

---

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



La Relación Entre la Actividad de  $\text{Cu}^{2+}$  y la Toxicidad  
en *Thalassiosira pseudonana*.

TESIS

que para obtener el título de:

**OCEANOLOGO**

presenta:

*R. Yadira Castro Peñuelas.*

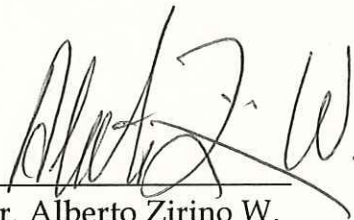


LA RELACION ENTRE LA ACTIVIDAD DE  $\text{Cu}^{2+}$  Y LA TOXICIDAD  
en *Thalassiosira pseudonana*.

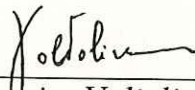
Tesis que presenta:

*Rosario Yadira Castro Peñuelas .*

Aprobada por:



Dr. Alberto Zirino W.  
(Presidente del jurado.)



Dr. Domenico Voltolina L.  
(Sinodal)



M.C. Raúl Canino H.  
(Sinodal)

---

*A mis padres:*

*con todo mi amor y respeto.*

|

---

## Agradecimientos.

### *A mi director de tesis:*

*Dr. Alberto Zirino W., por haber confiado en mí para realizar este trabajo y por toda su ayuda y comprensión.*

### *A mis sinodales:*

*Dr. Domenico Voltolina L. y M.C. Raúl Canino Herrera por sus atinados comentarios y apoyo en la realización de este trabajo.*

*Al CICESE por haberme proporcionado el material y equipo necesario para el desarrollo de este trabajo y a la M.C. Lurdes Trujillo por todas sus enseñanzas.*

*A mis amigos M.C. Martín Fernández y M.C. Lorena Ríos por su paciencia, apoyo, enseñanzas y sobre todo por haberme brindado su amistad.*

*A Bily, Lalo, Charly, Miriam y a todos los "cuadernos"...por que de una forma u otra, siempre estuvieron conmigo en las buenas y en las malas.*

*Y se me olvidaba... Gracias Roberto por haberme aguantado todo este tiempo.*

# Índice.

<i>Resumen</i> .....	1
<i>1.0-Introducción</i> .....	2
<i>2.0-Objetivo</i> .....	6
<i>2.1.-Objetivos particulares</i> .....	6
<i>3.0-Metodología</i> .....	7
<i>3.1.-Preparación, axenización y aclimatación de los medios de cultivo</i> .....	7
<i>3.2.-Limpieza y calibración del electrodo de ionselectivo.</i> .....	9
<i>3.3.-Pruebas de toxicidad para <i>Thalassiosira pseudonana</i></i> .....	12
<i>4.0-Resultados</i> .....	16
<i>5.0-Discusiones</i> .....	29
<i>6.0-Conclusiones</i> .....	35
<i>7.0-Bibliografía</i> .....	36
<i>8.0-Anexos</i> .....	40

## Indice de tablas.

<i>Tabla I.- Composición del agua de mar enriquecida con el medio f/2 .....</i>	<i>8</i>
<i>Tabla II.- Concentraciones utilizadas en los medios de cultivo y su pCu calculado con el programa MICROQL .....</i>	<i>10</i>
<i>Tabla III.- Constantes de formación utilizadas en el programa MICROQL .....</i>	<i>11</i>
<i>Tabla IV.- Concentraciones totales de los componentes utilizados en el programa MICROQL para obtener el pCu calculado .....</i>	<i>20</i>
<i>Tabla V.- Constantes de equilibrio de las diferentes especies utilizadas en el programa para calcular el pCu. ....</i>	<i>20</i>
<i>Tabla VI.- Parámetros y resultados obtenidos durante los experimentos con Thalassiosira pseudonana ..</i>	<i>22</i>

## Indice de figuras

- Figura 1.- *Curva de crecimiento control de Thalassiosira pseudonana para cada uno de los quelantes ....* 17
- Figura 2.- *Curva típica generada durante la calibración del electrodo de Ion Selectivo .....* 19
- Figura 3.- *Comparación entre los resultados de pCu calculados con MICROQL y medidos con electrodo de Ion Selectivo .....* 19
- Figura 4.- *Cultivo de Thalassiosira pseudonana tratado con CDTA. ....* 24
- Figura 5.- *Cultivo de Thalassiosira pseudonana tratado con EDTA .....* 24
- Figura 6.- *Cultivo de Thalassiosira pseudonana tratado con glicina .....* 26
- Figura 7.- *Cultivo de Thalassiosira pseudonana tratado con NTA .....* 26
- Figura 8.- *Cultivo de Thalassiosira pseudonana tratado con etilendiamina . ....* 27

---

*Figura 9.- Experimento con Thalassiosira pseudonana que muestra los cinco quelantes conservando estable la concentración ( $1 \times 10^{-4} M$ )..... 27*

---

## Indice de Anexos

<i>Anexo I.- Curva de crecimiento generada por Sunda y Guillard(1976) .....</i>	<i>41</i>
<i>Anexo II.- Programa MICROQL .....</i>	<i>43</i>
<i>Anexo III.- Resultados de las pruebas estadísticas .....</i>	<i>48</i>
<i>Anexo IV.- Curvas de crecimiento para Thalassiosira pseudonana generadas durante la fase de aclimatación .....</i>	<i>50</i>

## *Resumen.*

Se realizó un experimento con mediciones directas de pCu (electrodo de ion selectivo) adicionados con cinco concentraciones de diferentes agentes quelantes (EDTA, NTA, CDTA, etilendiamina y glicina) para probar que la concentración de cobre total ( $2 \times 10^{-5} \text{M}$ ) no es la que influye en la toxicidad para los organismos. Se encontró que la concentración total se encuentra fuertemente influenciada por la actividad del ion libre de Cobre<sup>2+</sup> debido a la complejación químico-orgánica del metal con el ligando. La concentración del quelante también influye en los cambios de dicha actividad: a mayores concentraciones del quelante corresponde una mayor actividad iónica que se refleja en un mayor porcentaje de sobrevivencia. Se determinó que la capacidad de complejación del quelante actúa sobre la actividad iónica, siendo el CDTA ( $1 \times 10^{-4} \text{M}$ ), el que presentó la más alta capacidad de complejación (pCu = 13.59, 100% de sobrevivencia) y la glicina, que a la misma concentración, presentó una capacidad menor (pCu = 9, 0% de sobrevivencia). El uso del Electrodo de Ion Selectivo proporciona datos reales en la medición de dicha actividad sobre la concentración de la forma iónica del metal en un medio determinado.

## 1.- Introducción:

El efecto de los metales traza y de su quelación por sustancias orgánicas de origen natural o por sus homólogos, ha sido objeto de estudios, desde hace algunos años, pero no ha sido acompañado por un estudio paralelo sobre la especiación química de los metales y el estado en que éstos se encuentran presentes en el medio. Este acercamiento, que es importante en estudios analíticos y geoquímicos, puede tener aplicación en estudios relacionados con toxicidad.

La formación de complejos es importante desde diferentes puntos de vista, en la química de aguas naturales y residuales. Los complejos modifican las especies metálicas en solución, por lo general reduciendo la concentración de los iones metálicos libres de modo que se alteran los efectos y propiedades que dependen de esta concentración. Estos efectos incluyen aspectos como la modificación de la solubilidad, la toxicidad y posiblemente las propiedades bioestimuladoras de los metales y la adsorción de los metales en solución.

Varios estudios sobre la importancia de la complejación producida por ligandos biológicos y sus efectos en la especiación del cobre y su toxicidad para las algas en ambientes naturales, han demostrado efectos benéficos concerniente a la productividad cuando se adicionan quelantes artificiales a los medios de cultivo de fitoplancton (Barber, 1973; Bin Xue y Sigg, 1990 ). Algunas estrategias biológicas para resistir a la toxicidad por metales implican un mecanismo de complejación de los metales produciendo ligandos ya sea fuera de la célula o en la superficie de la misma (Folsom *et al.*, 1986). Por ejemplo, un quelante polipeptídico

extracelular producido por *Anabaena cylindrica* la protege de la toxicidad del cobre (Fogg y Westlake, 1955) y se han demostrado efectos similares con otros exudados de microalgas bentónicas.

Los agentes complejantes son importantes para reducir la toxicidad del cobre en los medios de cultivo (Manahan y Smith, 1973; Fitzgerald y Faust, 1963) mediante el control de la actividad del ion de cobre.

Las observaciones con tres especies fitoplanctónicas en condiciones de laboratorio llevadas a cabo por Sunda y Guillard (1976) y Anderson y Morel (1978), demostraron que la toxicidad por cobre se encuentra únicamente determinada por la actividad del ion. Bin- Xue y Sigg (1990), al utilizar NTA en los medios de cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii*, demostraron que la toxicidad de cobre no depende de la concentración total, sino de la actividad del ion libre.

La capacidad de complejación del cobre y las constantes de complejación en los medios para el cultivo de fitoplancton pueden ser medidas después de la adición de altas concentraciones de cobre, usando diferentes técnicas, tales como columnas de intercambio catiónico (Stolzberg y Robin, 1977), titulación potenciométrica con un electrodo de ion selectivo (Swallow *et al.*, 1978; McKnight y Morel, 1978; Belli y Zirino, 1992) y un intercambio iónico con  $MnO_2$  (Sueur *et al.*, 1982), voltametría de pulso diferencial de desnudamiento anódico (Fisher y Fabris, 1982; Seritti *et al.*,

1986), aislamiento por una columna de extracción Sec Pak C18 y determinación por cobre orgánico (Zhou y Wangersky, 1985, 1989).

Concentraciones de cobre tan bajas como 1 ppb pueden ser tóxicas para varias especies fitoplanctónicas (Stemann Nielsen y Kamp-Nielsen, 1970; Mandelli, 1969; Erickson, 1972; Martin y Olander, 1971). El cobre es tóxico para la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* en concentraciones que exceden de 2 mM en ausencia de quelantes, pero no es tóxico para la misma microalga en concentraciones de 5mM cuando es complejado con EDTA (Spencer, 1957). La quelación de cobre por nitriloacetato o citrato también reduce la toxicidad para las algas (Erickson *et al.*, 1970; Steemann Nielsen y Kamp-Nielsen, 1970). Gráficas de inhibición de crecimiento en *Thalassiosira pseudonana* contra la concentración del cobre en un medio que contiene EDTA o histidina, nos muestran una tendencia parecida a las curvas de titulación potenciométrica, ya que la inflexión de la curva ocurre en el punto donde la concentración de cobre excede a la del quelante (Davey *et al.*, 1973).

Todos estos experimentos evidencian que la toxicidad del cobre para las algas está relacionada con los cambios en la actividad del ion libre de este metal y no directamente con su concentración total; por otra parte, en ninguno de estos estudios la actividad del ion de cobre fue medida directamente en el medio de cultivo, sino que fue calculada. En este trabajo se medirá la actividad del ion utilizando un electrodo de ion selectivo, se comparará con la calculada y con los resultados reportados en un trabajo clásico (Sunda y Guillard, 1976) sobre la relación entre la toxicidad del

---

cobre y su actividad, empleando el mismo organismo utilizado en ese estudio.

Este tipo de experimento permite determinar el grado de toxicidad presentado por la actividad del ion de cobre y como es transformada debido a la complejación químico-orgánica, permitiendo reducir la toxicidad para un organismo determinado; además el uso del electrodo de ion selectivo nos permite realizar mediciones directas y rápidas durante la experimentación.

## 2.- Objetivo.

Demostrar que la toxicidad de cobre en *Thalassiosira pseudonana* es una función de la actividad del ion libre medida directamente con un electrodo de ion selectivo en el medio de cultivo. Para ello se utilizan: NTA, EDTA, CDTA, glicina y etilendiamina como agentes quelantes a diferentes concentraciones y se mantendrán constantes el pH (8.4) y la concentración total de cobre ( $2 \times 10^{-5} \text{M}$ ).

### 2.1.- Objetivos Particulares:

- \* Evaluar la toxicidad para *Thalassiosira pseudonana* a diferentes concentraciones de cinco agentes quelantes y demostrar que la adición de agentes quelantes reducen la concentración del ion de Cu libre modificando la toxicidad.
- \* Comparar la capacidad de quelación de los diferentes agentes quelantes.

Modelar los efectos de quelación y compararlos con los experimentales.

### 3.- Metodología .

El experimento constó de tres partes: En la primera etapa se llevó a cabo la axenización, tratamiento y aclimatación a los medios de cultivo de *Thalassiosira pseudonana*. La segunda etapa consistió en la limpieza y calibración del electrodo de ion selectivo y el cálculo de las concentraciones de los quelantes y el rango de pCu utilizados en el experimento por medio del programa MICROQL. Durante la tercera etapa del experimento se realizaron las prueba de toxicidad con los cultivos de *Thalassiosira pseudonana* y las mediciones directas del pCu dentro de los mismos con el electrodo de ion específico. A continuación se describen cada una de las fases del experimento:

#### 3.1.- Preparación, axenización y aclimatación de los medios de cultivo para *Thalassiosira pseudonana*.

Para axenizar los cultivos, se realizaron baños con antibióticos de la cepa experimental, de la siguiente manera:

- A 10 ml de cultivo se aplicó ultrasonido durante medio minuto para separar las bacterias de la pared celular, posteriormente se centrifugaron por 5 min. a 3000 RPM, separándose el sobrenadante; las microalgas se resuspendieron en medio f/2 con las siguientes concentraciones de antibióticos: 10 mg/l de estreptomicina durante 8 hrs. con una aplicación

posterior de 50 mg/l de penicilina por 12 hrs. alternadamente, con 24 hrs. de descanso después de cada baño. Para probar la efectividad de los baños se realizaron pruebas con bactopectona preparada con 1 g/l de agua de mar al 75% en tubos de ensaye con tapón de rosca de 20 ml, con nueve mililitros de agua peptonada y un mililitro del cultivo que se incubaron a 30°C y se revisaron durante tres días. Los baños se suspendieron cuando las pruebas resultaron negativas al crecimiento bacteriano.

Para el cultivo de la microalga se utilizó medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962) (tabla 1), preparado con agua de mar filtrada a través de filtros de membrana con diámetro de poro de 0.2 µm. Los cultivos se prepararon en matraces Erlenmeyer de 250 ml, previamente enjuagados con HNO<sub>3</sub> al 15% para minimizar la contaminación por metales. Se esterilizaron en autoclave por 15 min. a 15 psi. La iluminación se proporcionó por medio de luz fluorescente (Sylvania Co., Cool White). Los cultivos experimentales fueron inoculados con cultivos axénicos en crecimiento exponencial en medio f/2, preparado sin cobre y en recipientes libres del mismo.

Tabla I.- Composición del agua de mar enriquecida con el medio f/2

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN	COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
<b>Nutrientes mayores</b>		<b>Vitaminas</b>	
NaNO <sub>3</sub>	888 µ M	Tiamina	0.1 g/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	36.3 µ M	Biotina	0.5 mg/l
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> . 9H <sub>2</sub> O	100 µ M	B <sub>12</sub>	0.5 mg/l
<b>Metales traza</b>		<b>Metales traza</b>	
FeCl <sub>3</sub>	1.0 µ M	CoCl . 6H <sub>2</sub> O	0.05 µM
CuSO <sub>4</sub>	0.04 µ M	MnCl .4H <sub>2</sub> O	0.9 µ M

La aclimatación, de los cultivos de *Thalassiosira pseudonana*, consistió en añadir la mínima y máxima concentración de cada uno de los quelantes en los medios de cultivo. Esto se realizó para determinar si los quelantes eran tóxicos por sí mismos. Además se utilizó un cultivo de referencia sin quelante, para determinar la toxicidad del cobre en la concentración utilizada en el experimento.

### 3.2.- Limpieza y calibración del electrodo de ion selectivo.

Para esta etapa se utilizó un potenciómetro Orion (92-13), equipado con un electrodo de ion selectivo y uno de referencia. El electrodo de ion selectivo se limpió con una mezcla de diamante y se lijó hasta obtener una superficie totalmente brillante.

Se procedió después a su calibración utilizando para ello una titulación con gotas de hidróxido de sodio (NaOH) y ácido clorhídrico (HCl) a una solución de agua de mar artificial con un amortiguador de etilendiamina-Cu y glicina-Cu (Belli y Zirino, 1992) llevándola desde un pH=5 hasta un pH=8 y viceversa para determinar la reversibilidad del electrodo. Con los resultados de la titulación y el pCu calculado, con el programa MICROQL, se determinó la pendiente de la recta, cuando los resultados mostraron una pendiente de 27.5, se consideró la calibración como correcta (Belli y Zirino, 1992).

Las concentraciones adecuadas de los quelantes para los cultivos, al igual que su grado de complejación con el cobre se calcularon con el

programa MICROQL (tabla 2) (Westall, 1986). La concentración se determinaba de acuerdo al resultado de pCu calculado por el programa, que debía estar dentro del intervalo de pCu (9–13.5) determinado por Sunda y Guillard (1976) para el crecimiento de *Thalassiosira pseudonana*.

**Tabla II.-** Concentración de quelante a utilizar en los medios de cultivo y su pCu calculado con el programa MICROQL.

QUELANTE	[ M ]	pCu	QUELANTE	[ M ]	pCu
EDTA	$2.00 \times 10^{-5}$	9.31	GLICINA	$1.10 \times 10^{-3}$	11.50
	$2.10 \times 10^{-5}$	10.68		$3.80 \times 10^{-3}$	12.80
	$2.70 \times 10^{-5}$	11.54		$7.00 \times 10^{-3}$	13.51
	$1.00 \times 10^{-4}$	12.59	CDTA	$2.00 \times 10^{-5}$	9.80
	$0.70 \times 10^{-3}$	13.55		$2.01 \times 10^{-5}$	10.69
ETILENDIAMINA	$4.00 \times 10^{-5}$	9.10	$2.08 \times 10^{-5}$	11.53	
	$4.40 \times 10^{-5}$	10.47	$3.40 \times 10^{-5}$	12.83	
	$5.40 \times 10^{-5}$	11.50	$1.00 \times 10^{-4}$	13.59	
	$1.00 \times 10^{-4}$	12.80	NTA	$2.4 \times 10^{-5}$	9.09
$1.80 \times 10^{-4}$	13.55	$1.00 \times 10^{-4}$		10.39	
GLICINA	$1.00 \times 10^{-4}$	9.11		$1.00 \times 10^{-3}$	11.51
	$3.50 \times 10^{-4}$	10.47	$7.10 \times 10^{-3}$	12.81	
			$9.90 \times 10^{-3}$	13.51	

El programa MICROQL (ver anexo) es un programa escrito en BASIC para calcular las especies químicas en solución y su interacción con la fase acuosa. En este trabajo se representó un modelo de agua de mar con

especies solubles en equilibrio con la atmósfera a 350 ppm de CO<sub>2</sub>, para simular la especiación del cobre con diferentes quelantes. Para definir el problema en el programa se utilizaron 16 componentes y 66 especies, solubles en agua de mar con sus concentraciones totales y el logaritmo de la concentración libre estimada, al igual que sus constantes de estabilidad, que son consideradas como constantes termodinámicas corregidas a una fuerza iónica similar a la del agua de mar (I=0.7) utilizando la ecuación de DeBye-Hückle corregida; se realizó una matriz con la estequiometría de las especies en términos de los componentes. Como resultados, el programa presenta una tabla con las especies mostrando el nombre, el logaritmo de la concentración libre, la concentración libre, la concentración total y el remanente en el balance de ecuaciones. Las constantes fueron tomadas de Martell y Smith (1974). Se consideran los complejos que forma el cobre con cada uno de los quelantes y con el TRIS, además de los hidroxicomplejos CuOH<sup>+</sup>, Cu(OH)<sub>2</sub> y CuOH<sub>4</sub> (tabla 3).

TABLA III.- Constantes de formación utilizadas en el programa MICROQL.

\*L = quelante.

	Glicina		EDTA		Etilendiamina		CDTA		NTA	
H	HL	9.78	HL	11.12	HL	9.93	HL	13.28	HL	10.33
	H <sub>2</sub> L	12.13	H <sub>2</sub> L	16.80	H <sub>2</sub> L	16.78	H <sub>2</sub> L	20.00	H <sub>2</sub> L	13.27
Mg <sup>2+</sup>	MgL	2.70	MgL	10.60	MgL	0.40	MgL	12.80	MgL	6.50
Cu <sup>2+</sup>	CuL	8.60	CuL	20.50	CuL	10.50	CuL	23.70	CuL	14.20
	CuL <sub>2</sub>	15.60	CuHL	23.90	CuL <sub>2</sub>	19.60	CuHL	27.30	CuL <sub>2</sub>	18.10

### 3.3.- Pruebas de Toxicidad para los cultivos de *Thalassiosira pseudonana*.

Las pruebas de toxicidad en los cultivos se realizaron por triplicado con mediciones cada 24 hrs. durante 6 días, que es el tiempo necesario para que un cultivo de *Thalassiosira pseudonana* alcance la fase estacionaria de crecimiento (Trujillo-Valle, 1993). Se utilizó un cultivo normal de *Thalassiosira pseudonana* como referencia y un cultivo sin quelantes con la concentración de cobre utilizada para el experimento ( $2 \times 10^{-5} \text{M}$ ).

La concentración total de cobre se mantuvo constante ( $2 \times 10^{-5} \text{M}$ ) en todos los cultivos, se variaron las concentraciones de los quelantes, para registrar los cambios en la actividad del ion (pCu) que fue el parámetro de principal importancia al igual que el porcentaje de sobrevivencia de la microalga. El intervalo necesario para el experimento se encontró entre 9-13.5, con base en lo reportado por Sunda y Guillard (1976) como intervalo de pCu para la sobrevivencia de *Thalassiosira pseudonana*.

El pH se controló con 10 mM/l de TRIS (trishidroximetilaminometano) para mantenerlo constante (8.4). El TRIS no interfirió en el experimento, debido a que se contempló como parte del medio en el programa utilizado para calcular el intervalo de pCu y la concentración de los quelantes utilizados.

Todos los compuestos químicos utilizados en la preparación de los medios de cultivo para este experimento fueron de grado reactivo.

La concentración de células fue medida, por triplicado, cada 24 hrs. por conteo en un hematocitómetro con rejilla de Neubauer de 0.1 mm de profundidad.

Las tasas específicas de crecimiento de los cultivos, fueron determinados por la ecuación logística (Guillard, 1973):

$$N_{t_1} = N_{t_0} e^{\mu t}, \text{ donde:}$$

$N_{t_1}$  = # de células al tiempo  $t_1$ .

$N_{t_0}$  = # de células al tiempo  $t_0$ .

$\mu$  = Tasa de crecimiento.

$t$  = Intervalo de tiempo entre observaciones =  $t_1 - t_0$ .

Además, al tiempo del muestreo, se tomaron mediciones de la actividad de cobre libre (pCu) con el electrodo de ion selectivo, después de un período de estabilización de media hora. Para determinar la confiabilidad de los datos obtenidos en el experimento se realizaron calibraciones diarias antes de empezar con el experimento y en los períodos entre mediciones el electrodo se dejaba en una solución sobresaturada de etilendiamina, para limpiarlo de cualquier impureza que hubiera quedado durante el día.

Las muestra que se tomaron para medir el potencial y realizar el conteo se realizaron asépticamente, esterilizando el área de trabajo con alcohol y toda la vidriería con dos mecheros, para evitar la contaminación bacteriana y mantener los cultivos axénicos.

El pCu, que es el parámetro de primordial importancia en los medios de cultivo, se define como el logaritmo negativo de la actividad del ion de cobre.

Para medir el potencial se utilizó un electrodo de ion selectivo (Orion 94-29) y un electrodo de referencia (Orion 90-02), calibrado con agua de mar artificial conectado a flujo continuo. Se calculó el pCu teórico para este medio. La relación entre el potencial medido con el pCu calculado se realizó siguiendo la ecuación de Nernst:

$$E = E^0 - 0.0275(pCu) \text{ en el rango de pCu } 9-13.$$

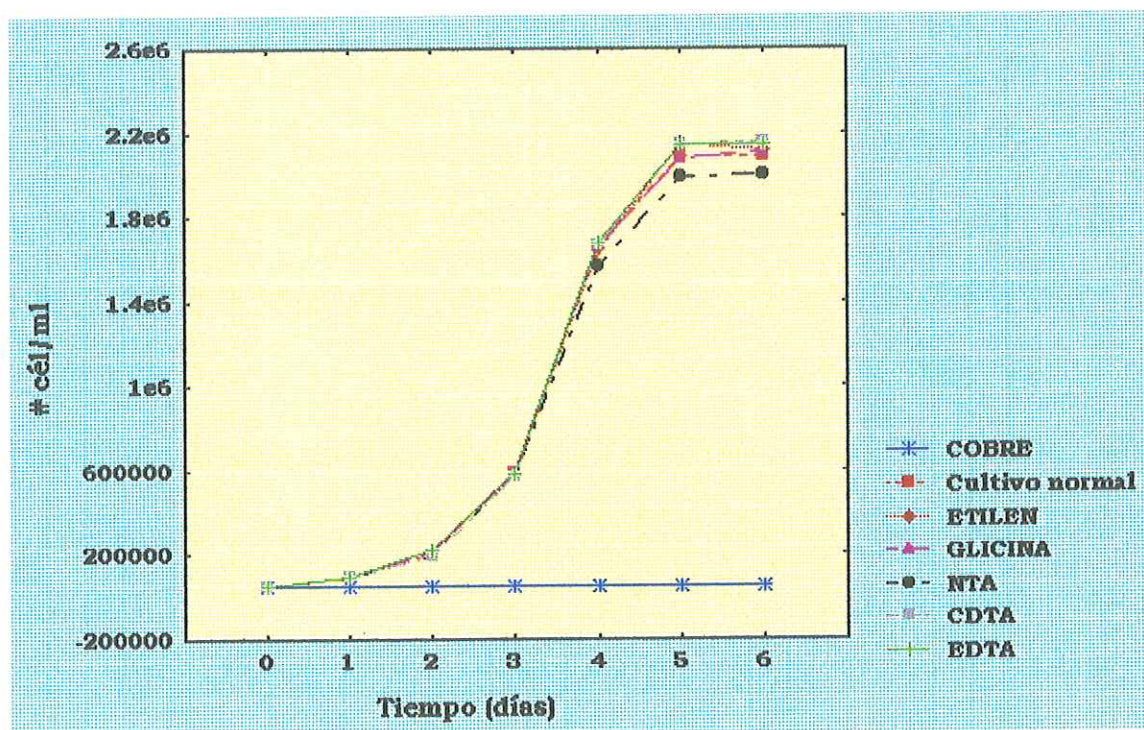
Para analizar los resultados obtenidos se tomó un cultivo normal de *Thalassiosira pseudonana* como referencia para determinar el porcentaje de sobrevivencia en los cultivos con los quelantes y el cobre y se realizó una comparación entre los resultados calculados y los medidos directamente dentro del cultivo. El porcentaje de sobrevivencia medido fue obtenido tomando como 100% el número de células/ml contadas al sexto día de iniciado un cultivo normal de *Thalassiosira pseudonana*. El porcentaje de sobrevivencia calculado tomado como referencia para determinar el porcentaje de sobrevivencia en el experimento, al igual que el rango de pCu óptimo para el crecimiento de *Thalassiosira pseudonana*, están basados en los resultados presentados por Sunda y Guillard (1976). El porcentaje de sobrevivencia calculado se determinó a partir de la relación presentada por los mismos autores entre las divisiones de la célula por día y el número de células presentes en los cultivos .

Para identificar las diferencias significativas de los resultados, se realizaron pruebas de análisis de varianza por medio de ANOVAS.

## 4.- RESULTADOS.

Durante la primera etapa del experimento, de una duración aproximada de una semana, se realizó la axenización de los cultivos. Con esta cepa se inocularon los cultivos para la aclimatación de *Thalassiosira pseudonana* a los quelantes y a la concentración de cobre utilizada dentro del experimento. En esta parte se determinó que la máxima y la mínima concentración de los quelantes no resultaban tóxicas para la microalga; esto se puede observar en la figura 1, que muestra las curvas de crecimiento para cada uno de los cultivos sólo con la concentración mayor del quelante, debido a que el comportamiento en ambas concentraciones fue similar. En esta figura se puede apreciar que el crecimiento de los cultivos con quelante tuvo un comportamiento similar al cultivo control de *Thalassiosira pseudonana* y que el período de aclimatación tuvo la misma duración en todos los cultivos. También se puede apreciar que el cultivo que contenía sólo cobre, sin ningún quelante, presentó una inhibición total de crecimiento.

Durante la segunda etapa del experimento se calibró y se limpió el electrodo de ion selectivo (ISE). Al realizar las titulaciones con NaOH y HCl con los amortiguadores de etilendiamina-Cu y glicina-Cu se obtuvieron regresiones lineales entre los milivolts registrados por el ISE y el pCu calculado con el programa MICROQL.



**Fig. 1.-** Curvas de crecimiento control de *Thalassiosira pseudonana* para cada uno de los quelantes (sólo se muestra la concentración mayor).

La pendiente resultante se tomó como base para determinar la confiabilidad de las mediciones, que se toman como correctas si se encuentran dentro del orden de 24–30 (Belli-Zirino, 1992). Durante el período de calibración la pendiente mayor registrada fue de 27.5 (fig. 2).

A través de los experimentos se conservó esta pendiente, calibrando el electrodo diariamente y dejándolo en una solución sobresaturada de etilendiamina, en los períodos que no se usaba, para minimizar las impurezas que se pudieron adherir durante el día.

En cuanto a la relación existente entre los valores de pCu medidos y calculados, se puede observar en la fig. 3, que casi no hubo diferencia entre ellos, registrándose valores muy parecidos en ambos. Al realizar una regresión lineal entre los resultados obtenidos y calculados, se puede observar que existe una relación directa entre ellos con poca dispersión de los datos. Esto nos indica que las mediciones con el electrodo de ión selectivo son confiables.

El pCu y las concentraciones de los quelantes se calcularon con el programa MICROQL, en el cual se varían las concentraciones del quelante especificado en los componentes (tabla 4), sin variar el pH; el programa presentó un listado de las concentraciones de los componentes y las constantes de formación de las especies (tabla 5), calculando el pCu; se cuidó de que éste se conservara dentro del intervalo de 9–13.5.

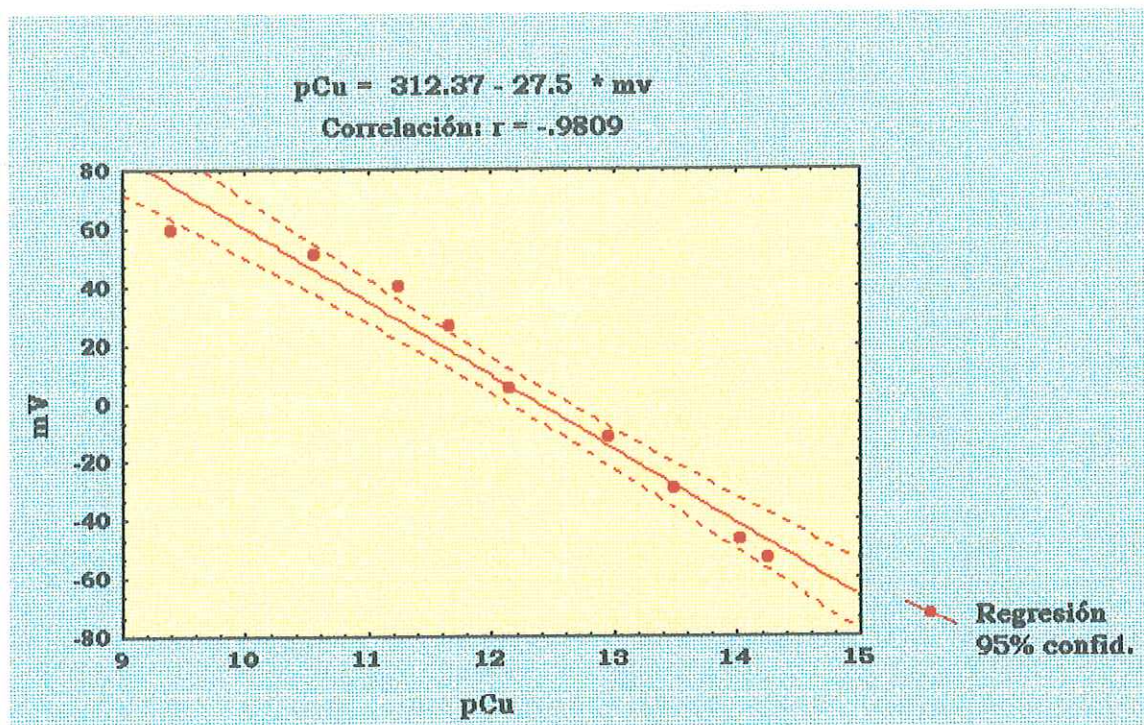


Fig 2.- Curva típica generada durante la calibración del electrodo de ion selectivo.

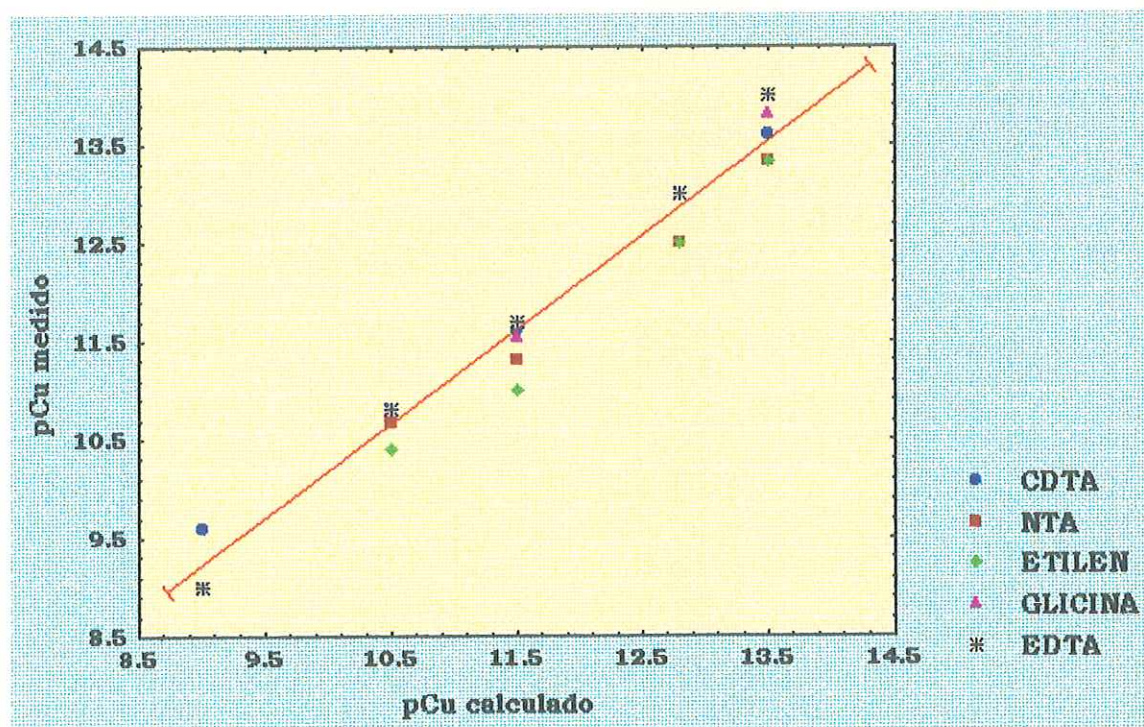


Fig 3.- Comparación entre los resultados de pCu medidos con electrodo de ion selectivo y los de pCu calculados con MICROQL, en presencia de diferentes quelantes.

**TABLA IV.-** Concentraciones totales de los componentes utilizadas en el programa MICROQL para obtener el pCu calculado.

\* Los quelantes se encuentran especificados en la tabla 3.

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN [M]	Log [M]
Cl	0.5606	-0.251
Na	0.4809	-0.318
SO <sub>4</sub>	0.0290	-1.534
Mg	0.0547	-1.262
Ca	0.0106	-1.974
K	0.0102	-1.991
TRIS	0.0024	-2.619
Br	0.0008	-2.096
Quelante*	*	*
B(OH) <sub>4</sub>	1x10 <sup>-12</sup>	-12.000
F	1x10 <sup>-12</sup>	-12.000
PO <sub>4</sub>	0.003912	-2.4076
SiO <sub>4</sub>	1x10 <sup>-12</sup>	-12.000
Cu	2.5x10 <sup>-5</sup>	-4.6020
CO <sub>3</sub>	1x10 <sup>-3</sup>	-3.000
H <sup>+</sup>	.0175	-1.756

**TABLA V.-** Constantes de equilibrio de las diferentes especies utilizadas en el programa MICROQL para calcular el pCu.

\*\* Las especies del cobre y de los quelantes se encuentran en la tabla 3.

ESPECIES	Log K	ESPECIES	Log K
Cl	0	HCO <sub>3</sub>	9.804
Na	0	HPO <sub>4</sub>	12.4
SO <sub>4</sub>	0	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	19.6
Mg	0	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	21.70
Ca	0	H <sub>4</sub> SiO <sub>4</sub>	9.61
K	0	CuCO <sub>3</sub>	5.91
TRIS	0	Cu(CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	9.2
Br	0	CuHCO <sub>3</sub>	1.867
Quelante	0	CuOH	-8.03
B(OH) <sub>4</sub>	0	Cu(OH) <sub>2</sub>	-16.415
F	0	Cu(OH) <sub>3</sub>	-42.2
PO <sub>4</sub>	0	Cu(OH) <sub>4</sub>	-56.2
SiO <sub>4</sub>	0	CuSO <sub>4</sub>	1.67
Cu**	**	CuCl	-0.431
CO <sub>3</sub>	0	CuCl <sub>2</sub>	-1.389
H <sup>+</sup>	0	CuCl <sub>3</sub>	-3.0396
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	15.877	CuCl <sub>4</sub>	-5.282
HSO <sub>4</sub>	1.62	CuB(OH)	7.29
NaOH	-14.039	Cu(B(OH)) <sub>4</sub>	12.12
NaSO <sub>4</sub>	0.3047	HTRIS	8.31
KCO <sub>3</sub>	0.167	CaTRIS	0.25
KSO <sub>4</sub>	0.279	MgTRIS	0.30
CaCO <sub>3</sub>	2.092	CuTRIS	4.00
CHCO <sub>3</sub>	10.73	NaCO <sub>3</sub>	0.623
CaSO <sub>4</sub>	1.534	NaHCO <sub>3</sub>	9.212
MgCO <sub>3</sub>	2.02	KOH	-14.095
MgHCO <sub>3</sub>	10.58	KHCO <sub>3</sub>	-0.923
MgOH	-11.9	CaOH	-13.09
MgSO <sub>4</sub>	1.52	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	9.00
HL***	***		
MgF	1.83		
CaF	1.00		
OH	-13.897		

---

Cuando se encontraron todas las concentraciones que presentaban un pCu contenido dentro de este intervalo, se procedió con la tercera parte del experimento (las pruebas de toxicidad para *Thalassiosira pseudonana* de los cambios en la actividad del ion libre de cobre).

Los resultados obtenidos durante el experimento nos muestran claramente que los niveles de toxicidad están relacionados con la actividad del ion libre, como se puede observar en la tabla 6 que presenta un resumen de los resultados encontrados en los experimentos con los diferentes agentes quelantes utilizados, indicando también la actividad del ion de cobre (pCu) tanto medido como calculado, al igual que el porcentaje de sobrevivencia obtenido con el experimento y el calculado a partir de los resultados presentados por Sunda y Guillard y la tasa de crecimiento, para cada caso. También muestra el tiempo máximo de duración para cada cultivo con las distintas concentraciones de quelantes. En estos resultados se aprecia que la relación entre la actividad del ion de cobre y la sobrevivencia está fuertemente influenciada por la concentración de cada uno de los agentes quelantes: a mayores cantidades del quelante, corresponde una mayor complejación que se refleja en un mayor porcentaje de sobrevivencia.

Los porcentajes de sobrevivencia medidos y calculados se graficaron contra los valores de pCu medidos con ISE y calculados con el programa MICROQL para mostrar su comportamiento con cada una de las cinco concentraciones de los diferentes quelantes.

TABLA VI.- Parámetros y resultados obtenidos durante los experimentos con *Thalassiosira pseudonana*.

QUELANTE [M]	DÍAS	pCU CALCU LADO	pCU MEDIDO	% DE SOBREVI- VENCIA	% DE SOBREVI- VENCIA	TASA DE CRECI- MIENTO (μ)
<b>CDTA</b>				Calculado	Medido	
$2.00 \times 10^{-5}$	0.564	9.80	9.60	0	9.40	0.693
$2.01 \times 10^{-5}$	1.51	10.69	10.80	3	25.17	0.603
$2.08 \times 10^{-5}$	3.44	11.53	11.61	50	57.30	1.512
$3.40 \times 10^{-5}$	5.87	12.83	13.00	95	97.80	0.853
$1.00 \times 10^{-4}$	6.00	13.59	13.59	98	100.0	0.084
<b>NTA</b>						
$2.40 \times 10^{-5}$	0.00	9.09	9.00	0	0.00	0.000
$1.00 \times 10^{-4}$	1.00	10.39	10.67	3	16.67	1.862
$1.00 \times 10^{-3}$	3.20	11.51	11.30	50	53.34	1.334
$7.10 \times 10^{-3}$	5.00	12.81	12.50	95	83.34	0.068
$9.90 \times 10^{-3}$	5.04	13.51	13.33	98	84.00	0.083
<b>ETILEN</b>						
$4.00 \times 10^{-5}$	0.00	9.10	9.00	0	0.00	0.000
$4.40 \times 10^{-5}$	0.88	10.47	10.40	3	14.67	1.971
$5.40 \times 10^{-5}$	2.00	11.50	11.00	50	33.34	1.088
$1.00 \times 10^{-4}$	5.02	12.80	12.50	95	83.67	0.243
$1.80 \times 10^{-4}$	5.18	13.55	13.33	98	86.40	0.238
<b>GLICINA</b>						
$1.00 \times 10^{-4}$	0.00	9.01	9.00	0	0.00	0.000
$3.50 \times 10^{-4}$	0.78	10.47	10.80	3	13.00	0.711
$1.10 \times 10^{-3}$	3.00	11.50	11.53	50	50.00	1.052
$3.80 \times 10^{-3}$	5.76	12.80	13.00	95	96.00	1.761
$7.00 \times 10^{-3}$	6.00	13.51	13.80	98	98.40	0.039
<b>EDTA</b>						
$2.00 \times 10^{-5}$	1.00	9.31	9.00	0	16.67	0.909
$2.10 \times 10^{-5}$	1.74	10.68	10.80	3	29.00	0.693
$2.70 \times 10^{-5}$	3.42	11.54	11.70	50	57.00	1.101
$1.00 \times 10^{-4}$	5.90	12.59	13.00	95	98.34	0.341
$0.70 \times 10^{-3}$	6.00	13.55	14.00	98	100.00	0.046
<b>[1X10<sup>-4</sup> M]</b>						
Glicina	0.00	9.01	9.00	0	0.00	0.000
NTA	1.00	10.39	10.67	3	16.67	1.862
Etilendiamina	3.42	11.54	11.70	50	57.00	0.243
EDTA	5.02	12.80	12.50	95	83.67	0.341
CDTA	6.00	13.59	13.59	98	100.0	0.084

Comparando las figuras 4 y 5 con las siguientes 6 a 9 y con los datos reportados en la tabla 6, se puede observar claramente que los medios con CDTA y EDTA son los que presentan el más alto nivel de sobrevivencia demostrando, que mientras más alta sea la actividad iónica registrada menor será la toxicidad para la microalga; estos quelantes son los que permiten la más alta tasa de crecimiento durante el tratamiento y también se observa un comportamiento parecido en los puntos de inflexión dentro de la gráfica presentando casi los mismos valores de pCu medidos y calculados durante el experimento. Aunque aparentemente estos quelantes son los que mejor resultado dieron en cuanto a lo que a sobrevivencia se refiere, fueron los únicos con los cuales se notaron daños en la morfología de la célula, al hacer observaciones en el microscopio, sobre todo en la pared celular que se encontró destruida casi en su totalidad cuando el pCu fluctuaba alrededor de 9 y 9.6; en ese intervalo alcanzaron un máximo de 16.67% de sobrevivencia. A un pCu medido de 13.9 y 14 lograron un 100% de sobrevivencia durante los seis días necesarios para que el cultivo alcanzara su fase estacionaria.

El comportamiento que presentaron los cultivos tratados con glicina (fig. 6) fue parecido al de los cultivos con EDTA Y CDTA pero, a diferencia de éstos, el cultivo con un pCu medido de 9 no presentó sobrevivencia alguna; mientras que el cultivo con un pCu medido de 13.8 logró sobrevivir los 6 días como el cultivo control, pero no registró una sobrevivencia del 100% como los que contenían EDTA y CDTA a un intervalo de pCu similar. La tasa de crecimiento máxima se registró cuando el pCu medido fue de 13.0, con un 96% de sobrevivencia.

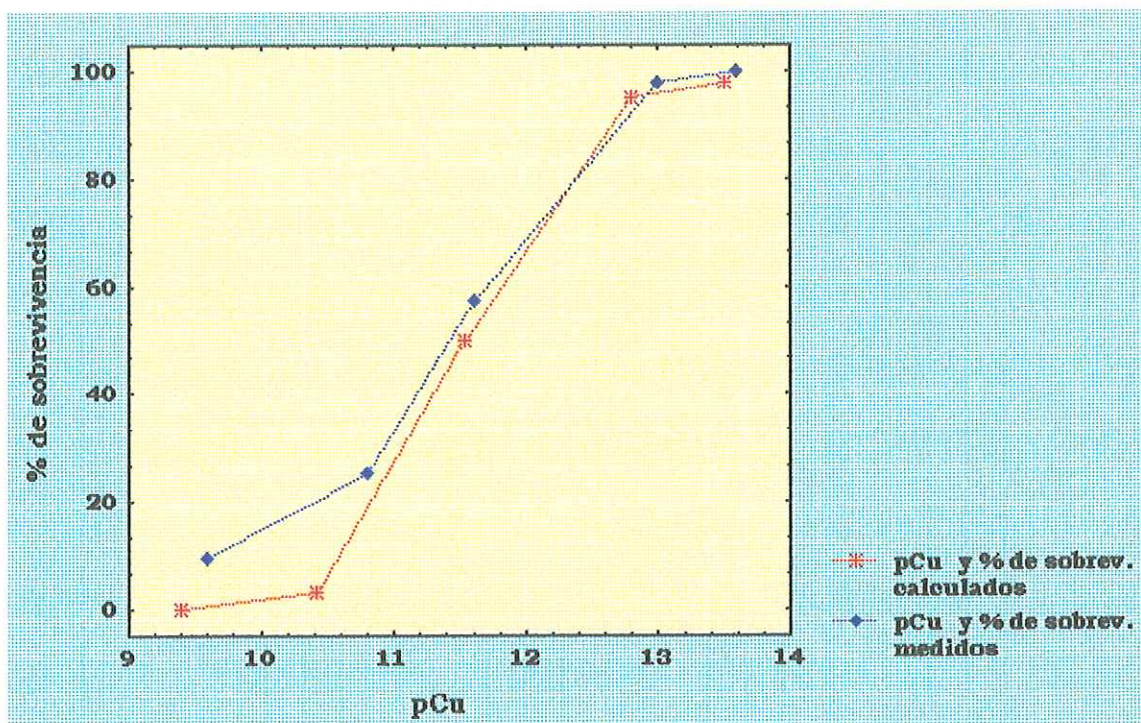


Fig 4.- Cultivo de *Thalassiosira pseudonana* tratado con CDTA a cinco concentraciones distintas, mostrando el pCu calculado y medido, además de sus porcentajes de sobrevivencia respectivos.

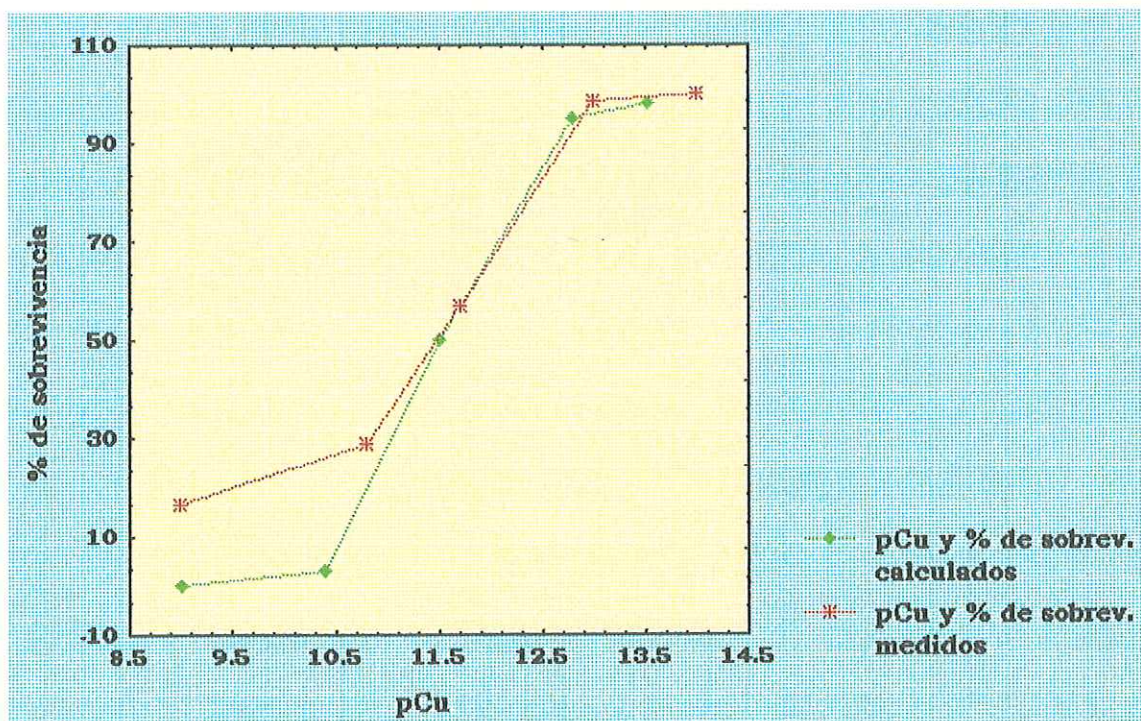


Fig 5- Cultivo de *Thalassiosira pseudonana* tratado con EDTA a cinco concentraciones distintas, mostrando el pCu calculado y medido, además de sus porcentajes de sobrevivencia respectivos.

Los cultivos que contenían NTA y etilendiamina presentaron valores de sobrevivencia final parecidos, y además no se encontró sobrevivencia durante las primeras doce horas en que se administró el quelante. La sobrevivencia máxima la alcanzaron los cultivos con un pCu medido de 13.33 al quinto día de iniciado el cultivo, alcanzando hasta ahí la fase estacionaria. La tasa más alta de crecimiento la alcanzó el cultivo que contenía la segunda concentración de etilendiamina que registró un pCu medido de 10.40 (tabla 6). Ambos presentaron la máxima sobrevivencia en el mismo valor de pCu medido (13.33), pero el que contenía etilendiamina fue el que registró un porcentaje de sobrevivencia superior (fig. 7 y 8).

Además de la concentración del quelante, otro factor que influye en los cambios de actividad del ion, es la capacidad de complejación del quelante mismo, como se puede observar en la figura 9, ya que comparando la misma concentración de los cinco quelantes y manteniendo la concentración de cobre que se manejó durante todo el experimento, se puede observar que se obtuvieron diferentes valores de pCu medidos y por consecuencia diferente % de sobrevivencia. En esta figura se puede observar que el quelante que presenta menor efectividad a una concentración de  $1 \times 10^{-4} \text{M}$  es la glicina que a un pCu medido de 9 no presentó sobrevivencia alguna desde las primeras doce horas de iniciado el cultivo. Sin embargo, el cultivo que contenía CDTA a la misma concentración presentó una mayor efectividad representada por una mayor sobrevivencia, ya que registró un pCu medido de 13.59 y un 100% de sobrevivencia, alcanzando su fase estacionaria a los 6 días al igual que el cultivo control; una de las más altas tasas de crecimiento (1.971), la presentó el cultivo que contenía etilendiamina.

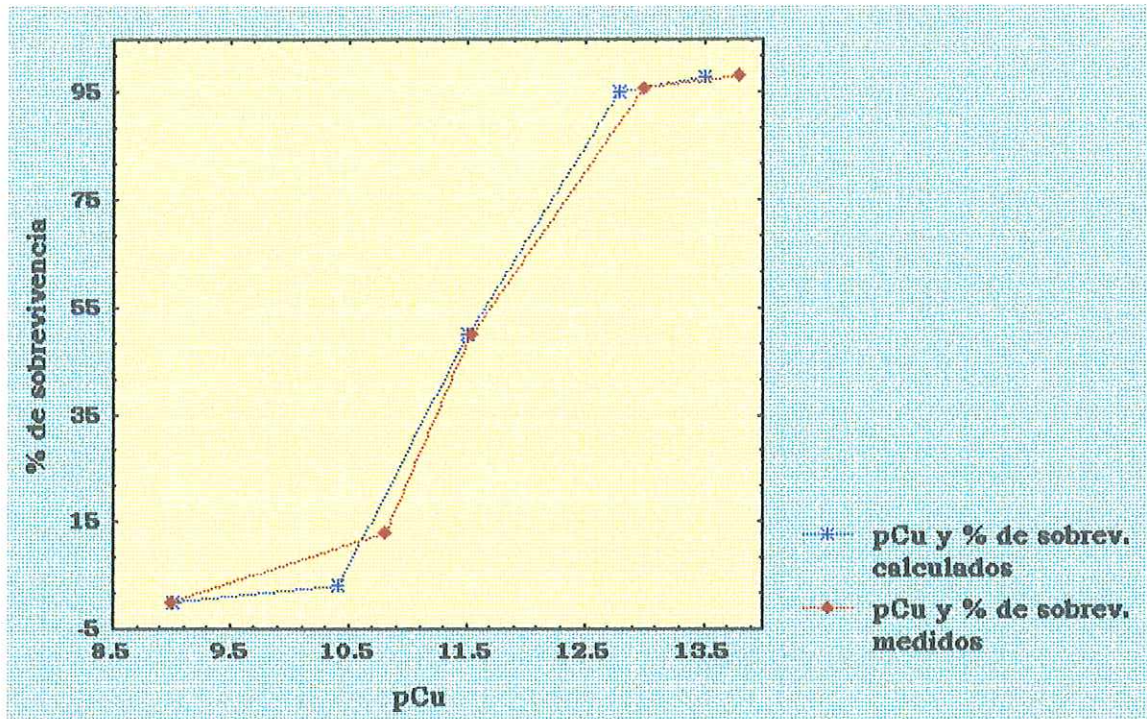


Fig 6.- Cultivo de *Thalassiosira pseudonana* tratado con glicina a cinco concentraciones distintas, mostrando el pCu calculado y medido, además de sus porcentajes de sobrevivencia respectivos.

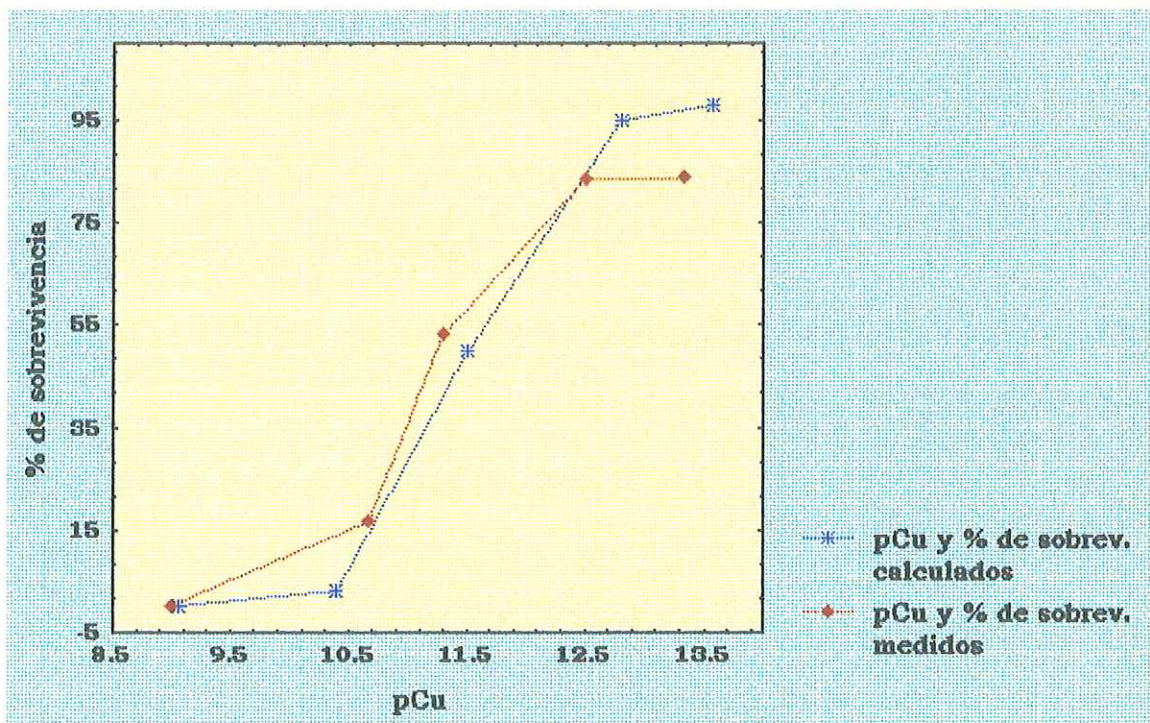


Fig 7.- Cultivo de *Thalassiosira pseudonana* tratado con NTA a cinco concentraciones distintas, mostrando el pCu calculado y medido, además de sus porcentajes de sobrevivencia respectivos.

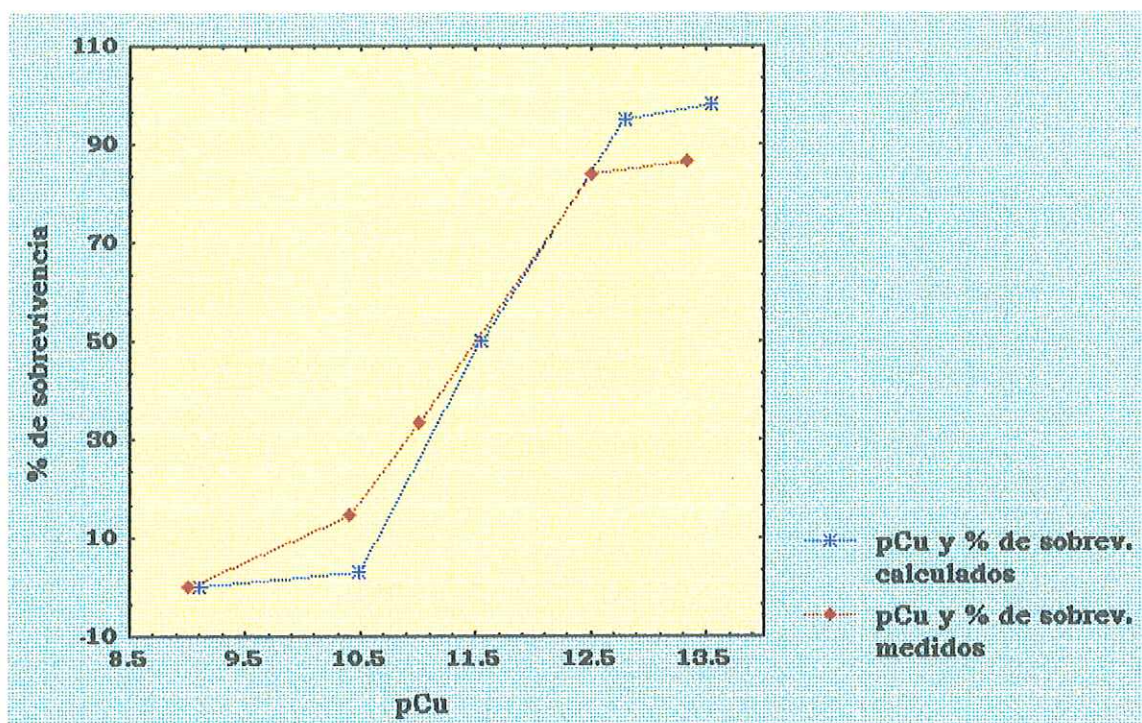


Fig 8.- Cultivo de *Thalassiosira pseudonana* tratado con Etilendiamina a cinco concentraciones distintas, mostrando el pCu calculado y medido, además de sus porcentajes de sobrevivencia respectivos.

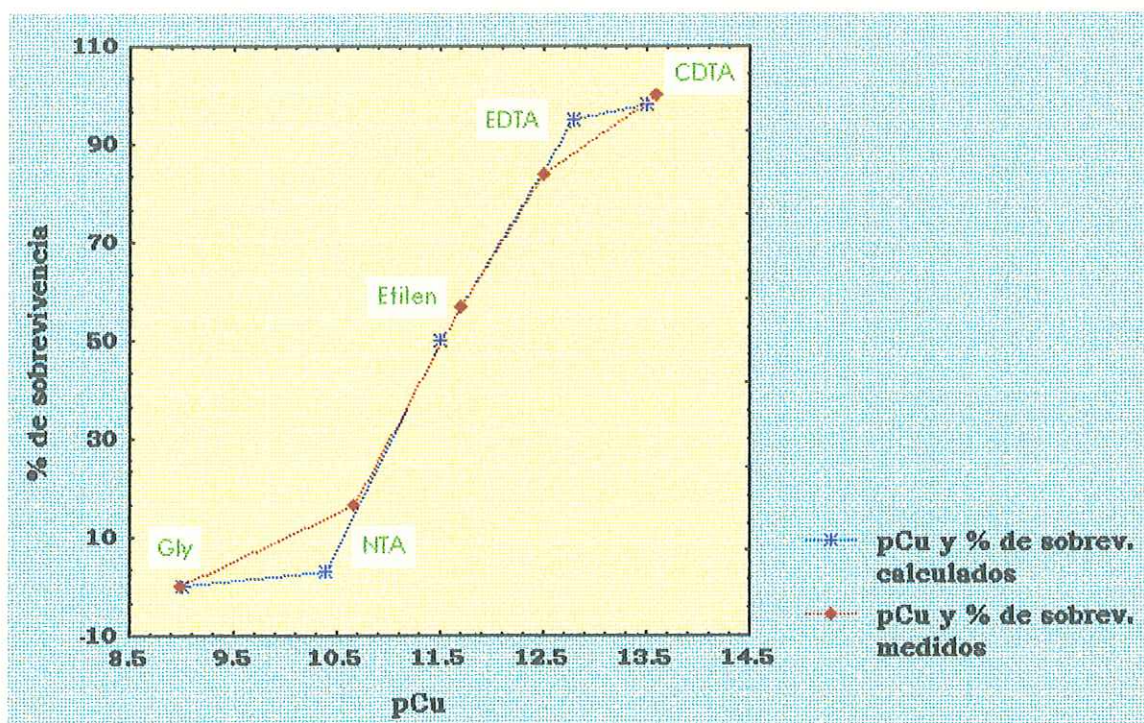


Fig 9.- Experimento que muestra los cinco quelantes a la misma concentración ( $1 \times 10^{-4} \text{M}$ ), conservando estable la concentración de Cu ( $2 \times 10^{-5} \text{M}$ ). Se presentan los porcentajes de sobrevivencia y los pCu calculados y medidos.

---

En cuanto a los análisis estadísticos requeridos para confirmar la confiabilidad de los resultados, se realizaron pruebas de normalidad para todos los experimentos al igual que análisis de varianza por medio de ANOVA de una vía con efectos fijos, utilizando el programa STATISTICA 4.2 for Windows no encontrándose diferencias significativas entre los resultados obtenidos y los calculados, con un 95% de confianza (ver anexo).

## 5.- *Discusiones:*

El experimento realizado con cinco diferentes quelantes y un amplio intervalo de valores de pCu medidos directamente con un electrodo de ion selectivo, nos confirman que la toxicidad del cobre está determinada por la actividad del ion y no por su concentración.

La razón principal para escoger un cultivo de microalgas como monitor de toxicidad y de especiación por metales pesados es la facilidad con que se puede mantener el cultivo, observándose en éste tres fases principales: a) la fase letárgica donde no existe un aumento en la concentración celular, sólo un acondicionamiento al nuevo medio al que son expuestas, b) la fase de crecimiento logarítmico y c) la fase límite de crecimiento; el total de las 3 fases no dura más de 6 días (Fogg, 1955). En la segunda fase es donde se pueden determinar mejor los efectos de la toxicidad y el efecto de la concentración del metal en la velocidad de crecimiento.

Las microalgas excretan agentes quelantes como el ácido glicólico y el ácido pirúvico, entre otros, que tienen el efecto de modificar la especiación de los metales en el agua de mar, pero cuando esta es tratada con radiación ultravioleta para su esterilización, los quelantes son destruidos causando aumento en la toxicidad y una disminución de la complejación.

Tanto en el experimento como en el modelo se cuidó de que no hubiera variación alguna en el pH manteniéndolo a 8.4, debido a que esta variable influye en las especies formadas con los quelantes y en las concentraciones de otros ligandos tanto orgánicos como inorgánicos como el  $\text{CO}_3^{2-}$  y  $\text{OH}^-$ , entre otros, logrando con esto que la formación de complejos se asemeje a la que se encuentra en el agua de mar.

En todos los experimentos anteriores a éste se ha tenido que utilizar modelos de especiación química para determinar el pCu y las concentraciones a utilizar. En algunos experimentos se utilizó agua de mar artificial para minimizar los excedentes de metales presentes en el agua de mar natural. En este trabajo no se utilizó este recurso, debido a que se pretendía que el experimento fuera lo más parecido a las condiciones naturales. En los experimentos reportados en literatura tampoco se ha realizado una medición directa de la actividad del ion dentro del medio de cultivo, mientras que en este experimento se realizó una medición directa dentro de los medios de cultivo para demostrar que no existe una diferencia significativa entre los pCu calculados y los medidos.

El electrodo de ion selectivo sólo responde al ion metálico libre al cual es específico. De acuerdo al manual de Orion (Orion, 1968) el límite de detección para el electrodo de ion de cobre libre (II) modelo 94-29 es de  $1 \times 10^{-8}$  M, pero otros trabajos con este electrodo de ion selectivo, han reportado límites de detecciones inferiores. Blaedel y Dinwiddie (1974) en estudios de conductividad con este electrodo en el rango de  $1 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-9}$  M de cobre iónico concluyen que el límite de detección, debe estar cerca de  $1 \times 10^{-14}$  M de cobre basado en la solubilidad de  $\text{CuS}$  (sólido) en el electrodo. Stella y

---

Ganzerli-Valentini (1979) reportaron límites de detección de  $1 \times 10^{-10}$  M de  $\text{Cu}^{2+}$ .

Una fórmula basada en las propiedades del electrodo exhibe un cambio en el potencial de aproximadamente 30 mV por un cambio en la concentración de cobre iónico (= pendiente) y es usada para convertir los mV leídos en concentración de ion libre. En este experimento se trabajó con una pendiente de 27.5 considerada como dentro del límite de detección y con ella se producen mediciones correctas (Belli y Zirino, 1993), por lo que es posible determinar que los resultados obtenidos de pCu son confiables.

Las gráficas obtenidas con el experimento confirman la hipótesis de que la toxicidad se encuentra firmemente influenciada por la actividad del ion de cobre y no por la concentración total del metal. Al mantener el pH constante se minimiza la influencia que este factor presenta sobre la complejación y se evita la competencia con los ligandos orgánicos administrados al cultivo.

Davey *et al.* (1973) al experimentar con *Thalassiosira pseudonana*, encontraron que las gráficas de crecimiento contra concentración de metal son similares a las curvas de titulación que se obtienen midiendo la actividad del ion libre con un electrodo de ion selectivo. Guy y Kean (1980) expresaron en su trabajo que existen problemas al realizar comparaciones entre mediciones directas con el electrodo de ion selectivo (ISE) y con la especiación calculada, ya que existe la posibilidad de que la microalga modifique la especiación durante el experimento; sin embargo, con los resultados obtenidos en este trabajo se pudo demostrar que el adicionar quelantes en los medios de cultivo disminuye esta modificación, debido a que cuando se agrega un ligando que forma un complejo muy estable con

un ion metálico a una solución de este ion, aunque éste esté complejado con otro ligando menos estable, el ligando más fuerte tiende a descomponer el complejo existente y extraer el metal formándose un nuevo complejo con dicho ligando (Snoeynk y Jenkins, 1990). También como se puede observar en otros experimentos, los cambios en la especiación por los exudados de la microalga dependen también de la especie del organismo como lo demostraron Anderson y Morel (1978).

Sunda y Guillard (1976) encontraron que el pCu óptimo para *Thalassiosira pseudonana* es entre 10.6 y 13.3; en este experimento se encontró que el pCu óptimo para el crecimiento del cultivo está en el intervalo de 11-14 con todos los quelantes; los autores mencionados indican que a un pCu de 14.6 existe deficiencia nutricional y que a un pCu de 8.3-8.6, causan daños en la morfología celular. Sin embargo, en el presente trabajo no se observó deficiencia nutricional alguna a un pCu de 14, sino que presentó una sobrevivencia del 100% y el cultivo creció normalmente, sin ningún cambio en la morfología celular, utilizando como quelante EDTA; los daños morfológicos se encontraron a un pCu de 9-9.6 sólo en los cultivos donde se utilizó CDTA y EDTA.

Se conoce que el NTA a pH=8 al igual que cualquier otro agente formador de complejos, produce complejos con los metales en el orden de las constantes de estabilidad del complejo NTA-metal. A una concentración de NTA de  $10^{-7}$  M, sólo hay suficiente agente quelante para producir una baja concentración de complejos encontrándose complejado, sólo el 4% de Cu(II) total. A medida que la concentración de NTA aumenta a  $3 \times 10^{-6}$  M se produce un apreciable aumento en los complejos hasta del 84% de Cu(II) (Snoeynk y Jenkins, 1990); esto explica el por que al aumentar las

concentraciones del quelante la toxicidad disminuye como se pudo observar en el experimento. También se conoce que el NTA es más débil que el EDTA y por lo tanto su utilización causa una menor sobrevivencia como se presentó en el experimento donde el cultivo que contenía NTA como agente quelante nunca alcanzó el 100% de sobrevivencia, como en el caso del EDTA. Bin-Xue y Sigg (1990) en un experimento sobre los exudados de *Chlamydomonas reinhardtii* encontraron, utilizando NTA y un pH de 6.5, que la sobrevivencia de dicha microalga se encuentra en el intervalo de pCu 9-11; comparando estos resultados con los obtenidos durante el presente experimento se nota una diferencia ya que en el cultivo en el que se usó NTA se determinó un intervalo vital de pCu 9-13.33. Aunque el pCu determinado como límite para el crecimiento coincide, no es así para el superior en que existe una marcada diferencia, que puede ser debido a las diferencias presentadas en el manejo de ambos experimentos como son el pH y la concentración manejada de quelante, que fue menor en el experimento de los autores mencionados.

En sus experimentos con *Selenastrum capricornutum* Guy y Kean (1980), utilizando EDTA, NTA y etilendiamina en sus cultivos, determinaron un pCu alguicida en un intervalo de 8-9.11. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el experimento en los cultivos que contenían NTA, etilendiamina y glicina, pero no para los tratados con EDTA y CDTA, esto se explica debido a que ambos quelantes son los que presentan una mayor fuerza de quelación, aunque sean más lentos en su acción.

Davey *et al.* (1973), en sus experimentos examinaron la toxicidad del cobre en *Thalassiosira pseudonana* cultivada en un medio formulado con agua de mar artificial y determinaron que al adicionar quelantes disminuye la

actividad del ion de cobre por lo que se produce un cambio en la toxicidad. Sus resultados indican una relación lineal entre la velocidad de crecimiento y el logaritmo negativo de las concentraciones computadas de cobre libre (pCu). En los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede observar que la tasa de crecimiento es mayor a medida que aumenta el pCu, tanto medido como calculado.

## 6.- Conclusiones:

La concentración de cobre total no es la que influye directamente en la toxicidad para los organismos, sino que ésta se encuentra fuertemente influenciada por la actividad del ion libre debido a la complejación químico-orgánica del metal con el ligando.

La concentración del quelante también influye en los cambios de actividad del ion: a mayores concentraciones de agente quelante corresponde una mayor actividad iónica, que se refleja en un mayor porcentaje de sobrevivencia.

La capacidad de complejación del quelante influye en los cambios de actividad presentes en el ion, siendo mayor la presentada por el CDTA, que a una concentración de  $1 \times 10^{-4} \text{M}$ , presentó la más alta actividad iónica ( $p\text{Cu} = 13.59$ ), con un 100% de sobrevivencia. No así la glicina que a la misma concentración presentó la más baja actividad iónica ( $p\text{Cu} = 9$ ), sin ninguna sobrevivencia.

Es además importante subrayar que el uso del electrodo de ion selectivo en la medición de dicha actividad proporciona datos reales sobre la concentración de la forma iónica del metal en un medio determinado. Con esta técnica se obtienen, por lo tanto, resultados confiables, prácticos y en poco tiempo, que permiten una interpretación más realista de los modelajes sobre los efectos en la toxicidad, que presenta la quelación en los organismos

## 7.- Bibliografía.

- Anderson D.M. y F. M. M. Morel. (1978). Copper sensitivity of *Gonyaulax tamarensis*. *Limnol. Oceanogr.* 23: 283-295.
- Barber, R.T. (1973). Organic ligands and phytoplankton growth in nutrient-rich seawater. En: Trace metals and metal-organic interactions in natural waters. P.C. Singer, ed., Ann Arbor, Mich., Ann Arbor Science, pp 321-338.
- Belli, S.L. y A. Zirino. (1993). Behavior and calibration of the Copper (II) Ion-Selective electrodes in high chloride media and marine waters. *Anal. Chem.* 65:2583-2589.
- Bin-Xue, H. y L. Sigg. (1990). Binding of Cu(II) to algae metal buffer. *Wat. Res.* 24: 1129-1136.
- Blaedel, W.J. y D.E. Dinwiddie. (1974). Study of behavior of Copper Ion-Selective electrodes at sub-micromolar concentrations levels. *Anal Chem.* 46: 873-878.
- Davey, E.W., M.J. Morgan y S.J. Erickson. (1973). A biological measurement of Copper complexation capacity of seawater. *Limnol. Ocean.* 18: 993-997.
- Erickson, S.J. (1972). Toxicity of Copper to a marine diatom in unenriched inshore seawater. *J. Phycol.* 8:318-323.

- Erickson, S.F., T.E. Maloney y J.H. Gentile. (1970). Effect of nitrilotriacetic acid on the growth and metabolism of estuarine phytoplankton. *J. Water Pollution Control*, 42:329-335.
- Fisher, N.S. y J.G. Fabris. (1982). Complexation of Cu, Zn, and Cd by metabolites excreted from marine diatoms. *Mar. Chem.* 11:224-255.
- Fitzgerald, G.P. y S.L. Faust. (1963). Factors affecting the algicidal properties of Copper. *Appl. Microbiol.* 8:229-239.
- Fogg, G.E. y P.F. Westlake. (1955). The importance of extracellular products of algae in freshwater. *Verhandl, intern. Ver. Limnol.* 12:319-323.
- Folsom, B.R., N.A. Popescu y J.M. Wood. (1986). Comparative study of Aluminum and Copper transport and toxicity in an acid-tolerant freshwater green algae. *Envir. Sci.Technol.* 20:616-620.
- Guillard, R.R.L. (1973). Division rates, p 289-311. En: *Handbook of phycollogical methods*. J.R. Stein, ed. Cambridge University Press, London, 448 pp.
- Guillard, R.R.L. y J.H. Ryther. (1962). Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husted y *Detonula confervacea* (Cleve). *Gran. J. Microbiol.* 8:229-239.

- Guy, R.D. y A. R. Kean. (1980). Algae as a chemical speciation monitor-I. A comparison of algal growth and computer calculated speciation. *Water Reseach.* 14:891-899.
- Manahan, S.E. y M.J. Smith. (1973). Copper micronutrient requirement for algae. *Environ. Sci. and Tech.* 7:829-833.
- Mandelli, E.F. (1969). The inhibitory effects of Copper on marine phytoplankton. *Contrib. Mar. Sci.* 14:47-57.
- Martell, A.E. y R.M. Smith. (1974). *Critical Stability Constants.* Plenum Press, New York.
- Martin D.F. y W.K. Olander (1971). Effects of Copper, Titanium, and Zirconium on the growth rates of the red tide organism, *Gymnodinium breve*. *Environn. Lett.* 2(3):135-142.
- McKnight D.M. y F.M.M. Morel. (1979). Release of weak and strong copper-complexing agents by algae. *Limnol. Oceanogr.* 24:823-837.
- MICROQL. User's Manual. Department of Soil and Enviromental Science. University of California. Rivereside, Calif.
- Seritti, A., D. Pellegrini, E.C. Morelli, C. Barghiani y R.Ferrara. (1986). Copper complexing capacity of phytoplanktonic cell exudates. *Mar. Chem.* 18:351-357.

- Snoeyink, L.V. y D. Jenkins. (1990). Química del agua. Editorial Limusa, S.A. de C.V. México, D.F. 508 pp.
- Spencer, C.P. (1957). Utilization of trace elements by marine unicellular algae. *J. gen. Microbiol.* 16:282-285.
- Steemann Nielsen E. y L. Kamp-Nielsen. (1970). Influence of deleterious concentrations of Copper on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*. *Physiol. Plant* 23:828-840.
- Stella, R. y M.T. Ganzareli- Valentini. (1979). Copper Ion-Selective electrodes for determination of inorganic Copper species in freshwater. *Anal. Chem.* 51:2148-2151.
- Stolzberg, R.J. y D. Robbin. (1977). Chromatographic measurement of submicromolar strong complexing capacity of phytoplankton media. *Analyt. Chem.* 49:226-230.
- Sueur, S., C.M.M. van der Berg y J.P. Riley. (1982). Measurement of the metal complexing ability of exudates of marine macroalgae. *Limnol. Oceanogr.* 27: 536-543.
- Sunda, W.G. y R.R.L. Guillard.(1979). The relationship between cupric ion activity and toxicity of copper to phytoplankton. *J. Mar. Res.* 34:511-529.
- Swallow, K.C., J.C. Westall, D.L. MacKnight, N.M.L. Morel y F.M.M. Morel. (1978). Potentiometric determination of Copper

---

complexation by phytoplankton exudates. *Limnol. Oceanogr.* 23: 306-308.

Trujillo-Valle L. (1993). La colección de microalgas del CICESE. Serie Acuicultura. Centro De Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 104 pp.

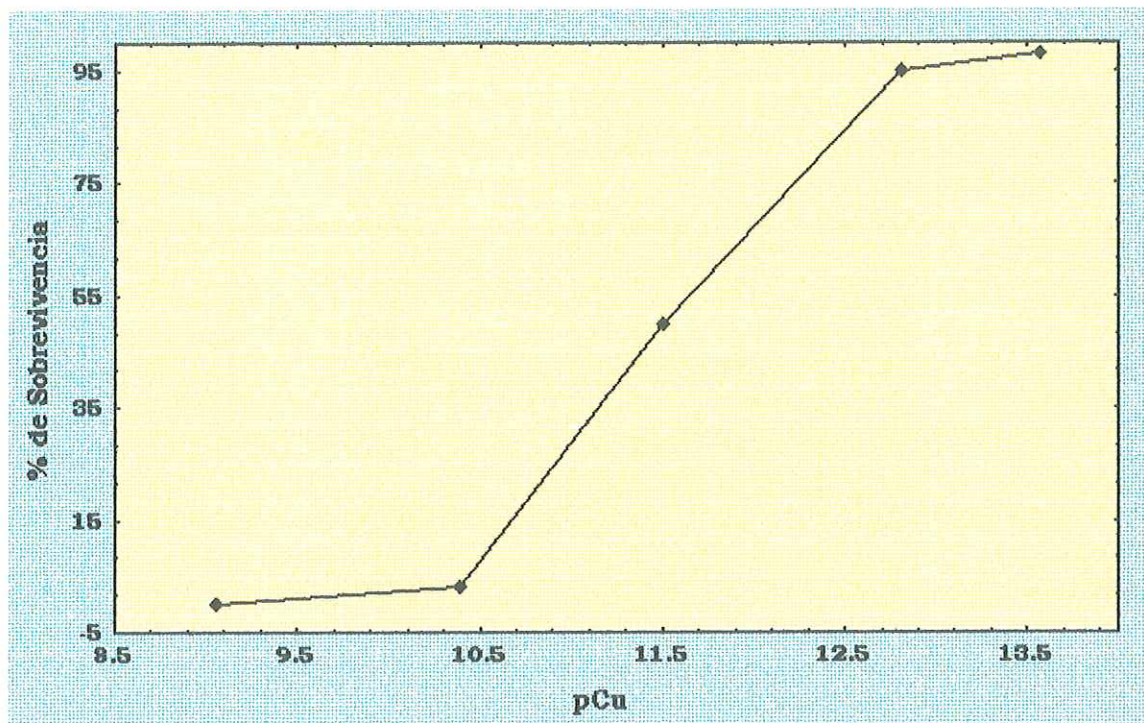
Westall, J. C. (1986). A chemical equilibrium program in BASIC. Dep. Chemist. Oregon State University Corvallis, Oregon. 47 pp.

Zhou, X. y P.J. Wangersky. (1985). Copper complexing capacity in cultures of *Pheodactylum tricorutum*: diurnal changes. *Mar. Chem.* 17:301-312.

Zhou, X. y P.J. Wangersky. (1989). Production of Copper-complexing organics ligands by the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* in a cage culture turbidostat. *Mar. Chem.* 26: 239-259.

## *Anexo I.*

*Curva de sobrevivencia generada por Sunda y Guillard  
(1976) utilizada como base para calcular el porcentaje de  
sobrevivencia teórico.*



**Fig A.-** Curva de supervivencia para *Thalassiosira pseudonana* generada por Sunda y Guillard (1976), utilizada como base para obtener el porcentaje de supervivencia teórico y el intervalo de pCu calculado.

## *Anexo II.*

*Programa MICROQL utilizado para calcular el  $pCu$  y las concentraciones de quelante utilizadas en el experimento.*

```

1  REM This program represents a multi-species seawater model
2  REM running in the open in the "open" mode; e.g., in equi-
3  REM librium with 350 ppm of CO2 in the atmosphere. It runs
4  REM as a pH titration, and the total H+ increments are chan-
5  REM ged by the function DELTA.
6  CLS
8  OPEN "JUNK.DAT" FOR OUTPUT AS #1
20  D$ = DATE$: T$ = TIME$
30  PRINT "NEW RUN: "; D$, " "; T$: PRINT
40  START = TIMER
100  LIMIT = .01: DELTA = .0001: MM% = 0
101  REM STORAGE *****
102  DIM T(20), X(20), GX(20), Y(20), W(20), Z(20, 20), X$(20)
104  DIM A(80, 20), GK(80), C(80), GC(80), C$(80)
105  DIM Q(20, 21), P(21)
107  REM *****
108  T(16) = 0!: START = TIMER
112  T(N1%) = T(N1%) + MM% * DELTA
    IF T(N1%) > LIMIT THEN GOTO 950 ELSE GOTO 200
200  GOSUB 2000: REM input
250  GOSUB 10000: REM transform for solids          :REM MIC4
300  GOSUB 3000: REM mass action
400  GOSUB 4000: REM material balance
500  GOSUB 5000: REM jacobian
600  GOSUB 6000: REM convergence check
610  IF F% = 1 THEN GOTO 800: REM branch to output if converged
700  GOSUB 7000: REM solve n x n, improve x
720  GOTO 300: REM go to next iteration
800  GOSUB 8000: REM output
810  FINISH = TIMER: PRINT : PRINT "RUN TIME = "; FINISH - START: BEEP
820  PRINT USING "##.#####.##.####"; T(N1% - 1); GX(N1% - 1)
830  PRINT #1, USING "##.#####.##.####"; T(N1% - 1); GX(N1% - 1)
900  : T(N1%) = T(N1% - 1): MM% = MM% + 1: RESTORE
901  SLEEP 10:
902  PRINT C$(15); C(15)
    PRINT C$(17); C(17)
    PRINT C$(21); C(21)
    PRINT C$(23); C(23)
    PRINT C$(24); C(24)
    PRINT C$(26); C(26)
    PRINT C$(27); C(27)
    PRINT C$(36); C(36)
    PRINT C$(41); C(41)
    PRINT C$(42); C(42)
    PRINT C$(43); C(43)
903  GOTO 108
950  CLS : END
2000  REM INPUT *****
2010  READ M1%, N1%, K1%
2020  FOR J% = 1 TO N1%: READ X$(J%): NEXT
2030  FOR I% = 1 TO M1%: READ C$(I%): NEXT
2040  FOR I% = 1 TO M1%: FOR J% = 1 TO N1%: READ A(I%, J%): NEXT: NEXT
2050  FOR I% = 1 TO M1%: READ GK(I%): NEXT
2060  FOR J% = 1 TO N1% - 1: READ T(J%): NEXT
2070  FOR J% = 1 TO N1%: READ GX(J%): X(J%) = 10! ^ GX(J%): NEXT
2071  FOR I% = 1 TO M1%: PRINT I%; C$(I%); GK(I%): NEXT
2100  E9 = .000005

```

```

2200 I9% = 20
2300 I8% = 0
2900 RETURN
3000 REM MASS ACTION *****
3010 FOR I% = 1 TO M1%
3020 V = GK(I%)
3030 FOR J% = 1 TO N1%: V = V + GX(J%) * A(I%, J%): NEXT
3040 GC(I%) = V: C(I%) = 10! ^ V
3050 NEXT
3900 RETURN
4000 REM MASS BALANCE *****
4010 FOR J% = 1 TO N1%
4020 V = -T(J%): U = ABS(V)
4030 FOR I% = 1 TO M1%: V = V + A(I%, J%) * C(I%): U = U + ABS(A(I%, J%) * C(I%)): NEXT
4040 Y(J%) = V: W(J%) = U
4050 NEXT
4900 RETURN
5000 REM JACOBIAN *****
5010 FOR J% = 1 TO K1%: FOR K% = 1 TO K1%
5020 V = 0
5030 FOR I% = 1 TO M1%: V = V + A(I%, K%) * A(I%, J%) * C(I%): NEXT
5040 Z(J%, K%) = V
5050 NEXT: NEXT
5900 RETURN
6000 REM CONVERGENCE CHECK *****
6010 F% = 1
6020 FOR J% = 1 TO K1%
6030 IF ABS(Y(J%)) / W(J%) > E9 THEN F% = 0
6040 NEXT
6900 RETURN
7000 REM SOLVE N x N, IMPROVE X *****
7100 I8% = I8% + 1: IF I8% > I9% THEN STOP
7200 REM newton-raphson
7300 N% = K1%: GOSUB 40000
7400 FOR J% = 1 TO K1%
7420 IF P(J%) < 1 THEN X(J%) = X(J%) * (1 - P(J%)) ELSE X(J%) = X(J%) / 10
7430 GX(J%) = LOG(X(J%)) / LOG(10!)
7440 NEXT
7900 RETURN
8000 REM OUTPUT *****
8010 GOSUB 8100: PRINT : GOSUB 8200
8090 RETURN
8100 REM A,K,B
8110 PRINT "i, id, A, GK, GC, C"
8120 FOR I% = 1 TO M1%
8130 PRINT I%; C$(I%); C(I%)
8140 FOR J% = 1 TO N1%: PRINT A(I%, J%); : NEXT: PRINT GK(I%), GC(I%), C(I%)
8150 NEXT
8190 RETURN
8200 REM gx,x,t,y
8210 PRINT "j, id, GX, X, T, Y"
8220 FOR J% = 1 TO N1%: PRINT J%; X$(J%); GX(J%), X(J%), T(J%), Y(J%): NEXT
8290 RETURN
9000 REM INPUT DATA *****
9010 DATA 66,16,15
9020 DATA "Cl", "Na", "SO4", "Mg", "Ca"
DATA "K", "TRIS", "Br", "en", "B(OH)4", "F"

```





## *Anexo III.*

*Resultados de las pruebas estadísticas.*

**Tabla A.- Resultados del Test Levene de homogeneidad de varianzas.**

0	1	2	3	4	5	6	7	8
CASE	SS-EFFEC	DF-EFFEC	MS-EFFEC	SS-ERROR	DF-ERROR	MS-ERROR	F	P
Muestras	211134e7	5	422270e6	131558e8	36	365439e6	1.155516	.349761

**Tabla B.- Resultados del Análisis de varianza.**

0	1	2	3	4	5	6	7	8
CASE	SS-EFFEC	DF-EFFEC	MS-EFFEC	SS-ERROR	DF-ERROR	MS-ERROR	F	P
Muestras	422743e7	5	852488e6	492349e8	36	136763e7	.603588	.697495

**Tabla C.- Sumario de medias.**

0	1	2	3	4	5
CASE	MUEST-ME	MUEST-N	MUEST-SU	MUEST-ST	MUEST-VA
SOLA:SOLA	970706	7	6794942	944308	89171726e4
ETILEN:ETILEN	985371	7	6897599	961446	92437893e4
GLIC:GLIC	969749	7	6788241	940380	88431421e4
NTA:NTA	924073	7	6468510	894209	79961048e4
CDTA:CDTA	1715753	7	1210273	1996797	39871980e5
EDTA:EDTA	712774	7	4989416	847695	71858640e4
Todos los grupos	1046404	42	43948981	1140841	13015188e5

## Anexo IV.

*Curvas de crecimiento generadas para Thalassiosira  
pseudonana generadas durante la fase de aclimatación.*

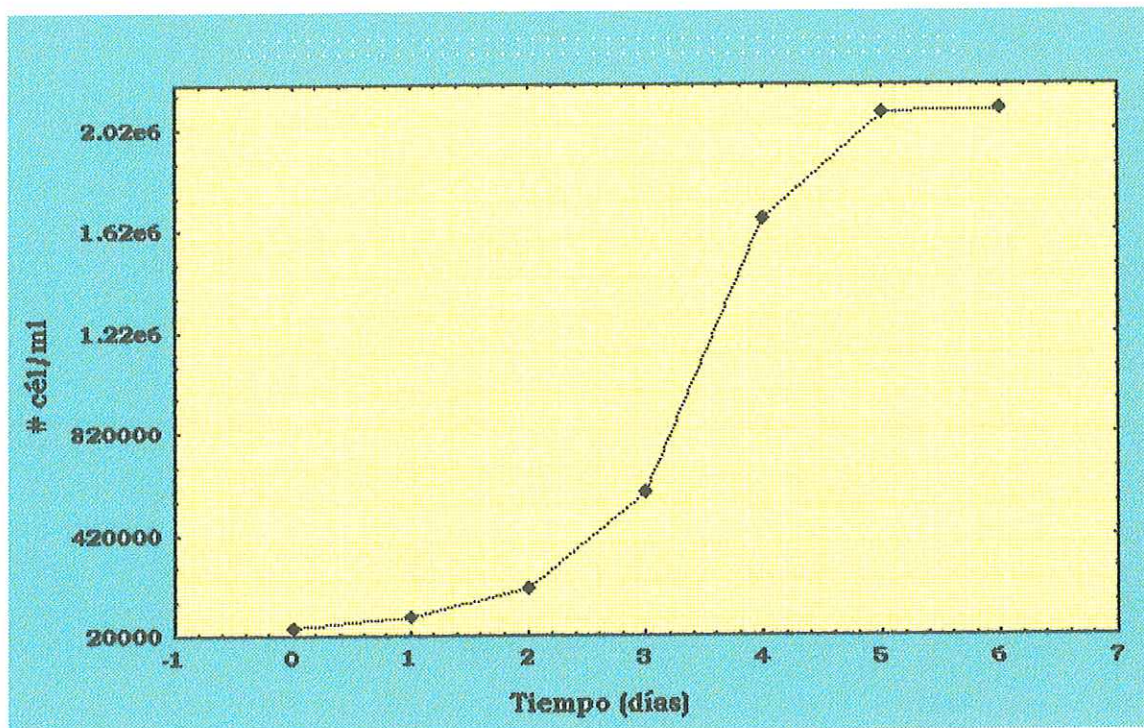


Fig A.- Curva de crecimiento de *Thalassiosira pseudonana* cultivada en medio f/2, libre de Cu y de quelantes.

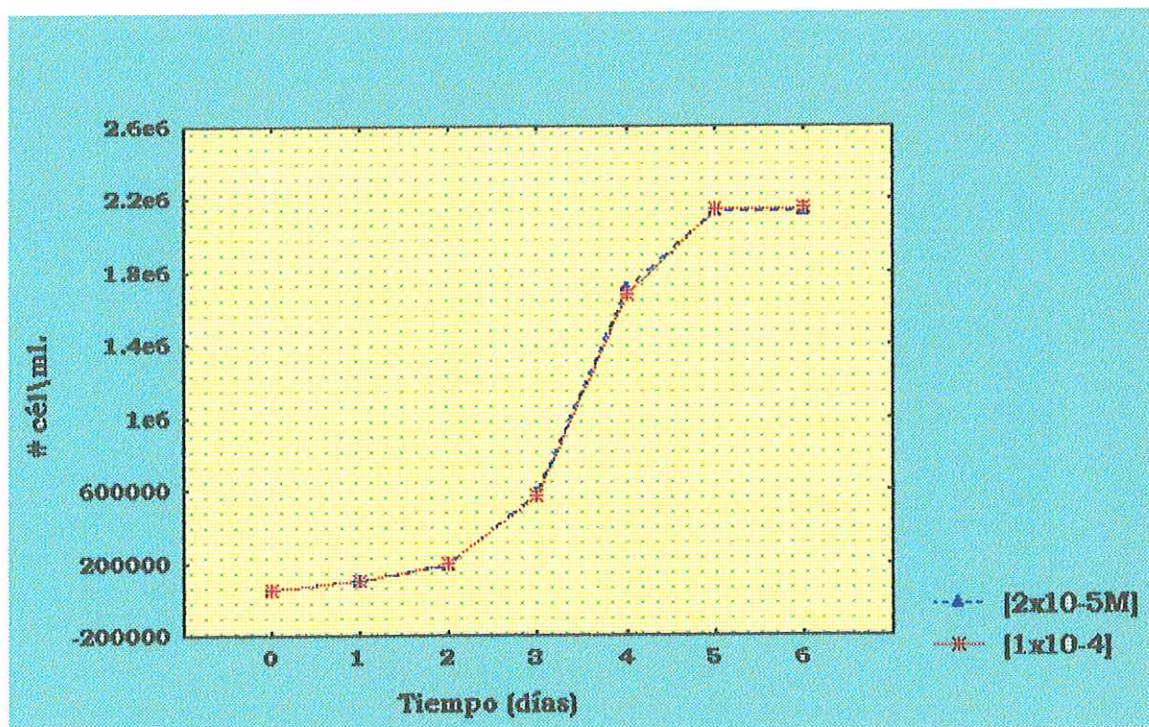


Fig B.- Curva de crecimiento de *Thalassiosira pseudonana* cultivada en medio f/2, en presencia de dos concentraciones de CDTA.

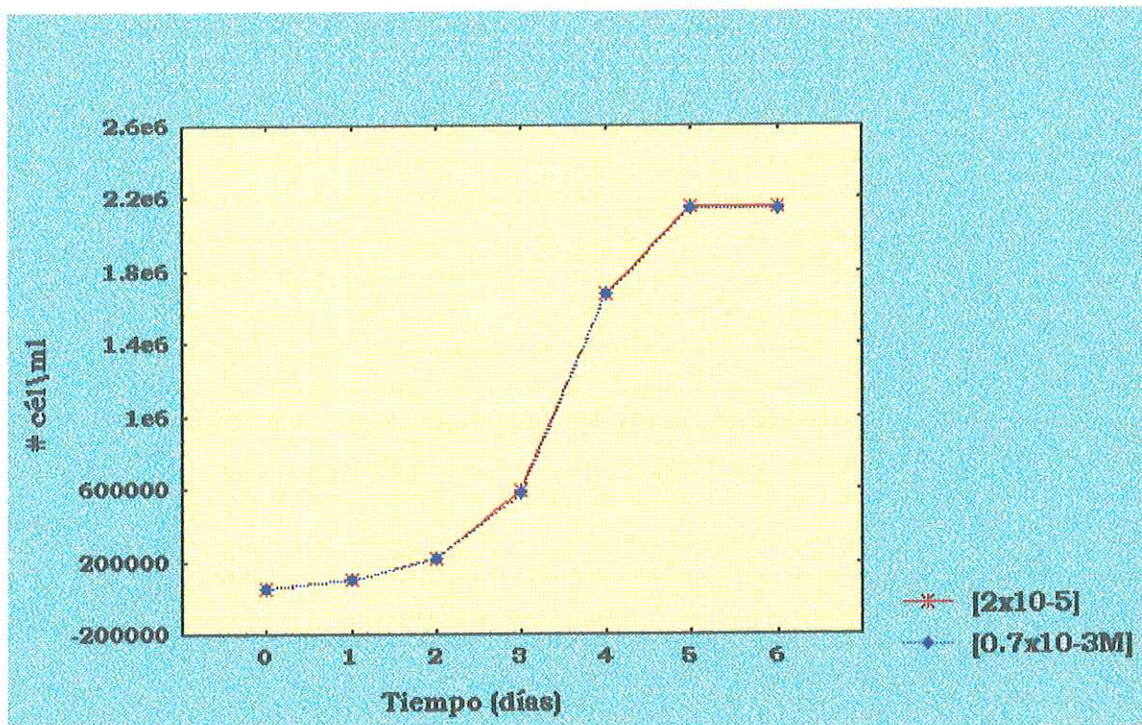


Fig C- Curva de crecimiento de *Thalassiosira pseudonana* cultivada en medio f/2, en presencia de dos concentraciones de EDTA.

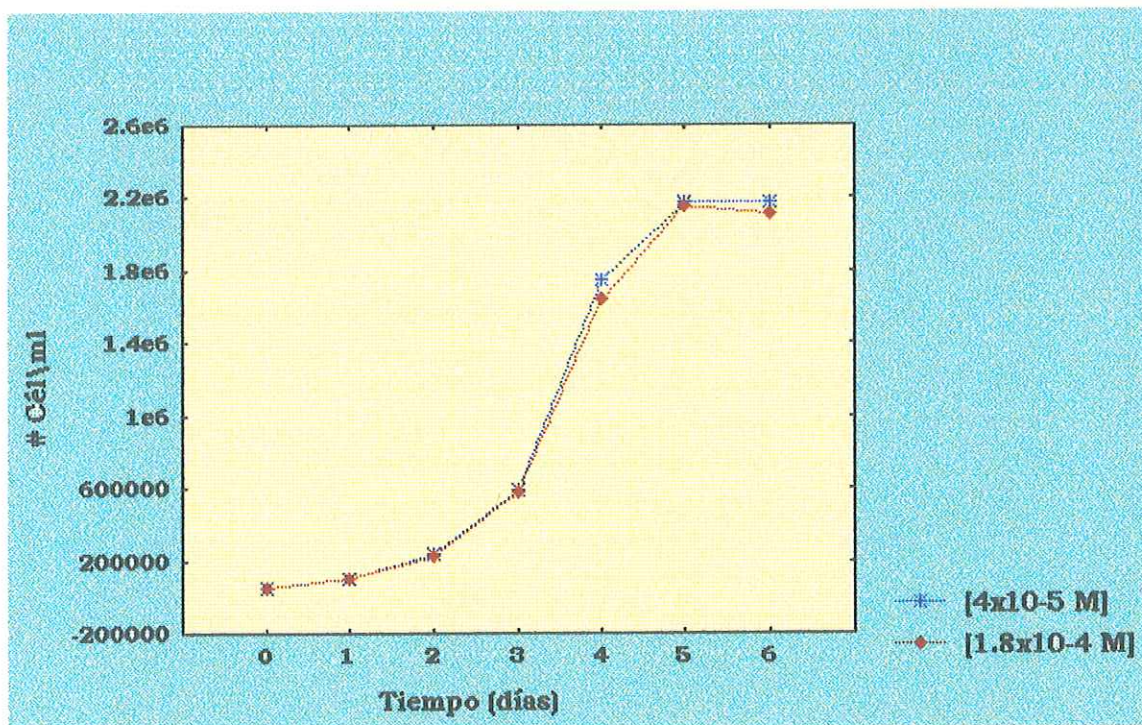


Fig D- Curva de crecimiento de *Thalassiosira pseudonana* cultivada en medio f/2, en presencia de dos concentraciones de Etildiamina.

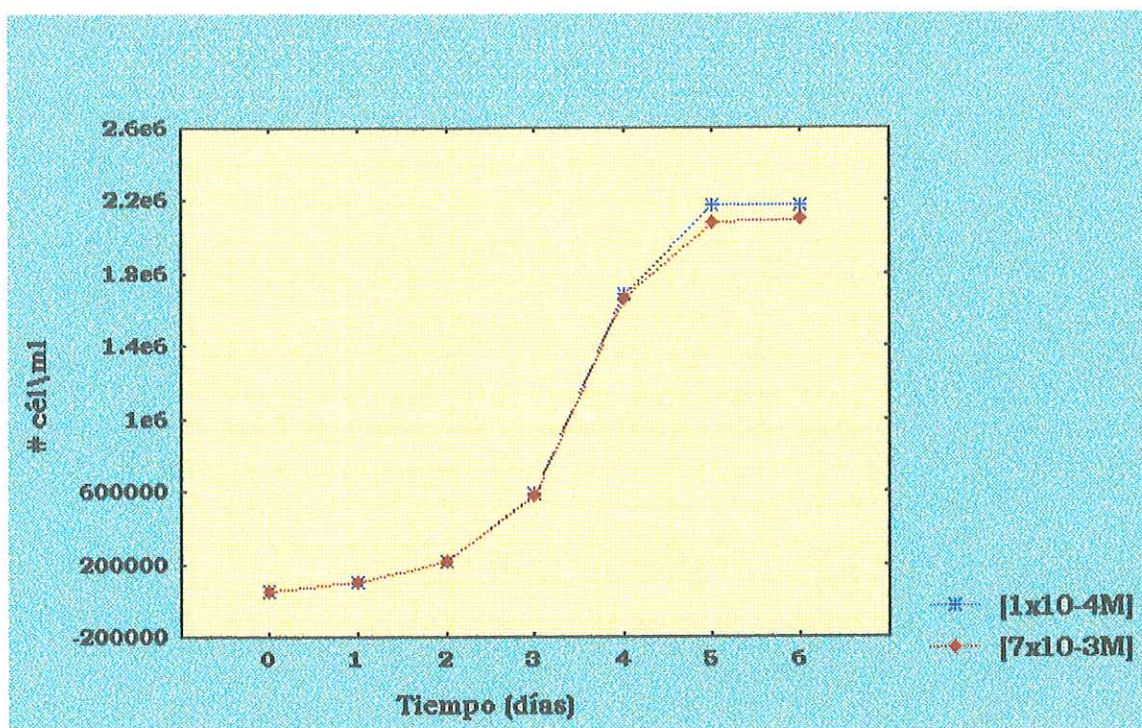


Fig E.- Curva de crecimiento de *Thalassiosira pseudonana* cultivada en medio f/2, en presencia de dos concentraciones de Glicina.

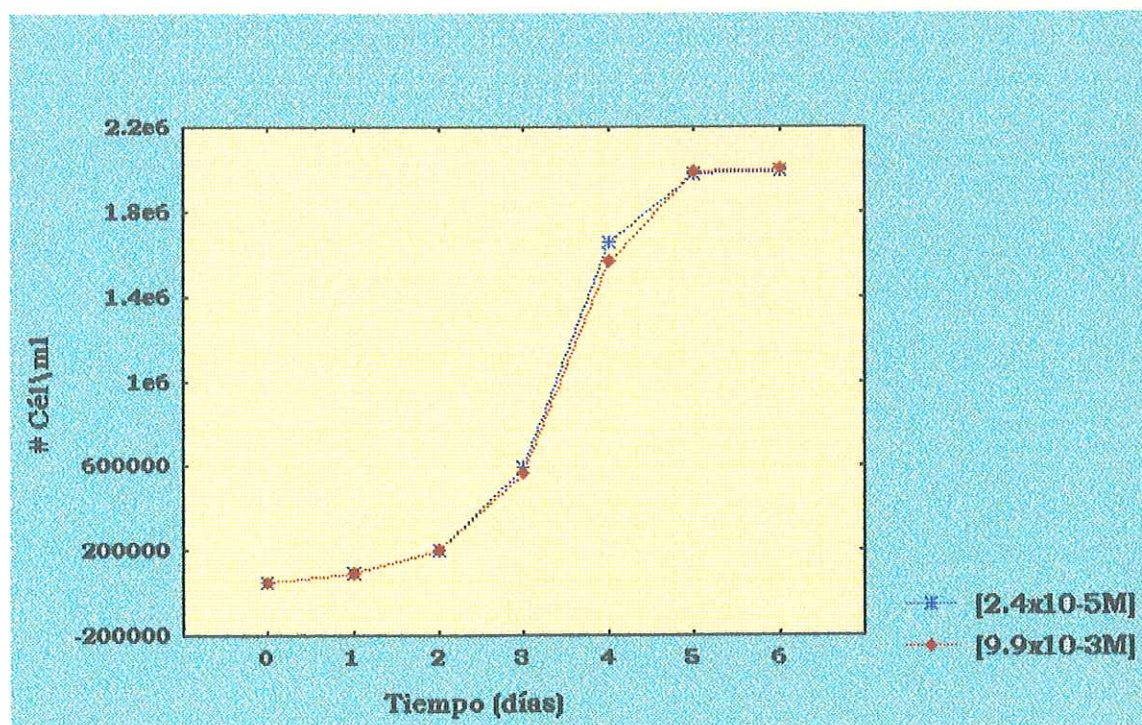


Fig F.- Curva de crecimiento de *Thalassiosira pseudonana* cultivada en medio f/2, en presencia de dos concentraciones de NTA.