

Laboratorio de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona
(Prof. F. Ponz)

Actividad fosfatásica de los cladóceros, en particular sobre sustancias disueltas en el agua ambiente

por **Ramón Margalef y Francisco Ponz**

(Recibido para publicar el 30 de noviembre de 1950)

Las ideas actuales sobre el ciclo del fósforo y regeneración de los fosfatos en las aguas naturales — dulces o marinas — parecen ignorar cualquier acción enzimática de los animales que contribuyese a liberar fosfato inorgánico de los compuestos orgánicos fosforados contenidos en el agua (véase Chu, 1946; Armstrong & Harvey, 1945; Hutchinson & Bowen, 1950; Welch, 1935).

Pocas referencias pueden inducir a pensar en la participación de la acción fosfatásica de los animales. Cooper (3) añadía muestras de zoo y fitoplancton al agua de mar contenida en recipientes de vidrio y seguía las variaciones en el contenido de fosfatos; la descomposición del zooplancton era muy rápida y se liberaba más fosfato inorgánico que el correspondiente al cuerpo de los animales y la diferencia tenía que proceder de compuestos orgánicos fosforados presentes en el agua. Gardiner (5) indica que el zooplancton, alimentándose de diatomeas, excreta considerable cantidad de fosfatos, sin precisar más. En ambos casos se puede pensar en una acción de tipo enzimático sobre materia orgánica que atraviese el tubo digestivo sin absorberse.

Max Steiner (16) ha sido el único que se ha referido en concreto a la liberación enzimática de fósforo inorgánico como factor de importancia a considerar en las transformaciones de fósforo orgánico a fósforo inorgánico en las aguas; en plancton muerto por toluol o cloroformo vió que aumentaba progresivamente el fósforo inorgánico, lo que no encuentra, o sólo en muy pequeña proporción, si previamente ha sido sometido a cocción. La liberación de fosfato inorgánico se verifica también en presencia de plancton

muerto a partir del glicerofosfato cálcico u otros ésteres fosfóricos y la atribuye a fosfatasas.

Hemos querido estudiar el problema concretándonos a los entomostráceos. Para tener una idea del papel que estos animales pudieran desempeñar en la rápida regeneración de los fosfatos en las aguas, se dejaron cladóceros vivos en un medio que contenía glicerofosfato disuelto, determinando después el fosfato inorgánico liberado. Así, hemos puesto de manifiesto una notable acción enzimática por estos crustáceos que forzosamente ha de alcanzar importancia ecológica en el ciclo del fósforo en las aguas naturales. Hemos practicado luego algunas experiencias complementarias sobre la naturaleza de las fosfatasas presentes en tales animales.

Material y Métodos

Se emplearon dos especies de cladóceros, vulgares en Barcelona: *Chydorus sphaericus* (0,3-0,4 mm.) y *Daphnia pulex* (1-1,5 milímetros). Los animales se obtenían con una red de plancton y se lavaban abundantemente al grifo. Las *Daphnia* se cogían individualmente con una pipeta; unos 5 a 10 ejemplares adultos en 10 cc. de medio era una densidad apropiada para las experiencias. Los *Chydorus*, mucho menores, se separaban por tamizado, eliminándose así también los individuos muy jóvenes, quedando generalmente el material impurificado por la presencia de un 1 a 2 % de otros entomostráceos de tamaño similar; los animales se contaban al final de la experiencia, sobre una tela de seda o sobre el mismo papel de filtro; una densidad de 100 a 200 individuos por tubo resultó apropiada.

Para la obtención del autolizado de *Daphnia*, los crustáceos se pesaban sin selección, por medio de una red, de un depósito que contenía un cultivo de la especie, prácticamente puro. La masa de cladóceros, después de lavada, se dejaba sobre papel de filtro para obtener un secado parcial privándoles de la humedad excesiva.

Una parte se pesaba y se contaban los individuos contenidos en ella; cada *Daphnia*, en una población con individuos de todas las edades, tiene un peso medio (húmedo) de 0,10 a 0,14 mgs.; en una población de hembras adultas, la mayoría con epípio, el peso medio de un crustáceo es de 0,25 mgs. Otra porción (entre 0,5 y 0,8 g. de la masa húmeda) se trituraba en mortero con un poco de agua clorofórmica, dejándola durante 24 horas a la temperatura del laboratorio (14-18°) después de completar el volumen hasta 50 cc con agua clorofórmica.

Las algas empleadas procedían de cultivos unialgales, con ligera contaminación bacteriana. Ya que el medio de cultivo de las algas contiene de 20 a 50 gammas de fósforo por cm³, las algas

se lavaron en tubo de centrifuga y se resuspendieron, pero sin conseguir eliminar todo el fosfato presente en la membrana o adherido a ella. La muerte de las algas se conseguía calentando los tubos hasta iniciar la ebullición.

La determinación de la actividad fosfatásica se ha hecho siguiendo en líneas generales la técnica de Sols y Ponz (15), adaptada a nuestras condiciones de trabajo.

Las experiencias con animales vivos se realizaban en tubos conteniendo en 10 cc de medio, 5 cc de una solución de glicerofosfato sódico al 1 % (aproximadamente M/20) y 5 cc de suspensión de crustáceos en agua del grifo incluyendo en su caso la suspensión de algas o cierta cantidad de glúcidos disueltos. El pH era de 7,5 a 7,7 y variaba muy poco durante la experiencia a pesar de no utilizar soluciones amortiguadoras que eran nocivas para la vida de los animales. Para valorar la hidrólisis enzimática resulta adecuado un tiempo de 24 horas a la temperatura del laboratorio que según las series de experiencias varió de 12,5 a 25°. Casi nunca se usó ácido tricloroacético; el contenido de los tubos se filtraba y la valoración del fosfato se hacía colorimétricamente por adición de 2 cc de reactivo molíbdico y otros dos de reductor recién preparado. Las pruebas en blanco indicaban una media de $4,51 \pm 0,45$ gammas de fósforo inorgánico por tubo y unas 3 gammas más de fósforo por cada 10 millones de células cuando se hacían en presencia de algas; estos valores se deducían de los resultados obtenidos para los tubos conteniendo cladóceros.

Cuando se trabajaba con extractos, se operaba tal como se indica en la técnica de Sols y Ponz, con acetato veronal como solución amortiguadora a pH comprendidos entre 4 y 9; para pH superiores utilizamos la mezcla glicocola-sosa según Sørensen. La hidrólisis duraba una hora a 37°.

El pH se controlaba electrométricamente.

Resultados

1. — Acción fosfatásica de los cladóceros vivos

Las tablas 1 y 2 resumen los resultados obtenidos. Por término medio un *Chydorus* libera $0,15 \pm 0,001$ gammas de fósforo por hora; una *Daphnia* adulta $0,60 \pm 0,07$ en el mismo tiempo. Los cladóceros muertos no liberan fósforo en cantidad apreciable y tampoco lo liberan los vivos en ausencia de glicerofosfato, como lo demostraron una serie de experiencias que no es necesario detallar. Los cladóceros viven normalmente en el medio que contiene glicerofosfato disuelto; sin embargo, mueren en presencia de amortiguadores como los empleados en las experiencias con autolizados.

TABLA I

Actividad fosfatásica de *Chydorus sphaericus* vivos sobre glicerofosfato sódico disuelto en su medio. pH = 7,5—7,7 aprox. Temperatura 13—18° C. Luz difusa.

Horas de acción	Número de crustáceos		P (fosfato) liberado, en gammas		
			Total	Por individuo	Por indivi./h:ra
4	410		24	0,058	0,014
7	187		14	0,075	0,010
7	202		17	0,084	0,012
7	295		53	0,179	0,025
9	277		40	0,146	0,016
21	400		214	0,535	0,025
23	278		125	0,449	0,019
24	158		41	0,259	0,011
24	131		33	0,252	0,010
24	302		82	0,271	0,011
24	164		261	0,372	0,015
26	410		219	0,534	0,020
30	298		222	0,744	0,025
30	390		214	0,548	0,018
en presencia de glúcidos					
23	157	0'01 mg. glucosa en 10 ml. .	39	0,248	0,011
23	166	0'1 » » » 10 » .	46	0,277	0,012
23	94	1 » » » 10 » .	27	0,297	0,013
23	190	10 » » » 10 » .	54	0,284	0,012
23	90	10 » » » 10 » .	31	0,344	0,015
23	85	0'01 » almidón » 10 » .	33	0,388	0,017
23	168	0'1 » » » 10 » .	63	0,375	0,016
23	196	1 » » » 10 » .	58	0,295	0,013
23	55	10 » » » 10 » .	21	0,382	0,016
23	98	10 » » » 10 » .	26	0,265	0,011
23	80	0'5 » gluc. + 0'5 mg. alm. en 10 ml. de medio . .	25	0,312	0,014
en presencia de <i>Scenedesmus</i>					
24	110	70 células por mm. ³ . . .	57	0,520	0,021
24	46	300 » » » . . .	24	0,521	0,021
24	67	1200 » » » . . .	35	0,522	0,022
24	321	3750 » » » . . .	286	0,894	0,037
24	340	3750 » » » . . .	315	0,925	0,038
24	45	4800 » » » . . .	38	0,845	0,035

La cantidad de fósforo liberado es proporcional al número de animales y al tiempo que actúan (tabla I). La relación aproximadamente lineal entre fósforo liberado y tiempo de acción de los crustáceos, indica que no hay acumulación importante de fermentos activos en el medio ambiente. Por esto se puede pensar que

la acción principal de las fosfatasas se ejerce sobre el medio que circula a través del tubo digestivo del animal.

Siguiendo una sugerencia de Harvey (Plymouth), fundada en sus estudios sobre la existencia de fosfatasas libres en el agua del mar, se trató de determinar la actividad fosfatásica del agua en que habían vivido las *Laphnias*.

TABLA II

Actividad fosfatásica de *Daphnia pulex* vivas sobre glicerofosfato sódico disuelto en su medio. pH = 7,5—7,7 aprox. Temperatura 15—25° C. Luz difusa. Las *Daphnia* que murieron en el curso de la experiencia se computan como una mitad. Todas las experiencias duraron 24 horas.

Número de crustáceos		P (fosfato) liberado, en gammas		
		Total	Por individuo	Por indiv./hora
2		31	15,5	0,65
4 1/2		56	12,4	0,51
en presencia de <i>Scenedesmus</i>				
11	5 células por mm. ³	128	11,6	0,48
5	10 » » »	83	16,5	0,69
4	50 » » »	63	15,9	0,66
4 1/2	200 » » »	93	20,6	0,86
4 1/2	1100 » » »	98	21,8	0,91
5	1100 » » »	129	25,8	1,07
5	4400 » » »	153	30,6	1,28

Agua en que permanecieron durante una hora unos 15 individuos vivos de *Daphnia* por cc. no mostró actividad fosfatásica apreciable con las técnicas seguidas. Con la misma densidad de población, pero permaneciendo en el agua 24 horas, 5 cc. del medio filtrado por algodón liberaron a 37° y pH 7,7 y en una hora, una media de 10,6 gammas de fósforo. No se tomaron precauciones para evitar el paso de bacterias en el filtrado, ya que experiencias con agua en las mismas condiciones de contaminación o con cladóceros muertos dieron una actividad fosfatásica inapreciable, de modo que en la observada en experiencias anteriores se puede atribuir en su casi totalidad a los cladóceros.

La actividad de los fermentos cedidos al medio resulta ser, pues, muy pequeña, correspondiendo tan sólo 0,006 gammas de fósforo liberado por *Daphnia* y hora ($10,6/5 \times 15 \times 24$) en las condiciones expresadas más arriba.

Debe pensarse, por tanto, que la acción fermentativa tiene lugar en el cuerpo del animal; pero también aquí nos encontra-

mos con dificultades para una total explicación. Por una parte, para liberar las 0,6 gammas de P por hora, sería necesario que el crustáceo hiciera circular por su tubo digestivo, y atacase, de medio a un milímetro cúbico de la solución, cada hora. Esta cifra es muy elevada, si se tiene en cuenta que la capacidad del tubo digestivo de una *Daphnia* no pasa de una centésima de milímetro cúbico y que, según datos de Naumann (1921) para *Daphnia longispina*, el coeficiente de renovación es de 20 a 30 minutos, aunque es posible que el líquido circule con mayor rapidez que las partículas sólidas que estudiara Naumann. Como mínimo sería necesario que el contenido intestinal se renovara totalmente cada minuto. No es ésta la sola dificultad; la cantidad de fosfatasas extraídas es relativamente pequeña si se compara con la liberación de 0,6 gammas de P por hora de que son capaces los crustáceos vivos, lo cual, unido a la pequeña proporción de fosfatasas que son arrastradas al medio, hace pensar que su acción se desenvuelve en circunstancias desconocidas y particularmente favorables.

2. — Estimulación de la actividad fosfatásica por la presencia de algas

En presencia de glúcidos diluídos (glucosa y almidón) de 0,1 a 100 mg. % la actividad fosfatásica de *Chydorus* no experimenta modificación (tabla I). Pero en presencia de algas, el fósforo liberado aumenta.

Una suspensión de algas vivas (*Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus quadricauda*, *Hormidium subtile*) en presencia de glicerofosfato a pH 7,5-7,7 no libera fosfato inorgánico en cantidad apreciable. Cuando se ponen en presencia cladóceros y algas con la solución de glicerofosfato, la liberación de P debida a los entomostráceos se encuentra incrementada como se muestra también en las tablas I y II. Este aumento no puede atribuirse a que se haya liberado P de las algas sometidas a digestión, porque es, sin comparación, mucho más elevado (por lo menos 20 veces) que el P contenido en la totalidad de las algas. El aumento de la actividad fosfatásica está relacionado con la densidad de células presentes en el medio; parece (fig. 1) que el incremento es, en primera aproximación, función lineal del logaritmo de la concentración de las algas. La relación entre la actividad de una *Daphnia* y de un *Chydorus* en iguales condiciones, se mantiene, en todo caso, próxima a 40. Es decir, una *Daphnia* libera siempre unas 40 veces más fosfato que un *Chydorus*.

Es de creer que la presencia de algas estimula la secreción de fosfatasas o la circulación de agua a través del tubo digestivo, o influye simultáneamente sobre los dos procesos.

3. — Acción fosfatásica del autolizado de *Daphnia*

En las tablas III y IV se exponen los resultados de varias series de experiencias realizadas con la técnica indicada en otro apartado. No se han encontrado diferencias entre la actividad del autolizado filtrado por algodón y la del autolizado no filtrado.

El extracto fosfatásico obtenido por trituración y autólisis de *Daphnia pulex* muestra un pH óptimo de 8,6 aproximadamente (fig. 2.). La actividad se reduce a menos de la mitad para pH 7,5 y 9,5.

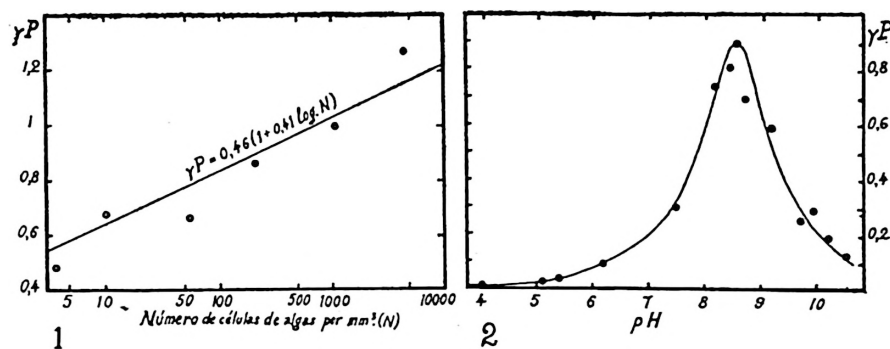


Figura 1. Actividad fosfatásica de *Daphnia pulex* vivas en presencia de células de *Scenedesmus* suspendidas en el medio. Abscisas en escala logarítmica. Datos de la tabla II. Suponiendo que el incremento de P liberado es función lineal del logaritmo de la concentración de las algas, resulta la recta dibujada.

Figura 2. Actividad fosfatásica del autolizado de *Daphnia pulex* a diferente pH. Datos de la tabla III.

La última experiencia de la tabla IV (pH - 9.7) se repitió a otras temperaturas, obteniendo los siguientes resultados (gammas de P por individuo, medias de dos ensayos):

Temperatura	12° C.	26° C.	38° C.
P (fosfato) liberado	0,18	0,23	0,27

La comparación de las tablas III y IV permite comprobar cómo la actividad fosfatásica es mayor en los individuos de gran tamaño. El primer material, engloba, en efecto, *Daphnia* de todas las edades de una población en crecimiento; la segunda, sólo hembras adultas de la población llegada al final del ciclo. Los valores referidos a peso húmedo, a pesar de la inseguridad de éste (diferente grado de desecación para las distintas series) no son, naturalmente, tan diferentes.

El contenido de fosfatasa extraíble de una *Daphnia*, actuando a pH óptimo, en una hora y a 37° C., libera solamente cuatro

veces más P del glicerofosfato disuelto que la misma *Daphnia* viva, también en una hora y a la temperatura de 15-25° C.; y sólo dos veces más que el P liberado cuando el cladócero vivo está en presencia de una densa población de algas.

TABLA III

Actividad fosfatásica de autolizado de *Daphnia pulex* (individuos de todos los tamaños). La relación entre peso húmedo y número de individuos varía ligeramente para los diferentes autolizados obtenidos en días sucesivos. Los valores que se dan son la media de, por lo menos, dos ensayos.

Autolizado	pH	P (fosfato) liberado en una hora a 37-38° C.	
		Mg. P por gramo de peso húmedo	Gammas de P por individuo
a	4	0,05	0,006
b	5,1	0,22	0,02
b	5,4	0,26	0,03
b	6,2	0,84	0,09
b	7,5	2,78	0,29
b	8,2	6,95	0,73
a	8,5	5,90	0,80
b	8,6	8,40	0,89
c	8,7	6,49	0,69
c	9,2	5,48	0,58
c	9,7	2,25	0,24
c	9,9	2,71	0,28
c	10,2	1,71	0,18
a	10,5 (aprox.)	0,80	0,11

TABLA IV

Actividad fosfatásica de autolizado de *Daphnia pulex* (individuos de gran tamaño, casi todos hembras efipiales). Un solo autolizado. Los valores que se dan son la media de dos ensayos.

pH	P (fosfato) liberado en una hora a 38° C.	
	Mg. de P por gramo de peso húmedo	Gammas de P por individuo
5,5 (aprox.)	0,09	0,04
6	0,52	0,19
7,8	4,83	1,76
8,2	6,60	2,67
9,5	1,76	0,71
9,7	0,69	0,27

Discusión

Los cladóceros vivos separan fosfato de los compuestos orgánicos fosforados disueltos en el medio y parece ser que esta acción tiene lugar principalmente en el tubo digestivo de los crustáceos, aunque también se excretan pequeñas cantidades de enzimas que continúan actuando en el agua ambiente.

La presencia de algas en el medio estimula en alto grado la actividad fosfatásica de estos entomostráceos. Es interesante que en mamíferos (López Navarro) y anfibios (Ponz) se haya demostrado que las sustancias alimenticias provocan por estímulo local de la mucosa intestinal una activa secreción de fosfatasas; las algas parecen ejercer un efecto semejante en los cladóceros y el gran aumento en el fósforo liberado por éstos en presencia de aquéllas, puede atribuirse a una mayor producción y liberación de fosfatasas por el tubo digestivo, ante el estímulo de la actividad digestiva, comportamiento que parece ser muy general en los animales. La presencia de almidón o glucosa disueltos en el medio no ha sido suficiente, sin embargo, para provocar tal efecto, quizás por tratarse de una dilución excesiva.

La existencia de fosfatasas en muy diversos invertebrados y entre ellos los malacostráceos es conocida desde hace algún tiempo (véase Sols (14), Kind (8), Elliott y Hunter (4), etc.). De los entomostráceos, sin embargo, no conocíamos referencia alguna. De nuestras experiencias se deduce que en *Daphnia* la fosfatasa tiene un óptimo de actividad a pH 8,6, aproximadamente, dentro del intervalo estudiado (4 a 10,5) sin que aparezca ningún segundo óptimo en la zona ácida, lo que indica que no debe haber fosfatasa ácida como no sea en proporción muy escasa en relación a la alcalina. Es de notar que al pH del agua en que vivían (7,6), la actividad es aún de cerca del 40 % respecto de la óptima, mientras que con la fosfatasa intestinal de rata, en igualdad de condiciones, se ha encontrado (10) sólo un 15 a 20 %. Ello significa que las fosfatasas de *Daphnia* pueden ejercer mucha actividad en las aguas en que viven.

La importancia ecológica que una población de crustáceos puede tener en la regeneración de los fosfatos, después de nuestras experiencias, parece estar fuera de duda. Se ha estudiado frecuentemente la relación entre las proporciones de P orgánico y de P inorgánico presentes en las aguas naturales (véase Armstrong & Harvey, 1950; Chu, 1946; Kreps & Osadchik, 1933, y bibliografía allí citada) variable en el tiempo y en el espacio; pero su dinamismo se había relacionado en general a lo más con «microorganismos» o, concretamente, con bacterias, sin tratar de ponerlo en relación con las eventuales accio-

nes fermentativas de las poblaciones animales que se suceden, excepción hecha del trabajo de Steiner. Una dirección de trabajo que parece ser interesante después de estos primeros resultados obtenidos, es la de averiguar la verdadera importancia de las poblaciones zooplanctónicas en la determinación de la dinámica y relaciones entre las diferentes fracciones de fósforo (inorgánico disuelto, orgánico disuelto, orgánico en «partículas» detríticas) presentes en las aguas de lagos y mares.

Hay algunos puntos, por otra parte, que deben evitarnos caer en un optimismo excesivo. En las aguas naturales, la concentración del P orgánico es varios cientos de miles de veces más baja que en nuestras experiencias. Además, como se ha dicho, la liberación de fosfato es mayor de la que sería previsible teniendo en cuenta la cantidad de fosfatasas presentes y la velocidad de renovación del contenido del tubo digestivo de manera que, en relación con estos extremos, son necesarios estudios complementarios. De todas maneras, sea mucha o sea poca, la acción de los entomostráceos habrá de colocarse, en lo sucesivo, al lado o por encima de la bacteriana, como uno de tantos factores que rigen el ciclo del fósforo en las aguas naturales.

Resumen

Cladóceros vivos, mantenidos en una solución de glicerofosfato sódico (1 %) liberan fosfato inorgánico. Por individuo-hora, a pH 7,5-7,7 y temperatura ambiente, se liberan 0,015 gammas de P en el caso de *Chydorus sphaericus* y 0,6 gammas de P en el de *Daphnia pulex*. La presencia de algas unicelulares en el medio incrementa la acción fosfatásica hasta más del doble, de manera que a aumentos iguales de la densidad de las algas, corresponden incrementos cada vez menores de la acción separadora de fosfato. El agua en que han vivido *Daphnia* muestra ligera actividad fosfatásica, tan pequeña al lado de la actividad total de los crustáceos (del orden 1/70 a 1/100), que debe pensarse que la principal acción fermentativa tiene lugar en el tubo digestivo del animal. De todos modos, esta actividad resulta difícil de poner de acuerdo, por lo elevada, con los datos que se poseen sobre el coeficiente de renovación intestinal en los cladóceros.

Por trituración y autólisis de *Daphnia pulex* se ha obtenido un extracto de intensa actividad fosfatásica, con pH óptimo de 8,6. El número de unidades (mg. de P separado en una hora a 37° C, por g. de peso húmedo (con bastante cantidad de agua) es de 8,4 a pH óptimo. Las fosfatasas presentes en un individuo adulto liberan hasta 2,7 gammas de P en las mismas condiciones.

Se sugiere la importancia que puede tener la acción de los entomostráceos en el ciclo del fósforo en las aguas naturales, modificando la relación entre las fracciones de fósforo orgánico y fósforo inorgánico disueltos en el medio.

Summary

Alive water-fleas, maintained in a solution of sodium glycerophosphate (1 %) set free phosphate, in an average amount of 0,015 gam-

ma P per animal/hour *Chydorus sphaericus*, and of 0,6 gamma P. per animal/hour *Daphnia pulex*, at pH=7,5-7,7 and t=13-25° C. Presence of unicellular algae increases the enzymatic activity of cladocerans up to more than the double (fig. 1). The water in which *Daphnia* has previously been living has a feeble phosphatasic activity, only 1/70-1/100 of the total activity of alive crustaceans. This fact suggests that breakdown of glycerophosphate occurs chiefly in the gut of the animal. However the required water circulation through the gut surpasses the known data about the renovation coefficient in *Daphnia*.

By trituration and autolysis of *Daphnia pulex*, a fluid of phosphatasic activity has been obtained, with optimum pH point near 8,6 (fig. 2). At this point, activity amounts 8,4 unities (mg. of P set free in an hour, at 37° C, per g. wet weight). The phosphatases present in an adult *Daphnia* may 2,7 gamma of the P in the separate conditions above stated

The importance of planktonic crustaceans in the cycle of phosphorus in natural waters is emphasized. They may be, indeed, able to modify the relations between the different P fractions (organic-inorganic) dissolved in lakes and seas.

Bibliografía

- (1) ARMSTRONG, F. A. J. y HARVEY, H. W.: *J. Mar. Biol. Assos. U. K.*, **29**, 145. 1950.
- (2) CHU, S. P.: *J. Mar. Biol. Assos. U. K.*, **26**, 285. 1946.
- (3) COOPER, L. H. N.: *J. Mar. Biol. Assos. U. K.*, **20**, 197. 1935.
- (4) ELLIOT, A. M. y HUNTER, R. L.: *Bioll. Bull.*, **99**, 357. 1950.
- (5) GARDINER, A. C.: *J. Cons. Intern. Expl. Mer.*, **12**, 144. 1937.
- (6) HARVEY, H. W. *Recent advances in the Chemistry and Biology of Sea Water*. Cambridge, Univ. Press. 1945.
- (7) HUTCHINSON, G. E. y BOWEN, V. T.: *Ecology*, **31**, 194. 1950.
- (8) KIND, A.: *Biol. Bull.*, **97**, 262. 1949.
- (9) KREPS, E. y OSADCHIK, M.: *Inter. Rev. d. ges Hydrobiol. u. Hydrogr.*, **29**, 221. 1933.
- (10) LARRALDE, J. y PONZ, F.: *R. esp. Fisiol.*, **5**, 37. 1949.
- (11) LÓPEZ NAVARRO, J.: *R. esp. Fisiol.*, **2**, 211. 1946.
- (12) NAUMANN, E.: *Lunds. Univ. Arsskr.*, N. F., **2**, 17, n. 4. 1921.
- (13) PONZ, F.: *R. esp. Fisiol.*, **4**, 203. 1948.
- (14) SOLS, A.: *R. esp. Fisiol.*, **3**, 67. 1947. *Ibid.*, **5**, 57. 1949.
- (15) SOLS, A. y PONZ, F.: *R. esp. Fisiol.*, **2**, 283. 1946.
- (16) STEINER, M.: *Die Naturwissenschaften*, **26**. 1938.
- (17) WELCH, P. S.: *Limnology*, Mc. Graw-Hill Co., New York and Londres. 1935.

