

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



EFFECTO DE TÓXICOS SOBRE EL SISTEMA FOTOSINTÉTICO DEL FITOPLANCTON.

BIOENSAYO CON FLUORESCENCIA INMEDIATA Y RETRASADA.

T E S I S

Para Obtener el Título de

OCEANOLOGO

Presenta:

Jaime Lizardi Mendoza

Ensenada, Baja California, México.

Mayo de 1996

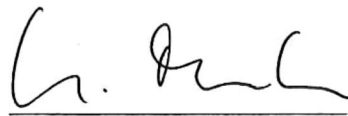
**EFFECTO DE TÓXICOS SOBRE EL SISTEMA FOTOSINTÉTICO DEL FITOPLANCTON:
BIOENSAYO CON FLUORESCENCIA INMEDIATA Y RETRASADA.**

T E S I S

QUE PRESENTA

JAIME LIZARDI MENDOZA

APROBADA POR:



Dr. Helmut Maske Rubach
Director de Tesis



M. C. Graciela Guerra Rivas
Sinodal



M. C. Ramon Cajal Medrano
Sinodal

DEDICATORIA

A Dios.

A mis Padres:

Aurelia Mendoza y Jaime Lizardi Meza
agradeciendo su amor, entrega, y esfuerzo.

A mi Familia:

A mi mas grande, mas 'Chico' y mas 'Baquete' motivo: a mi hijo Jaime
Con mi Amor a 'mi Niña', Irene.

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A mis padres, a mi mamá por ser la inspiración y ejemplo de mi vida, a mi papá por su apoyo decido, su presencia y consejos. A mis hermanos David y Dina.

A mi familia, Irene y Jaimito, por llenar mi vida de amor y cariño, travesuras y otras cosas.

Al diector de esta tesis Dr. Helmut Maske, por los consejos, enseñanzas y apoyo recibido durante el tiempo que he estado trabajando a su cargo. Y en especial por la amistad que me a brindado.

A mis sinodales: a M.C. Graciela Guerra Rivas al mostrar el la formación y revisión crítica de este trabajo la calidad de su vocación de Maestra. Al M.C. Ramón Cajal Medrano, agradezco sus consejos y disponibilidad durante el desarrollo del trabajo y su presencia como compañero de venturas y desventuras vividas durante mi estancia en el Laboratorio de Ecología del Plancton.

A CICESE y su personal por las facilidades y apoyo otorgado para la realización del trabajo

Al Dr. Roberto Iglesias por compartir su conocimiento, sus explicaciones y comentarios sobre el proceso fotoquímico de la fotosíntesis, una ayuda valiosa en las discusiones de este trabajo.

A los compañeros del laboratorio y de CICESE un reconocimiento por su apoyo, ayuda y disponibilidad.

A mis amigos, por ser.

RESUMEN

De la tesis presentada por **Jaime Lizardi Mendoza** como requisito parcial para la obtención del **Título de Oceanólogo**. Ensenada, Baja California, México. Mayo de 1996.

Se realizó un bioensayo con cultivos de tres especies de fitoplancton para probar la efectividad de la relación (fluorescencia retrasada / fluorescencia inmediata, DF/PF) para detectar cambios fisiológicos en el sistema fotosintético de las microalgas producidos por tóxicos; utilizando un sistema de medición simultánea de fluorescencia inmediata y retrasada.

El bioensayo constó de cuatro experimentos con *Skeletonema costatum* cultivada a una intensidad de luz de $300 \mu\text{E s}^{-1}\text{m}^{-2}$ (denominada luz alta, LA), tres con la misma especie cultivada a $20 \mu\text{E s}^{-1}\text{m}^{-2}$ (denominada luz baja, LB), dos con *Isochrysis galvana* en uno cultivada con LA y el otro con LB, un experimento mas fue con *Monochrysis sp.* adaptada a LA; de cada cultivo en fase de crecimiento exponencial se tomaron muestras que fueron intoxicadas con cloruro de mercurio, Diuron (3-[3,4-diclorofenil]-1,1-dimetilurea; DCMU), y el herbicida de marca comercial Faena (con glifosfato como ingrediente activo), en varias concentraciones subletales. Cada muestra después de aproximadamente tres horas de haber sido intoxicada fue colocada en el sistema de medición simultánea de fluorescencia inmediata y retrasada, que consiste de una bomba peristáltica, un fluorómetro modificado para medir fluorescencia retrasada, otro fluorómetro con celda de flujo continuo para la medición de fluorescencia inmediata, una fuente de irradiancia fotosintéticamente activa, filtros para modificar la irradiancia, un radiómetro, una tarjeta de interfase análogo digital y un ordenador.

No se encontró un patrón definido en la relación DF/PF por especie o tipo de cultivo, tomando en cuenta lo anterior, las muestras intoxicadas con Diuron presentaron una reducción en la relación de trabajo del 40 al 70% respecto al control no intoxicado, en el caso de las muestras intoxicadas con cloruro de mercurio no mostraron cambios significativos respecto al control, de igual manera la relación entre las fluorescencias de las muestras intoxicadas con Faena no fue distinta al valor de la relación del control utilizado. Aun cuando las concentraciones utilizadas en este bioensayo pueden ser comparadas con las utilizadas en otros bioensayos, por ejemplo Microtox, la relación DF/PF no resulto efectiva para detectar cambios fisiológicos en el sistema fotosintético de las microalgas provocados por cloruro de mercurio o Faena, esto puede deberse a que el tiempo de detección de la fluorescencia retrasada no muestre en forma clara el daño sobre la fuente de energía de este tipo de fluorescencia y/o a que la forma de acción de estos tóxicos provoque cambios en ambos tipos de fluorescencia que no afecten la relación de trabajo.

ÍNDICE

CONTENIDO:

APROBACIÓN DEL TRABAJO	I
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	IV
ÍNDICE	V
Contenido	V
Lista de Figuras	VI
Lista de Tablas	VII
1 INTRODUCCIÓN	1
2 OBJETIVO	7
3 MÉTODO	7
3.1. Cultivo de microalgas	7
3.2. Material de prueba	7
3.3. Mediciones	8
3.4. Tratamiento de los datos	12
4 RESULTADOS	16
4.1. Fluorescencia inmediata (PF) y fluorescencia retrasada (DF)	16
4.2. Efecto de la especie y tipo de cultivo sobre la relación DF/PF	16
4.3. Efecto de tóxicos sobre DF/PF	20
5 DISCUSIONES	24
5.1. Fluorescencia inmediata y fluorescencia retrasada	24
5.2. Efecto por especie y tipo de cultivo	28
5.3. Efecto por tóxicos	29
5.3.1. Relación DF_n/PF_n	29
5.3.2. Aspectos técnicos y metodológicos	30
5.3.3. Aspecto fisiológico	31
5.4. Comparación con otros bioensayos	32
5.5. Concentraciones en el medio ambiente	34
6 CONCLUSIONES	35
7 LITERATURA CITADA	36
ANEXO I	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.: A).- Esquema del flujo electrónico en el proceso fotosintético	
B).- Diagrama del nivel energético del proceso fotosintético.	3
Figura 1.2: A) Representación diagramática de la fluorescencia inmediata.	
B) Representación diagramática de la fluorescencia retrasada.	5
Figura 3.1.: Esquema del sistema de medición continua de fluorescencia inmediata (PF) y retrasada (DF) utilizado.	11
Figura 3.2.: Representación gráfica de los valores de fluorescencia inmediata (PF), retrasada (DF) y luz; que ejemplifica el espectro de respuesta obtenido en los distintos experimentos.	15
Figura 4.1.: Comportamiento de la señal, sin normalizar, de fluorescencia inmediata (PF) y fluorescencia retrasada (DF) de cultivos adaptados a luz alta (LA) y a luz baja (LB).	17
Figura 4.2.: Valores de la relación DF/PF (sin estandarizar) calculados para los controles de todos los experimentos.	18
Figura 4.3.: Relación DF12/PF12 (estandarizada) de los controles de todos los experimentos, por tipo de cultivo y especie.	19
Figura 4.4.: Efecto de la concentración de DCMU sobre la relación DF _n /PF _n .	21
Figura 4.5.: Efecto de la concentración de HgCl ₂ sobre la relación DF _n /PF _n .	22
Figura 4.6.: Efecto de la concentración de Faena sobre la relación DF _n /PF _n .	23
Figura 5.1.: Ajuste de fluorescencia inmediata (PF) y fluorescencia retrasada (DF) del cultivo adaptado a luz alta (LA) a curvas tipo P-I.	26

Figura 5.2.: Ajuste de fluorescencia inmediata (PF) y fluorescencia retrasada (DF) del cultivo adaptado a luz baja (LB) a curvas tipo P-I. 27

Figura 5.3.: Representación esquemática del intervalo de tiempo utilizado para la medición de la fluorescencia retrasada (hipotético). 30

LISTA DE TABLAS

Tabla 3.A.: Experimentos realizados, especie y tratamiento correspondiente. 9

Tabla 3.B.: Ejemplo de parte de un archivo de datos de fluorescencia inmediata (PF), fluorescencia retrasada (DF) e irradiancia (PAR). 14

Tabla 5.A.: Tabla de concentraciones utilizadas en el presente trabajo y anteriormente reportadas para los tóxicos utilizados. 33

1 INTRODUCCIÓN

La contaminación de los cuerpos de agua, por fuentes agrícolas, industriales y domésticas, es un problema que presenta grandes implicaciones ecológicas, sociales, y económicas; de esto surge la necesidad de implementar métodos de detección, medición y monitoreo de productos potencialmente dañinos al medio ambiente.

Los métodos fisicoquímicos, por sí solos, resultan poco eficientes en la detección de contaminación, por resultar prácticamente imposible el detectar y medir cada sustancia potencialmente tóxica; requieren de una correlación con sistemas biológicos de monitoreo, tanto de campo como de laboratorio, que aún cuando son menos específicos logran evidenciar la presencia de un amplio número de sustancias tóxicas, para obtener una evaluación mas completa y efectiva del estado ecológico del medio. (Cairns *et al.*, 1982).

El monitoreo biológico puede definirse como el uso sistemático de respuestas biológicas para evaluar cambios en el medio ambiente, parámetros tanto estructurales, como funcionales pueden considerarse una respuesta biológica (Matthews *et al.*, 1982).

Para una máxima utilidad, los sistemas de monitoreo biológico requieren de características como: parámetros cuantificables por técnicas apropiadas de interfase para su análisis y manejo en equipo electrónico, como un ordenador; una rápida y reproducible detección del desarrollo del tóxico en el medio, y su relación con factores fisicoquímicos de este. (Cairns *et al.*, 1982).

Missimer y colaboradores (1989) reportan el uso de microalgas como organismos de prueba, para estimar eutroficación potencial y toxicidad de aguas residuales, hacia

finales de la década de los 60 y principios de la de los 70, con el desarrollo de "pruebas de botella" usando *Selenastrum capricornutum*; estos autores mencionan el uso de microalgas como recomendable en pruebas de toxicidad. En el mismo trabajo consideran y utilizan la fluorescencia (*in vivo*) para estimar tasas de crecimiento.

La fluorescencia es ampliamente utilizada en el estudio y determinación de pigmentos y/o productividad primaria; como herramienta en sistemas de monitoreo biológico, solo se ha reportado la propuesta del uso de cambios en la inducción de la fluorescencia inmediata (curvas de Kautsky) como consecuencia de exposición a tóxicos (Benecke, *et al.* 1988). En ese tipo de bioensayo la muestra es adaptada por lo menos 5 minutos a obscuridad midiendo la fluorescencia inmediata desde el momento en que la muestra es irradiada nuevamente.

La fluorescencia es un proceso de pérdida de energía previamente absorbida por moléculas de pigmentos fotosintéticos, que se encuentra íntimamente relacionado con las principales reacciones fotoquímicas, como la separación de cargas y la generación del gradiente de protones. Implica la captación de fotones con una cierta energía que excita moléculas pigmentarias y la emisión de fotones, desde las moléculas de clorofila α , con una longitud de onda mayor y menor energía. Figura 1.1 (Hall y Rao, 1987; Geider y Osborne, 1992).

Se le denomina fluorescencia inmediata a la emisión de luz que se realiza durante la excitación y, al cesar esta, presenta un tiempo medio de caída de 10^{-12} s. Ésta forma de fluorescencia es una medio de liberación de energía contenida en moléculas de

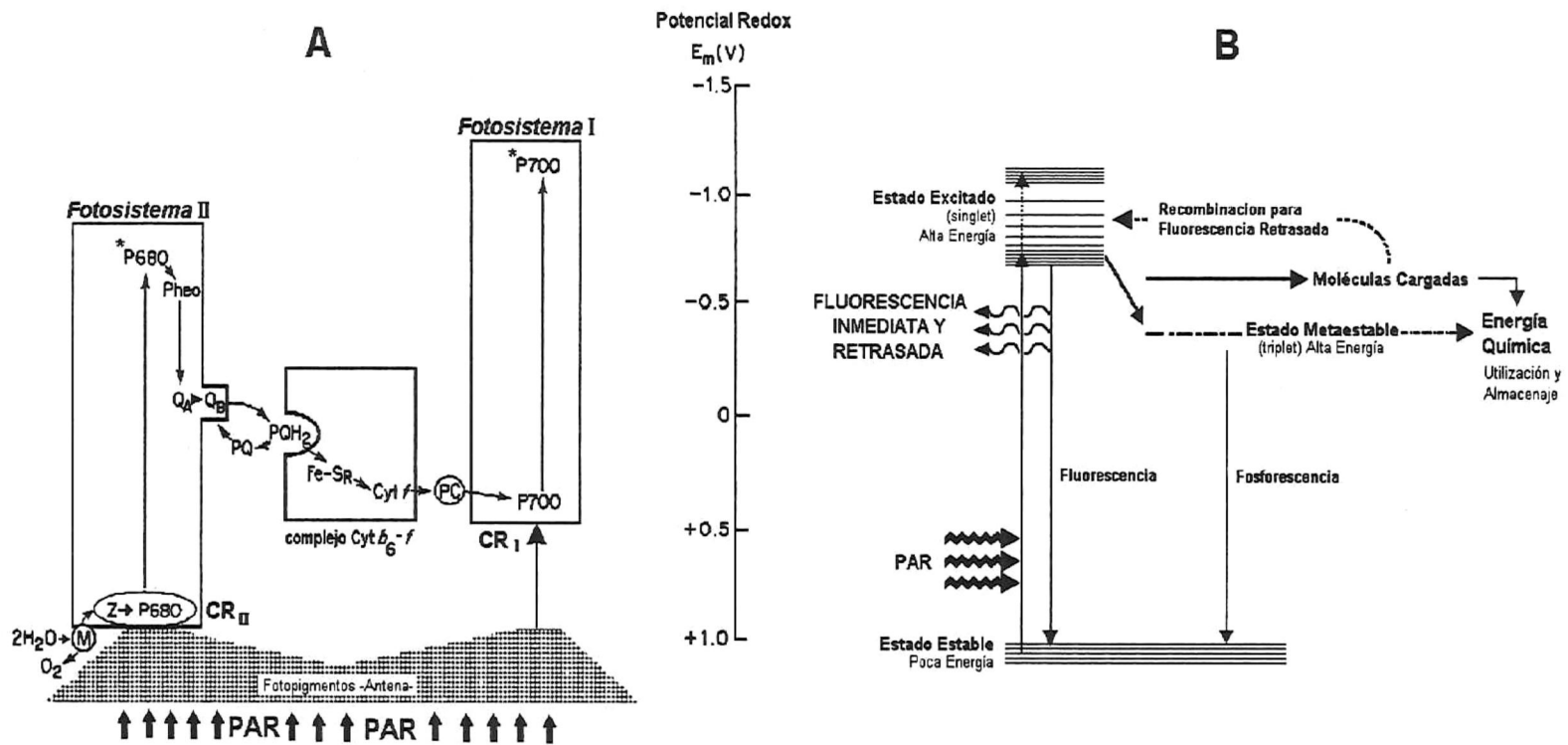


Figura 1.1.: A).- Esquema del flujo electrónico en el proceso fotosintético. M, proteína oxidante de agua; Z, donador primario de electrones; P680-700, clorofila 680 (700); CR_I, CR_{II}, centros de reacción; Q_A, Q_B, PQ, plastoquinonas; Cyt, citocromo; Pheo, feofitina; Fd, ferridoxina; FNR, ferridoxina-NADP reductasa. B).- Diagrama del nivel energético del proceso fotosintético. (Modificado de Hall and Rao, 1992).

clorofila α que no puede ser utilizada en los procesos fotosintéticos, ni disipada en forma de calor (Hall y Rao, 1987; Geider y Osborne, 1992). Figura 1.2.

La fluorescencia retrasada, en cambio, se refiere a luz emitida igualmente desde moléculas de clorofila α , pero con emisión posterior a la excitación en tiempos desde microsegundos hasta minutos y es aproximadamente tres ordenes de magnitud menor que la fluorescencia inmediata (Hall y Rao, 1987; Krasnovsky, 1982); la hipótesis mas aceptada para explicar la fluorescencia retrasada la describe como el resultado de la recombinación de los fotoproductos primarios, componentes reducidos en la cadena electrónica entre el fotosistema II (PS II) al fotosistema I (PS I), este flujo electrónico en contra del potencial redox es sostenido principalmente por energía térmica. Figura 1.2. (Hall y Rao, 1987; Lavorel, 1975; Fleischman, 1978; Amesz y Van Gorkom, 1978).

La emisión de fluorescencia inmediata proviene de moléculas de clorofila α en la antena y en el centro de reacción del PS II reducido, la fluorescencia retrasada solo es emitida por las moléculas de clorofila α en los centros del PS II reducido. La fluorescencia retrasada requiere de la integridad del aparato fotosintético, por esto si el aparato fotosintético se encuentra dañado ésta disminuye (Lavorel, 1975). En cambio, la fluorescencia inmediata mantiene una relación inversamente proporcional a la eficiencia del proceso de separación de cargas, típicamente si este proceso es interrumpido o alterado se aumenta la fluorescencia inmediata (Geider y Osborne, 1992).

De acuerdo a lo anterior, si ocurriese algún tóxico en concentración suficiente para alterar el funcionamiento del aparato fotosintético, la relación (cociente) entre ambos tipos de fluorescencia cambiaría.

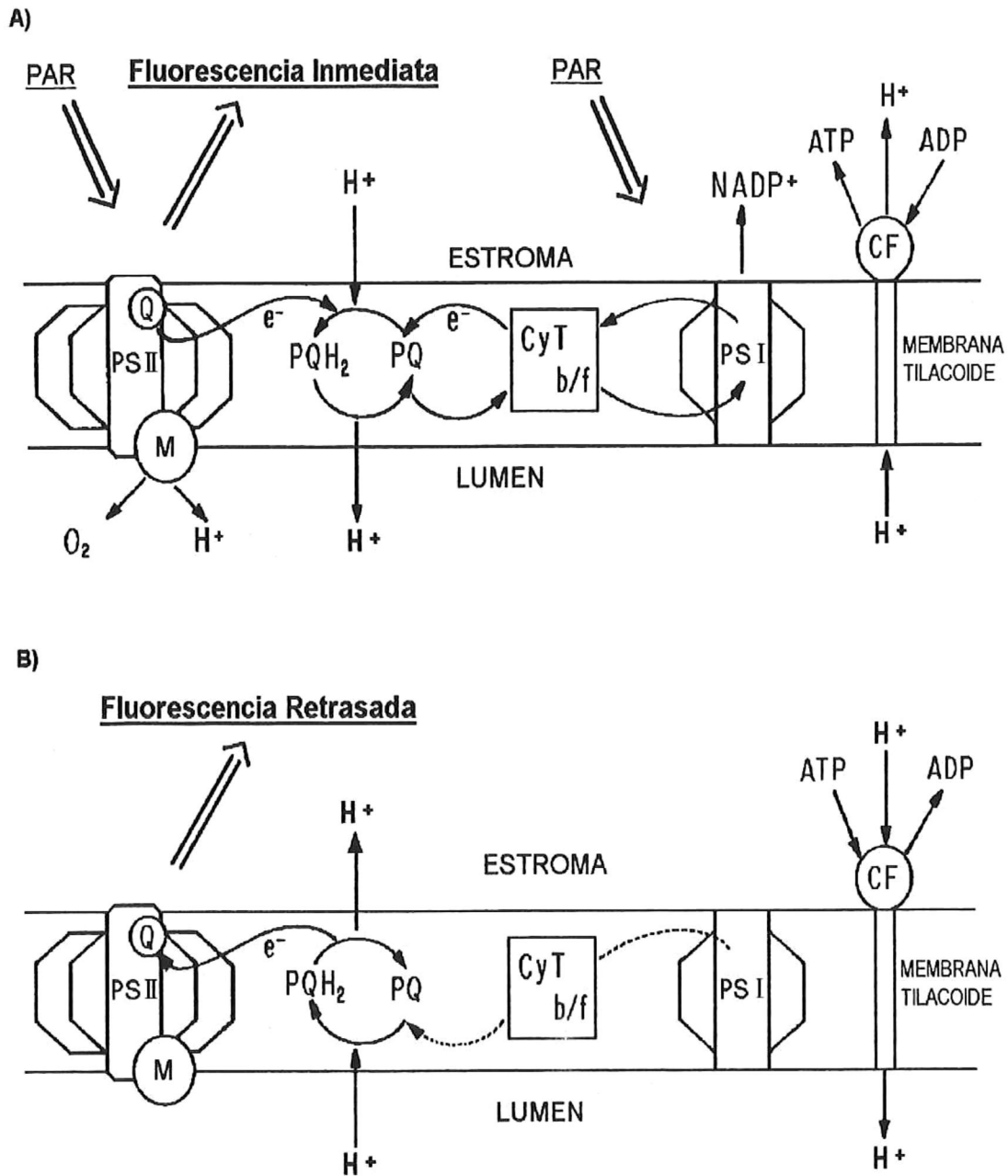


Figura 1.2: A) Representación diagramática de la fluorescencia inmediata.

B) Representación diagramática de la fluorescencia retrasada (en oscuridad).

PS I, PS II, fotosistemas I y II; el resto de los símbolos como en la Figura 1.1.

Con la finalidad de desarrollar un método de monitoreo biológico para aguas naturales, que cumpla con requisitos de precisión, rapidez y bajo costo, utilizando los cambios en el cociente de los valores de la fluorescencia retrasada y fluorescencia inmediata del fitoplancton, como indicador de daño fisiológico causado por tóxicos, en el departamento de ecología del plancton del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE), el Dr. Helmut Maske diseñó y construyó un sistema con la finalidad de detectar daño fisiológico en microalgas, midiendo y relacionando las emisiones de ambos tipos de fluorescencia de una suspensión de fitoplancton simultáneamente.

Utilizando este sistema se intenta detectar cambios significativos en la relación entre la fluorescencia inmediata y retrasada de una suspensión de microalgas, que manifiesten daños fisiológicos en su aparato fotosintético causados por sustancias tóxicas, como el Diuron, un herbicida ampliamente usado que interrumpe la transferencia de electrones en las reacciones fotoquímicas (Geider y Osborne, 1992; Cremlyn 1986; Van Coillie *et al.*, 1983; Villarias, 1981); el cloruro de mercurio (HgCl_2) con efectos tóxicos, documentados, sobre una amplia gama de organismos y entre ellos el fitoplancton (Cloutier-Mantha y Harrison, 1980); o el herbicida comercial Faena, utilizado en la agricultura y jardinería de la región, como tratamiento postemergente de malezas.

2 OBJETIVO

Evaluar la sensibilidad del sistema de medición simultánea de fluorescencia inmediata y retrasada a cambios producidos en suspensiones de fitoplancton cultivado, por la exposición a distintas concentraciones de Diuron, cloruro de mercurio (HgCl_2) o del herbicida comercial Faena (glifosfato).

3 MÉTODO

3.1. Cultivo de Microalgas:

Se generaron pares de monocultivos estáticos de alguna de las especies: *Skeletonema costatum*, *Isochrysis galvana* o *Monochrysis sp.* para cada experimento, se utilizó medio f/20 (Guillard) contenidos en matraces bola para cultivo de 6 litros con tapones de gasa, agitados por aire pasado por filtros de membrana de $0.2 \mu\text{m}$, mantenidos a una temperatura de $21^\circ \pm 1^\circ \text{C}$ y a una intensidad de luz aproximada de $300 \mu\text{E s}^{-1}\text{m}^{-2}$ (cultivo 'Luz Alta' [LA]), un matraz de cada par fue adaptado a aproximadamente $20 \mu\text{E s}^{-1}\text{m}^{-2}$ (cultivo 'Luz Baja' [LB]) de intensidad de luz, por lo menos 48 horas antes de ser utilizado.

3.2. Material de Prueba :

Se utilizó: Diuron (3-[3,4-diclorofenil]-1,1-dimetilurea; DCMU), en solución acuosa base con concentración de 0.1165 g/l . Mercurio en forma de cloruro de mercurio (HgCl_2), en solución acuosa base 0.36 mM . Y el herbicida de marca comercial Faena, con glifosfato [N(fosfometil)glicina] como ingrediente activo en forma de la sal isopropilamina de glifosfato en concentración mayor al 49% peso/peso.

3.3. Mediciones:

De cada suspensión de fitoplancton disponible (en cultivo 'LA' y 'LB') en fase de crecimiento exponencial, se tomaron muestras homogéneas a las que se les agregaron los tóxicos conforme a la Tabla 3.A. Después de intoxicar cada muestra y mantener en promedio 3 h. bajo una intensidad de luz equivalente a la adaptada en cultivo, se procedió a medir la fluorescencia inmediata y retrasada de cada muestra

La medición de los dos tipos de fluorescencia fue tomada en el sistema que se encuentra representado en la Figura 3.1., que está compuesto por: una fuente de irradiancia fotosintéticamente activa (PAR) controlada por filtros espectralmente neutrales (F), un baño de agua a temperatura constante y contenedor para la muestra (S), una bomba peristáltica (B), una celda de emisión adaptada a un fluorómetro para HPLC (Kratos, modelo FS 920 Fluoromat) modificado para registrar la fluorescencia retrasada (DF) y un fluorómetro con celda de flujo continuo para la fluorescencia inmediata (PF).

El procedimiento utilizado es el siguiente: una vez encendidos y estabilizados los fluorómetros, aproximadamente 100 ml de la muestra se coloca en el contenedor dentro del baño de agua, se introducen en la muestra las mangueras que permiten la circulación continua de esta por el sistema, se enciende la bomba peristáltica, se ajusta a una velocidad de 150 ml/min y se extraen las burbujas de aire que pudieron quedar en el sistema. La secuencia de medición es: la muestra es expuesta a cierto nivel de irradiancia en el contenedor, tras pasar por una trampa para luz (T) entra a una celda de emisión adaptada al fotomultiplicador del fluorómetro Kratos FS 920 donde es registrada la fluorescencia retrasada (DF), después de pasar por otra trampa para luz la muestra ingresa a una celda de flujo continuo del fluorómetro Turner A 111 donde se mide la fluorescencia inmediata (PF), posteriormente regresa al contenedor.

Tabla 3.A.: Experimentos realizados, especie y tratamiento correspondiente. * Experimentos donde se utilizó cultivo adaptado a baja intensidad de luz: N.A., No aplicable.

No. DE EXPERIMENTO	ESPECIE UTILIZADA	NOMBRE MUESTRA	VOLUMEN CULTIVO [ml]	SOL. TÓXICA UTILIZADA	CANTIDAD AGREGADA [ml]	FACTOR DE DILUCIÓN	CONC. DE TRABAJO [ppm]
41125214	Skeletonema c.	Única	Necesario	Ninguna	N.A	N.A	N.A
41125224 *	Skeletonema c.	Única	Necesario	Ninguna	N.A	N.A	N.A
41126005	Skeletonema c.	Control	250	Ninguna	N.A	N.A	N.A
		DAB	250	DCMU [117] ppm	0.005	50000	0.00234
		DAM	250	DCMU [117] ppm	0.1	2500	0.0468
		DAA	250	DCMU [117] ppm	2.5	100	1.17
		HAB	250	HgCl ₂ [97.56] ppm	0.005	50000	0.001951
		HAM	250	HgCl ₂ [97.56] ppm	0.1	2500	0.039
		HAA	250	HgCl ₂ [97.56] ppm	2.5	100	0.9756
50130	Monochrysis sp.	Control	300	Ninguna	N.A	N.A	N.A
		D1A	300	DCMU [117] ppm	0.005	60000	0.00195
		D2A	300	DCMU [117] ppm	0.1	3000	0.039
		H1A	300	HgCl ₂ [97.56] ppm	0.005	60000	0.001626
		H2A	300	HgCl ₂ [97.56] ppm	0.1	3000	0.03252
50216	Skeletonema c.	Control	200	Ninguna	N.A	N.A	N.A
		D1A	200	DCMU [117] ppm	0.005	40000	0.002925
		D2A	200	DCMU [117] ppm	0.1	2000	0.0585
		H1A	200	HgCl ₂ [97.56] ppm	0.005	40000	0.002439
		H2A	200	HgCl ₂ [97.56] ppm	0.1	2000	0.04878
		F1A	200	FAENA [4.9e+5]ppm	0.001	200000	2.45
		F2A	200	FAENA [4.9e+5]ppm	0.005	40000	12.25
50217 *	Skeletonema c.	Control	200	Ninguna	N.A	N.A	N.A
		D1B	200	DCMU [117] ppm	0.005	40000	0.002925
		D2B	200	DCMU [117] ppm	0.1	2000	0.0585
		H1B	200	HgCl ₂ [97.56] ppm	0.0005	400000	0.00024
		H2B	200	HgCl ₂ [97.56] ppm	0.005	40000	0.00244
		F1B	200	FAENA [4.9e+5]ppm	0.00002	10000000	0.049
		F2B	200	FAENA [4.9e+5]ppm	0.0001	200000	0.245

Tabla 3.A.: (continuación)

50316	Isochrysis g.	Control	200	Ninguna	N.A	N.A	N.A
		D1A	200	DCMU [117] ppm	0.005	40000	0.002925
		D2A	200	DCMU [117] ppm	0.1	2000	0.0585
		H1A	200	HgCl ₂ [97.56] ppm	0.0005	400000	0.00024
		H2A	200	HgCl ₂ [97.56] ppm	0.005	40000	0.00244
		F1A	200	FAENA [4.9e+5]ppm	0.00002	10000000	0.049
		F2A	200	FAENA [4.9e+5]ppm	0.0001	200000	0.245
		50317 *	Isochrysis g.	Control	200	Ninguna	N.A
D1B	200	DCMU [117] ppm		0.005	40000	0.002925	
D2B	200	DCMU [117] ppm		0.1	2000	0.0585	
H1B	200	HgCl ₂ [97.56] ppm		0.0005	400000	0.00024	
H2B	200	HgCl ₂ [97.56] ppm		0.005	40000	0.00244	
F1B	200	FAENA [4.9e+5]ppm		0.00002	10000000	0.049	
F2B	200	FAENA [4.9e+5]ppm		0.0001	200000	0.245	
50724	Skeletonema c.	Control		250	Ninguna	N.A	N.A
D1A		250	DCMU [117] ppm	0.005	50000	0.00234	
D2A		250	DCMU [117] ppm	0.1	2500	0.0468	
H1A		250	HgCl ₂ [97.56] ppm	0.0005	500000	0.000195	
H2A		250	HgCl ₂ [97.56] ppm	0.005	50000	0.00195	
F1A		250	FAENA [4.9e+5]ppm	0.000002	125000000	0.00392	
F2A		250	FAENA [4.9e+5]ppm	0.00002	12500000	0.0392	
50728 *		Skeletonema c.	Control	250	Ninguna	N.A	N.A
D1B	250		DCMU [117] ppm	0.005	50000	0.00234	
D2B	250		DCMU [117] ppm	0.1	2500	0.0468	
H1B	250		HgCl ₂ [97.56] ppm	0.0005	500000	0.000195	
H2B	250		HgCl ₂ [97.56] ppm	0.005	50000	0.00195	
F1B	250		FAENA [4.9e+5]ppm	0.000002	125000000	0.00392	
F2B	250		FAENA [4.9e+5]ppm	0.00002	12500000	0.0392	

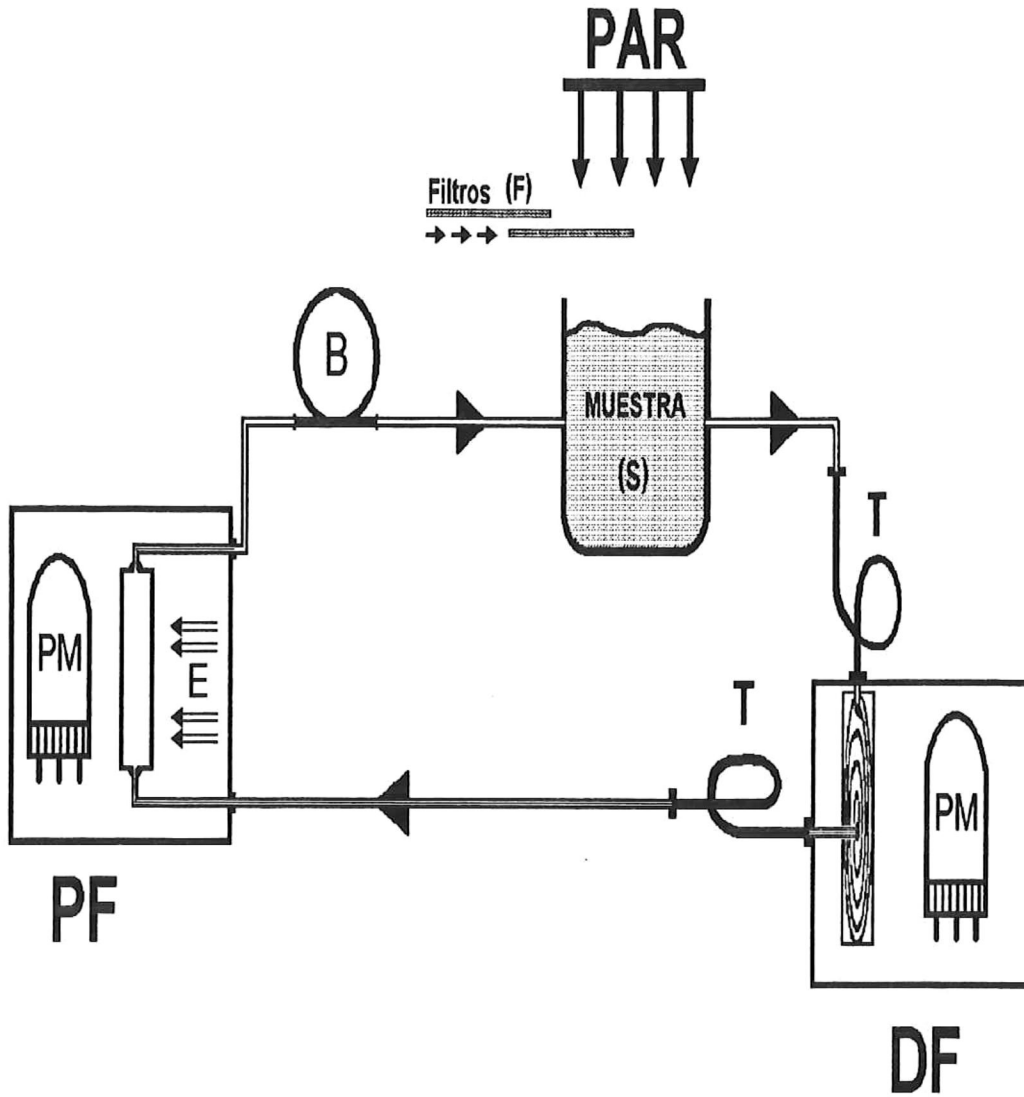


Figura 3.1.: Esquema del sistema de medición continua de fluorescencia inmediata (**PF**) y retrasada (**DF**) utilizado. **PAR**, Radiación fotosintéticamente activa; **F**, Filtros para atenuación de la irradiancia; **S**, muestra; **B**, Bomba peristáltica; **T**, Trampa de luz; **E**, Luz de excitación; **PM**, fotomultiplicador.

La señal de fluorescencia retrasada (DF) que es registrada es aquella que entra en un intervalo de tiempo estimado que va desde 0.44 a 6.04 s.; esto dado por la velocidad del flujo, la longitud de la trampa de luz, el volumen tanto de la trampa de luz como de la celda de emisión y la probabilidad de permanencia de las microalgas en la celda.

Cada muestra fue expuesta a tres distintos niveles de irradiancia excepto en el experimento inicial donde se utilizaron 8 niveles de irradiancia; en cada irradiancia se realizaban mediciones 6 minutos a fin de permitir que las señales alcanzaran cierta estabilidad. Esta irradiancia cumple con dos funciones, nos permite observar el desarrollo de la fotosíntesis y la respuesta adaptativa del aparato fotosintético a los distintos niveles de irradiancia, así como servir de fuente de excitación para la fluorescencia retrasada.

La irradiancia fue modificada al interponer filtros de doble capa de tela negra de fibra de vidrio, con luz de malla de 0.5 mm, y medida durante los experimentos por un radiómetro Li-Cor modelo LI-188B, con sensibilidad direccional geométrica coseno.

Los datos obtenidos de ambos fluorómetros y del radiómetro fueron capturados y grabados en memoria electromagnética cada 4 segundos con ayuda de una tarjeta de interfase análogo digital marca Strawberry Tree modelo DATAshuttle-12 (12 bits, 5 kHz) y un ordenador (80286 compatible IBM).

3.4. Tratamiento de los Datos:

Se realizaron diez experimentos en total, dos de ellos sin tóxico alguno, uno por tipo de cultivo (LA y LB), probando 8 niveles de luz de excitación (irradiancia). En los restantes se utilizaron los tóxicos así como alguna de las tres especies de microalgas antes mencionadas y probando tres niveles de irradiancia.

En cada experimento se generó una serie de datos de fluorescencia inmediata, fluorescencia retrasada e intensidad de luz (ejemplo en Tabla 3.B), que al ser graficados respecto al tiempo nos muestra el espectro de respuesta de las muestras durante el desarrollo del experimento como, por ejemplo, se observa en la figura 3.2.

Los datos de fluorescencia obtenidos fueron corregidos por el valor de su correspondiente blanco de agua destilada; posteriormente se calculó el promedio de los últimos diez datos, que corresponden al último minuto de cada nivel de irradiancia utilizado, como valor representativo (DF_m y PF_m). Esto se realizó para cada registro de ambos tipos de fluorescencia.

Los valores de fluorescencia, tanto inmediata (PF_m) como retrasada (DF_m), se dividieron sobre el valor del control correspondiente (PF_c , DF_c); obteniendo los valores normalizados y razón de cambio de la fluorescencia inmediata ($PF_n = PF_m/PF_c$) y la fluorescencia retrasada ($DF_n = DF_m/DF_c$) para cada tratamiento (tablas en Anexo I), con los cuales se calculó la relación fluorescencia retrasada/fluorescencia inmediata (DF_n/PF_n), que representa la proporción de cambio de la relación causada por los tóxicos.

Tabla 3.B.: Ejemplo de parte de un archivo de datos de fluorescencia inmediata (PF), fluorescencia retrasada (DF) e irradiancia (PAR). Abreviaciones: st4b, solución estándar '4b' de HgCl₂; st4, solución estándar '4' de HgCl₂; st3, solución estándar '3' de DCMU; st, solución estándar 'base' de DCMU; s3, solución '3' de Faena; s4, solución '4' de Faena.

<u>50728200.WQ1</u>							
50728200.TXT Cultivo: <i>Skeletonema c.</i>							
2 días en luz baja. medio f/20.							
Secuencia:							
Control,							
HgCl ₂ : 0.1 ml st4b,0.1 ml st4;							
DCMU 0.1 st3, 0.1 st;							
Faena 0.1 s3,0.1 s4.							
<u>Tiempo</u>	<u>PF</u>	<u>DF</u>	<u>PAR</u>	<u>Tiempo</u>	<u>PF</u>	<u>DF</u>	<u>PAR</u>
20:07:03	0.88691	0.21818	0.01442	20:08:27	0.79132	0.18921	0.087425
20:07:07	0.88353	0.2066	0.00086	20:08:31	0.79069	0.1933	0.087115
20:07:11	0.88218	0.19924	0.000816	20:08:35	0.78438	0.19103	0.08685
20:07:15	0.87142	0.19604	0.000816	20:08:39	0.78564	0.19148	0.087781
20:07:19	0.85014	0.19148	0.086479	20:08:43	0.77746	0.1933	0.086718
20:07:23	0.82463	0.18152	0.086411	20:08:47	0.77809	0.19194	0.086455
20:07:27	0.8143	0.18288	0.086279	20:08:51	0.7806	0.19239	0.085842
20:07:31	0.80276	0.18288	0.086718	20:08:55	0.78186	0.19422	0.085799
20:07:35	0.7983	0.18876	0.086235	20:08:59	0.78123	0.19604	0.086586
20:07:39	0.78879	0.18694	0.086455	20:09:03	0.78186	0.19513	0.086455
20:07:43	0.78627	0.18785	0.086894	20:09:07	0.77809	0.19467	0.087692
20:07:47	0.78375	0.18559	0.087514	20:09:11	0.78186	0.19558	0.087959
20:07:51	0.78186	0.1874	0.086542	20:09:15	0.78186	0.19604	0.088227
20:07:55	0.78186	0.18604	0.087381	20:09:19	0.78879	0.1965	0.088892
20:07:59	0.78249	0.1883	0.087292	20:09:23	0.79426	0.2006	0.087932
20:08:03	0.78249	0.18604	0.087159	20:09:27	0.79489	0.20014	0.089071
20:08:07	0.78816	0.1874	0.087381	20:09:31	0.79299	0.19923	0.088303
20:08:11	0.78627	0.1883	0.087115	20:09:35	0.79299	0.20014	0.087665
20:08:15	0.78942	0.19285	0.087248	20:09:39	0.79109	0.20244	0.087665
20:08:19	0.7869	0.19012	0.088048	20:09:43	0.79109	0.19923	0.087887
20:08:23	0.79259	0.1874	0.088227	20:09:47	0.79046	0.20381	0.087887

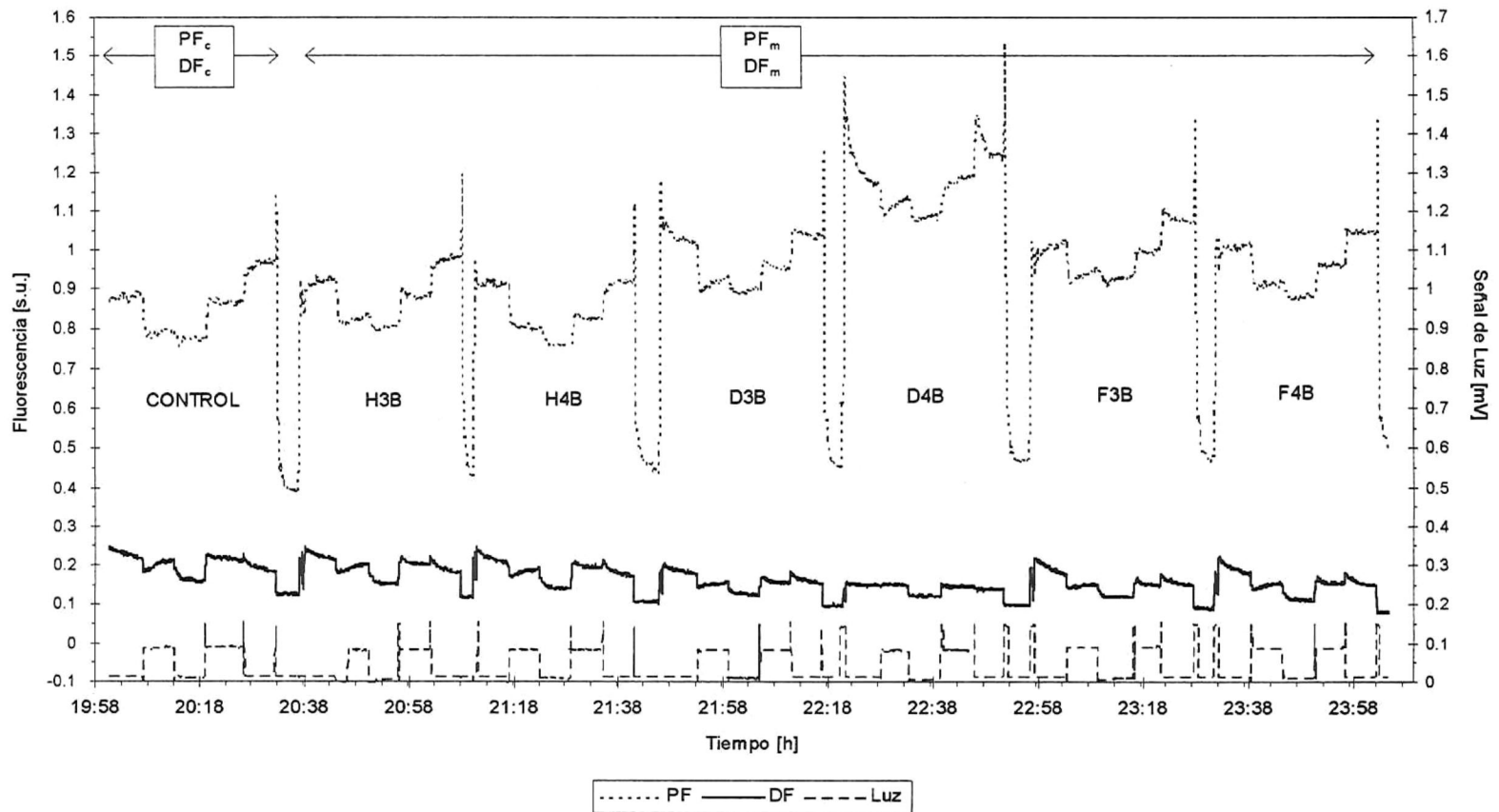


Figura 3.2.: Representación gráfica de los valores de fluorescencia inmediata (PF), retrasada (DF) y luz; que ejemplifica el espectro de respuesta obtenido en los distintos experimentos. (H3B, H4B, D3B, ..., F4B), muestras. PF_c y DF_c , medición de PF y DF del control; PF_m y DF_m , medición de PF y DF de las muestras.

4 RESULTADOS

4.1. Fluorescencia inmediata (PF) y Fluorescencia retrasada (DF)

Los primeros dos experimentos (#41125214 y #41125224), nos ayudaron a caracterizar la emisión de fluorescencia inmediata (PF) y fluorescencia retrasada (DF), utilizando *Skeletonema c.* como organismo de prueba. En un experimento se utilizaron microalgas cultivadas a una intensidad de luz de $300\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aproximadamente (LA), y en el otro las microalgas fueron adaptadas a baja intensidad de luz (LB) alrededor de $20 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Durante el desarrollo de estos experimentos se utilizaron seis filtros de malla, en diferentes combinaciones, para obtener ocho niveles de luz de excitación, a fin de obtener un espectro de respuesta mas detallado.

La respuesta de ambos tipos de fluorescencia presentan semejanzas entre sí (Figura 4.1), con tendencia a aumentar con la irradiancia, con excepción hecha para el cultivo LA para irradiancias mayores de $80 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ donde muestra una disminución en la señal.

4.2. Efecto de la especie y tipo de cultivo sobre la relación DF/PF

En la Figura 4.2. se encuentran graficados, por especie y tipo de cultivo, los valores de la relación DF/PF de los controles de todos los experimentos realizados, a causa de las distintas concentraciones de clorofila entre los experimentos los datos resultan dispersos, de manera que no pueden ser apreciados debidamente, para compensar este efecto, los datos fueron estandarizados al promedio de los valores correspondientes a $17.7 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de cada tratamiento (Figura 4.3.).

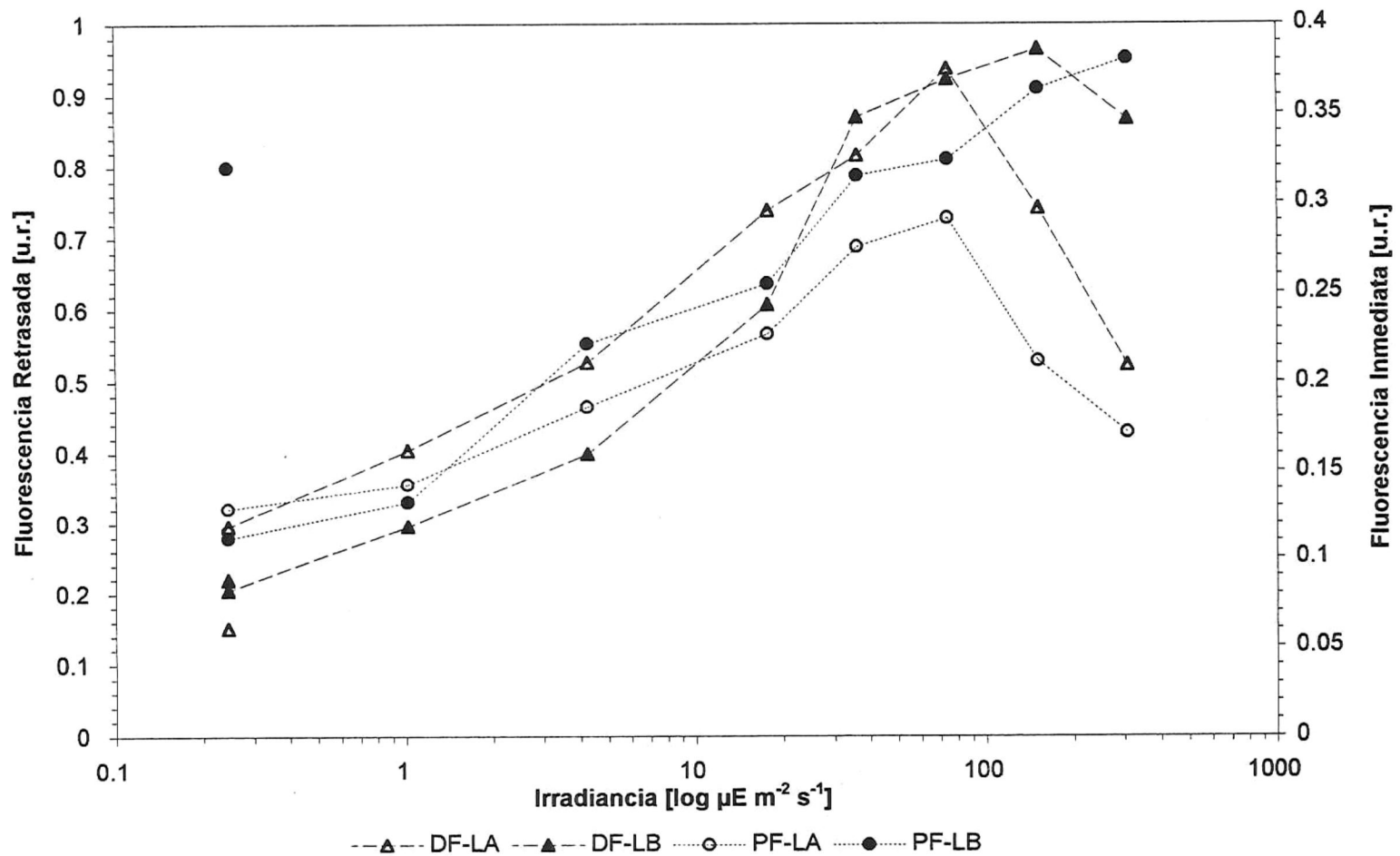


Figura 4.1.: Comportamiento de la señal, sin normalizar, de fluorescencia inmediata (PF) y fluorescencia retrasada (DF) de cultivos adaptados a luz alta (LA) y a luz baja (LB). Los datos a $0.24 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no conectados fueron tomados después de la medición a la irradiancia mas alta.

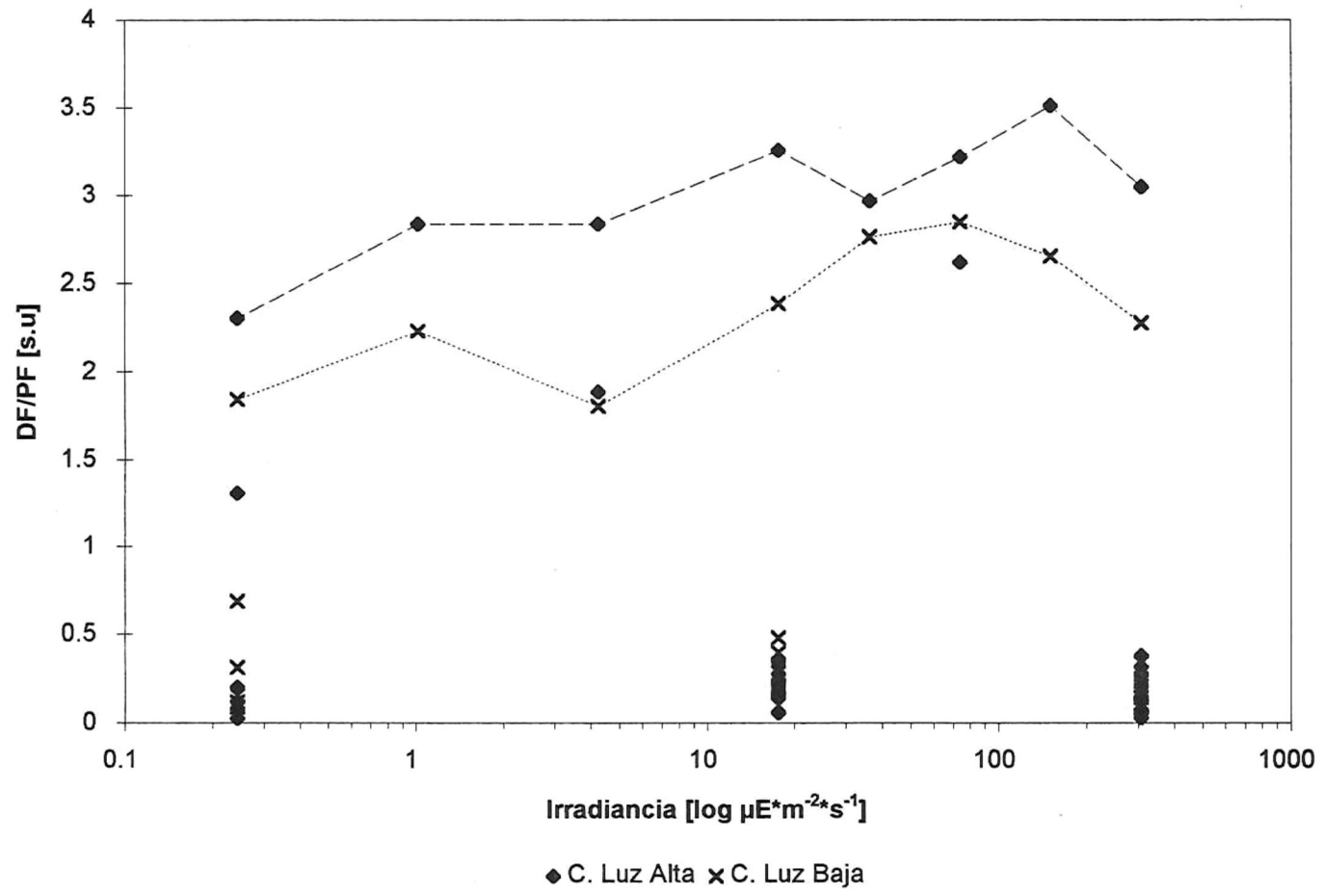


Figura 4.2.: Valores de la relación DF/PF (sin estandarizar) calculados para los controles de todos los experimentos. Los puntos conectados corresponden a los de la Fig. 4.1.

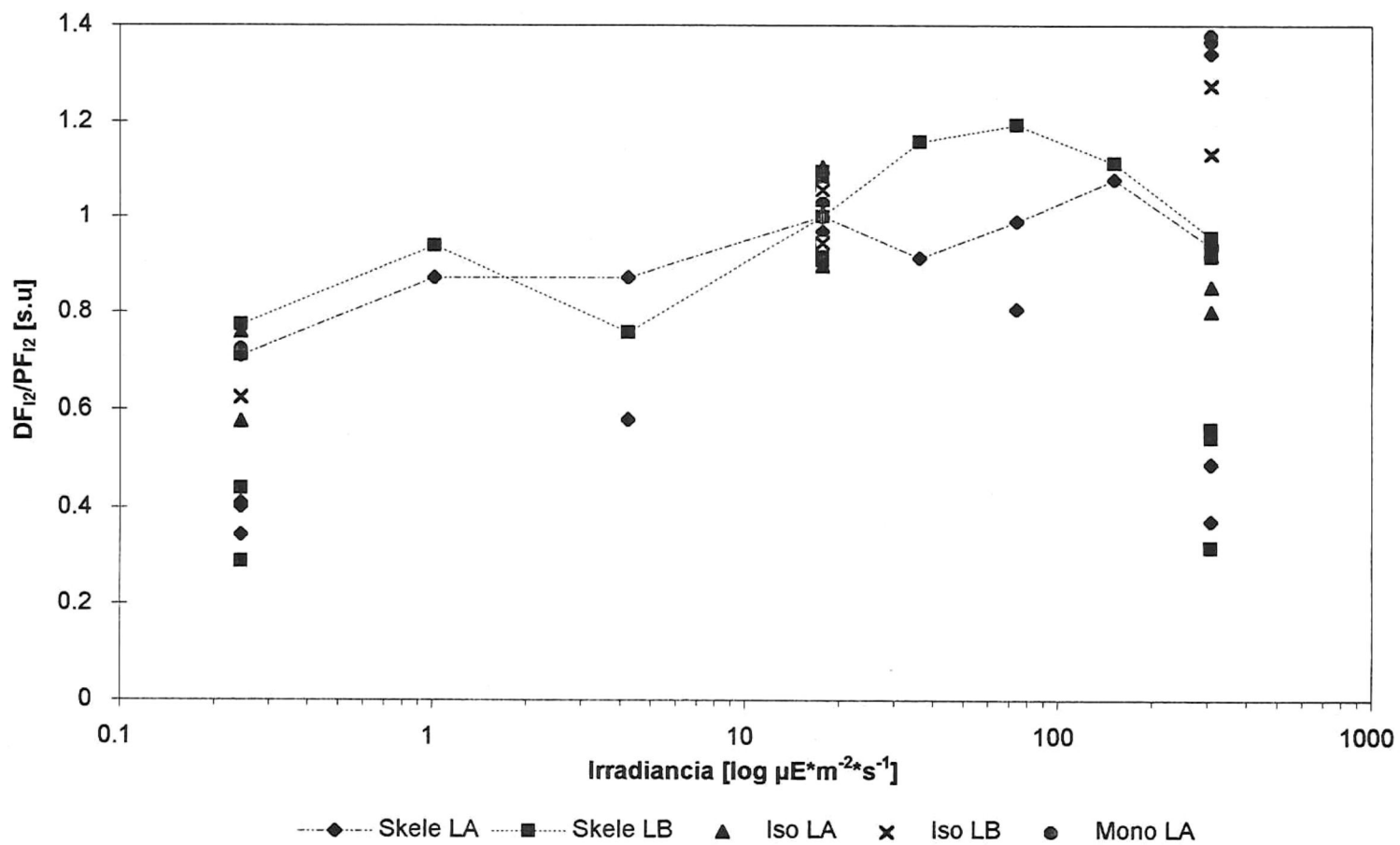


Figura 4.3.: Relación DF_{12}/PF_{12} (estandarizada) de los controles de todos los experimentos, por tipo de cultivo y especie. Skele, *Skeletonema c.*; Iso, *Isocrysis g.*; Mono, *Monocrysis sp.* LA, cultivo luz alta; LB, cultivo luz baja. Los puntos conectados corresponden a los de la Fig. 4.1.

No puede apreciarse una diferencia clara entre las respuestas de distintos tipos de cultivo, en cuanto a las respuestas por especie tampoco pueden distinguirse, a excepción de la respuesta a $308 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de *Isocrysis galvana* y *Monocrysis sp.* que no presentan una reducción marcada como en la respuesta de *Skeletonema costatum*.

4.3. Efecto de tóxicos sobre DF/PF

La razón de cambio de la relación DF/PF de las muestras intoxicadas a las diferentes concentraciones utilizadas de DCMU respecto a su control correspondiente puede ser observado en la Figura 4.4.. Existe una reducción del 40 al 70% en la relación DF/PF respecto al control para las concentraciones utilizadas.

Para HgCl_2 (Figura 4.5.) y FAENA (Figura 4.6) no se aprecian cambios significativos en la relación de trabajo (DF/PF) respecto al control, en las concentraciones utilizadas.

El DCMU a 1.17 ppm redujo el valor de la relación prácticamente a cero (no se muestra en Figura 4.4.) ; para el cloruro de mercurio, 0.976 ppm inhibió totalmente la emisión de ambos tipos de fluorescencia (no se muestra en Figura 4.5.); el mismo efecto fue causado por 2.45 ppm de FAENA (no se muestra en Figura 4.6.).

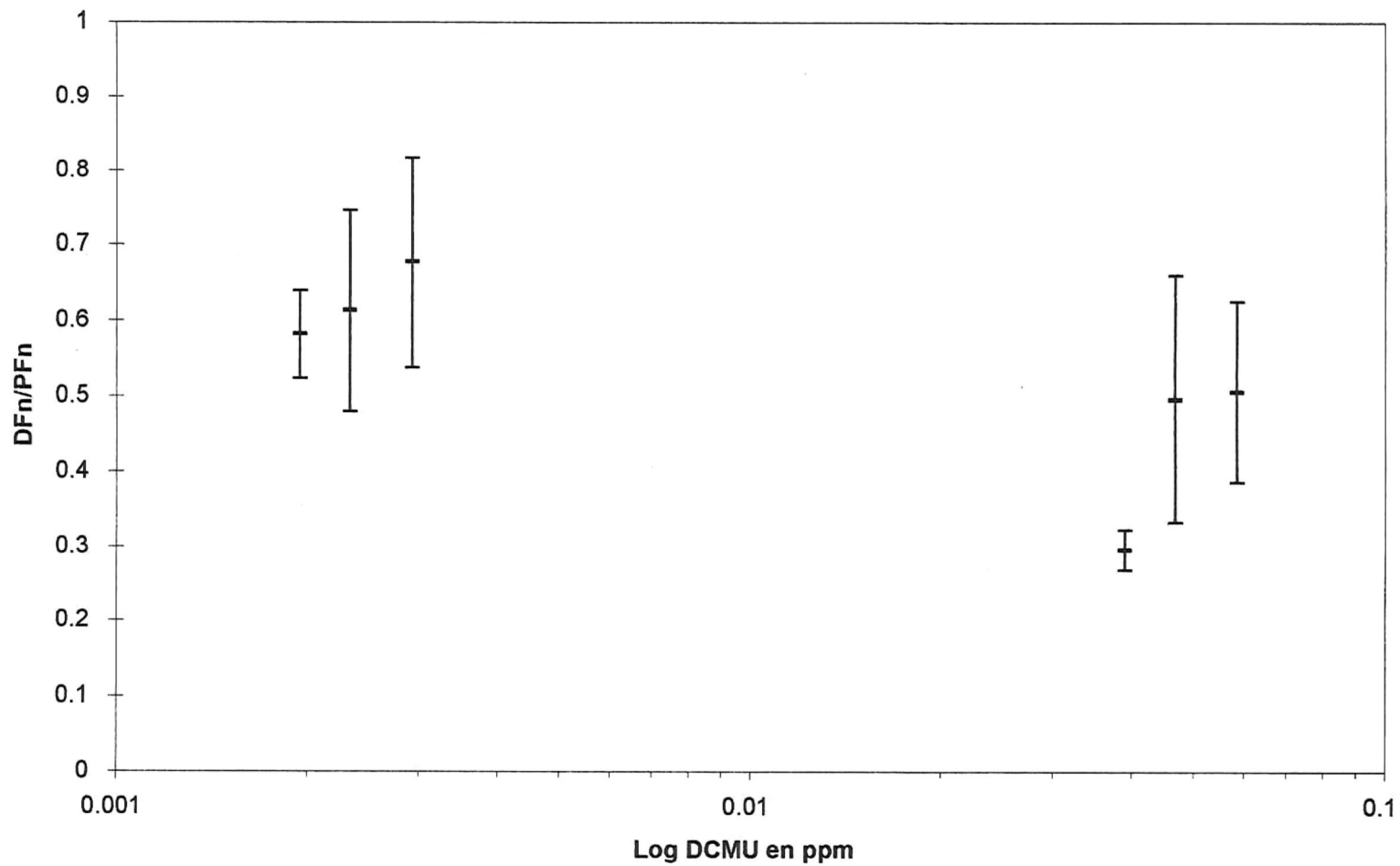


Figura 4.4.: Efecto de la concentración de DCMU sobre la relación DF_n/PF_n . DF_n/PF_n de los controles = 1.0 . Media mas menos una desviación estandar.

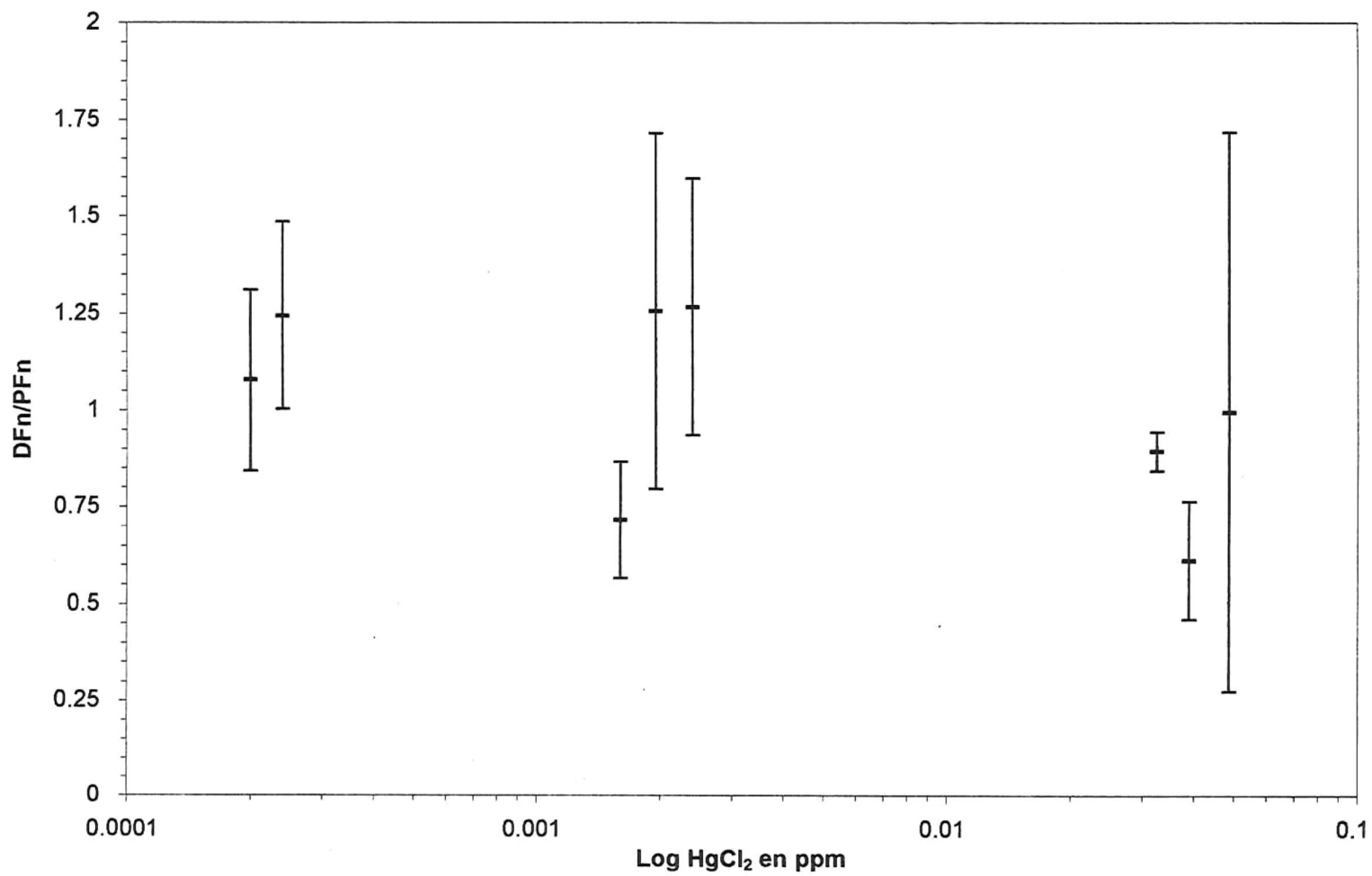


Figura 4.5.: Efecto de la concentración de HgCl₂ sobre la relación DFn/PFn. DFn/PFn de los controles = 1.0 . Media mas menos una desviación estandar.

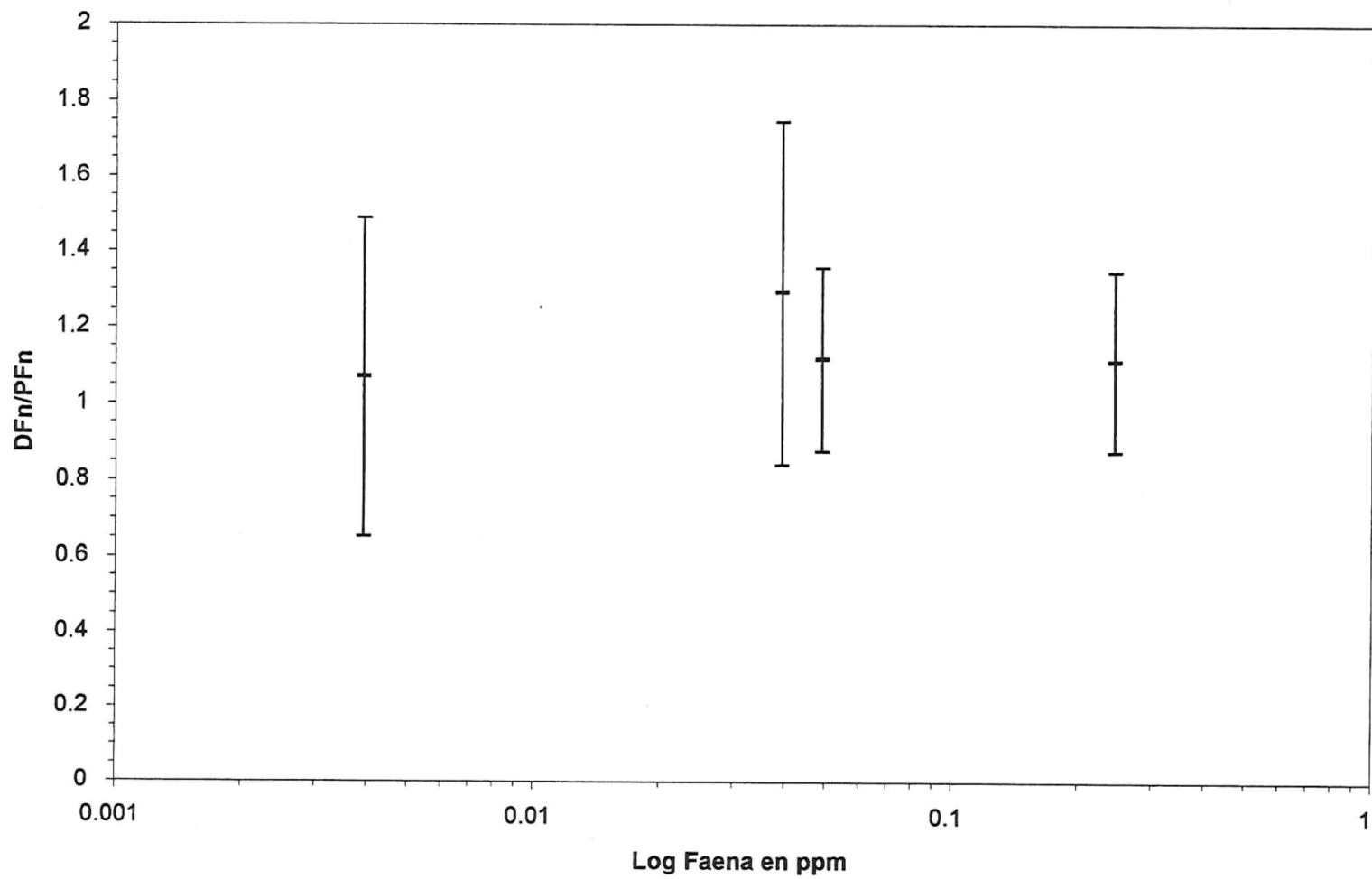


Figura 4.6.: Efecto de la concentración de Faena sobre la relación DF_n/PF_n . DF_n/PF_n de los controles = 1.0 . Media mas menos una desviación estandar.

5 DISCUSIONES

5.1. Fluorescencia Inmediata y Fluorescencia Retrasada

La respuesta a la irradiancia (PAR, Fig. 3.1) de ambos tipos de fluorescencia presentan un comportamiento similar. A irradiancias menores de $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ presentan una primera fase de aumento con tendencia lineal, seguida por una fase de fotosaturación del aparato fotosintético donde la fluorescencia es independiente de la irradiancia y por una ultima fase de fotoinhibición donde la fluorescencia se reduce con el aumento de la irradiancia. El comportamiento mostrado en general es parecida a la respuesta de la fotosíntesis a la irradiancia.

En el comportamiento de la señal de fluorescencia inmediata (PF) se representa la adaptación fisiológica del aparato fotosintético a distintas irradiancias (PAR, Fig. 3.1.) pues la irradiancia de excitación (E, Fig. 3.1.) utilizada en el fluórometro se mantiene constante y es de poca intensidad. A bajas irradiancias el aparato se ajusta para aprovechar de manera mas eficiente los excitones disponibles por lo que la fluorescencia inmediata es mínima, al aumentar la irradiancia (PAR) se va adecuando a utilizar los excitones con la capacidad que presente el sistema fotoquímico, de esta manera al llegar al límite de capacidad fotoquímica la fluorescencia inmediata tiende a aumentar con el incremento de la irradiancia hasta el punto de mayor fluorescencia que esta determinado por la cantidad de pigmentos, el número de centros de reacción y la cantidad de células, entre otros factores.

En cuanto a la señal de fluorescencia retrasada (DF), al depender de la formación del gradiente de protones en el proceso fotoquímico y de la energía residual en el sistema fotoquímico, nos puede dar idea de la integridad del aparato fotosintético y la capacidad de éste para formar el gradiente de protones.

Mientras la fluorescencia inmediata nos indica cambios en la eficiencia cuántica de la separación de cargas, primer paso de la fotosíntesis, la fluorescencia retrasada muestra la capacidad del aparato fotosintético de generar el gradiente de protones.

Aún cuando la PF es resultado de la liberación de energía captada por los pigmentos pero no utilizada en el sistema fotoquímico, y en cambio la DF es resultado de la liberación de la energía contenida en el sistema fotoquímico y/o el gradiente de protones (Fig. 1.1. y 1.2.), ambas presentan un comportamiento similar, pues a bajas irradiancias el aparato fotosintético utiliza mas eficientemente los excitones para la fotosíntesis y el gradiente de protones se encuentra en formación. Al aumentar la irradiancia se reduce la eficiencia en aprovechamiento de los excitones para la fotosíntesis, debido a que el aceptor de electrones (PQ, Fig. 1.1 y 1.2) se encuentra reducido mas tiempo, resultando en un aumento de PF, y el flujo electrónico en el sistema fotoquímico (de PS II a PS I, Fig. 1.2.) se acerca al punto de saturación aumentando también el gradiente de protones, generador de DF. Al continuar el aumento de la irradiancia se alcanza el punto de fotosaturación del sistema, no pueden utilizarse más excitones y el exceso se transforma en calor o PF. En el sistema de medición que se utilizó en el presente estudio, la irradiancia de excitación (E) del fluorometro para PF no cambia, por esto, la PF depende de la cantidad de pigmentos, centros de reacción y otras características celulares, mientras DF también se independiza de la irradiancia al estar funcionando al máximo el sistema. Alta irradiancia puede llegar a causar daño sobre los pigmentos y el aparato fotosintético en general provocando una reducción de ambos tipos de fluorescencia.

La respuesta de ambos tipos de fluorescencia en las dos formas de cultivo pueden ser ajustadas al tipo de curvas fotosíntesis-irradiancia (P-I) utilizadas en el estudio de la fotosíntesis (Platt, et al., 1980) como se puede apreciar en las Figuras 5.1. y 5.2.

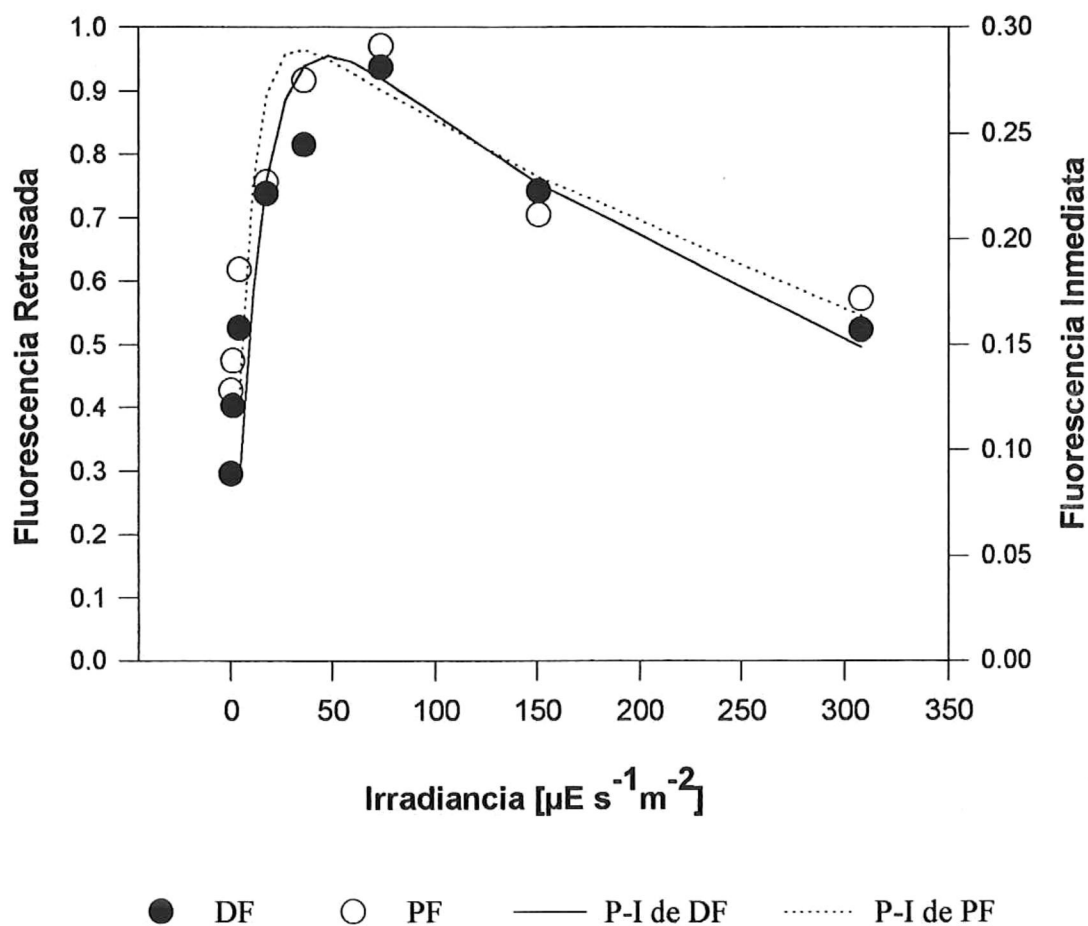


Figura 5.1. Ajuste de fluorescencia inmediata (PF) y fluorescencia retrasada (DF) del cultivo adaptado a luz alta (LA) a curvas tipo P-I. Curvas P-I de acuerdo al modelo $P=Ps(1-e^{-aI})e^{-bI}$ según Platt et al., 1980. En el ajuste para DF, $a=0.078$, $b=0.003$ y $Ps=1.127$. En el ajuste para PF $a=0.036$, $b=0.00068$ y $Ps=0.317$.

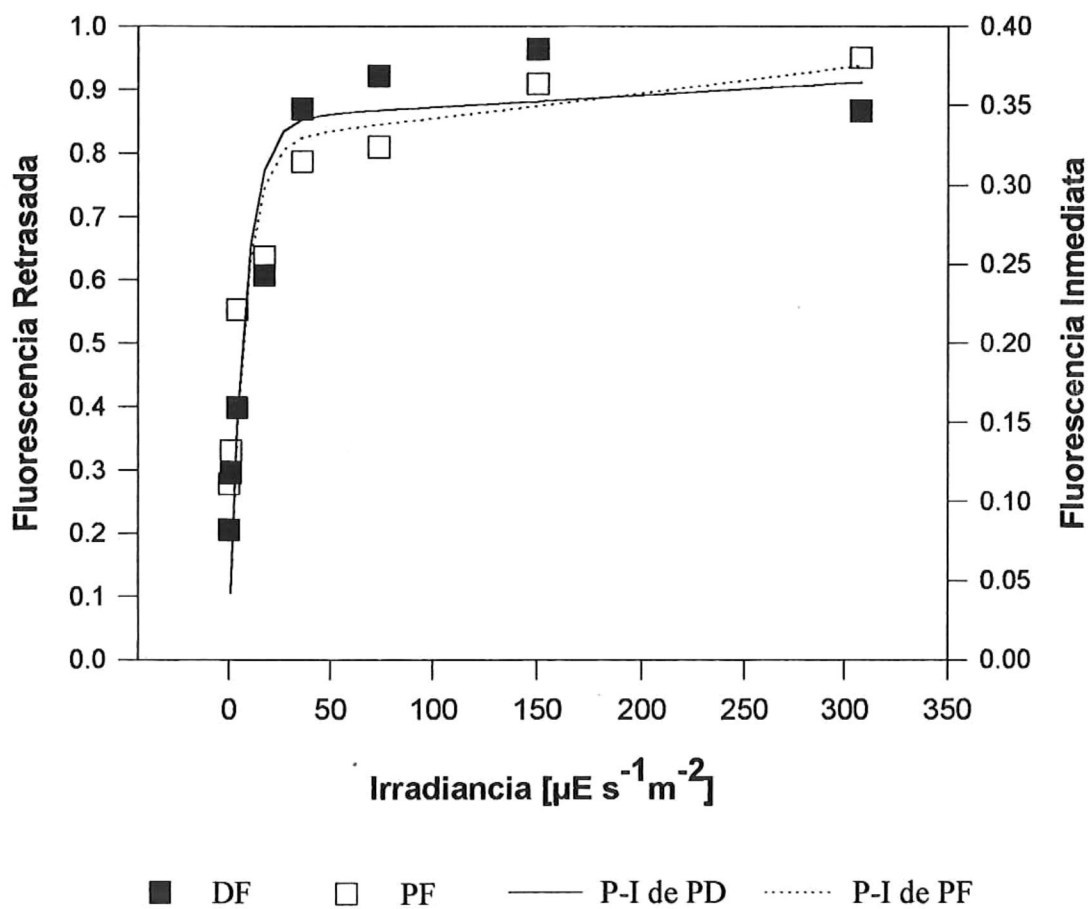


Figura 5.2. Ajuste de fluorescencia inmediata (PF) y fluorescencia retrasada (DF) del cultivo adaptado a luz baja (LB) a curvas tipo P-I. Curvas P-I de acuerdo al modelo $P=Ps(1-e^{-aI})e^{-bI}$ según Platt et al., 1980. En el ajuste para DF, $a=0.113$, $b=1.8 \cdot 10^{-4}$ y $Ps=0.8535$. En el ajuste para PF $a=0.044$, $b=1.46 \cdot 10^{-4}$ y $Ps=0.327$.

Esto permite suponer que la respuesta puede reflejar efectivamente el estado fisiológico de la muestra.

Debe mencionarse que para el cultivo adaptado a alta intensidad de luz (LA) se muestra una fotoinhibición marcada a más de $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, aun cuando esto resulte atípico y no nos sea posible explicarlo, pues es de esperarse que esta fotoinhibición ocurriese con los cultivos adaptados a luz baja (LB). Sin embargo, el hecho que se presente en ambos tipos de fluorescencia resulta en poca interferencia sobre la relación DF/PF.

5.2. Efecto por Especie y Tipo de Cultivo

El sistema de medición utilizado en este bioensayo fue diseñado para utilizar la relación entre ambas fluorescencias para detectar cambios fisiológicos en poblaciones fitoplanctónicas naturales, el utilizar muestras de poblaciones naturales pudiera evitar el gasto de material y tiempo en mantener un cultivo estático. Sin embargo, por el cambio en la composición taxonómica de las poblaciones fitoplanctónicas naturales, reflejados en el carácter fisiológico de la muestra, se optó por utilizar cultivos estáticos de tres especies de microalgas como organismo de prueba y adaptarlos a dos intensidades de luz, intentando observar alteraciones en la relación de trabajo DF/PF a causa de estas condiciones.

Utilizando la relación DF/PF de las muestras sin intoxicar (controles) de todos los experimentos, estandarizados al promedio de los valores correspondientes a $17.7 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para compensar el efecto de diferentes concentraciones de clorofila, no es posible determinar patrón alguno, ni por especie y/o tipo de cultivo (Figura 4.3.).

La señal correspondiente a la más alta irradiancia de excitación es la que presenta mayor variación, posiblemente debido a la fotoinhibición y a que la eficiencia del sistema fotoquímico es distinto, según la especie que se trate y/o la intensidad de luz a la que fueron adaptadas las microalgas.

5.3. Efecto por Tóxicos

5.3.1. Relación DF_n/PF_n

La hipótesis de trabajo planteó el utilizar la relación DF/PF para comparar de manera directa entre las concentraciones utilizadas de cada tóxico, y entre los distintos tóxicos utilizados; sin embargo, debido a la variación en la concentración de pigmentos entre cultivos, por tipo iluminación de cultivo y especie utilizada, fue necesario utilizar diferentes configuraciones en los fluorómetros en algunos experimentos. De manera que para comparar el valor de la relación entre los experimentos fue necesario estandarizarlos al control del experimento respectivo, presentando los resultados como razón de cambio respecto al control.

Considerando los efectos por especie o tipo de cultivo como mínimos, la relación estandarizada (DF_n/PF_n) representa el cambio en la suspensión de microalgas provocado por el tóxico. De esta manera el daño fisiológico sobre el sistema fotosintético sólo es evidente en el caso del DCMU; en las respuestas DF_n/PF_n para $HgCl_2$ y Faena no existen diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas.

Este resultado difiere con las expectativas planteadas al inicio del trabajo, la razón de esto puede ser atribuida a factores de carácter técnico metodológicos y/o al tipo de respuesta fisiológica a los tóxicos.

5.3.2. Aspectos técnicos y metodológicos

Las muestras estuvieron expuestas a los tóxicos un promedio de tres horas, por esto pueden considerarse como pruebas de toxicidad aguda. Para DCMU y HgCl_2 se reconocen efectos casi inmediatos (Cremlym, 1986; Hall and Rao, 1987; Lee et al., 1992), pero por el tipo de acción del glifosfato 'Faena', su efecto no puede considerarse inmediato (Klingman y Ashton, 1980; Villarias, 1981), sin embargo para el tiempo de exposición utilizado es muy factible el esperar manifestaciones de intoxicación.

Para HgCl_2 y Faena, en general, la respuesta de fluorescencia retrasada no sufrió la reducción esperada, reflejándose esto en la relación de trabajo (DF/PF).

La fluorescencia retrasada se puede observar en un rango de tiempo relativamente amplio, de microsegundos a minutos, con una reducción en el tiempo aproximada a la forma exponencial. Tomando en cuenta esto se estableció un intervalo de tiempo de medición de fluorescencia retrasada (Figura 5.3.), en función de la disponibilidad y especificaciones de espacio, aparatos, material y por condiciones de diseño.

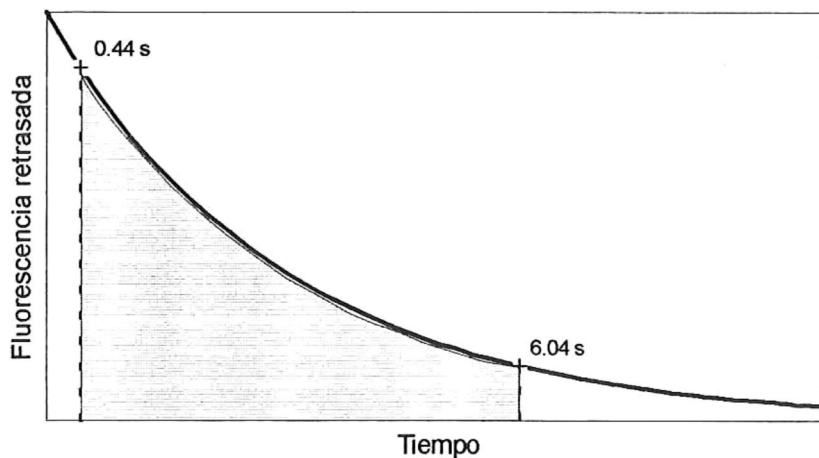


Figura 5.3.: Representación esquemática del intervalo de tiempo utilizado para la medición de la fluorescencia retrasada (hipotético).

Probablemente los períodos de tiempo representan diferentes fuentes de energía que sostienen la fluorescencia retrasada. La energía para la DF que se observa de corto plazo proviene de las plastoquinonas y la que sostiene por períodos más largos probablemente se encuentre almacenada en el gradiente de protones.

Es posible que el rango de tiempo empleado (0.44 a 6.04 s) no fuese el adecuado para detectar claramente la señal de fluorescencia retrasada de manera que indicara daño fisiológico sobre la fuente de energía asociada a este tiempo; sin embargo, para el tratamiento con DCMU es posible observar cambios que afectan la relación DF/PF. Posiblemente el tiempo de retraso fue muy corto y la señal de la fluorescencia fue dominada por el estado de reducción de la cadena de electrones. La fluorescencia retrasada del período entre 0.44 y 6.04 seg. probablemente no mostró el estado del gradiente de protones. De esta manera se puede explicar por qué el DCMU produjo una reducción en la relación DF/PF, debido a que esta sustancia corta el flujo de electrones del sistema fotoquímico (PS II a PS I, Fig. 1.1) mientras los otros tóxicos no afectaron la relación de trabajo DF/PF.

Otra posible explicación del por qué los resultados no cumplen con la hipótesis es que el tiempo utilizado para permitir un ajuste y estabilidad de las respuestas de fluorescencia al tomar los valores de trabajo, en cada nivel de irradiancia utilizado, pudiera no haber sido suficiente para lograr su objetivo. En la Figura 3.2. puede observarse que en algunos casos la señal de ambos tipos de fluorescencia no alcanzaron valores estables

5.3.3 Aspecto fisiológico

Con HgCl_2 y con Faena la relación DF_n/PF_n no reflejó los cambios fisiológicos que ocurrieron en la muestra, posiblemente por la forma en que estos tóxicos afectan el funcionamiento de las células y su blanco específico de acción.

En el caso de HgCl_2 se sabe que los compuestos de mercurio inhiben las funciones fotosintéticas en varios puntos, en especial el sistema de oxidación del agua (water splitting complex) (Lee, *et al* ,1980); siendo éste el punto de acción, no es posible la formación del gradiente de protones, posible fuente de energía de la fluorescencia retrasada, también se evita que la P680, clorofila del centro de reacción II, sea reducida, y en su forma oxidada es un fuerte inhibidor de ambos tipos fluorescencia, perdiéndose la energía en forma de calor, que al afectar los dos tipos de fluorescencia la relación entre ellas no cambia.

El glifosfato (Faena) presenta un efecto mas general sobre las proteínas al inhibir la síntesis de aminoácidos aromáticos (Cremlyn, 1986; Klingman y Ashton, 1980), por esto es factible esperar un efecto análogo al mostrado por el cloruro de mercurio.

5.4. Comparación con otros Bioensayos

Para evaluar la sensibilidad del sistema utilizado se requiere compararlo con otros bioensayos, técnicas o sistemas de monitoreo biológico. Actualmente una de las mas efectivas y utilizadas pruebas de toxicidad es Microtox; esta prueba es un bioensayo que mide la inhibición en la bioluminiscencia de la bacteria marina *Photobacter phosphoreum* a causa de tóxicos contaminantes. También es conveniente el observar resultados obtenidos por otras pruebas en las que se utilizó fitoplancton y en especial aquellas que emplean fluorescencia.

En la tabla 5.A se muestran algunas concentraciones críticas reportadas para los tóxicos de prueba en este trabajo.

Tabla 5.A.: Tabla de concentraciones utilizadas en el presente trabajo y anteriormente reportadas para los tóxicos utilizados. EC50-x', concentración efectiva para mortalidad 50% en x tiempo; LOEC, menor concentración efectiva; CMD, concentración mínima detectable.

Tóxico	Concentraciones Utilizadas	Concentraciones Reportadas	Prueba	Referencias
DCMU	0.00195 ppm (min) 1.17 ppm (max)	16.5 ppm	EC50-5' Microtox	Kaiser & Palabrica 1991
HgCl₂	0.000195 (min) ppm 0.04878 (max) ppm	0.05 ppm 0.068 ppm 0.05 ppm 0.005 ppm	LOEC Microtox EC50 5' Microtox CMD Microtox CMD Microalgas	Huynh, et al. 1994. Rebagay, et al. 1991. Bulich, 1986. Benecke, et al. 1988
FAENA	0.00392 ppm (min) 2.45 ppm (max)	7.73 ppm 7.7 ppm	EC50-30' Microtox EC50 Microtox	Kaiser & Palabrica 1991 Chang <i>et al.</i> 1981

Las concentraciones reportadas para DCMU son de uno a cuatro ordenes de magnitud mayores a las empleadas en este bioensayo; el cambio detectable en la relación DF/PF para las concentraciones utilizadas, la menor (0.00195 ppm) casi cuatro ordenes de magnitud menor a las reportadas, se atribuye a la forma de acción del herbicida, ideal para mostrar el efecto buscado, al incrementar la fluorescencia inmediata y abatir la fluorescencia retrasada.

Aun cuando para cloruro de mercurio y glifosfato (Faena) no se mostró cambio en la relación DF/PF, a una concentración de 0.04878 ppm de HgCl₂ y a 2.45 ppm de Faena la señal de ambos tipos de fluorescencias se abatió hasta prácticamente cero; tomando estos valores como la mínima concentración con efecto observable, para el caso del cloruro de mercurio es comparable con los valores reportados para Microtox pero una orden de magnitud mayor a la reportada para un bioensayo que utilizaba el desarrollo de la señal de fluorescencia de microalgas; mientras para Faena es apenas tres veces menor que la reportada para Microtox.

5.5. Concentraciones en el Medio Ambiente

Respecto a los tóxicos utilizados y su ocurrencia en el medio natural se reportan concentraciones de mercurio que van desde $1.0 \cdot 10^{-6}$ ppm a $1.6 \cdot 10^{-3}$ ppm en ambientes acuáticos sin contaminación antropogénica (Förstner and Wittmann, 1981; Kaiser and Tölg, 1980) y como límite permitido en aguas superficiales para consumo doméstico concentraciones menores a $0.2 \cdot 10^{-3}$ ppm (Nemerow, 1991) hasta $5 \cdot 10^{-3}$ ppm (Förstner and Wittmann, 1981) según la agencia de regulación regente; estos valores son tres órdenes de magnitud menores, como mínimo, que los utilizados en el presente bioensayo. Debido a la mortal toxicidad y bioacumulación demostrada para el mercurio metálico y algunos de sus compuestos en varios lamentables episodios (Förstner and Wittmann, 1981; Kaiser and Tölg, 1980; Nemerow, 1991) es recomendable el mantener las concentraciones máximas permitidas en rangos mínimos y trabajar en mejorar la sensibilidad de los métodos de detección y monitoreo biológico.

En general los herbicidas todavía no representan un problema ambiental de grandes dimensiones (Klingman y Ashton, 1980) sin embargo el uso generalizado, con regulación inefectiva, puede resultar en problemas, que aunque locales no menos graves; esto debido a propiedades como la acción residual del DCMU y su persistencia hasta de seis meses (Cremlyn, 1986). No se encontraron referencias sobre su ocurrencia en el medio natural, sin embargo, la mayoría de las regulaciones marcan como requisito de calidad en agua la ausencia de cualquier tipo de plaguicida.

6 CONCLUSIONES

La relación DF/PF solo muestra cambios significativos para las concentraciones utilizadas de DCMU, en los casos del cloruro de mercurio y de Faena (glifosfato) no pueden considerarse cambios en la relación a ninguna de las concentraciones utilizadas.

El DCMU a 1.17 ppm redujo el valor de la relación prácticamente a cero, el cloruro de mercurio a 0.976 ppm inhibió totalmente la emisión de ambos tipos de fluorescencia y el mismo efecto fue causado por 2.45 ppm de FAENA.

La relación de trabajo DF/PF se muestra poco afectada por la especie utilizada, la variación de las respuestas en fluorescencia entre especies no es mayor a la variación intraespecífica.

A pesar de que el tipo de cultivo con luz alta presenta fotoinhibición a los dos niveles de irradiancia mayores, el hecho de que esta fotoinhibición se presente en ambos tipos de fluorescencia en una magnitud similar evita que la relación de trabajo se vea modificada substancialmente.

Las concentraciones utilizadas en este bioensayo pueden ser comparables con las utilizadas en otros bioensayos, por ejemplo Microtox.

Si la relación DF/PF no resulto efectiva para detectar cambios fisiológicos en el sistema fotosintético de las microalgas utilizadas provocados por cloruro de mercurio o glifosfato (Faena) puede deberse a que el rango de tiempo para la detección de fluorescencia retrasada no muestre en forma clara el daño sobre su fuente de energía y/o a que la forma de acción de estos tóxicos provoque cambios en ambos tipos de fluorescencia de manera que no afecte la relación DF/PF.

7 LITERATURA CITADA

- Amesz, J. and Van Gorkom, H.J. (1978). Delayed fluorescence in photosynthesis. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 29:47-66.
- Benecke, G., Falke, W. and Schmidt, C. (1988). Use of algal fluorescence for an automated biological monitoring system. **Bull. Environm. Contam. Toxicol.** 28, 385-395.
- Briggs, W.R. (1980). **Photosynthesis**. Alan R. Liss, Inc. New York. pp. 45-58
- Bulich, A.A. (1986) Bioluminescence assays. In: Bitton, G. and Dutka, B.J. (ed). **Toxicity testing using microorganisms**. CRC press, Florida. 157 pp.
- Cairns, J.Jr and Van Der Shalie, W.H. (1982). Biological Monitoring. Part I: Early warning systems. In: Cairns, J. Jr. (ed.), **Biological monitoring in water pollution**, Pergamon Press. Oxford, pp.1179-1196.
- Chang, J.C., Taylor, P.B. and Leach, F.R. (1981). Use of Microtox[®] assay system for environmental samples. **Bull. Environm. Contam. Toxicol.** 26:150-156.
- Cloutier-Mantha, L. and Harrison, P.J. (1980). Effects of sublethal concentrations of mercuric chloride on ammonium limited *Skeletonema costatum*. **Marine Biology.** 56: 219-231.
- Cremlyn, R. (1986). **Plaguicidas modernos y su acción bioquímica**. Limusa. México. 356 pp.
- Fleischman, D. (1978). Delayed fluorescence and chemiluminescence. In: Clayton, R. K. and Sistiom, W. R. (eds), **The photosynthetic bacteria**. Ple. Press, London, pp. 513-523.
- Förstener, V. and Wittmann, G.T.W. (1981). **Metal pollution in the aquatic environment**. 2a. Ed., Springer-Verlag. Berlin. 488 p.
- Geider, R. J. and Osborne, B. A. (1992). **Algal photosynthesis**. Chapman and Hall. New York, 256 pp.
- Hall D.O. and Rao,K.K. (1987). **Photosynthesis**. (cuarta edición). Cambridge University Press. Cambridge, G.B.. 122 pp.
- Huynh, H., Bulich, A. & Ulitzur,S. 1994. Measuring chronic toxicity using luminescent bacteria. **15th Annual SETAC Meting**. Denver. 18 pp.
- Kaiser, G. and Tölg, G. (1980) Mercury. In: Hutzinger, O. (ed.) **The handbook of environmental chemistry**. Vol. 3 Part A. Antropogenic compounds. Springer-Verlag. Berlin. 274p.
- Kaiser, K.L and Palabrica, V.S. (1991). *Photobacteriumphosphoreum* toxicity data index. **Water Poll. Res. J. Canada.** 26(3): 361-431.

- Kirk, J. T. O. (1983). **Light and photosynthesis in aquatic ecosystems**. Cambridge University Press. Cambridge. 401 pp.
- Klingman, G.C. y Ashton, F.M. (1980). **Estudio de las plantas Nocivas**. Limusa. México. 450 p.
- Krasnovsky, A.A. Jr. (1982). Delayed fluorescence of plant pigments. **Photochemistry and Photobiology**. 36:733-741.
- Lavorel, J. (1975). Luminescence. In: Govindjee, (ed), **Bioenergetics of photosynthesis**. Academic Press. pp. 223-274.
- Lee, C.-H., Chang, H., Ha, S.-B., Moon, B.Y. and Lee, C.B. (1992). Mercury induced light-dependent alteration of chlorophyll fluorescence kinetics in barley leaf slices. In: Murata, N. (ed.) **Research in photosynthesis**. vol. II. Kluwer Academic Publishers. pp. 45-52.
- Matthews, R. A., Buikema, A. L. Jr, Cairns, J. Jr and Rodgers, J. H. Jr. (1982). Biological Monitoring. Part II-A: Receiving system functional methods, relationships and indices. In: Cairns, J.Jr (ed.), **Biological monitoring in water pollution**, Pergamon Press. Oxford, pp. 129-139.
- McFeters, G.A., Bond, P.J., Olson, S.B. and Tchan, Y.T. (1983). A comparison of microbial bioassays for the detection of aquatic toxicants. **Water Res.** 17(12):1757-1762.
- Missimer, C. L., Lemarie, D. P. and Rue, W. J. (1989). Evaluation of a chronic estimation toxicity test using *Skeletonema costatum*. In: Cowgill U. M. and Williams, L. R. (eds). **Aquatic toxicology and hazard assessment: 12th volume**. ASTM STP 1027. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp.345-354.
- Nemerow, N.L. (1991). **Stream, lake, estuary and ocean pollution**. 2a Ed., Van Nostrand Reinhold. New York. 472 p.
- Platt, T., Gallegos, C.L. and Harrison, W.G. (1980) Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. **J. Mar. Res.** 38:687-701.
- Rebagay, T., Dodd, D.A. and Voogd, J.A. (1991). Toxicity assessment of Hanford Site wastes by bacterial bioluminescence. Westinghouse Hanford Company. Richland, Wa. 20 pp.
- Van Coillie, R., Couture, P. and Visser S. (1983). Use of algae in aquatic ecotoxicology. In: Nriagu J.(ed). **Aquatic toxicology**. John Wiley & Sons, N.Y., pp. 487-502.
- Villarias M., J.L. (1981). **Guía de aplicación de herbicidas**. Mundi-prensa. Madrid. 856 pp.

ANEXO I:

Tablas de los Datos de Trabajo Utilizados.

Tabla A: a).- Valores de fluorescencia inmediata (PFm) obtenidos para las muestras expuestas a DCMU.

Experimento	# Filtros	LUZ		Concentración de prueba DCMU [PPM]							
		ME e-1 m-2	[0]	[0.001951]	[0.00234]	[0.002925]	[0.039]	[0.0468]	[0.0585]	[1.17]	
41125224	5	0.24	0.12840								
<i>Skeletonema c</i>	4	1.02	0.14247								
Luz de Cultivo:	3	4.24	0.18574								
LC: Alta	2	17.70	0.22690								
	1.5	36.15	0.27514								
Tiempo de Exposición:	1	73.85	0.29122								
TE: N.A	0	150.86	0.21148								
	5	308.17	0.17189								
	5	0.24	0.11583								
41125235	5	0.24	0.11141								
<i>Skeletonema c</i>	4	1.02	0.13228								
LC: Baja	3	4.24	0.22128								
TE: N.A	2	17.70	0.25487								
(No Aplicable)	1.5	36.15	0.31494								
	1	73.85	0.32403								
	0.5	150.86	0.36366								
	0	308.17	0.38044								
	5	0.24	0.31984								
41126005	3	4.24	0.21706	0.37539			0.47150		0.52174		
LC: Alta	1	73.85	0.28997	0.42783			0.51005		0.58741		
TE: 30 min.											
FL_50130											
<i>Monocrysis sp</i>	0	308.17	0.21636	0.38133			0.79252				
LC: Alta	2	17.70	0.30805	0.52772			1.00009				
TE: 30 min.	5	0.24	0.32283	0.54340			0.83174				
	2	17.70	0.33300	0.55896			0.99539				
	0	308.17	0.24527	0.42903			0.82968				
50216185	0	308.17	0.22895		0.48397			0.79369			
<i>Skeletonema c</i>	2	17.70	0.48551		0.71806			0.67980			
LC: Alta	5	0.24	0.48923		0.76337			0.90881			
TE: 4:30 hrs.	2	17.70	0.57708		0.86399			1.02813			
	0	308.17	0.51177		0.84577			1.00553			
50217192	0	308.17	0.63564		0.59624			0.58799			
<i>Skeletonema c</i>	2	17.70	0.58962		0.62338			0.66868			
LC: Baja	5	0.24	0.53878		0.55587			0.60590			
TE: 4:30 hrs.	2	17.70	0.57250		0.57253			0.66670			
	0	308.17	0.63835		0.57699			0.58466			
50316190	0	308.1666	0.69361		0.73960			0.82081			
<i>Isocrysis sp</i>	2	17.69802	0.65614		0.85609			0.82611			
LC: Alta	5	0.243575	0.57166		0.78030			0.73720			
TE: 6:00 hrs.	2	17.69802	0.80708		0.69049			0.84028			
	0	308.1666	0.59129		0.73270			0.76587			
50317185	0	308.1666	1.03810		1.17550			1.43200			
<i>Isocrysis sp</i>	2	17.69802	1.06277		1.26222			1.57841			
LC: Baja	5	0.243575	1.02280		1.22781			1.38712			
TE: 6:00 hrs.	2	17.69802	1.01505		1.26606			1.61583			
	0	308.1666	1.04979		1.11149			1.33280			
50724203	0	308.1666	0.46919		0.53432			0.55392			
<i>Skeletonema c</i>	2	17.69802	0.39747		0.56604			0.57299			
LC: Alta	5	0.243575	0.37867		0.57491			0.55985			
TE: 6:00 hrs.	2	17.69802	0.39974		0.62253			0.62990			
	0	308.1666	0.48009		0.68710			0.62881			
50728200	0	308.1666	0.49025		0.57182			0.70612			
<i>Skeletonema c</i>	2	17.69802	0.39497		0.47595			0.66755			
LC: Baja	5	0.243575	0.37593		0.44976			0.62396			
TE: 6:00 hrs.	2	17.69802	0.46833		0.50105			0.71766			
	0	308.1666	0.55792		0.58079			0.77060			

b).- Valores normalizados de fluorescencia inmediata (PFn) obtenidos para las muestras expuestas a DCMU.

Experimento	# Filtros	LUZ		Concentración de prueba DCMU [PPM]							
		ME e-1 m-2	[0]	[0.001951]	[0.00234]	[0.002925]	[0.039]	[0.0468]	[0.0585]	[1.17]	
41126005	3	4.24	1.0		1.72941				2.17217		2.40363
LC: Alta	1	73.85	1.0		1.49088				1.77737		2.04695
TE: 30 min.											
FL_50130											
<i>Monocrysis sp</i>	0	308.17	1.0	1.76244				3.66288			
LC: Alta	2	17.70	1.0	1.72429				3.26773			
TE: 30 min.	5	0.24	1.0	1.68323				2.57840			
	2	17.70	1.0	1.67856				2.98916			
	0	308.17	1.0	1.74921				3.38354			
50216185	0	308.17	1.0		2.13244						3.49714
<i>Skeletonema c</i>	2	17.70	1.0		1.47487						1.61211
LC: Alta	5	0.24	1.0		1.56034						1.85762
TE: 4:30 hrs.	2	17.70	1.0		1.49717						1.78159
	0	308.17	1.0		1.26183						1.96481
50217192	0	308.17	1.0		0.93801						0.89358
<i>Skeletonema c</i>	2	17.70	1.0		1.05727						1.13443
LC: Baja	5	0.24	1.0		1.03520						1.12877
TE: 4:30 hrs.	2	17.70	1.0		1.00005						1.16454
	0	308.17	1.0		0.90386						0.88487
50316190	0	308.17	1.0		1.06630						1.18310
<i>Isocrysis sp</i>	2	17.70	1.0		1.30474						1.25905
LC: Alta	5	0.24	1.0		1.36497						1.28959
TE: 6:00 hrs.	2	17.70	1.0		1.46690						1.38419
	0	308.17	1.0		1.23915						1.29526
50317185	0	308.17	1.0		1.13454						1.38210
<i>Isocrysis sp</i>	2	17.70	1.0		1.18787						1.48518
LC: Baja	5	0.24	1.0		1.20088						1.35647
TE: 6:00 hrs.	2	17.70	1.0		1.24628						1.59187
	0	308.17	1.0		1.06181						1.27322
50724203	0	308.17	1.0		1.13882						1.18058
<i>Skeletonema c</i>	2	17.70	1.0		1.42412						1.44161
LC: Alta	5	0.24	1.0		1.51824						1.47847
TE: 6:00 hrs.	2	17.70	1.0		1.55734						1.57577
	0	308.17	1.0		1.43118						1.30977
50728200	0	308.1666	1.0		1.16637						1.44032
<i>Skeletonema c</i>	2	17.69802	1.0		1.20502						1.69014
LC: Baja	5	0.243575	1.0		1.19640						1.65976
TE: 6:00 hrs.	2	17.69802	1.0		1.07446						1.53894
	0	308.1666	1.0		1.04098						1.38119

PFm = Fluorescencia Inmediata de la muestra

PFn = Valores de Fluorescencia Inmediata normalizados al control correspondiente. = PFm/PFc

PFc = Fluorescencia Inmediata del control.

Tabla B: a).- Valores de fluorescencia retrasada (DFm) obtenidos para las muestras expuestas a DCMU.

Experimento	# Filtros	ME s-1 m-2	LUZ Concentracion de prueba DCMU [PPM]										
			[0]	[0.00195]	[0.00234]	[0.00293]	[0.039]	[0.0468]	[0.0585]	[1.17]			
41125224	5	0.24	0.29600										
<i>Skeletonema c</i>	4	1.02	0.40346										
Luz de Cultivo:	3	4.24	0.52656										
LC: Alta	2	17.70	0.73829										
	1.5	36.15	0.81530										
Tiempo de	1	73.85	0.93681										
Exposicion:	0.5	150.86	0.74189										
TE: N.A	0	308.17	0.52278										
	5	0.24	0.15147										
41125235	5	0.24	0.20512										
<i>Skeletonema c</i>	4	1.02	0.29535										
LC: Baja	3	4.24	0.39906										
TE: N.A	2	17.70	0.60762										
(No Aplicable)	1.5	36.15	0.86949										
	1	73.85	0.92193										
	0.5	150.86	0.96416										
	0	308.17	0.86660										
	5	0.24	0.21972										
41126005	3	4.24	0.40934	0.51306		0.64986		0.34365					
LC: Alta	1	73.85	0.75122	0.59797		0.60176		0.33654					
TE: 30 min.	1	FL_50130											
<i>Monocrysis sp</i>	0	308.17	0.08135	0.09074		0.08098							
LC: Alta	2	17.70	0.08444	0.07730		0.08239							
TE: 30 min.	5	0.24	0.06408	0.07056		0.05059							
	2	17.70	0.09129	0.08192		0.09113							
	0	308.17	0.09302	0.08967		0.08413							
50216185	0	308.17	0.06007		0.08611			0.09631					
<i>Skeletonema c</i>	2	17.70	0.10228		0.09013			0.08505					
LC: Alta	5	0.24	0.03322		0.05072			0.04925					
TE: 4:30 hrs.	2	17.70	0.10608		0.10281			0.08312					
	0	308.17	0.03750		0.08055			0.07889					
50217192	0	308.17	0.15565		0.21686			0.18856					
<i>Skeletonema c</i>	2	17.70	0.28209		0.32971			0.30732					
LC: Baja	5	0.24	0.16663		0.22614			0.24845					
TE: 4:30 hrs.	2	17.70	0.22679		0.36414			0.30444					
	0	308.17	0.08835		0.15256			0.15786					
50316190	0	308.17	0.08490		0.08317			0.06316					
<i>Isocrysis sp</i>	2	17.70	0.09000		0.08918			0.06858					
LC: Alta	5	0.24	0.06632		0.05071			0.04131					
TE: 6:00 hrs.	2	17.70	0.10266		0.09287			0.07384					
	0	308.17	0.08304		0.08200			0.06615					
50317185	0	308.17	0.24101		0.14324			0.11287					
<i>Isocrysis sp</i>	2	17.70	0.20488		0.12545			0.13486					
LC: Baja	5	0.24	0.11641		0.09612			0.06888					
TE: 6:00 hrs.	2	17.70	0.17468		0.13109			0.13289					
	0	308.17	0.21628		0.13797			0.10489					
50724203	0	308.17	0.02519	0.04862		*****							
<i>Skeletonema c</i>	2	17.70	0.02371	0.03901		*****							
LC: Alta	5	0.24	0.00898	0.01779		*****							
TE: 6:00 hrs.	2	17.70	0.02236	*****		0.02668							
	0	308.17	0.01356	0.02774		0.02167							
50728200	0	308.17	0.08911	0.06984				0.04872					
<i>Skeletonema c</i>	2	17.70	0.08366	0.04942				0.04797					
LC: Baja	5	0.24	0.03290	0.01909				0.02323					
TE: 6:00 hrs.	2	17.70	0.08675	0.05125				0.04882					
	0	308.17	0.06020	0.05220				0.04342					

b).- Valores normalizados de fluorescencia retrasada (DFn) obtenidos para las muestras expuestas a DCMU.

Experimento	# Filtros	ME s-1 m-2	LUZ Concentracion de prueba DCMU [PPM]										
			[0]	[0.00195]	[0.00234]	[0.00293]	[0.039]	[0.0468]	[0.0585]	[1.17]			
41126005	3	4.24	1.25338										
LC: Alta	1	73.85	1.0	0.79600				1.58757		0.83952			
TE: 30 min.	0	308.17	1.0	1.11543				0.80104		0.45065			
FL_50130	2	17.70	1.0	0.91537									
<i>Monocrysis sp</i>	5	0.24	1.0	1.10106						0.99539			
TE: 30 min.	2	17.70	1.0	0.89733						0.97574			
	0	308.17	1.0	0.96391						0.78951			
	0	308.17	1.0	0.96391						0.99822			
	0	308.17	1.0	0.96391						0.90437			
50216185	0	308.17	1.0					1.43355				1.60342	
<i>Skeletonema c</i>	2	17.70	1.0					0.88126				0.83157	
LC: Alta	5	0.24	1.0					1.52672				1.48256	
TE: 4:30 hrs.	2	17.70	1.0					0.96915				0.78355	
	0	308.17	1.0					2.14765				2.10356	
50217192	0	308.17	1.0					1.39323				1.21140	
<i>Skeletonema c</i>	2	17.70	1.0					1.16884				1.08947	
LC: Baja	5	0.24	1.0					1.35711				1.49101	
TE: 4:30 hrs.	2	17.70	1.0					1.60560				1.34235	
	0	308.17	1.0					1.72683				1.78679	
50316190	0	308.17	1.0					0.97964				0.74389	
<i>Isocrysis sp</i>	2	17.70	1.0					0.99080				0.76202	
LC: Alta	5	0.24	1.0					0.76469				0.62293	
TE: 6:00 hrs.	2	17.70	1.0					0.90462				0.71931	
	0	308.17	1.0					0.98750				0.79658	
50317185	0	308.17	1.0					0.59433				0.46832	
<i>Isocrysis sp</i>	2	17.70	1.0					0.61234				0.65826	
LC: Baja	5	0.24	1.0					0.82572				0.59170	
TE: 6:00 hrs.	2	17.70	1.0					0.75048				0.76080	
	0	308.17	1.0					0.63795				0.48500	
50724203	0	308.17	1.0					1.93006				0.00000	
<i>Skeletonema c</i>	2	17.70	1.0					1.64524				0.00000	
LC: Alta	5	0.24	1.0					1.98012				0.00000	
TE: 6:00 hrs.	2	17.70	1.0					0.00000				1.19326	
	0	308.17	1.0					2.04507				1.59736	
50728200	0	308.17	1.0					0.78374				0.54676	
<i>Skeletonema c</i>	2	17.70	1.0					0.59069				0.57347	
LC: Baja	5	0.24	1.0					0.58018				0.70627	
TE: 6:00 hrs.	2	17.70	1.0					0.59071				0.56278	
	0	308.17	1.0					0.86719				0.72132	

DFm = Fluorescencia Retrasada de la muestra

DFn = Valores de Fluorescencia Retrasada normalizados al control correspondiente. = DFm/DFc

DFc = Fluorescencia Retrasada del control.

Tabla C : Valores de la relacion fluorescencia retrasada / fluorescencia inmediata (DFn/PFn) calculados para las muestras expuestas a DCMU.

Experimento	LUZ # Filtros	ME s-1 m-2	Concentracion de prueba DCMU				[PPM]			
			[0]	[0.001951]	[0.00234]	[0.00293]	[0.039]	[0.0468]	[0.0585]	[1.17]
41126005										
LC: Alta	3	4.24	1.0		0.72475				0.73087	0.34927
TE: 30 min.	1	73.85	1.0		0.53391				0.45069	0.22016
FL_50130										
<i>Monocrysis sp</i>	0	308.17	1.0	0.63289				0.27175		
LC: Alta	2	17.70	1.0	0.53087				0.29860		
TE: 30 min.	5	0.24	1.0	0.65413				0.30644		
	2	17.70	1.0	0.53459				0.33395		
	0	308.17	1.0	0.55105				0.26728		
50216185										
<i>Skeletonema c</i>	0	308.17	1.0		0.67226				0.45849	
LC: Alta	2	17.70	1.0		0.59752				0.45889	
TE: 4:30 hrs.	5	0.24	1.0		0.97845				0.79810	
	2	17.70	1.0		0.64732				0.43980	
	0	308.17	1.0		1.70202				1.07061	
50217192										
<i>Skeletonema c</i>	0	308.17	1.0		1.48529				1.35568	
LC: Baja	2	17.70	1.0		1.10552				0.96037	
TE: 4:30 hrs.	5	0.24	1.0		1.31097				1.32091	
	2	17.70	1.0		1.60552				1.15269	
	0	308.17	1.0		1.91049				2.01927	
50316190										
<i>Isocrysis sp</i>	0	308.17	1.0		0.91872				0.62877	
LC: Alta	2	17.70	1.0		0.75938				0.60523	
TE: 6:00 hrs.	5	0.24	1.0		0.56022				0.48304	
	2	17.70	1.0		0.61669				0.51966	
	0	308.17	1.0		0.79691				0.61499	
50317185										
<i>Isocrysis sp</i>	0	308.17	1.0		0.52385				0.33885	
LC: Baja	2	17.70	1.0		0.51558				0.44322	
TE: 6:00 hrs.	5	0.24	1.0		0.68771				0.43621	
	2	17.70	1.0		0.60074				0.47793	
	0	308.17	1.0		0.60081				0.38092	
50724203										
<i>Skeletonema c</i>	0	308.17	1.0		1.69479				0.00000	
LC: Alta	2	17.70	1.0		1.15527				0.00000	
TE: 6:00 hrs.	5	0.24	1.0		1.30422				0.00000	
	2	17.70	1.0		0.00000				0.75726	
	0	308.17	1.0		1.42894				1.21957	
50728200										
<i>Skeletonema c</i>	0	308.17	1.0		0.67195				0.37961	
LC: Baja	2	17.70	1.0		0.49019				0.33930	
TE: 6:00 hrs.	5	0.24	1.0		0.48494				0.42553	
	2	17.70	1.0		0.54977				0.36569	
	0	308.17	1.0		0.83306				0.52224	

PFn = Valores de Fluorescencia Inmediata normalizados al control corespondiente. = PFm/PFc
DFn = Valores de Fluorescencia Retrasada normalizados al control corespondiente. = DFm/DFc

Tabla E: a) - Valores de fluorescencia retrasada (DFm) obtenidos para las muestras expuestas a HgCl2.

Experimento	# Filtros	ME s-1 m-2	Concentración de prueba HgCl2 [PPM]										
			LUZ	[0]	[0.000195]	[0.00024]	[0.00163]	[0.00195]	[0.00244]	[0.0325]	[0.039]	[0.04878]	[0.9756]
41125224	5	0.24	0.29600										
Skeletonema	4	1.02	0.40346										
Luz de Cultivo	3	4.24	0.52656										
LC: Alta	2	17.70	0.73829										
	1.5	36.15	0.81530										
Tiempo de	1	73.85	0.93681										
Exposición:	0.5	150.86	0.74189										
TE: N.A	0	308.17	0.52278										
	5	0.24	0.15147										
41125235	5	0.24	0.20512										
Skeletonema	4	1.02	0.29535										
LC: Baja	3	4.24	0.39906										
TE: N.A	2	17.70	0.80762										
(No Aplicable)	1.5	36.15	0.86949										
	1	73.85	0.92193										
	0.5	150.86	0.98416										
	0	308.17	0.86660										
	5	0.24	0.21972										
41128005	3	4.24	0.40934										
LC: Alta	1	73.85	0.75122										
TE: 30 min.	FL_50130												
Monocrysis sp	0	308.17	0.08135										
LC: Alta	2	17.70	0.08444										
TE: 30 min.	5	0.24	0.06408										
	2	17.70	0.09129										
	0	308.17	0.09302										
50216185	0	308.17	0.08007										
Skeletonema	2	17.70	0.10228										
LC: Alta	5	0.24	0.03322										
TE: 4:30 hrs.	2	17.70	0.10808										
	0	308.17	0.03750										
50217192	0	308.17	0.15565										
Skeletonema	2	17.70	0.28209										
LC: Baja	5	0.24	0.18663										
TE: 4:30 hrs.	2	17.70	0.22879										
	0	308.17	0.08835										
50316190	0	308.17	0.08490										
Isocrysis sp	2	17.70	0.09000										
LC: Alta	5	0.24	0.06832										
TE: 6:00 hrs.	2	17.70	0.10266										
	0	308.17	0.08304										
50317185	0	308.17	0.24101										
Isocrysis sp	2	17.70	0.20488										
LC: Baja	5	0.24	0.11841										
TE: 6:00 hrs.	2	17.70	0.17468										
	0	308.17	0.21828										
50724203	0	308.17	0.02519										
Skeletonema	2	17.70	0.02371										
LC: Alta	5	0.24	0.00898										
TE: 6:00 hrs.	2	17.70	0.02236										
	0	308.17	0.01356										
50728200	0	308.17	0.08911										
Skeletonema	2	17.70	0.08366										
LC: Baja	5	0.24	0.03290										
TE: 6:00 hrs.	2	17.70	0.08675										
	0	308.17	0.06020										

b) - Valores normalizados de fluorescencia retrasada (DFn) obtenidos para las muestras expuestas a HgCl2.

Experimento	# Filtros	ME s-1 m-2	Concentración de prueba HgCl2 [PPM]										
			LUZ	[0]	[0.000195]	[0.00024]	[0.00163]	[0.00195]	[0.00244]	[0.0325]	[0.039]	[0.04878]	[0.9756]
41128005	3	4.24	1.0										
LC: Alta	1	73.85	1.0										
TE: 30 min.	FL_50130												
Monocrysis sp	0	308.17	1.0										
LC: Alta	2	17.70	1.0										
TE: 30 min.	5	0.24	1.0										
	2	17.70	1.0										
	0	308.17	1.0										
50216185	0	308.17	1.0										
Skeletonema	2	17.70	1.0										
LC: Alta	5	0.24	1.0										
TE: 4:30 hrs.	2	17.70	1.0										
	0	308.17	1.0										
50217192	0	308.17	1.0										
Skeletonema	2	17.70	1.0										
LC: Baja	5	0.24	1.0										
TE: 4:30 hrs.	2	17.70	1.0										
	0	308.17	1.0										
50316190	0	308.17	1.0										
Isocrysis sp	2	17.70	1.0										
LC: Alta	5	0.24	1.0										
TE: 6:00 hrs.	2	17.70	1.0										
	0	308.17	1.0										
50317185	0	308.17	1.0										
Isocrysis sp	2	17.70	1.0										
LC: Baja	5	0.24	1.0										
TE: 6:00 hrs.	2	17.70	1.0										
	0	308.17	1.0										
50724203	0	308.17	1.0										
Skeletonema	2	17.70	1.0										
LC: Alta	5	0.24	1.0										
TE: 6:00 hrs.	2	17.70	1.0										
	0	308.17	1.0										
50728200	0	308.17	1.0										
Skeletonema	2	17.70	1.0										
LC: Baja	5	0.24	1.0										
TE: 6:00 hrs.	2	17.70	1.0										
	0	308.17	1.0										

DFm = Fluorescencia Retrasada de la muestra

DFn = Valores de Fluorescencia Retrasada normalizados al control correspondiente. = DFm/DFc

DFc = Fluorescencia Retrasada del control.

Tabla F : Valores de la relacion fluorecencia retrasada - fluorecencia inmediata (DFn/PFn) calculados para las muestras expuestas a HgCl2.

Experimento	LUZ	# Filtros	ME s-1 m-2	Concentracion de prueba HgCl2 [PPM]																
				[0]	[0.0002]	[0.00024]	[0.0016]	[0.00195]	[0.0024]	[0.0325]	[0.039]	[0.0488]	[0.976]							
41126005																				
LC: Alta		3	4.24	1.0					0.69346				0.72011							0.00000
TE: 30 min.		1	73.85	1.0					0.45180				0.50457							0.00000
FL_50130																				
<i>Monocrysis sp</i>		0	308.17	1.0				0.97045				0.92362								
LC: Alta		2	17.70	1.0				0.70875				0.87503								
TE: 30 min.		5	0.24	1.0				0.68538				0.93266								
		2	17.70	1.0				0.59038				0.81235								
		0	308.17	1.0				0.62512				0.92580								
50216185																				
<i>Skeletonema c</i>		0	308.17	1.0						0.88726										0.48506
LC: Alta		2	17.70	1.0						1.01383										0.00000
TE: 4:30 hrs.		5	0.24	1.0						2.19814										0.00000
		2	17.70	1.0						1.03385										0.00000
		0	308.17	1.0						1.50528										1.50636
50217192																				
<i>Skeletonema c</i>		0	308.17	1.0				0.98671				1.02554								
LC: Baja		2	17.70	1.0				1.06156				1.08654								
TE: 4:30 hrs.		5	0.24	1.0				1.30815				1.22335								
		2	17.70	1.0				1.49995				1.73589								
		0	308.17	1.0				1.43694				1.53623								
50316190																				
<i>Isocrysis sp</i>		0	308.17	1.0				1.75858				1.66543								
LC: Alta		2	17.70	1.0				1.54095				1.45593								
TE: 6:00 hrs.		5	0.24	1.0				0.92319				0.95488								
		2	17.70	1.0				1.35961				1.35200								
		0	308.17	1.0				1.09134				1.11426								
50317185																				
<i>Isocrysis sp</i>		0	308.17	1.0				1.08081				1.07158								
LC: Baja		2	17.70	1.0				1.12730				1.08389								
TE: 6:00 hrs.		5	0.24	1.0				1.04395				0.99270								
		2	17.70	1.0				1.34525				1.31896								
		0	308.17	1.0				1.08888				1.08205								
50724203																				
<i>Skeletonema c</i>		0	308.17	1.0				1.46571				1.67209								
LC: Alta		2	17.70	1.0				1.27769				1.70779								
TE: 6:00 hrs.		5	0.24	1.0				1.36404				1.91584								
		2	17.70	1.0				1.03905				1.74676								
		0	308.17	1.0				0.66509				1.53835								
50728200																				
<i>Skeletonema c</i>		0	308.17	1.0				1.01447				1.02985								
LC: Baja		2	17.70	1.0				0.92334				0.98153								
TE: 6:00 hrs.		5	0.24	1.0				0.96911				0.97199								
		2	17.70	1.0				0.97109				1.12994								
		0	308.17	1.0				1.08370				1.22789								

PFn = Valores de Fluorecencia Inmediata normalizados al control corespondiente. = PFm/PFc

DFn = Valores de Fluorecencia Retrasada normalizados al control corespondiente. = DFm/DFc

Tabla G: a).- Valores de fluorescencia inmediata (PFm) obtenidos para las muestras expuestas a FAENA.

Experimento	# Filtros	LUZ ME s-1 m ⁻²	Concentracion de prueba FAENA [PPM]						
			[0]	[0.00392]	[0.0392]	[0.049]	[0.245]	[2.45]	[12.25]
50216185									
<i>Skeletonema c</i>	0	308.17	0.22695					0.08151	0.12438
LC: Alta	2	17.70	0.48551					0.06072	
TE: 4:30 hrs.	5	0.24	0.48923					0.05843	0.11313
	2	17.70	0.57708					0.05213	
	0	308.17	0.51177					0.05453	
50217192									
<i>Skeletonema c</i>	0	308.17	0.63564		0.60440	0.53556			
LC: Baja	2	17.70	0.58962		0.61744	0.52034			
TE: 4:30 hrs.	5	0.24	0.53678		0.53435	0.44133			
	2	17.70	0.57250		0.56270	0.49150			
	0	308.17	0.63835		0.59312	0.51536			
50316190									
<i>Isocrysis sp</i>	0	308.17	0.36539		0.32527				
LC: Alta	2	17.70	0.35593		0.32955				
TE: 6:00 hrs.	5	0.24	0.33494		0.32140				
	2	17.70	0.35157		0.33424				
	0	308.17	0.35190		0.34539				
	0	308.17	0.69361				0.71590		
	2	17.70	0.65614				0.62427		
	5	0.24	0.57166				0.51951		
	2	17.70	0.60706				0.58493		
	0	308.17	0.59129				0.57623		
50317185									
<i>Isocrysis sp</i>	0	308.17	1.03610		0.91080	0.82801			
LC: Baja	2	17.70	1.06277		0.88658	0.83380			
TE: 6:00 hrs.	5	0.24	1.02260		0.82240	0.77993			
	2	17.70	1.01505		0.82233	0.78195			
	0	308.17	1.04679		0.86039	0.81662			
50724203									
<i>Skeletonema c</i>	0	308.17	0.46919	0.54784	0.50755				
LC: Alta	2	17.70	0.39747	0.56383	0.46680				
TE: 6:00 hrs.	5	0.24	0.37867	0.57654	0.45989				
	2	17.70	0.39974	0.63029	0.49797				
	0	308.17	0.48009	0.72021	0.58418				
50728200									
<i>Skeletonema c</i>	0	308.17	0.49025	0.54178	0.51954				
LC: Baja	2	17.70	0.39497	0.46566	0.41519				
TE: 6:00 hrs.	5	0.24	0.37593	0.44910	0.38064				
	2	17.70	0.46633	0.51463	0.45343				
	0	308.17	0.55792	0.58078	0.53882				

b).- Valores normalizados de fluorescencia inmediata (PFn) obtenidos para las muestras expuestas a FAENA.

Experimento	# Filtros	LUZ ME s-1 m ⁻²	Concentracion de prueba FAENA [PPM]						
			[0]	[0.00392]	[0.0392]	[0.049]	[0.245]	[2.45]	[12.25]
50216185									
<i>Skeletonema c</i>	0	308.17	1.0						0.35913 0.54806
LC: Alta	2	17.70	1.0						0.12507
TE: 4:30 hrs.	5	0.24	1.0						0.11943 0.23123
	2	17.70	1.0						0.09033
	0	308.17	1.0						0.10655
50217192									
<i>Skeletonema c</i>	0	308.17	1.0				0.95086	0.84256	
LC: Baja	2	17.70	1.0				1.04719	0.88250	
TE: 4:30 hrs.	5	0.24	1.0				0.99547	0.82219	
	2	17.70	1.0				0.98289	0.85852	
	0	308.17	1.0				0.92914	0.80732	
50316190									
<i>Isocrysis sp</i>	0	308.17	1.0				0.89020		
LC: Alta	2	17.70	1.0				0.92589		
TE: 6:00 hrs.	5	0.24	1.0				0.95958		
	2	17.70	1.0				0.95072		
	0	308.17	1.0				0.98151		
	0	308.17	1.0					1.03213	
	2	17.70	1.0					0.95144	
	5	0.24	1.0					0.90878	
	2	17.70	1.0					0.96356	
	0	308.17	1.0					0.97453	
50317185									
<i>Isocrysis sp</i>	0	308.17	1.0				0.87906	0.79916	
LC: Baja	2	17.70	1.0				0.83422	0.78456	
TE: 6:00 hrs.	5	0.24	1.0				0.80423	0.76270	
	2	17.70	1.0				0.81014	0.77035	
	0	308.17	1.0				0.82193	0.78012	
50724203									
<i>Skeletonema c</i>	0	308.17	1.0	1.16762	1.08175				
LC: Alta	2	17.70	1.0	1.41855	1.17444				
TE: 6:00 hrs.	5	0.24	1.0	1.52256	1.21449				
	2	17.70	1.0	1.57676	1.24574				
	0	308.17	1.0	1.50014	1.21681				
50728200									
<i>Skeletonema c</i>	0	308.17	1.0	1.10510	1.05974				
LC: Baja	2	17.70	1.0	1.17898	1.05120				
TE: 6:00 hrs.	5	0.24	1.0	1.19464	1.01253				
	2	17.70	1.0	1.10357	0.97235				
	0	308.17	1.0	1.04097	0.96575				

PFm = Fluorescencia Inmediata de la muestra PFn = Valores de Fluorescencia Inmediata normalizados al control correspondiente. = PFm/PFc PFc = Fluorescencia Inmediata del control.

Tabla H.a).- Valores de fluorescencia retrasada (DFm) obtenidos para las muestras expuestas a FAENA.

Experimento	# Filtros	ME s-1 m ⁻²	LUZ Concentración de prueba FAENA [PPM]							
			[0]	[0.00392]	[0.0392]	[0.049]	[0.245]	[2.45]	[12.25]	
50216185										
<i>Skeletonema c</i>	0	308.17	0.06007						0.00082	-0.00495
LC: Alta	2	17.70	0.10228						-0.03487	
TE: 4:30 hrs.	5	0.24	0.03322						-0.03871	-0.03836
	2	17.70	0.10608						-0.03525	
	0	308.17	0.03750						-0.00341	
50217192										
<i>Skeletonema c</i>	0	308.17	0.15565			0.17975	0.13319			
LC: Baja	2	17.70	0.28209			0.35621	0.30893			
TE: 4:30 hrs.	5	0.24	0.16663			0.20741	0.14625			
	2	17.70	0.22679			0.39209	0.34409			
	0	308.17	0.08835			0.11841	0.09914			
50316190										
<i>Isocrysis sp</i>	0	308.17	0.11509			0.10601				
LC: Alta	2	17.70	0.11350			0.09856				
TE: 6:00 hrs.	5	0.24	0.06375			0.05076				
	2	17.70	0.12044			0.11102				
	0	308.17	0.09907			0.08934				
	0	308.17	0.08490				0.08306			
	2	17.70	0.09000				0.08722			
	5	0.24	0.06632				0.04454			
	2	17.70	0.10266				0.11046			
	0	308.17	0.08304				0.08406			
50317185										
<i>Isocrysis sp</i>	0	308.17	0.24101			0.20145	0.19791			
LC: Baja	2	17.70	0.20488			0.16367	0.16443			
TE: 6:00 hrs.	5	0.24	0.11641			0.09405	0.08323			
	2	17.70	0.17468			0.17157	0.16772			
	0	308.17	0.21628			0.18737	0.18239			
50724203										
<i>Skeletonema c</i>	0	308.17	0.02519	0.05143	0.05233					
LC: Alta	2	17.70	0.02371	0.04339	0.04491					
TE: 6:00 hrs.	5	0.24	0.00898	0.01985	0.01933					
	2	17.70	0.02236	-0.14894	0.04090					
	0	308.17	0.01356	0.02865	0.02825					
50728200										
<i>Skeletonema c</i>	0	308.17	0.08911	0.08404	0.09197					
LC: Baja	2	17.70	0.08366	0.05852	0.06790					
TE: 6:00 hrs.	5	0.24	0.03290	0.02719	0.02464					
	2	17.70	0.08675	0.05958	0.07076					
	0	308.17	0.06020	0.06061	0.06540					

DFm = Fluorescencia Retrasada de la muestra

DFn = Valores de Fluorescencia Retrasada normalizados al control correspondiente. = DFm/DF DFC = Fluorescencia Retrasada del control.

b).- Valores normalizados de fluorescencia retrasada (DFn) obtenidos para las muestras expuestas a FAENA.

Experimento	# Filtros	ME s-1 m ⁻²	LUZ Concentración de prueba FAENA [PPM]							
			[0]	[0.00392]	[0.0392]	[0.049]	[0.245]	[2.45]	[12.25]	
50216185										
<i>Skeletonema c</i>	0	308.17	1.0						0.01370	0.00000
LC: Alta	2	17.70	1.0						0.00000	
TE: 4:30 hrs.	5	0.24	1.0						0.00000	0.00000
	2	17.70	1.0						0.00000	
	0	308.17	1.0						0.00000	
50217192										
<i>Skeletonema c</i>	0	308.17	1.0					1.15479	0.85568	
LC: Baja	2	17.70	1.0					1.26278	1.09517	
TE: 4:30 hrs.	5	0.24	1.0					1.24472	0.87766	
	2	17.70	1.0					1.72881	1.51719	
	0	308.17	1.0					1.34031	1.12216	
50316190										
<i>Isocrysis sp</i>	0	308.17	1.0					0.92107		
LC: Alta	2	17.70	1.0					0.86836		
TE: 6:00 hrs.	5	0.24	1.0					0.79615		
	2	17.70	1.0					0.92175		
	0	308.17	1.0					0.90183		
	0	308.17	1.0						0.97831	
	2	17.70	1.0						0.96903	
	5	0.24	1.0						0.67169	
	2	17.70	1.0						1.07603	
	0	308.17	1.0						1.01227	
50317185										
<i>Isocrysis sp</i>	0	308.17	1.0					0.83588	0.82119	
LC: Baja	2	17.70	1.0					0.79887	0.80261	
TE: 6:00 hrs.	5	0.24	1.0					0.80787	0.71492	
	2	17.70	1.0					0.98221	0.96018	
	0	308.17	1.0					0.86634	0.84333	
50724203										
<i>Skeletonema c</i>	0	308.17	1.0	2.04136	2.07701					
LC: Alta	2	17.70	1.0	1.83018	1.89419					
TE: 6:00 hrs.	5	0.24	1.0	2.20968	2.15247					
	2	17.70	1.0	0.00000	1.82887					
	0	308.17	1.0	2.11259	2.08277					
50728200										
<i>Skeletonema c</i>	0	308.17	1.0	0.94309	1.03209					
LC: Baja	2	17.70	1.0	0.69946	0.81170					
TE: 6:00 hrs.	5	0.24	1.0	0.82653	0.74906					
	2	17.70	1.0	0.68678	0.81566					
	0	308.17	1.0	1.00696	1.08653					

Tabla I: Valores de la relacion fluorescencia retrasada - fluorescencia inmediata (DFn/PFn) calculados para las muestras expuestas a FAENA.

Experimento	LUZ # Filtros	ME s-1	m-2	Concentracion de prueba FAENA				[PPM]		
				[0]	[0.00392]	[0.0392]	[0.049]	[0.245]	[2.45]	[12.25]
50216185										
<i>Skeletonema</i>	0	308.17	1.0					0.03815	0.00000	
LC: Alta	2	17.70	1.0					0.00000		
TE: 4:30 hrs.	5	0.24	1.0					0.00000	0.00000	
	2	17.70	1.0					0.00000		
	0	308.17	1.0					0.00000		
50217192										
<i>Skeletonema</i>	0	308.17	1.0		1.21447	1.01557				
LC: Baja	2	17.70	1.0		1.20588	1.24098				
TE: 4:30 hrs.	5	0.24	1.0		1.25038	1.06746				
	2	17.70	1.0		1.75890	1.76721				
	0	308.17	1.0		1.44253	1.38998				
50316190										
<i>Isocrysis sp</i>	0	308.17	1.0		1.03467					
LC: Alta	2	17.70	1.0		0.93787					
TE: 6:00 hrs.	5	0.24	1.0		0.82968					
	2	17.70	1.0		0.96953					
	0	308.17	1.0		0.91882					
	0	308.17	1.0					0.94786		
	2	17.70	1.0					1.01849		
	5	0.24	1.0					0.73911		
	2	17.70	1.0					1.11672		
	0	308.17	1.0					1.03872		
50317185										
<i>Isocrysis sp</i>	0	308.17	1.0		0.95088	1.02756				
LC: Baja	2	17.70	1.0		0.95763	1.02301				
TE: 6:00 hrs.	5	0.24	1.0		1.00453	0.93735				
	2	17.70	1.0		1.21240	1.24642				
	0	308.17	1.0		1.05402	1.08102				
50724203										
<i>Skeletonema</i>	0	308.17	1.0	1.74831	1.92005					
LC: Alta	2	17.70	1.0	1.29018	1.61285					
TE: 6:00 hrs.	5	0.24	1.0	1.45129	1.77233					
	2	17.70	1.0	0.00000	1.46810					
	0	308.17	1.0	1.40826	1.71167					
50728200										
<i>Skeletonema</i>	0	308.17	1.0	0.85340	0.97391					
LC: Baja	2	17.70	1.0	0.59328	0.77216					
TE: 6:00 hrs.	5	0.24	1.0	0.69186	0.73979					
	2	17.70	1.0	0.62233	0.83885					
	0	308.17	1.0	0.96733	1.12507					

PFn = Valores de Fluorescencia Inmediata normalizados al control correspondiente. = PFn/PFc
DFn = Valores de Fluorescencia Retrasada normalizados al control correspondiente. = DFm/DFc