

# EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE HIERRO EN EL CRECIMIENTO Y TAMAÑO CELULAR DE *Chaetoceros muelleri* CULTIVADA EN LABORATORIO.

Karina Robles Figueroa, José Antonio López Elías, Luis Rafael Martínez Córdova \* y Mercedes Serna Félix.

Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, Rosales y Blvd. Luis Encinas, Apdo Postal 1819, Hermosillo, Sonora, México.

(\*) Autr correspondiente: Email: [lmtz@guaymas.uson.mx](mailto:lmtz@guaymas.uson.mx)

## RESUMEN

Se llevó un estudio para evaluar el efecto de la concentración de hierro en el crecimiento (densidad y volumen celular) y tamaño celular de la microalga marina *Chaetoceros muelleri* cultivada en condiciones de laboratorio. Se utilizó un diseño experimental simple en un arreglo completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. Se probaron 8 tratamientos consistentes en 7 diferentes concentraciones de hierro más la adición de EDTA en uno de ellos (162, 325, 650, 650 + EDTA, 1300, 2600 y 5200 ppm) y un tratamiento control. Las microalgas se dejaron crecer por 7 días bajo condiciones constantes de luz y temperatura y se midió la concentración (densidad y volumen) y el tamaño celular cada 24 horas. Los resultados obtenidos mostraron que tanto el exceso como la deficiencia de este metal afectan a *Chaetoceros muelleri* al reducir su densidad celular. El volumen y tamaño celular no mostraron un patrón definido y en ocasiones fue inverso a la densidad. A concentraciones moderadamente altas de hierro (1300 y 2600 ppm) se obtuvieron altas densidades celulares al final del experimento (entre  $3.4$  y  $4.75 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>). La longitud y volumen de las células fue mayor en tratamientos con concentraciones moderadamente altas y excesivas de hierro. El EDTA tuvo un efecto positivo en el desempeño de las microalgas, sobre todo en la multiplicación celular, ya que las mayores densidades se observaron en el tratamiento en donde el quelante fue añadido.

Palabras clave: hierro; crecimiento; volumen celular; microalgas; cultivo; *Chaetoceros muelleri*.

## ABSTRACT

An experimental study was carried out in the facilities of DICTUS, Hermosillo, Sonora, Mexico, to evaluate the effect of iron concentration on the growth (cell density and volume) and cell size of the marine microalgae *Chaetoceros muelleri*. A single-factor completely randomized experimental design with four replicates per treatment was used. Eight treatments consisted of 7 different concentrations of iron, plus one of them with the addition of EDTA (162, 325, 650, 650 + EDTA, 1300, 2600 and 5200 ppt) and a control were evaluated. Microalgae were grown out for 7 days under constant light and temperature conditions. The concentration (density and volume), and cell size were measured every 24 hours. The results showed that both, the excess as well as the deficiency of iron affected the development of *Chaetoceros muelleri* by reducing the density and cell size. Cell volume and size had not a defined pattern and in some cases was inverse to density. At a moderate iron concentration (1300 to 2600 ppt), the highest cell densities (around  $3 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>) were obtained at the end of the trial. The greatest volume and cell size were obtained in treatments with a moderate and excessive iron concentration. EDTA had a positive effect in the microalgae performance, especially in cellular multiplication, since treatment where the EDTA was added, had the highest cell density.

Key words: Iron; microalgae; growth; cell volume; culture; *Chaetoceros muelleri*

Las microalgas son organismos ampliamente utilizadas en la nutrición larvaria de numerosas especies acuícolas (Merchie, Lavens y Sorgeloos, 1997). De entre las microalgas, las diatomeas, son las de mayor abundancia en el fitoplancton, las de mayor interés en acuicultura y tienden a dominar cuando naturalmente hay altas concentraciones de nutrientes, así como en experimentos de fertilización artificial con hierro (Sarhou, *et al.*, 2005).

Se puede simular o incluso mejorar las condiciones naturales donde crecen las microalgas y realizar su cultivo en condiciones semi-controladas o totalmente controladas, para lograr de esta forma obtener de ellas una biomasa tal que permita usarlas como alimento para organismos acuícolas. En el caso de los cultivos masivos, es necesario tomar en cuenta diversos factores que pudieran afectar de alguna manera el buen desarrollo del cultivo, como la luz, fuentes de nitrógeno, oxígeno, fósforo, silicio, metales traza y vitaminas (Stickney, 2000).

El hierro es cuantitativamente el metal traza más importante para las microalgas (Vymazal, 1990), juega un papel importante en numerosas reacciones de oxidación-reducción; está involucrado en la asimilación del nitrógeno, participa también en la síntesis de pigmentos fotosintéticos (clorofila-a y c-ficocianina) y además juega un papel muy importante en la síntesis del citocromo (Sulzberger, *et al.*, 1989).

La escasez de hierro puede causar clorosis en las microalgas (Kudo y Harrison, 1997). También la limitación de este micronutriente puede afectar al fitoplancton reduciendo su tasa de divisiones diarias ( $\mu$ ) y su biomasa (Wilhem, 1995). Por otro lado, los cultivos pobres en hierro también pueden causar que las microalgas sean más sensibles a la foto inhibición (Van Oijen, *et al.*, 2004). Pero tal vez una de las funciones más importantes que juega el hierro en el metabolismo celular, es que está implicado en la actividad de las enzimas nitrato y nitrito reductasa ya que es componente de éstas y de la ferredoxina que es el donador de electrones para dichas enzimas en los procesos metabólicos (Kudo & Harrison, 1997). Se ha demostrado que deficiencias en la concentración de hierro en cultivos de microalgas, afectan los procesos metabólicos de éstas (Huntsman y Sunda, 1980; Leynaert, *et al.*, 2004; Lewandowska y Kosakowska, 2004).

El hierro generalmente sólo puede ser absorbido cuando se encuentra como ion libre ( $Fe^{+++}$ ) y esto es cuando el pH se encuentra entre 5 y 6.5 (Dobermann y Fairhurst, 2000). Si el pH está por arriba de 7.5, la disponibilidad del hierro y de otros metales se ve reducida (Richmond, 1986). Sin embargo, cuando se adiciona EDTA al medio, éste tiene la capacidad de mantener al hierro en su forma soluble y biodisponible para el fitoplancton (Huntsman y Sunda, 1980). Otra razón por la cual el hierro puede perder disponibilidad para que las microalgas lo usen en sus procesos metabólicos, es por la presencia de otros metales como el zinc, manganeso, fósforo y cobre, así como compuestos quelantes, que pueden atraparlo y formar complejos con él, haciéndolo no biodisponible (Cañizares-Villanueva *et al.*, 2003).

La toxicidad de los metales traza no sólo depende de su concentración, sino también del pH al que se encuentren y del grado de actividad de los iones metálicos libres (Martínez-Córdova, 1998; Kazlauskiena y Mar, 1999; Cañizares-Villanueva, *et al.*, 2003).

En los sistemas de cultivos de las microalgas, los bajos niveles de metales traza también pudieran presentarse al hacer diluciones del agua de mar con agua dulce, considerando además que en los cultivos masivos finales no se emplean metales traza en la formulación del medio f/2.

Por otro lado, se ha observado que debido al uso constante, desgaste y salinización de los pozos usados para alimentar los estanques donde se cultivan las microalgas, los metales como el hierro se concentran llegando a ser tóxicos.

Por lo anteriormente expuesto, es importante conocer las concentraciones óptimas de los metales pesados en los medios de cultivo de las microalgas y evaluar tanto las deficiencias como los excesos, en especial del hierro que cuantitativamente es el más importante.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este experimento se utilizó la microalga marina *Chaetoceros muelleri* que es ampliamente usada en la alimentación de los camarones peneidos en sus primeras etapas de desarrollo larvario (Martínez-Córdova, 1999). Esta especie se obtuvo del cepario del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS) donde es mantenida a condiciones controladas de luz y temperatura.

Previo a cada uno de los tratamientos, se aclimató la microalga durante una semana a cada una de las concentraciones de hierro con que se trabajó. El agua de mar utilizada fue obtenida de la Unidad Experimental Kino de la Universidad de Sonora, que es agua previamente filtrada por carbón activado, algodón y filtros de arena.

Se utilizó un diseño experimental simple en un arreglo completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. Las unidades experimentales fueron matraces de 250 mL mantenidos bajo las siguientes condiciones de laboratorio: Iluminación constante mantenida con cuatro lámparas de 40 watts, y temperatura controlada entre 22 y 23°C con acondicionador de aire de 2400 BTU. Diariamente se midió la temperatura con un termómetro de mercurio convencional, la iluminación con un fotómetro marca Fisher Scientific y el pH con un potenciómetro marca Denver Instrument modelo 215, previa calibración con amortiguadores de 7 y 10.

Se evaluaron 8 tratamientos (Tabla 1) consistentes en 6 concentraciones de hierro, más una de ellas con la adición de EDTA, y un tratamiento control.

Tabla 1. Tratamientos utilizados en los cultivos de *Chaetoceros muelleri* con las correspondientes concentraciones de hierro

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN DE HIERRO (ppm)
Control	650 + EDTA + metales traza
A	162
B	325
C	650
D	650 + EDTA
E	1300
F	2600
G	5200

El medio control fue el f/2 de Guillard (1975), mientras que el resto de los tratamientos tuvieron como base dicho medio en su formulación excepto en las concentraciones de hierro, metales traza y EDTA. Este medio es ampliamente utilizado en el cultivo de microalgas tanto a nivel experimental como comercial y contiene todos los nutrientes necesarios para el buen desarrollo de las microalgas (nitratos, sulfatos, silicatos, EDTA como quelante, los metales traza hierro, cobre, zinc, manganeso, molibdeno y vitaminas). Para los tratamientos experimentales se añadió el hierro en forma de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) hasta las concentraciones deseadas.

Los experimentos se iniciaron con una concentración de  $2 \times 10^5$  cel  $\text{mL}^{-1}$  y tuvieron una duración de 7 días en un sistema estático. Este tiempo de cultivo se consideró suficiente ya que dada la rápida duplicación de esta microalga, en un tiempo de 7 días se alcanzan a tener hasta 6-8 divisiones celulares, lo cual es representativo de su desempeño en las condiciones experimentales.

Para la evaluación de la densidad celular, las muestras se tomaron cada 24 horas de cada matraz, después se fijaron con lugol y se almacenaron en ambiente oscuro para su posterior conteo. La densidad celular se midió en un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad, realizando el conteo en un microscopio compuesto con los objetivos de 10X y 20X y ocasionalmente el de 40X (Voltolina *et al.*, 1989). Cuando la densidad celular fue muy grande se hicieron diluciones para facilitar el conteo.

Se utilizó una reglilla en micrómetros para determinar la biometría de las células. Además se observaron las características morfológicas de éstas en cada tratamiento.

El volumen celular de las células fue calculado en base a la fórmula de un cilindro considerando la altura y el radio de las células medidas, con la siguiente fórmula:

$$V = \pi \cdot r^2 \cdot h$$

Para determinar posibles diferencias en la velocidad de crecimiento entre los tratamientos y el efecto del quelante, se llevó a cabo un análisis de pendientes además de un análisis de varianzas de una vía, previa prueba de normalidad y homogeneidad de varianza. Se empleó la prueba de Tukey (Zar, 1984) para comparación y ordenación de medias.

## RESULTADOS

La iluminación en todas las unidades experimentales estuvo en el rango de 10.13 a 9.55 Klux, la cual influyó por igual a los 8 tratamientos. El pH varió de acuerdo a las concentraciones de hierro en los tratamientos. El valor mínimo se registró para el tratamiento G, iniciando con un valor de 6.4, que aumentó ligeramente en el día 4 hasta 6.89 y disminuyendo hasta 6.36 el último día. Los valores de pH más elevados fueron registrados en los tratamientos D, E y Control, alcanzando valores finales de 9.37, 9.31 y 9.02 respectivamente (Fig. 1).

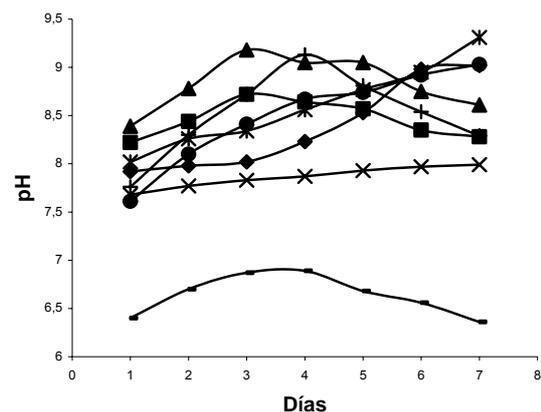


Fig. 1. Valores promedio de pH en los diferentes tratamientos. —♦— Control, —■— A, —▲— B, —x— C, —+— D, —●— E, —|— F, —— G.

La Tabla 2 muestra la respuesta de las microalgas a los diferentes tratamientos respecto a la

Tabla 2. Promedio ( $\mu\text{m}$ ) del largo, ancho y setas celulares de *Chaetoceros muelleri* con los diferentes tratamientos con hierro. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos en cada una de las tres medidas a  $p > 0.05$ . Letras diferentes en la misma columna representan diferencias significativas a  $P < 0.05$

	Densidad celular ( $\times 10^6$ cél $\text{mL}^{-1}$ )	Volumen celular ( $\mu\text{m}^3$ )	Largo ( $\mu\text{m}$ )	Ancho ( $\mu\text{m}$ )	Setas ( $\mu\text{m}$ )
<b>Control</b>	$3.66 \pm 1.09^b$	$584 \pm 296^a$	$6.37 \pm 1.02^a$	$5.20 \pm 0.89^a$	$20.65 \pm 7.27^{ab}$
<b>A</b>	$0.01 \pm 0.00^a$	$507 \pm 22^a$	$6.10 \pm 1.11^a$	$5.00 \pm 0.78^a$	$17.66 \pm 7.98^a$
<b>B</b>	$1.19 \pm 0.32^a$	$604 \pm 299$	$6.09 \pm 1.07^a$	$5.24 \pm 0.82^a$	$22.50 \pm 5.66^{ab}$
<b>C</b>	$3.41 \pm 0.11^b$	$480 \pm 252^a$	$6.33 \pm 1.09^a$	$4.80 \pm 0.92^a$	$16.94 \pm 8.08^a$
<b>D</b>	$4.75 \pm 0.09^b$	$605 \pm 283^a$	$6.49 \pm 1.07^a$	$5.28 \pm 0.88^a$	$18.23 \pm 5.76^{ab}$
<b>E</b>	$3.85 \pm 0.29^b$	$2067 \pm 977^b$	$9.43 \pm 1.47^c$	$8.04 \pm 1.40^c$	$31.53 \pm 5.02^{cd}$
<b>F</b>	$3.76 \pm 0.52^b$	$545 \pm 296^a$	$6.37 \pm 1.02^a$	$5.04 \pm 1.09^a$	$31.93 \pm 6.54^d$
<b>G</b>	$0.45 \pm 0.14^a$	$1095 \pm 584^{ab}$	$8.23 \pm 1.12^b$	$6.29 \pm 1.35^b$	$24.92 \pm 6.56^{bc}$

densidad celular, volumen celular, largo y ancho de las células y tamaño de las setas. La densidad celular más alta al final del estudio se registró en el tratamiento D (650 ppm de Fe + EDTA), con un valor de  $4.7 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ . El control y los tratamientos C (650 ppm), E (1300 ppm) y F (2600 ppm), alcanzaron densidades celulares promedio similares al final del experimento con valores promedio entre  $3.413 \times 10^6$  y  $3.849 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$  (Fig. 2), sin embargo no se detectaron diferencias significativas entre ellos, pero fueron superiores a las obtenidas en los tratamientos G y B y A ( $F = 60.84$ ,  $p < 0.0001$ ), que son cantidades excedidas (G) o deficientes (A y B) en hierro.

El tratamiento A (162 ppm), alcanzó su máxima densidad celular al tercer día con  $9.5 \times 10^5$  cel  $\text{mL}^{-1}$ , pero para el cuarto día presentó una caída abrupta. El tratamiento B presentó un crecimiento lento, alcanzando al final del experimento su máxima densidad celular con casi  $1.2 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ . Finalmente el tratamiento G (5200 ppm) fue el que mantuvo densidades celulares más bajas con  $4.55 \times 10^5$  cel  $\text{mL}^{-1}$  para el séptimo día de tratamiento.

El volumen celular fue similar entre los tratamientos con valores entre 480 y 605  $\mu\text{m}^3$ , a excepción de los tratamientos E y G, con los valores más altos.

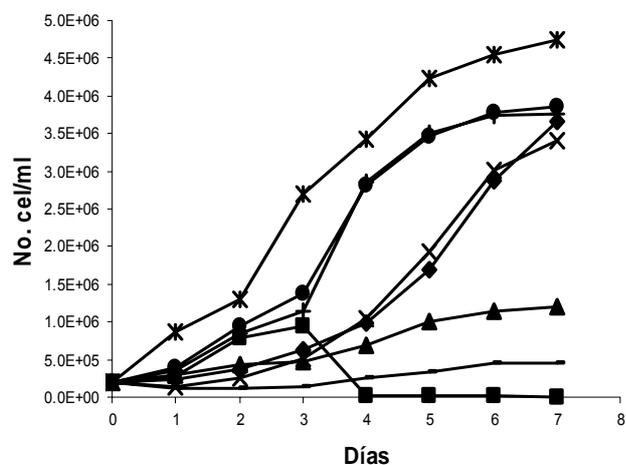


Fig. 2. Densidad celular de *Chaetoceros muelleri* con diferentes concentraciones de hierro. —◆— Control, —■— A, —▲— B, —x— C, —x— D, —●— E, —|— F, — — G.

El largo de las células varió desde 6.09 a 9.44  $\mu\text{m}$ , aunque en la mayoría de los casos se mantuvo en el rango de 6  $\mu\text{m}$ . El ancho varió desde 4.8 a 8.04  $\mu\text{m}$ , aunque en la mayoría de los tratamientos fluctuó entre 4.8 y 5.28  $\mu\text{m}$ . Al comparar el largo y

ancho de las células entre los tratamientos, se observó que el tratamiento E presentó los mayores promedios, seguido del tratamiento G, mientras que en el resto de los tratamientos no hubo diferencias significativas ( $F = 35.58$ ,  $p < 0.0001$ ;  $F = 33.26$ ,  $p < 0.0001$ ).

El tamaño de las setas fue también variable, con valores de 16.94 a 31.94  $\mu\text{m}$ , los valores mayores se encontraron en los tratamientos E, F y G (exceso de hierro) y los más bajos en los otros tratamientos ( $F = 21.02$ ,  $p < 0.0001$ ).

Al analizar las pendientes del crecimiento de los cultivos de los diferentes tratamientos (Tabla 3), se encontró que el tratamiento A fue estadísticamente diferente con respecto al resto de los tratamientos y entre ellos, solamente se encontró diferencia entre el C y el F.

Tabla 3. Pendientes promedio y error estándar de los 8 tratamientos de hierro. Letras diferentes indican diferencias significativas con un  $p < 0.05$ . Letras diferentes en la misma columna representan diferencias significativas a  $P < 0.05$

	b	Error estándar
Control	0.1966 <sup>bc</sup>	0.0083
A	-0.3681 <sup>a</sup>	0.1021
B	0.1141 <sup>bc</sup>	0.0089
C	0.2161 <sup>c</sup>	0.0208
D	0.1774 <sup>bc</sup>	0.0341
E	0.1908 <sup>bc</sup>	0.0252
F	0.1934 <sup>bc</sup>	0.0254
G	0.0852 <sup>b</sup>	0.0229

Las tasas de crecimiento promedio acumuladas fueron menores en los tratamientos deficientes (A y B) y con exceso de hierro (G) en comparación con el resto de los tratamientos (Fig. 3).

## DISCUSIÓN

La incidencia de luz en los tratamientos fue ligeramente variable, teniendo valores entre 9.55 a 10.13 Klux con un promedio de 9.86. Sánchez-Saavedra (1994), al trabajar con *Chaetoceros* sp., reportó que la intensidad mínima para tener un buen cultivo es de 5 Klux (Ukeles, 1976) por lo cual se puede establecer que en el presente

experimento las condiciones de iluminación fueron propicias.

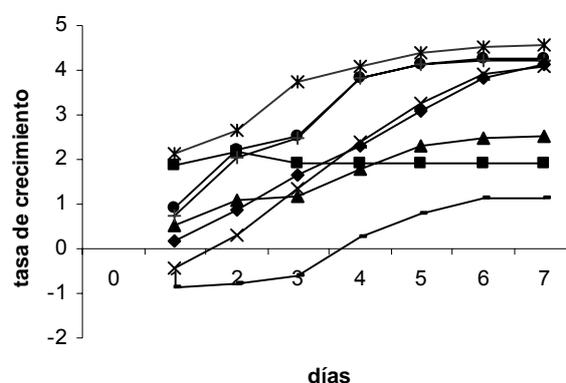


Fig. 3. Tasa de crecimiento acumulada promedio de *Chaetoceros muelleri* con diferentes concentraciones de hierro. ◆—Control, ■— A, ▲— B, ×— C, \*— D, ●— E, — F, — G.

Los tratamientos mostraron amplias variaciones de pH pero en general, el que presentó los valores más bajos fue el tratamiento con mayor cantidad de hierro (G). Esto puede atribuirse a que el hierro reacciona con el agua y al encontrarse en cantidades excesivas forma precipitados de hidróxidos provocando la liberación de iones hidrónico por la descomposición de 3 moléculas de agua, acidificando así el medio (Riley y Chester, 1989). Sunda y Huntsman (2003) mostraron que el pH en el cual el hierro quelado con EDTA tiene más rápida disociación cinética es entre 7.7 y 9.0, aumentando las concentraciones de hierro inorgánico disuelto biológicamente disponible. En el tratamiento D (650 ppm + EDTA) el pH se mantuvo entre 8.0 y 9.3, siendo ésta quizás una razón por la cual en este tratamiento se presentaron los mayores crecimientos.

Las mayores densidades celulares fueron encontradas en el tratamiento D, en donde la concentración de hierro fue moderadamente alta pero además se añadió EDTA. Estos resultados coinciden con lo que otros investigadores han reportado desde hace algunos años, en el sentido de que el EDTA afecta la solubilidad del Fe y otros metales traza, lo cual ocasiona una mayor disponibilidad de éstos, que benefician el desarrollo de las microalgas (Huntsman y Sunda, 1980).

En los tratamientos E y F también se registraron altas densidades celulares, lo que indica que el

hierro en concentraciones moderadamente altas, puede favorecer el crecimiento del fitoplancton.

Los tratamientos C y Control presentaron densidades celulares muy similares, lo que indica que el hierro presente en el medio f/2 es suficiente para el crecimiento de esta microalga.

En los tratamientos A y B, cuyas concentraciones de hierro fueron las menores entre los tratamientos, se presentaron densidades celulares muy bajas con respecto a los demás tratamientos. Esto concuerda con investigaciones anteriores que muestran que algunas microalgas expuestas a deficiencias de hierro reducen tanto su biomasa como su producción de clorofila (Kudo y Harrison, 1997; Henley y Yin, 1998). La Roche *et al.* (1993) encontraron que durante las primeras etapas, el fitoplancton podía mantener su rango de crecimiento al reducir sus requerimientos de hierro, reemplazando en los procesos metabólicos, por ejemplo, la ferredoxina por flavodoxina que no contiene hierro. Es por ello que en los tratamientos con concentraciones más bajas de hierro se tuvo algún crecimiento; sin embargo en el tratamiento A (162 ppm) hasta el segundo día hubo crecimiento, pero a partir del tercer día se presentó una caída abrupta, lo cual parece indicar que el reemplazo de unas sustancias por otras en los procesos metabólicos del fitoplancton tiene sus límites.

Por otra parte, en el tratamiento G, que fue el que tuvo mayor concentración de hierro, se presentaron también crecimientos bajos, lo que sugiere que concentraciones tan elevadas afectan negativamente el crecimiento de *Chaetoceros muelleri*.

En investigación realizada por Cordero *et al.* (2005) se menciona que conforme aumenta la concentración de metales tóxicos existe un incremento en el volumen celular, lo cual fue verificado en esta investigación a las dosis de 1300 (E) y 5200 ppm (G), que son cantidades arriba de las empleadas en un medio convencional como lo es el medio f/2.

El análisis de las pendientes del crecimiento de los cultivos en los diferentes tratamientos indica que la deficiencia de hierro (tratamiento A) influye más significativamente en el bajo desempeño de la microalga que el exceso (tratamiento G).

Al analizar las tasas de crecimiento acumuladas es evidente que tanto el exceso como la deficiencia de hierro ocasionan que la velocidad de crecimiento disminuya en gran medida.

Con respecto al tamaño celular, en los tratamientos E y G (exceso de Fe) se observó la tendencia de que a mayor concentración de hierro en el medio hubo mayor tamaño celular y mayor largo de las setas, aunque en el tratamiento F no se presentó este patrón.

En cuanto al resto de los tratamientos tanto el tamaño celular como el largo de las setas estuvieron muy cercanos al Control. En otras investigaciones se ha observado que cuando las células son sometidas a bajas concentraciones de hierro estas tienden a reducir su tamaño (Lewandowska y Kosakowska, 2004). Laynaert, *et al.*, (2004) trabajaron con la diatomea *Cilindrotheca fusiformis* y encontraron que al aumentar el estrés por deficiencia de hierro el crecimiento y el tamaño celular disminuyeron, observando también que la disponibilidad de hierro favorecía la toma de silicio en esta microalga. En otras investigaciones también se ha encontrado que el hierro puede ser un factor de control de crecimiento para algunas diatomeas en los ecosistemas acuáticos (Lewandowska y Kosakowska, 2004).

De los resultados del presente estudio se puede concluir que el hierro es un elemento indispensable y que debe estar en concentraciones moderadamente altas para un adecuado desempeño de *Chaetoceros muelleri*. La concentración de este metal en el medio f/2, es suficiente para obtener un buen crecimiento y tamaño celular de la microalga, pero ambos parámetros se pueden mejorar con concentraciones mayores de hierro, aún cuando no se añada EDTA.

## REFERENCIAS

Cañizares-Villanueva, R.O., J.M. Peña-Castro y F. Martínez-Jerónimo (2003): Efecto de los metales pesados sobre las microalgas y sus implicaciones ambientales. Centro de investigación y estudios avanzados del IPN. México, D.F., *Congreso Cinvestambiente* 2003, 12 pp.

Cordero, J., M. Guevara, E. Morales y C. Lodeiros (2005): Efecto de los metales pesados en el crecimiento de la microalga *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae). *Rev. Biol. Trop.* 53 (3-4): 325-330.

Dobermann, A. y T. Fairhurst (2000): *Rice. Nutrient disorders & nutrient management*. Handbook series. Potash & Phosphate Institute (PPI), Potash & Phosphate Institute of Canada (PPIC) and International Rice Research Institute, 191 pp.

- Guillard, R.R.L. (1975): Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: *Culture of Marine Invertebrate Animals* (W.L. Smith y M.H. Chanley, eds.), pp: 29-60.
- Henley, W. y Y. Yin (1998): Growth and photosynthesis of marine *Synechococcus* (cyanophyceae) under iron stress. *Journal of Phycology* 34: 94-103.
- Huntsman, S. y W.G. Sunda (1980): The role of Trace Metals in regulating Phytoplankton Growth, with emphasis on Fe, Mn and Cu. En: *The physiological ecology of phytoplankton* (Morris, I. ed.). University of California Press, pp: 285-327.
- Kazlauskiena, N. y I. Mar (1999): The biological effect of heavy metals and their complexonates with DTPA on fish. *Acta Zoológica Lituanica. Hidrobiología* 9 (2):71 -75.
- Kudo, I. y P. Harrison (1997): Effect of iron nutrition on the marine cyanobacterium *Synechococcus* grown on different N sources and irradiances. *Journal of Phycology* 33: 232-240.
- La Roche, J.H., R.J. Geider, L. Graziano, H. Murray y K. Lewis (1993): Introduction of specific proteins in eukaryotic algae grown under iron, phosphorous and nitrogen different conditions. *Journal of Phycology* 29: 767-77.
- Lewandowska, J. y A. Kosakowska (2004): Effect of iron limitation of cells of the diatom *Cyclotella meneghiniana* Kutzing. *Oceanologia* 46 (2):269-287.
- Leynaert, A., E. Bucciarelli, P. Claquin, R.C. Dugdale, V. Matin-Jezequel, P. Pondaven y O. Ragueneau (2004): Effect of iron deficiency on diatom cell size and silice acid uptake kinetics. *Limnology and Oceanography* 49(4):1134-1143.
- Martínez-Córdova, L.R. (1998): *Ecología de los Sistemas Acuícolas*. AGT. Editores, México, D.F., 227 pp.
- Martínez-Córdova, L.R. (1999): *Cultivo de Camarones Peneidos, Principios y Prácticas*. AGT. Editores, México, D.F., 283 pp.
- Merchie, G., P. Lavens y P. Sorgeloos (1997): Optimization of dietary vitamin C in fish and crustacean larvae: a review. *Aquaculture* 155: 165-181.
- Richmond, A. (1986): *Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 527 pp.
- Riley, J.P. y R. Chester (1989): *Introducción a la Química Marina*. Ediciones AGT, 459 pp.
- Sánchez-Saavedra, M.P. (1994): Efecto de la luz azul sobre el crecimiento, la composición bioquímica y el valor alimenticio de *Chaetoceros* sp. (Bacilliarophyceae). México, Baja California, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), *Tesis doctoral*, 90 pp.
- Sarthou, G., K.R. Timmermans, S. Blain y P. Treguer (2005): Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: a review. *Journal of Sea Research* 53 (1-2): 25-42.
- Stickney, R.R. (2000): *Encyclopedia of Aquaculture*. Ed. John Willey and Sons. Inc., New York, 1063 pp.
- Sulzberger, B., D. Suter, C. Siffer, S. Banwart, y W. Stum (1989): Dissolution of Fe<sup>+++</sup> hydr-oxides in natural water. Laboratory assessment on the kinetics controlled by surface coordination. *Marine Chemistry* 28:127-144.
- Sunda, W. y S. Huntsman (2003): Effect of pH, and temperature on Fe-EDTA chelation and Fe hydrolysis in seawater. *Marine Chemistry* 84 (1-2):35-47.
- Ukeles, R. (1976): Cultivation of plants. En: *Marine Ecology. III (Part 1)*. (Kinne, O. ed.) John Willey and Sons. NY., pp: 367-466.
- Van Oijen, T., M.A. Van Leeuwe, W.W.C. Geiskes y H.J.W. De Baar (2004): Effect of iron limitation on photosynthesis and carbohydrate metabolism in the Antarctic diatom *Chaetoceros brevis*. *European Journal of Phycology* 39 (2): 161-171.
- Voltolina, D., Bückle-Ramírez L. F. y E.L. Morales-Guerrero (1989): Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas. 2da Edición. México, Baja California, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Informe especial OC-89-01, 67 pp.
- Vymazal, J. (1990): *Algae and Element Cycling in Wetlands*. Lewis Publisher. CRG. Press. Inc. Boca Raton, Florida, 385 pp.

Wilhem, S.W. (1995): Ecology of iron limited cyanobacteria: a review of physiological responses and implications for aquatic systems. *Aquatic Microbiology & Ecology* 9:295-303.

Zar, J.H. (1984): *Biostatistical Analysis*. Second Edition. Ed. Prentice Hall. New Jersey, 718 pp.

Aceptado: 21 de diciembre de 2006