

Tesis de Posgrado

Acción de productos algales sobre plantas de importancia agrícola

Zulpa de Caire, Gloria

1981

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Zulpa de Caire, Gloria. (1981). Acción de productos algales sobre plantas de importancia agrícola. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1680_ZulpadeCaire.pdf

Cita tipo Chicago:

Zulpa de Caire, Gloria. "Acción de productos algales sobre plantas de importancia agrícola". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1981.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1680_ZulpadeCaire.pdf

1680

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ACCION DE PRODUCTOS ALGALES SOBRE PLANTAS DE IMPORTANCIA AGRICOLA

AUTOR: GLORIA ZULPA DE CAIRE
DIRECTOR: DRA. DELIA R. DE HALPERIN

TRABAJO REALIZADO EN LOS LABORATORIOS DE FISILOGIA VEGETAL DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES (UBA).

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS.

-1981-

1680

30

A Delia R. de Halperin
ejemplo de mujer e investigadora

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Delia R. de Halperin, por su constante y cálido apoyo, humano y científico.

Al Dr. Juan Accorinti, por su incondicional apoyo como consejero de estudios de post-grado.

Al Departamento de Estadística de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

A todos aquellos que de alguna manera contribuyeron para que esta investigación pudiera realizarse.

INDICE

INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	2
1- Importancia de la propiedad de fijar nitrógeno	2
2- Importancia de las sustancias con actividad biológica presentes en la masa algal.	7
3- Productos extracelulares.	13
3.1- Naturaleza de los productos extracelulares:	13
Carbohidratos	13
Acidos orgánicos	14
Sustancias nitrogenadas	14
Sustancias con actividad biológica	16
Toxinas	19
3.2- Características del proceso de liberación:	20
Procesos	20
Relación entre estado de crecimiento y liberación de productos extracelulares.	21
Influencia de factores ambientales y fisiológicos.	23
3.3- Aspectos ecológicos:	24
Productividad primaria	24
Simbiosis	24
MATERIAL Y METODOS	26
1- Cepa estudiada	26
2- Obtención del cultivo masivo	26
3- Obtención de los extractos a partir de la masa algal	27
3.1- Extracto etéreo transferido a agua	27
1.1- Extracto acuoso	27
3.2- Extracto acuoso directo	27
4- Obtención del medio de cultivo donde crecieron las algas	27
5- Semillas	28

6- Suelo	28
7- Metodología	28
7.1- Imbibición de semillas en extractos algales	28
7.2- Imbibición de semillas en filtrados algales	29
2- Tratamientos hechos a plántulas	29
7.3- Determinación de nitrógeno por Micro-Kjeldahl y Colorimetría	30
7.4- Estudio estadístico	32
RESULTADOS Y CONCLUSIONES	
	33
1- Germinación	33
1.1- Germinación de semillas embebidas en extractos algales	33
1.2- Germinación de semillas embebidas en filtrados algales	36
2- Altura de las plantas	40
2.1 Extractos algales	40
2.2 Filtrados algales	44
2.3 Filtrados algales y tratamientos posteriores	44
3- Número de hojas	51
3.1 Extractos algales	51
3.2 Filtrados algales	53
3.3 Filtrados algales y tratamientos posteriores	53
4- Peso seco de las plantas	57
4.1- Extractos algales	57
4.2- Filtrados algales	59
4.3- Filtrados algales y tratamientos posteriores	59
5- Contenido proteico	63
5.1- Extractos algales	63
5.2- Filtrados algales	65
5.3- Filtrados algales y tratamientos posteriores	67
6- Estudios estadísticos	72
6.1- Extractos algales	72
6.2 Filtrados algales	73
6.3 Filtrados algales y tratamientos posteriores	73

DISCUSSION

78

BIBLIOGRAFIA

81

INTRODUCCION

Las algas azules, tanto continentales como marinas, son de gran importancia ecológica porque representan un aporte con tinuamente renovado de materia orgánica, liberan y producen sustancias con actividad biológica y en numerosos casos fijan nitrógeno atmosférico.

Las primeras referencias sobre el efecto fertilizante de las algas y su aplicación en la agricultura nos ha llegado por tradición de los países del norte de Europa y Asia, donde se incorporaban al suelo los arribazones de diversas algas marinas observándose una relación directa entre el monto de materia or gánica así agregado y la productividad de dichos suelos (Booth, 1966; Stephenson, 1968).

Con miras a su aplicación en la agricultura se encaró en el presente trabajo de tesis el estudio de extracto algales y productos extracelulares de un cultivo axénico de una cianofícea (*Tolypothrix tenuis*) sobre plántulas de maíz.

Este trabajo ha sido desarrollado de acuerdo al siguiente plan:

- 1) Obtención de extractos etéreos y acuosos a partir de la masa algal, para imbibición de semillas.
- 2) Obtención de productos extracelulares a partir del medio de cultivo donde crecieron las algas para utilizarse en: -imbibición de semillas, -riego de plántulas, -pulverización de plántulas, -riego y pulverización de plántulas.
- 3) Se evaluaron los siguientes parámetros; % de germinación de las semillas, altura, número de hojas, peso seco y con tenido proteico de las plántulas.

ANTECEDENTES

1.- Importancia de la propiedad de fijar nitrógeno

Con respecto a las algas de ambientes continentales, desde los trabajos de Frank (1889) y de otros investigadores del siglo pasado y comienzos del actual, se consideró la posibilidad de que algunas especies fuesen capaces de fijar nitrógeno atmosférico similarmente a lo que ocurre con determinadas bacterias. Es sólo a partir de la obtención de cultivos axénicos que pudo verificarse fehacientemente que de todos los grupos algales solamente algunas especies de algas azules o *Cyanophyta* poseen esta propiedad (Drewes, 1928; Allison et al., 1930-1937; Fritsch et De, 1938; De, 1939; Fogg, 1942; etc). La comprobación de esta característica fisiológica confirmó a dichas especies un papel significativo en la economía del nitrógeno en la naturaleza, ya que la conversión del nitrógeno molecular a la forma orgánica mediante organismos fotoautótrofos representa el medio más directo de aprovechar la energía solar para incrementar el monto del nitrógeno disponible. En cambio, en el caso de las bacterias fijadoras de nitrógeno, con excepción de las fotosintéticas, se requiere energía exógena (por cada mg a 10 mg de nitrógeno fijado, 1 g de carbohidrato según Stewart, 1967). Por lo tanto, un manejo adecuado de las algas permitiría utilizarlas para incrementar la productividad de suelos y ambientes acuáticos (Allen, 1956).

En 1938 Fritsch y De y en 1939 De, fueron los primeros en sugerir que la fertilidad de los arrozales, tanto de la India como de otras regiones tropicales y sub tropicales de Asia, donde las parcelas destinadas a este cultivo mantienen su rendimiento sin requerir el agregado de fertilizantes, podía explicarse por la presencia de algas azules fijadoras de nitrógeno molecular, a las que consideró responsables de la provisión de nitrógeno. También Watanabe (1960 b); Venkataraman, (1966); Mayland et al.

(1966); etc., consideran que el nitrógeno algal es utilizado por las plantas superiores después de su conversión por bacterias del suelo a formas inorgánicas tales como amoníaco o nitrato, considerando que la flora bacteriana presente en el suelo es un factor muy importante en la práctica agrícola.

Una serie de trabajos posteriores confirmaron los resultados de De. A partir de entonces, en distintos países se realizaron investigaciones con el objeto de aplicar estas algas en la agricultura como biofertilizante, principalmente en el cultivo de arroz.

En Japón, Ukai et al. (1958), seleccionaron una cepa de *Tolypothrix tenuis* con alta capacidad de fijación y estudiaron la influencia de diferentes factores (luz, temperatura y composición del medio) sobre su crecimiento y velocidad de fijación de nitrógeno molecular. Dicha cepa puede crecer auto o heterotróficamente en oscuridad en un medio que contenga una mezcla de aminoácidos como fuente nitrógenada y glucosa como fuente de energía (Watanabe, 1975 b).

Actualmente, se preparan cultivos masivos de la citada cepa (Watanabe, 1959 a; 1960 a) para utilizarlos como abono verde, los cuales se obtienen efectuando los siguientes pasos: 1) agitación del cultivo en frascos comunes; 2) pasaje a un tanque aseptico de 30 litros con agitación y 3) cultivos de circulación cerrada al aire libre utilizando una bolsa de poca altura de polivinilo o con un sistema de burbujeo abierto.

T. tenuis (Watanabe, 1959 b) puede preservarse viable durante aproximadamente 2 años, ya sea por liofilización o por adsorción en una grava especial de poro fino. Al ser incorporada a los arrozales como abono verde (Watanabe 1956-1960 a y 1962) se comprueba un incremento progresivo en el rendimiento de la cosecha hasta alcanzar un 20% al cuarto año. El autor atribuye este incremento, que aumenta año tras año, a la implantación de la flora algal.

Watanabe (1975 a), en un trabajo en el que se emplean las mismas técnicas antes citadas para la obtención de cultivos masivos, indica las siguientes normas para la inoculación y para asegurar el establecimiento de las algas en los arrozales:

- 1) espolvorear limo en el agua del arrozal antes de agregar algas, a fin de disminuir la acidez y favorecer el posterior crecimiento del inóculo.
- 2) aplicar fertilizantes fosfatados y molibdeno para favorecer el crecimiento algal y el proceso de fijación de nitrógeno.
- 3) aplicar pesticidas (Folidol 250 p.p.m., paration 250 p.p.m.) y también pentaclorofenol (PCP, 100 p.p.m.) que suprime el crecimiento de las clorofíceas sin efectos deletéreos sobre algas azules.

En la India los mejores resultados se obtuvieron con el agregado al suelo de *Aulosira fertilissima*. Con esta especie Singh (1961) observa un incremento en la producción de granos de arroz: 368% en maceta y 114% en condiciones de campo.

Sundara Rao et al. (1963), con la misma especie, observa diferencias significativas en distintos parámetros en experiencias realizadas en macetas con plantas de arroz cuando agrega una suspensión de algas.

Subrahmanyam et al. en 1964, (según Watanabe 1975 b) utiliza una mezcla de especies (*Nostoc sphaericum*, *N. amplissium*, *Toly*-*pothrix campylonemoides* y *Westiella* sp.) y observa un incremento del 30% en el rendimiento de la cosecha, en un ensayo a campo con un cultivo de arroz.

Venkataraman (1969), desarrolló una técnica similar a la de Watanabe para la obtención de cultivos. Dicha técnica consiste en precultivos, cultivos en Erlenmeyers y en tanques de 200 litros. Para preservar estos cultivos y con el objeto de mantener viables los inóculos a utilizar en el campo, dicho autor

propuso en 1961 mezclar partes iguales de arena de cuarzo estéril y de suspensión algal, dejando al sol hasta desecación. Se conserva en frascos o bolsas de papel (hasta dos años) para ser incorporadas al suelo en el momento necesario. Como con esta técnica se obtenía un desarrollo algal pobre por hundimiento de la mezcla en el suelo, Venkataraman, propuso en 1966 el uso de trozos de esponja sintética previamente incubados con una suspensión algal. Estos trozos también pueden ser almacenados secos hasta el momento de su aplicación. Presentan la ventaja de flotar en el suelo inundado de los arrozales y pueden recuperarse antes del secado del campo, para usarse en futuras inoculaciones. Este autor considera como requisito importante el conocimiento de la flora algal indígena, dado que el refuerzo de la flora autóctona proporciona resultados más rápidos y seguros. Cabe señalar que la introducción exitosa de una cepa o el refuerzo de ciertas formas útiles depende principalmente de su capacidad para competir con los otros organismos del habitat. Venkataraman, designó algalización al agregado de algas al suelo.

Recientemente se ha desarrollado un método rural simple en el Instituto de Investigaciones Agrícolas (IARI) de Nueva Delhi (Venkataraman, 1977 a). El mérito de este método reside en que puede realizarse en forma continua, no requiere una gran inversión de capital y no tiene complicaciones técnicas, siendo por lo tanto muy fácil de adoptar por los agricultores. El cultivo inicial es una mezcla de varias especies fijadoras provista por dicho Instituto a bajo costo. El agricultor debe hacer piletas de ladrillo o chapa galvanizada de 2 m x 1 m x 0,22 m, donde se agrega 8 a 10 kg de suelo, 200 g de fosfato, y 2 g de molibdato. Las piletas se llenan con agua hasta una altura de 5 a 10 cm y se controla el pH del suelo (7 a 7,5). Cuando el suelo sedimenta se esparce el inóculo en la superficie (400 g de algas secas para las medidas antes indicadas). Se riega periódicamente a fin de mantener un nivel adecuado. Cuando se alcanza un buen desarrollo algal se suspende el riego y se deja secar al sol.

Luego se cosechan las algas que presentan el aspecto de costuras, y en este estado se almacenan en bolsas hasta su uso en el campo. Esta operación se repite contando así con una provisión continua de biofertilizante. Para sembrar la pileta basta una pequeña cantidad de las algas cosechadas. Cada recolección representa 1,5 a 2 kg de material algal. Las drogas agregadas son suficientes para 3 a 4 cultivos algales en pileta. La algalización se realiza con 8 a 10 kg de alga seca /ha/cosecha.

Según Agarwal (1979), estas experiencias revelan que:

- 1) en ausencia total de fertilizantes químicos, las algas azules pueden fijar de 25 a 30 kg de N/ha por cosecha, dando como resultado un aumento del 10 al 15% en la producción del grano.
- 2) cuando se usan fertilizantes químicos la dosis puede ser reducida en 1/3 y se suplementa con algas azules para obtener la misma producción.
- 3) aún cuando se usan los niveles totales de fertilizantes químicos recomendados, la complementación con algas azules es beneficiosa dando una mayor producción del grano.

Los científicos del IARI han encontrado que las algas azules pueden mantenerse casi permanentemente en los campos de los agricultores si la inoculación se repite por 3 ó 4 cosechas sucesivas. Esto asegura el desarrollo de una producción apreciable sin requerir inoculaciones posteriores a menos que se den condiciones ecológicas muy desfavorables.

Trabajos similares se están realizando actualmente en Egipto, Marruecos, Senegal, etc. con resultados en general concordantes con los obtenidos por el IARI de Nueva Delhi. En Filipinas, el Instituto de Investigaciones del Arroz informó que la fijación de nitrógeno determinada "in situ" con ^{15}N en arrozales a los que se les había incorporado algas varió de 40 a 80 Kg de N/ha/año. Con la misma técnica se demostró que el

nitrógeno fijado y liberado por algas es efectivamente tomado por las plantas de arroz.

En la actualidad en los arrozales, se ha comprobado que la fijación debida a las algas azules es 2 a 6 veces mayor que la fijación asociada con las plantas en las estaciones húmeda y seca respectivamente. (I. Watanabe et al., 1978).

Con respecto al agregado de algas a otros cultivos, la información es escasa y se refiere tan sólo a ensayos en maceta. El agregado de *Calothrix anomala*, masa algal y/o adicionada de urea, a cultivos de *Capsicum annum* y *Lactuca sativa* mostró que la aplicación combinada (urea-alga) era más efectiva que aplicadas por separado, obteniéndose un aumento de peso en las plantas de *Lactuca sativa* y mejor producción de frutos en *Capsicum annum* (Dadich et al. 1969). Se observó también mayor contenido de nitrógeno en plantas de cebada tratadas con algas, y en cultivos de tomate la inoculación con *Tolypothrix tenuis* produce un aumento significativo en el contenido de vitamina C (Fuller et al. y Aiyer et al. respectivamente, según Dadich et al., 1969).

Singh (1961) también observa que el agregado de floraciones de algas azules a cultivos de caña de azúcar produce un efecto benéfico.

U marova et al. (1972) y Kogan et al. (1972), (citados por Venkataraman, 1977 b), observaron que las cianofíceas aumentaban la producción de algodón en Rusia, tanto en presencia como en ausencia de nitrógeno combinado.

2.- Importancia de las sustancias con actividad biológica presentes en la masa algal

Gupta * (1966), al estudiar la flora algal de los arroza-

* Gupta como De (1939) consideran que las algas azules son las predominantes en los arrozales. El primer autor encontró que de 58 especies identificadas, 47 correspondían a cianofíceas.

les de la India, señaló que las algas, así como los demás vegetales, contienen sustancias promotoras del crecimiento de indudable efecto beneficioso en el desarrollo de este cultivo, independientemente de la posible capacidad de fijar nitrógeno molecular que puedan tener algunas especies. En ensayos preliminares con extractos algales de especies fijadoras (*Fischerella mucicola*, *Scytonema hofmanni* y *Nostoc sp.*), comprobó que los mismos aceleraban la germinación de las semillas de arroz, concluyendo entonces que el crecimiento algal puede resultar beneficioso por la fijación de nitrógeno y también por el aporte de sustancias con actividad biológica inductora.

En una serie de trabajos, Gupta y colaboradores señalaron el efecto de extractos algales obtenidos a partir de masa algal, sobre diversos cultivos:

Gupta y Lata (1964) estudiaron el efecto de extractos algales etéreos y acuosos de especies no fijadoras de nitrógeno sobre la germinación de semillas de arroz. El efecto benéfico está restringido a los extractos diluidos y a imbibiciones de las semillas en los mismos por tiempos cortos, dado que tiempos prolongados reducen el porcentaje de germinación. Las cepas estudiadas fueron: *Phormidium foveolarum*, *P. corium* y *P. autumnale*. Con la primera especie, muy frecuente en los arrozales, se observa que todos los extractos ensayados aceleraron la velocidad de germinación, obteniéndose el porcentaje de germinación más efectivo con una imbibición de las semillas por 24 horas en el extracto acuoso 1%. En el mismo cultivo, Shukla y Gupta (1967), observan que el extracto acuoso al 5% de *P. foveolarum* es el más efectivo en cuanto a productividad (peso seco de: planta completa, todas las espigas por planta, de una espiga y de 1000 granos) y contenido proteico del grano. También los extractos etéreos 1 y 5% muestran efectos positivos sobre el crecimiento vegetativo y contenido proteico del grano. Gupta y Shukla (1967), cuando embeben semillas de arroz en extractos acuosos y etéreos de dis

tintas especies de *Phormidium*, observan diferencias al considerar distintos parámetros del crecimiento vegetal (altura de la planta, número y ancho de las hojas, largo de la raíz principal y de las laterales, número de raíces laterales, etc.). Así con *P. foveolarum*, el extracto etéreo 1% muestra un efecto benéfico, con respecto a los parámetros antes indicados. De los acuosos, el 5% es el mejor con excepción del largo de la raíz principal. Con *P. tenue* los mejores valores se obtienen con los extractos al 1% (etéreo y acuoso), en tanto que *P. frigidum* mostró los mejores resultados con el extracto etéreo 1%.

De las tres especies estudiadas *P. foveolarum* es la que muestra los mejores efectos en cuanto a: altura de las plantas; número, largo y ancho de las hojas; número de macollos; peso seco de las plantas; peso seco de todas las espigas por planta; peso seco de una sola espiga; peso de 1000 semillas y contenido proteico. Los autores concluyen que el tratamiento con extractos algales no sólo puede aumentar el crecimiento y productividad del arroz sino que también puede mejorar la calidad de los granos producidos, ya que éstos son más ricos en proteínas.

Continuando con el estudio de los efectos de extractos de la masa algal sobre el desarrollo de cultivos de interés económico Gupta y Kushwaha (1970) y Kushwaha y Gupta (1970 a) trabajaron con la cepa de *P. foveolarum* antes citada y plántulas de diferentes variedades de trigo (*Triticum aestivum*). Comprobaron en cultivos en maceta, que el tratamiento de preimbibición de las semillas en dichos extractos (acuosos o etéreos) producen todos un efecto benéfico sobre la productividad tanto con respecto al número y peso de los granos, como con respecto al peso seco total de la planta, largo de la raíz principal y laterales y largo de la plúmula; siendo leve el aumento del contenido proteico del grano. Además observaron que para algunas variedades de trigo el extracto más efectivo es el etéreo al 2% siendo para una de ellas el etéreo al 1%, aunque las diferencias no son muy

apreciables; de los extractos acuosos, el 5% es el mejor para todos las variedades. Los parámetros considerados fueron: peso seco total, peso seco de las partes vegetativas, peso seco de las espigas, peso seco de los granos por espiga y peso seco de los granos por planta. La productividad por grano aumenta con todos los tratamiento y en todas las variedades, y especialmente en los extractos etéreos 1 y 2%.

Continuando con el mismo cultivo (*Triticum aestivum*) Gupta y Kushwaha (1972), estudiaron el efecto combinado de preimbibición de las semillas y pulverización de las plantas con extractos algales de *P. foveolarum*. Observaron en general un efecto benéfico sobre el crecimiento, desarrollo y productividad de todas las variedades de trigo estudiadas. Las plantas se pulverizaron por primera vez al mes de la siembra repitiendo el tratamiento al segundo y tercer mes. Las observaciones se hicieron sobre el número de macollos y espigas y una vez cosechado sobre el peso total de las plantas, peso de las espigas y de los granos por 100 plantas.

En cuanto al efecto de la preimbibición, los mejores resultados se obtuvieron con el extracto etéreo (2% para algunas variedades y 1% para otras); de los extractos acuosos, el 5% dió los mejores resultados para todos los tipos de trigo investigados.

Las plantas pulverizadas con extractos (etéreo al 2% y acuoso al 5%) obtenidas sin preimbibición de las semillas muestran buenos resultados. Pero, el efecto combinado de preimbibición y pulverización resulta óptimo, pues los efectos benéficos en las plantas que recibieron preimbibición son aumentados con la pulverización. Las plantas pulverizadas con extractos etéreos no sólo muestran un mejor desarrollo de los macollos y espigas, sino también un aumento marcado en el peso de las espigas y productividad del grano (en gm/100 plantas) y en peso total de las plantas.

En general, los mejores resultados son obtenidos con preimbibición y pulverización con extractos etéreos al 2%. También las plantas pulverizadas con extractos acuosos muestran un aumento similar en el número de macollos y espigas, peso seco de las espigas, productividad del grano y peso total de la planta. Dichos autores observaron también resultados beneficiosos en el desarrollo de macollos, espigas y aumento de la productividad, cuando aplicaron tratamientos combinados preimbibición con extractos etéreos o acuosos y pulverización con extractos acuosos o etéreos.

En plántulas de arveja, Gupta y Gupta (1970) con extractos algales de *P. foveolarum* observaron un efecto benéfico en el largo de la raíz principal, número de raíces laterales, longitud del tallo y del primer entrenudo.

Dados los resultados promisorios obtenidos con extractos algales de varias especies de *Phormidium* sobre arroz, trigo, arveja, Kushwaha y Gupta (1970 b) investigaron dos variedades de maíz, cultivo de interés económico, observando un efecto benéfico en el crecimiento y desarrollo de dichas plantas. Con respecto al largo de la plúmula los mejores resultados se obtuvieron con el extracto etéreo 1 y 2%, siendo el 2% el más efectivo de los acuosos.

Gupta y Agarwal (1973) sugieren que ambos tratamientos (preimbibición de semillas y/o pulverización de plantas) con extractos de *P. foveolarum*, ejercen un efecto benéfico sobre el crecimiento, productividad y contenido proteico de diferentes cultivos debido principalmente a la presencia en estos extractos de una sustancia tipo giberelina con actividad biológica.

Venkataraman y Neelakantan (1967) demostraron que el cuerpo algal contiene además de compuestos nitrogenados sustancias biológicamente activas como vitamina B₁₂ y de tipo auxínico que pueden contribuir considerablemente a la acción fertilizante del alga, lo cual fue probado para plantas de arroz.

Caire et al. (1976) estudiaron la acción de extractos acuosos y etéreos de masa algal de *Nostoc muscorum* Ag. (79a) sobre germinación y crecimiento de plantas de mijo (*Panicum miliaceum* L.) mediante tratamiento de preimbibición de las semillas. A los dos días de la siembra se observa que todos los extractos aumentaron significativamente la velocidad de germinación de las semillas con respecto al testigo húmedo ($p < 0.05$). Los extractos más efectivos son los etéreos y especialmente el más diluido lo que indicaría que las sustancias con actividad biológica contenidas en la masa algal son solubles en éter. Todos los extractos producen incrementos en la altura de las plantas (medidas a los 28 y 39 días de la siembra). A los 39 días, o sea al finalizar la experiencia, se observa que todos los extractos producen un incremento del peso seco con respecto al testigo húmedo. El mayor aumento (22,6%) correspondió al extracto acuoso sin diluir.

También se observa que diferentes concentraciones del extracto acuoso diluido son significativamente eficientes en el control de un ataque de "damping off".

Además, se ha estudiado en nuestro laboratorio el efecto de extractos algales sobre microorganismos: hongos y bacterias (Mulé, et al. 1976 y 1977). Se probaron extractos de *N. muscorum* cepa N° 79 a) sobre el desarrollo del hongo *Cunninghamella blakeskeana* (-) y se comprobó que los extractos acuosos contienen alguna sustancia con actividad biológica inhibitoria para el desarrollo de este hongo. Con respecto a la bacteria *Staphylococcus aureus* se encontró que los diferentes extractos algales de *Aphanothece stagnina* son inductores o inhibidores del crecimiento.

Jacq et Roger (1977) mostraron que la siembra de granos de arroz pregerminados en un cultivo de cianofíceas disminuye notablemente la pérdida de semillas debido a la oxigenación del medio. El oxígeno liberado por las algas favorece la formación de sulfatos, evitando así el efecto perjudicial de los

sulfuros. Esta acción sólo se manifiesta en condiciones óptimas de cultivo (siembra poco profunda y suelo no sumergido). Las experiencias en cultivo hidropónico permitieron a los autores precisar el modo de acción de esta técnica que además reúne las ventajas de una pregerminación en presencia de productos que aceleran el desarrollo de la plántula y de un agregado de algas al suelo.

3.- Productos extracelulares

Actualmente se sabe que las algas azules producen una gran variedad de sustancias extracelulares. Dichas sustancias desempeñan un papel importante en el crecimiento y fisiología algal, así como también en cadenas alimenticias acuáticas y ecosistemas en general.

3.1. Naturaleza de los productos extracelulares

Entre los principales productos liberados al medio se pueden citar:

Carbohidratos: polisacáridos simples en *Anabaena* sp. y *Nostoc* sp. y azúcares simples en *Nostoc* sp., *Calothrix* sp. , *Scytonema* sp. (Hought et al. 1952; Drew y Smith, 1967; Richardson et al., 1968; Moore y Thischer, 1965; Bishop et al., 1954; Smith et al., 1969; los tres últimos autores según Hellebust 1974).

Fogg (1952) en *Anabaena cylindrica* encontró que la velocidad de producción de pentosa en diferentes estados de desarrollo puede ser comparada con la de nitrógeno combinado y aumenta con la edad del cultivo.

Las cantidades liberadas pueden representar una fracción considerable del carbono incorporado por fotosíntesis durante el crecimiento activo (28% en *Anabaena flos-aquae*, Moore and Tisher, 1965, según Hellebust, 1974).

Acidos orgánicos: el ácido glicólico es en general el más comúnmente liberado por las algas. Dicha liberación está favorecida por condiciones donde el CO_2 limita la fotosíntesis, dado que la ribulosa 1-5 difosfato carboxilasa (además de carboxilar la ribulosa 1-5 di P), posee función de oxigenasa, clivando la ribulosa 1-5 difosfato en cantidades equimoleculares de ácido fosfoglicérico y fosfoglicólico. Este último es desfosforilado y excretado como glicolato. Las condiciones del medio que favorecen este clivaje oxigenativo son: aerobiosis, aporte limitado de CO_2 y altas intensidades de luz. Se ha demostrado que el glicolato exógeno no permite el crecimiento de cianofíceas en presencia de diclorometilurea (DCMU) y a la luz. Esto no excluye la posibilidad de la fotoasimilación del glicolato a un número restringido de caminos metabólicos. Tal proceso sería análogo a la fotoasimilación del acetato que puede contribuir aproximadamente en un 10% a los compuestos carbonados sintetizados en condiciones fotoautotróficas de crecimiento (Stanier y Cohen-Bazire, 1977).

Los estudios realizados hasta el presente indican que la cantidad de glicolato liberado varía considerablemente para las diferentes especies: *Coccochloris*, *Anacystis*, *Oscillatoria* (Hellebust, 1965; Dohler et al., 1971 y Cheng, 1971).

Sustancias nitrogenadas: Las algas azules liberan al medio una gran proporción de sus sustancias nitrogenadas asimiladas (Fogg 1952, 1966; Jones y Steward, 1969 a y b). *Anabaena cylindrica* en cultivos en activo crecimiento libera aproximadamente el 30% de su nitrógeno orgánico (Fogg 1952). Cantidades similares de nitrógeno extracelular, 14 a 42%, han sido citadas para otras algas azules fijadoras de nitrógeno: *Tolypothrix tenuis*, *Calothrix brevissima*, *Anabaenopsis sp.*, *Nostoc sp.* (Watanabe, 1951). *Calothrix scopulorum* libera alrededor del 40% del nitrógeno fijado, y es posible que inmediatamente después de transferido a condiciones de crecimiento menos favorables la proporción liberada sea mayor. Por lo tan-

to en el campo, donde se producen grandes cambios, es posible que el alga libere un gran porcentaje de lo que fija (Jones y Stewart, 1969 a).

Los datos sobre la tasa de compuestos nitrogenados intra y extracelulares, obtenidos en experimentos con ^{15}N , muestran que la liberación de nitrógeno orgánicos no está específicamente asociada con el proceso de fijación (Stewart, 1964).

En algunos casos puede haber liberación de amoníaco, pero la mayor proporción de nitrógeno extracelular liberado está en forma de polipéptidos y sólo se encuentra una pequeña cantidad de aminoácidos libres (Watanabe, 1951; Fogg, 1952; Taha y El Refai, 1962; Whitton, 1965; Jones y Stewart, 1969 a; Meffert y Zimmermann-Telschow, 1979).

Watanabe (1951) trabajando con *Calothrix brevissima*, *Anabaenopsis* sp., *Nostoc* sp. y *Tolypothrix tenuis* encontró liberación de aminoácidos sólo en esta última especie (ac. aspártico, ac. glutámico, y alanina). Estos mismos aminoácidos fueron citados por Venkataraman, et al. (1964) para el ficobionte de *Cycas revoluta*. Singh y Trehan (1973 a) hicieron el análisis cualitativo de aminoácidos extracelulares de *Aulosira fertilissima* y de *Anacystis nidulans* y determinaron que liberan ac. glutámico, aspártico, prolina y valina. El ácido glutámico está siempre presente en el medio de cultivo de *Aulosira fertilissima* pero no en el de *Anacystis nidulans*.

Taha y El Refai (1962) encontraron que *Nostoc muscorum* libera al medio nitrógeno en forma de nitratos, nitritos, amoníaco, amidas y amino nitrógeno. Los únicos aminoácidos libres presentes en el medio de cultivo fueron el ácido aspártico y el glutámico. Luego de la hidrólisis se detectó: serina, glicina, alanina y tirosina, presumibles componentes de los polipéptidos liberados al medio. Sin embargo, Magee y Burris (1954) en esta última especie no detectaron aminoácidos libres en el medio de cultivo, el cual sólo después de hidrólisis dió reacción de ninhi-

drina positiva. En *Aulosira fertilissima* Varma et al. (1964) no detectaron azúcares ni aminoácidos libres; sólo se hallaban presentes después de una hidrólisis: aspártico, glutámico, alanina y fenilalanina.

Caire et al. (1974) en *Aphanothece stagnina* no detectaron la presencia de sustancias de naturaleza indólica, ni de aminoácidos. Es posible que la presencia de nitrógeno combinado (nitrato o aminoácidos) en el medio de cultivo de alguna manera pudiera prevenir la liberación de aminoácidos (Singh y Trehan, 1973 b).

Jones y Stewart (1969 a) observaron con *Calothrix scopulorum* aminoácidos similares a los citados por Stewart (1963), aunque en proporciones algo diferentes. Los péptidos extracelulares están representados aproximadamente por una docena de aminoácidos: glicina, ácido glutámico, ácido aspártico, alanina y serina; y no hay o sólo se detectan trazas de aminoácidos básicos (Whitton, 1965; Jones y Stewart, 1969 a). Según éstos últimos (1969) probablemente los aminoácidos libres y amidas son producto de desecho perdidos o secretados activamente desde el protoplasma hacia el medio, dado que las algas azules a diferencia de los eucariotas, no poseen grandes vacuolas dentro de las cuales los productos no excretables o no requeridos o en exceso pueden ser canalizados.

Además el material peptídico liberado por las algas puede acomplejarse con metales (en particular con el ión cúprico) reduciendo así su toxicidad; o solubilizar fosfatos favoreciendo el crecimiento del alga tanto en condiciones de cultivo como naturales (Fogg, 1956; Van den Berg et al., 1979).

Sustancias con actividad biológica: En *Nostoc punctiforme* se observó una autoinhibición del crecimiento aparentemente debido a la acumulación en el medio de productos metabólicos específicos (Harder, 1917 según Fogg, 1962).

Boyd (1973) determinó que algunas especies de algas excretan una o más sustancias al medio, las cuales inhiben el crecimiento de otras especies. Así, la inhibición del crecimiento de algas verdes fue particularmente marcada en el caso de dos especies cultivadas simultáneamente con las siguientes algas azules: *Oscillatoria rubescens*, *Anabaena flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa* y *Coccochloris peniocyctis*. También las algas verdes dejaron de crecer a una velocidad normal en un medio preparado con filtrados de algas que contenía floraciones de algas azules. El autor sugiere que las sustancias inhibitorias son aparentemente un factor importante en el desarrollo y persistencia de floraciones.

Oscillatoria splendida, (Goryunova, 1950 según Fogg, 1962) produce sustancias bacteriostáticas, así como una cepa de *Scytonema sp.* ensayada en nuestro laboratorio frente a *Staphylococcus aureus* (Accorinti et al, 1974). Además se observó en esta especie de *Scytonema* como en *Nostoc muscorum*, *Tolypothrix tenuis* y *Aphanothece stagnina* liberación al medio de cultivo de sustancias biológicamente activas que inhiben o inducen el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (Accorinti , l.c.; Caire et al., 1974; Mulé et al., 1976).

Según Whitton, (1965), *Anabaena cylindrica* libera una sustancia que disminuye la toxicidad de la polimixina B producida por una bacteria que se encuentra comunmente asociada con ella en la naturaleza: *Bacillus polymyxa*.

Henriksson (1960) ha demostrado que el medio de crecimiento del ficobionte (*Nostoc sp.*) del liquen *Collema tenax* contiene sustancias que inhiben el desarrollo del micobionte. La acción antibiótica no es exclusiva de este ficobionte sino que también ocurre en otras especies no simbióticas de algas azules (*Cylindrospermum maius* y dos especies de *Nostoc*).

Con respecto a la naturaleza de las sustancias extracelulares con actividad biológica Bentley (1958) en filtrados de cul-

tivos de *Anabaena cylindrica* y de agua de lago con un crecimiento prácticamente unialgal de *Oscillatoria* sp. encontró hormonas vegetales del tipo auxínico, producidas y liberadas por las células algales al medio en el cual crecen. Singh y Trehan (1973 c) atribuyen el efecto de los productos extracelulares de *Aulosira fertilissima* sobre el crecimiento de plántulas de arroz a sustancias de naturaleza hormonal. Observaron que el hábito de dichas plántulas tratadas con filtrado algal era semejante al de las tratadas con ácido giberélico, aunque en las primeras el crecimiento radical fue más pronunciado. Caire et al., (1979) estudiaron el comportamiento de una cepa axénica de *Nostoc muscorum* en dos medios de cultivo (con y sin nitrógeno combinado) y en diferentes períodos (15, 22, 29 y 43 días) de su crecimiento. Se observaron los efectos de los filtrados del medio de cultivo, obtenidos en cada una de las condiciones antes citadas, sobre el crecimiento de plántulas de arroz. La tendencia general de los resultados en ambos medios mostró una inhibición del crecimiento del vástago y un aumento de la longitud de la raíz principal de dichas plántulas. El efecto beneficioso de la cepa en este caso se debería no solo a su capacidad de fijar nitrógeno, sino también a la liberación de sustancias extracelulares entre las cuales podrían hallarse hormonas de naturaleza auxínica dado que detectamos actividad auxínica con el test recto de avena. También se identificó por cromatografía una sustancia con características similares al ácido indol acético (AIA).

Esta línea de trabajo continuó con *Aphanothece stagnina* que proviene, como la cepa antes citada, de arrozales de Argentina. Los resultados obtenidos fueron: aumento de la longitud de la raíz principal, disminución del número de raíces adventicias y del número de hojas. El efecto favorable de los productos extracelulares de *Aphanothece stagnina* sobre el crecimiento de las plántulas de arroz se traduciría fundamentalmente en la mayor elongación de la raíz principal, lo cual signi-

ficaría un aumento en la superficie de absorción de la misma con el consiguiente beneficio para el desarrollo de la plántula en los primeros estadios. Este efecto es similar al observado para *Nostoc muscorum*, si bien en este último caso también hay un efecto positivo sobre el número y largo de las raíces adventicias, lo cual favorecería además de la absorción el anclaje de la plántula. Las diferencias observadas entre los efectos de los productos extracelulares de ambas cepas podrían deberse a la diversa naturaleza de los productos liberados. Por lo tanto, a este respecto, no pueden darse pautas generales sino estudiar el efecto de cada cepa en particular (Cano et al., 1979).

Augier, (1977) en una extensa revisión sobre el tema presenta una lista de cianofíceas en las cuales diversos autores han analizado la masa algal y/o el medio de cultivo, destacando que en uno y otro caso, aún es desconocida o dudosa la naturaleza de las sustancias con actividad biológica, es decir, que hasta el momento se sabe más de sus efectos que de su composición.

Toxinas: En presencia de floraciones algales en un cuerpo de agua los peces pueden morir no sólo como resultado de sofocación, ya que los microorganismos y procesos oxidativos reducen el nivel de oxígeno en el agua, sino también por envenenamiento. Se ha atribuido a *Microcystis toxica* el envenenamiento masivo de mamíferos. Otras especies responsables de intoxicaciones son: *M. aeruginosa*, *M. flos-aquae*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena flos-aquae*, *Nodularia spumigena*, *Coelosphaerium sp.* y *Gloeotrichia equinulata*. Entre las ficotoxinas conocidas producidas por cianofíceas de agua dulce podemos citar: alcaloides, polipéptidos y pteridinas; y debromoaphyciatoxinas (deBr-aphit x) y toxinas relacionadas y lyngyatoxina A para marinas (Gorham y Carmichael, 1979). Se detectó un factor de muerte muy rápida liberado al medio de cultivo por *Anabaena flos-aquae*, el cual determina la muerte de rato-

nes en pocos minutos. Este factor fue químicamente identificado como un alcaloide de bajo peso molecular. Carmichael y Gorham (1978) lo designaron anatoxina-a determinando su estructura y con firmando por cristalografía de rayos x y por síntesis su peso molecular (165). La anatoxina A, es un bloqueante neuromuscular (Carmichael et al., 1979). En cambio el factor de muerte lenta obtenido a partir de cultivos de *Microcystis aeruginosa*, y que provoca la muerte en 30 a 60 minutos, es una endotoxina. Este factor iden tificado como uno de los cinco péptidos aislados de células de este cultivo, es un oligopéptido cíclico de peso molecular menor de 2600 (Wolk, 1973).

En este grupo de algas no se detectaron sustancias fenólicas, fostatatos orgánicos ni factores sexuales. Con respecto a lípidos, vitaminas y enzimas la información es escasa. Hellebust (1965) observó que los extractos con cloroformo del medio de cultivo de *Coccochlooris* sp. contenía el 10,3% del material extracelular total, indicando ésto la liberación de una pequeña cantidad de compuestos lipídicos. Venkataraman et al. (1964) en el medio de cultivo del ficobionte de *Cycas revoluta* determinaron, usando *Lactobacillus leichmanii* ATC 4797 como organismo de prueba, la presencia de sustancias relacionadas con la vitamina B₁₂. También Pintner y Altmeyer (1979) detectaron producción de vitamina B₁₂ en el filtrado de cultivos de dos cepas de *Anacystis marina*. Wolk (1980) confirmó los informes previos con respecto a la liberación de fosfatasas y además demostró la liberación de proteasas y deoxiribonucleasas en *Anabaena variabilis*.

3.2 Características del proceso de liberación:

Procesos: La liberación de sustancias simples tales como azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos, probablemente ocurre principalmente por difusión a través del plasma lema celular. La ve

locidad de tal liberación dependerá por lo tanto del gradiente de concentración de la sustancia a través de la membrana, y de la constante de permeabilidad de la membrana para la sustancia (Stadelman, 1969). Los datos sobre las cantidades relativas de moléculas simples intra y extracelulares apoyan esta hipótesis. Podría también existir una liberación activa, pero no hay evidencias concluyentes al respecto. Las moléculas grandes tales como polisacáridos y proteínas son probablemente excretadas por procesos más complejos. En algunas, la producción de mucílago extracelular durante el movimiento representa un caso especial de liberación de macromoléculas (Walsby, 1968).

La pérdida de contenido celular puede también ocurrir por autólisis o por cualquier otro tipo de lisis celular, particularmente durante la fase estacionaria de crecimiento.

La velocidad de liberación depende de factores fisiológicos y ambientales que afectan la permeabilidad de la membrana; de la concentración intracelular de metabolitos simples; y de la habilidad de las sustancias complejas que serán excretadas, para formar sustancias de la pared celular y/o vaina, y que pueden subsecuentemente ser liberados al medio.

Relaciones entre estado de crecimiento y liberación de productos extracelulares: Las células en fase "lag" y estacionaria generalmente liberan más carbono orgánico que las células en crecimiento exponencial, donde la liberación es menor dependiendo de las especies y condiciones de crecimiento.

Calothrix scopulorum libera en promedio un 40% del nitrógeno fijado correspondiendo el mayor porcentaje a la fase "lag". Por lo tanto es posible que en el campo, donde se producen grandes cambios, el alga libere un gran porcentaje de lo que fija. En la especie citada se observó que durante el crecimiento exponencial la vaina se mantiene delgada y el porcentaje de nitrógeno

liberado es bajo, mientras que en condiciones adversas (mayor temperatura y salinidad) el desarrollo de la vaina y la producción de nitrógeno extracelular aumenta. Parece ser entonces que es la vaina la que suministra la mayor proporción de productos extracelulares. Además puede ser que en las especies fijadoras de nitrógeno, en las cuales bajo condiciones adversas la fijación de nitrógeno es inhibida antes que la fotosíntesis, la formación de una vaina gruesa no sólo proteja al alga de las condiciones adversas, sino que siendo rica en carbohidratos y baja en nitrógeno ayude a mantener una relación C/N más favorable dentro de la célula (Jones y Stewart, 1969 a). Sin embargo, Lange (1976) considera que las vainas voluminosas están asociadas a un crecimiento vigoroso. Sugiere que la formación y retención de gruesas vainas provee un microambiente alrededor de la célula algal donde los nutrientes esenciales, presentes sólo en niveles subóptimos en el agua circundante, se concentran siendo rápidamente disponibles para la célula. Este aumento de concentración de nutrientes por sobre un nivel crítico, conduce a su vez a un crecimiento algal vigoroso.

También es posible en células vivas la liberación normal de altas concentraciones de metabolitos y productos extracelulares que no son utilizados en los procesos biosintéticos normales debido a condiciones pobres de crecimiento (Jones y Stewart, 1969 a).

La velocidad de excreción del ácido glicólico es mucho mayor en cultivos en rápido crecimiento, que en cultivos viejos.

Nalawajko y Lean (1972) observaron en experiencias cortas con cultivos de distintas algas, entre ellas *Anabaena flos-aquae*, que tanto la proporción de productos fotosintéticos liberados al medio como la composición de los mismos se alteran con la edad. En cultivos viejos se hacen predominantes compuestos de alto peso molecular.

Sing y Trehan (1973 b) en *Aulosira fertilissima* y *Anacystis nidulans* determinaron que el mayor número de aminoácidos es excretado durante las fases "lag" y estacionaria. Esto indicaría que alguno de estos aminoácidos son reutilizados por el alga en crecimiento.

Influencia de factores ambientales y fisiológicos: en general cualquier condición ambiental que inhibe la multiplicación celular pero permite que continúe la fotoasimilación da como resultado la liberación de altas proporciones de productos de la fotosíntesis.

Según Hellebust (1965) las altas intensidades luminosas provocan a menudo la liberación de grandes porcentajes de fotosintatos, probablemente debido a daños en las células algales. Nalewajko (1966) encontró, a altas intensidades de luz, una buena correlación entre la inhibición relativa de la fotosíntesis y el porcentaje de liberación de fotoasimilados. Observó que todas las especies estudiadas liberan al medio una fracción de carbono fotosintético; esta excreción era baja a intensidades de luz saturantes y con buen aporte de CO₂, llegando a menos del 2% del carbono total fijado en fotosíntesis. Además, con densidades muy altas de población (más de 2500 µg de peso seco de materia algal libre de cenizas/100 ml de medio) se produce una disminución de la velocidad de fotosíntesis y un aumento de la excreción. La reducción de la concentración de CO₂ da como resultado velocidades de excreción relativamente mayores.

Poco se sabe de los efectos de la temperatura sobre la producción de sustancias extracelulares. Los cambios rápidos en las condiciones ambientales, incluyendo la temperatura, determinan a menudo altas velocidades de liberación extracelular (Jones y Stewart, 1969 a).

Hood et al. (1969) sugirieron que en las algas azules la rápida producción de péptidos y aminoácidos extracelulares puede ser la consecuencia de una falla en el control de la biosíntesis de aminoácidos a través de una regulación por producto final.

3.3 Aspectos ecológicos:

Productividad primaria: Para determinar la productividad primaria de los ecosistemas acuáticos es muy importante la estimación exacta de las cantidades relativas de fotoasimilados liberados por las algas.

Jones y Stewart (1969 b) encontraron que *Calothrix scopulorum* libera nitrógeno extracelular y éste es aprovechado por otras algas, hongos y bacterias. En la absorción de estos productos nitrogenados están involucrados procesos activos y pasivos cuya importancia relativa varía con el organismo y con el producto extracelular. También se produce la adsorción de estos compuestos a núcleos inorgánicos en solución, fenómeno éste que puede ser de importancia ecológica considerable.

En general se ha observado que las velocidades de excreción son mayores en muestras de fitoplancton natural que en cultivos de laboratorio de las mismas especies. No se puede asegurar sin embargo que ésto refleje con exactitud el comportamiento de las algas en el medio natural porque el proceso de incubación por distintos períodos puede por sí mismo modificar la población natural y dar como resultado altas tasas de excreción. También problemas metodológicos como centrifugaciones o filtraciones poco cuidadosas pueden afectar las células y aumentar la liberación al medio.

Simbiosis: Se ha estudiado la liberación de productos extracelulares (principalmente carbohidratos y nitrógeno orgánico) en distintos tipos de asociaciones (hongos, hepáticas, helechos,

gimnospermas y angiospermas). Estos productos son utilizados en el seno de la asociación y han sido estudiados por diversos autores: Drew y Smith (1967); Richardson et al. (1967, 1968); Henriksson (1958, 1960, 1961); Whitton (en Carr-Whitton 1973); Loekart et al. (1978); Millbank (1974); Stewart (1977); Venkataraman (1962); Peters, et al. (1980); Talley y Rains (1980).

MATERIAL Y METODOS

1- Cepa estudiada: Se utilizó una cepa de *Tolypothrix tenuis* (Kütz) J. Schmidt em. (Scytonemataceae) cepa 40 d, aislada de arrozales de Argentina (Entre Ríos, Concepción del Uruguay; leg. D. R. de Halperín y R. Dieguez, 20-XII-1966 barro entre plantas pH 6,7), obtenida en condición de cultivo unialgal y posteriormente axénica mediante 30 m de irradiación con luz ultravioleta (Halperín et al. 1973). Se mantiene en el medio de Watanabe (1959) algo modificado ($\text{PO}_4 \text{HK}_2$: 0,3g; $\text{SO}_4 \text{Mg } 7 \text{H}_2\text{O}$: 0,2g; $\text{Cl}_2 \text{Ca}$: 0,05g; Fe: trazas (de una solución de $\text{Cl}_3 \text{Fe}$ al 1%, se agregan 2 a 3 gotas/l de medio); agua destilada: 1000ml, 1ml de solución A_6 de elementos menores (B, Cu, Zn, Mn, Co y Mo); esterilizar en autoclave 15 minutos a 120 °C) en tubos de ensayo de 16 x 160 mm, a la temperatura del laboratorio y expuestos a la luz de tubos fluorescentes de 40 w.

2- Obtención del cultivo masivo: Se utilizó el medio de Allen y Stanier (1968) algo modificado:

$\text{PO}_4 \text{HK}_2$: 0,039 g

$\text{SO}_4 \text{Mg } 7 \text{H}_2\text{O}$: 0,075 g

$\text{CO}_3 \text{Na}_2 10 \text{H}_2\text{O}$: 0,02 g

$\text{Cl}_2 \text{Ca } 2 \text{H}_2\text{O}$: 0,027 g

$\text{Si O}_3 \text{Na}_2$: 0,058 g

EDTA Na 10 mM: 0,03 ml

Acido cítrico: 0,06 g

Tartrato férrico ($\text{Cl}_3 \text{Fe}$: 5g + ácido tartárico: 5g en 1000 ml de H_2O destilada): 2 ó 3 gotas.

Solución A_6 ($\text{BO}_3 \text{H}_3$: 2,86 g; $\text{Cl}_2 \text{Mn } 4 \text{H}_2\text{O}$: 1,81 g;

$\text{SO}_4 \text{Zn } 7\text{H}_2\text{O}$: 0,222g; $\text{Na}_2 \text{MoO}_4 2\text{H}_2\text{O}$: 0,391 g; $\text{SO}_4 \text{Cu } 5 \text{H}_2\text{O}$: 0,079g

$\text{Cl}_2 \text{CO } 6\text{H}_2\text{O}$: 0,0415 g; en 1000 ml H_2O destilada): 1 ml.

Llevar con agua destilada a 1000 ml. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 120 °C.

13 Erlenmeyers de 300ml de capacidad, con 200 ml de medio de cultivo se inocularon al 10% con un cultivo desarrollado en el mismo medio. Se mantuvieron durante 7 meses y medio, expuestos a una intensidad luminosa de 3800 lux con 8 horas diarias de agitación durante el primer mes. El pH inicial del medio de cultivo fue de 6,5 siendo de 5,6 al finalizar el ensayo.

3-Obtención de los extractos a partir de la masa algal: Se separó la masa algal del medio de cultivo por centrifugación. Para la obtención de los extractos se utilizaron 26,10 g de peso fresco los cuales se separaron en dos fracciones:

3.1-Extracto etéreo transferido a agua: Una de las fracciones de masa algal (13,05 g) fue extraída en un potter con 200ml de éter libre de peróxidos (Werner, 1933). Se extrajo con pequeñas alícuotas hasta utilizar 200 ml de éter. El extracto así obtenido se transfirió a agua destilada estéril, obteniéndose el extracto etéreo transferido a agua tal cual (x) y por dilución a la mitad (1/2x). Se obtuvieron 2 fracciones de 40 ml cada una.

1-1-Extracto acuoso: a la citada masa algal, después de la extracción etérea, se le hicieron sucesivas extracciones con agua destilada estéril (100 ml) obteniéndose así el extracto acuoso tal cual (x) y extracto acuoso diluido a la mitad (1/2x). Se obtuvieron 50 y 100 ml respectivamente.

3.2-Extracto acuoso directo: La otra fracción de la masa algal (13,05 g) se extrajo directamente con 100 ml de agua destilada estéril (en alícuotas de 5 ml por vez) obteniéndose así el extracto acuoso directo tal cual (x) y diluyendo a la mitad (1/2x). Se obtuvieron 50 y 100 ml respectivamente.

4-Obtención del medio de cultivo donde crecieron las algas: Como se señaló en 3, la masa algal se separó del medio de culti-

vo por centrifugación, el sobrenadante fue filtrado por Buchner a través de papel de filtro común doble. Se obtuvieron 854 ml de filtrado algal.

Los pasos 3 y 4 se realizaron en condiciones de esterilidad,

5- Semillas: Se usaron de Zea mays, obtenidas en el comercio. Se las seleccionó a fin de hacer un lote lo más sano y parejo posible en cuanto a tamaño y color. El poder germinativo y viabilidad fue del 100%.

Las semillas se esterilizaron por inmersión en etanol, durante un minuto; luego de escurridas se trataron con biocloruro de mercurio, también durante un minuto; por último se lavaron con agua destilada estéril por 30 minutos (tres pasajes sucesivos de 10 minutos cada uno).

La esterilización se realizó en tubos de ensayo con cinco semillas cada uno.

6- Suelo: Se utilizó suelo Brunizen proveniente de Castelar (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA), de pH 5,5 - 6,0; se secó al aire y luego se tamizó.

El suelo se esterilizó en autoclave durante una hora a 120 °C .

En 88 macetas de 200 c.c. de capacidad se colocaron 170 g de dicho suelo estéril.

7- Metodología:

7.1- Imbibición de las semillas en extractos algales: semillas estériles se embebieron durante 24 horas en los diferentes extractos obtenidos a partir de la masa algal: etéreo transferido a agua x y 1/2 x; acuoso x y 1/2 x ; acuoso y directo x y 1/2 x. Como testigo se usaron semillas estériles remojadas en agua destilada estéril durante el mismo tiempo. Se realizaron 6 tratamienu

tos con 8 repeticiones cada uno, cada repetición con cinco semillas. Cada grupo de 5 semillas se embebió en 5 ml del extracto correspondiente.

7.2- Imbibición de semillas en filtrados algales: semillas estériles se embebieron durante 24 horas en el medio de cultivo donde crecieron las algas. Como testigo se usaron semillas estériles remojadas en agua destilada estéril durante el mismo tiempo.

Se realizaron 4 tratamientos que se detallan más adelante, con 8 repeticiones cada uno; cada repetición con 5 semillas. Cada grupo de 5 semillas se embebió en 5 ml de filtrado algal.

Tanto para el caso 7-1, como para el 7-2, se sembraron cinco semillas por maceta. Estas, se colocaron en una cámara para cultivo con un régimen de luz de 12 horas diarias a una temperatura de 26-27°C y una humedad del 60 al 65 %. Se regaron con agua destilada estéril.

1-Tratamientos hechos a plántulas: A la semana de la siembra las plántulas del caso 7-2, fueron tratadas durante cinco días consecutivos de la siguiente manera:

Tratamiento 1: Riego; cada maceta fue regada con 5 ml de filtrado algal.

Tratamiento 2: Pulverización; las plantas de cada maceta fueron pulverizadas con 5 ml de filtrado algal.

Tratamiento 3: Riego y Pulverización; a cada maceta se le realizó el tratamiento 1 y 2 simultáneamente.

Tratamiento 4: Testigo; se regó con agua destilada estéril.

Además, las 88 macetas fueron regadas con agua destilada estéril en cantidad suficiente.

Para ambos casos 7-1 y 7-2, a los 5 y 7 días se determinó el

porcentaje de germinación sobre 40 semillas.

A los 15 días de la siembra se segaron las plantas de todos los tratamientos. Se midió la altura del vástago y se contó el número de hojas de las plantas. Se determinó el peso seco de la parte aérea de las plantas por maceta, en estufa a 105°C (24-26 h) hasta peso constante. Se determinó el contenido proteico del vástago en porcentaje por el método Micro-Kjeldalh y Colorimetría.

7.3-Determinación de nitrógeno por Micro-Kjeldalh y Colorimetría: La técnica corresponde a la descrita por Lang (1958) y Jones (1960), con algunas modificaciones comunicadas verbalmente por el Licenciado Jorge Duville (CIBIMA, INTI), y otras elaboradas en nuestro laboratorio.

El método consiste en: digestión ácida de la muestra (descomposición de la materia orgánica nitrogenada en agua, anhídrido carbónico y amoníaco), nesslerización y medición del color resultante. Con éste método se puede detectar de 1 a más de 1000% de nitrógeno.

Reactivos: las drogas usadas son analíticas y el agua desionizada y destilada por destilador de vidrio con agregado de permanganato de potasio.

1-Mezcla para digestión: las siguientes drogas se combinan en el orden dado:

sulfato de potasio.....	40 g
selenio metálico.....	0.3 g
H ₂ O destilada.....	hasta 250 ml
ácido sulfúrico concentrado.....	250 ml
sulfato de cobre 1 M.....	20 ml

El selenio metálico se disuelve previamente en un balón Kjeldalh a temperatura media (100-150 °C) durante 30 minutos en

20 a 30 ml de ácido sulfúrico concentrado.

2-Reactivo de Nessler: 7g de ioduro mercurico y 5g de ioduro de potasio se disuelven en agua; luego se completa con agua hasta 500 ml, dejando esta solución en heladera y en oscuridad durante 12 horas. Se separa con papel de filtro común el exceso de ioduro mercurico. Al filtrado se le agrega 160 ml de una solución acuosa al 1% (peso en volumen) de goma arábica (*). Se completa con agua hasta 1500 ml. La solución debe protegerse de la luz. Inmediatamente antes de usar una alícuota de esta solución se diluye con igual volumen de hidróxido de sodio 2 N.

3-Soluciones standard de:

a. Sulfato de amonio: 19,65 g de sulfato de amonio anhidro, previamente secado en desecador, se disuelven y llevan a 250 ml en una solución de ácido sulfúrico 0,2 N. Para preparar las standars se hacen diluciones que contendrán cantidades conocidas de sulfato de amonio.

b. Lisina: 652 mg se disuelven en 100 ml de agua.

Equipo:

A. Aparato para digestión: como elemento calefactor se usa un sistema de resistencias en serie que mantienen un baño de arena a 320 °C. Las muestras colocadas en tubos de ensayos comunes (15 x 150 mm) se introducen hasta una profundidad de 25 cm en la arena. Esto permite que cada tubo actúe simultáneamente como condensador, dando una adecuada área de reflujo. El aparato usado permite el procesamiento simultáneo de numerosas muestras.

B. Fotocolorímetro: se usó el modelo Spectronic 20 de Bausch y Lomb.

Procedimiento: en cada tubo de ensayo se colocan 20 mg de muestra y 1 ml de mezcla para digestión. Estos tubos, junto con otros que contienen soluciones standard se colocan en el baño de arena hasta que la temperatura alcanza 320 °C; y se los mantiene

(*) Cumple la función de estabilizar el complejo coloreado que se forma en la reacción de Nessler (Jones, 1960).

a esta temperatura por 1 h 30 m a 2 horas. Para los standards son suficientes 30 minutos. Luego se retiran los tubos y se los deja enfriar a temperatura ambiente. Cada tubo se diluye en la forma necesaria para hacer las lecturas en el fotocolorímetro. Se toma una alícuota de 3 ml de esta solución y se mezcla con 4 ml de solución de Nessler; se deja en reposo por 10 minutos en oscuridad, y luego se lee la densidad óptica a 420 $m\mu$ en el fotocolorímetro.

A partir de la curva de calibración hecha con los standard de sulfato de amonio se calcula el contenido de nitrógeno de las muestras.

Todas las determinaciones se hacen por duplicado y se multiplican por 6,25 para obtener el contenido proteico.

7.4-Estudio estadístico: se ajustó a los datos un modelo de análisis de la varianza de un factor multivariado (11 grupos, 5 variables). Se comparó luego cada tratamiento con el tratamiento considerado testigo teniendo en cuenta todas las variables estudiadas, cuando la diferencia entre un tratamiento y su testigo resultó significativa al 5 % se estudió cuál o cuales variables provocaban esta diferencia.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

1- GERMINACION

1.1-Germinación de semillas embebidas en extractos algales: el tiempo de inmersión empleado (24 horas) concuerda con el utilizado por Gupta y colaboradores (1964) y por Caire et al. (1976), ya que según los primeros autores, una inmersión prolongada (48 horas) reduce el porcentaje de germinación. El cuadro N° 1 muestra el efecto de los diferentes extractos algales (etéreos y acuosos) sobre la germinación de cuarenta semillas/tratamiento a los 5 y 7 días.

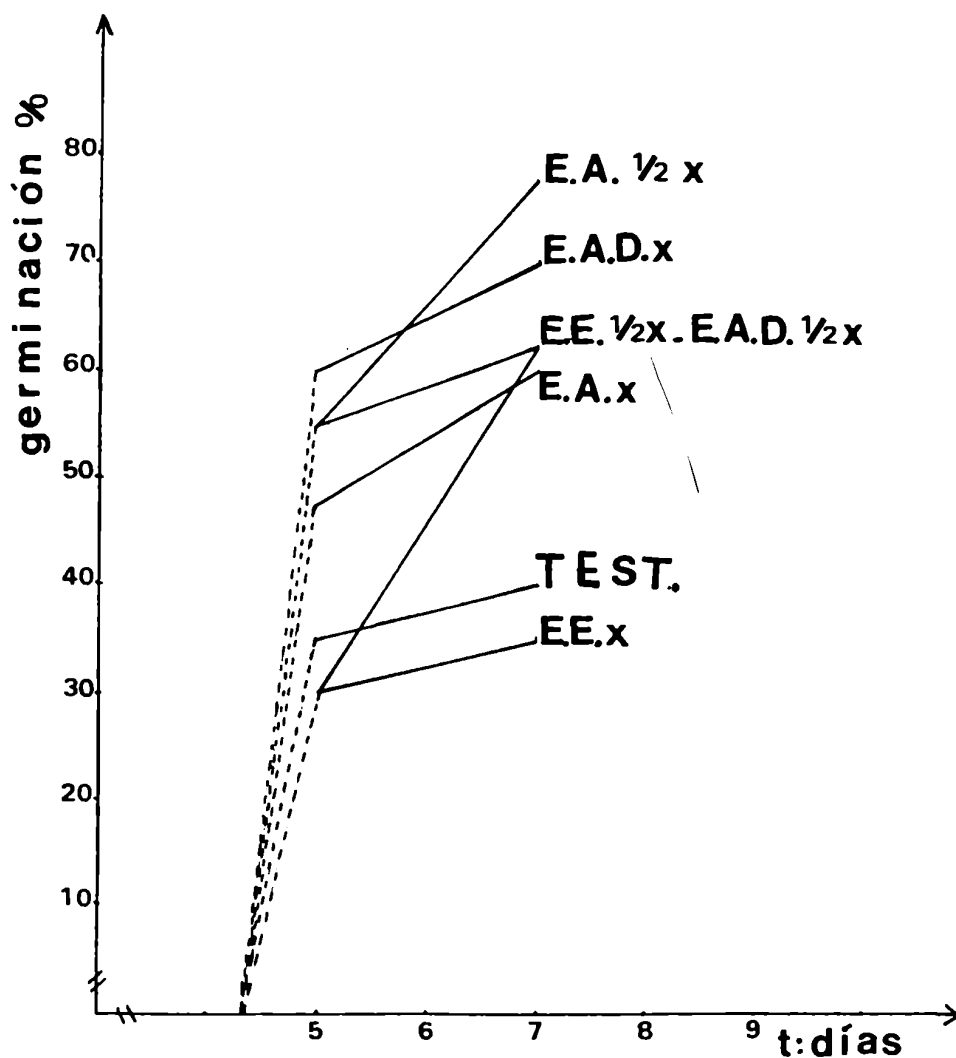
CUADRO N° 1: Efecto de los extractos algales sobre la germinación de las semillas

TRATAMIENTO	MACETA N°								∑ Sem. Germ.	% Germinación (días)	
	1	2	3	4	5	6	7	8			
E.A.D. 1/2x	3	4	2	3	3	3	3	4	25	62,5	55
E.A.D.x	4	3	3	4	2	5	4	3	28	70	60
E.E. 1/2x	2	4	4	3	4	2	3	3	25	62,3	30
E.E. x	2	2	3	2	2	1	1	1	14	35	30
E.A. 1/2x	4	4	4	5	3	4	2	5	31	77,5	55
E.A. x	3	3	3	4	3	3	1	4	24	60	47,5
TESTIGO	0	3	1	3	3	1	3	2	16	40	35

REF: E.A.D. 1/2x y E.A.D. x: extracto acuoso directo diluido a la mitad y tal cual respectivamente; E.E. 1/2x y E.E. x; extracto etéreo diluido a la mitad y tal cual respectivamente; E.A. 1/2x y E.A. x: extracto acuoso diluido a la mitad y tal cual respectivamente.

El gráfico N° 1 representa el efecto de los tratamientos con extractos algales: acuosos (E.A.), acuosos directos (E.A.D.) y etéreos (E.E.), tal cual (x) y diluidos a la mitad (1/2 x), de *Tolypothrix tenuis* sobre la germinación de semillas de maíz en función del tiempo.

Gráfico N° 1. Efecto de los extractos algales sobre la germinación de semillas de maíz.



Los resultados estadísticos realizados con los datos obtenidos a los 7 días indican que: 1) la germinación de las semillas tratadas con extractos acuosos y con extractos acuosos directos tal cual y diluidos a la mitad aumenta significativamente (de $p < 0,05$ a $p < 0,01$); 2) el extracto etéreo tal cual no tiene efecto sobre la germinación de las semillas, en tanto que el diluido a la mitad ejerce una promoción significativa comparable con la obtenida con el extracto acuoso directo diluido a la mitad. Para el extracto etéreo diluido a la mitad la tendencia de los resultados se invierte en el lapso de dos días, probablemente debido a un lavado de inhibidores.

Para el resto de los extractos a los 7 días se observa la misma tendencia en los resultados que la observada a los 5 días de la siembra.

En las condiciones de nuestra experiencia los mejores resultados para la germinación de semillas embebidas en extractos algales se obtuvieron con extractos acuosos, especialmente con el extracto acuoso 1/2 x (77,5% de germinación). Esto indicaría que las sustancias con actividad biológica contenidas en la masa algal son solubles en agua.

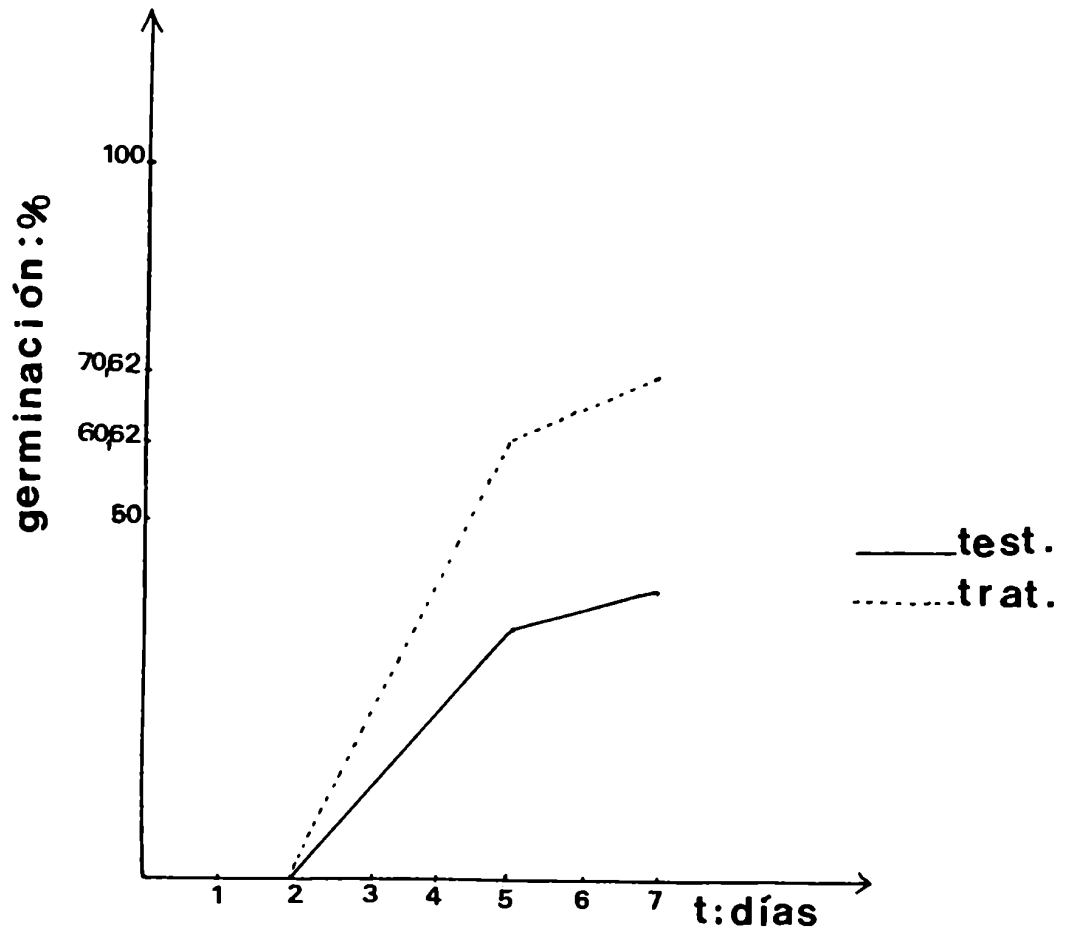
1.2-Germinación de semillas embebidas en filtrados algales:
el cuadro N° 2 muestra el efecto de los productos algales liberados al medio por *T. tenuis* sobre la germinación de 160 semillas de maíz a los 5 y 7 días. En este caso las semillas fueron embebidas en filtrados algales.

CUADRO N° 2: Efecto de los filtrados algales sobre la germinación de las semillas

TRATAMIENTO	1	2	3	4	5	6	7	8	\sum Sem. Germ.	% Germinación (días)
IMBIBICION DE SEMILLAS EN FILTRADOS ALGALES	3	4	4	3	4	4	4	5	28	70
									28	62,5
									28	70
									28	62,5
									28	70
									28	60
									29	72,5
									29	57,5
TESTIGO	0	3	1	3	3	1	3	2	16	40
									16	35

El gráfico N° 2 representa el efecto de la imbibición en filtrados algales de *Tolypothrix tenuis* sobre la germinación de semillas de maíz en función del tiempo.

Gráfico N° 2. Efecto de filtrados algales sobre la germinación de semillas de maíz



El estudio estadístico de los datos obtenidos a los 7 días de la siembra indica una promoción en la germinación de las semillas tratadas altamente significativa ($p < 0,001$). Se obtuvo un 70,62 % de germinación de semillas a los 7 días.

Los resultados obtenidos coinciden, en cuanto a extractos acuosos se refiere, con los de Gupta y Lata (1964) con *Phormidium foveolarum* y semillas de arroz. Estos autores observaron que los extractos acuosos (1-2 y 10%) aceleraban la germinación de las semillas con respecto a los testigos. Además, dichos autores para los extractos etéreos transferidos a agua (2 y 10%), observaron que la tendencia de los resultados se invierte a los dos días de la germinación de la misma manera que lo hace nuestro extracto etéreo diluido a la mitad. Como ya señalamos, esto podría deberse a un lavado de inhibidores por riegos posteriores.

Caire et al. (1976), trabajando con una cepa de *Nostoc muscorum* Ag. (Nº 79 a) observaron que tanto los extractos etéreos como los extractos acuosos aumentaban la velocidad de germinación con respecto a un testigo húmedo, tomados los datos a los 2-3-4 y 5 días de la siembra.

Las diferencias observadas pueden atribuirse al comportamiento propio de las especies algales estudiadas (*Phormidium foveolarum*, *Nostoc muscorum*, *Tolypothrix tenuis*) en cuanto a liberación de productos extracelulares y a la diferente sensibilidad de las semillas ensayadas (arroz, mijo, maíz).

Las experiencias realizadas muestran que tanto la imbibición de las semillas en extractos obtenidos a partir de la masa algal como en filtrados algales producen un efecto benéfico en el porcentaje de germinación (77,5 % y 70,62 % respectivamente).

2- ALTURA DE LAS PLANTAS

2.1-Extractos algales: la altura promedio (por maceta) de las plantas obtenidas previa imbibición de las semillas en extractos algales se consigna en el cuadro N° 3.

Los datos obtenidos muestran que ningún tratamiento promovió un mayor crecimiento de las plantas. En el caso de los extractos etéreos se observa una disminución del crecimiento 24,34 cm y 20,36 cm respectivamente vs. el testigo 28,99 cm. Esta disminución es significativa a nivel del 1 % para el extracto etéreo sin diluir.

CUADRO N° 3: Altura de las plantas (en cm)

MACETA	EXTRACTO ACUOSO DIRECTO	EXTRACTO ETereo	EXTRACTO ACUOSO	TESTIGO
	1/2x x	1/2x x	1/2x x	
1	34,35 29,10	22 27,65	37,26 27,00	-
2	24,36 33,15	26,02 22,35	31,26 29,73	31,73
3	23,55 36,50	22,12 26,63	31,12 34,96	29,50
4	23,16 28,30	18,23 23,65	24,20 29,40	34,03
5	24,03 25,90	30,00 27,55	32,26 25,26	29,56
6	25,90 25,94	26,75 19,90	27,90 28,60	24,50
7	24,10 32,55	27,40 6,20	26,40 15,10	28,26
8	28,77 31,95	22,25 9,00	33,92 27,55	25,40
P	26,02 30,42	24,34 20,36	30,54 27,20	28,99

La fotografía N° 1 muestra el aspecto de varias plantas co
rrespondientes a los distintos tratamientos en el momento de la
cosecha.

Foto N° 1



Ref.: los números indican los tratamientos con extractos
y el testigo: 1-testigo; 2-etéreo 1/2 x; 3-acuoso directo x;4-
etéreo x; 5-acuoso 1/2 x; 6-acuoso x; 7-acuoso directo 1/2 x.

La fotografia N° 2 representa la altura media de las plantas de cada tratamiento en el momento de la cosecha.

Foto N° 2



Ref.: los números indican los tratamientos con extractos y el testigo: 1-testigo; 2-etéreo 1/2 x; 3-acuoso directo x; 4-etéreo x; 5-acuoso 1/2 x; 6-acuoso x; 7-acuoso directo 1/2 x.

2.2-Filtrados algales: el cuadro N° 4 consigna la altura promedio (por maceta) de las plantas obtenidas previa imbibición de las semillas en filtrados algales y regadas posteriormente con agua destilada estéril.

Los estudios estadísticos de los resultados obtenidos no indican diferencias significativas.

2.3-Filtrados algales y tratamientos posteriores: el cuadro N° 5 consigna la altura promedio (por maceta) de las plantas obtenidas previa imbibición de las semillas en filtrados algales y tratamientos posteriores con los mismos filtrados algales suministrados como:

- 1) riego
- 2) pulverización
- 3) tratamiento combinado de riego y pulverización.

Los estudios estadísticos de los resultados obtenidos no indican diferencias significativas.

CUADRO N° 4: Altura de las plantas (en cm)

MACETA	AGUA	TESTIGO
1	29,86	-
2	29,25	31,73
3	21,95	29,50
4	28,13	34,03
5	32,96	29,56
6	26,47	24,50
7	36,72	28,26
8	23,66	25,40
p	28,62	28,99

Ref.: Agua- semillas embebidas en filtrados algales y posteriormente regadas con agua destilada estéril.

Testigo- semillas embebidas en agua destilada y posteriormente regadas con agua destilada estéril.

p- promedio

CUADRO N° 5: Altura de las plantas (en cm)

MACETA	A	R	P	R+P
1	29,86	34,76	27,90	17,13
2	29,25	27,82	26,10	23,35
3	21,95	29,56	26,00	31,85
4	28,13	28,05	27,70	25,74
5	32,96	24,96	32,18	27,27
6	26,47	31,54	15,65	25,27
7	36,72	20,00	25,90	29,75
8	23,66	34,70	27,87	33,30
p	28,62	28,92	26,16	26,70

- Ref.: A- plántulas regadas con agua destilada estéril (testigo)
R- plántulas regadas durante 5 días consecutivos con filtrado algal y luego con agua destilada estéril.
P- plántulas pulverizadas durante 5 días consecutivos con filtrado algal y luego regadas con agua destilada estéril.
R+P- plántulas regadas y pulverizadas durante 5 días consecutivos con filtrado algal y luego regadas con agua destilada estéril
p- promedio

La fotografía N° 3 muestra el aspecto de varias plantas correspondientes a los distintos tratamientos en el momento de la cosecha.

Foto N° 3



Ref.: los números indican los distintos tratamientos: 7-riego y pulverización; 8- testigo; 9-riego; 10-agua; 11-pulverización.

La fotografía N° 4 representa la altura media de las plantas de cada tratamiento en el momento de la cosecha.

Foto N° 4



Ref.: los números indican los distintos tratamientos: 7-riego y pulverización; 8-testigo; 9-riego; 10-agua; 11-pulverización.

Con respecto al efecto de extractos algales (acuosos o etéreos) sobre la altura de las plantas cabe señalar que a diferencia de los resultados de este trabajo los realizados por los diferentes grupos de investigación conocidos revelan siempre un efecto benéfico independientemente del cultivo de que se trate (trigo-arveja - arroz - maíz - mijo) y del extracto usado (etéreo o acuoso). Así Shukla y Gupta (1967) observaron un aumento en la altura de plantas de arroz cuyas semillas habían sido embebidas en extractos acuosos y etéreos de *Phormidium foveolarum* (5 y 1% respectivamente). Las plantas fueron medidas a los 15; 30; 45 y 60 días observándose incrementos en todos los casos. Estos mismos autores (1969) observaron en el mismo cultivo que el desarrollo de plántulas es estimulado cuando las semillas son embebidas en extractos etéreos transferidos a agua o acuosos de tres especies de *Phormidium*.

Kushwaha y Gupta (1970 b) observaron un incremento en el largo de la plúmula de plántulas de maíz obtenidas después de imbibición de las semillas en extractos etéreos transferidos a agua y acuosos de *P. foveolarum*. Los mejores resultados fueron observados para el extracto etéreo al 2% para un tipo de maíz y 1% para el otro tipo, mientras que el extracto acuoso al 2% dió los mejores resultados para ambos tipos.

Gupta y Gupta (1970) observaron en plántulas de arveja cuyas semillas habían sido embebidas en extractos de *P. foveolarum* un aumento en la longitud del vástago. Los extractos acuosos más efectivos fueron 5% ; 1% y 0,5% dependiendo del tipo de arveja usada. Los extractos etéreos transferidos a agua más efectivos fueron 1% y 2% dependiendo también del tipo de arveja usada.

Kushwaha y Gupta en 1970 a observaron un incremento en el largo de la plúmula de plántulas de trigo después de la imbibición de las semillas en extractos de *P. foveolarum*, tanto con extractos acuosos (1;2 y 5%) como con extractos etéreos transferidos a agua (1; 2 y 0,5%) en ambos casos dependiendo de los tipos de trigo usados.

Caire et al. (1976), respecto de la altura de las plantas de mijo y de acuerdo a los datos recogidos a los 28 y 39 días de la siembra, observaron incrementos en la altura de todas las plantas tratadas con extractos acuosos y etéreos de *Nostoc muscorum* respecto al testigo húmedo.

En cuanto al efecto de los filtrados algales sobre la altura de las plantas los resultados obtenidos no siguen una tendencia general como en el caso de extractos. Caire et al. (1979) observaron que filtrados algales de *Nostoc muscorum* (creciendo en medios con y sin nitrógeno combinado) producen inhibición del crecimiento del vástago de plántulas de arroz en todos los casos estudiados, excepto en uno (correspondiente a 36 días y medio sin nitrógeno combinado) que no mostró diferencia significativa. En una experiencia similar, Cano et al. (1979) observaron que filtrados de otra especie: *Aphanothece stagnina* no tiene efecto significativo sobre el largo del vástago de plántulas de arroz, resultados coincidentes con los obtenidos en este trabajo. En cambio Singh y Trahan (1973 c) observaron un efecto beneficioso de los filtrados algales de *Aulosira fertilissima* en plántulas de arroz.

En las experiencias antes citadas los filtrados algales se utilizan como medio de crecimiento de las plántulas de arroz.

Watanabe et al. (1951) observaron que el agregado de *Tolythrix tenuis* a plantas de arroz (lo cual implica liberación de sustancias con actividad biológica) produce un efecto beneficioso en la longitud de las hojas (aumento del 17%) mientras que con otra especie: *Aulosira fertilissima* y en el mismo cultivo no observa diferencias (Watanabe 1973).

3- NUMERO DE HOJAS

3.4-Extractos algales: el número promedio de hojas (por maceta) de las plantas obtenidas previa imbibición de las semillas en extractos algales se consigna en el cuadro N° 6.

Los datos obtenidos muestran que ningún tratamiento promovió un aumento significativo en el número de hojas de las plantas.

CUADRO N° 6: Número de hojas de las plantas

TRATAMIENTO	MACETA N°								P
	1	2	3	4	5	6	7	8	
E.A.D. 1/2x	3,50	2,66	3,50	2,66	2,66	3	3	2,5	2,93
E.A.D. x	3	3	2,5	3	3	3	3,25	2,66	2,92
E.E. 1/2 x	3	3,33	2,75	2,33	3,33	3	2,66	3,5	2,98
E.E. x	3	2,50	3	3,50	3	2	2	2	2,62
E.A. 1/2 x	3,33	3	3	3	3,33	2,33	3	3,20	3,02
E.A. x	3	3	3,66	2,75	3	3	3	3,25	3,08
TESTIGO	0	3	3	3	3,33	3	2	3	2,90

Ref.: E.A.D. 1/2 x-extracto acuoso directo diluído a la mitad.
E.A.D. x- extracto acuoso directo sin diluir
E.E. 1/2 x- extracto etéreo diluído a la mitad
E.E. x- extracto etéreo sin diluir.
E.A. 1/2x- extracto acuoso diluído a la mitad.
E.A. x- extracto acuoso sin diluir.
P.- promedio

3.2- Filtrados algales: el cuadro N° 7 consigna el número promedio de hojas (por maceta) de las plantas obtenidas previa imbibición de las semillas en filtrados algales y regadas posteriormente con agua destilada estéril.

Los estudios estadísticos de los resultados obtenidos no indican diferencias significativas.

3.3- Filtrados algales y tratamientos posteriores: el cuadro N° 8 consigna el número promedio de hojas (por maceta) de las plantas obtenidas previa imbibición de las semillas en filtrados algales y tratamientos posteriores con los mismos filtrados algales suministrados como:

- 1) riego
- 2) pulverización
- 3) tratamiento combinado de riego y pulverización.

Los estudios estadísticos de los resultados obtenidos no indican diferencias significativas.

CUADRO N° 7: Número de hojas de las plantas

MACETA	AGUA	TESTIGO
1	3	-
2	3	3
3	2,50	3
4	3	3
5	3	3,33
6	3	3
7	3,25	2
8	3,50	3
p	3,03	2,90

Ref.: agua- plántulas obtenidas a partir de semillas embebidas en filtrados algales y posteriormente regadas con agua destilada estéril.

testigo- plántulas obtenidas a partir de semillas embebidas en agua destilada y posteriormente regadas con agua destilada estéril.

p- promedio.

CUADRO N°: 8: Número de hojas de las plantas

MACETA	A	R	P	R+P
1	3	3,33	2,50	2,33
2	3	2,75	3	3
3	2,50	3,33	2,75	3,25
4	3	3	2,75	3
5	3	3,33	3	3
6	3	3	2,50	3
7	3,25	3	3	3
8	3,50	3,25	2,75	3
p	3,03	3,12	2,78	2,94

Ref.: A- plántulas regadas con agua destilada estéril (testigo)
R- plántulas regadas durante 5 días consecutivos con filtrado algal y luego con agua destilada estéril.
P- plántulas pulverizadas durante 5 días consecutivos con filtrado algal y luego regadas con agua destilada estéril.
R+P- plántulas regadas y pulverizadas durante 5 días consecutivos con filtrado algal y luego regadas con agua destilada estéril.
p- promedio.

Con respecto al efecto de los extractos algales (acuosos y etéreos), la bibliografía consultada indica resultados opuestos a los obtenidos en nuestra experiencia. Así, Shukla y Gupta (1967) observaron que las plántulas de arroz obtenidas previa imbibición de las semillas en extractos etéreos transferidos a agua y acuosos, ambos al 5%, muestran un aumento en el número de hojas (21, 4 vs. 14,2 y 43,9 vs. 14,2 respectivamente).

En ensayos con filtrados algales como medio de cultivo para el crecimiento de plántulas de arroz son variados los resultados obtenidos por los distintos autores, dependiendo en la mayoría de los casos de la edad del cultivo y de la cepa algal empleada. Así, Singh y Trehan (1973 c) con una cepa de *Aulosira fertilissima* no observaron diferencias significativas en el número de hojas de las citadas plantas. En cambio, Caire et al. (1979) observaron con *Nostoc muscorum* inhibición o incremento significativo en el número de hojas dependiendo de la edad del cultivo algal. Con otra especie, *Aphanothece stagnina* Cano et al. (1979) no observaron diferencias significativas en cuanto al número de hojas con filtrados algales de 15 días, en tanto que con los de 22 y 29 días detectaron una inhibición significativa.

4- PESO SECO DE LAS PLANTAS

4.1- Extractos algales: el peso seco promedio por planta obtenida previa imbibición de la semilla en extractos algales se consigna en el cuadro N° 9.

Los estudios estadísticos realizados con los datos obtenidos indican que el extracto acuoso directo sin diluir y el extracto acuoso diluído a la mitad determinan un aumento significativo en el peso seco de las plantas (535; 568 vs. 416). Los otros extractos utilizados no producen diferencias significativas en el citado parámetro.

CUADRO N° 9: Peso seco promedio por maceta de las plantas (mg)

TRATAMIENTO	MACETA N°								P
	1	2	3	4	5	6	7	8	
E.A.D. 1/2x	70,6	46,9	52,8	35,7	52,0	49,2	38,6	48,8	49,3
E.A.D.x	52,4	54,8	55,1	42,6	45,1	46,2	61,3	70,8	53,5
E.E. 1/2x	41,6	44,9	43,3	21,4	38,0	44,3	45,8	33,9	33,9
E.E.x	54,1	22,0	36,1	57,9	49,0	22,8	14,9	18,0	34,3
E.A. 1/2x	70,1	59,2	54,6	48,4	62,7	42,6	50,3	66,7	56,8
E.A. x	31,2	57,6	50,5	51,7	34,3	60,2	22,0	53,8	45,1
TESTIGO	-	53,9	40,8	59,2	38,9	23,2	27,3	38,0	41,6

Ref.: E.A.D. 1/2 x- extracto acuoso directo diluído a la mitad.
E.A.D.x-extracto acuoso directo sin diluir.
E.E. 1/2x- extracto etéreo diluído a la mitad.
E.E. x- extracto etéreo sin diluir.
E.A. 1/2x- extracto acuoso diluído a la mitad.
E.A.x- extracto acuoso sin diluir.
P- promedio

4.2- Filtrados algales: el cuadro N° 10 consigna el peso seco promedio por maceta de las plantas obtenidas previa imbibición de las semillas en filtrados algales y regadas posteriormente con agua destilada estéril.

Los estudios estadísticos de los resultados obtenidos no indican diferencias significativas.

4.3- Filtrados algales y tratamientos posteriores: el cuadro N°11 consigna el peso seco promedio por maceta de las plantas obtenidas previa imbibición de las semillas en filtrados algales y tratamientos posteriores con filtrados algales suministrados como:

- 1) riego
 - 2) pulverización
 - 3) tratamiento combinado de riego y pulverización
- los estudios estadísticos de los resultados obtenidos no indican diferencias significativas.

CUADRO N°10: Peso seco promedio por maceta
de las plantas (mg)

MACETA	AGUA	TESTIGO
1	55,4	
2	59,4	53,9
3	48,8	40,8
4	38,7	59,2
5	64,4	38,9
6	40,4	23,2
7	72,1	37,3
8	45,3	38,0
p	53,0	41,6

Ref.: agua- plántulas obtenidas a partir de semillas embebidas en filtrados algales y posteriormente regadas con agua destilada estéril.

testigo- plántulas obtenidas a partir de semillas embebidas en agua destilada estéril y posteriormente regadas con agua destilada estéril.

p- promedio

EUADRO N° 11: Peso seco promedio por maceta de las plantas (mg)

MACETA	A	R	P	R+P
1	55,4	62,1	46,3	45,8
2	59,4	65,3	45,6	39,7
3	48,8	58,5	42,8	60,9
4	38,7	55,1	52,9	46,8
5	64,4	51,1	63,3	72,0
6	40,4	51,3	27,5	47,3
7	72,1	33,9	42,5	50,9
8	45,3	58,4	48,3	48,9
p	53,0	54,4	46,1	51,5

- Ref.: A- plántulas regadas con agua destilada estéril (testigo)
R- plántulas regadas durante 5 días consecutivos con filtrado algal y luego con agua destilada estéril.
P- plántulas pulverizadas durante 5 días consecutivos con filtrado algal y luego regadas con agua destilada estéril.
R+P- plántulas regadas y pulverizadas durante 5 días consecutivos con filtrado algal y luego regadas con agua destilada estéril.
p- promedio

Shukla y Gupta (1967); Gupta y Kushwaha (1970-1972), observaron que la imbibición de las semillas en extractos de *P. foveolarum* y tratamientos posteriores determinó un aumento del peso seco de las partes vegetativas de las diferentes plantas probadas. Los aumentos registrados tanto con extractos acuosos como etéreos dependieron del cultivo usado.

Similarmente, Caire et al. (1976) observaron que extractos etéreos y acuosos de *Nostoc muscorum* determinaron un incremento de la materia seca de plantas de mijo, correspondiendo el más elevado al extracto acuoso sin diluir.

En las condiciones experimentales del presente trabajo, a diferencia de los resultados antes mencionados, sólomente los extractos acuosos promueven un aumento en el peso seco de la parte vegetativa. De la consideración de estos resultados se infiere que para este tipo de trabajos no pueden enunciarse reglas generales, sino que la experimentación debe realizarse para cada cepa y para cada cultivo.

5- CONTENIDO PROTEICO

5.1- Extractos algales: el porcentaje del contenido proteico de la parte aérea de las plantas obtenidas previa imbibición de las semillas en extractos algales se consigna en el cuadro N° 12.

Los estudios estadísticos realizados con los datos obtenidos indican que el extracto acuoso directo sin diluir y el extracto acuoso diluido a la mitad aumentan significativamente el contenido proteico (33, 75; 33; 37 respectivamente vs. 29,87).

CUADRO N° 12: Contenido proteico de la parte aerea (%)

TRATAMIENTO	MACETA N°								P
	1	2	3	4	5	6	7	8	
E.A.D. 1/2x	34,62	33,25	31,44	28,50	34,62	29,00	32,68	26,81	31,31
E.A.D. x	28,12	27,81	34,75	33,50	37,75	34,81	35,25	38,06	33,75
E.E. 1/2 x	-	29,06	34,37	28,18	26,43	27,06	25,62	31,43	33,00
E.E.x	35,12	32,75	28,87	-	33,00	33,25	31,50	34,87	32,75
E.A. 1/2 x	28,50	-	34,06	34,25	36,56	35,93	30,12	34,31	33,37
E.A.x	-	37,12	32,93	33,12	30,43	30,18	30,68	31,12	32,18
TESTIGO	-	31,75	28,31	32,68	30,75	25,87	30,00	29,75	29,87

Ref.: E.A.D. 1/2 x- extracto acuoso directo diluído a la mitad.
 E.A.D.x- extracto acuoso directo sin diluir.
 E.E. 1/2x- extracto etéreo diluído a la mitad.
 E.E.x- extracto etéreo sin diluir.
 E.A. 1/2 x- extracto acuoso diluído a la mitad.
 E. A. x- extracto acuoso sin diluir
 P.- promedio

5.2 Filtrados algales: el cuadro N° 13 consigna el contenido proteico en porcentaje de la parte aérea de las plantas obtenidas previa imbibición de las semillas en filtrados algales y riego posterior con agua destilada estéril.

Los estudios estadísticos de los resultados obtenidos no indican diferencias significativas.

CUADRO N° 13: Contenido proteico de la parte aérea (%)

MACETA	AGUA	TESTIGO
1	34,31	-
2	28,87	31,75
3	-	28,31
4	30,12	32,68
5	30,81	30,75
6	25,12	25,87
7	32,12	30,00
8	30,06	29,75
p	30,18	29,87

Ref.: agua- plántulas obtenidas a partir de semillas embebidas
en filtrados algales y posteriormente regadas con
agua destilada estéril
testigo- plántulas obtenidas a partir de semillas embebidas
en agua destilada estéril y posteriormente regadas
con agua destilada estéril
p- promedio

5.3 Filtrados algales y tratamientos posteriores: el cuadro N° 14 consigna el contenido proteico en porcentaje de la parte aérea de las plantas obtenidas previa imbibición de las semillas en filtrados algales y tratamientos posteriores con los mismos filtrados algales suministrados como:

- 1) riego
- 2) pulverización
- 3) tratamiento combinado de riego y pulverización

Los estudios estadísticos de los resultados obtenidos indican que todos los tratamientos promueven diferencias significativas. El tratamiento 1) produce un aumento muy significativo del contenido proteico de la parte aérea (35,23 vs. 30,18). Los tratamientos 2) y 3) por lo contrario producen una disminución muy significativa del contenido proteico (22,56 y 23,06 respectivamente vs. 30,18). Cabe señalar en el caso de éste parámetro que el tratamiento combinado de un agente beneficioso y de uno perjudicial no da como resultado la anulación de los efectos individuales indicados en 1) y en 2); sino que prevalece el efecto perjudicial del tratamiento 2). Esto indicaría que la pulverización con filtrados algales resulta perjudicial para el balance proteico de los cultivos, por lo menos en las condiciones de nuestra experiencia. Esto debe considerarse cuando se trata de cultivos destinados a la alimentación ya sea humana o animal.

CUADRO N° 14: Contenido proteico de la parte aérea (%)

MACETA	A	R	P	R+P
1	34,31	38,62	27,43	20,12
2	28,87	34,12	20,06	22,50
3	-	35,12	20,56	23,00
4	30,12	33,37	23,81	22,87
5	30,81	40,68	22,00	26,56
6	25,12	30,93	-	23,81
7	32,12	34,18	20,18	22,93
8	30,06	36,50	24,00	-
p	30,18	35,25	22,56	23,06

- Ref: A- plántulas regadas con agua destilada estéril (testigo)
R- plántulas regadas durante 5 días consecutivos con filtrado algal y luego con agua destilada estéril.
P- plántulas pulverizadas durante 5 días consecutivos con filtrado algal y luego regadas con agua destilada estéril
R+P- plántulas regadas y pulverizadas durante 5 días consecutivos con filtrado algal y luego regadas con agua destilada estéril.
p- promedio

Con respecto al efecto de los extractos algales sobre el contenido proteico los resultados consignados en la bibliografía coinciden con los obtenidos en éste trabajo.

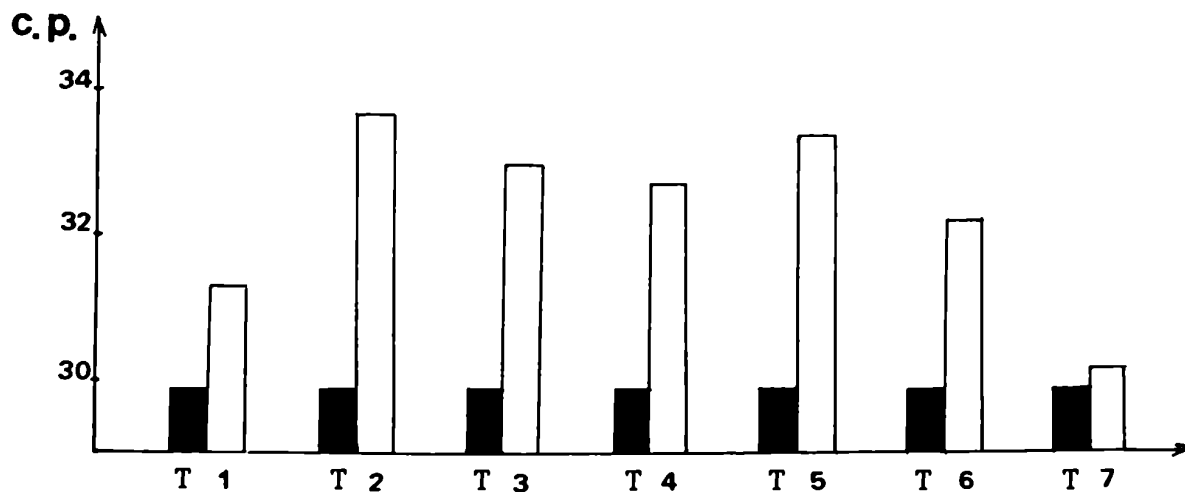
Así, Shukla y Gupta (1967) observaron que después de la imbibición de semillas de arroz en extractos acuosos y etéreos de *P. foveolarum* las plantas obtenidas aumentaban su contenido en proteínas siendo el extracto acuoso al 5% el más efectivo.

En nuestro caso los extractos que produjeron los mayores aumentos fueron el acuoso directo sin diluir y el acuoso diluído.

Con respecto a la acción de filtrados algales no contamos con referencias bibliográficas.

Los histogramas N° 1 y 2 resumen los resultados obtenidos con los distintos tratamientos con respecto al contenido proteiico.

Histograma N° 1



Ref.: c.p.- contenido proteico

T.- testigo

1.- imbibición en extracto acuoso directo diluido a la mitad

2.- imbibición en extracto acuoso directo tal cual

3.- imbibición en extracto etéreo diluido a la mitad

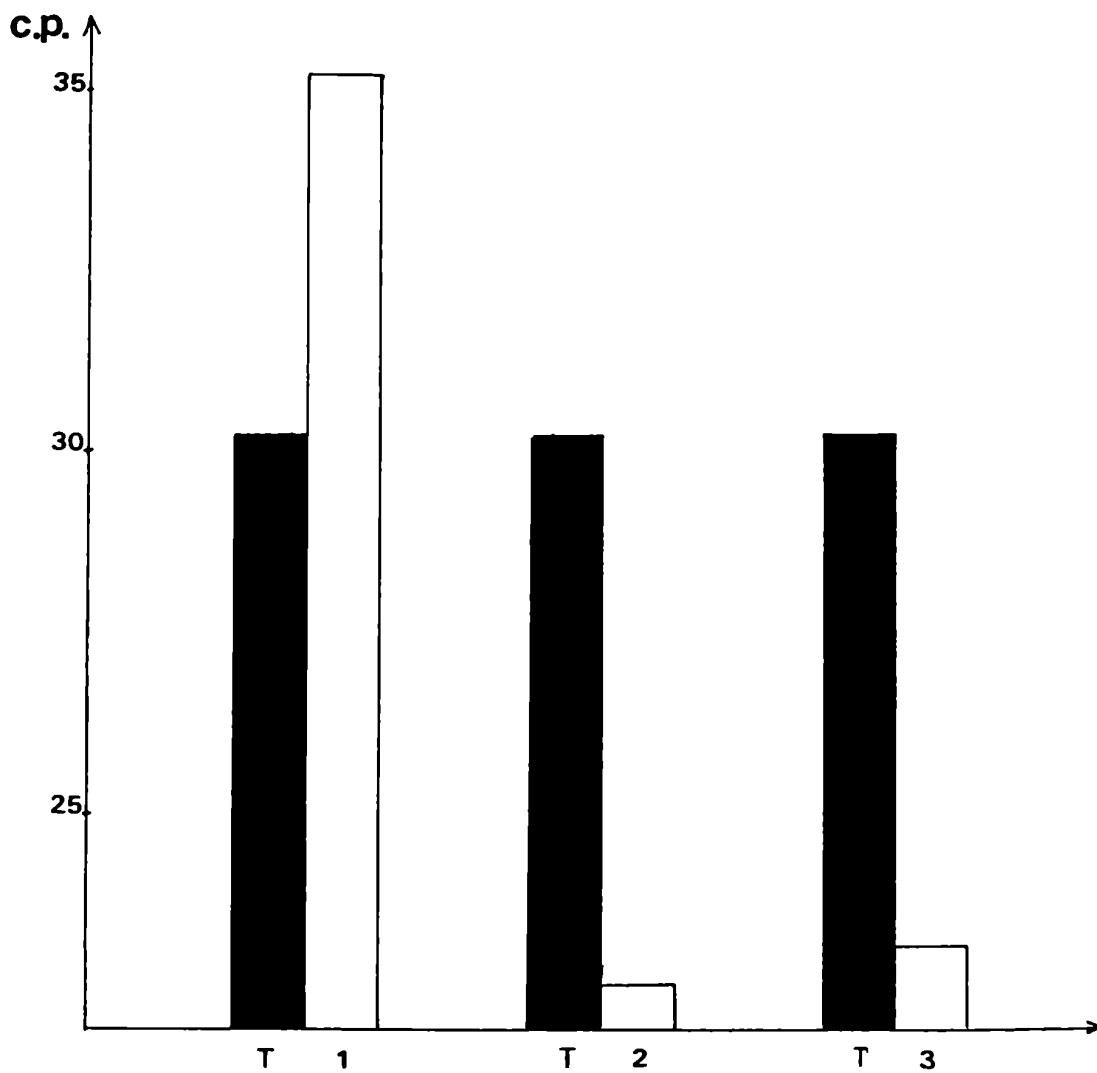
4.- imbibición en extracto etéreo tal cual

5.- imbibición en extracto acuoso diluido a la mitad

6.- imbibición en extracto acuoso tal cual

7.- imbibición en filtrados algales

Histograma N° 2



Ref.: c.p.- contenido proteico
T.- testigo
1.- riego
2.- pulverización
3.- riego y pulverización

6- ESTUDIOS ESTADISTICOS

Se ajustó a los datos un modelo de análisis de la varianza de un factor multivariado (11 grupos, 5 variables), Timm (1975). Se comparó luego cada tratamiento con el testigo teniendo en cuenta todas las variables estudiadas. Cuando la diferencia entre un tratamiento y su testigo resultó significativa al 5% se estudió cual o cuales variables provocaban esta diferencia.

6.1-Extractos algales: el cuadro N° 15 consigna el estudio estadístico de los datos comparativos entre el efecto de los extractos algales y el testigo.

Como se observa en el cuadro si se tienen en cuenta las cinco variables estudiadas son significativas las diferencias entre el testigo y todos los extractos probados salvo el extracto acuoso sin diluir.

Para el extracto acuoso directo sin diluir la diferencia se debe especialmente a un aumento del valor de las variables número de semillas germinadas, peso seco y contenido proteico.

En el caso del extracto acuoso directo diluido a la mitad la diferencia se debe a un mayor número de semillas germinadas.

Para los extractos etéreos sin diluir y diluido a la mitad la diferencia se debe a una disminución en la altura promedio de las plantas y a un aumento en el número de semillas germinadas respectivamente.

En el caso del extracto acuoso diluido a la mitad la diferencia se debe fundamentalmente a un aumento en el número de semillas germinadas, en el valor del peso seco y del contenido proteico.

6.2-Filtrados algales: el cuadro N° 16 consigna el estudio estadístico de la imbibición de las semillas en los filtrados algales. La diferencia entre las plantas obtenidas a partir de las semillas y el testigo correspondiente, teniendo en cuenta las 5 variables estudiadas, es significativa; debiéndose fundamentalmente en este caso a un aumento en el número de semillas germinadas.

6.3-Filtrados algales y tratamientos posteriores: el cuadro N° 17 consigna el estudio estadístico de los datos comparativos entre los diferentes tratamientos posteriores a la imbibición. Si se tienen en cuenta las cinco variables estudiadas en todos los casos los tratamientos dan diferencias significativas con el testigo, debidas siempre a efectos sobre el contenido proteico de la parte aérea. En el caso del riego el contenido proteico aumenta, mientras que con la pulverización y con pulverización y riego combinado el valor disminuye.

CUADRO N° 15: Comparación de extractos algales vs. testigo.

TRAT. QUE SE COMPARAN	COMPARACION DE LOS TRAT. TENIENDO EN CUENTA LAS VARIABLES	COMPARACION DE LOS PROMEDIOS DE:				
		N° DE SEMILLAS GERMINADAS	ALTURA DE LA PLANTA	N° DE HOJAS	PESO SECO DE LA PARTE AEREA	
E.A.D. x vs. T.	F(5,66)=3,17 p<0,05	F(1,77)=10,19 p<0,01	F(1,76)=0,30 no sign.	F(1,77)=0,015 no sign.	F(1,76)=4,08 p<0,05	F(1,70)=7,13 p<0,01
E.A.D. 1/2x vs. T	F(5,66)=2,43 p<0,05	F(1,77)=5,73 p<0,05	F(1,76)=1,33 no sign.	F(1,77)=0,03 no sign.	F(1,76)=1,70 no sign.	F(1,70)=1,05 no sign.
E.E.x vs T.	F(5,66)=3,79 p<0,01	F(1,77)=0,28 no sign.	F(1,76)=11,24 p<0,001	F(1,77)=2,50 no sign.	F(1,76)=0,17 no sign.	F(1,70)=3,71 no sign.
E.E.1/2x vs. T.	F(5,66)=2,39 p<0,05	F(1,77)=5,73 p<0,05	F(1,76)=3,26 no sign.	F(1,77)=0,22 no sign.	F(1,76)=1,51 no sign.	F(1,70)=0,43 no sign.
E.A. x vs. T.	F(5,66)=1,95 no sign.			F(1,77)=1,01 no sign.	F(1,76)=0,36 no sign.	F(1,70)=2,46 no sign.
E.A. 1/2x vs. T.	F(5,66)=4,12 p<0,01	F(1,77)=15,92 p<0,001	F(1,76)=0,35 no sign.	F(1,77)=0,45 no sign.	F(1,76)=6,64 p<0,05	F(1,70)=5,49 p<0,05

CUADRO N° 16: Comparación de filtrados algales vs. agua

COMPARACION DE LOS TRAT. TENIENDO EN CUENTA LAS 5 VARIABLES	COMPARACION DE LOS PROMEDIOS DE				CONTENIDO PROTEICO DE LA PARTE AEREA
	N° DE SEMILLAS GERMINADAS	ALTURA DE LA PLANTA	N° DE HOJAS	PESO SECO DE LA PARTE AEREA	
F(5,66)=2,80 p<0,05	F(1,77)=19,87 p<0,001	F(1,76)=0,02 no sign.	F(1,77)=0,51 no sign.	F(1,76)=3,76 no sign.	F(1,70)=0,06 no sign.

CUADRO N° 17: Comparación de los tratamientos posteriores a la imbibición vs. testigo

TRAMIENTOS QUE SE COMPARAN	COMPARACION DE LOS TRAT. TENIENDO EN CUENTA LAS 5 VARIABLES	COMPARACION DE LOS PROMEDIOS DE			CONTENIDO PROTEICO DE LA PARTE AEREA
		ALTURA DE LA PLANTA	N° DE HOJAS	PESO SECO DE LA PARTE AEREA	
RIEGO vs. AGUA	F(4,67)=3,48 p<0,05	F(1,76)=0,01 no sign.	F(1,77)=0,29 no sign.	F(1,76)=0,06 no sign.	F(1,70)=13,65 p<0,001
PULVERIZACION vs. AGUA	F(4,67)=7,08 p<0,001	F(1,76)=0,98 no sign.	F(1,77)=2,14 no sign.	F(1,76)=1,47 no sign.	F(1,70)=27,90 p<0,001
RIEGO + PULVERIZACION vs. AGUA	F(4,67)=6,63 p<0,001	F(1,76)=0,59 no sign.	F(1,77)=0,24 no sign.	F(1,76)=0,06 no sign.	F(1,70)=24,14 p<0,001

Comparación de los mejores tratamientos de cada bloque

(extractos vs. filtrado algal): los mejores tratamientos de cada bloque se eligieron teniendo en cuenta el grado de significación de las diferencias con el testigo. Dentro del bloque de los extractos el tratamiento más efectivo fue el del extracto acuoso diluído a la mitad, mientras que para filtrados algales el más efectivo fue el riego.

E.A. 1/2 x vs Riego

F (5,66)=0,344 no significativo

DISCUSION

En años recientes se ha acumulado suficiente evidencia de que los extractos de algas tanto marinas como de aguas continentales aceleran la germinación de las semillas, mejoran el crecimiento y aumentan la productividad y el contenido proteico de ciertos cultivos. De la misma manera se observaron efectos en plantas tratadas con filtrados algales, pero el número de experiencias realizadas es menor. La importancia de los citados filtrados algales reside en el hecho de que contienen sustancias elaboradas por las algas y liberadas luego al medio ya sea durante su vida o por muerte y lisis de las mismas. Estas sustancias pueden tener actividad biológica promotora o inhibidora y producir efectos en las plantas que comparten el hábitat, existiendo en algunos casos un paso intermedio que depende de la flora del suelo (mineralización).

Cabe señalar de acuerdo a la bibliografía consultada y a los resultados obtenidos en el presente trabajo que los distintos géneros y especies utilizados para la preparación de extractos o de filtrados algales dan resultados diferentes debido al metabolismo, del cual dependen los productos extracelulares propios de cada cepa. De la misma manera es diferente la respuesta de cada una de las plantas vasculares probadas. De ahí, que no se pueden dar pautas generales con respecto a la influencia de diferentes especies algales sobre el crecimiento y desarrollo de vegetales superiores.

La importancia de este tipo de ensayo reside entonces en la posibilidad de obtener una tecnología general basada en numerosísimas experiencias que permitan manejar un parámetro dado en función de una determinada necesidad. Así, en plantas de importancia económica, sería de gran interés obtener un mayor contenido proteico y peso seco, manteniendo un balance nutricional adecuado. De la misma manera puede resultar impor-

tante lograr plantas con un mayor número de hojas (tabaco, té, yerba mate) o con mayor altura del vástago (lino, caña de azúcar) o con una morfología apropiada para un sistema de laboreo dado. Además y con respecto al porcentaje de germinación, un aumento en éste parámetro se traduce en una mayor productividad sin modificación de los costos.

En las condiciones de nuestra experiencia se han alcanzado algunos de éstos objetivos mediante el tratamiento con extractos y filtrados algales de una cepa de *Tolypothrix tenuis* como aumento en el porcentaje de germinación, disminución de la altura de las plantas, aumento en el valor del peso seco y del contenido proteico.

Con respecto a las diferencias observadas para el valor del contenido proteico en el bloque de filtrados algales de acuerdo al tratamiento recibido por la planta podemos señalar:

- 1) cuando el filtrado algal es suministrado a la planta en forma de riego, los principios activos están sujetos a las variaciones del suelo en cuanto a dilución, escurrimiento, evaporación, etc.; una vez absorbidos por la raíz pueden ser transportados por la corriente transpiratoria y llegar a los sitios de acción donde pueden ser modificados o no por el metabolismo celular.
- 2) cuando el filtrado algal es suministrado a la planta por pulverización es muy probable que los principios activos se acumulen y alcancen niveles no fisiológicos por imposibilidad de translocarse o metabolizarse a nivel de la hoja dando como resultado la inhibición del metabolismo proteico. Por otra parte podrían actuar como inhibidores competitivos.

Cabe señalar que los extractos etéreos si bien no producen efecto sobre el número de hojas, peso seco y contenido proteico, en su forma no diluida disminuyen significativamente la altura de la planta, factor éste que podría tener importancia en algunos cultivos. Por otra parte el extracto diluido a la mitad si bien no tiene efecto sobre la mayoría de los parámetros aumenta el por-

centaje de la germinación lo cual podría traducirse en una mayor biomasa.

En nuestra experiencia los mejores resultados se obtuvieron mediante el tratamiento con extracto acuoso diluido a la mitad (mayor porcentaje de germinación, mayor peso seco, y mayor contenido proteico), para el bloque de los extractos algales. Con respecto a los filtrados algales y tratamientos posteriores los mejores resultados se obtuvieron con riego (mayor porcentaje de germinación y mayor contenido proteico). Los estudios estadísticos, analizando las 5 variables en conjunto, indican que no hay diferencias entre los mejores tratamientos de cada bloque. Esto implica que de acuerdo a las circunstancias o a las posibilidades técnicas o a las necesidades se elegirá un tratamiento u otro. Porejemplo en nuestro caso si se desea disponer del cultivo de maíz como forraje se adoptará el tratamiento con extractos algales dado que en este caso se observan entre otros efectos un aumento en el peso seco.

Cabe señalar que en ambos casos el efecto benéfico en el parámetro contenido proteico podría explicarse por un aumento en el metabolismo proteico debido a la probable liberación de sustancias nitrogenadas, entre ellas aminoácidos, por la cepa algal utilizada (*T. tenuis*).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo para maíz son de gran importancia en el caso de esta planta forrajera.

BIBLIOGRAFIA

- Accorinti, J.; Caire, G. Z. de ; Mulé, M. C. Z. de 1974. Sustancias biológicamente activas, en cultivos axénicos de Cyanophyta. Phyton. 32(1): 23-33.
- Agarwal, A. 1979. Blue-green algae to fertilise Indian rice paddies. Nature 279: 181.
- Allen, M.B. 1956. Photosynthetic nitrogen fixation by blue-green algae. Sci. Month. 83(2): 100-106.
- Allen, M.M.; Stanier, R. Y. 1968. Selective isolation of blue-green algae from water and soil. J. Gen. Microbiol. 51: 203-209.
- Allison, F. E.; Morris, H. J. 1930. Nitrogen fixation by blue-green algae. Science 71 (1834): 221-223.
- Allison, F. E.; Hoover, S.R.; Morris, H. J. 1937. Physiological studies with the nitrogen fixing alga Nostoc muscorum. Bot. Gaz. 98: 433-463.
- Augier, H. 1977. Les Hormones des algues. Etat actuel des connaissances. V. Index alphabétique par espèces des travaux de caractérisation des hormones endogines. Bot. Mar. 20 (3): 187-203.
- Bentley, J.A. 1958. Role of plant hormones in algal metabolism and ecology. Nature. 181 (4622): 1499-1502.
- Booth, E. 1966. Some properties of seaweed marines. Int. Seaw. Symp. Proc. 5: 349-357.

- Boyd, C. E. 1973. Biotic interacciones between different species of algae. J. Weed Sci. Soc. Am. 21(1): 32-37
- Caire, G. Z. de; Mulé, C. Z. de; Accorinti, J. 1974. Valoración experimental de sustancias biológicamente activas obtenidas de cultivos de *Aphanothece stagnina* (Sprengel) A. Braun (Cyanophyta). Phyton 32(2):99-105.
- Caire, G. Z. de; Mulé, C. Z. de; Doallo, S.; Halperín, D. R. de; Halperín, L. 1976. Acción de extractos algales acuosos y etéreos de *Nostoc muscorum* Ag. (Nº 79 a) I. Efecto sobre plántulas de mijo (*Panicum miliaceum* L.) mediante tratamiento de sus semillas. Bol. Soc. Arg. Bot. 17(3-4): 289-300.
- Caire, G. Z. de; Mulé, C. Z. de; Cano, M. S. de; 1979. Productos extracelulares de *Nostoc muscorum* Ag. (cepa 79 a) obtenidos en medios con y sin nitrógeno combinado. I: Sus efectos sobre plántulas de arroz. Phyton 37(1): 1-13.
- Cano, M.S. de; Mulé, C. Z. de; Caire, G. Z. de 1979. Efectos de los productos extracelulares de *Aphanothece stagnina* (Sprengel) A. Braun sobre el crecimiento de plántulas de arroz. Phyton 37(1): 15-20.
- Carmichael, W. W.; Gorham, P.R. 1978. Anatoxins from clones of *Anabaena flos-aquae* isolated from lakes of Western Canada Mitt. Internat. Verein. Limnol. 21: 285-295.
- Carmichael, W.W.; Biggs, D.F.; Peterson, M.A. 1972. Pharmacology of anatoxin -a, produced by the fresh water cyanophyta *Anabaena flos-aquae* N R C-44-1 Toxicon 17: 229-236.

- Cheng, K. H.; Miller, A. G.; Colman, B. 1972. An investigation of glycolate excretion in two species of blue-green algae. Planta (Berl) 103: 110-116.
- Dadhich, K.S.; Varma, A.K.; Venkataraman, G. S. 1969. The effect of *Calothrix* inoculation on vegetable crops. Plant and Soil. 31 (2): 377-379.
- De, P. K. 1939. The role of blue-green algae in nitrogen fixation in rice fields. Proc. Roy. Soc. London Sec. B. 127 (846): 121-139.
- Döhler, G.; Braun, F. 1971. Untersuchung der Beziehung zwischen extracellulärer Glykolsäure-Ausscheidung und der photosynthetischen CO₂-Aufnahme bei der Blaualge *Anacystis nidulans*. Planta (Berl.) 98: 357-361.
- Drew, E, A.; Smith, D. C. 1967. Studies in the physiology of lichens. VII The physiology of the *Nostoc symbiont* of *Peltigera polydactyla* compared with cultured and free-living forms. New Phytol. 66: 379-88.
- Fogg, G. E. 1942. Studies on nitrogen fixation by blue-green algae. I. Nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica*. Lemm J. Exp. Biol. 19(1): 79-87.
- Fogg, G. E. 1952. The production of extracellular nitrogenous substances by a blue-green alga. Proc. Roy. Soc. Ser. B 139: 372-397.
- Fogg, G. E. 1956. The comparative physiology and biochemistry of the blue-green algae. Bacteriol. Rev. 20(3): 148-165.

- Fogg, G. E. 1962. Extracellular products: 475-489. In Lewin, R. A. (ed) "Physiology and Biochemistry of algae". Academic Press, New York and London. 929 p,
- Fogg, G. E. 1966. The extracellular products of algae. Oceanogr. Mar. Biol. Am. Rev. 4: 195-212.
- Frank, B. 1889. Ueber den experimentellen Nachweis der Assimilation freien Stickstoff durch erdbodenbewohnende Algen. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 7: 34-42.
- Fritsch, F. E.; De, P.K. 1938. Nitrogen fixation by blue-green algae. Nature 142(3602): 878.
- Gorham, P.R.; Carmichael, W.W. 1979. Phycotoxins from blue-green algae. Pure and Appl. Chem. 52: 165-174.
- Gupta, A. B.; Lata, K. 1964. Effect of algal growth hormones on the germination of paddy seeds. Hydrobiologia 24(1-3): 430-434.
- Gupta, A. B. 1966. Algal flora and its importance in the economy of rice fields. Hydrobiologia 28 (2): 213-222.
- Gupta, A.B.; Shukla, A. C. 1967. Studies on the nature of algal growth promoting substances and their influence on growth, yield and protein contents of rice plants. Labdev J. Sci. Technol., Kampur (India) 5(2): 162-163.
- Gupta, A.B.; Shukla, A. C. 1969. Effect of algal extracts of *Phormidium* species on growth and development of rice seedlings. Hydrobiologia 34(1): 77-84.
- Gupta, A.B.; Gupta, K.K. 1970. The effect of *Phormidium foveolarum* extract on growth and development of pea seedlings. Labdev J. Sci. and Technol., Kampur (India). 8 B (3): 151-154.

- Gupta, A.B.; Kushwaha, A.S. 1970. Studies on the effect of *Phormidium foveolarum* extract on the growth and yield of *Triticum aestivum*. I. The effect of presoaking seeds in ether and water extracts of *P. foveolarum* in pot culture. Labdev J. Sci. and Technol. Kanpur (India) 8:B(2): 105-107.
- Gupta, A. B.; Kushwaha, A. S. 1972. Studies on the effect of *Phormidium foveolarum* extract on the growth and yield of *Triticum aestivum*. II The combined effect of presoaking seeds and spraying with *P. foveolarum* extract on some high yielding varieties of wheat: 387-390. In Desikachary, T.V. (ed)"Taxonomy and biology of blue-green algae". Univ. Madras, Madras, India 591 p.
- Gupta, A.B.; Agarwal, P.R. 1973. Extraction isolation and bioassay of a gibberellin like substance from *Phormidium foveolarum*. Ann. Bot. 37 (152): 737- 741.
- Halperin, D. R. de; Mendoza, M.L.; Caire, G. Z. de 1973. Obtención de cultivos axénicos de algas azules (Cianophyta). Physis Sec. B 32(84): 67-84/ Contrib. Cient. CIBIMA, Bs. As. (65).
- Hellebust, J.A. 1965. Excretion of some organic compounds by marine phytoplankton. Limnol. Oceanogr. 10: 192-200.
- Hellebust, J.A. 1974. Extracellular products: 838-863. In Stewart, W. D. P. (ed.) "Algae physiology and biochemistry". Blackwell Scientific, Publications. Oxford. 989p.
- Henriksson, E. 1958. Studies in the physiology of the lichen *Collema* II A preliminary report on the isolated fungal partner with special regard to its behaviour when growing together with the simbiotic alga. Sv. Bot. Tidskr. 52(3):391-396.

- Henriksson, E. 1960. Studies in the physiology of the lichen *Collema*. III The occurrence of an inhibitory action of the phycobiont on the growth of the mycobiont. Physiol. Plant. 13: 751-754.
- Henriksson, E. 1961. Studies in the physiology of the lichen *Collema*. IV The occurrence of polysaccharides and some vitamins outside the cells of the phycobiont, *Nostoc* sp. Physiol. Plant. 14: 813-817.
- Hood, W.; Leaver, A. G. ; Carr, N. G. 1969. Extracellular nitrogen and the control of arginine biosynthesis in *Anabaena variabilis*. Biochem. J. 114: 12.
- Hough, L.; Jones, J.K.N.; Wadman, W. H. 1952. An investigation of the polysaccharide components of certain fresh-water algae. J. Chem. Soc. 3393-3399.
- Jacq, V.; Roger, P. 1977. Diminution des fontes de semis dues à la sulfato-réduction, par unprétraitement des graines de riz avec des Cyanophyceés. Cah. ORSTOM ser Biol. 12(2): 101-107.
- Jones, A. S. 1960. Determination of nitrogen by Kjeldahl's method: 495-509. In Wilson, C.L.; Wilson, D. W. (ed) "Comprehensive Analytical Chemistry". Vol I B. Elsevier Publ., Co Amsterdam. 878 p.
- Jones, K., Stewart, W. D. P. 1969 a. Nitrogen turnover in marine and brackish habitats. III The production of extracellular nitrogen by *Calothrix scopulorum*. J. Mar. Biol. Ass., U. K. 49: 475-488.
- Jones, K., Stewart, W. D. P. 1969 b. Nitrogen turnover in marine and brackish habitats. IV Uptake of the extracellular products of the nitrogen - fixing alga *Calothrix scopulorum*. J. Mar. Biol. Ass., U. K. 49: 701-716.

- Kushwaha, A. S., Gupta, A. B. 1970 a. Effect of algal growth promoting substances of *Phormidium foveolarum* on seedlings of some varieties of wheat. Hydrobiologia 35(2): 324-332.
- Kushwaha, A. S., Gupta, A.B. 1970 b. Effect of pretreating the seeds with extracts of *Phormidium foveolarum* on growth and development of maize seedlings. Hydrobiologia 35(2): 203-208.
- Lang, C. A. 1958. Simple microdetermination of Kjeldahl nitrogen in biological materials. Anal. Chem. 30 (10): 1692-1694.
- Lange, W. 1976. Speculations on a possible essential function of the gelatinous sheath of blue-green algae. Can. J. Microbiol. 22: 1181-1185.
- Lockhart, C.M.; Rowell, P.; Stewart, W. D. P. 1978. Phytohaemagglutinins from the nitrogen-fixing lichens *Peltigera canina* and *P. polydactyla*. FEMS Microbiol. Letters 3: 127-130.
- Magee, W. E.; Burris, R. H. 1954. Fixation of N₂ and utilization of combined nitrogen by *Nostoc muscorum*. Amer. J. Bot. 41: 777-782.
- Mayland, H.F.; Mc Intosh, T. H.; Fuller, W. H. 1966. Fixation of isotopic nitrogen on a semiarid soil by algal crust organisms. Soil. Sci. Soc. Am. Proc. 30(1): 56-60.
- Meffert, M.E.; Overbeck, J. 1979. Regulation of bacterial growth by algal release products. Arch. Hydrobiol. 87(1): 118-121.

- Meffert, M.E.; Zimmermann-Telschow, H. 1979. Net release of nitrogenous compounds by axenic and bacteria-containing cultures of *Oscillatoria redekii* (Cyanophyta). Arch. Hydrobiol 87(2): 125-138.
- Millbank, J.W. 1974. Associations with blue-green algae: 238-264. In Quispel, A. (ed) "The biology of nitrogen fixation". North-Holland Publ. Co., Amsterdam. Oxford. Am. Elsevier Publ. Co., Inc., New York.
- Mulé, C. Z. de; Caire, G. Z. de; Accorinti, J. 1976. Inductores e inhibidores, intra y extracelulares, en cultivos axénicos de *Aphanothece stagnina* (Cyanophyta). Phyton 34 (2): 185-191.
- Mulé, C. Z. de; Caire, G. Z. de; Doallo, S.; Halperín, D. R. de; Halperín, L. 1977. Acción de extractos algales acuósos y etéreos de *Nostoc muscorum* Ag. (Nº 79a). II Efecto sobre el desarrollo del hongo *Cunninghamaella blakesleana* (-) en el medio Mehlich. Bol. Soc. Arg. Bot. 18(1-2): 121-128.
- Nalewajko, C. 1966. Photosynthesis and excretion in various planktonic algae. Limnol. Oceanogr. XI(1): 1-10.
- Nalewajko, C.; Lean, D. R. S. 1972. Growth and excretion in planktonic algae and bacteria. J. Phycol. 8(4): 361-366.
- Peters, G. A.; Ray, T.B.; Mayne, B. C.; Toia, Jr. R.E. 1980. *Azolla-Anabaena* Association Morphological and Physiological Studies: 293-309. In W. E. Newton and W. H. Orme-Johnson (ed). "Nitrogen Fixation" Vol. II. University Park Press Baltimore.

- Pintner, I. J.; Altmeyer, L.V. 1979. Vitamin B₁₂-binder and other algal inhibitors. J. Phycol. 15:391-398.
- Richardson, D. H. S.; Smith, D.C.; Lewis, D. H. 1967. Carbohydrate movement between the symbionts of lichens. Nature (London) 214: 879-882.
- Richardson, D. H. S.; Jackson Hill, D.; Smith, D.C. 1968. Lichen physiology. XI The role of the alga in determining the pattern of carbohydrate movement between lichen symbionts. New Phytol. 67: 469-486.
- Shukla, A.C.; Gupta, A. B. 1967. Influence of algal growth promoting substances on growth, yield and protein content of rice plants. Nature 213: 744.
- Singh, R.N. 1961. Role of blue-green algae in nitrogen economy of Indian Agriculture. Indian Council. Agric. Research. New Delhi, 175 p.
- Sing, V. P.; Trehan, K. 1973 a. Extracellular protein amino acids of blue-green algae. I The production of extracellular aminoacids by *Aulosira fertilissima* and *Anacystis nidulans*. Phykos 12 (1/2): 3641.
- Singh, V.P.; Trehan, K. 1973 b. Extracellular protein amino acids of blue-green algae. II Effect of nitrate and amino acids on the liberation of amino acids by *Aulosira fertilissima*. Phykos 12(1/2):42-47
- Sing, V P.; Trehan, K. 1973 c. Effect of extracellular products of *Aulosira fertilissima* on the growth of rice seedlings. Plant and Soil 38: 457-464.
- Stadelman, E.J. 1969. Permeability of the plant cell. Ann. Rev. Pl. Physiol. 20: 585-606

- Stanier, R. J.; Cohen-Bazire, G. 1977. Phototrophic prokaryotes: the Cyanobacteria. Ann. Rev. Microbiol. 31: 225-275.
- Stephenson, W. A. 1958. Seaweed in agriculture and horticulture. London. Faber and Faber. 231 p.
- Stewart, W. D. P. 1963. Liberation of extracellular nitrogen by two nitrogen-fixing blue-green algae. Nature 200 (4910): 1020-1021.
- Stewart, W. D. P. 1964. Nitrogen fixation by Myxophyceae from marine environments. J. Gen Microbiol. 36: 415-422.
- Stewart, W. D. P. 1967. Nitrogen-fixing plants. Science 158(3807): 1426-1432.
- Stewart, W. D. P. 1977. A botanical ramble among the blue-green algae. Br. Phycol. J. 12: 89:115.
- Sundara Rao, W. V. B.; Goyal, S. K.; Venkataraman, G.S. 1963. Effect of inoculations of *Aulosira fertilissima* on rice plants. Curr. Sci 32: 366-367.
- Taha, E.E.M.; El Refai, A. E. H. 1962. Physiological and biochemical studies on nitrogen fixing blue-green algae. I. On the nature of cellular and extracellular nitrogenous substances formed by *Nostoc commune*. Arch. Mikrobiol. 41: 307-312.
- Talley, S.N.; Rains, D.W. 1980. *Azolla* as a nitrogen source for temperate rice: 311-320. In Newton, W. E. and W. H. Orme-Johnson. (ed). Nitrogen fixation vol II Sec.III: Cyanobacteria and their associations. Univ. Park. Press. Baltimore.

- Timm, N. H. 1975. Multivariate analysis with applications in education and psychology. Brooks. Cole Publ.Co. California
- Ukai, Y.; Fujita, Y.; Morimura, Y.; Watanabe, A. 1958. Studies on growth of blue green alga *Tolypothrix tenuis*. J. Gen. Appl. Microbiol. 4(3): 163-169.
- Van den Berg, C. M. G; Wong, P.T.S.; Chau, Y. K. 1979. Measurement of complexing materials excreted from algae and their ability to ameliorate copper toxicity. J. Fish. Res. Board. Can. 36: 901-905.
- Varma, A. K.; Mitra, A.K.; Venkataraman, G.S. 1964. Role of *Aulosira fertilissima* in the nitrogen economy of the soils. Phykos 3(1-2): 29-32.
- Venkataraman, G. S. 1961. A method of preserving blue green-algae for seedling purposes. J. Gen. Appl. Microbiol. 7(2): 96-99.
- Venkataraman, G. S. 1962. Studies on nitrogen fixation by blue-green algae.III Nitrogen fixation by *Anabaena azollae*. Indian J. Agric. Sci. 32(1): 22-24.
- Venkataraman, G. S.; Jacob, K. M.; Goyal , S.K. 1964. Nitrogen fixation by the endophytic alga from the coralloid roots of *Cycas revoluta*. Proc. Nat. Acad. Sci.,India 34 Sect. B. Part. II: 153-159
- Venkataraman, G. S. 1966. Algalization. Phykos 5(1-2): 164-174.
- Venkataraman, G. S.; Neelakantan, S. 1967. Effect of the cellular constituents of the nitrogen fixing blue-green alga, *Cylindrospermum musciola*, on the root growth of rice plants. J.Gen. Appl. Microbiol 13: 53-61.

- Venkataraman, G. S. 1969. The cultivation of algae. Ind. Counc. of Agricultural Research, New Dehli. 319p.
- Venkataraman, G. S. 1977 a. Blue-green algae. A biofertilizer for rice. Indian Agric. Res. Inst. New Delhi 110012. India 8p.
- Venkataraman, G. S. 1977 b. Blue-green algae as a biological nitrogen input in rice cultivation. Proc. Nat. Symp. "Nitrogen Assimilation and Crop Productivity". :132-141
- Walsby, A. E. 1968. Mucilage secretion and the movement of blue-green algae. Protoplasma 65: 223-238.
- Watanabe, A. 1951. Production in cultural solution of some amino acids by the atmospheric nitrogen-fixing blue green algae. Arch. Biom. Biophys. 34(1): 50-55.
- Watanabe, A. 1956. On the effect of the atmospheric nitrogen fixing blue-green algae on the yield of rice. Bot. Mag. (Tokyo) 69(820-821): 530-536.
- Watanabe, A. 1959. Distribution of nitrogen fixing blue-green algae in various areas of south and east Asia. J. Gen. Appl. Microbiol. 5(1-2): 21-29.
- Watanabe, A. 1959 a. On the mass-culturing of a nitrogen-fixing blue-green alga, *Tolypothrix tenuis*. J. Gen. Appl. Microbiol. 5(1-2): 85-91.
- Watanabe, A. 1959 b. Some devices for preserving blue-green algae in viable state. J. Gen. Appl. Microbiol 5(3): 153-157.

- Watanabe, A. 1960. Collection and cultivation of nitrogen-fixing blue-green algae and their effect on the growth and crop yield of rice plants. Proc. Symp. Algal. Ind. Coun. Agric. Res. and Unesco. (New Delhi), 1959. 162-166.
- Watanabe, A. 1962. Effecto of nitrogen-fixing blue-green alga: *Tolypothrix tenuis* on the nitrogenous fertility of paddy soil and on the crop yield of rice plant. J. Gen. Appl. Microbiol. 8(2): 85-91.
- Watanabe, A. 1973. On the inoculation of paddy fields in the Pacific area with nitrogen-fixing blue-green algae. Soil. Biol. Biochem. 5:161-162.
- Watanabe, A. 1975 a. Nitrogen fixation by algae; 255-272. In Tokida, J.; Hirose, H. (ed) "Advances of Phycology in Japan." W. Junk Publ. The Hague. 355 p.
- Watanabe, A. 1975 b. Nitrogen-fixing blue-green algae used as green manure ; 3-7. In Takahachi, H. (ed). "Nitrogen fixation and nitrogen cycle". JIBP Synthesis 12 Univ. Tokyo Press.
- Watanabe, A.; Nishigaki, S.; Konishi, C. 1951. Effect of nitrogen-fixing blue-green algae on the growth of rice plants. Nature 168 (4278): 748-749.
- Watanabe, A.; Kiyohora, T. 1960 b. Decomposition of blue-green algae as effected by the action of soil bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. 5(4): 175-179.
- Watanabe, Iwao,; Kuk-ki, L.; Guzmán, M. 1978. Seasonal change of N_2 fixing rate in rice field assayed by in situ acetylene reduction technique. 2: Estimate of nitrogen fixation associated with rice plants. Soil Sci. Plant. Nutr. 24(4): 465-471.

- Werner, E. A. 1933. A simple and rapid procedure for the purification of ether and acetone. Analyst 58: 335-337.
- Whitton, B. A. 1965. Extracellular products of blue-green algae. J. Gen. Microbiol. 40(1):1-11
- Whitton, B. A. 1973. Interactions with other organisms: 415-433. In Carr, N. G. and B. A. Whitton (ed) "The biology of blue-green algae. Blackwell Sci.Publi., Oxford.
- Wolk, C. P. 1973. Physiology and citological chemistry of blue-green algae. Bacteriol. Rev. 37(1): 32-101.
- Wolk, C. P. 1980. Heterocysts, ^{13}N , and N_2 -fixing plants: 279-292. In Newton, W. E. and W. H. Orme-Johnson (ed) "Nitrogen Fixation. Vol II. Sect. III: Cyanobacteria and their associations. University Park Press, Baltimore.

Robert P. de laet

J. P. Wolk