

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

ESCUELA SUPERIOR DE CIENCIAS MARINAS

EFFECTO DEL EDTA Y FILTRACION SELECTIVA DEL AGUA DE MAR EN LA
ECLOSION, TIEMPO DE DESARROLLO Y SUPERVIVENCIA DEL
COPEPODO CALANOIDEO MARINO Acartia tonsa Dana

TESIS

que para obtener el título de OCEANOLOGO presenta
JUAN CARLOS AZCARATE CAPRILES

Ensenada, B. C., Diciembre de 1980.

RESUMEN de la tesis de JUAN CARLOS ÁZCARATE CAPRILES, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de LICENCIATURA en OCEANOLOGIA. Ensenada, Baja California, México. Diciembre de 1981.

EFFECTO DEL EDTA Y FILTRACION SELECTIVA DEL AGUA DE MAR EN LA ECLOSION, TIEMPO DE DESARROLLO Y SUPERVIVENCIA DEL COPEPODO CALANOIDEO MARINO Acartia tonsa Dana

Resumen aprobado: _____

M. C. MARK GREGORY HAMMANN

Director de tesis

Un mil doscientos huevos del copépodo calanoideo marino Acartia tonsa Dana fueron cultivados en laboratorio hasta estado adulto, bajo condiciones experimentales caracterizadas por la matriz resultante de dos tipos de filtraciones del agua de mar utilizada (0.2 μm y 3.0 μm) y tres tratamientos para cada filtración: dos de ellos con concentraciones de 37 mg/l y 100 mg/l del quelante $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ y uno sin $\text{Na}_2\text{-EDTA}$.

de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ se incrementa la eclosión y supervivencia de los estadios de desarrollo de A. tonsa; concentraciones de 100 mg/l de este quelante son menos efectivas, y en la ausencia de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ se reduce la eclosión y supervivencia de los estadios de desarrollo de este copépodo. Por otro lado, la filtración del agua de mar hasta $0.2 \mu\text{m}$ tiene un efecto inhibitorio en la eclosión, tiempo de desarrollo y supervivencia de los estadios nauplius de A. tonsa. Se discute la importancia ecológica.

CONTENIDO

. 1 0*

	<u>Página</u>
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	
a. Materia Orgánica en Partículas y Disuelta	4
b. Divisiones de la Materia Orgánica	5
c. Efectos de la Materia Orgánica Disuelta	6
III. METODOS Y MATERIALES	
a. Muestreo	10
b. Sistema General de Cultivo	10
c. Sistema Experimental	12
IV. RESULTADOS	
a. Eclosión	16
b. Tiempo de Desarrollo	16
c. Supervivencia	19
V. DISCUSION	23
VI. CONCLUSIONES	35
VII. RECOMENDACIONES	36
LITERATURA CITADA	37

LISTA DE FIGURAS

12*

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
1	Fórmula estructural del ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA).	7
2	Configuración estérica del complejo metal-EDTA.	7
3	Diseño del sifón utilizado para drenar el agua de desecho y transferir los copepoditos de <u>Acartia tonsa</u> Dana.	14
4	Porcentaje de eclosión de <u>Acartia tonsa</u> Dana.	17
5	Tiempo de desarrollo de nauplio a adulto de <u>Acartia tonsa</u> Dana.	18
6	Numero total de organismos que alcanzaron los diferentes estadíos de desarrollo de <u>Acartia tonsa</u> Dana.	20
7	Supervivencia de nauplios y copepoditos de <u>Acartia tonsa</u> Dana.	22

LISTA DE TABLAS

<u>Tabla</u>		<u>Página</u>
I	Diseño experimental de los tratamientos	13
II	Promedios y rangos del tiempo de desarrollo de <u>Acartia tonsa</u> Dana bajo los efectos del Na_2 -EDTA y la filtración del agua de mar.	19
III	Valores obtenidos de eclosión y supervivencia de los estadios de desarrollo de <u>Acartia tonsa</u> Dana.	21
IV	Componentes orgánicos con poderes quelantes presentes en agua de mar.	24
V	Concentraciones de algunos metales en solución, presentes en agua de mar.	28
VI	Constantes de estabilidad de los complejos-EDTA de algunos metales.	30

I. INTRODUCCION

El avance en el conocimiento del medio ambiente marino y de los organismos que lo habitan ha sido significativo en las ultimas décadas. Sin embargo, la información disponible en algunas áreas es todavía escasa.

Cleland (1953) describió la influencia del ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA), un agente quelante, sobre la fertilización y segmentación del erizo marino Psamechinus miliaris. Bernhard (1955) encontró un mejoramiento en la calidad del agua para cultivo de larvas del erizo marino Arbacia lixula utilizando una concentración de 37 mg/l. de EDTA. Zarogian et al. (1969) tuvieron éxito en el cultivo de huevos y larvas de la ostra americana Crassostrea virgínica utilizando agua de mar artificial tratada con Chelex-100, una resina formadora de complejos. Lewis y Ramnarine (1969) encontraron un incremento en la supervivencia de los dos primeros estadios nauplius del copépodo calanoideo marino Euchaeta japónica Marukawa utilizando EDTA, solo, o con cobalto y cinc, y Carrillo Barrios-Gómez et al. (1974) encontraron un incremento en la supervivencia del copépodo calanoideo Acartia clausi cultivado bajo condiciones de laboratorio en un medio con 37 mg/l. de EDTA.

Los efectos que tiene la filtración del agua de mar en las funciones vitales de los organismos no han sido considerados como es debido. La mayor parte de los investigadores que requieren del cultivo de zooplancton para llevar a cabo sus experimentos utilizan microfiltraciones con el fin de remover al máximo el material orgánico particulado. Así, Zillioux (1969), Zillioux y Lackie (1970), Carrillo Barrios-Gómez et al. (1974), Allan et al. (1977) y Parrish y Wilson (1978) han utilizado agua de mar filtrada hasta 0.45 μm .

El objetivo de esta tesis es el de probar experimentalmente los efectos del quelante $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ y la filtración selectiva del agua de mar en la supervivencia del copépodo calanoideo marino Acartia tonsa Dana. Este trabajo forma parte del programa de investigación llevado a cabo bajo la asesoría del Dr. Enrique Carrillo Barrios-Gómez en el laboratorio de Ecología del Zooplancton del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por el potencial de calanoideos en el cultivo de peces marinos (Harada, 1970; May, 1970; Houde, 1973). Se eligió esta especie como organismo de experimentación debido a su sensibilidad a la calidad del agua (Moraitou-Apostolopoulou y Verriopoulos, 1979), importancia ecológica (Reeve y Walter, 1977) y su elevada producción en condiciones naturales (Heinle, 1966), así como por su abundancia y distribución espacio temporal en la región de la corriente de California (Esterly, 1916). Por otro lado, los aspectos básicos

de su biología, ecología y fisiología han sido estudiados por Conover (1956) y Heinle (1966; ^o 1969), y las dificultades asociadas con su cultivo han sido resueltas por varios autores, entre ellos, Zillioux y Wilson (1966), Corkett y Urry (1968), Zillioux (1969), Heinle (1970), Zillioux y Lackie (1970) y Azcárate Capriles (sin publicar).

La idea original del estudio de los efectos del EDTA en la supervivencia de A. tonsa provino de la tesis de maestría del Dr. Carrillo Barrios-Gómez, en la cual sugiere un estudio detallado sobre el efecto del EDTA en la supervivencia de copépodos calanoideos.

II. ANTECEDENTES

La materia orgánica puede actuar directa o indirectamente sobre organismos vivientes y afectar las dinámicas de integración dentro de un ecosistema. Las células pueden liberar ciertos metabolitos que influyen a otras células dentro o fuera del organismo. Estos metabolitos son evidentes en forma de hormonas, estimulantes de crecimiento, toxinas, antibióticos, organizadores embriológicos, agentes de quimiosíntesis y algunos otros agentes. Saunders (1957) presentó la interrogante de las dos principales consideraciones del papel que juega la materia orgánica: 1) De dónde proviene la materia orgánica disuelta y cuál es la evidencia de su presencia en cuerpos de agua naturales? y 2) Cuáles pueden ser sus efectos sobre organismos vivientes y cuál es la evidencia de estos efectos?

a. Materia Orgánica en Partículas y Disuelta

En las aguas naturales existe una amplia gama de material en suspensión. Filtrando o sedimentando el agua se obtiene un residuo denominado seston, en el que se reconoce una parte viva, el plancton, y una fracción desprovista de vida, el tripton. Parte del tripton es de naturaleza inorgánica y consiste, por ejemplo, en fragmentos pequeños de minerales de la arcilla, o

partículas finísimas de sílice o de hidróxidos de hierro. La porción orgánica del seston ^o consiste en restos y excreciones de organismos, formando partículas de todos los tamaños, hasta llegar a micelas y moléculas orgánicas verdaderamente en solución. En sentido opuesto opera la aglomeración y compactación de partículas muy finas que se sedimentan a mayor velocidad que el material originario. La gradación insensible dificulta hablar de materia orgánica en general, sin especificar el grado de subdivisión, pues se pasa de la materia finamente dividida, o leptopelo, a la disuelta (Margalef, 1974).

b. Divisiones de la Materia Orgánica

Es muy difícil decir dónde termina la materia orgánica particulada y dónde empieza la disuelta. Igualmente difícil es decidir la situación de la fracción coloidal, que se puede considerar como intermedia. La única definición posible es hablar de materia que pasa a través o es retenida por un filtro de determinadas características, generalmente de poro de fracción de micra (entre 0.2 y 0.5 μm). La fracción que pasa a través del filtro se denomina materia orgánica disuelta, aunque contenga coloides y material fino particulado en adición a las especies verdaderamente disueltas. La fracción retenida por el filtro, materia orgánica particulada, también contendrá partículas menores que el diámetro de poro (Margalef, 1974).

c. Efectos de la Materia Orgánica Disuelta

La materia orgánica disuelta puede afectar a los organismos en cuatro formas básicas: a) puede proveer componentes que se utilicen como fuente de energía o que contengan los elementos básicos esenciales para formar el protoplasma; b) puede proveer factores de crecimiento que son requeridos para estimular el crecimiento de organismos; c) puede encontrarse en forma de sustancias tóxicas, inhibiendo actividades o causando la muerte de algunos organismos acuáticos y d) puede formar complejos orgánicos con metales traza con efectos benéficos o detrimentales, dependiendo de las circunstancias. Esta última es la habilidad para influenciar la disponibilidad de metales traza por quelación, que 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 simplemente un grupo de átomos unidos ciclicamente por medio de uno o más enlaces covalentes coordinados. En este caso, los átomos que proporcionan los electrones suelen ser el oxígeno, el nitrógeno o el azufre; el átomo aceptor, es casi siempre un metal. En un anillo de este tipo, el átomo metálico está atrapado con más firmeza que si estuviese simplemente unido a otros átomos en moléculas independientes (Walton, 1953).

Uno de los mejores agentes quelantes es un producto químico conocido como ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) (Fig. 1).

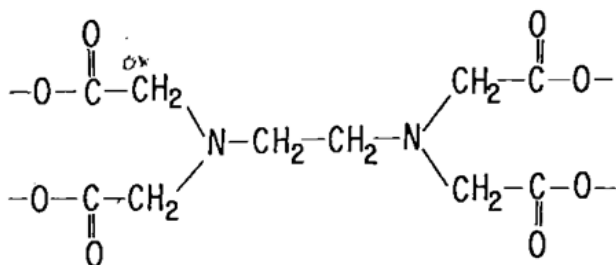


Figura 1. Fórmula estructural del ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA).

El EDTA reacciona con la mayoría de los iones metálicos, formando quelatos solubles y se emplea en el tratamiento de calcificaciones patológicas. El ácido purifica las ropas "contaminadas" por explosiones radiactivas o pruebas nucleares. Los agentes de quelación, en general se utilizan como desincrustantes de calderas, en la clarificación de vinos, y para estabilizar el perfume de los jabones (Devore, 1969).

Los pigmentos de la sangre y la clorofila son quelatos de los metales hierro y magnesio, respectivamente; las hemocianinas, del cobre y cobalto. La figura 2 resume graficamente el fenómeno de quelación.

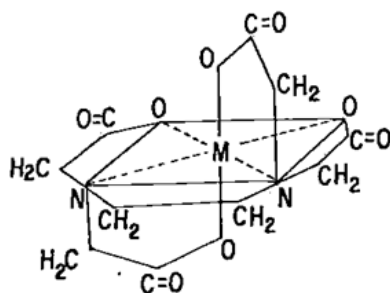


Figura 2. Configuración estérica del complejo metal-EDTA.

Algunos componentes orgánicos que ocurren en el mar pueden

actuar como quelantes (Johnston, 1964; Duursma, 1970; Steemann Nielsen y Wium-Andersen, 1970) y juegan un papel importante en la producción primaria de los océanos (Barber y Ryther, 1969; Steemann Nielsen y Wium-Andersen, 1970; Betz, 1979).

La capacidad de un agua en particular para sostener el crecimiento de un organismo específico es una propiedad que cambia a medida que las poblaciones de organismos crecen y mueren en el agua. Los cambios en la calidad del agua, frecuentemente referidos como "acondicionamiento biológico", se supone que están mediados por cantidades traza de compuestos orgánicos biológicamente activos (Lucas, 1958). La proporción C/N puede dar algunas indicaciones sobre la presencia de sustancias similares a "ácidos húmicos" y "amarillos" (proporción C/N muy alta) en agua de mar. Si asumimos que el plancton tiene una proporción C/N cercana a 6, altos valores podrían indicar la presencia de algunas sustancias de tipo húmico y bajos valores la presencia de proteínas, aminoácidos o aminas. Existe la posibilidad de que muy altos o muy bajos radios C/N puedan coincidir con la capacidad quelante del agua de mar (Provasoli, 1963).

Teóricamente la proporción quelante/metal traza expresada en miliequivalentes tiene un radio molar 1:1, pero en práctica es aproximadamente 2:1, dando lugar a la posibilidad de que los metales traza quelados 1:1 o el exceso de quelante libre de una

mezcla puede ser responsable para el mejoramiento de aguas "malas" para fitoplancton (Mc Lachlan, 1964). Estos resultados se adaptan perfectamente a la situación ecológica: al pH normal del agua de mar (7.5), el hierro, el manganeso y probablemente los demás elementos traza son extremadamente insolubles. El total de hierro en el agua de mar varía entre 1-60 ug átomo/l. Sin embargo, Cooper (1937) calculó que no más de 10^{-8} ug átomo/l de hierro pueden permanecer en solución a un pH de 8.0-8.5. La promoción del crecimiento por quelatos metálicos es debida a su poder de solubilidad al pH del agua de mar, haciendo disponibles los metales traza presentes pero altamente indisponibles (Provasoli, 1963).

Los metales traza son esenciales como cofactores de sistemas enzimáticos y como componentes de otros compuestos metalo-orgánicos significativos biológicamente v.gr., el cinc es un constituyente de la anhidrasa carbónica; el cobalto está presente en la vitamina B12; el cobre reemplaza al hierro en los pigmentos de la sangre de ciertos moluscos y también se encuentra presente en algunos sistemas enzimáticos; el cobre y el manganeso son esenciales para el desarrollo de la clorofila, y el hierro es indispensable para los citocromos y la hemoglobina (Saunders, 1957).

III. METODOS Y MATERIALES

a. Muestreo

Los copépodos usados en este trabajo fueron colectados de poblaciones naturales de Bahía de Todos Santos, Baja California Norte, México, con una red de plancton de 30 cm de diámetro y luz de malla de 0.239 mm. La muestra obtenida fué tamizada inmediatamente con una malla de nylon para remover los organismos más grandes que A. tonsa. Los que pasaron a través de la malla fueron depositados en botellas Termos de 3.8 litros, parcialmente llenas con agua de mar conteniendo 37 mg/l. de EDTA y 6.25 mg/l. de penicilina G, un antibiótico usado unicamente en el período inicial de cultivo (Neunes y Pongolini, 1965).

b. Sistema General de Cultivo

A su llegada al laboratorio, los adultos de A. tonsa fueron separados del resto de la muestra y distribuidos en varios recipientes por un periodo de aproximadamente 48 horas para efectos de aclimatación. Para disminuir la mortalidad, se mantuvo una concentración aproximada de un copépodo por cada 35 ml de agua (Urry, 1965; Corkett y Urry, 1968).

Transcurrido este período, los copépodos sobrevivientes fueron mantenidos en el laboratorio utilizando dos sistemas de cultivo: el primero, durante las primeras generaciones filiales para el establecimiento de la población (Jacobs, 1961; Corkett, 1967; Carrillo Barrios-Gómez, et al., 1974); posteriormente el segundo, de mantenimiento constante bajo condiciones de cultivo masivo utilizando "torres de cultivo" ha sido usado con éxito para el cultivo de A. tonsa por más de dos años y medio (Azcárate Capriles, sin publicar).

La temperatura y la salinidad se mantuvieron constantes a lo largo del experimento; del orden de 18.5 ± 0.5 °C y 27‰ respectivamente. El agua de mar utilizada provino de la Bahía de Todos Santos. Toda el agua fue filtrada a $3 \mu\text{m}$ con cartuchos "Hytrex" antes de ser utilizada en los cultivos.

Como alimento, se utilizaron mezclas de cultivos del crisomónado Isochrysis galbana y del flagelado Tetraselmis sp., en concentraciones de 50,000 células/ml y 25,000 células/ml respectivamente (Azcárate Capriles, sin publicar). La densidad de alimento fué determinada mediante conteos sobre hematocitómetros (Fuchs-Rosenthal), de la manera descrita por Corkett y Urry (1968). El fitoplancton se cultivó en el laboratorio siguiendo procedimientos estandard (Loosanoff y Davis, 1963; Ukeles, 1965) utilizando el medio "f/2" descrito por Guillard (1973). La iluminación de los cultivos de

fitoplancton y copépodos fué constante, a través de 12 lámparas fluorescentes tipo "blanco frío", de 40 watts cada una, colocadas verticalmente y paralelas a las torres de cultivo a una distancia de 10 cm.

Las determinaciones de eclosión, sexo y etapa de desarrollo fueron hechas con la ayuda de un microscopio estereoscópico. La manipulación de copépodos a lo largo de todo su desarrollo ontogenético fué hecha con goteros selectivos con bocas que varían en diámetro de 1 a 3 mm, dependiendo del estado de desarrollo en que se encontraba el organismo (huevos, 1 mm; nauplius, 2 mm; copepoditos y adultos, 3 mm).

c. Sistema Experimental

Las condiciones ambientales y de alimentación durante el experimento fueron similares a las que han sido descritas anteriormente para el sistema general de cultivo en el laboratorio, con la excepción de la filtración y la presencia de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$.

Para determinar los efectos de la filtración se utilizaron dos gradaciones: la primera, con cartuchos de polipropileno "Hytrex" a 3 μm , que contiene material particulado finamente dividido (leptopelo); la segunda, con cartuchos de membrana

"Gelman", hasta $0.2 \mu\text{m}$, para una remoción casi total del material finamente dividido (Fox et al., 1953; Koshy et al., 1969; Sienko y Plane, 1975). Con el fin de diferenciar las características de las dos filtraciones, se definió el concepto de "leptopelo" en función del diámetro de las partículas. Si estas miden de 3.0 hasta $0.2 \mu\text{m}$, el agua filtrada hasta esta última, quedará desprovista de leptopelo. Para cada filtración se prepararon dos medios con diferentes concentraciones de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ y uno desprovisto del quelante (Tabla I).

TRATAMIENTO		CONCENTRACION DE EDTA (mg/l)	FILTRACION DEL AGUA DE MAR (μm)
SERIE 1	A	—	3.0
	B	37.00	
	C	100.00	
SERIE 2	A	—	0.2
	B	37.00	
	C	100.00	

Tabla I. Diseño experimental de los tratamientos.

Se utilizó la forma disódica del quelante, por ser la más ampliamente usada en los medios de cultivo de microalgas, por no ser metabolizada rápidamente por microbios y por su alta solubilidad en agua (Mc Lachlan, 1964).

Machos adultos y hembras en el quinto estadio de copepodito fueron removidos de las torres de cultivo y agrupados en vasos de precipitado de 150 ml a razón de dos machos y una hembra por recipiente para incrementar las probabilidades de fertilización.

Estos recipientes fueron observados una vez cada 12 horas para determinar la implantación de espermatozoides en las hembras. Las hembras con espermatozoides adheridos fueron transferidas a otros vasos de precipitado del mismo volumen, de donde se obtuvieron huevos fecundados para iniciar el experimento.

Los huevos fecundados fueron transferidos de los vasos de precipitado a cajas Petri utilizando un sifón selectivo provisto de una amplia área de succión (Fig. 3). De ahí, fueron separados con pipetas Pasteur y depositados en cajas Petri desechables de 10 ml, con 10 huevos por caja. Cada uno de los seis tratamientos experimentales se hizo con 20 réplicas simultáneas, para un número inicial de 200 huevos por tratamiento.

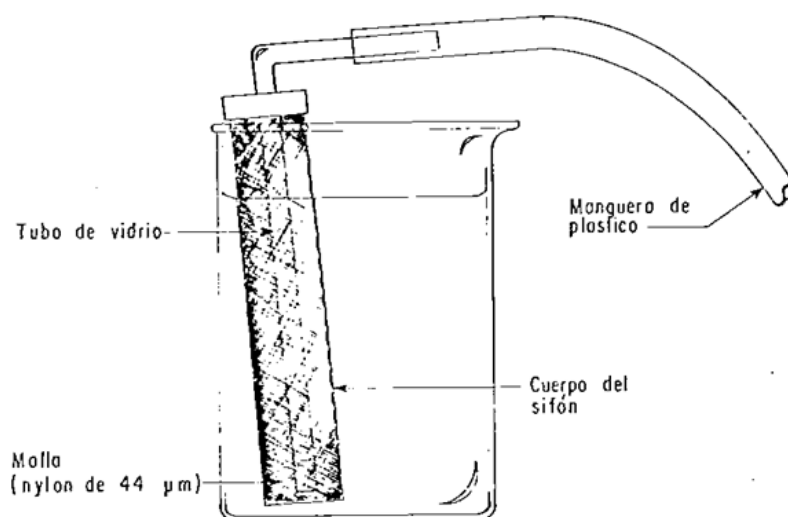


Figura 3. Diseño del sifón utilizado para drenar el agua de desecho y transferir los copepoditos de Acartia tonsa Dana.

Cada caja Petri del experimento fue examinada diariamente

para determinar eclosión, estado de desarrollo y supervivencia. A partir del primer día, los organismos muertos fueron removidos al momento de estas observaciones diarias, y los huevos que no eclosionaron fueron separados al inicio de su degradación. La concentración de alimento utilizada fue mantenida aproximadamente constante, tanto para nauplius como para copepoditos, al momento de reemplazar los medios de cultivo. Cincuenta por ciento del medio de cultivo en cada caja Petri fue reemplazado cada segundo día durante los estadios nauplius. Los copepoditos fueron transferidos a vasos de precipitado de 150 ml con una densidad máxima de 10 copepoditos por recipiente. En estos casos, se reemplazó el volumen total del medio de cultivo cada tercer día, utilizando el sifón selectivo y los goteros correspondientes.

Se concluyó el experimento cuando cincuenta por ciento de la población sobreviviente de A. tonsa para cada tratamiento, alcanzó el estadio adulto.

IV. RESULTADOS

a. Eclosión

La figura 4 (representada por diagramas de Tukey) muestra los resultados del efecto del quelante y el leptopelo en la eclosión de A. tonsa. Los valores más altos se observan en el tratamiento 1B con una mediana del orden de un 100% de eclosión. Los mínimos coinciden con una sobrequelación como lo muestran los tratamientos 1C y 2C. Los tratamientos de la serie 2 muestran una inhibición en la eclosión, con valores tan bajos como 27% (Tratamiento 2C). La eclosión se llevó a cabo en los primeros dos días de cultivo en la mayor parte de los tratamientos.

b. Tiempo de Desarrollo

En la figura 5 y la tabla II se observa que el tiempo de desarrollo se vió más afectado por la falta de leptopelo, como lo muestran los tratamientos de la serie 2. El efecto inhibitorio en el crecimiento es más evidente en el tratamiento 1C que en el 1A. Este último solamente difiere por un día con el tratamiento 1B en el tiempo de desarrollo de nauplii hasta adulto. Cabe mencionar que la mayor diferencia fué en el periodo de copepodito a adulto. En el tratamiento 2A se muestra el caso de un organismo que llegó a durar 25 días en estadio

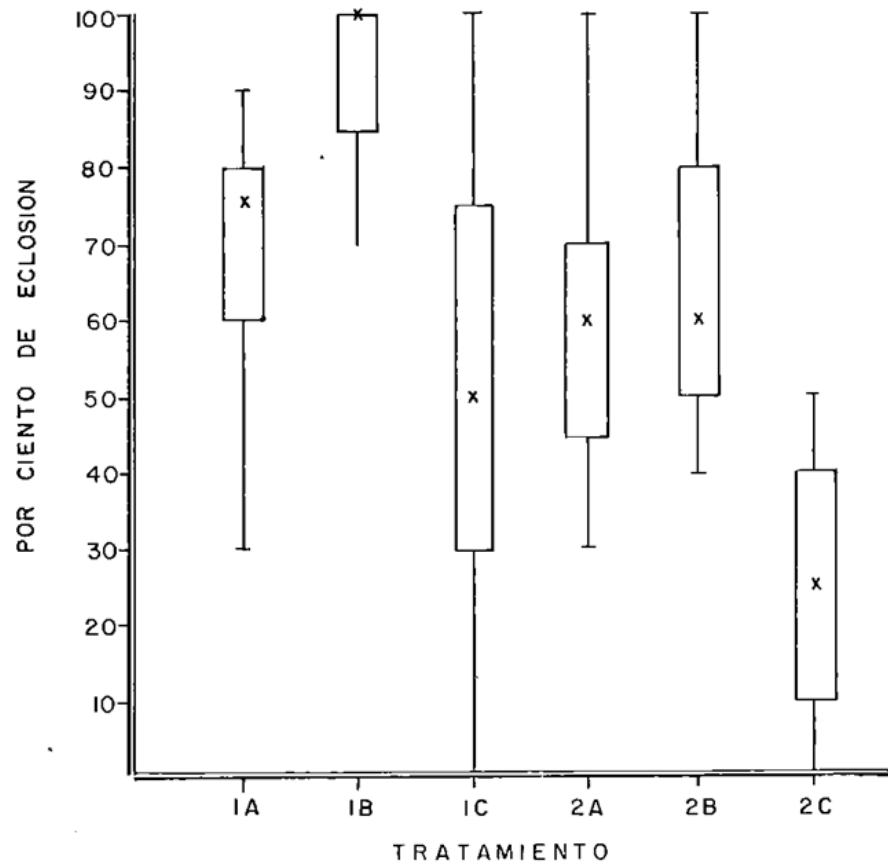


Figura 4. Porcentaje de eclosión de Acartia tonsa Dana (medianas, 95% l.c. y rangos).

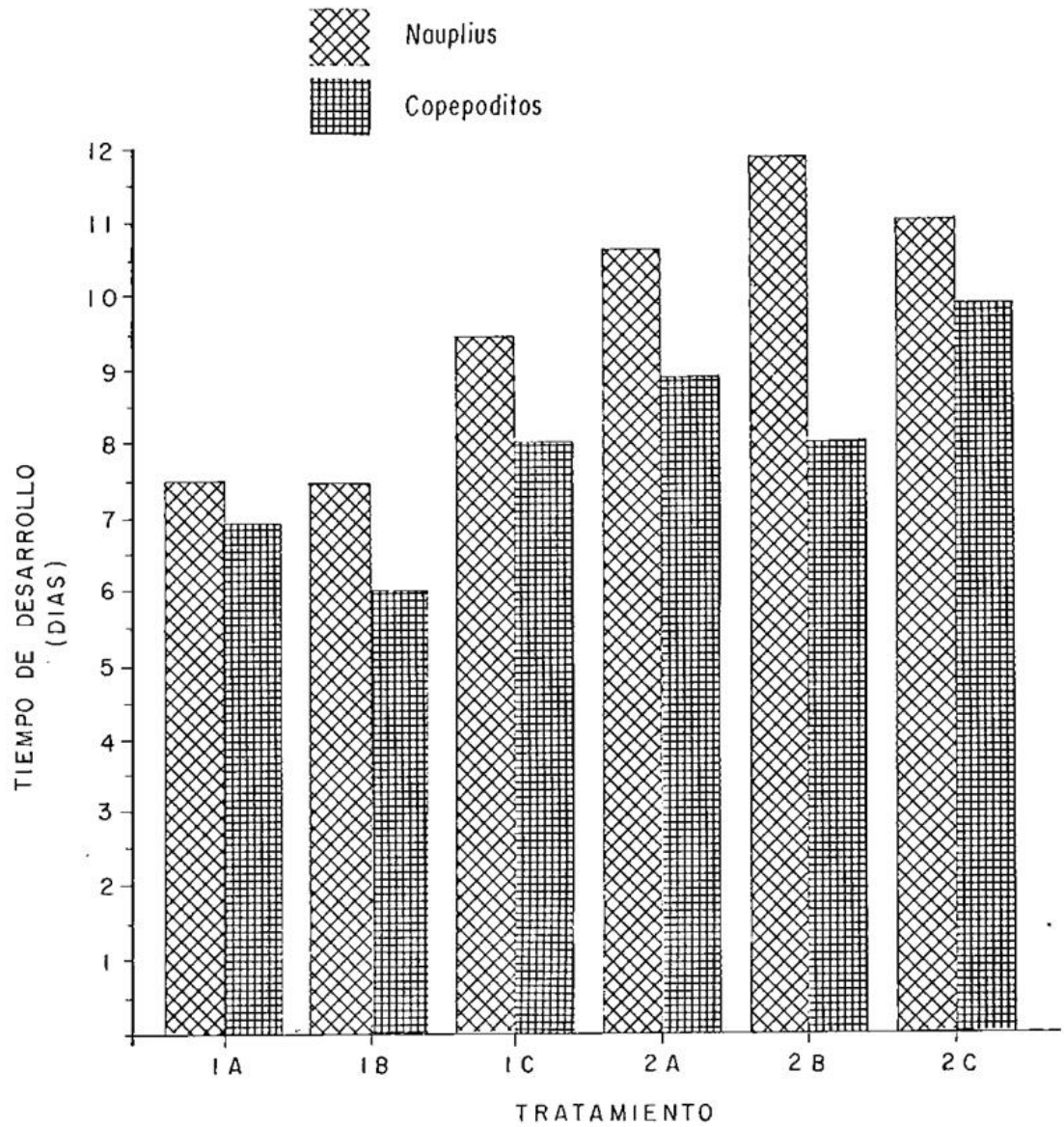


Figura 5. Tiempo de desarrollo de nauplio a adulto de Acartia tonsa Dana.

nauplii sin mudar a copepodito I.

Se puede observar que el tiempo de desarrollo de A. tonsa (Tabla II) se prolongó en los mismos casos, como lo indica la figura 5, el periodo de desarrollo de nauplii a copepodito es del orden de 7.5 días en el tratamiento 1A mientras que la falta de leptopelo (Tratamiento 2A) alargó los estadios naupliares hasta 10.7 días. El tratamiento 1B muestra una pequeña disminución en el tiempo requerido para el estadio nauplii.

TRATAMIENTO	PERIODO DE DESARROLLO (DIAS)					
	N - C	RANGO	C - A	RANGO	N - A	RANGO
1 A	7.5 ± 0.8	7 - 12	6.9 ± 0.6	6 - 9	14.4 ± 0.9	13 - 19
1 B	7.4 ± 0.5	7 - 8	6.0 ± 0.6	6 - 9	13.3 ± 0.7	13 - 16
1 C	9.4 ± 1.3	8 - 16	8.0 ± 1.0	6 - 12	17.5 ± 1.4	14 - 21
2 A	10.7 ± 0.9	8 - 25	8.8 ± 1.1	6 - 12	19.5 ± 1.3	14 - 26
2 B	11.8 ± 1.0	10 - 17	8.0 ± 0.7	6 - 9	19.8 ± 0.8	19 - 21
2 C	11.0 ± 1.1	10 - 13	9.8 ± 1.0	6 - 12	20.8 ± 0.9	19 - 25

Tabla II. Promedios y rangos del tiempo de desarrollo de Acartia tonsa Dana bajo los efectos del EDTA y la filtración del agua de mar. (N = Nauplii; C = Copepodito; A = Adulto).

c. Supervivencia

En los resultados del efecto de las interacciones quelante-leptopelo sobre el tamaño de la población de los diferentes estadios de desarrollo de A. tonsa, nuevamente el tratamiento 1B coincidió con el valor más alto del número de nauplius, copepoditos y adultos (Fig. 6).

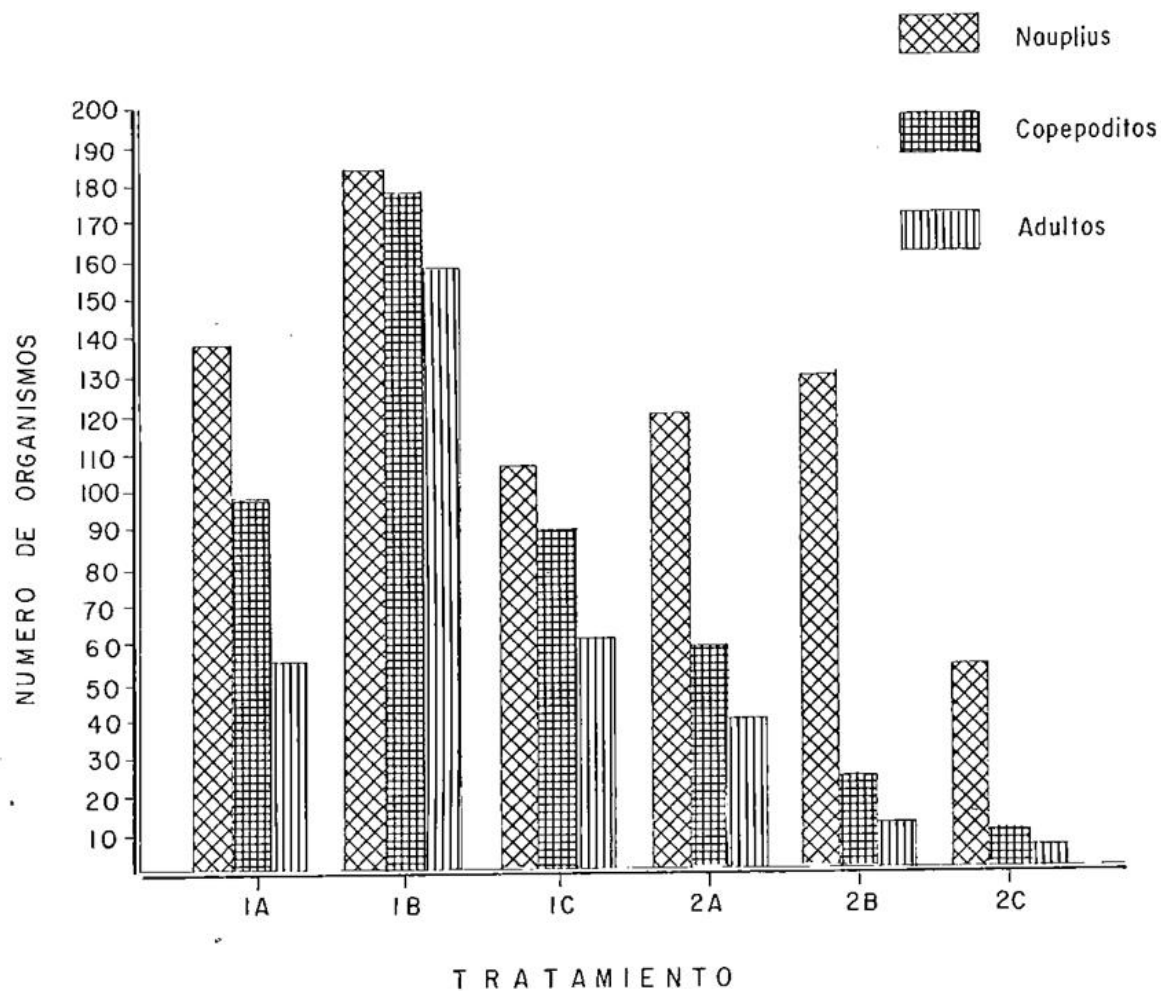


Figura 6. Numero total de organismos que alcanzaron los diferentes estadios de desarrollo de Acartia tonsa Dana.

En la serie 1 (Fig. 7) se muestra que los valores más bajos de supervivencia para ambos estadios corresponden al tratamiento 1A. Nótese que en la serie 1 la supervivencia de nauplius fué mayor que la de copepoditos. Sin embargo, la serie 2 presentó valores sumamente bajos de supervivencia de nauplius, mientras que la supervivencia de copepoditos fué semejante a la de la serie 1 (exceptuando el caso del tratamiento 1B). Se puede observar que desde el inicio el tamaño de la población fué muy reducido, teniendo mortalidades arriba del 80% en los tratamientos 2B y 2C.

En la tabla III se muestran los resultados de la supervivencia de los diferentes periodos de desarrollo para cada uno de los seis tratamientos.

Tratamiento	% Eclosión	% de supervivencia			
		Nauplius	Copepoditos	Nauplii a Estado Adulto	
1	A	60.9 ± 11	71.0 ± 10	56.1 ± 11	39.9 ± 12
	B	92.0 ± 5	96.7 ± 4	88.8 ± 3	85.5 ± 5
	C	52.5 ± 23	84.8 ± 12	67.4 ± 10	57.1 ± 11
2	A	59.5 ± 14	48.7 ± 16	67.2 ± 8	32.8 ± 17
	B	64.5 ± 17	17.8 ± 4	52.2 ± 12	9.3 ± 15
	C	27.0 ± 17	18.5 ± 11	60.0 ± 9	11.1 ± 10

Tabla III. Valores obtenidos de eclosión y supervivencia de los estadios de desarrollo de Acartia tonsa Dana (promedios y desviación estandard).

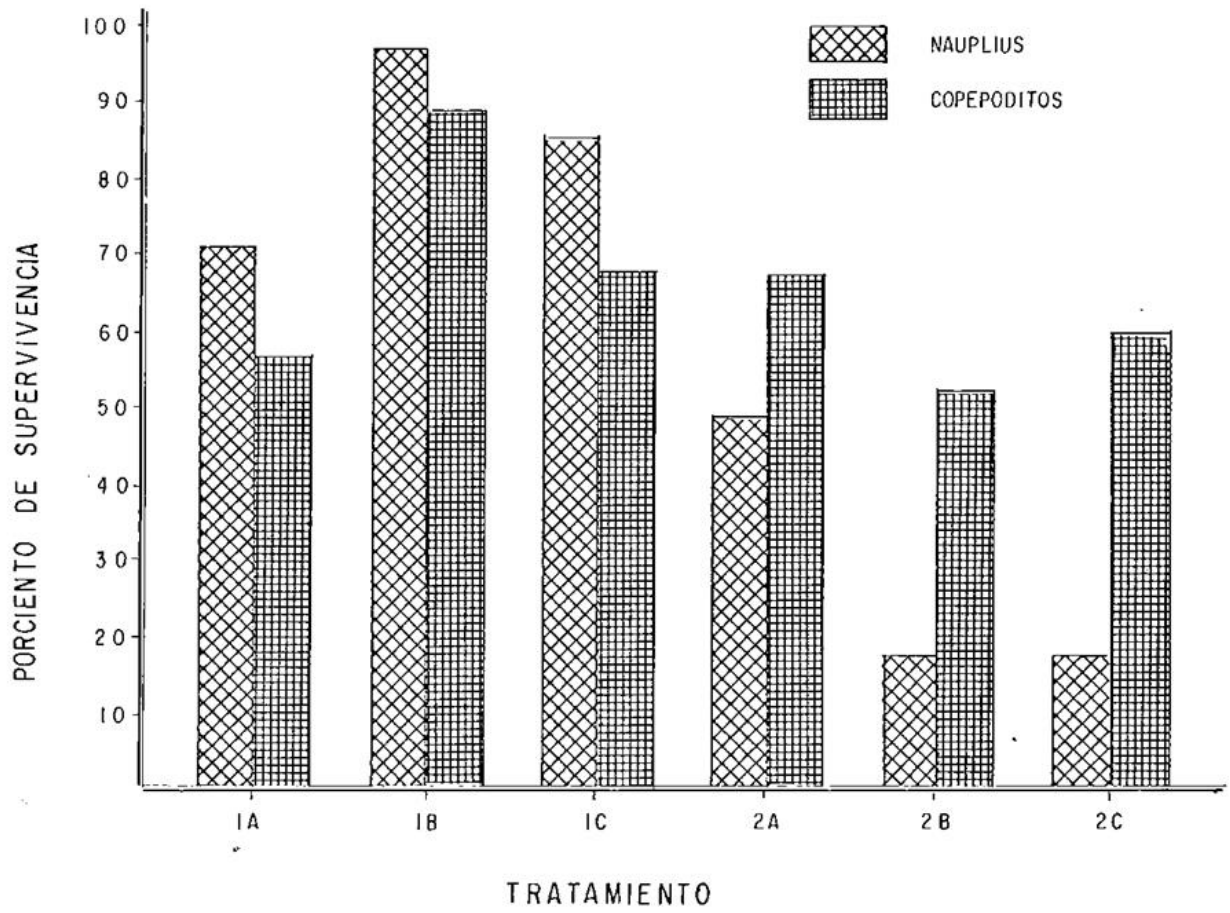


Figura 7. Supervivencia de nauplius y copepoditos de Acartia tonsa Dana.

V. DISCUSION

La diferencia en la eclosión entre el agua de mar con EDTA y sin EDTA asume que esto se debió al efecto del enriquecimiento y la presencia o ausencia de leptopelo. El tratamiento 1B muestra un incremento en la eclosión del 23% con respecto al 1A, indicando esto que ciertas propiedades del EDTA fueron limitantes. Sin embargo, el tratamiento 1C señala que una sobrequelación dá como resultado un efecto inhibitorio. Aparentemente la ausencia de leptopelo disminuye el número de nauplius eclosionados en aproximadamente un 10% con respecto al tratamiento 1A. También se muestra una inhibición en la eclosión con la falta de leptopelo y el exceso de quelante (Tratamiento 2C). Estos efectos coincidieron de manera semejante en el tiempo de desarrollo de los estadios nauplii y copepodito de A. tonsa, observándose una prolongación en la duración de cada periodo. Si estas condiciones se llevaran a cabo en la naturaleza, la ausencia de leptopelo implicaría una reducción en el número de generaciones anuales, dándonos como resultado una disminución en la productividad secundaria de las zonas habitadas por A. tonsa.

Los tratamientos 1B y 1C ponen de manifiesto que la adición de EDTA al agua de mar incrementa la supervivencia de nauplius y copepoditos indicando esto que ciertas propiedades del agua de

mar relativas a la naturaleza del EDTA son limitantes en la supervivencia de los estadios de desarrollo. Esto es, si el EDTA, o agentes de naturaleza similar, estuvieran presentes en el medio ambiente marino, la supervivencia sería mayor.

En el mar, los componentes orgánicos con poderes quelantes (Tabla IV) están presentes en la materia orgánica disuelta, la cual proviene de la excreción y desintegración de organismos.

Componente Orgánico	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 et al (1967)
Carotenoides	Slowey et al (1967)
Nucleótidos	Provasoli (1963)
Acidos Hidroxílicos	Provasoli (1963)

Tabla IV. Componentes orgánicos con poderes quelantes, presentes en agua de mar.

Barber y Ryther (1969) encontraron una evidencia directa de la ocurrencia de quelantes naturales al obtener efectos similares cuando añadieron un quelante artificial fuerte o un extracto de zooplancton indefinido. Johnston (1964) señaló que

un incremento en quelantes naturales está asociado con el aumento en material orgánico. Barber y Ryther (1969) encontraron un incremento en la tasa de crecimiento del fitoplancton y lo atribuyeron al aumento en material orgánico disuelto.

Saunders (1957) estableció cuatro formas por las cuales la quelación de metales traza puede afectar a las algas: (1) el quelato orgánico puede afectar la disponibilidad de un metal traza en forma de ión, mediante la disminución de su concentración efectiva en el sistema acuoso debajo del nivel requerido por un organismo en particular. Así, un metal traza necesario para un cierto sistema biológico puede estar presente pero totalmente indisponible o encontrarse parcialmente disponible, limitando por ende el crecimiento y reproducción del organismo; (2) si existe exceso de un metal traza que sea tóxico para un organismo en particular, la quelación puede reducir la concentración del ión metálico debajo del nivel de toxicidad para dicho organismo; (3) la quelación puede remover un ión metálico que sea antagónico a un metal venenoso, incrementando efectivamente la concentración relativa del veneno a un nivel al cual se hace tóxico y (4) si un metal traza tiende a precipitarse, quedando inaccesible para un organismo, la quelación puede mantener ese elemento particular complejo en estado soluble, manteniendo de esta manera un nivel de concentración adecuado para su utilización por las células.

Las dos explicaciones más importantes (no mutuamente excluyentes) sobre los efectos de quelantes en el crecimiento del fitoplancton son: (1) un quelante incrementa la disponibilidad de iones metálicos esenciales transformándolos en formas biologicamente activas y (2) la quelación desintoxica el agua de mar, al "atrapar" ciertos iones metálicos tóxicos dejándolos en forma inactiva. El primer caso se puede aplicar para el hierro, un nutriente esencial para el crecimiento de los organismos que está presente en el agua de mar predominantemente como un precipitado coloidal. La afinidad del EDTA por el ión férrico es muy grande, de este modo el EDTA puede actuar transformando el hierro de estado sólido insoluble a soluble, que es disponible para la célula. Un ejemplo de una posible acción de agentes quelantes puede hacerse en referencia al ciclo del hierro en aguas naturales (Ruttner, 1953). En aguas neutras o alcalinas en las cuales hay oxígeno presente, el hierro podrá estar en estado férrico y precipitarse como hidróxido o fosfato. Este precipitado se hundirá desde la zona fótica, y los organismos estarán privados de una fuente de hierro. Ahora, si existen componentes orgánicos presentes capaces de quelar el hierro, este permanecerá efectivamente en estado soluble dentro de la zona fótica y así estará disponible para los organismos. Lo mismo puede suceder con otros metales tales como el cobalto y el cinc, que son esenciales para los primeros estadios de desarrollo del copépodo Euchaeta japónica (Lewis y Ramnarine, 1969). El segundo caso se puede aplicar para el cobre. Se ha

encontrado que el cobre en forma iónica es muy venenoso para la fotosíntesis y el crecimiento de algas unicelulares a concentraciones que usualmente ocurren en aguas naturales. Steemann Nielsen y Wium-Andersen (1970) fueron los primeros en sugerir que el cobre iónico que ocurre en concentraciones naturales puede ser tóxico para el fitoplancton. La concentración normal en agua de mar es de 3 ug Cu/l (Goldberg, 1963), y en aguas costeras es de 10 ug Cu/l (Atkins, 1932). Reeve et al. (1977) observaron una reducción en la producción de huevos de poblaciones cultivadas bajo condiciones de laboratorio compuestas principalmente por Acartia, Paracalanus, Pseudocalanus y Témora después de estar expuestos a 5 ug Cu/l. Moraitou-Apostolopoulou y Verriopoulos (1979) encontraron un efecto tóxico de concentraciones de cobre tan bajas como 1 ug/l en la respiración, alimentación, fecundidad y longevidad del copépodo Acartia clausi. Lewis et al. (1971) hallaron que las concentraciones de cobalto y cinc en agua de origen oceánico son mucho mayores que en zonas costeras. Estas concentraciones o aquellas de otros cationes metálicos, en efecto pueden inhibir el desarrollo de los estadios de prealimentación de Euchaeta japónica si el EDTA no está presente. No obstante, Steemann Nielsen y Wium-Andersen (1970) indicaron que "es poco probable que otros iones de metales pesados además del cobre puedan actuar como veneno en el océano. La concentración de estos metales es mucho menor que la del cobre" (Tabla V).

METAL	mg/kg. Cl=19.00 ‰	mg-atoms /lt. Cl= 19.00 ‰	PESO ATOMICO (1940)	REFERENCIA	
Plata	0.0003	0.000003	107.880	Haber (1928)	
Bario	0.05	0.0004	137.36		
Estroncio	13.0	0.15	87.63		
Magnesio	12.72	53.57	24.32		
Calcio	4.00	10.24	40.08		
Manganeso	0.001 - 0.01	0.00002 - 0.0002	54.93		
Hierro	0.002 - 0.02	0.00003 - 0.0003	55.85		
Aluminio	0.5	0.02	26.97		
Cobalto					Thompson y Robinson (1932) Fox y Ramage Atkins (1936) Boury (1938) Ernst y Hoerman (1936)
Cadmio					
Zinc	0.005	0.00008	65.38		
Plomo	0.004	0.00002	207.21		
Niquel	0.0001	0.000002	58.69		
Cobre	0.001 - 0.01	0.00002 - 0.0002	63.57		
Mercurio	0.00003	0.0000001	200.61		
Cromo				Goldschmidt (1937) Webb (1937) Föyn et al. (1939)	
Torio	< 0.0005	< 0.000002	232.12		

Tabla. IV.- Concentraciones de algunos metales en solución, presentes en agua de mar. (Sverdrup, Fleming y Johnson, 1942)

Recientemente se ha mostrado que el agua oceánica en los centros de surgencias se vuelve fructífera para el crecimiento del fitoplancton solamente después de la adición de un quelante. Esto sugiere que una gran parte del cobre que se encuentra en aguas subsuperficiales de los océanos está presente en forma iónica. Barber y Ryther (1969) reportaron que las aguas de surgencias fuera de ciertas áreas de la costa de Perú deben estar condicionadas orgánicamente antes de que surja el florecimiento del fitoplancton y sugirieron que los componentes orgánicos son necesarios para hacer disponibles los metales traza requeridos para el crecimiento. Sin embargo, Steemann Nielsen y Wium-Andersen (1970) interpretaron los resultados de Barber y Ryther como una evidencia de la reducción de la toxicidad del cobre por componentes orgánicos preferentemente a que se incrementara la disponibilidad de metales. Estas aguas resultaron ser de elevado contenido en nutrientes inorgánicos, de relativamente bajo contenido de carbono orgánico disuelto y sostener menor crecimiento de fitoplancton que las aguas al norte o sur del Ecuador.

Jackson y Morgan (1978) examinaron tres mecanismos para mejorar el abastecimiento de hierro vía quelación: transporte a través de la membrana, intercambio por ligando en la superficie celular e incremento del suministro de hierro en la superficie celular por disociación del quelato. Sin embargo, señalaron que ninguna de las interacciones quelante-celula explica la facultad

de los ligandos orgánicos para mejorar el crecimiento del fitoplancton. Existe la posibilidad de que los ligandos en el exterior de la membrana celular se combinen con iones metálicos de forma tal que estos puedan ser transportados al interior de la membrana. Debido a que el cobre tiene afinidad muy alta por algunos ligandos (Tabla VI) puede adherirse al ligando de la superficie celular y así inhibir la "toma" de otros metales traza esenciales.

Catión	log K	Catión	log K
Ag ⁺	7.3	Cd ⁺²	16.46
Ba ⁺²	7.76	Zn ⁺²	16.50
Sr ⁺²	8.63	Pb ⁺²	18.04
Mg ⁺²	8.69	Ni ⁺²	18.62
Ca ⁺²	10.70	Cu ⁺²	18.80
Mn ⁺²	13.79	Hg ⁺²	21.80
Fe ⁺²	14.33	Cr ⁺³	23.0
Al ⁺³	16.13	Th ⁺⁴	23.2
Co ⁺²	16.31	Fe ⁺³	25.1

Tabla VI. Constantes de estabilidad de los complejos-EDTA de algunos metales. Tomado de Schwarzenbach (1956).

Finalmente, no concluyeron que la limitación del crecimiento del fitoplancton por el hierro sea imposible aunque sus experimentos mostraron que los quelantes sintéticos no incrementan la razón de suministro de hierro.

La concentración natural de materia orgánica en el agua de mar generalmente varía de 10^{-7} a 10^{-10} M (Kinne, 1972). Estas

concentraciones son mucho menores que las utilizadas en el tratamiento 1B (10^{-4} M EDTA). Esto indica que, si estos resultados se llevan a cabo en la naturaleza, el poder quelante de la materia orgánica disuelta debería ser muy elevado. El EDTA es uno de los quelantes artificiales más fuertes debido a la organización física que lo conforma. En realidad la adición de 37 y 100 mg/l de EDTA implica una sobrequelación, ya que la proporción quelante/metal traza expresada en miliequivalentes es de 1:1 y la concentración natural de metales traza en agua de mar generalmente es mucho menor que la correspondiente concentración de EDTA utilizada. No obstante, Cleland (1953) no encontró efectos tóxicos del EDTA a concentraciones tan altas como 370 mg/l (10^{-3} M). Por otro lado, la cantidad de materia orgánica disuelta varía con la latitud (Barber y Ryther, 1969) y estación del año (Lewis et al., 1971), lo que sugiere también una variación en la actividad quelante de un lugar a otro y de una época del año a otra.

El efecto inhibitorio causado por la ausencia de leptopelo posiblemente se deba a su relación directa o indirecta con coloides, y estos a su vez con "factores de crecimiento". Saunders (1957) mencionó que una sustancia es considerada como factor de crecimiento accesorio si es necesaria solamente en cantidades muy pequeñas. Si un organismo en cultivo requiere de un factor de crecimiento accesorio en particular, parece razonable esperar que también tendrá ese requerimiento bajo

condiciones naturales. Es posible que algunos elementos metálicos agregados en forma de coloides o adheridos a estos por adsorción, sean esenciales para la formación de factores de crecimiento. v.gr. el cobalto es un constituyente de la cobalamina (vitamina B12). La ingestión de partículas flotantes en el mar puede ser de gran importancia debido a que se conoce que las partículas absorben vitaminas y porque sirven como soporte para las bacterias epífitas marinas. Es evidente que la mayor cantidad de vitamina B12 está asociada con la fracción orgánica de algunos sólidos presentes en agua de mar. Las partículas suspendidas son importantes en la nutrición vitamínica y las bacterias son productores significantes de vitamina B12 en el ambiente marino (Kinne, 1972). El hecho de que los medios de cultivo desprovistos de leptopelo hallan inhibido el crecimiento de los copépodos a tal grado que se pueden considerar "enanos" es una evidencia de que estos organismos no toman todos sus requerimientos nutricionales del fitoplancton con el que se alimentan.

Zillioux (1966) observó una prolongación en el tiempo de desarrollo de A. tonsa y, por otro lado, mostró los efectos adversos de concentraciones elevadas de nauplius en recipientes reducidos: "los cultivos que contienen 100 o más nauplius por litro (1 nauplii por 10 ml) mostraron un desarrollo errático seguido de gran mortalidad". El agua de mar utilizada en sus experimentos fué filtrada a 0.45 μ m. Estos resultados son

semejantes a los efectos de prolongación del tiempo de desarrollo y elevada mortalidad de nauplius del tratamiento 2a. La concentración de nauplius en el tratamiento 1B fué del orden de 1 nauplii por ml y la supervivencia fué 96.7%.

Lewis y Ramnarine (1969) señalaron la importancia del cobalto y cinc para los primeros estadios de desarrollo del copépodo E. japónica. Es posible que la necesidad de añadir estos metales a sus medios de cultivo se halla debido a que al haber utilizado agua de mar filtrada a 0.45 μ m hallan sido removidos gran parte de los coloides que poseen estos requerimientos fisiológicos. Carrillo Barrios-Gómez et al. (1974) utilizaron 37 mg/l de EDTA y agua de mar filtrada a 0.45 μ m en sus cultivos del copépodo A. clausi; el bajo porcentaje de supervivencia en sus experimentos condujo a pensar en la semejanza de los efectos inhibidores del tratamiento 2B.

La presencia de EDTA fué benéfica solamente en los tratamientos que contenían leptopelo (1B y 1C) y tuvo efectos detrimentales en la ausencia de este (2B y 2C). Este argumento apoya la hipótesis de que la quelación hace disponibles los metales traza esenciales presentes pero altamente indisponibles.

Debido a que se utilizó el medio "f/2" para el cultivo de microalgas (Guillard, 1973), una concentración de aproximadamente 10^{-10} M de Na_2 -EDTA se introdujo a los seis

tratamientos experimentales. Por otra parte, no se pretende concluir que 37 mg/l de Na₂-EDTA es la concentración óptima para todas las aguas naturales del medio marino; de hecho, así como la materia orgánica disuelta varía de un hábitat particular a otro, así también la actividad quelante variará, dependiendo del material orgánico que halla sido metabolizado por microorganismos hasta formar complejos orgánicos con metales traza.

VI. CONCLUSIONES

1. En la ausencia de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ se reduce la eclosión y supervivencia de los estadíos de desarrollo de A. tonsa.

2. En concentraciones de 37 mg/l de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ se incrementa la eclosión y supervivencia de los estadíos de desarrollo de A. tonsa.

3. El agua de mar sin leptopelo y con 37 mg/l de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ tuvo efectos detrimentales, lo que sugiere un apoyo a la hipótesis de que la quelación hace disponibles los metales traza esenciales presentes pero altamente indisponibles.

4. La filtración del agua de mar hasta 0.2 μm tiene un efecto inhibitorio en la eclosión, tiempo de desarrollo y supervivencia de los estadíos nauplius de A. tonsa.

5. En concentraciones de 100 mg/l de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ se favorece la supervivencia de los estadíos de desarrollo de A. tonsa pero se disminuye la eclosión.

VII. RECOMENDACIONES

Entre los muy variados y complejos aspectos que requieren de una investigación complementaria, los de mayor interés para un futuro trabajo que determine las causas de los efectos mostrados en esta tesis, podrían ser:

1) Añadir algunos elementos traza esenciales (v. gr. hierro, cobalto, cinc, etc.) a los medios de cultivo que sean filtrados hasta $0.2 \mu\text{m}$, a fin de determinar cuales fueron los responsables del efecto inhibitorio del tratamiento 2A.

2) Determinar las concentraciones de metales traza esenciales y tóxicos en los tratamientos 1A y 1B.

Los resultados de estos experimentos podrían ser útiles para conocer las formas por las cuales la quelación afecta la supervivencia de A. tonsa.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, se recomienda: (1) la elección de A. tonsa como una forma biológica para estimar la actividad quelante del agua de mar; (2) la utilización de agentes de quelación en los medios de cultivo y (3) filtrar moderadamente el agua de mar para no remover las partículas que oscilan en el rango de 0.2 a $3.0 \mu\text{m}$.

LITERATURA CITADA

Allan, J. D., S. Richman, y R. Huff. 1977. Grazing in juvenile stages of some estuarine calanoid copepods. Mar. Biol. 43: 317-331.

Atkins, W. R. G. 1932. The copper content of sea water. J. Mar. Biol. Ass. U. K. 18: 193-198.

Azcárate Capriles, J. C. 1980. Filtración bioquímica: una herramienta para el cultivo masivo del copépodo calanoideo marino Acartia tonsa Dana. Sin publicar.

Barber, R. T. y J. H. Ryther. 1969. Organic chelators: factors affecting primary production in the Cromwell current upwelling. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 3: 191-199.

Bernhard, M. 1955. Die kultur von seeigellarven (Arbacia lixula in Künstlichem und natürlichem Meerrwasser mit Hilfe von Ionenaustauschsubstanzen und komplexbildnern. Publ. Staz. Zool. Napoli. 29: 80-95.

Betz, M. 1979. Separation of naturally occurring high molecular weight metal complexes from seawater. Marine Chemistry. 7: 165-170.

Carrillo Barrrios-Gómez, E., C. B. Miller, y P. H. Wiebe.
1974. Failure of interbreeding between Atlantic and Pacific
populations of the marine calanoid copepod Acartia clausi
Giesbrecht. Limnol. Oceanogr. 19(3): 452-458.

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

Conover, R. J. 1956. Oceanography of Long Island Sound,
1952-1954. VI. Biology of Acartia clausi and A. tonsa. Bull.
Bingham Oceanographic Collection 16: 156-233.

Conover, R. J. 1967. Reproductive cycle, early development,
and fecundity in laboratory populations of the copepod Calanus
hiperboreus. Crustaceana. 13: 61-72.

Cooper, L. H. N. 1937. Some conditions governing the
solubility of iron. Proc. Roy. Soc. London. B124: 299.

Corkett, C. J. 1967. Technique for rearing marine calanoid
copepods in laboratory conditions. Nature. 216: 58-59.

Corkett, C. J. y D. L. Urry. 1968. Observations on the
keeping of adult female Pseudocalanus elongatus under laboratory
conditions. J. Mar. Biol. Ass. U. K. 48: 97-105.

Devore, G. 1969. Fenoles. Quinones, p. 459. En: Química Orgánica. (Publicaciones Cultural S.A., ed.) España. 734 p.

Duursma, E. K. 1970. Organic chelation of Co and Zn by leucine in relation to sorption by sediments. En: Organic matter in natural waters. (D. W. Hood, ed.). College, Alaska: Institute of Marine Science Occasional Publication. 1: 387-397.

Esterly, C. O. 1916. The feeding habits and food of pelagic copepods and the question of nutrition by organic substances in solution in the water. Univ. Cal. Publ. Zool. 16(14): 171-184.

Fox, D. L., C. H. Oppenheimer y T. S. Kittredge. 1953. Microfiltration in oceanographic research. II. J. Mar. Res. 12: 233-243.

Goldberg, E. D. 1963. The oceans as a chemical system, p. 3-26. En: The Sea, Vol. II. (M. N. Hill, ed.). Intersciences Publishers., London. 554 p.

Guillard, R. L. 1973. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Woods Hole Oceanographic Institution, Massachusetts 29-60.

- Harada, T. 1970. The present status of marine fish cultivation research in Japan. *Helgolander wiss. Meeresunters.* 20: 594-601.
- Heinle, D. R. 1966. Production of a calanoid copepod, Acartia tonsa, in the Patuxent River Estuary. *Chesapeake Science.* 7(2): 59-74.
- Heinle, D. R. 1969. Culture of calanoid copepods in synthetic seawater. *J. Fish. Res. Bd. Canada.* 26: 150-153.
- Heinle, D. R. 1970. Population dynamics of exploited cultures of calanoid copepods. *Helgolander wiss. Meeresunters.* 20: 360-372.
- Houde, E. D. 1973. Some recent advances and unsolved problems in culture of marine fish larvae. *Proc. World Maric. Soc.* 3: 83-112.
- Jackson, G. A. y J. J. Morgan. 1978. Trace metal-chelator interactions and phytoplankton growth in seawater media: Theoretical analysis and comparison with reported observations. *Limnol. Oceanogr.* 23(2): 268-282.
- Jacobs, J. 1961. Laboratory cultivation of the marine copepod Pseudodiaptomus coronatus Williams. *Limnol. Oceanogr.* 6:

443-446.

Johnston, R. 1964. Sea water, the natural medium of phytoplankton. II. Trace metals and chelation, and general discussion. J. Mar. Biol. Ass. U. K. 44: 87-109.

Kinne, O., ed. 1972. Organic substances, p. 1527-1566. En: Marine Ecology Vol. 1 Part 3. Wiley Interscience., New York. 1774 p.

Koshy, E., M. V. M. Desai y A. K. Ganguly. 1969. Studies on organo-metallic interactions in the marine environment. Part 1. Interaction of some metallic ions with dissolved organic substances in sea water. Current Science. 23: 555-558.

Lewis, A. G. y A. Ramnarine. 1969. Some chemical factors affecting the early developmental stages of Euchaeta japonica (Crustacea: Copepoda: Calanoida) in the laboratory. J. Fish. Res. Bd. Canada. 26: 1347-1362.

Lewis, A. G., A. Ramnarine y M. S. Evans. 1971. Natural chelators -an indication of activity with the calanoid copepod Euchaeta japonica. Mar. Biol. 11: 1-4.

Loosanoff, V. L. y H. C. Davis. 1963. Rearing of bivalve molluscs, p. 1-136. En: Advances in Marine Biology, 1(F. S. Russell, ed.). Academic Press., New York. 128 p.

Lucas, C. E., 1958. External metabolites and productivity. Rapp. Cons. Explor. Mer. 144: 155-158.

Margalef, R. 1974. El medio líquido, p. 70-71. En: Ecología. (Ediciones Omega S.A., ed.) Barcelona. 951 p.

May, R. C. 1970. Feeding larval marine fishes in the laboratory: a review Calif. Mar. Res. Comm., CalCOFI Rept. 14: 76-83.

Mc Lachlan, J. 1964. Some considerations of the growth of marine algae in artificial media. Can. J. Microbiol. 10: 769-782.

Moraitou-Apostolopoulou, M. y G. Verriopoulos. 1979. Some effects of sub-lethal concentrations of copper on a marine copepod. Mar. Pollution Bull. 10: 88-92.

Neunes, H. W. y G. F. Pongolini. 1965. Breeding a pelagic copepod, Euterpina acutifrons Dana, in the laboratory. Nature. 208: 571-573.

Parrish, K. K. y D. F. Wilson. 1978. Fecundity studies on Acartia tonsa (Copepoda: Calanoida) in standardized culture. Mar. Biol. 46: 65-81.

Provasoli, L. 1963. Organic regulation of phytoplankton fertility, p. 201-209. En: The Sea, Vol. II. (M. N. Hill, ed.). Intersciences Publishers, London. 554 p.

Reeve, M. R. y M. A. Walter. 1977. Observations on the existence of lower threshold and upper critical food concentrations for the copepod Acartia tonsa Dana. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 29: 211-221.

Reeve, M. R., J. C. Gamble, y M. A. Walter. 1977. Experimental observations on the effects of copper on copepods and other zooplankton: controlled ecosystem pollution experiment. Bull. Mar. Sci. 27(1): 92-104.

Ruttner, F. 1953. Fundamentals of Limnology. Univ. Toronto Press. Toronto. 242 p.

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

Scharzenbach, G. 1956. Die complexometrische Titration. F. Encke, Stuttgart. English translation (H. Irving): Complexometric titration. Methuen, London (1957).

Sienko, M. J. y R. A. Plane. 1975. Coloides, p. 232-233. En: Química. (Aguilar, ed.) España: Colección Ciencia y

Tecnología. 623 p. 0*

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

Steemann Nielsen, E. y S. Wium-Andersen. 1970. Copper ions
as poison in the sea and in fresh waters. Mar. Biol. 6:
93-97.

Sverdrup, H. U., M. W. Johnson y R. H. Fleming. 1942.
Composition of seawater, 176-177 p. En: The Oceans, their
physics, chemistry, and general biology. (Prentice-Hall, Inc.)
New York. 1087 p.

Ukeles, R. 1965. A simple method for mass culture of marine
algae. Limnol. Oceanogr. 10(3): 492-495.

Urry, D. L. 1965. Observations on the relationship between
the food and the survival of Pseudocalanus elongatus in the
laboratory. J. Mar. Biol. Ass. U. K. 45: 49-58.

Walton, H. F. 1953. Chelation. Scientific American. June,
1953: 68-76.

Wilson, C. B. 1932. The copepod crustaceans of Chesapeake

Bay. Proc. U. S. Nat. Mus. 80: 1-54.

Ch.

Zarogian, G. E., G. Pesch y G. Morrison. 1969. Formulation of an artificial seawater media suitable for oyster larvae development. (abstr.) Amer. Zool. 9(4): 1149.

Zillioux, E. J. y D. F. Wilson. 1966. Culture of planktonic calanoid copepod through multiple generations. Science. 151: 996-998.

Zillioux, E. J. 1969. A continuous recirculating culture system for planktonic copepods. Mar. Biol. 4(3): 215-218.

Zillioux, E. J. y N. F. Lackie. 1970. Advances in the continuous culture of planktonic copepods. Helgolander wiss. Meeresunters. 20: 325-332.