

## Crecimiento de la diatomea *Thalassiosira pseudonana* en cultivos estáticos con iluminación continua y fotoperiodo a diferentes salinidades

José Antonio López Elías<sup>1</sup>

Norma García Lagunas

Laura Rebeca Jiménez Gutiérrez

Nolberta Huerta Aldaz

### RESUMEN

Se evaluó el crecimiento de *Thalassiosira pseudonana* en un sistema estático en salinidades de 15, 25 y 35 unidades prácticas de salinidad (psu), a iluminación continua y con fotoperiodo 12 h luz:12 h oscuridad. Los bioensayos se realizaron en matraces de 250 mL por cuadruplicado bajo condiciones controladas de laboratorio, utilizando el medio de cultivo f/2. Los parámetros monitoreados diariamente fueron luz, temperatura, pH y conteos celulares directos cada 12 horas. La variable salinidad afectó la concentración celular y la tasa de crecimiento de *T. pseudonana*, mientras que los regímenes de iluminación solamente afectaron la tasa de crecimiento máxima y acumulada. La tasa de crecimiento y densidad celular fueron mayores a la salinidad de 35 psu. La tasa de crecimiento máxima fue a la salinidad de 35 psu con 1.71 divisiones día<sup>-1</sup> y la concentración celular máxima fue de 555,000 cél/mL en los cultivos con luz continua y 1.0 divisiones día<sup>-1</sup> con 477,000 cél/mL en los cultivos con fotoperiodo. Los resultados indican que el crecimiento de *T. pseudonana*

es determinado por la salinidad con un crecimiento óptimo a 35 psu, mientras que a salinidad de 15 psu disminuye drásticamente su crecimiento.

Palabras clave: *Thalassiosira pseudonana*, salinidad, fotoperiodo, luz continua

### ABSTRACT

*Thalassiosira pseudonana* was grown in batch system at salinities of 15, 25 and 35 psu. Continuous light and 12:12 h light:dark photoperiod was evaluated. Bioassays were kept in f/2 medium, using 250 mL flasks under laboratory conditions. Light, temperature, pH and cell density were evaluated every 12 hours. Salinity affected the cell density and growth rate of *T. pseudonana*, while light conditions affected only the maximum and accumulated growth rate. The highest growth rate and cell density were founded at 35 psu of salinity. Maximum growth rate with was 1.7 divisions day<sup>-1</sup> and cell density was 554,700 cel/mL and in the cultures with photoperiod (12:12 h light:dark) was 1 division day<sup>-1</sup> and a cell density of 477,200 cel/mL. We concluded that

<sup>1</sup> Doctor en Ciencias. Profesor investigador titular "C" del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora. Correo electrónico: jlopez@guayacan.uson.mx

growth of *T. pseudonana* is influenced by salinity, with an optimum salinity of 35psu, while low salinities of 15 psu reduce algae growth.

Key words: *Thalassiosira pseudonana*, salinity, photoperiod, continuous light.

## INTRODUCCIÓN

Las microalgas son usadas en acuicultura como alimento vivo para todos los estadios de crecimiento de los moluscos, para los estadios larvales de crustáceos, para algunas especies de peces y en la producción de zooplancton (Muller-Feuga, 2004; Babaro y col., 2001). Los géneros de microalgas más utilizadas son: *Isochrysis*, *Nannochloropsis*, *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Dunaliella*, *Rhodomonas*, *Pavlova*, *Chaetoceros*, *Nitzschia* y *Thalassiosira* (Wikfors y Ohno, 2001). La selección de la microalga depende de características como: tamaño, calidad bioquímica, mayor crecimiento con altas densidades (Becker, 2004). Se han desarrollado diferentes medios para el cultivo de microalgas que van desde las fórmulas para enriquecer el agua de mar natural, hasta el uso de medios artificiales, la selección de un medio químico adecuado es el primer paso y el más importante para el éxito del cultivo (Paniagua-Michell y col., 1989). Las microalgas requieren diferentes factores para su crecimiento, dentro de estos se encuentran: los físico-químicos y los nutritivos. Entre los primeros, se destacan la luz, temperatura, salinidad, pH, CO<sub>2</sub> y fotoperiodo (Becker, 2004; Tzovenis y col. 2003). Dentro de los segundos son relevantes los macro nutrientes, que son utilizados para sintetizar compuestos orgánicos, y los micro nutrientes usados como catalizadores (Becker, 2004). El crecimiento microalgal se rige

por la ley del mínimo, es decir, el factor limitante del crecimiento es aquel que está presente en cantidades más próximas al mínimo crítico necesario. La salinidad es un factor abiótico importante, porque afecta el crecimiento y densidad celular de las microalgas en cultivo como en el ambiente marino, en este último además, determina su distribución e influye en la densidad, temperatura y gases disueltos del agua marina, lo cual ocasiona una respuesta de las microalgas a cambios en la salinidad regulado por cambios rápidos en el volumen celular y ajuste osmótico. La variación en la salinidad provoca que la célula libere iones, sintetice compuestos orgánicos, disminuya la fijación de CO<sub>2</sub> y afecte el metabolismo del nitrógeno (Kirst, 1989).

Las microalgas tienen un rango de tolerancia muy alto a la concentración de sales, lo cual no implica que crezcan bien a las diferentes salinidades (Brown y col., 1996). Las condiciones hipoosmóticas tienden a ser más peligrosas que las altas salinidades, debido a que la tasa de crecimiento y actividad metabólica se reducen drásticamente en salinidades por debajo de 20 ppm (Kirst, 1989).

El crecimiento óptimo y tolerancia a las variaciones de salinidad depende de la adaptación de las especies de microalgas, las especies estuarinas toleran mejor las bajas salinidades que las especies oceánicas (Kirst, 1989). Renaud y Parry (1994), reportan que salinidades de 10 a 35 psu no producen cambios en la tasa de crecimiento de *Isochrysis* sp. y *Nitzschia frustulum*, sin embargo, la velocidad de crecimiento de *N. oculata* disminuye a 35 psu.

El fotoperiodo (tiempo de exposición a la luz) es otro factor importante que tiene efecto sobre los ciclos de vida y actividades metabólicas de las microalgas tanto en cultivo como en la naturaleza. En condiciones naturales, la mayoría de las algas se establecen en periodos alternos de luz: oscuridad, sin embargo, en la mayoría de los laboratorios de microalgas se mantiene constante la iluminación en los cultivos al interior, debido a que esta favorece la división celular en ciertas microalgas como las diatomeas; cuando se llegan a utilizar los ciclos luz:oscuridad, es con el fin de simular las condiciones naturales o la de sincronizar los cultivos (Humprey, 1979).

La diatomea *T. pseudonana* ha sido utilizada en acuicultura marina como alimento vivo dado su valor nutritivo, principalmente para moluscos y crustáceos (Wikfors y Ohno, 2001), además, tiene la capacidad para crecer en cultivos masivos generando buenas densidades celulares, lo que la hace una especie ideal para investigación sobre todo en la búsqueda de como eficientizar su producción.

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de diferentes salinidades, iluminación continua y fotoperiodo 12 h luz:12 h oscuridad en el crecimiento y densidad celular de *Thalassiosira*

*pseudonana*, en cultivos estáticos crecidos bajo condiciones de laboratorio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La diatomea *Thalassiosira pseudonana*, fue cultivada en tubos de ensaye con tapón de rosca en el medio de cultivo f/2 (Guillard y Ryther, 1962) para una primera aclimatación a las diferentes salinida-

*En la mayoría de microalgas el crecimiento se lleva acabo durante el periodo de luz debido a que a través de la fotosíntesis generan material orgánico y energía suficiente para este proceso, mientras que la división celular se da en el periodo de oscuridad, sin embargo en las diatomeas la división celular también se realiza en luz continua, por lo tanto, la densidad celular de T. pseudonana no se vió afectado por las condiciones de luz, pero si disminuyeron las tasas de crecimiento máxima con fotoperiodo.*

des (15, 25 y 35 psu), posteriormente se cultivaron en matraces de 125 mL y fueron aclimatados por 6 días. Para los cultivos se utilizó un diseño simple en matraces de 250 mL por cuadruplicado para iluminación continua y para el fotoperiodo 12 h luz:12 h oscuridad y se evaluaron por 7 días, se iniciaron con un inóculo de 50,000 cél/mL. Los cultivos fueron mantenidos bajo condiciones estándar de laboratorio las cuales fueron: iluminación continua con luz fría, fotoperiodo 12:12h y temperatura controlada por un acondicionador de aire a 22°C ± 1. Las variables monitoreadas cada 12 h fueron temperatura, iluminación, pH y densidad celular.

La temperatura fue medida con un termómetro de mercurio convencional (-10 a 120°C), el pH con un potenciómetro portátil marca Oakton pHTestr 1, previamente calibrado con amortiguadores de 7.0 y 10.0 y la iluminación con un fotómetro marca Fisher Scientific.

La cuantificación de la densidad celular se realizó mediante la técnica de conteo directo con un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad en un microscopio compuesto a 10x y muestras fijadas con lugol al 1% (Andersen, 2005).

Los datos de las concentraciones celulares fueron transformados para obtener el logaritmo base 2. Las tasas de crecimiento (número de divisiones por día) y el tiempo de duplicación se calcularon con la fórmula  $m = (\text{Log}_2 B_n - \text{Log}_2 B_0) / (t_n - t_0)$ . La tasa de crecimiento acumulada ( $\mu$ ) fue obtenida con la sumatoria de todas las tasas registradas en el experimento ( $\Sigma \mu$ ) y la tasa máxima fue el valor de  $\mu$  más alto obtenido durante el desarrollo de los cultivos.

El análisis estadístico aplicado fue un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey con un nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ) para examinar las diferencias entre tratamientos (Zar, 1989).

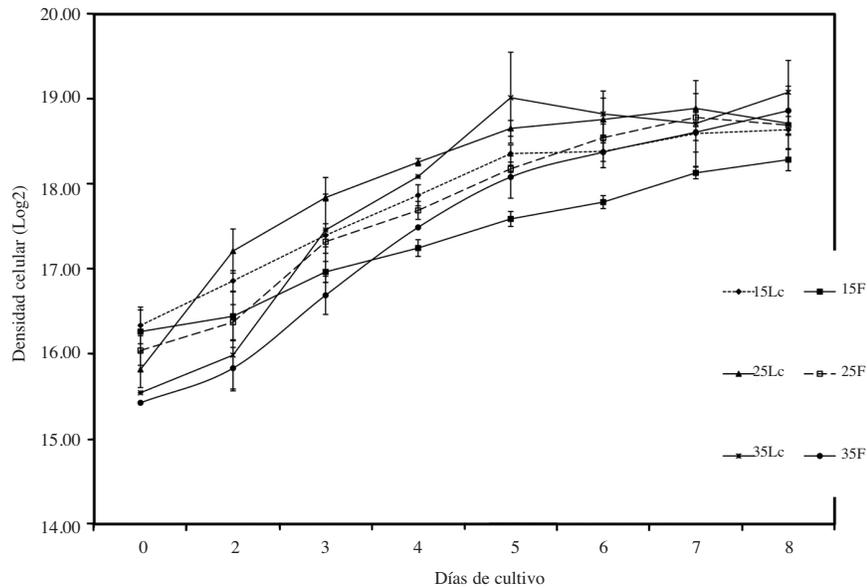
## RESULTADOS Y DISCUSIONES

Las variables de temperatura e iluminación se mantuvieron entre  $22^\circ\text{C} \pm 1$  y 3 Klux, respectivamente. El pH varió de  $8.87 \pm 0.36$  a  $8.89 \pm 0.34$  en los cultivos con fotoperiodo y de  $8.85 \pm 0.29$  a  $8.88 \pm 0.35$  en los cultivos con luz continua. La variación observada fue pequeña entre las dos condiciones de iluminación.

El crecimiento en cultivo inició por la fase de adaptación en donde la mayoría de las células inoculadas fueron viables pero no están en condiciones de dividirse inmediatamente, luego continuó

el crecimiento exponencial donde las células comenzaron a dividirse regularmente a una tasa constante, para registrar la tasa de crecimiento máximo en esta fase, esta continuó hasta el día 5 de cultivo, posteriormente el tiempo requerido para la duplicación celular aumentó, reduciendo la tasa de crecimiento presentándose así la fase de lento crecimiento entre el día 6 y 7 que fue el último día de cultivo. Las curvas de crecimiento en las tres salinidades y las dos condiciones de iluminación tuvieron una tendencia similar, con un crecimiento ascendente hasta los últimos días del experimento y una fase exponencial extendida principalmente para la salinidad de 15 psu con fotoperiodo (Fig. 1). En la salinidad de 35 psu se obtuvo el mayor crecimiento, y en menor medida en la salinidad de 25 psu, mientras que el más bajo se observó en 15 psu. Esta disminución del crecimiento en la salinidad de 15 psu es debido a que el alga está adaptada a crecer a salinidades cercanas a las del agua de mar debido a que su origen es marino, por lo que la disminución de la salinidad ocasiona que exista un aumento en el volumen celular por acumulación de agua en su interior y desvío de sus actividades metabólicas (Mansour y Salama 2004).

La salinidad tuvo un efecto significativo ( $P < 0.001$ ) sobre la tasa de crecimiento y densidad celular máxima de *T. pseudonana*. En la salinidad de 35 psu se obtuvo el mayor crecimiento, mientras que el más bajo se observó en las salinidades de 25 psu y 15 psu respectivamente. La tasa de crecimiento máxima a 35 psu fue con 1.71 divisiones día<sup>-1</sup> en los cultivos con luz continua y 1.0 divisiones día<sup>-1</sup> con fotoperiodo y de 1.39 divisiones día<sup>-1</sup> en los cultivos con luz continua a 25 psu.



**Figura 1.** Curvas de crecimiento celular de *Thalassiosira pseudonana* a salinidades de 15, 25 y 35 psu con luz continúa (Lc) y fotoperiodo (F).

**Tabla I.** Valores promedio y desviación estándar del número de células máximo (cél/mL), divisiones por día ( $\mu$  máxima,  $\mu$  promedio,  $\mu$  acumulada) de *Thalassiosira pseudonana* con fotoperiodo (F) y luz continua (Lc).

Salinidad (psu)	Condiciones de luz	Concentración celular máxima ( $\times 10^3$ Cel/mL)	Tasas de crecimiento específico (Divisiones/día)		
			$\mu$ máxima	$\mu$ promedio	$\mu$ acumulada
15	F	304 $\pm$ 15 <sub>a</sub>	0.68 $\pm$ 0.26 <sub>a</sub>	0.33 $\pm$ 0.05 <sub>a</sub>	2.30 $\pm$ 0.36 <sub>a</sub>
25	F	424 $\pm$ 30 <sub>b</sub>	0.95 $\pm$ 0.18 <sub>a</sub>	0.38 $\pm$ 0.01 <sub>ab</sub>	2.74 $\pm$ 0.16 <sub>ab</sub>
35	F	453 $\pm$ 35 <sub>bc</sub>	1.00 $\pm$ 0.20 <sub>ab</sub>	0.46 $\pm$ 0.04 <sub>bc</sub>	3.23 $\pm$ 0.29 <sub>b</sub>
15	Lc	387 $\pm$ 18 <sub>ab</sub>	0.71 $\pm$ 0.10 <sub>a</sub>	0.35 $\pm$ 0.06 <sub>a</sub>	2.50 $\pm$ 0.34 <sub>a</sub>
25	Lc	450 $\pm$ 18 <sub>bc</sub>	1.39 $\pm$ 0.09 <sub>bc</sub>	0.43 $\pm$ 0.03 <sub>abc</sub>	3.21 $\pm$ 0.28 <sub>b</sub>
5	Lc	555 $\pm$ 137 <sub>c</sub>	1.71 $\pm$ 0.15 <sub>c</sub>	0.49 $\pm$ 0.05 <sub>c</sub>	3.43 $\pm$ 0.37 <sub>b</sub>

Letras diferentes indican diferencias significativas con un  $\alpha = 0.05$

La tasa de crecimiento acumulada fue arriba de 3 divisiones día<sup>-1</sup> para estas mismas salinidades y condiciones de luz, mientras que en los otros tratamientos fueron menores (Tabla I). Thessen y col. (2005), mencionan que el crecimiento óptimo a diferente salinidad depende de la especie de microalga debido a que encontraron que *Pseudo-nitzschia delicatissima* tuvo una tasa de crecimiento máxima a bajas salinidades, mientras que el crecimiento máximo de *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* fue a salinidades elevadas y *Pseudo-nitzschia multiseriis* presentó un crecimiento intermedio entre las otras dos especies.

Al analizar las concentraciones celulares máximas al final del experimento en cada una de las salinidades se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) en las tres salinidades, se observó que fueron mayores a 35 psu de  $555,000 \pm 137,000$  cél/mL con luz continua y  $453,000 \pm 89,000$  cél/mL con fotoperiodo, disminuyeron significativamente a la salinidad más baja de 15 psu (Tabla I). La respuesta en la densidad celular con respecto a la variación en la salinidad del medio de cultivo es diferente dependiendo de la especie de microalga cultivada. En el presente estudio la disminución de la concentración celular a salinidades bajas concuerda con Rosales y col. (2005) quienes encontraron que la mayor densidad celular de *Synechococcus* fue a 35 psu. Por su parte, Arroyo-Pacheco y Martínez-Baldenebro (1994) reportaron que *Chaetoceros muelleri* cultivada bajo condiciones controladas de laboratorio disminuye su densidad celular a salinidades altas (36 y 40 psu). López Elías y col. (2004) encontraron que *Isochrysis* sp. muestra una mayor densidad celular a concentraciones bajas de sal, sin embargo, Castro-Araujo y

col. (2005), observaron que las salinidades de 25 y 35 no tuvieron un efecto significativo ( $P > 0.05$ ) sobre el crecimiento y la densidad celular máxima de *Chaetoceros cf. wighamii*.

Los cambios de salinidad afectan a los organismos en tres vías: a) estrés osmótico con impacto directo sobre el potencial del agua celular; b) estrés iónico causado por la entrada o pérdida de iones y c) cambio en la tasa iónica celular debido a la permeabilidad iónica selectiva de la membrana (Mansour y Salama 2004).

Además de la salinidad, el régimen de luz también juega un papel importante puesto que también afecta el crecimiento y producción de biomasa de los cultivos (Tzovenis y col. 2003). En el presente trabajo, las dos condiciones de iluminación no mostraron un efecto estadísticamente significativo ( $P = 0.107$ ) sobre la concentración celular máxima en los tratamientos, pero si en la tasa de crecimiento máxima ( $P < 0.001$ ) y en la tasa de crecimiento acumulada ( $P = 0.03$ ); los cultivos con fotoperiodo 12 h luz:12 h oscuridad tuvieron un crecimiento menor, esto concuerda con Brown y col. (1996), quienes reportaron que *T. pseudonana* tuvo una tasa de crecimiento máxima de 1.9 con iluminación continua y de 1 con fotoperiodo 12 h luz:12 h oscuridad. Por otro lado Humprey (1979), encontró un crecimiento más lento de *Chaetoceros didymum*, *Chroomonas* sp., *Cylindrotheca closterium*, *Dunaliella Tertiolecta*, *Pavlova lutheri* y *Phaeodactylum tricornutum* cuando crecieron en un ciclo 12 h luz:12 h oscuridad comparado con cultivos expuestos a iluminación continua. Las diatomeas *Chaetoceros didytum* y *Phaeodactylum*

*tricornutum* mostraron una tasa de crecimiento con luz continua de 0.6 y 1.7 respectivamente, y con fotoperiodo 0.4 y 1.2. Por su parte Viramontes-Robles (1991), evaluó el efecto de tres fotoperiodos: 12:12, 14:10 y 16:8 e iluminación continua en el crecimiento de *C. muelleri*, *Skeletonema costatum* y *Tetraselmis suecica*, encontró que las dos diatomeas crecieron bien en cualquiera de las intensidades luminosas, pero *Tetraselmis* creció menos con fotoperiodo que con iluminación continua.

Tzovenis y col. (2003) encontraron que la tasa de crecimiento máxima para una cepa de *Isochrysis galbana* (T-ISO), fue mayor con iluminación continua y disminuyó con el fotoperiodo.

En la mayoría de microalgas el crecimiento se lleva a cabo durante el periodo de luz debido a que a través de la fotosíntesis generan material orgánico y energía suficiente para este proceso, mientras que la división celular se da en el periodo de oscuridad, sin embargo en las diatomeas la división celular también se realiza en luz continua, por lo tanto, la densidad celular de *T. pseudonana* no se vio afectado por las condiciones de luz, pero si disminuyeron las tasa de crecimiento máxima con fotoperiodo. Dicha diatomea como muchas otras especies de microalgas, mostró un crecimiento positivo a la salinidad típica del agua de mar, mientras que a medida que baja la salinidad se observa una reducción en el crecimiento y densidad celular siendo menor a la salinidad de 15 psu. Esto demuestra que la tasa de crecimiento y concentración celular de dicha microalga estuvo determinada principalmente por la salinidad con un crecimiento óptimo a 35 psu.

## CONCLUSIONES

El crecimiento y densidad celular de *Thalassiosira pseudonana* fueron determinados principalmente por la salinidad, con una óptima de 35 psu, mientras que por debajo de esta salinidad disminuye significativamente el desarrollo de los cultivos. Por otro lado, las condiciones de luz no influyeron en la densidad celular pero sí en la tasa de crecimiento máxima.

## REFERENCIAS

- Andersen, R.A. 2005. Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press. USA. 578 pp.
- Arroyo-Pacheco, L. E. y Martínez-Baldenebro, F. 1994. Producción de biomasa y composición química de dos especies de microalgas marinas a diferentes salinidades. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo, México. 78 pp.
- Babaro, F. M. J., Fernández J. M., Laborta U. 2001. Influence of preservation techniques and freezing storage time on biochemical composition and spectrum of fatty acids of *Isochrysis galbana* clone T-ISO. Journal of phycology. 32: 565-572.
- Becker, W. 2004. Microalgae for Aquaculture: The Nutritional value of Microalgae for Aquaculture. En Richmond A. Handbook of Microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Publishing. U.S.A. 380-391 pp.
- Brown, M.R. Dunstan, G.A., Norwood, S.J., Miller, K.A. 1996. Effects of harvest stage on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. Journal of phycology. 32: 64-73.

- Castro-Araujo, S., Tavano G.V. 2005. Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros cf. wighamii brightwell* under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. I. Protein, carbohydrates and lipids. *Aquaculture*. 246: 405– 412.
- Guillard, R.L. y Ryther, J.H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervaceae* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*. 8: 229-239.
- Humphrey, G.F. 1979. Photosynthetic characteristics of algae grown under constant illumination and light-dark regimes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 40: 63-70.
- Kirst, G.O. 1989. Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 21-53.
- López-Elías, J.A., Huerta-Aldaz N., Estrada-Durán G., Celis-Salgado .M., De la Re- Vega E., Quintero-Arredondo N., Estrada-Quintero J., Niebla-Larreta J., Miramontes-Higuera N., García-Quiroz K., Rodríguez-Niebla J., Carvajal-Sánchez I., Velasco-Rameños J. 2004. Efecto de la salinidad en el crecimiento de *Isochrysis* sp. bajo condiciones de cultivo estático. *Biotecnia*. 3 (6): 10-15.
- Muller-Feuga, A. 2004. Microalgae for Aquaculture: The Current Global Situation and Future Trends. En Richmond A. *Handbook of Microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Publishing. U.S.A. 352-363 pp.
- Mansour, M.M.F. y Salama K.H.A. 2004. Cellular basis of salinity tolerance in plants. *Environ. Exp. Bot.* 52:113-22.
- Paniagua-Michell, J., Voltolina, L. D., Bückle-Ramírez L. F. 1989. Manual de metodología y alternativas para el cultivo de microalgas. Informe especial Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada 2da. Edición. Baja California, México. 70 pp.
- Renaud S.M. y Parry D.L. 1994. Microalgae for use in tropical aquaculture II: Effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae. *Australian Journal of Botany*. 51: 703-713.
- Rosales, N., Ortega, J., Mora, R., Morales, E. 2005. Influencia de la salinidad sobre crecimiento y composición bioquímica de la cianobacteria *Synechococcus* sp. *Ciencias Marinas*. 31(2): 349-355.
- Thessen, A., Dortch, Q., Parsons, M., Morrison, W. 2005. Effect of salinity of *Pseudo-nitzschia* species (bacillariophyceae) growth and distribution. *Journal of Phycology*. 41: 21-29.
- Tzovenis, I., De Pauw N., Sorgeloos P. Optimization of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids I. Effect of different light regimes on growth and biomass production. *Aquaculture* 2003; 216:203-222.
- Viramontes-Robles, F. 1991. Estudio del efecto de diferentes ciclos luz-oscuridad sobre el crecimiento y contenido de lípidos en tres especies de microalgas marinas. Tesis de licenciatura. Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Universidad de Sonora. 46 pp.
- Wikfors, G.H., Ohno, M. 2001. Impact algae research in aquaculture. *Journal of Phycology*. 37: 968-974.
- Zar, J. H. 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall. New Jersey.