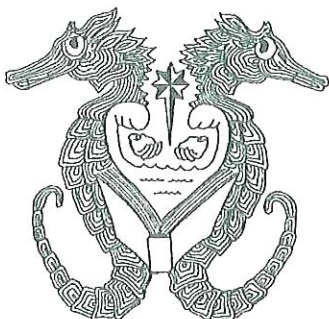


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA
CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



EFFECTO DE LA VITAMINA B₁₂ SOBRE EL
CRECIMIENTO DEL DINOFLAGELADO
Amphidinium carteri HULBURT 1957

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
OCEANOLOGO
PRESENTA:
LAURA ALEJANDRA ARDILLA DE LA ROSA CARRILLO

ENSENADA, B.C. MARZO DE 1996

RESUMEN.

En el presente trabajo se determinó el efecto de distintas concentraciones de vitamina B₁₂ sobre la tasa específica de crecimiento de un dinoflagelado tóxico y productor de mareas rojas, *Amphidinium carteri*. Se determinaron su máxima tasa de crecimiento ($\mu_{\max}$) y su constante de semisaturación (k_s)

La especie fue cultivada con 7 concentraciones de vitamina B₁₂, de 0 a 500 ng l⁻¹, en cultivos cerrados en matraces erlenmeyer de 250 ml. Cada concentración se probó por triplicado. Los cultivos se muestrearon diariamente y se realizaron conteos celulares en cámaras de conteo, con microscopio óptico.

Se calculó la tasa específica de crecimiento de cada réplica de cada condición de cultivo, así como la densidad celular final alcanzada en cada uno. Las tasa de crecimiento fueron de 0.27 a 0.62 días⁻¹ y las densidades finales de 190,600 hasta 1,633,056 células/ml.

Se encontró una relación del tipo Michaelis-Menten entre la concentración de vitamina y la tasa de crecimiento de la especie. Se obtuvo una constante de semisaturación de 4.53 ng l⁻¹ y una tasa máxima de crecimiento de 0.6 días⁻¹.

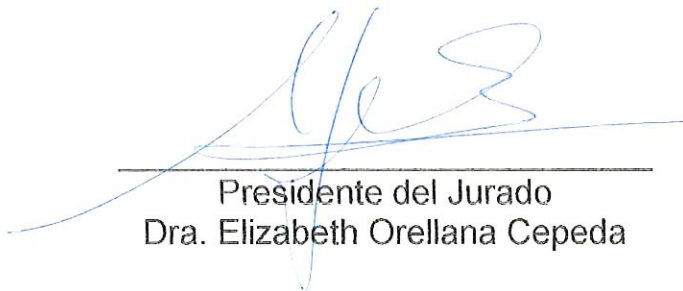
La concentración de vitamina B₁₂ limitó la densidad máxima de la especie a concentraciones menores a 50 ng l⁻¹.

Se comprobó que la cantidad de vitamina B₁₂ disuelta en el medio es un factor limitante del crecimiento de *Amphidinium carteri*.

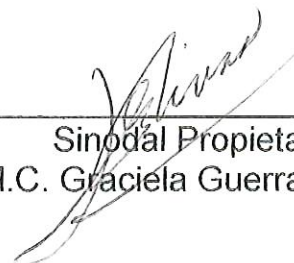
"EFECTO DE LA VITAMINA B₁₂ SOBRE EL CRECIMIENTO DEL
DINOFLAGELADO *Amphidinium carteri* HULBURT 1957"

T E S I S
QUE PRESENTA:
LAURA ALEJANDRA ARDILLA DE LA ROSA CARRILLO

Aprobada por:



Presidente del Jurado
Dra. Elizabeth Orellana Cepeda



Sinodal Propietario
M.C. Graciela Guerra Rivas



Sinodal Propietario
Oc. Enrique Valenzuela Espinoza

Dedicatoria

A Laura, Tito, León y Alejo
(en orden de aparición)

A Maru y Marianito.

A Emilio.

Porque a pesar de estar tan lejos, estuvimos juntos...
Los quiero.

Agradecimientos

A mi directora de tesis Dra. Elizabeth Orellana por su apoyo y amistad y sobre todo su confianza en mí, que a veces sobrepasaba la mía, a pesar de las dificultades.

A mi sinodal Oc. Enrique Valenzuela por la ayuda prestada a lo largo de toda la realización de esta tesis, así como por sus consejos para mejorarla.

A mi sinodal y maestra M.C. Graciela Guerra por su apoyo a este trabajo y su estímulo y ejemplo como maestra y como persona.

A mis padres Gustavo (Tito) y Laura por todos estos años de apoyo para que pudiera llegar a donde estoy ahora, y porque hicieron de mí lo mejor que se pudo.

A la familia Alvarez Parrilla: Estela, Manolo, Manolo y Alvaro por su confianza y cariño, por casi adoptarme y hacerme sentir como parte de su familia.

Al profesor Jesús Serrano y Doña Maty por recibirnos y aguantarnos tantas veces en su casa y ayudarnos siempre que lo necesitamos.

A todos los "Salmones" por hacerme pasar los 5 años más divertidos de mi vida, especialmente:

A Gigi por compartir, durante estos 5 años, su vida y su casa (y hasta su cama).

A Aida Lety Mariana y Selene (en orden alfabético) por su amistad y todos los buenos momentos, aunque debería darles las gracias a cada una por separado, por falta de espacio déjenme dárselas a todas juntas ¿sí? Gracias!!!!!!!

A Jesús, Lolita, Carelia, Carlos, Ricardo, Horacio, Víctor, Francisca, el Tex, Zuray y Perla ("Salmones" o no) por todo lo que me han soportado y ayudado, unos más que otros, y lo que hemos compartido juntos. A Rubén por nunca hacerme caso.

Un agradecimiento especial a Selene por el "apoyo técnico" para la realización de esta tesis.

A Emilio Alvarez, porque sin tí, creo que nunca me habría metido en esto...
gracias por todo ♥.

INDICE

I. INTRODUCCION	1
I.I.Antecedentes	5
I.II.Objetivo	10
II. METODOLOGIA	11
II.I.Condiciones generales de los cultivos	11
II.II.Preparación de las soluciones stock de vitaminas	12
II.III.Experimento	14
II.IV. Obtención de parámetros poblacionales y requerimiento vitamínico.....	17
II.IV.I. Conteos	17
II.IV.II. Parámetros poblacionales	17
II.IV.III Requerimiento vitamínico	18
II.V Tratamiento estadístico	19
III. RESULTADOS	21
IV. DISCUSIONES	37
V CONCLUSIONES	45
VI. REFERENCIAS	46

Lista de Tablas.

Tabla I. Concentración de las vitaminas en el medio de cultivo f/2.....	12
Tabla II. Concentración de las soluciones stock de vitaminas.....	12
Tabla III. Concentración de las soluciones stock secundarias de vitaminas.....	13
Tabla IV. Concentraciones iniciales de vitamina B ₁₂ probadas en los cultivos de <i>Amphidinium carteri</i>	15
Tabla V. Crecimiento poblacional de <i>Amphidinium carteri</i> con 0 ng B ₁₂ l ⁻¹	22
Tabla VI. Crecimiento poblacional de <i>Amphidinium carteri</i> con 25 ng B ₁₂ l ⁻¹	23
Tabla VII. Crecimiento poblacional de <i>Amphidinium carteri</i> con 50 ng B ₁₂ l ⁻¹	24
Tabla VIII. Crecimiento poblacional de <i>Amphidinium carteri</i> con 100 ng B ₁₂ l ⁻¹ ...	25
Tabla IX. Crecimiento poblacional de <i>Amphidinium carteri</i> con 100 ng B ₁₂ l ⁻¹	26
Tabla X. Crecimiento poblacional de <i>Amphidinium carteri</i> con 200 ng B ₁₂ l ⁻¹	27
Tabla XI. Crecimiento poblacional de <i>Amphidinium carteri</i> con 300 ng B ₁₂ l ⁻¹	28
Tabla XII. Crecimiento poblacional de <i>Amphidinium carteri</i> con 500 ng B ₁₂ l ⁻¹	29
Tabla XIII. Efecto de la concentración inicial de vitamina B ₁₂ en el medio de cultivo, sobre la tasa de crecimiento (μ), el tiempo de duplicación (G), el número de duplicaciones diarias (D) y la densidad final (N _f) en los cultivos de <i>Amphidinium carteri</i>	30
Tabla XIV. Análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, para detectar diferencias entre las densidades finales en los cultivos de <i>Amphidinium carteri</i> a diferentes concentraciones de vitamina B ₁₂ con un nivel de significancia $\alpha=0.05$	32

Tabla XV. Análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, para detectar diferencias entre las tasas específicas de crecimiento de <i>Amphidinium carteri</i> cultivado a diferentes concentraciones de vitamina B ₁₂ con un nivel de significancia $\alpha=0.05$	33
Tabla XVI. Efecto de las vitaminas sobre el crecimiento de algunos organismos.....	40

Lista de Figuras.

Figura 1. Diseño de los experimentos para probar el efecto de diferentes concentraciones de vitamina B ₁₂ sobre el crecimiento poblacional del dinoflagelado <i>Amphidinium carteri</i>	16
Figura 2. Crecimiento poblacional de <i>Amphidinium carteri</i> con 0 ng B ₁₂ l ⁻¹ (promedio de las réplicas ± desviación estándar).....	22
Figura 3. Crecimiento poblacional de <i>Amphidinium carteri</i> con 25 ng B ₁₂ l ⁻¹ (promedio de las réplicas ± desviación estándar).....	23
Figura 4. Crecimiento poblacional de <i>Amphidinium carteri</i> con 50 ng B ₁₂ l ⁻¹ (promedio de las réplicas ± desviación estándar).....	24
Figura 5. Crecimiento poblacional de <i>Amphidinium carteri</i> con 100 ng B ₁₂ l ⁻¹ (promedio de las réplicas ± desviación estándar).....	25
Figura 6. Crecimiento poblacional de <i>Amphidinium carteri</i> con 100 ng B ₁₂ l ⁻¹ (promedio de las réplicas ± desviación estándar).....	26
Figura 7. Crecimiento poblacional de <i>Amphidinium carteri</i> con 200 ng B ₁₂ l ⁻¹ (promedio de las réplicas ± desviación estándar).....	27
Figura 8. Crecimiento poblacional de <i>Amphidinium carteri</i> con 300 ng B ₁₂ l ⁻¹ (promedio de las réplicas ± desviación estándar).....	28
Figura 9. Crecimiento poblacional de <i>Amphidinium carteri</i> con 500 ng B ₁₂ l ⁻¹ (promedio de las réplicas ± desviación estándar).....	29

Figura 10. Efecto de la concentración inicial de vitamina B ₁₂ sobre la densidad final de <i>Amphidinium carteri</i> en cultivos cerrados.....	34
Figura 11. Efecto de la concentración inicial de vitamina B ₁₂ sobre la tasa específica de crecimiento de <i>Amphidinium carteri</i> en cultivos cerrados y obtención de k_s y μ_{max}	35

I. INTRODUCCION.

Muchas especies del fitoplancton son auxótrofas, esto es, que requieren de una fuente exógena para obtener uno o mas factores accesorios para el crecimiento, de los cuales, sólo las vitaminas B₁₂, biotina y tiamina han demostrado ser de importancia general para las algas (Droop, 1962). Sin embargo, los requerimientos vitamínicos son distintos para cada especie, e incluso para una misma especie varían de acuerdo a las demás condiciones del ambiente (Bonin *et al.*, 1981). Por lo tanto, las vitaminas contribuyen a modificar el crecimiento de las diferentes especies de fitoplancton de tal forma que, aunque no se consideran limitantes de la producción primaria total, es muy posible que al interactuar con otros factores físicos y químicos determinen la sucesión fitoplanctónica (Raymont, 1980; Bonin *et al.*, 1981).

De las vitaminas del complejo B, la que más comúnmente necesita el fitoplancton es la B₁₂ o cianocobalamina (Raymont, 1963). Provasoli y Carlucci (1974, citado por Bonin *et al.*, 1981) encontraron que, de 388 especies de microalgas previamente estudiadas, 203 eran auxótrofas; y de ellas, 85% dependían de la vitamina B₁₂, 40% de la tiamina y 7% de la biotina.

Así como varían los requerimientos vitamínicos específicos de las algas en cuanto a la cantidad que necesitan para crecer, también varían sus requerimientos en cuanto a la estructura molecular de la vitamina que utilizan, por lo que algunas microalgas crecen bien con análogos de la vitamina en cuestión. Las cobalaminas consisten de dos componentes

característicos: un sistema de anillos que contiene cuatro anillos del tipo pirrol y un átomo de cobalto coordinado con los cuatro átomos de nitrógeno internos del sistema anular. El segundo componente es un nucleótido que contiene como base al 5,6-dimetilbenzimidazol (Lehninger, 1991). La respuesta específica de los organismos hacia la B₁₂ o cianocobalamina y sus variantes, está determinada por la naturaleza del nucleótido. La respuesta puede ser de tres tipos: 1) aquellos que, como los mamíferos, necesitan una base del tipo del benzimidazol en el nucleótido; 2) aquellos que, como *Lactobacillus leichmannii* pueden también usar una base como la adenina, y 3) aquellos que, como *Escherichia coli*, requieren solamente del núcleo, sin importar los nucleótidos. Las algas caen en las tres categorías (Bonin *et al.*, 1981).

El efecto de las vitaminas sobre el crecimiento del fitoplancton fue estudiado al principio de manera cualitativa, es decir, todo o nada. Sin embargo; pronto fue obvio que a concentraciones bajas, podía observarse una respuesta graduada en forma de una cinética del tipo Michaelis-Menten (Swift, 1980). En las últimas décadas, con la observación de un incremento global en la frecuencia, magnitud y extensión de las mareas rojas (Anderson, 1989), se ha dado importancia al rol de las vitaminas del complejo B en el desarrollo de éstas (Iwasaki, 1989).

Todas las especies de fitoplancton capaces de producir marea roja, estudiadas hasta ahora, necesitan vitamina B₁₂, algunas biotina y/o tiamina (Nishijima y Hata, 1989). Nishizima (1986, citado por Iwasaki, 1989) estudió los requerimientos específicos de varios dinoflagelados productores de marea roja y encontró que todos requerían concentraciones

de 10 a 20 ng l⁻¹ de B₁₂ en el medio; consecuentemente, sugirió que la concentración de vitamina B₁₂ en el agua de mar es uno de los factores más importantes que controlan el surgimiento de mareas rojas en aguas costeras.

En el medio marino las bacterias son generalmente consideradas como las principales productoras de vitamina B₁₂ en sedimentos y en la columna de agua, seguidas por algunas especies fitoplanctónicas que son capaces de producirla internamente y, por lo tanto, no requieren una fuente externa de esta vitamina (Swift, 1980). Normalmente hay suficiente vitamina B₁₂ disuelta en el medio para que el fitoplancton auxótrofo pueda alcanzar tasas máximas de crecimiento ($\mu_{\max}$) sin embargo, después de un florecimiento, la cantidad de vitamina puede variar, dependiendo de la presencia de bacterias, y dar lugar a una competencia entre auxótrofos. En este caso las especies particulares que se desarrollarán en la zona estarán determinadas por la influencia de la vitamina sobre la tasa específica de crecimiento de cada una (Swift, 1980). Esta es la importancia de la constante de afinidad o semisaturación (k_s) definida como la concentración de vitamina a la que una especie alcanza la mitad de su máxima tasa de crecimiento.

Es importante, por tanto, conocer los requerimientos vitamínicos específicos y su influencia sobre la tasa de crecimiento de las diferentes especies del fitoplancton (k_s), sobre todo las formadoras de marea roja; así como la distribución y dinámica de las vitaminas en el medio marino, como parte del conocimiento de las causas que originan estos fenómenos, que en ocasiones son tan dañinos para el hombre.

El género *Amphidinium* perteneciente a la familia Gymnodiniidae de los dinoflagelados desnudos, ha sido reportado como tóxico (Halstead, 1965) y productor de mareas rojas (Ikawa y Sasner, 1975; Fraga y Sánchez, 1979). *Amphidinium carteri* (Hulburt, 1957) es un dinoflagelado marino de aguas templadas y someras descrito por primera vez en la zona de Cape Cod, Massachusetts, en Estados Unidos. Requiere vitamina B₁₂ para su crecimiento (Carlucci y Silbernagel, 1969) y su respuesta es del tipo mamífero (Provasoli y Carlucci, 1974 citado por Swift, 1980).

En el presente trabajo se utilizaron cultivos cerrados, con medio f/2 de Guillard (1975), para probar el efecto que diferentes concentraciones de vitamina B₁₂ en el medio de cultivo tienen sobre la tasa de crecimiento (μ) y densidad final (N_f) de *Amphidinium carteri*; y así conocer su constante de semisaturación (k_s), es decir, cantidad de vitamina B₁₂ disuelta en el medio que necesita *A. carteri* para su crecimiento poblacional y duplicación celular.

I.I. Antecedentes.

Uno de los primeros trabajos realizados acerca del efecto de las concentraciones de vitamina B₁₂ sobre la tasa de crecimiento de las microalgas fue el realizado por Ford (1958), en el que observó que la crisofita *Ochromonas malhamensis* muestra una disminución de la tasa de división a una concentración de 13 ng B₁₂ l⁻¹.

Droop (1961, 1966 y 1968) realizó una serie de experimentos orientados a conocer las respuestas de la microalga *Monochrysis lutheri* hacia la vitamina B₁₂ en cultivos cerrados y quimiostatos. En el primero (1961) utilizó cultivos cerrados a tres temperaturas diferentes y observó que la producción final de todos los cultivos varió de manera directa con la concentración de vitamina B₁₂, lo cual dio como resultado que 1 ng de B₁₂ disuelta en el medio de cultivo pudo soportar una producción de 0.55×10^6 cel/ml, para un intervalo entre 0.1 y 100 ng B₁₂ l⁻¹; aunque no observó ninguna variación significativa en la tasa de división celular, en este mismo intervalo.

Droop (1966) utilizó un quimiostato de 250 ml para medir los parámetros del requerimiento de vitamina B₁₂ de *M. lutheri*; obtuvo una producción de 0.25×10^6 cel/ml para un ng de B₁₂ y una constante de semisaturación entre 2 y 6 ng B₁₂ ml⁻¹.

Droop (1968) utilizó vitamina B₁₂ marcada con ⁵⁷Co para estudiar detalladamente la cinética de asimilación, crecimiento e inhibición de la misma microalga; observó que el crecimiento específico de *M. lutheri* en los quimiostatos dependía directamente de la concentración intracelular de vitamina (cuota celular) más que de la externa, que la

absorción de la vitamina era más rápida que la asimilación, y que existía un inhibidor excretado por las mismas células, el que se unía a la vitamina haciéndola no disponible. Se encontró también que la excreción y sensibilidad a este inhibidor no eran específicas de cada especie ni estaban confinadas a algas que requieren vitamina B₁₂.

Swift y Taylor (1974) compararon la cinética de crecimiento de tres especies marinas de acuerdo a las concentraciones de B₁₂ y observaron diferentes características para estas especies. La constante de semisaturación fue 0.39 ng l⁻¹ para *Thalassiosira pseudonana*, 1.69 para *Isochrysis galbana* y 2.77 para *Monochrysis lutheri*; concluyeron que una cierta fase del ciclo de vida de estas especies podría estar limitada por la disponibilidad de vitamina.

Córdova-Ricardez (1988) realizó un experimento sobre el efecto de la cianocobalamina en *Tetraselmis suecica* pero no encontró diferencia significativa entre el crecimiento de la microalga con o sin la vitamina B₁₂.

Estudios recientes sobre la relación entre la vitamina B₁₂ y el desarrollo de las mareas rojas han sido realizados por Nishijima y Hata (1989), quienes estudiaron el requerimiento de vitamina B₁₂ de *Chatonella antiqua*, así como la dinámica de esta vitamina en el mar de Seto, Japón. Encontraron una constante de semisaturación de 0.05-0.35 ng l⁻¹ para *C. antiqua*, y concluyeron que, en ese lugar, el nivel de vitamina B₁₂ disuelta es un factor importante que controla la aparición de mareas rojas de *Chatonella*.

Granelli *et al.* (1993), determinaron las posibles causas de una marea roja de *Chrysochromulina polyepis* ocurrida en aguas Escandinavas, donde observaron que los números máximos de *C. polyepis* en cultivos se ven promovidos por el cobalto en forma iónica o en vitamina B₁₂.

Honjo (1993) afirmó que las mareas rojas de la raphidophyta *Heterosigma akashiwo*, que han incrementado su ocurrencia en aguas costeras debido a la eutroficación de éstas, requieren metales como hierro y manganeso, así como nitrógeno, fósforo y vitamina B₁₂ disueltos en el medio para su desarrollo.

Orellana-Cepeda *et al.* (1993) sugieren que la producción de vitaminas en zonas de descarga y de maricultivos, en las costas de Baja California, fomentan la dominancia de especies auxótrofas de dinoflagelados, que son los principales productores de mareas rojas en la región.

Acerca del dinoflagelado *Amphidinium carteri*, Ikawa y Taylor (1973), observaron mortalidad de peces en el sobrenadante de un cultivo de este organismo y encontraron que *A. carteri* contiene un alto porcentaje de cloruro de colina, en forma de 3 derivados de ésta, que pueden ser los responsables de la toxicidad de la especie.

Sampayo (1985) reportó que *A. carteri* también ha sido localizado en las costas de Portugal, donde sus florecimientos en estanques de cultivo de peces están asociados con mortalidad de los mismos. También se ha encontrado asociado a arrecifes coralinos en la

Polinesia Francesa (Fukuyo, 1981), y en Okinawa (Nakajima *et al.*, 1981), donde su toxicidad ha sido comprobada (Yasumoto *et al.*, 1980 y Nakajima *et al.*, 1981).

Tomas *et al.* (1989) estudiaron los efectos de diferentes fuentes de nitratos y fosfatos y de la temperatura sobre el crecimiento de *A. carteri*, aislado del Golfo de Nápoles y observaron que crece particularmente bien con urea, amonio y glicerofosfato, mientras que las densidades máximas varían directamente con la temperatura y la fuente de nitrógeno.

Sobre sus requerimientos vitamínicos, se sabe que necesita B₁₂, tiamina y biotina. Carlucci y Silbernagel (1969) probaron el efecto de las vitaminas B₁₂, tiamina y biotina sobre cultivos cerrados de *Cyclotella nana*, *Monochrysis lutheri* y *Amphidinium carteri* respectivamente. Encontraron que el número de células en todos los cultivos fue proporcional a las concentraciones de vitaminas.

De este estudio se obtuvo la constante de semisaturación (k_s) de *A. carteri* para biotina. En la revisión bibliográfica efectuada no se encontró ningún reporte de la constante de semisaturación (k_s) de esta especie, para la vitamina B₁₂.

En el departamento de microalgas, del Laboratorio de Acuicultura del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) se ha observado que *A. carteri* presenta efectos tóxicos sobre *Artemia sp.* (Valenzuela-Espinoza, comunicación personal).

El presente trabajo se ubica dentro del proyecto "Ecofisiología del fitoplancton costero" de la Universidad Autónoma de Baja California convenios CONACYT P220CCR-892410 y SEP-UABC 90-01-375.

I.II. Objetivo.

1) Determinar la tasa de crecimiento de *Amphidinium carteri* a diferentes concentraciones de vitamina B₁₂ en cultivos cerrados.

2) Determinar la constante de semisaturación (k_s) de vitamina B₁₂ para *A. carteri*.

II. METODOLOGIA.

II.I. Condiciones generales de los cultivos.

Se utilizó una cepa de *Amphidinium carteri* proporcionada por el departamento de microalgas del Laboratorio de Acuacultura del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO).

Los experimentos se realizaron en cultivos cerrados, en matraces erlenmeyer de vidrio de 250 ml de capacidad, con tapón de algodón y gasa. Todo el material de cristal se lavó con jabón libre de fosfatos, se dejó en ácido clorhídrico 5% durante 24 horas y se enjuagó con agua destilada y agua de mar esterilizada por UV.

El medio utilizado fue el f/2 de Guillard (1975). Los nutrientes utilizados fueron: nitratos, fosfatos, solución de metales traza con EDTA disódico y amortiguador TRIS. Para la preparación del medio de cultivo se utilizó 1 ml de solución stock de cada nutriente para 1000 ml de agua de mar. Las soluciones stock de los nutrientes fueron también proporcionadas por el laboratorio de microalgas del IIO

Todos los medios de cultivo se prepararon con agua de mar filtrada y pasada por UV. Posteriormente se esterilizaron en autoclave a 15 lb de presión por 10 minutos..

Para las manipulaciones de los cultivos en medio estéril, se utilizó una campana provista con lámparas de rayos ultravioleta (UV) del proyecto "Ecofisiología del fitoplancton costero".

II.II. Preparación de las soluciones stock de vitaminas.

Todas las soluciones stock se prepararon con agua destilada y desionizada. Las concentraciones de vitaminas del medio f/2 (Guillard, 1975) se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Concentración de las vitaminas en el medio de cultivo f/2.

Vitamina	En 1000 ml de agua de mar	En 100 ml de agua de mar (vol en matraces)
Biotina cristalina	0.5 µg ó 500 ng	0.05 µg ó 50 ng
Cianocobalamina cristalina (B ₁₂)	0.5 µg ó 500 ng	0.05 µg ó 50 ng
Clorhidrato de tiamina (B ₁)	0.1 mg ó 100 µg	0.01 mg ó 10 µg

Para obtener estas concentraciones finales en el medio de cultivo, primeramente se prepararon las soluciones stock concentradas de cada vitamina, con concentraciones 20,000 veces mayores que las del medio f/2.

Tabla II. Concentración de las soluciones stock de vitaminas.

Vitamina	Concentración
Biotina cristalina	10 mg l ⁻¹
Cianocobalamina cristalina (B ₁₂)	10 mg l ⁻¹
Clorhidrato de tiamina (B ₁)	2 g l ⁻¹

Para ello, se pesó en una balanza analítica 10 mg de biotina y B₁₂ y 2 g de tiamina. Cada una se disolvió y se aforó separadamente a 1000 ml de agua desionizada.

A continuación se preparó un stock secundario de biotina-tiamina. Se tomó 1 ml de las soluciones de biotina y tiamina y se aforó a 100 ml de agua desionizada.

Para la solución de B₁₂ se tomó 5 ml del stock primario y se aforó a 1000 ml de agua desionizada.

Tabla III. Concentración de las soluciones stock secundarias de vitaminas.

Vitamina	Concentración
Biotina cristalina	100 $\mu\text{g l}^{-1}$
Cianocobalamina cristalina (B ₁₂)	50 $\mu\text{g l}^{-1}$
Clorhidrato de tiamina (B ₁)	20 mg l^{-1}

Estas soluciones se transfirieron a viales de vidrio y se esterizaron en autoclave a 15 lb de presión por 5 minutos. Para la preparación de los medios de cultivo se agregaron, dentro de la campana irradiada con lámparas de UV, 0.5 ml de la solución de biotina-tiamina a cada matraz erlenmeyer con medio de cultivo ya esterilizado. De la solución de B₁₂ se agregaron distintos volúmenes de la solución stock secundaria, según la concentración a probar, siendo 1 ml el volumen de solución stock secundaria necesario para obtener la concentración de 500 ng l^{-1} , indicada por el medio f/2 (Guillard, 1975).

II.III. Experimento.

a) Aclimatación

Se llevó a cabo en matraces erlenmeyer (por duplicado) con 98 ml de medio de cultivo f/2 sin vitaminas, donde se inocularon, en medio estéril, 2 ml de la cepa de *A. carteri*.

Los matraces se colocaron en el cuarto de incubación a temperatura de 20 ± 1 °C y en condiciones de luz controladas; diariamente fueron agitados manualmente y se mantuvieron durante 10 días. Esto se hizo con el fin de que agotaran su reserva interna (pool) de vitaminas, la cual, en algunas especies puede ser conservada hasta por seis generaciones (Bladbeer, 1971, citado por Córdova-Ricardez, 1988).

b) Experimento

Se realizaron dos experimentos, en el primero se probaron las siguientes concentraciones iniciales de vitamina B₁₂ en el medio de cultivo: 0, 100, 200, 300 y 500 ng B₁₂ l⁻¹; la primera como blanco y la última como testigo, debido a que es la concentración de vitamina de enriquecimiento para el agua de mar en el medio f/2 de Guillard (1975). En el segundo experimento se probaron concentraciones menores de vitamina: 25, 50 y 100 ng B₁₂ l⁻¹.

En matraces erlenmeyer se colocaron 94 ml de medio enriquecido f/2 sin vitaminas, y se esterilizaron en autoclave. En medio estéril, se les agregaron 0.5 ml de la solución de biotina-tiamina, y los siguientes volúmenes de la solución de B₁₂.

Tabla IV. Concentraciones iniciales de vitamina B₁₂ probadas en los cultivos de *Amphidinium carteri*.

Volumen usado de la sol. stock	Concentración inicial en el medio
0 ml	0 ng l ⁻¹
0.05 ml	25 ng l ⁻¹
0.1 ml	50 ng l ⁻¹
0.2 ml	100 ng l ⁻¹
0.4 ml	200 ng l ⁻¹
0.6 ml	300 ng l ⁻¹
1.0 ml	500 ng l ⁻¹

A continuación se inocularon con 5 ml de las células previamente aclimatadas, provenientes de cultivos con densidades de 1,040,000 células/ml, para el primer experimento y 1,266,667 células/ml para el segundo. Todas las condiciones se probaron por triplicado. Los cultivos se colocaron en incubación a 21 ± 2 °C con irradiancia constante. Diariamente se homogenizaron manualmente.

En el primer experimento se tomó diariamente, a partir de las 69 horas, una muestra de 1 ml. Para el segundo experimento se tomó una muestra cada doce horas, de las 47 a las 139; y luego cada 24 horas de las 139 hasta las 259. Las muestras se preservaron con 2 gotas de fijador Uthermöhl. En la figura 1 puede observarse un diagrama de flujo, que ilustra lo descrito anteriormente.

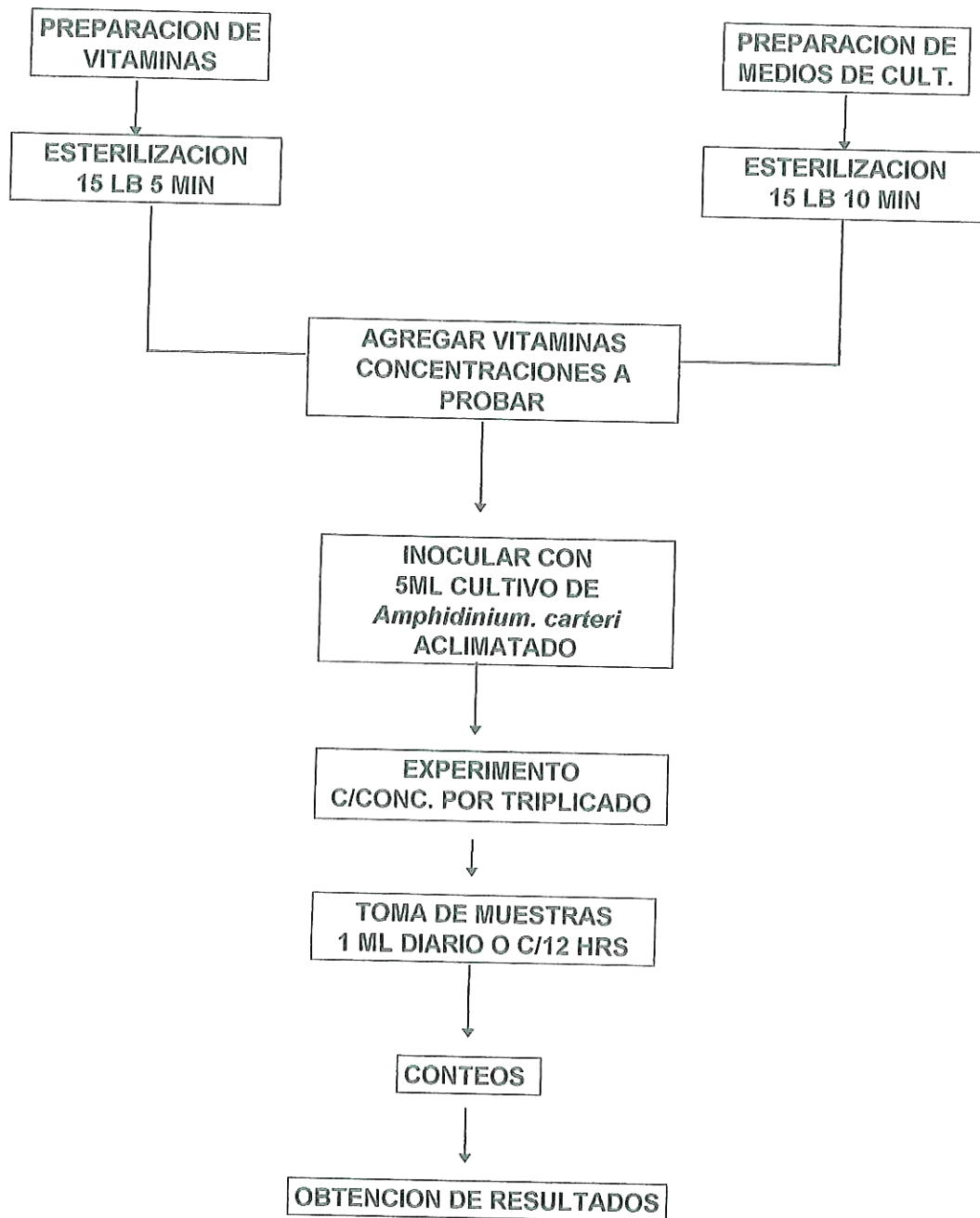


Figura 1. Diseño de los experimentos para probar el efecto de diferentes concentraciones de vitamina B₁₂ sobre el crecimiento poblacional del dinoflagelado *Amphidinium carteri*.

II.IV. Obtención de parámetros poblacionales y requerimiento vitamínico.

II.IV.I. Conteos

Las células se contaron al microscopio compuesto con un objetivo de 10 aumentos en cámaras de conteo Neubauer de 0.1 mm de profundidad. De cada muestra se contaron seis submuestras y se obtuvo un promedio. Se realizó un conteo de tipo sistemático y se obtuvo el número de células por mililitro (Guillard, 1978).

Se graficó el logaritmo natural del número de células por mililitro ($\ln(N)$) contra el tiempo (en horas) de cultivo. Se buscó diferenciar gráficamente las siguientes fases: 1) una fase de latencia en la cual aparentemente no existe un aumento en el número de células 2) una fase exponencial en la cual la multiplicación de células es rápida y los números incrementan en progresión geométrica 3) una fase de declinación relativa del crecimiento 4) una fase en la que el número de células permanece mas o menos estacionario, y 5) una fase de muerte (Fogg, 1975).

II.IV.II. Parámetros poblacionales

Se obtuvieron los siguientes parámetros para la fase de crecimiento exponencial de cada réplica de cada condición de cultivo.

Se calculó la tasa específica de crecimiento μ , como:

$$\mu = \frac{\ln(N_2) - \ln(N_1)}{t_2 - t_1}$$

donde: N_1 es el número de células al principio de la fase de crecimiento exponencial; N_2 el número de células al final de la fase exponencial y t_1 y t_2 son el tiempo inicial y final de esta fase.

Si μ se calcula con logaritmo base 2 de N ; la tasa específica de crecimiento (μ) es equivalente al número de duplicaciones por día, (D) (Guillard, 1973). Para convertir la tasa de crecimiento calculada con logaritmo natural (μ) a número de duplicaciones diarias, ésta se divide entre el logaritmo natural de 2:

$$D = \frac{\mu}{\ln(2)} = \frac{\mu}{0.693}$$

El tiempo de duplicación G es el valor recíproco de D (IDEM):

$$G = \frac{1}{D}$$

La densidad final, N_f de cada cultivo se calculó como el promedio del número de células en toda la fase estacionaria de cada condición de concentración de vitamina B_{12} .

II.IV.III. Requerimiento vitamínico.

Droop (1961), expresa que, de acuerdo a la ecuación de Monod, la relación entre la concentración de un nutriente limitante (S) y el crecimiento relativo de una especie (μ) es:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S}$$

donde k_s es equivalente a la concentración necesaria para alcanzar la mitad de la máxima tasa específica de crecimiento, $\mu_{\max}$ (McCarthy, 1981).

Gracias al uso de este modelo se utilizan los parámetros k_s (constante de semisaturación) y $\mu_{\max}$ para expresar los requerimientos específicos de los organismos por un nutriente dado.

Para determinar dichos parámetros en el presente trabajo, se graficó la tasa específica de crecimiento contra la concentración inicial de vitamina B₁₂. Se aplicó la transformación de Wolf (Droop, 1966; McCarthy, 1981; Nishijima y Hata, 1986,a):

$$\frac{S}{\mu} = \frac{1}{\mu_{\max}} S + \frac{k_s}{\mu_{\max}}$$

S y k_s en ng B₁₂ l⁻¹

μ y $\mu_{\max}$ en días⁻¹

De donde por una regresión lineal de mínimos cuadrados se obtuvieron $\mu_{\max}$ y k_s .

II.V. Tratamiento estadístico.

Se comprobó la validez de las réplicas por medio de un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia $\alpha=0.05$ realizado en el paquete Statistica Ver 4.2. Se eligió utilizar una prueba no paramétrica porque el número de observaciones, o conteos es pequeño ($n=6$) y además no se puede suponer

normalidad de las muestras; por lo tanto es más eficaz en este caso la aplicación de una prueba no paramétrica (Siegel, 1990).

Una vez comprobada la validez de las réplicas se calculó el valor promedio del número de células por mililitro en cada réplica. Se realizó un análisis de varianza similar entre los días de cultivo, para detectar estadísticamente la fase de crecimiento exponencial en cada condición de cultivo.

Una vez definida la fase de crecimiento exponencial, tanto por método gráfico como estadístico, se sacaron los parámetros poblacionales antes mencionados para cada condición de cultivo.

Se aplicó otro análisis de varianza de Kruskal-Wallis a los parámetros de μ y N_t , para observar si existían diferencias entre las 7 diferentes concentraciones de vitamina B₁₂.

III. RESULTADOS.

El crecimiento poblacional de *Amphidinium carteri* cultivado con siete diferentes concentraciones iniciales de vitamina B₁₂ se observa en las figuras 2 a la 9, donde se graficó el logaritmo natural del número de células contra las horas del cultivo.

El análisis estadístico demostró que no existieron diferencias significativas entre las réplicas, excepto en la réplica 1 del cultivo que creció en medio con 25 ng B₁₂ l⁻¹. Esta réplica se eliminó de los análisis posteriores.

Para la condición de ausencia de vitamina B₁₂ en el medio de cultivo (figura 2) es posible observar una curva de crecimiento limitado, en la que no se distingue claramente una fase exponencial y con tasa de crecimiento y densidad final menores que en las demás figuras.

El análisis gráfico y estadístico comprobó que la fase exponencial era aproximadamente de las 47 a las 114 horas. La fase de retraso del crecimiento exponencial fue a las 139 y 114 horas, y a partir de ahí siguió la fase estacionaria (Tablas V - XII).

Los parámetros poblacionales obtenidos para cada condición de cultivo, se resumen en la Tabla XIII. La mayor tasa de crecimiento (μ) fue de 0.62 días⁻¹, con un tiempo de duplicación de 1.12 días y 0.89 duplicaciones diarias, para el cultivo con 200 ng B₁₂ l⁻¹. La menor tasa de crecimiento fue de 0.27 días⁻¹ con un tiempo de duplicación de 2.51 días y 0.39 duplicaciones diarias para del cultivo sin vitamina. Las tasas de crecimiento fueron muy semejantes entre sí a partir de los 100 ng B₁₂ l⁻¹,

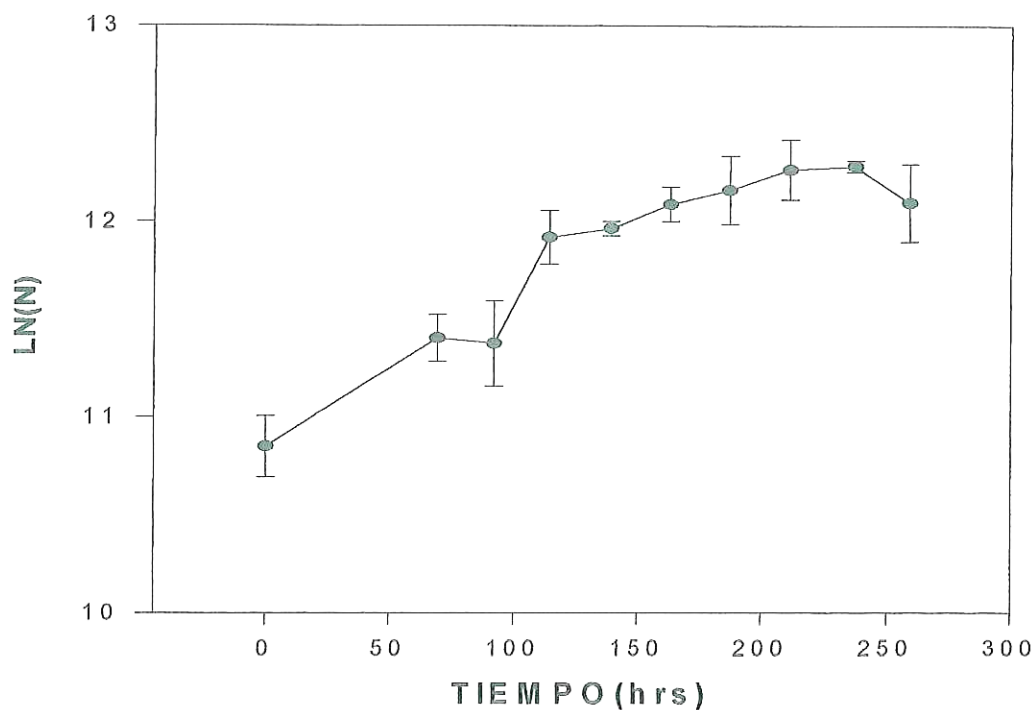


Figura 2. Crecimiento poblacional de *Amphidinium carteri* con 0 ng B₁₂ l⁻¹ (promedio de las réplicas $\pm$ desviación estándar).

Tabla V. Crecimiento poblacional de *Amphidinium carteri* con 0 ng B₁₂ l⁻¹

Tiempo (horas)	Réplica a cel/ml	Réplica b cel/ml	Réplica c cel/ml	PROM cel/ml	DS
0	52000	52000	52000	52000	7416.198*
69	78000	96851.85	95111.11	89987.6533	8506.28859
92	74444.44	112037	79629.63	88703.69	16634.3834
114	165000	160000	128333.3	151111.1	16235.1703
139	164000	154000	153333.3	157111.1	4878.78603
163	171666.7	196666.7	166666.7	178333.367	13123.3465
187	156666.7	216000	206666.7	193111.133	26050.274
211	180000	243333.3	218333.3	213888.867	26046.0037
237	213333.3	211666.7	223333.3	216111.1	5151.99111
259	220000	148000	176666.7	181555.567	29596.4611
$\mu_{(69-114)}$	0.3996	0.2676	0.1598	0.2756	0.098

* Desviación estándar de los conteos.

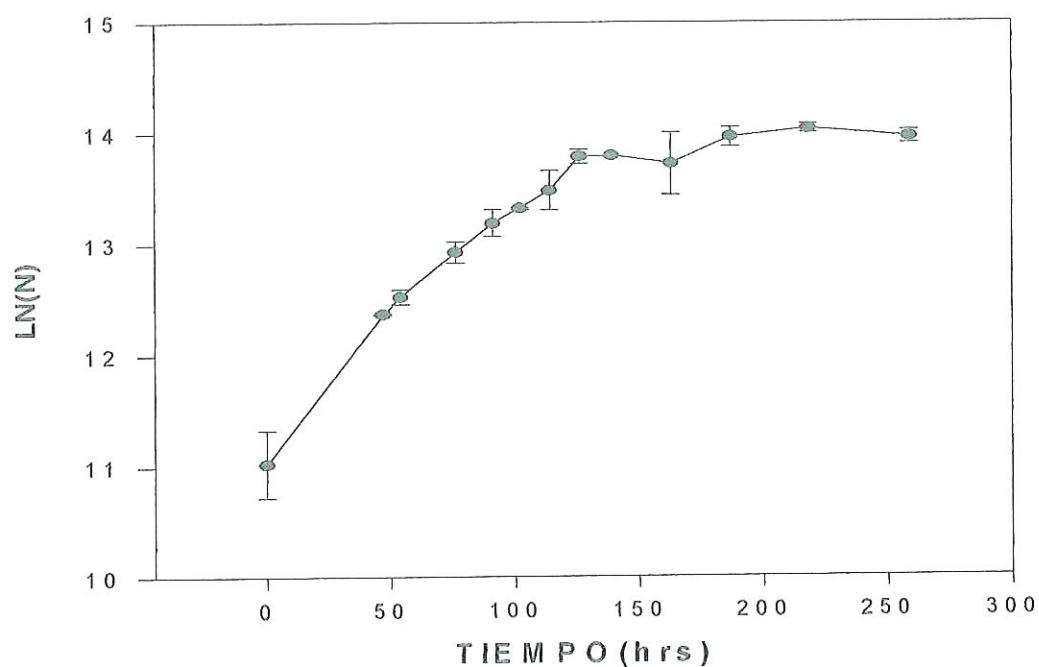


Figura 3. Crecimiento poblacional de *Amphidinium carteri* con 25 ng B₁₂ l⁻¹ (promedio de las réplicas $\pm$ desviación estándar).

Tabla VI. Crecimiento poblacional de *Amphidinium carteri* con 25 ng B₁₂ l⁻¹

Tiempo (horas)	Réplica b cel/ml	Réplica c cel/ml	PROM cel/ml	DS	Fase
0	63333.35	63333.35	63333.35	14907.12*	
47	236666.7	235000	235833.35	833.35	exp
54	288333.3	263333.3	275833.3	12500	exp
76	441666.7	385000	413333.35	28333.35	exp
91	583333.3	491666.7	537500	45833.3	exp
102	616666.7	608333.3	612500	4166.7	exp
114	633333.3	816666.7	725000	91666.7	retraso
126	1020000	933333.3	976666.65	43333.35	est
139	983333.3	983333.3	983333.3	0	est
163	1116667	750000	933333.5	183333.5	est
187	1091667	1233333	1162500	70833	est
218	1216667	1283333	1250000	33333	est
259	1108333	1208333	1158333	50000	est
$\mu(47-102)$	0.4178	0.4149	0.4164	.0014	

* Desviación estándar de los conteos.

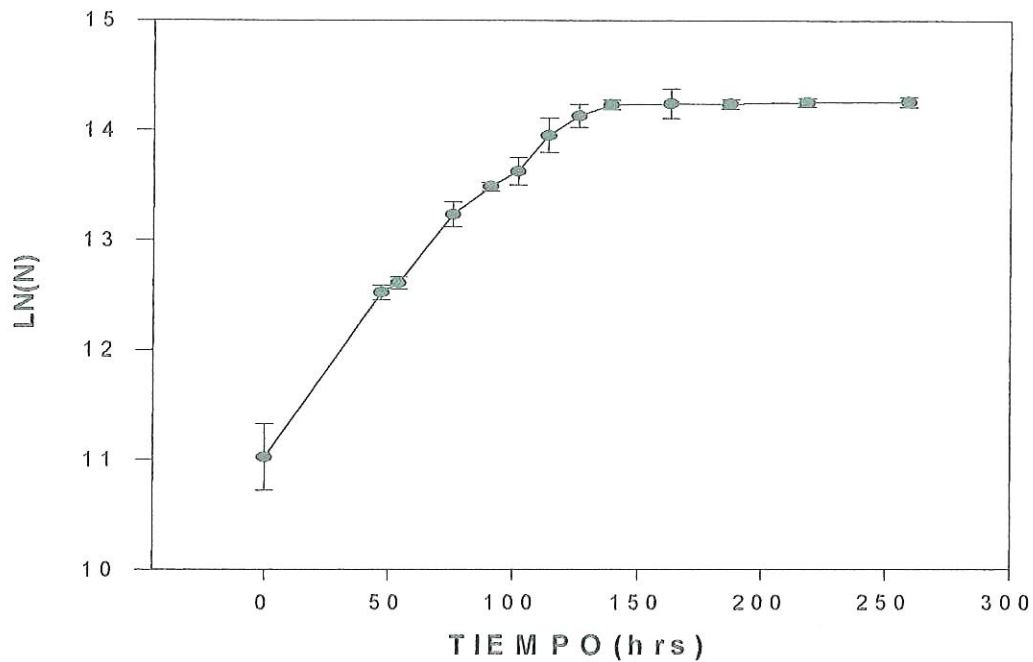


Figura 4. Crecimiento poblacional de *Amphidinium carteri* con 50 ng B₁₂ l⁻¹ (promedio de las réplicas $\pm$ desviación estándar).

Tabla VII. Crecimiento poblacional de *Amphidinium carteri* con 50 ng B₁₂ l⁻¹.

Tiempo (horas)	Réplica a cel/ml	Réplica b cel/ml	Réplica c cel/ml	PROM cel/ml	DS	Fase
0	63333.35	63333.35	63333.35	63333.35	14907.12*	
47	271666.7	256666.7	293333.3	273888.9	15051.3237	exp
54	290000	316666.7	288333.3	298333.333	12981.4925	exp
76	583333.3	604000	490000	559111.1	49591.9095	exp
91	700000	708333.3	750000	719444.433	21872.2497	exp
102	950000	783333.3	758333.3	830555.533	85074.4202	exp
114	1366667	1016667	1083333	1155555.67	151738.998	retraso
126	1541667	1283333	1291667	1372222.33	119863.77	est
139	1566667	1541667	1441667	1516667	54006.1725	est
163	1691667	1316667	1608333	1538889	160775.417	est
187	1591667	1466667	1525000	1527778	51068.8291	est
218	1600000	1566667	1483333	1550000	49065.5269	est
259	1633333	1491667	1550000	1558333.33	58134.3113	est
$\mu_{(47-102)}$	0.5462	0.4867	0.4144	0.4824	0.0538	

* Desviación estándar de los conteos.

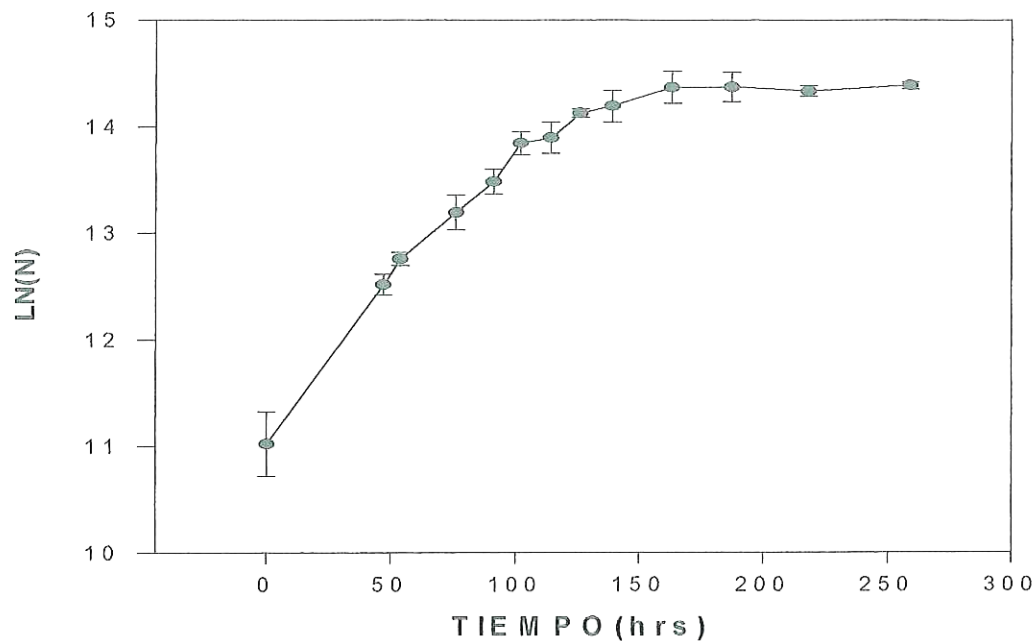


Figura 5. Crecimiento poblacional de *Amphidinium carteri* con 100 ng B₁₂ l⁻¹ (promedio de las réplicas $\pm$ desviación estándar).

Tabla VIII. Crecimiento poblacional de *Amphidinium carteri* con 100 ng B₁₂ l⁻¹.

Tiempo (horas)	Réplica a cel/ml	Réplica b cel/ml	Réplica c cel/ml	PROM cel/ml	DS	Fase
0	63333.35	63333.35	63333.35	63333.35	14907.12*	
47	243333.3	286666.7	290000	273333.333	21256.8298	exp
54	330000	340000	371666.7	347222.233	17760.4235	exp
76	558333.3	450000	616666.7	541666.667	69054.4699	exp
91	800000	633333.3	725000	719444.433	68154.7037	exp
102	925000	1025000	1150000	1033333.33	92044.6751	exp
114	991666.7	1000000	1283333	1091666.57	135571.327	retraso
126	1316667	1358333	1416667	1363889	41013.4275	est
139	1458333	1258333	1691667	1469444.33	177082.251	est
163	1591667	1600000	2066667	1752778	221979.11	est
187	1491667	1916667	1858333	1755555.67	188111.023	est
218	1691667	1591667	1758333	1680555.67	68493.2366	est
259	1825000	1791666	1711667	1776111	47557.4091	est
$\mu_{(47-102)}$	0.5827	0.5558	0.6012	0.5799	0.0186	

* Desviación estándar de los conteos.

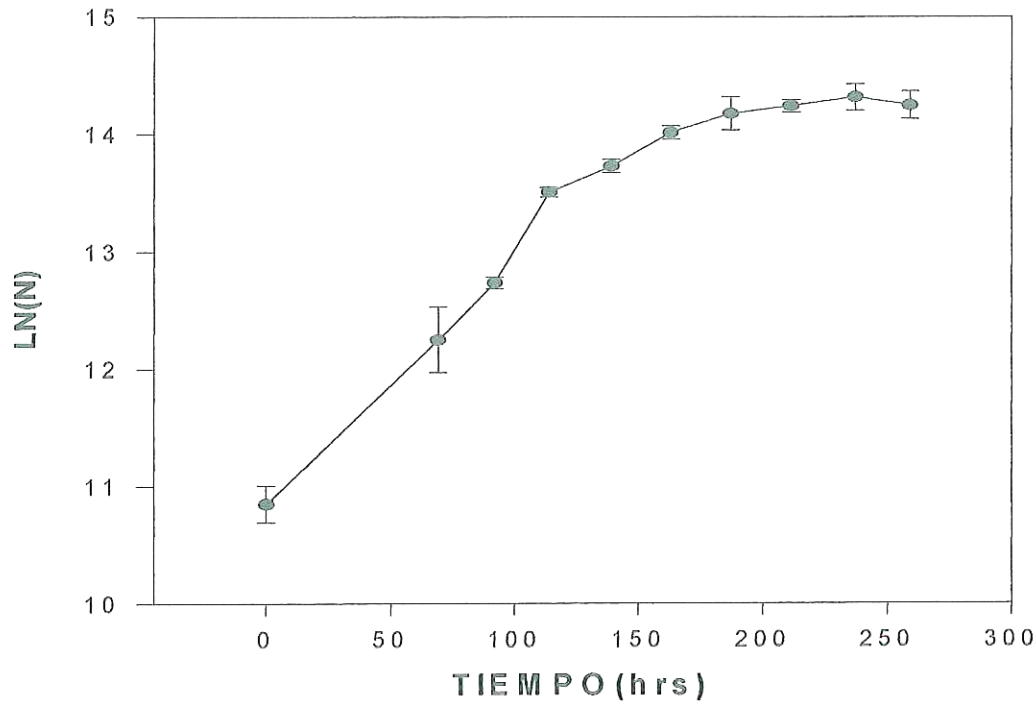


Figura 6. Crecimiento poblacional de *Amphidinium carteri* con 100 ng B₁₂ l⁻¹ (promedio de las réplicas $\pm$ desviación estándar).

Tabla IX. Crecimiento poblacional de *Amphidinium carteri* con 100 ng B₁₂ l⁻¹.

Tiempo (horas)	Réplica a cel/ml	Réplica b cel/ml	Réplica c cel/ml	PROM cel/ml	DS	Fase
0	52000	52000	52000	52000	7416.198*	
69	235000	151666.7	255000	213888.9	44748.9414	exp
92	321666.7	345000	354000	340222.233	13625.4875	exp
114	766666.7	708333.3	725000	733333.333	24532.6955	exp
139	858333.3	950000	941666.7	916666.667	41387.9791	retraso
163	1183333	1300000	1175000	1219444.33	57062.9553	est
187	1558333	1550000	1216667	1441666.67	159135.157	est
211	1508333	1466667	1625000	1533333.33	67012.9203	est
237	1820000	1458333	1683333	1653888.67	149110.655	est
259	1558333	1358333	1725000	1547222	149897.216	est
$\mu(69-114)$	0.6384	0.822**	0.5572	0.5938	0.0015	

* Desviación estándar de los conteos.

** Esta tasa de crecimiento se eliminó de análisis posteriores por considerarse demasiado alta.

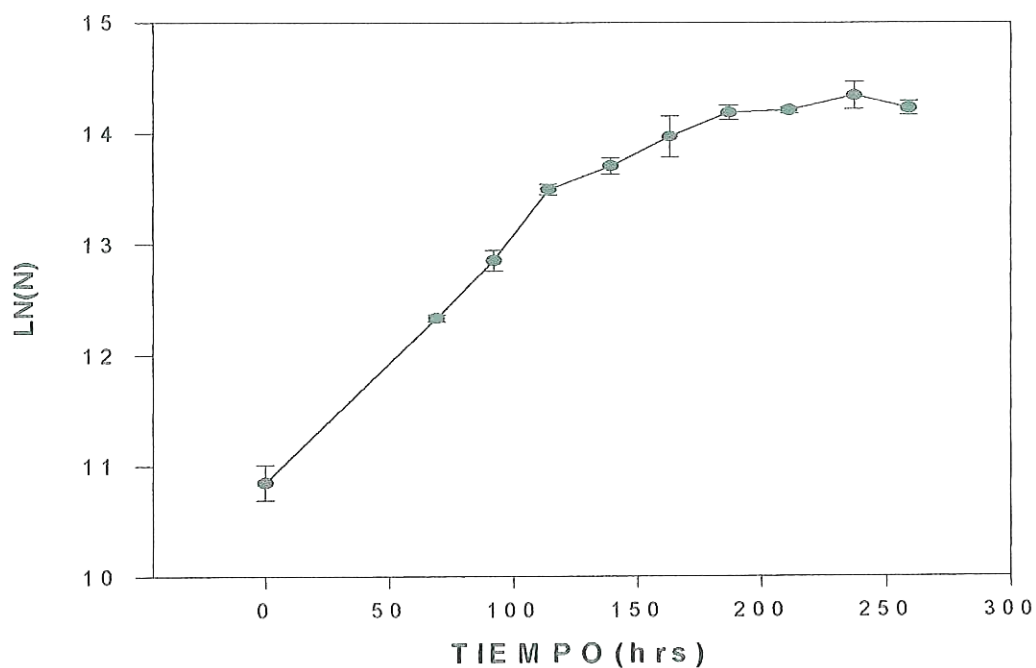


Figura 7. Crecimiento poblacional de *Amphidinium carteri* con 200 ng B₁₂ l⁻¹ (promedio de las réplicas $\pm$ desviación estándar).

Tabla X. Crecimiento poblacional de *Amphidinium carteri* con 200 ng B₁₂ l⁻¹.

Tiempo (horas)	Réplica a cel/ml	Réplica b cel/ml	Réplica c cel/ml	PROM cel/ml	DS	Fase
0	52000	52000	52000	52000	7416.198*	
69	235000	225000	221666.7	227222.233	5665.56634	exp
92	343750	400000	408333.3	384027.767	28683.1523	exp
114	693750	725000	762500	727083.333	28105.7033	exp
139	900000	830000	958333.3	896111.1	52463.9662	retraso
163	975000	1158333	1408333	1180555.33	177603.953	est
187	1358333	1550000	1450000	1452777.67	78272.3719	est
211	1450000	1525000	1466667	1480555.67	32155.0545	est
237	1466667	1800000	1833333	1700000	165551.581	est
259	1591667	1408333	1533333	1511111	76477.4557	est
$\mu_{(69-114)}$	0.5904	0.624	0.6588	0.6244	0.279	

* Desviación estándar de los conteos.

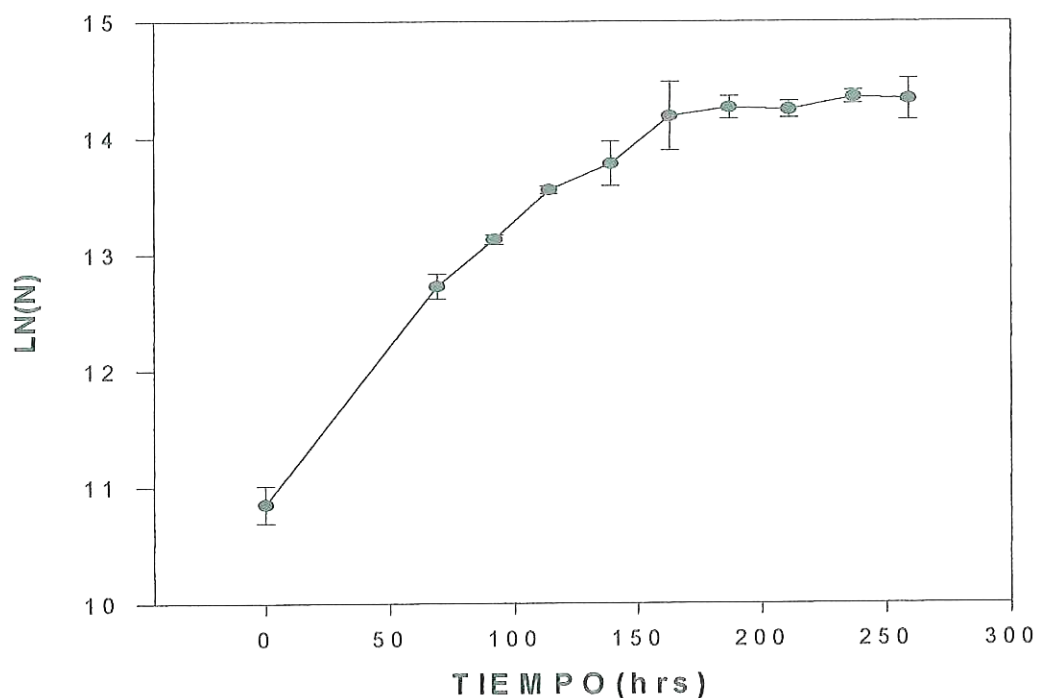


Figura 8. Crecimiento poblacional de *Amphidinium carteri* con 300 ng B₁₂ l⁻¹ (promedio de las réplicas $\pm$ desviación estándar).

Tabla XI. Crecimiento poblacional de *Amphidinium carteri* con 300 ng B₁₂ l⁻¹.

Tiempo (horas)	Réplica a cel/ml	Réplica b cel/ml	Réplica c cel/ml	PROM cel/ml	DS	Fase
0	52000	52000	52000	52000	7416.198*	
69	371666.7	340000	300000	337222.233	29323.6647	exp
92	516666.7	480000	511666.7	502777.8	16235.1703	exp
114	743750	781250	791666.7	772222.233	20577.1388	exp
139	850000	875000	1200000	975000	159426.054	retraso
163	1050000	1858333	1558333	1488888.67	333633.977	est
187	1408333	1708333	1575000	1563888.67	122726.244	est
211	1483333	1666667	1458333	1536111	92879.4985	est
237	1616667	1691667	1808333	1705555.67	78861.208	est
259	1491667	2050000	1533333	1691666.67	253950.254	est
$\mu(0-92)$	0.599	0.5798	0.5964	0.5917	0.0084	

* Desviación estándar de los conteos.

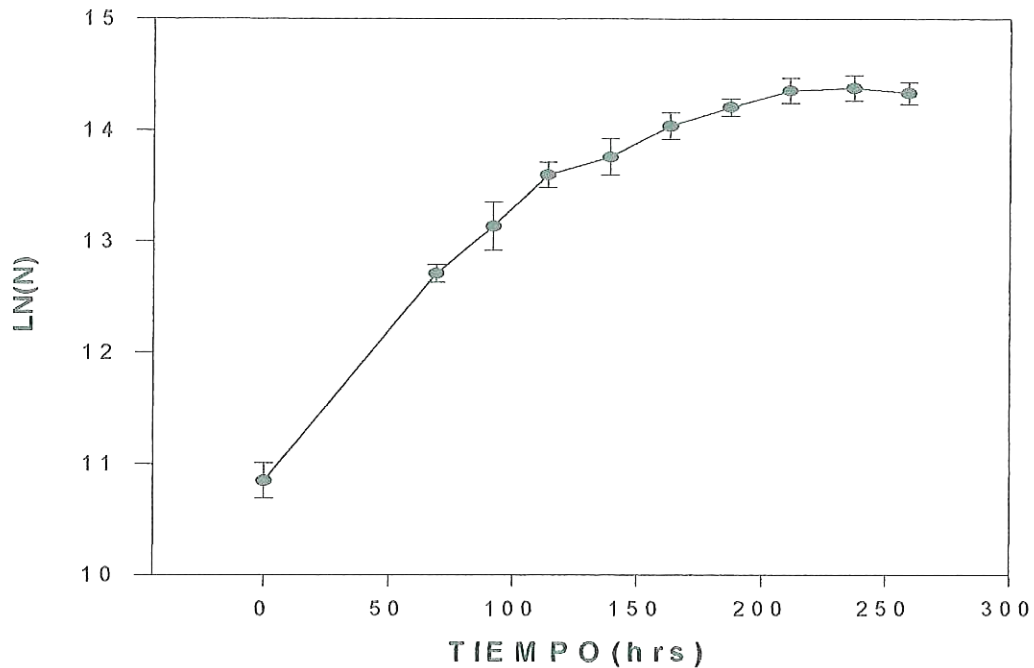


Figura 9. Crecimiento poblacional de *Amphidinium carteri* con 500 ng B₁₂ l⁻¹ (promedio de las réplicas $\pm$ desviación estándar).

Tabla XII. Crecimiento poblacional de *Amphidinium carteri* con 500 ng B₁₂ l⁻¹.

Tiempo (horas)	Réplica a cel/ml	Réplica b cel/ml	Réplica c cel/ml	PROM cel/ml	DS	Fase
0	52000	52000	52000	52000	7416.198*	
69	310000	325000	361666.7	332222.233	21702.2651	exp
92	395000	573333.3	575000	514444.433	84462.7096	exp
114	750000	758333.3	916666.7	808333.333	76678.766	exp
139	791666.7	975000	1091667	952777.9	123478.504	retraso
163	1116667	1233333	1416667	1255555.67	123478.433	est
187	1366667	1591667	1500000	1486111.33	92379.3675	est
211	1866667	1808333	1508333	1727777.67	156987.654	est
237	1541667	1916667	1841667	1766667	162018.517	est
259	1683333	1525000	1858333	1688888.67	136139.319	est
$\mu(0-92)$	0.5289	0.6261	0.6268	0.594	0.0459	

* Desviación estándar de los conteos.

Tabla XIII. Efecto de la concentración inicial de vitamina B₁₂ en el medio de cultivo, sobre la tasa de crecimiento (μ), el tiempo de duplicación (G), el número de duplicaciones diarias (D) y la densidad final (N_f) de los cultivos de *Amphidinium carteri*.

S ng B ₁₂ l ⁻¹	μ días ⁻¹	DS	G días	D días ⁻¹	N _f cel/ml	DS
0	0.2756	0.098	2.51	0.39	190600	36966.81
25	0.4164	0.0014	1.66	0.60	1077661	152226.7
50	0.4824	0.0538	1.44	0.70	1510648	115533.9
100	0.5799	0.0186	1.20	0.84	1633056	220667.6
100	0.5938	0.036	1.17	0.86	1481889	194654.6
200	0.6244	0.0279	1.12	0.89	1469800	211881.3
300	0.5917	0.0084	1.17	0.85	1597222	228167
500	0.594	0.0459	1.17	0.86	1585000	243062.5

Las densidades finales (N_f) de los cultivos fueron desde 190,600 células/ml para la condición de 0 ng B_{12} l⁻¹ hasta 1,633,056 células/ml en el cultivo con 100 ng B_{12} l⁻¹.

El análisis de varianza demostró que sí existen diferencias significativas entre los valores de μ y N_f con respecto a las distintas concentraciones iniciales de vitamina B_{12} (Tablas XIII y XIV).

La densidad final, N_f , en los cultivos de *Amphidinium carteri*, respecto a la concentración inicial de vitamina B_{12} (S) en el medio de cultivo se comportó con la forma de una parábola donde la densidad final aumenta de forma rápida con la concentración de B_{12} hasta llegar a una concentración de alrededor de 50 ng B_{12} l⁻¹, a partir de la cual las densidades se mantienen casi constantes (figura 10). Esto significa que a concentraciones de vitamina menores a los 50 ng l⁻¹, las densidades de *Amphidinium carteri* pueden depender de la cantidad de vitamina B_{12} disuelta en el medio.

Al graficar las tasas específicas de crecimiento (μ) contra S se obtuvo también una parábola rectangular, de acuerdo al modelo de Monod (figura 11), la que, transformada por la linearización de Wolf dio una recta con la siguiente ecuación:

$$S/\mu = 7.5176 S + 1.6576$$

donde:

$$1.6576 = 1/\mu_{\max},$$

$$7.5176 = K_s/\mu_{\max}.$$

Tabla XIV. Análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, para detectar diferencias entre las densidades finales en los cultivos de *Amphidinium carteri* a diferentes concentraciones iniciales de vitamina B₁₂, con un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

H₀: No hay diferencia significativa entre las densidades finales de las diferentes concentraciones iniciales de B₁₂.

STAT.	ANOVA por Rangos		
	Prueba de Kruskal-Wallis: $H(6, N=22) = 13.4907$ $p=0.0359$		
N _r	Conc. B ₁₂	Número de réplicas	Suma de rangos
Grupo 1	0	3	6.00000
Grupo 2	25	2	9.00000
Grupo 3	50	3	35.00000
Grupo 4	100	5	75.00000
Grupo 5	200	3	31.00000
Grupo 6	300	3	46.00000
Grupo 7	500	3	51.00000

Tabla XV. Análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, para detectar diferencias entre las tasas específicas de crecimiento de *Amphidinium carteri* cultivado a diferentes concentraciones iniciales de vitamina B₁₂, con un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

H₀: No hay diferencia significativa entre las tasas específicas de crecimiento de las diferentes concentraciones iniciales de B₁₂.

STAT.	ANOVA por Rangos		
	Prueba de Kruskal-Wallis: $H(6, N=22) = 15.29960$ $p=0.0181$		
μ	Conc. B ₁₂	Número de réplicas	Suma de rangos
Grupo 1	0	3	6.00000
Grupo 2	25	2	11.00000
Grupo 3	50	3	20.00000
Grupo 4	100	5	73.00000
Grupo 5	200	3	52.00000
Grupo 6	300	3	44.00000
Grupo 7	500	3	47.00000

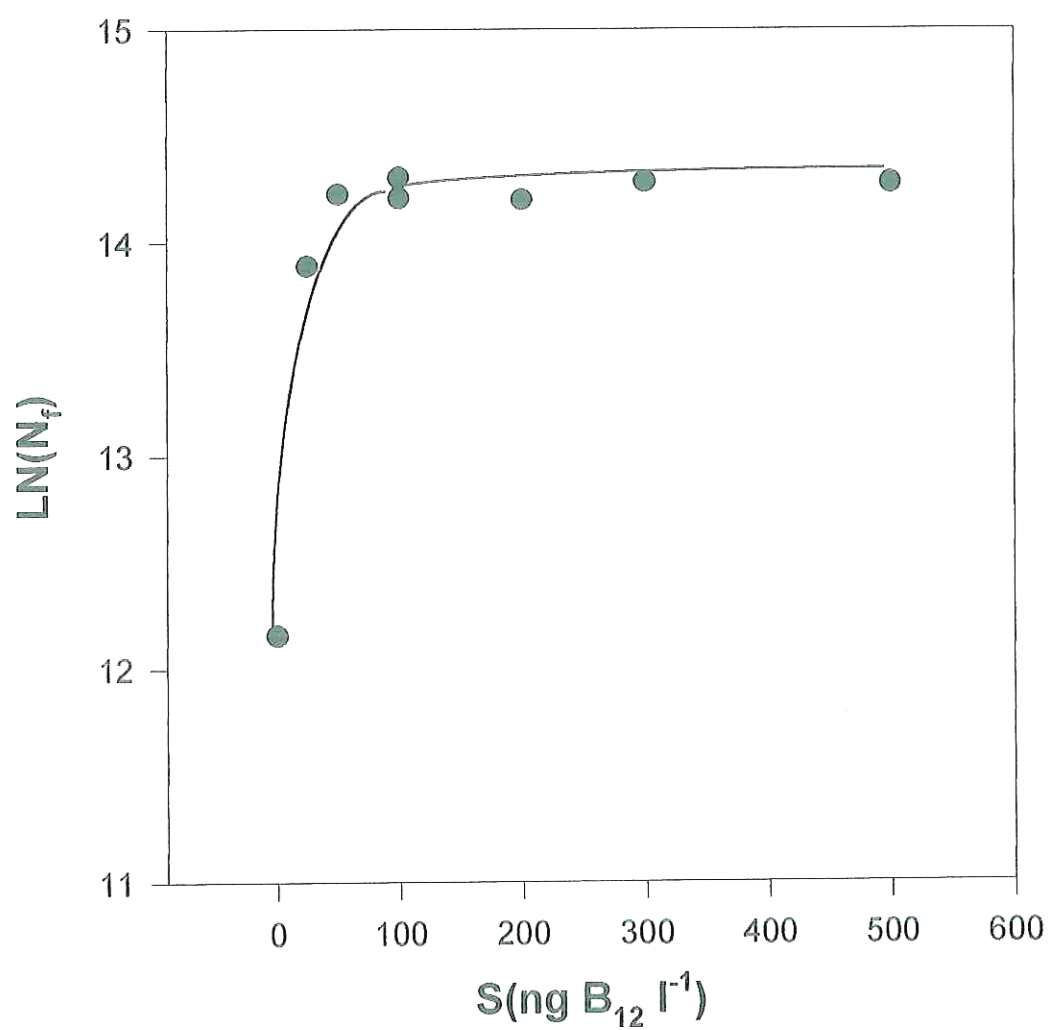


Figura 10. Efecto de la concentración inicial de vitamina B₁₂ sobre la densidad final de *Amphidinium carteri* en cultivos cerrados.

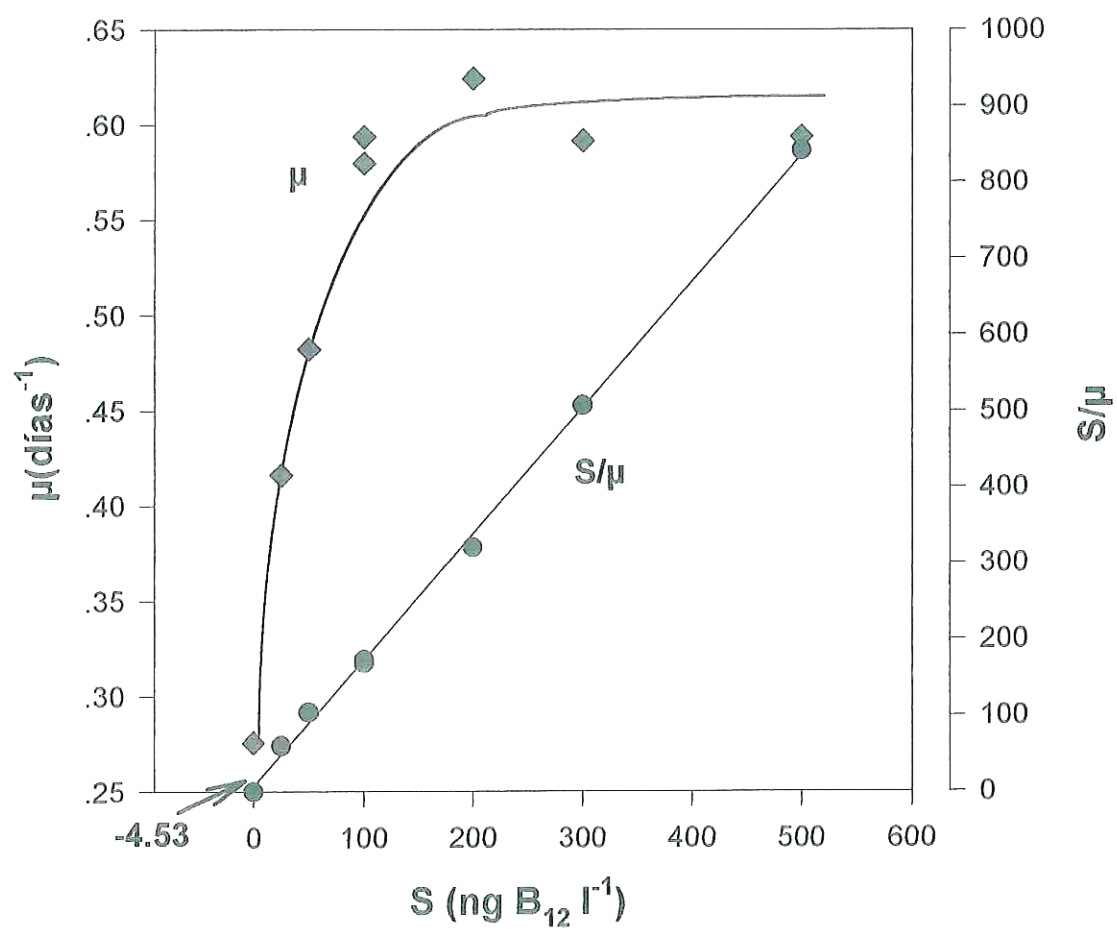


Figura 11. Efecto de la concentración inicial de vitamina B₁₂ sobre la tasa específica de crecimiento de *Amphidinium carteri* en cultivos cerrados; y obtención de k_s y μ_{max} .

Despejando la ecuación anterior se obtuvieron los resultados de los parámetros buscados:

$$\mu_{\max} = 0.6033 \text{ días}^{-1}$$

$$k_s = 4.5352 \text{ ng B}_{12} \text{ l}^{-1}$$

La máxima tasa de crecimiento $\mu_{\max} = 0.6033 \text{ días}^{-1}$ coincide con las tasas obtenidas en el experimento, en los cultivos con concentraciones iniciales de vitamina B₁₂ iguales o mayores que 100 ng l^{-1} (Tabla XII).

Por otro lado la constante de semisaturación (k_s) o afinidad por el compuesto, es decir, la concentración de vitamina a la que se logra la mitad de la máxima tasa de crecimiento, se obtuvo a los 4.5 ng l^{-1} de vitamina, esto significa que *Amphidinium carteri* se verá limitado en su crecimiento poblacional a concentraciones de vitamina B₁₂ menores a 4.5 ng l^{-1} .

IV. DISCUSIONES.

La concentración de vitamina B₁₂ disuelta inicialmente en el medio de cultivo determinó a la tasa específica de crecimiento según un modelo de Michaelis-Menten y a la densidad final en los cultivos de *Amphidinium carteri*. En contraste, la duración de la fase de crecimiento exponencial no se vio afectada por las concentraciones bajas de vitamina, a diferencia de lo reportado por Droop (1961) para *Monochrysis lutheri* y por Carlucci y Silbernagel (1969) para el mismo *A. carteri* cultivado con diferentes concentraciones de biotina.

De acuerdo a la ecuación de Monod, mientras los números de células en el medio de cultivo sean suficientemente pequeños para no afectar apreciablemente la concentración de un nutriente, la tasa relativa de crecimiento se mantendrá constante, aunque la concentración del nutriente sea limitante (Droop, 1961). Esto significa que una concentración baja de vitamina puede no limitar el crecimiento cuando la densidad celular sea baja, pero si limitarlo cuando los organismos tengan una densidad mayor.

El hecho de que en el presente trabajo, las tasas relativas de crecimiento sí se hayan visto afectadas, por la concentración de vitamina, significa que las concentraciones iniciales de 0 a 50 ng l⁻¹, fueron limitantes desde el principio de la fase de crecimiento exponencial de los cultivos (momento en que se tomaron las primeras muestras). Con esto se comprueba la hipótesis de que una baja concentración de vitamina B₁₂ en el medio es

un factor limitante del crecimiento de *Amphidinium carteri*, ya que disminuye su tasa de reproducción.

Carlucci y Silbernagel (1969) encontraron que los números de células de *Amphidinium carteri* eran similares en todas las concentraciones de biotina probadas durante los primeros días, y después las células se multiplicaban mas rápidamente en los cultivos con 4 y 5 ng l⁻¹. Al término del experimento, después de 7 días las células seguían dividiéndose en el cultivo con 5 ng Biotina l⁻¹, pero no en los demás.

En comparación, en este experimento, la duración de las fases fue la misma para todas las concentraciones de vitamina, aunque para el medio sin vitamina B₁₂, la fase exponencial no es clara. Esto significa que la causa del final de la fase de crecimiento exponencial no fue solamente el agotamiento de la vitamina B₁₂ del medio. Sin embargo, las densidades finales en los cultivos si fueron dependientes de la concentración inicial de vitamina, aunque no de manera lineal, como lo observado por Droop (1961), sino en forma de una parábola rectangular (Figura 10).

Un comportamiento lineal de los números finales de células en un cultivo con respecto a la concentración de un nutriente limitante, es muestra de que la fase exponencial terminó por agotamiento del nutriente; este principio se aplica como base de los bioensayos para cuantificar las vitaminas en el agua de mar (Fogg, 1975). Por lo tanto, del presente estudio puede sugerirse que *Amphidinium carteri* puede ser usado para este efecto, para determinar concentraciones de vitamina menores de 50 ng l⁻¹.

Según el presente estudio, la cantidad de vitamina B₁₂ necesaria para maximizar las densidades finales de *A. carteri* es de 50 ng l⁻¹. Esta concentración es alta comparada con la de otras especies productoras de marea roja, como *Chatonella antiqua* y el dinoflagelado *Prorocentrum micans*, que requieren entre 10 y 20 ng B₁₂ l⁻¹ (Nishijima y Hata, 1986a y Iwasaki e Iwasa, 1982) y la criptofita de agua dulce *Plagioselmis* sp. que produce mareas rojas en el Río Nakasuji de Japón y requiere 0.05 ng B₁₂ l⁻¹ para maximizar su densidad y tasa de crecimiento (Nishijima, *et al.*, 1990).

El requerimiento vitamínico de *Amphidinium carteri* se expresa también como su k_s y μ_{max} . En este trabajo se obtuvieron $k_s = 4.53$ ng l⁻¹ y $\mu_{max} = 0.6$ días⁻¹. Este requerimiento es alto en comparación con el de otras especies de microalgas, como puede observarse en la Tabla XVI.

En ella el mayor k_s lo presenta *Ochromonas malhamensis*, la cual, tiene un metabolismo diferente a las demás microalgas reportadas puesto que se trata de un quimiótrofo obligado, que utiliza como fuente de energía la glucosa (Droop, 1961).

De estas especies únicamente *Ch. antiqua* y *A. carteri* son productores de mareas roja. En comparación con estos reportes, *A. carteri* tiene un requerimiento muy elevado de vitamina B₁₂. Se observa que el k_s de *Amphidinium carteri* para biotina es de 4 ng l⁻¹, lo cual se parece al valor obtenido en este experimento para B₁₂. De hecho en la preparación del medio f/2 se utilizan las mismas concentraciones de ambas vitaminas (Guillard, 1975),

por lo que cabe esperarse similares requerimientos en algas que necesiten los dos compuestos.

Tabla XVI. Efecto de las vitaminas sobre el crecimiento de algunos organismos .

Organismo	Familia	Vitamina	$\mu_{\max}$ día ⁻¹	K _s ng l ⁻¹	Referencia
<i>Ochromonas malhamensis</i>	Chrysophyceae	B ₁₂		13	Ford 1958
<i>Monochrysis lutheri</i>	Chrysophyceae	B ₁₂	0.768	<0.1	Droop 1961
<i>M. lutheri</i>	Chrysophyceae	B ₁₂		2.6	Droop 1968
<i>M. lutheri</i>	Chrysophyceae	B ₁₂		0.14	Droop 1966 1968
<i>M. lutheri</i>	Chrysophyceae	B ₁₂	0.768	2.77	Swift y Taylor 1974
<i>M. lutheri</i>	Chrysophyceae	Tiamina	3.84	125	Carlucci 1969
<i>Isochrysis galbana</i>	Haptophyceae	B ₁₂	0.528	1.69	Swift y Taylor 1974
<i>Thalassiosira pseudonana</i> 3H	Bacillariophyceae	B ₁₂	1.296	0.39	Swift y Taylor 1974
<i>T. pseudonana</i> 3H	Bacillariophyceae	B ₁₂	1.2	0.26	Swift y Taylor 1974
<i>T. pseudonana</i> 13-1	Bacillariophyceae	B ₁₂	1.15-1.32	0.2 - 0.4	Carlucci 1969
<i>T. pseudonana</i> 13-1	Bacillariophyceae	B ₁₂	1.488	2.9	Carlucci 1969
<i>Chatonella antiqua</i>	Raphidophyceae	B ₁₂	0.48 - 0.69	0.05-0.35	Nishijima y Hata 1986
<i>Amphidinium carteri</i>	Dinophyceae	Biotina	0.6	4.0	Carlucci 1969
<i>Amphidinium carteri</i>	Dinophyceae	B ₁₂	0.603	4.53	Presente estudio

También se observa que para una misma especie es posible obtener diferentes constantes de semisaturación y tasas máximas de crecimiento. Esto depende de la metodología empleada en los experimentos así como de la cepa utilizada. Los requerimientos vitamínicos específicos también pueden variar dependiendo de la concentración de otros nutrientes en el medio, como *P. micans* que en presencia de

tiamina requiere $10 \text{ ng B}_{12} \text{ l}^{-1}$ para maximizar sus densidades, mientras que en ausencia de tiamina requiere $20 \text{ ng B}_{12} \text{ l}^{-1}$ (Iwasaki e Iwasa, 1982).

No se tienen reportes de las constantes de semisaturación de B_{12} de otros dinoflagelados, sin embargo, se sabe que la mayoría de las especies productoras de marea roja, necesitan vitamina B_{12} , (Nishijima y Hata, 1989). Si los requerimientos vitamínicos son clasificados de acuerdo a la taxonomía, pueden encontrarse diferencias significativas entre los grupos de algas: numerosas diatomeas céntricas, la mitad de las diatomeas penadas, la mayoría de las haptofitas y crisofitas, 90% de los dinoflagelados, sólo el 20% de las cianofitas y sólo unas cuantas clorofitas requieren vitamina B_{12} (Bonin *et al.*, 1981).

Un k_s alto significa una baja afinidad por el compuesto, lo cual es típico de especies que habitan en medios eutróficos (Zevenboom, 1986). En efecto, *A. carteri* ha sido localizado siempre en aguas costeras someras y en estanques de cultivo (Hulburt, 1957; Fraga y Sánchez, 1979; Sampayo, 1985), donde se pueden suponer concentraciones altas de vitaminas, especialmente la B_{12} que es producida principalmente por bacterias.

Por otro lado, las tasas máximas de crecimiento que pueda alcanzar una especie también serán importantes para la competencia en el medio, ya que una μ_{max} alta, bien puede compensar un k_s alto, es decir, una baja afinidad de la especie (Zevenboom, 1986).

La tasa máxima de crecimiento de *A. carteri* obtenida en este trabajo es de 0.6033 días^{-1} , muy parecida a la encontrada por Carlucci y Silbernagel (1969), de 0.6 días^{-1} . Esta tasa de crecimiento es menor que la de muchas otras especies fitoplanctónicas, que además tienen una mayor afinidad por la vitamina (Tabla XVI). Por lo tanto, se considera

que, en condiciones normales, *A. carteri* no será una especie dominante en el medio; pero ambientes eutroficados con altas concentraciones de vitaminas y bacterias, que hacen difícil el desarrollo de otras especies, pueden ser óptimos para un florecimiento de *Amphidinium carteri*, ya que una especie más sensible a las deficiencias de un nutriente, puede responder mas claramente que otras especies a un aumento repentino de este nutriente en el medio (Granelli, *et al.*, 1993).

Cuando dos especies de fitoplancton tienen valores de k_s y μ_{max} diferentes, y compiten entre sí en un mismo medio, a bajas concentraciones del nutriente limitante, dominará la especie que posea un k_s menor, mientras que a concentraciones altas del nutriente limitante, dominará aquella que posea una mayor μ_{max} (Lali y Parsons, 1993). Este sería el caso de *A. carteri* que en condiciones de alta concentración de vitamina puede llegar a dominar a otras especies, y a desarrollarse un florecimiento.

La concentración de vitaminas en el medio marino generalmente es suficiente para soportar el crecimiento de las especies auxótrofas de fitoplancton (Bonin *et al.*, 1981 y Swift, 1980). En las costas de California frente a la Jolla la concentración de vitamina B₁₂ varía entre 0.4 a 6.5 ng l⁻¹, donde la mayor parte de las muestras contienen menos de 1.5 ng l⁻¹ (Carlucci, 1970). En esta zona las concentraciones serían limitantes para el crecimiento de *A. carteri* ($k_s = 4.65$ ng l⁻¹), excepto en las estaciones mas cercanas a la costa en los meses de julio y agosto, cuando se supone que la vitamina es traída por advección de aguas ricas en ella. Cabe hacer notar que *A. carteri* no ha sido reportado aún en esta área.

En la Bahía de Napeague, Nueva York , zona donde *A. carteri* sí ha sido descrito, Bruno y Staker (1978) encontraron desde concentraciones indetectables de vitamina B₁₂ en noviembre y diciembre hasta 10.6 ng B₁₂ l⁻¹ en agosto, en la estación más cercana a la costa. De acuerdo a los resultados experimentales de la presente tesis, *Amphidinium carteri* solamente crecerá a más de la mitad de su máxima tasa de crecimiento en los meses de verano y en las estaciones más costeras de la Bahía de Napeague, donde existen concentraciones de 4.0 a 10.6 ng l⁻¹ (Bruno y Staker, 1978).

En el mar japonés de Harima-Nada, que ha estado eutroficado durante los últimos 20 años se encontraron niveles de vitamina B₁₂ de 1.38 a 25.0 ng l⁻¹, que son comparables con el contenido de vitamina en otras aguas eutroficadas (Nishijima y Hata, 1986, b). Estos autores afirman que en este mar han aumentado el número de mareas rojas como consecuencia de su eutroficación, que está directamente relacionada con las descargas de varios tipos de aguas residuales en el cuerpo de agua.

De esta manera, un cuerpo de agua eutroficado, y por tanto, con altas concentraciones de vitaminas puede ser un sitio adecuado para la ocurrencia de una marea roja de *Amphidinium carteri*. Además, en estos ambientes generalmente la diversidad específica tiende a ser baja (Lali y Parsons, 1993), con lo cual, existe una menor competencia; sin embargo, en la mayoría de los estudios de campo, hace falta más información con respecto a las características fisiológicas de las diversas especies que constituyen una población natural, para poder predecir de manera confiable la respuesta de toda la comunidad a un cambio en la disponibilidad de un nutriente (McCarthy, 1981).

De acuerdo a los resultados del presente estudio, se comprobó que la cantidad de vitamina B₁₂ disuelta en el agua de mar es un factor determinante para la reproducción de *Amphidinium carteri*, así mismo lo será para el surgimiento de mareas rojas de esta especie, e incluso para su distribución en el medio ambiente marino.

La vitamina B₁₂ no es el único factor que regula un florecimiento de marea roja, sino que esto ocurre por una combinación de factores fisicoquímicos y biológicos que controlan la respuesta de una comunidad fitoplanctónica (Granelli, *et. al.*, 1993). Por lo que es importante conocer también la respuesta del organismo hacia otros factores que pueden limitar o acelerar su crecimiento, y el de otras especies competidoras. Así como estudiar las concentraciones de vitamina B₁₂ disuelta en el medio en relación con la presencia de la especie.

V. CONCLUSIONES.

La cantidad de vitamina B₁₂ disuelta tuvo un efecto limitante sobre la tasa específica de crecimiento y las densidades finales en los cultivos de *Amphidinium carteri*. La vitamina fue limitante a concentraciones menores de 50 ng l⁻¹.

La tasa de crecimiento (μ) se vio determinada por la concentración de vitamina B₁₂ (S) en forma de una cinética de Michaelis-Menten, con la siguiente relación empírica:

$$\mu = \frac{0.6 S}{4.53+S}$$

De la cual se obtuvo para *A. carteri* una constante de semisaturación (k_s) de 4.53 ng B₁₂ l⁻¹ y una tasa máxima de crecimiento (μ_{max}) de 0.60 días⁻¹.

La densidad final de los cultivos se vio determinada por la concentración de vitamina en forma de una parábola rectangular, donde la densidad final fue limitada a concentraciones menores de 50 ng B₁₂ l⁻¹. Concentraciones mayores de vitamina no limitaron la densidad final.

De este manera se comprobó la hipótesis de que la cantidad de vitamina B₁₂ disuelta en el medio es un factor determinante para el crecimiento de *Amphidinium carteri* y que esta especie responde a la vitamina de acuerdo al modelo de Michaelis-Menten.

VI. REFERENCIAS.

- Anderson, D.M., (1989). Toxic algal blooms and red tides: a global perspective. In: T.Okaichi, D.M. Anderson and T.Nemoto (eds.), **Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology**, Elsevier, New York, USA, pp. 11-16.
- Bonin, D.J., Maestrini, S.Y. and Letley, J.W.,(1981). The role of phytohormones and vitamins in species sucession of phytoplankton. In: T.Platt (ed.), **Physiological bases of phytoplankton ecology**, Can. Bull. Fish. Aquat. Sci., 210, pp. 310-322.
- Bruno, S.F. and Staker, R.D., (1978). Seasonal B₁₂ and phytoplankton distribution, near Napeague Bay, New York (Block Island Sound). **Limnol. Oceanogr.**, 23: 1045-1051.
- Carlucci, A.F., (1970) The ecology of the plankton off La Jolla, California, in the period April through September, 1967. Part II Vitamin B₁₂ , thiamine and Biotin. **Bull. Scripps Inst. Oceanogr.**, 17: 23-31.
- Carlucci, A.F. and Silbernagel, S.B., (1969). Effect of vitamin concentrations on growth and development of vitamin-requiring algae. **J. Phycol.**, 5: 64-67.
- Córdova-Ricardez, J.A., (1988). Efecto de la variación de cianocobalamina (B₁₂) sobre el crecimiento de la microalga *Tetraselmis suecica* Kylin (1935) Butch. Memorias de curso de titulación, **FCM UABC**, Ensenada, B.C. 40 pp.
- Droop, M.R., (1961). Vitamin B₁₂ and marine ecology: the response of *Monochrysis lutheri*. **J. Mar. Biol. Ass. UK.**, 41: 69-76.

- Droop, M.R., (1962). Organic micronutrients. In: R.A. Lewin. **Physiology and Biochemistry of Algae**, Academic Press, New York, pp. 141-159.
- Droop, M.R., (1966). Vitamin B₁₂ and marine ecology III: an experiment with a chemostat. **J. Mar. Biol. Ass. UK.**, 46: 659-671.
- Droop, M.R. , (1968). Vitamin B₁₂ and marine ecology IV: The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. **J. Mar. Biol. Ass. UK.**, 48: 689-733.
- Fogg, G.E., (1975). **Algal Cultures and Phytoplankton Ecology**, 2^a Ed. The University of Wisconsin Press, Madison, Wisc. 236 pp.
- Ford, J.E., (1958). B₁₂ -vitamins and growth of the flagellate *Ochromonas malhamensis*. **J. Gen. Microbiol.**, 19: 323-329.
- Fraga, S. and Sanchez, F.J., (1979). A bloom of *Amphidinium* sp. in the Ria de Vigo (N.W. of Spain). In: D.L. Taylor and H.H. Seliger (eds.), **Toxic Dinoflagellate Blooms**, Elsevier/North Holland, New York, pp. 165-168.
- Fukuyo, Y., (1981). Taxonomical study on benthic dinoflagellates collected in coral reefs. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.**, 47: 967-978.
- Granelli, E., Paasche, E. and Maestrini, S.Y., (1993). Three years after the *Chrysochromulina polylepis* bloom in Scandinavian waters in 1988: some conclusions of recent research and monitoring. In: J.J. Smayda and Y. Shimizu (eds.), **Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea**, Elsevier, Amsterdam, pp. 23-32.
- Guillard, R.R.L., (1973). Division rates. In: J.R. Stein (ed.), **Handbook of Phycological Methods**, Cambridge University Press, New York, pp. 289-312.

- Guillard, R.R.L., (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: M.L. Smith and M.H. Chanley (eds.), **Culture of Marine Invertebrate Animals**, Plenum Press, New York, pp
- Guillard, R.R.L., (1978). Counting slides. En: A. Sournia (ed.), **Phytoplankton manual**, UNESCO, pp. 182-189.
- Halstead, B.W., (1965). **Poisonous and venomous marine animals of the world**, Vol. 1, U.S. Govt. Printing Office, Washington, DC, 1016 pp.
- Honjo, T., (1993). Overview on bloom dynamics and physiological ecology of *Heterosigma akashiwo*. In: J.J Smayda, and Y. Shimizu, (eds.) **Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea**, Elsevier, Amsterdam, pp. 741-746.
- Hulburt, E.M., (1957). The Taxonomy of unarmored Dinophyceae of shallow embayments on Cape Cod, Massachusetts. **Biol. Bull.**, 112: 196-219.
- Ikawa, M. and Sasner, J.J., (1975). Chemical and physiological studies on the marine dinoflagellate *Amphidinium carteri*. In: V.R. Lo Cicero (ed.), **Tox. Dinofl. Blooms Proc. Int. Conf. (1st)**, Mass. Sci. Technol. Fndn., pp. 323-332.
- Ikawa, M. and Taylor, R.F., (1973). Choline and related substances in algae. In: D.F. Martin and G.M. Padilla (eds.), **Marine pharmacognosy**, Academic Press, New York, pp. 127-177.
- Iwasaki, H., (1989). Recent progress of red tide studies in Japan: an overview. In: T. Okaichi, D.M. Anderson and T. Nemoto (eds.), **Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology**, Elsevier, New York, USA, pp. 3-9.

- Iwasaki, H. and Iwasa, K., (1982). Studies on the red tide flagellates VII. *Prorocentrum micans* (levantinoides type). **Bull. Fac. Fish. Mie Univ.**, 9: 49-56.
- Lali, C.M. and Parsons, T.R., (1993). **Biological Oceanography an Introduction**, Pergamon Press, New York, 301 pp.
- Lehninger, A.L., (1991). **Bioquímica**, 2ª Ed., Ediciones. Omega S.A., Barcelona, 1117 pp.
- McCarthy, J.J., (1981). The kinetics of nutrient utilization. In: T.Platt (ed.), **Physiological bases of phytoplankton ecology**, Can. Bull. Fish. Aquat. Sci., 210, pp. 211-233.
- Nakajima, I., Oshima, Y. and Yasumoto, T., (1981). Toxicity of benthic dinoflagellates in Okinawa. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.**, 47: 1029-1033.
- Nishijima, T. and Hata, Y., (1986 a). Physiological ecology of *Chatonella antiqua* (HADA) ONO on B group vitamin requirements. **Bull. Jap. Soc. Fish.**, 52: 181-186.
- Nishijima, T. and Hata, Y., (1986 b). Distribution of vitamin B₁₂, Thiamin and Biotin in the water of Harima-Nada Sea. **Bull. Jap. Soc. Fish.**, 52: 1533-1545.
- Nishijima, T. and Hata, Y., (1989). The dynamics of vitamin B₁₂ and its relation to the outbreak of *Chatonella* red tides in Harima Nada, the Seto Inland Sea. In: T.Okaichi, D.M.Anderson and T.Nemoto (eds.), **Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology**, Elsevier, New York, pp. 257-260.
- Nishijima, T., Hata, Y. and Hashimoto, N., (1990). Growth characteristics of *Plagioselmis* sp. (strain 87) causing freshwater red tide in the lower part of the Nakasuji River, Japan. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.**, 56: 353-359.

- Orellana-Cepeda, E., Morales-Zamorano, L.A. and Castro-Castro, N., (1993). A conceptual model of coastal red tides off Baja California. **Sixth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton**, Nantes, p. 152.
- Raymont, J.G.E., (1963). **Plankton and Productivity in the Oceans**, Pergamon Press, London, 660 pp.
- Raymont, J.G.E., (1980). **Plankton and Productivity in the Oceans**, 2^a Ed., Vol 1, Pergamon Press, London, U.K, 489 pp.
- Sampayo, M.A.M., (1985). Encysment and excysment of a portuguese isolate of *Amphidinium carteri* in cultures. In: D.M. Anderson, A.W. White and D.G. Baden (eds.), **Toxic Dinoflagellates**, Elsevier, New York, pp. 125-130.
- Siegel, (1990). **Estadística no Paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta**, Ed. Trillas, México, D.F., 346 pp.
- Swift, D.G., (1980). Vitamins and phytoplankton ecology. In: Morris, I. **The Physiological Ecology of Phytoplankton**. University of California Press, Los Angeles, pp 329-368.
- Swift, D.G. and Taylor, W.R., (1974). Growth of vitamin B₁₂ -limited cultures: *Thalassiosira pseudonana*, *Monochrysis lutheri* and *Isochrysis galbana*. **J. Phycol.**, 10: 385-391.
- Tomas, C.R., Montresor, M. and Tosti, E., (1989). Nutrient and temperature effects on growth and sexual phases of four marine dinoflagellates. In: T. Okaichi, D.M. Anderson and T. Nemoto (eds.), **Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology**, Elsevier, New York, pp. 293-294.

- Yasumoto, T., Oshima, Y., Murakami, Y., Nakajima, I., Bagnis, R. and Fukuyo, Y., (1980).
Toxicity of benthic dinoflagellates found in coral reef. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.**, 46:
327-331.
- Zevenboom, W., (1986). Ecophysiology of nutrient uptake, photosynthesis and growth. In:
T. Platt and Li W.K.W (eds.), **Photosynthetic picoplankton in the ocean**, Science
Progress pp. 87-102.