

Inv. Pesq.	47 (3)	Págs. 419-434	diciembre 1983
------------	--------	---------------	----------------

— Respuesta de la diatomea *Thalassiosira rotula* (Meunier, 1910) a los bifenilos policlorados. Implicaciones metodológicas *

M. J. FERNANDEZ REIRIZ, J. M. FRANCO SOLER y M. A. MURADO GARCÍA

Instituto de Investigaciones Pesqueras. Muelle de Bouzas. Vigo.

Palabras clave: Diatomea, *Thalassiosira rotula*, bifenilos policlorados (PCBs), DI_{50} , clorofilas, carotenoides, proteínas.

Key words: Diatom, *Thalassiosira rotula*, polychlorobiphenyls (PCBs), ID_{50} , chlorophylls, carotenoids, proteins.

RESUMEN: Se expusieron poblaciones de *Thalassiosira rotula* en crecimiento exponencial, a 20, 50, 100 y 200 ng/ml (ppb) del A-1232 y a 5, 10, 25 y 50 ng/ml (ppb) del A-1248. La $DI_{50/14}$ del A-1232 resultó ser de 71 ppb, mientras que la $DI_{50/14}$ del A-1248 fue de 20 ppb. Los resultados experimentales muestran que dichas dosis varían a lo largo del tiempo de incubación; asimismo se refleja una relación directa entre toxicidad y grado medio de cloración.

Puesto que la sucesión de fases que caracteriza el desarrollo de los cultivos de microorganismos en régimen discontinuo es correlativa con el estado fisiológico de las poblaciones celulares, cabe suponer que la fase en que se encuentre la población utilizada como inóculo determine en alguna medida su respuesta a los PCBs. Se observa que la fase del ciclo de crecimiento de la que procede la población del inóculo ejerce una influencia determinante sobre la sensibilidad del microorganismo a los tóxicos, siendo esta sensibilidad máxima en la fase exponencial.

SUMMARY: RESPONSE OF A MARINE DIATOM, *Thalassiosira rotula*, TO PCBs. METHODOLOGICAL IMPLICATIONS. — Cultures of *Thalassiosira rotula*, in exponential growth, were exposed to 20, 50, 100 and 200 ng/ml (ppb) of A-1232 and to 5, 10, 25 and 50 ng/ml (ppb) of A-1248. The $ID_{50/14}$ of A-1232 was estimated to be 71 ppb, while $ID_{50/14}$ of A-1248 was of 20 ppb. Experimental results show that these doses vary throughout the period of incubation; likewise there is a direct relation between toxicity and mean degree of chlorination.

As the succession of phases characterizing the culture growth of microorganism in bath culture is correlative with the physiological state of the cell populations, it can be assumed that the phase of the culture used as inoculum determines the response to PCBs. We can observe that the growth phase from which the inoculum comes, has a determining influence on the sensibility of the microorganism to the toxic; this sensibility is highest in the exponential phase.

INTRODUCCIÓN

La importancia toxicológica de los bifenilos policlorados (PCBs), sin duda uno de los grupos de microcontaminantes ambientales de mayor estabilidad y difusión, ha favorecido, en los últimos años, la realización de numerosos estudios en torno a sus niveles en sustratos naturales, flora y fauna silvestre

* Recibido el 11 de abril de 1983.

(RISEBROUGH *et al.*, 1968; JENSEN *et al.*, 1969; BALUJA *et al.*, 1977; FRANCO *et al.*, 1976, 1978, 1979), sus tasas y mecanismos de degradación y sus efectos sobre los seres vivos en variadas condiciones experimentales (JENSEN, 1963; MORGAN, 1972). Dentro de este capítulo —tal vez el menos abundantemente trabajado—, la información relativa a las interacciones PCBs-microorganismos, más escasa que la correspondiente a animales superiores, particularmente por lo que se refiere a los detalles de la incidencia sobre el microorganismo, resulta además, con cierta frecuencia, difícilmente concordante e incluso contradictoria. Así, no es raro encontrar valores muy diferentes de las DI_{50} (EWALD *et al.*, 1976; MOORE *et al.*, 1972) o resultados claramente discrepantes en lo referente a los efectos de los PCBs sobre los niveles relativos de diversos componentes esenciales (proteínas, lípidos, hidratos de carbono, pigmentos fotosintéticos, ARN) de microorganismos (KEIL *et al.*, 1971; EWALD *et al.*, 1976; MURADO *et al.*, 1976).

Aunque parcialmente atribuibles a diferencia de comportamiento entre cepas distintas de las mismas especies, tales discrepancias, sin embargo, pueden venir en gran parte determinadas por cuestiones de orden metodológico. Así el volumen del inóculo, el estado del cultivo de donde proceden, el momento en que se adiciona el tóxico —si es que no se hace al iniciarse la incubación—, la utilización de disolventes que lo lleven, aun a concentraciones por sí mismas inactivas, la forma del recipiente, aun para el caso de cultivos del mismo volumen y, por supuesto, los tiempos de exposición que se consideren, son factores que deben condicionar en grado variable la respuesta del microorganismo. Por otra parte —y esto parece todavía más importante— cuando, como es el caso más frecuente, el estudio se lleva a cabo utilizando cultivos en régimen discontinuo, la variación del estado fisiológico del microorganismo a lo largo de la sucesión de fases que caracteriza su desarrollo en estas condiciones, relativiza notablemente la representatividad de los resultados que se obtienen después de un tiempo determinado de incubación, por lo cual una descripción adecuada de la respuesta debe implicar un estudio paralelo de la evolución de los parámetros que se consideren relevantes, en cultivos de control y dosificados con los tóxicos, a lo largo de todas las fases por las que atraviesen.

En este trabajo, que estudia la respuesta de la diatomea marina *Thalassiosira rotula* en cultivo discontinuo a la presencia —no simultánea— de dos mezclas comerciales de PCBs (Aroclor-1232 y Aroclor-1248, cuyos contenidos medios en cloro son del 32 % y 48 % respectivamente), se presta una especial atención a la estandarización de los mencionados parámetros operatorios, así como a la influencia del estado fisiológico de la población del inóculo sobre las relaciones dosis-respuesta, relaciones que ponen de manifiesto una cierta complejidad y se describen, en distintas fases de los cultivos, a través de las variaciones en las densidades de población y en los niveles de diversos componentes esenciales del microorganismo.

MATERIAL Y MÉTODOS

El microorganismo se aísla de muestras de agua de mar mediante enriquecimiento, micromanipulación y resiembras, y se cultiva en el medio «f/2» de GUILLARD y RYTHER (1962) preparado con agua de mar previamente envejecida en la oscuridad a 28°C durante 21 días y filtrada luego a través de un filtro de fibra de vidrio (Whatman G-F). Como recipientes de cultivo se utilizan matraces esféricos de 1000 ml de capacidad, con un volumen igual de medio, al que una bomba de acuario proporciona simultáneamente aireación y agitación. La incubación se lleva a cabo en cámara isotérmica a $12 \pm 1^\circ\text{C}$. Una batería de tubos fluorescentes proporciona una iluminación lateral y continua de una intensidad aproximada de 2500 lux.

Los inóculos consisten en suspensiones de células procedentes, en el caso general, de un cultivo que se encuentra al inicio de la fase exponencial. La población inicial se ajusta a una densidad de 5000 células/ml.

Después de un ensayo preliminar sobre un intervalo de concentraciones más amplio, los cultivos se dosificaron al comienzo del período de incubación con 200 μl de soluciones de Aroclor-1232 y Aroclor-1248 en acetona, a las concentraciones necesarias para obtener unos niveles iniciales de 20, 50, 100 y 200 ng/ml (ppb) para el Aroclor menos clorado y 5, 10, 25 y 50 ng/ml (ppb) para el más clorado. Iguales volúmenes de acetona se adicionan a los correspondientes cultivos de control. Todos los ensayos se realizan por triplicado, y el error estándar no excede en ningún caso del 4 %.

La determinación del número de células se lleva a cabo por medida de la absorbancia a 750 nm, de alícuotas de los cultivos tomadas a diferentes períodos de incubación, frente a un blanco de medio puro, operando dentro de los intervalos en los que previamente se comprueba un alto grado de ajuste entre los datos fotométricos y los obtenidos por conteo directo en cámara hematocitométrica.

Valoración de los pigmentos fotosintéticos

Se lleva a cabo siguiendo esencialmente metodologías recomendadas en SCOR (UNESCO, 1966), sobre extractos en acetona: agua 90-10 (v/v) obtenidos por maceración (12 horas/0°C) en la oscuridad, seguida de otras 2 o 3 extracciones sucesivas del material retenido al filtrar una alícuota del cultivo a estudiar a través de un filtro de papel de 25 mm de diámetro, por el que previamente se pasan 5 ml de una suspensión de MgCO_3 (4 g/l) a fin de evitar posibles descomposiciones de la clorofila y facilitar la filtración.

Para la cuantificación de las clorofilas se aplican las ecuaciones de JEFFREY y HUMPHREY (1975).

$$\text{Clorofila } a: 11,47 A_{664} - 0,40 A_{630}.$$

$$\text{Clorofila } c_1 + c_2: 24,36 A_{630} - 3,73 A_{664}.$$

Para los carotenoides se utiliza la relación de PARSONS y STRICKLAND (1963).

$$\text{Carotenoides: } 10 A_{480}.$$

Las absorbancias a las longitudes de onda señaladas se corrigen por sus-tracción de las lecturas obtenidas a 750 nm.

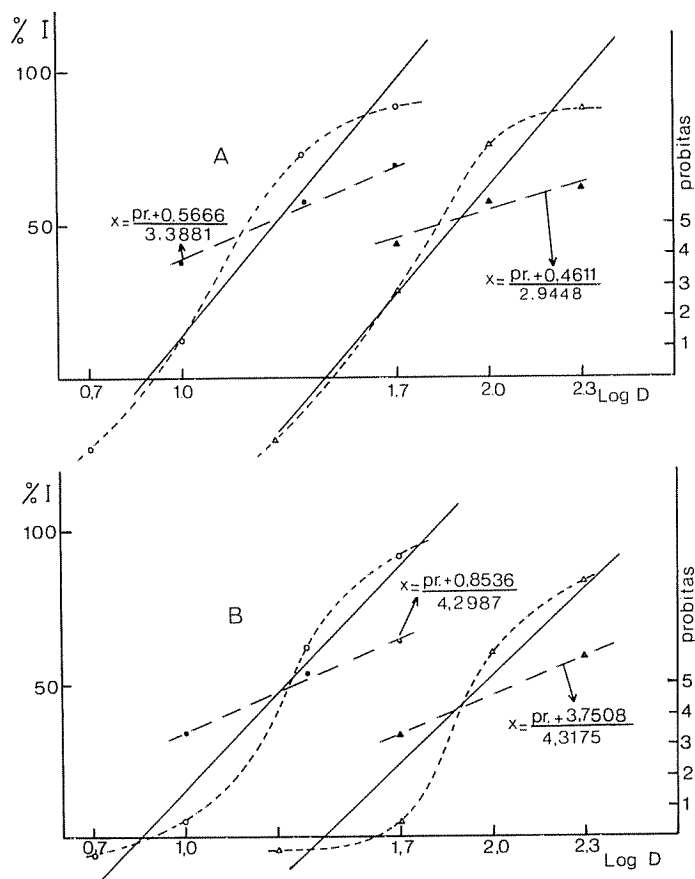


FIG. 1. — Relaciones dosis-respuesta en cultivos de *Thalassiosira rotula* dosificados con Aroclor-1232 (Δ) y Aroclor-1248 (\circ). Tiempo de exposición: A, 44 horas, y B, 68 horas. Las curvas punteadas representan el log D (dosis) frente al % I (inhibición), supuesta una relación sigmoideal. Las rectas continuas postulan una relación lineal. Las rectas punteadas corresponden a las transformaciones probíticas.

Valoración de las proteínas

Se lleva a cabo por el método de LOWRY *et al.* (1951), según lo aplica PACKARD *et al.* (1972).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo de Thalassiosira rotula en presencia de Aroclor-1232 y Aroclor-1248. Las relaciones dosis-respuesta

En la figura 1 quedan reflejadas las relaciones dosis-respuesta para cultivos tratados según se indicó, cuando, después de períodos de incubación de 44 y 68 horas respectivamente, se cuantifica la respuesta en términos de poblaciones celulares. Aunque en dichas figuras se representan también las regresiones que resultan al postular una relación log dosis - % inhibición respuesta de carácter lineal, tal relación viene mejor definida por una curva de tipo sigmoide, reducible a su vez a una recta mediante la transformación de los tantos por ciento de inhibición en probitas (MEYNELL y MEYNELL, 1969). Después de un tiempo de exposición de 44 horas, las DI_{50} (dosis que ejerce un efecto inhibitorio del 50 % sobre las poblaciones celulares) calculadas en base a esta última consideración, resultaron ser de 71 y 20 ppb ($\mu\text{g/litro}$) para el Aroclor-1232 y el Aroclor-1248 respectivamente.

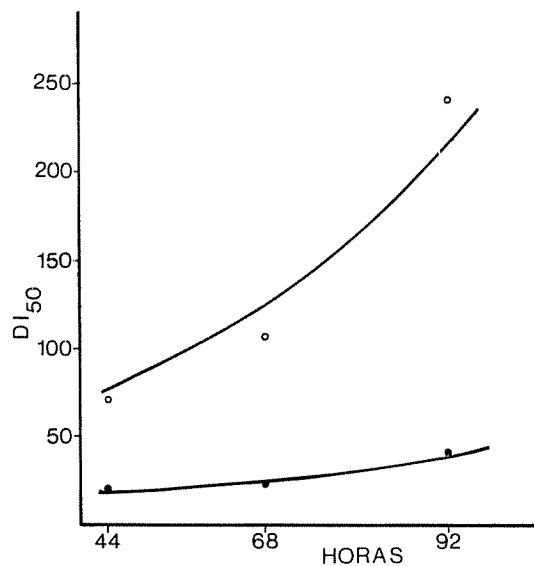


FIG. 2. — Variación de la DI_{50} del Aroclor-1232 (○) y del Aroclor-1248 (●). Las curvas continuas postulan una relación exponencial. Para explicación, véase el texto.

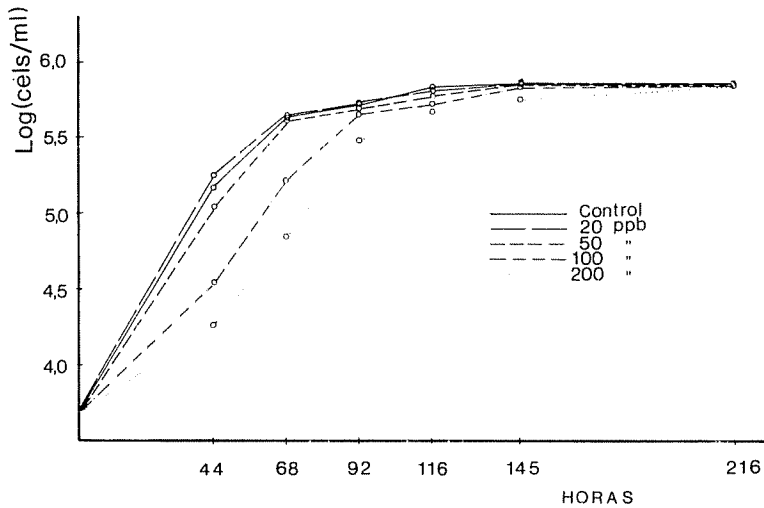


FIG. 3. — Crecimiento numérico de *Thalassiosira rotula* en presencia de varias concentraciones de Aroclor-1232 (20, 50, 100 y 200 ppb).

Por otra parte, la variación de las DI_{50} a lo largo del tiempo de exposición tiene lugar de acuerdo con una ecuación exponencial del tipo:

$$DI_{50} = a e^{bt}$$

que, expresando las DI_{50} en $\mu\text{g/l}$ y los tiempos en horas, permite definir (fig. 2):

$$\text{Aroclor-1232: } DI_{50} = 22,18 e^{2,5 \cdot 10^{-2}t} \quad (r = 0,98; \text{ sign. } 99 \%)$$

$$\text{Aroclor-1248: } DI_{50} = 9,905 e^{1,5 \cdot 10^{-2}t} \quad (r = 0,94; \text{ sign. } 95 \%)$$

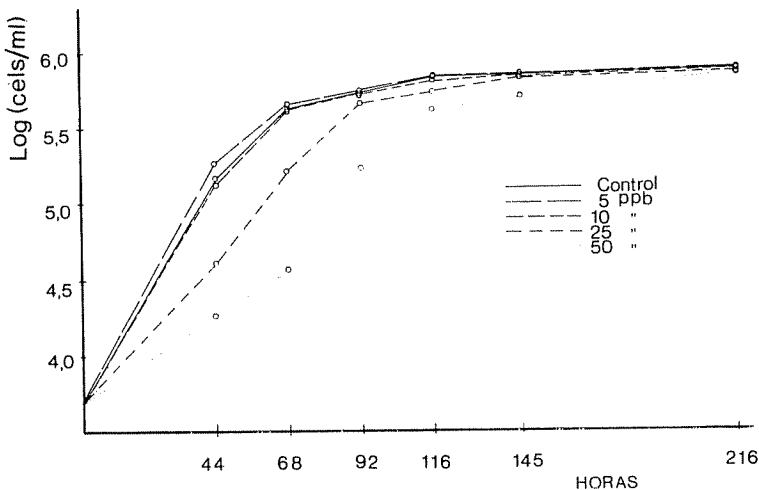


FIG. 4. — Crecimiento numérico de *Thalassiosira rotula* en presencia de varias concentraciones de Aroclor-1248 (5, 10, 25 y 50 ppb).

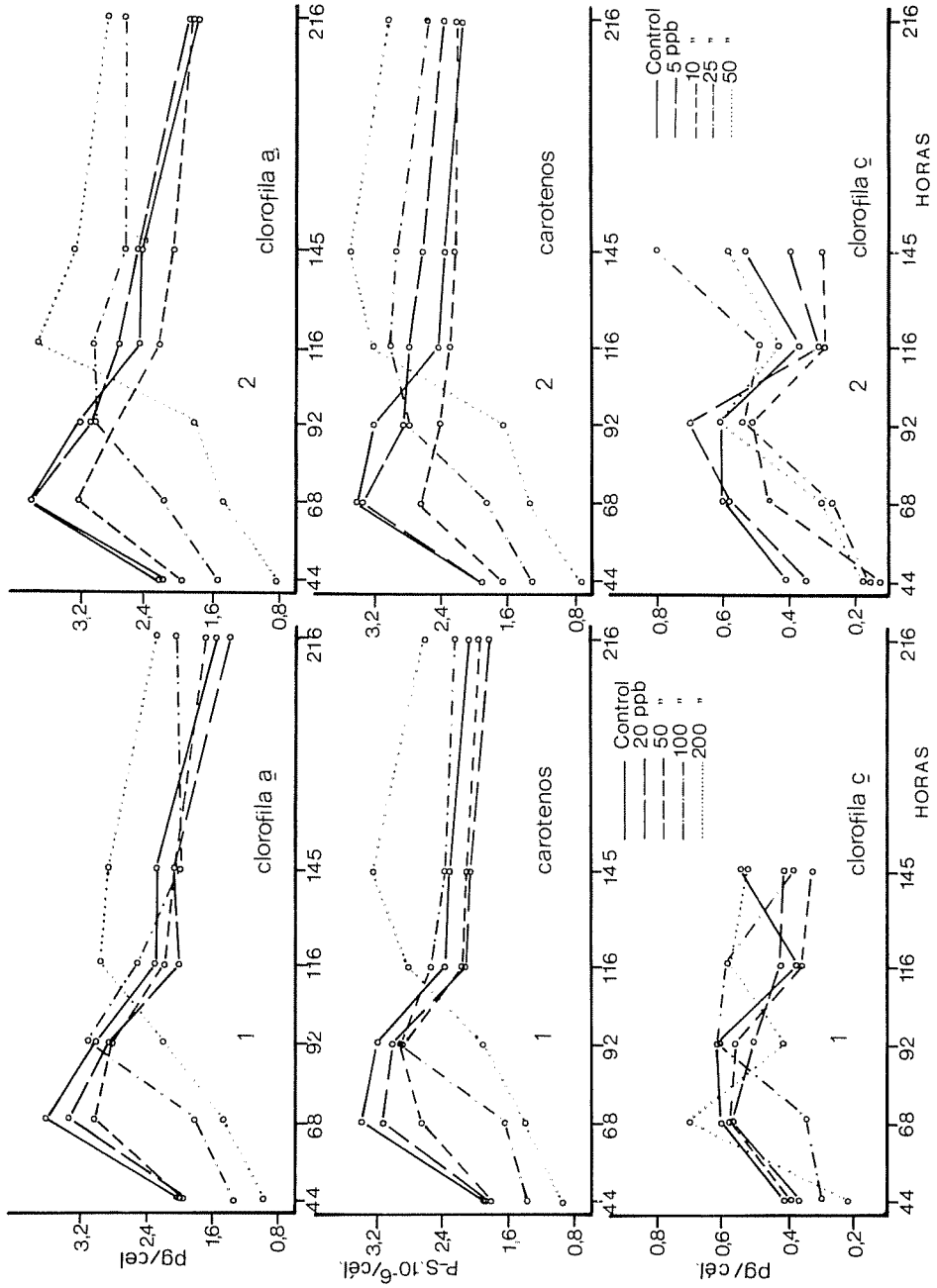


FIG. 5. — Evolución de los niveles de pigmentos fotosintéticos de *Thalassiosira rotula* en presencia de 1: Aroclor-1232, y 2: Aroclor-1248.

CUADRO I

DI₅₀ del Aroclor-1232 y del Aroclor-1248 frente a *Thalassiosira rotula*, obtenidas a través de diferentes criterios (tiempo de exposición: 44 horas).

	32 ‰	48 ‰
Clorofila $c_1 + c_2$	64,0 (ppb)	11,6 (ppb)
Carotenos	65,1 (ppb)	15,5 (ppb)
Clorofila a	66,0 (ppb)	16,2 (ppb)
Número de células	71,5 (ppb)	20,3 (ppb)

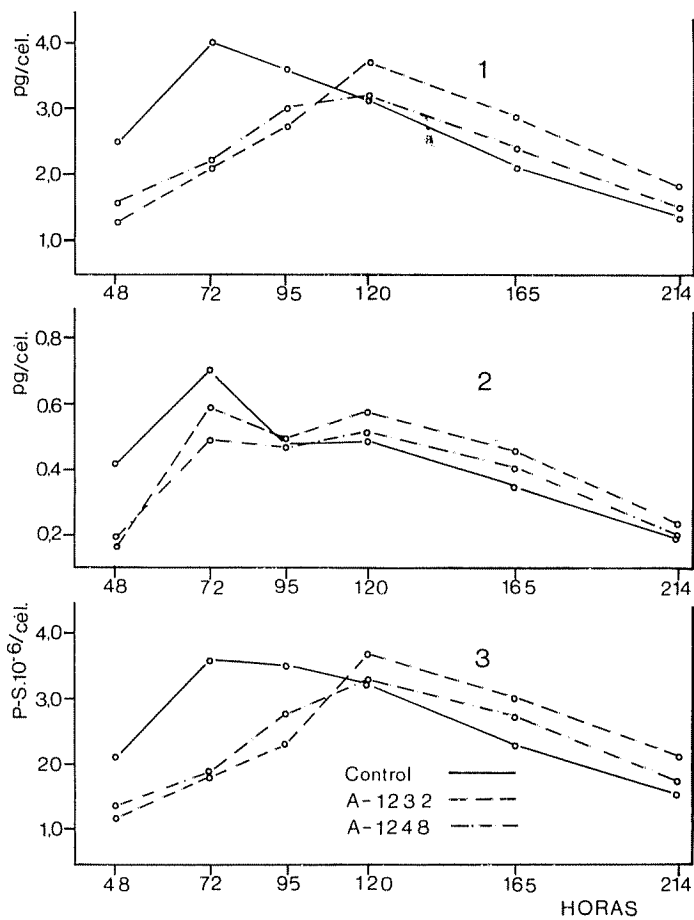


FIG. 6. — Evolución de los niveles de 1: clorofila a ; 2: clorofila c , y 3: carotenos, en presencia de la DI₅₀ del Aroclor-1232 y Aroclor-1248.

dinámica que cabe atribuir, simplemente, a la progresiva dilución de los xenobióticos en la biomasa en crecimiento.

Es, pues, durante las fases más precoces de la incubación cuando los efectos tóxicos de los xenobióticos aparecen más patentes, acusando los cultivos desarrollados en presencia de los Arocloros una fase de latencia que, ausente en los controles (figs. 3 y 4), se hace tanto más pronunciada cuanto más alta

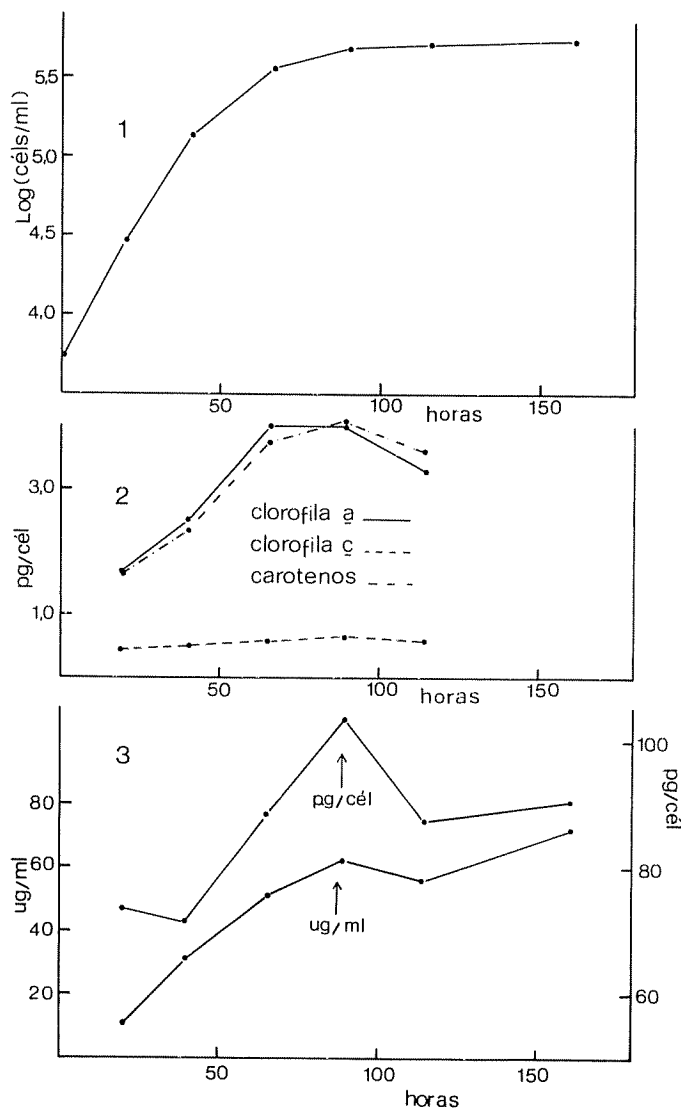


FIG. 7. — Desarrollo de un cultivo de *Thalassiosira rotula* en ausencia de Arocloros. 1: crecimiento numérico; 2: pigmentos fotosintéticos, y 3: niveles de proteínas.

es la concentración inicial de tóxico, excepto para las dosis inferiores de ambos Arocloros, casos en los que el crecimiento resulta incluso ligeramente estimulado. Una vez alcanzada la fase en que la tasa de división descende, la influencia de los xenobióticos resulta más confusa y, en todo caso, menos acusada.

Finalmente, cabe destacar que, en concordancia con numerosos resultados de otros autores (COOLE *et al.*, 1973), la toxicidad de los Arocloros parece elevarse a medida que aumenta el grado medio de cloración. Debe señalarse que asimismo existe un número no menos importante de resultados experimentales que ponen de manifiesto una relación inversa (MURADO, 1978) y que sugieren la complejidad de los efectos tóxicos.

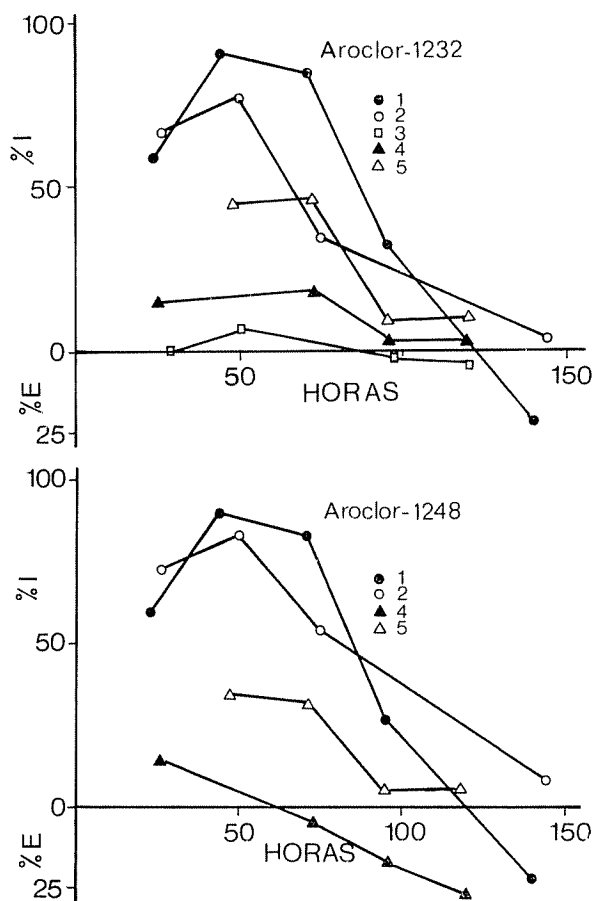


FIG. 8. — Influencia de la edad del inóculo en los % I (inhibición) de *Thalassiosira rotula* incubada en presencia de Aroclor-1232 y Aroclor-1248. 1: inóculo de 20 horas; 2: inóculo de 41 horas; 3: inóculo de 66 horas; 4: inóculo de 90 horas, y 5: 115 horas.

Por lo que se refiere a la influencia de los xenobióticos sobre la composición pigmentaria del microorganismo (fig. 5), es posible constatar (cuadro I) que cuando el cálculo de las DI_{50} se basa en las depresiones detectables en los niveles de pigmentos fotosintéticos por unidad de volumen de cultivo después de un período de exposición de 44 horas, los valores encontrados varían paralelamente en ambos Arocloros, si bien de un modo más acusado en el Aroclor-1248, resultando ser la clorofila *c* el componente más afectado. Siguen los carotenos *y*, por último, la clorofila *a*, componente que, de todos modos, resulta significativamente más deprimido que las poblaciones celulares. Debe señalarse asimismo que las mencionadas depresiones en los niveles pigmentarios no sólo constituyen una mera consecuencia del descenso en las pobla-

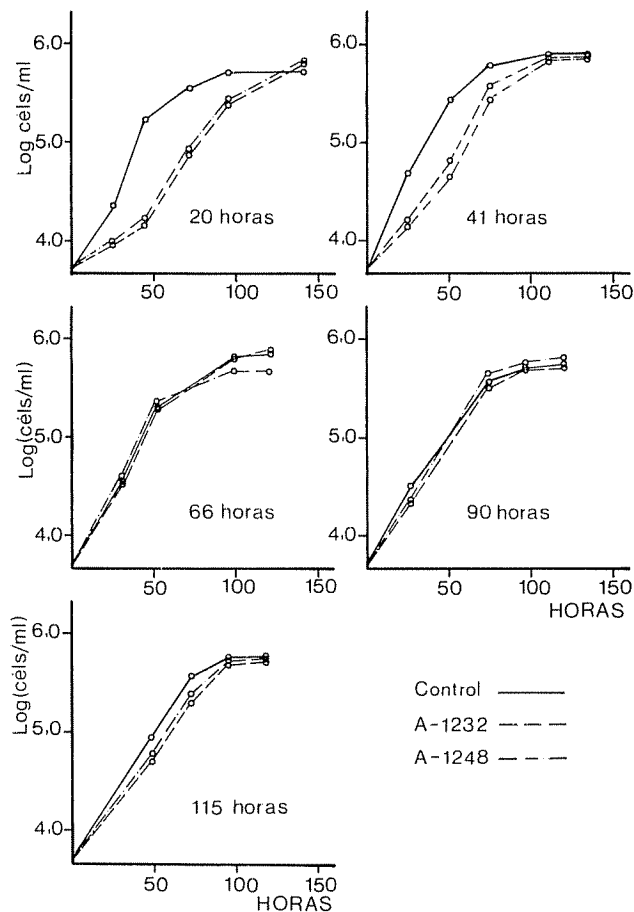


FIG. 9. — Influencia de la edad del inóculo sobre el crecimiento numérico de *Thalassiosira rotula* en su respuesta a los PCBs.

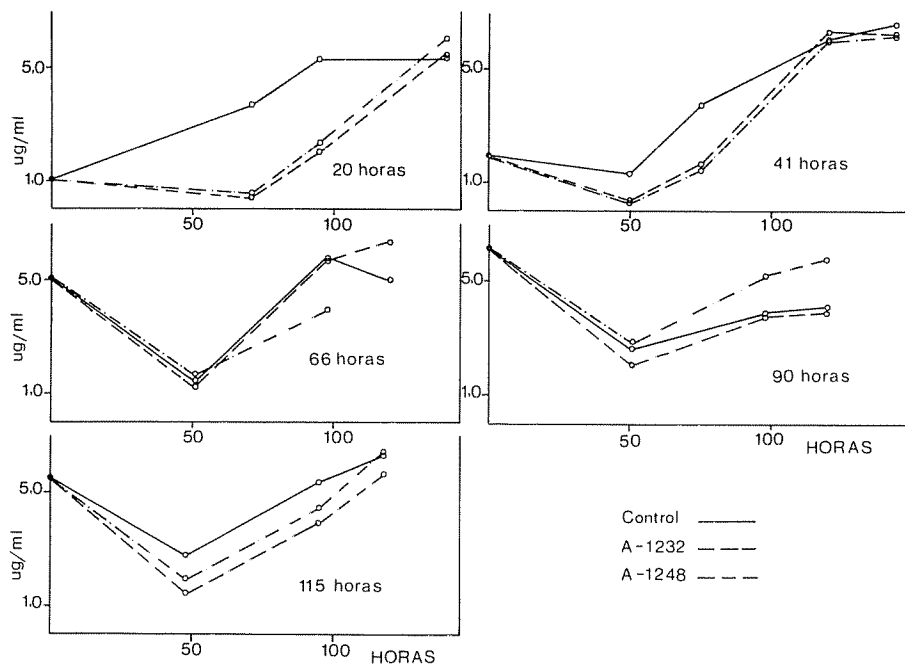


FIG. 10. — Influencia de la edad del inóculo sobre los niveles de proteínas de *Thalassiosira rotula* en su respuesta a los PCBs.

ciones celulares, sino también del descenso en los contenidos pigmentarios por célula inducido por los xenobióticos. Y, por otra parte, que los valores máximos en las concentraciones de pigmentos, tanto si se consideran por unidad de volumen de cultivo como por célula (fig. 6), se alcanzan con tanto mayor retraso cuanto mayor sea la toxicidad implicada en la dosificación inicial de los cultivos.

El examen de la mencionada figura 6 pone de manifiesto la dificultad de evaluar respuestas toxicológicas como la aquí estudiada en función de datos puntuales. Así, es claro que la situación de los niveles relativos de los pigmentos fotosintéticos proporciona, durante las primeras 100 horas de incubación, una imagen notablemente diferente que la que ofrecen de las 100 primeras horas en adelante.

Influencia de la edad del inóculo en la respuesta de Thalassiosira rotula a los PCBs

Puesto que la sucesión de fases que caracteriza el desarrollo de los cultivos de microorganismos en régimen discontinuo es correlativa con el estado

fisiológico de las poblaciones celulares, cabe suponer que la fase en la que se encuentra la población utilizada como inóculo determine en alguna medida su respuesta a los xenobióticos.

Para investigar tal hipótesis, una serie de muestras de igual número de células tomadas después de 20, 41, 66, 90 y 115 horas de iniciada la incubación, partiendo de un cultivo tal como se tipifica en la figura 7, se cultivan en presencia de Aroclor-1232 y Aroclor-1248 a concentraciones iniciales equivalentes a las DI_{50} calculadas en base a las densidades celulares para 44 horas de exposición, y se compara la evolución de cada cultivo.

Tal como se pone de manifiesto en la figura 8, cuando las respuestas se cuantifican en términos de poblaciones celulares, no sólo se evidencia que los efectos inhibitorios decrecen, después de pasar por un máximo, a medida que aumenta el período de exposición, sino que también lo hacen siguiendo además una dinámica cada vez menos acusada, a medida que aumenta la edad

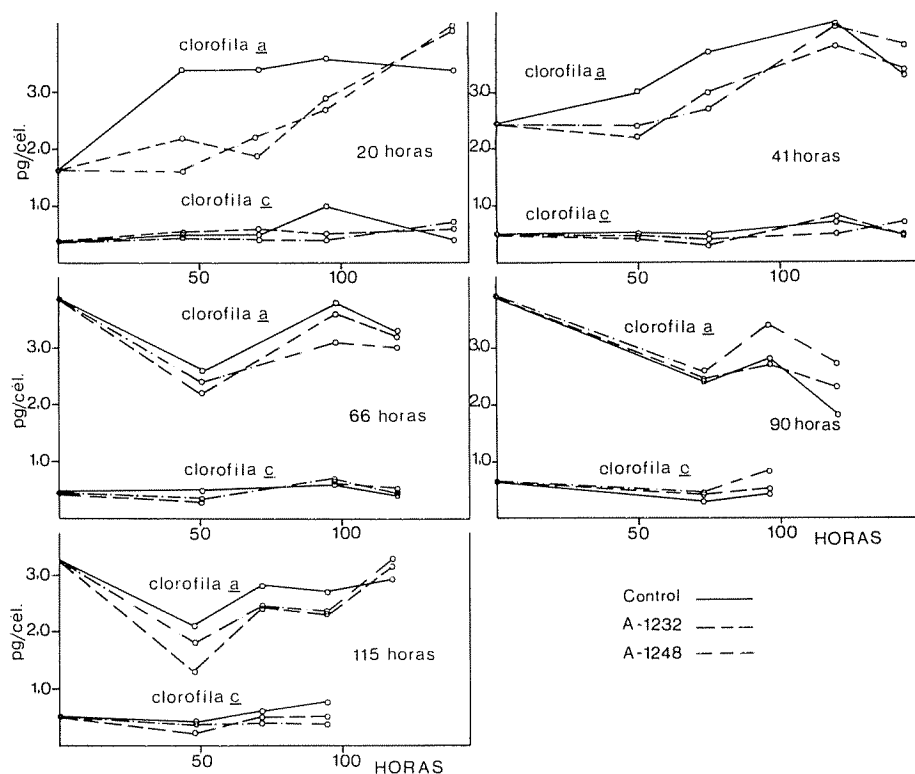


FIG. 11. — Influencia de la edad del inóculo sobre los niveles de clorofila *a* y clorofila *c* de *Thalassiosira rotula* en su respuesta a los PCBs.

del inóculo. Así, tanto por lo que se refiere a la densidad celular (fig. 9), como a los niveles de proteínas (fig. 10) y pigmentos fotosintéticos (figs. 11 y 12), la respuesta característica a los PCBs en forma de una fase de latencia inexistente en el desarrollo de los cultivos de control, sólo es detectable claramente con los inóculos de 20 y 41 horas de edad. Aunque la incidencia sobre los pigmentos fotosintéticos parece algo más general, y aunque con inóculo de fases tardías se aprecia un ligero recrudecimiento de los efectos depresores sobre todos los parámetros estudiados, es evidente que la sensibilidad de las poblaciones celulares a los xenobióticos estudiados varía notablemente a lo largo de los estados que se suceden en el ciclo de crecimiento discontinuo.

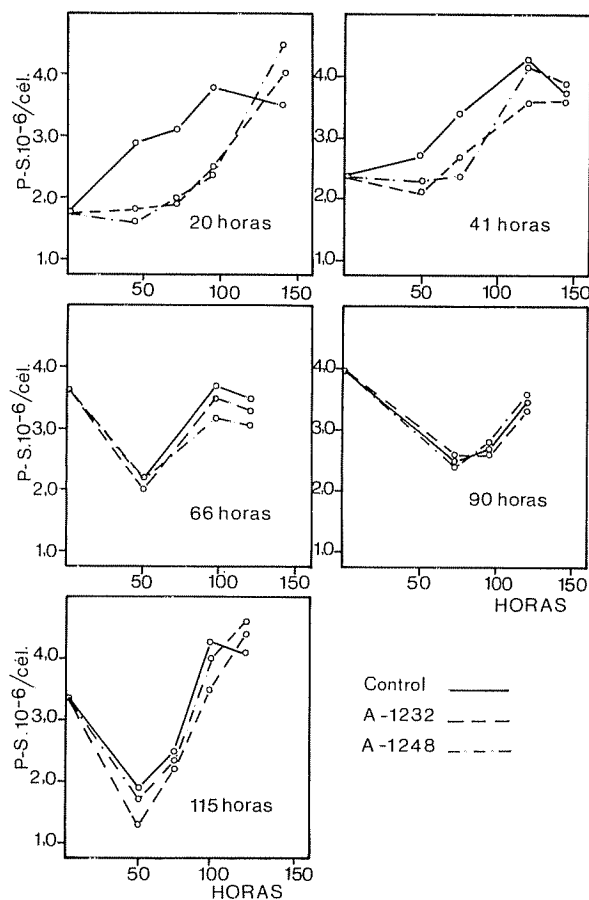


FIG. 12. — Influencia de la edad del inóculo sobre los niveles de carotenos de *Thalassiosira rotula* en su respuesta a los PCBs.

CONCLUSIONES

La tipificación de la incidencia sobre la diatomea marina *Thalassiosira rotula* de las mezclas de bifenilos policlorados comercializadas bajo los nombres de Aroclor-1232 y Aroclor-1248, revela una problemática toxicológica compleja, en muchos de cuyos aspectos no suelen entrar, pese a sus implicaciones metodológicas, la mayoría de los trabajos que se ocupan de los efectos de los contaminantes ambientales sobre los microorganismos, y de la que cabe destacar:

- 1) En las condiciones estudiadas, la toxicidad de los Aroclores aumenta con su contenido medio en cloro.
- 2) En todos los casos, las DI_{50} calculadas en base a la depresión de las poblaciones celulares son más altas que las estimadas en función de las depresiones en los niveles de pigmentos fotosintéticos. De éstos, el más afectado es la clorofila *c*.
- 3) Los valores de las DI_{50} calculadas por cualquiera de los criterios aplicados varían a lo largo del tiempo de incubación, como consecuencia de que, si bien la presencia de los xenobióticos determina la aparición de unas acusadas fases de latencia, no parece afectar a las cosechas máximas.
- 4) La fase del ciclo de crecimiento de la que procede la población del inóculo ejerce una influencia determinante sobre la sensibilidad del microorganismo a los tóxicos, siendo máxima durante la fase exponencial.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fraga por sus consejos y a Dña. Rosa Collazo por su colaboración.

BIBLIOGRAFÍA

- BALUJA, G.; M. A. MURADO; L. M. HERNÁNDEZ. — 1977. Contaminación del medio por plaguicidas organoclorados. Residuos de insecticidas y PCBs en tres espeques faunísticas del litoral Sur y Sureste español. *Inf. Técn. I.I.P.*, 44.
- EWALD, W. G.; J. E. FRENCH; M. A. CHAMP. — 1976. Toxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs) to *Euglena gracilis*: Cell population growth, carbon fixation, chlorophyll level, oxygen consumption, and protein and nucleic acid synthesis. *Bull. Env. Cont. Toxicol.*, 16 (1).
- FERNÁNDEZ, M. J.; J. M. FRANCO. — 1976. Presencia de DDT, sus derivados y PCBs en sardina (*Sardina pilchardus*) y jurel (*Trachurus trachurus*) del NW de España. *Inf. Técn. I.I.P.*, 39.
- FRANCO, J. M.; F. FRAGA; M. J. FERNÁNDEZ; C. MOURIÑO. — 1978. Región de afloramiento de la costa de Galicia. Datos hidrográficos básicos de la campaña «Galicia III» y contaminantes organoclorados. *Resultados Expediciones Científicas*, 7.
- FRANCO, J. M.; M. J. FERNÁNDEZ. — 1979. Residuos de bifenilos policlorados (PCBs) y DDT en tres especies de moluscos, mejillón (*Mytilus edulis*), lapa (*Patella* sp.) y nucela (*Nucella lapillus*) de las rías de Vigo y Pontevedra. *Inv. Pesq.*, 43 (3).
- GUILLARD, R. R. L.; J. H. RYHER. — 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervaceae* Cleve. *Canad. J. of Microbiol.*, 8.
- JEFFREY, S. W.; G. F. HUMPHREY. — 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen. Bd.*, 167 S.
- JENSEN, H. L. — 1963. Carbon nutrition of some microorganisms decomposing halogen-substituted aliphatic acids. *Acta Agr. Scand.*, 13.
- JENSEN, J.; A. G. JOHNELS; S. OLSON; G. OTTERLIND. — 1969. DDT and PCBs in marine animals from Swedish waters. *Nature*, 224.
- KEIL, J. E.; L. E. PRIESTER; S. H. SANDIFER. — 1971. Polychlorinated biphenyl (Aroclor-1242): Effects of uptake on growth, Nucleic acids, and chlorophyll of a marine diatom. *Bull. Env. Cont. Tox.*, 6 (2).
- LOWRY, O. H.; N. J. ROSEBRONG; A. L. FAIR. — 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 (1).
- MEYNELL, G. G.; E. MEYNELL. — 1969. Bacteriología experimental. Edic. Omega.
- MOORE, S. A.; R. C. HARRIS. — 1972. Effects of polychlorinated biphenyl on marine phytoplankton communities. *Nature*, 240.
- MORGAN, J. R. — 1972. Effects of Aroclor-1242 and DDT on cultures of an alga, protozoan, daphnid, ostracod and guppy. *Bull. Env. Cont. Toxicol.*, 8 (3).
- MURADO, M. A. — 1978. Interacciones fitoplancton-hidrocarburos aromáticos policlorados. I. Efectos de tres halowax sobre el crecimiento, pigmentos fotosintéticos y respiración endógena de *Nitzschia* sp. *Inv. Pesq.*, 42 (2).
- MURADO, M. A.; M.^a C. TEJEDOR; G. BALUJA. — 1976. Interactions between polychlorinated biphenyls (PCBs) and soil microfungi. Effects of Aroclor-1254 and other PCBs on *Aspergillus flavus* cultures. *Bull. Env. Cont. Toxicol.*, 15 (6).
- PACKARD, T. T.; T. M. MOORE; D. A. HARMON. — 1972. Biochemical assays. Special report n.º 52. Department of Oceanography, University of Washington, Seattle. Washington 98195.
- RISEBROUGH, R. W.; P. PEICHE; D. B. PEAKALL; S. G. HERMAN; M. N. HERMAN; M. N. KIRVEN. — 1968. Polychlorinated biphenyls in the global ecosystem. *Nature*, 220.
- SCOR-UNESCO. — 1960. Determination of photosynthetic pigments in seawater. *Monographs on Oceanographic Methodology*, 1:11-18. UNESCO.
- STRICKLAND, J. D.; T. R. PARSONS. — 1968. A practical handbook of seawater analysis. *Bull. Fish. Res. Can.*, 67.