 93	NS
50 Vs. 25	81 - 90	NS
50 Vs. 0	79 - 92	NS
25 Vs. 0	79 - 92	NS

NS = DIFERENCIA NO SIGNIFICATIVA.

S = DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

(*) .- T crítica (T_L - T_u) para n₁=n₂=9 es: 63 - 108

4. - DISCUSION

No hay reportes en la literatura acerca del efecto de una sobrequelación que ejerza efectos inhibitorios para una concentración excesiva de secuestrante. Cleland (1953) no encontró efectos tóxicos del EDTA a concentraciones tan altas como 370 mg/lt, que comparado con el presente trabajo, la máxima fué de 43.6 mg/lt.

En el agua de mar existen diversos componentes orgánicos con capacidad quelante (ver Tabla XII), encontrándose presentes en la materia orgánica disuelta proveniente de la excreción y desintegración de organismos acuáticos. Barber y Ryther (1969) y Prakash y Rashid (1968), reportan un incremento en la tasa de crecimiento del fitoplancton, atribuido al aumento de la materia orgánica disuelta.

El efecto del quelante sobre el fitoplancton puede ser variable, Saunders (1957) estudió sus efectos, dependiendo de las condiciones ambientales presentes:

I. - EFECTOS FAVORABLES

a) En exceso de un metal traza que sea tóxico para un organismo, la quelación puede reducir la concentración del ión metálico por debajo de su nivel de toxicidad.

b) Si un metal tiende a precipitarse y quedar inaccesible para un organismo, la quelación puede mantener

TABLA XII.- COMPONENTES ORGANICOS CON PODERES
QUELANTES, PRESENTES EN EL AGUA
DE MAR.

COMPONENTE ORGANICO	REFERENCIA
Acidos Carboxílicos	Johnston (1964)
Compuestos Fenólicos	Johnston (1964)
Carbohidratos Sulfónicos	Johnston (1964)
Acidos Urónicos	Johnston (1964)
Aminoácidos	Johnston (1964), Jackson y Morgan (1978), Saunders (1957)
Porfirinas	Saunders (1957)
Péptidos	Johnston (1964), Steeman-Nielsen y Wium-Anderson (1970)
Fosfolípidos	Slowey, Jeffrey y Hood (1967)
Carotenoides	Slowey, Jeffrey y Hood (1967)
Nucleótidos	Provasoli (1963)
Acidos Hidroxílicos	Provasoli (1963)

al elemento en estado soluble para ser biodisponible.

II. - EFECTOS DESFAVORABLES

a) La sobre-quelación afecta la biodisponibilidad de un ión metálico, mediante la disminución de su concentración efectiva en el sistema acuoso por debajo del nivel requerido por un organismo.

b) La quelación puede remover un ión metálico que sea antagónico a un metal venenoso, incrementando la concentración del segundo a un nivel tóxico.

De esta manera, la quelación actúa sobre los iones de Co^{++} , Fe^{+++} y Zn^{++} , incrementando su disponibilidad en forma biológicamente activa, además el agua de mar puede ser desintoxicada al capturar el quelante iones de metales tóxicos (como el Cu^{++}), dejándolos en forma inactiva (Sunda y Lewis, 1978; Huntsman y Sunda, 1980)

Por otro lado, los estudios efectuados con ausencia de elementos esenciales (Armstrong, et al, 1966), indican que los compuestos orgánicos, presentes en el agua de mar irradiada por U.V., se desdoblan casi completamente produciendo su biodisponibilidad inmediata en el cultivo. Sin embargo, en el presente trabajo no se encontró la existencia de una inhibición significativa del crecimiento de Tetraselmis suecica, al decrementar, hasta suprimir quelante artificial $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ en el medio de cultivo.

Las tasas de crecimiento (K) máximas alcanzadas en el

cultivo estático de *L. suecica*, fueron de 1.97 div/día para 100% de EDTA y de 1.73 div/día para 0%. Las cuales se comparan favorablemente con datos reportados por otros autores también en cultivos estáticos. Por ejemplo Persoone y Sorgeloos (1975) reportan datos de crecimiento para *L. suecica* de 0.69 div/día, Maddux y Jones (1964) obtuvieron un valor máximo de 0.85 div/día para la misma especie, De la Cruz y Alfonso de 0.71 div/día, aunque de manera más similar con reportes de trabajos en la localidad de estudio, por Aguirre-Muñoz (1981) encontrando 1.92 div/día, y Parés y Leyva (1982) obteniendo 1.14 div/día, para la misma especie.

Dado que la variación de EDTA al deprimir su concentración en el medio de cultivo, no reflejó un efecto significativo en su crecimiento, y aunque hubo una reducción aparente en la densidad de células al disminuir el quelante, no se considera que los metales traza hayan sido tóxicos aun a nulas concentraciones de quelantes, debido principalmente a que no se encuentran en concentraciones excesivas en el medio, además de la utilización de agua de mar natural, considerando que ésta pudiera contener quelantes naturales suficientes.

Para lograr detectar con mayor precisión los niveles de concentración óptima de EDTA, así como los niveles para los cuales el crecimiento se inhibe, es conveniente llevar

a cabo bioensayos utilizando más variedad de concentración de quelante por arriba y abajo del recomendado para el medio "f/2", y sobre todo utilizando agua de mar sintética en el ensayo, dado que el agua de mar pudiera llegar a poseer quelatos naturales.

5. - CONCLUSIONES

Para la elaboración del medio de cultivo enriquecido "f/2" para letraselmis suecica, bajo las condiciones ensayadas, no se estimaron diferencias significativas en el crecimiento al variar la concentración de Na₂-EDTA, para esta localidad, por lo que fué considerada innecesaria la utilización de quelante artificial, dado que al disponer de agua de mar filtrada e irradiada con luz ultravioleta, pudieran ser aportados quelatos naturales suficientes.

6.- RECOMENDACIONES

Considerando los resultados obtenidos en el experimento realizado, donde la microalga Tetraselmis suecica presentó un crecimiento favorable con un medio de cultivo preparado hasta con 0.0 g/lit de Na₂-EDTA, lo que pudo ser debido principalmente a que fué utilizada agua de mar filtrada, la cual posee quelatos naturales, además de que el agua de mar fué tratada con luz ultravioleta, lo que facilita la reducción de la materia orgánica disuelta y consecuentemente activa sustancias con potencial quelante capaces de actuar en el medio de cultivo, secuestrando a los metales traza.

Para fines comparativos, es conveniente cultivar a esta microalga bajo similares condiciones físicas y químicas a las que fué sometida, y al inocular el cultivo, sea tomada muy en cuenta la edad de la cepa (Fase) y su proveniencia (Matraz, Carboy, Fernbach o Tanque) para el bioensayo.

Sin embargo, para analizar la acción de los metales pesados en ausencia total de quelantes, se sugiere experimentar, manteniendo simultáneamente cultivos estáticos, con agua de mar natural y con agua de mar sintética y ambos con referencia en cero de concentración, a su vez incrementar la concentración de quelante hasta

niveles que sean considerados desfavorables por sobrequelación para el crecimiento de *L. guineensis*, tomando en cuenta la localidad donde sea utilizada el agua de mar natural.

Se recomienda efectuar otro tipo de bioensayos, que permitan estudiar el potencial quelador del agua de mar, y por otro lado, la incorporación directa de quelatos naturales determinando su posible asimilación por el fitoplancton.

Para efectuar investigaciones más profundas, se sugiere establecer diseños experimentales adecuados para identificar y caracterizar los complejos metálicos formados por la materia orgánica disuelta, dado que estos complejos naturales controlan la biodisponibilidad de los metales en el agua de mar, esto bajo las siguientes líneas de investigación:

a) Conocimiento acerca del equilibrio simultáneo de los ligandos quelantes y de los iones metálicos.

b) Selectividad de los agentes quelantes, para utilizarlos como fuente de micronutrientes.

c) Estimación de peligros potenciales ocasionados por la quelación de metales pesados (no esenciales), por los agentes quelantes adicionados, ya sea en sistemas controlados de cultivos, o en cultivos extensivos susceptibles de efluentes provenientes de sistemas de

tratamiento de aguas residuales.

Finalmente, para efectuar un estudio acerca del papel biológico de los micronutrientes, es recomendable que éstos sean visualizados desde el punto de vista de las moléculas dentro de las cuales los iones metálicos están incorporados.

7 - LITERATURA CITADA

- Acevedo-Chávez, R. 1980. Elementos metálicos de la vida. Información Científica y Tecnológica. CONACYT. México, D.F. Vol. 10(136): 36-40
- Aguirre-Muñoz, A. 1981. Estudios con un cultivo semi-continuo de Tetraselmis suecica Kylin, 1935: Nutrientes, vitaminas, desinfección del medio con U.V. y producción del sistema a largo plazo. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias Marinas (U.A.B.C.). 54 p.
- Anderson, D.M.; F.M.M. Morel and R.R.L. Guillard. 1978. Growth limitation of a coastal diatom by low, zinc ion activity. Nature, Vol. 276:70-71
- Armstrong, F.A.; P.M. Williams and J.D. Strickland. 1966. Photooxidation of organic matter in sea water by ultraviolet radiation, analytical and other applications. Nature 211: 481-487
- Azcárate-Capriles, J.C. 1981. Efecto del EDTA y filtración selectiva del agua de mar. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias Marinas (U.A.B.C.) 45 p.
- Barber, R.T. 1973. Organic ligands and phytoplankton growth in nutrient-rich sea water, p. 321-388. In: Trace metals and metal-organic interactions in natural waters. P. Singer (ed.), Ann Arbor Sci.
- Barber, R.T.; R.C. Dugdale; J.J. MacIsaac and R.L. Smith. 1971. Variations in phytoplankton growth associated with the source and conditioning of upwelling water. Invest. Pesq. 35: 171-193
- Barber, R.T. and J.H. Ryther. 1969. Organic chelators: Factors affecting primary production in the Cromwell Current upwelling. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 3: 191-199
- Brown, E.J. and H.F. Harris. 1978. Kinetic of phosphate uptake by aquatic microorganisms: Deviation from a simple Michaelis-Menten. Limnol. and Oceanogr. 23(1): 26-34
- Butch, R.W. 1959. Introduction and Chlorophyceae. An

Introduction Account of Scallops Algae of British Coastal Waters. Part 1, pp. 1-74. Fishery Investigations Series IV. London

Carlucci, A.F. and P.M. Bowers. 1970. Vitamin production and utilization by phytoplankton in mixed culture. J. Phycol. 6(6): 393-400

Christensen, T. 1967. Two new families and some new names and combinations in Algae Blumea, 15: 91-94

Chu, S.P. 1942. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae. I. Methods and culture media. J. Ecol., 30: 284-325

Cleland, K.W. 1953. Heavy metals, fertilization and cleavage in the eggs of Psammachinus miliaris. Exp. Cell. Res. 4: 246-248

Corner, E.D.S. and C.B. Cowey 1968. Biochemical studies on the production of marine zooplankton. Biol. Rev. 43: 393-426

Curtin, L. 1979. Oyster hatchery pilot scheme. Setting up, operation and future role of hatcheries. Fisheries Management Division. M.A.F. New Zealand. Technical Report No. 155. 16 pp.

Davis, H.C. and R.R.L. Guillard. 1958. Relative value of ten genera of micro-organisms as foods for oyster and U.S. Fish Wildlife Serv., Fishery Bull. 136(58): 293-304

De la Cruz, S.A. y E. Alfonso. 1975. Cultivo masivo de algas planctónicas marinas mediante fertilización. La Habana, Cuba. Ciencias, 8: 1-25

Droop, M.R. 1961. Some chemical considerations in the design of synthetic culture media for marine algae. Botánica Marina 2: 231-246

Droop, M.R. 1962. Organic micronutrients. In: Physiology and Biochemistry of algae (R.A. Lewin, ed.) N.Y. and London, p. 141-159

Droop, M.R. 1966. Vitamin B12 and marine ecology. III. An experiment with a chemostat. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 46: 659-671

Droop, M.R. 1969. Algae, p. 269-313. In: Methods in

- Microbiology (J.N. Norris and D.W. Ribbons, ed.)
Ac. Press, London.
- Droop, M.R. 1975. The chemostat in mariculture. In: G. Perceboone and E. Jaspers (eds.), Proc. 10th European Symposium on Marine Biology. Ostend, Belgium 17-22 September 1975. Vol. 1. Universa Press, Wetteren, pp. 71-93
- Environmental protection Agency. 1971. Algal assay procedure. National research Eutrophication Program / EPA p. 1-82
- Eppley, R.W. and J.H.D. Strickland. 1968. Kinetics of marine plankton growth, p. 23-62. In: Advances in Microbiology of the sea (M.R. Droop and E.J. Ferguson, eds.) Ac. Press, New York. 540 p.
- Fencel, Z. 1966. Theoretical analysis of continuous culture system. In: Theoretical and Methodological Basis of Continuous Culture of Microorganisms (I. Malek and Z. Fencel, eds.) Ac. Press, N.Y. and London p. 69-153
- Fogg, G.E. 1975. Algal Cultures and Phytoplankton Ecology. 2a. Ed. Univ. Wisconsin Press, Milwaukee. 175 p.
- Forstner, U. and G.I.W. Wittman. 1983. Metal Pollution in the Aquatic Environment, 2a. Ed. Springer Verlag, 486 p.
- Foster, P. and A.W. Morris. 1971. The seasonal variation of menai Straits. Deep Sea Res. 18: 231-236
- Galarza-Placencia, J. 1987. Bioensayo para determinar el efecto del E.D.T.A. con el fitoplancton costero de Baja California. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias Marinas (U.A.B.C.) 44 p.
- Gatesoupe, F.J. and P. Luquet. 1981. Practical diet for mass culture of the rotifer Brachionus plicatilis: application to larval rearing of sea bass, Dicentrarchus labrax. Aquaculture, 22: 149-163
- Girin, M. 1977. Some solutions to the problem of producing juvenile marine finfish fry its live food. Szymbark Poland, Sep. 23-28. 12 pp.

- Griffith, G.W., H.A. Murphy, Kenslow and L.A. Ross. 1973. A mass culture for Tetraselmis sp. a promising food for larval crustaceans. Proc. 4th Ann. Workshop Wld. Horticulture Soc. Monterrey, Mexico; pp. 289-294.
- Guillard, R.R.L. 1973. Division rates. In: Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurement (J.R. Stein, ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 289-311.
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, p. 29-60. In: Culture of Marine Invertebrates Animals (M.L. Smith and M.H. Chanley, eds.) Plenum Press, New York. 338 p.
- Helm, M.M. 1977. Mixed algal feeding of Ostrea edulis larvae with Isochrysis galbana and Tetraselmis suecica. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 57: 1019-1029.
- Helm, M.M.; D.L. Holland and R.R. Stephenson. 1973. The effects of supplementary algal feeding on a hatchery breeding stock of Ostrea edulis L. on larval vigour J. Mar. Biol. Ass. U.K., 53: 673-684.
- Houghes, M.N. 1981. The inorganic chemistry of biological processes. 2nd. Ed. John Wiley and Sons Ltd., N.Y. 426 p.
- Huntsman, S.A. and W.G. Sunda. 1980. The role of trace metals in regulating phytoplankton growth. In: Studies in Ecology: Physiological Ecology of phytoplankton. (I. Morris, ed.), University of California, Vol. 7, 625 pp.
- Imai, T. 1967. Mass production of molluscs by means of rearing the larvae in tanks. Venus, 25: 159-167.
- Jackson, G.A. and J.J. Morgan. 1978. Trace metal-chelator interactions and phytoplankton growth in sea water media: Theoretical analysis and comparison with reported observations. Limnol. and Oceanogr. Vol. 23(2): 268-282.
- Jeffrey, S.W. 1979. Cultivating unicellular marine plants (SIRO Fisheries and Oceanographic Report 1977-1979. pp. 23-43).

- Johnston, R. 1963. Sea Water the natural medium of phytoplankton. I. General Features. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 43(2): 427-434
- Johnston, R. 1964. Sea water the natural medium of phytoplankton. II. Trace Metals, Chelation and General Discussion. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 44(1): 87-110
- Kinne, O. 1976. Biological Water treatment: Culture Water Treatment. In: Marine Ecology, Vol. III. Cultivation, Part 1 (O. Kinne, ed.) Wiley, London. pp. 900-934
- Kinne, O. 1977. Bivalvia: Mollusca. Cultivation of animals research cultivation. In: Marine Ecology, Vol. III. Cultivation, Part 2 (O. Kinne, ed.) Wiley, London. pp. 122-134
- Kroes, H.W. 1972. Growth interactions between Chlamydomonas globosa snow and Chlorococcum ellipsoideum deason and bold: The role of extracellular products. Limnol. and Oceanogr. Vol. 17(3): 423-432
- Kruskal, W.H. and Wallis, W.A. 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. J. Amer. Statist. Ass., 47: 583-621
- Kubitscheck, H.E. 1970. Introduction to research with continuous cultures. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J. 195 pp.
- Kylin, H. 1935. Uber Rhodomonas, Platomonas und Prasinoclaides. K. Fisiogr. Sallsk. Lund. Forh., Bd. 5, Nr. 22: 1-13
- Laguna, J. 1972. Bioquímica. 2a. Ed., Edit. Fournier, S.A. México, D.F. 785 p.
- Laing, I. and M.M. Helm. 1981. Factors affecting the semi-continuous production of Tetraselmis suecica Kylin, 1935 Butch in 200 Lt. vessels. Aquaculture 22: 137-148
- Maddux, W.S. and R.F. Jones. 1964. Some interactions of temperature, light intensity and nutrient concentration during the continuous culture of Nitzschia closterium and Tetraselmis sp. Limnol. and Oceanogr. 9: 79-86

- Manton, I.F. and Stephenson. 1973. Further observations on the chemical composition of thecae of Platymonas tetraethale West (Prasinophyceae) by means of the X-Ray microanalyzer electron microscope (EMMA). J. Exp. Bot. 24(78): 223-229
- Manton, I.F. and M. Parke. 1965. Observations on the fine structure of two species of Platymonas with special reference to flagellar scales and the mode of origin of the theca. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 45: 743-754
- Matthiessen, G.C. and R.C. Toner. 1966. Possible methods of improving the shellfish industry of Martha's Vineyard Duke's County, Massachusetts. Marine Research Foundation, Edgartown, Mass., 138 p.
- Nie, Z.; Z. Wang; X. Niu; M. Ji; J. Shen; W. Chen; L. Liu. 1979. Artificial rearing of mussels (Mytilus edulis) larvae on a large scale. Acta Oceanolog. Sin. 1: 138-156
- North, B.B. and G.C. Stephens. 1967. Uptake and assimilation of aminoacids by Platymonas. Biol. Bull. 113: 391-400
- North, B.B. and G.C. Stephens. 1971. Uptake and assimilation of aminoacids by Platymonas, 2: Increased uptake in Nitrogen-deficient cells. Biol. Bull., Woods Hole, 140(2): 242-254
- Palmer, F.E.; K.A. Ballard and F.A. Taub. 1975. A continuous culture apparatus for the mass production of algae. Aquaculture 6: 319-331
- Paniagua-Michel, J. y C. Granados-Machuca. 1981. Obtención de dos medios económicos para el cultivo de fitoplancton bajo condiciones controladas. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias Marinas (U.A.B.C.) 128 p.
- Paniagua-Michel, J.; L.F. Buckle; C. Granados y D.H. Loya. 1986. Manual de Metodologías y Alternativas para el Cultivo de Microalgas. Informe Especial, C.I.C.E.S.E. OC-86-01, 94 p.
- Parés-Sierra, G. y G.A. Leyva. 1982. Cultivo semi-continuo de las microalgas Isochrysis galbana y Tetraselmis suecica, para su uso como alimento de larvas y adultos de Mytilus californianus. Tesis

Profesional. Esc. Sup. de Cs. Marinas (U.A.B.C.)
57 p.

Parson, T.R.; R. Stephens and J.D.H. Strickland. 1961.
On the chemical composition of eleven species of
marine phytoplankton. J. Fish. Res. Bd. Can.
18: 1001-1016

Parke, M. and P.S. Dixon, 1976. Check-list of british
marine algae -second revision. J. Mar. Biol. Ass.
U.K., 48: 763-832

Persoons, G. and P. Sorgeloos. 1975. Technological
improvements for the cultivation of invertebrates as
food for fishes and crustaceans. I. Devices and
Methods. Aquaculture 6: 275-289

Pilay, T.V.R. 1967. Actas del Simposio Mundial de la FAO
sobre piscicultura en estanques de agua templada.
F.A.O. Fish. Rep. (44), Vol. 3: 1-423

Prakash, A. and M.A. Rashid. 1968. Influence of humic
substances on the growth of marine phytoplankton:
dinoflagellates. Limnol. and Oceanogr. Vol.
13(4): 598-606

Prakash, A. and M.A. Rashid. 1969. The influence of
humic substances on coastal phytoplankton
productivity. In: Lagunas Costeras, Un Simposio.
Mem. Simp. Intern. Lagunas Costeras. UNAM-UNESCO,
Nov. 28-30. 1967. México, D.F. p. 431-438

Prieur, D. and J.P. Carval. 1979. Bacteriological and
physico-chemical analysis in a bivalve hatchery:
techniques and preliminary results. Aquaculture 17:
359-374

Prosser, C.L. y F.A. Brown. 1968. Fisiología
Comparada. 2a. Ed., Edit. Interamericana. México,
D.F. 728 p.

Provasoli, L. 1958. Nutrition and ecology of algae,
particulary flagellate protozoans. Ann. Rev.
Microbiol. 12: 279-308

Provasoli, L. 1963. Organic regulation of phytoplankton
fertility. In: The Sea. Vol. 2 New York and
London (M.N. Hill, ed.) p. 165-219

Provasoli, L.; J.J.A. McLaughlin and M.R. Droop. 1957.

The development of artificial media for marine algae.
Arch. Microbiol. 25: 393-423

Riley, J.P. and L. Roth. 1971. The distribution of trace elements in some species of phytoplankton grown in culture. J. Mar. Biol. Ass. U.K. Vol. 51: 63-72

Rfo, E.C.; Y.L. Sasso; B.E. Herrera y O.A. Armijo. 1975. Algunos aspectos de la piscicultura de la Republica Popular de China, de interés para México. Inst. Nac. de Pesca. Prog. Pisc. Exp. México, D.F. Serie Información INP/SI: i 37.

Ryther, J.H. 1971. Photosynthesis and fish production on the sea. In: Readings in Marine Ecology. p. 540-544

Saunders, G.W. 1957. Interrelations of dissolved organic matter and phytoplankton. Botanical Rev. 23(6): 389-410

SEAFDE (Southeast Asian Fisheries Development Center. 1978. Aquaculture Department. Tigbaun, Iloilo, Philippines. Annual Report 1978, 37 pp.

Slowey, J.F.; L.M. Jeffrey and D.W. Hood. 1967. Evidence for organic complexed copper in sea water. Nature 214: 377-378

Steeman-Nielsen, E. and S. Wium-Anderson. 1970. Copper ions as poison in the sea and freshwater. Mar. Biol. 6: 93-97

Stryer, L. 1979. Bioquímica. Ed. Reverté, S.A. México, D.F. 876 p.

Sunda, G.W. and J.A.M. Lewis. 1978. Effect of complexation by natural organic ligands on the toxicity of copper to a unicellular alga, Monochrysis lutheri. Limnol. and Oceanogr. 23(5): 870-876

Sweeney, B.M. 1954. Gymnodinium splendens, a marine dinoflagellate requiring vitamin B12. Am. J. Botany. 41: 821-824

Tenore, K.R. and W.M. Dunstan. 1973. Growth comparisons of cysters, mussels and scalops cultivated on algae grown with artificial medium and treated sewage effluent. Chesapeake Sci. 14(1):

64-66

- Forres-Moya, O. 1981. Algunas propiedades químicas indicadores de eventos de surgencias costeras y de la contracorriente de California en un área cercana a Punta Colonet, Baja California. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias Marinas (U.A.B.C.) 73 p.
- Trotta, P. 1981. A simple and inexpensive system for continuous monoaxenic mass culture of marine microalgae. *Aquaculture* 22: 383-387
- Ukeles, R. 1965. A simple method for the mass culture of marine algae. *Limnol. and Oceanogr.* Vol. 10(3): 492-495
- Ukeles, R. 1973. Continuous culture -a method for the production of *Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurements* (J.R. Stein, ed.). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 233-254
- Underwood, E.J. 1971. Trace elements in human and animal nutrition, 3a. Ed. N.Y. Ac. Press 537 p.
- Walne, P.R. 1970. Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera Ostrea, Crassostrea, Mercenaria and Mytilus. *Fishery Investigations Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.* London. Serie 2, Vol. 26(5): 1-45
- Walton, H.F. 1953. Chelation. *Scientific American.* Vol. 88(6): 68-78
- Wilcoxon, M. 1945. Individual comparison by ranking methods. *Biometric Bull.*, 1: 80-83
- Wilson, J.H. 1978. The food value of Phaeodactylum tricornutum Bohlin to the larvae of Ostrea edulis and Crassostrea gigas Thunberg. *Aquaculture* 13: 313-323
- Wood, J.M. 1974. Biological cycles for toxic elements in the environment. *Science* 183: 1049-1052
- Yanase, R. and T. Imai. 1968. the effect of light intensity and temperature on the growth of several marine algae useful for rearing molluscan larvae. *Tohoku Journal of Agricultural Research.* 19: 75-82