

**DETERMINACION DE LAS VARIACIONES FISIOLÓGICAS Y LA
BIOACUMULACION POR *Rhizoclonium riparium* (Roth) Harvey ex Kützing EN
PRESENCIA DE PLOMO, COBRE Y MERCURIO**

WILLY MONTOYA PALOMINO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, NATURALES Y DE LA EDUCACION
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
POPAYAN
2004**

**DETERMINACION DE LAS VARIACIONES FISIOLÓGICAS Y LA
BIOACUMULACION POR *Rhizoclonium riparium* (Roth) Harvey ex Kützing EN
PRESENCIA DE PLOMO, COBRE Y MERCURIO**

WILLY MONTOYA PALOMINO

Trabajo de grado para optar al título de Biólogo

Director

RICARDO BENÍTEZ BENITEZ

Asesores

ENRIQUE PEÑA SALAMANCA

MAITE DEL PILAR RADA

GUILLERMO VAZQUEZ

HILLDIER ZAMORA

UNIVERSIDAD DEL CAUCA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, NATURALES Y DE LA EDUCACION

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

POPAYAN

2004

Nota de aceptación

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

Popayán, agosto 2004

A la memoria de mi padre...

RESUMEN

El estudio pretendió determinar la capacidad de resistencia fisiológica de *Rhizoclonium riparium* a su tratamiento con metales pesados, en bioensayos de 1, 2, 6, 12, 24, 96 y 144 horas y 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 100 y 150 miligramos por litro de plomo, cobre y mercurio en un diseño de medidas repetidas. La fluorescencia y producción fotosintética del alga expuesta a plomo y cobre, disminuyeron mostrando 3 fases; alarma, recuperación y muerte. Tanto fluorescencia como producción fotosintética en *R. riparium*, mostraron incremento general al tratamiento con mercurio, con variación brusca a bajas concentraciones. La forma exponencial del consumo de mercurio en el tiempo, así como la fácil accesibilidad y trabajo en campo y laboratorio, sugieren al alga como bioacumuladora del metal y el incremento constante de las concentraciones de plomo y cobre en tejido algal, denotan a *R. riparium* como organismo indicador de contaminación estuarino para estos metales pesados.

Palabras clave; bioacumulación, *Rhizoclonium riparium*, contaminación por metales pesados, fluorescencia, producción fotosintética.

Abstract. *Rhizoclonium riparium* accumulated Pb, Cu and Hg on an actively way, during a 144 hours bioassay and ten work concentrations in a repeated measurements design. Fluorescence and photosynthetic production of the algae exposed to lead and copper diminished showing a three stages process; alarm, recovery and exhaustion. Both, fluorescence and photosynthetic production of *R. riparium* showed a general increase with strong variations to low concentrations on the mercury treatment; the exponential shape of this bioassay over time, plus constant increasing of lead and copper on algal tissue, furthermore high availability on field and easy laboratory handling, suggest to *R. riparium* as an estuarine bioindicator of heavy metal pollution.

Key words; bioaccumulation, *Rhizoclonium riparium*, heavy metal pollution, fluorescence, photosynthetic yield.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi madre y abuelita, por permitirme ser;

A mi familia en extenso, entre ellas los Montoya Guzmán, Aristizábal Palomino, Viñez Aristizabal, Rojas, Ortíz y Abello Monedero y a los Perafán Ledezma, Gómez Perafán, Martínez Dueñas, Eraso Eraso y Ortiz Manzo por su -colaboración logística y amor en Popayán.

A los profesores Enrique Javier Peña Salamanca y Ricardo Benítez Benítez, por guiarme en el proceso investigativo y permitirme hacer parte de su proyecto y a Guillermo León Vázquez Zapata, Hildier Zamora González y Gerardo Naundorf Sanz, por impartirme su saber en el hermoso campo de la Limnología tropical.

A Manuel Almario por facilitarme su ordenador para la elaboración del primer borrador del manuscrito y al Biólogo William Andrés Martínez Dueñas, por la revisión final del trabajo de grado y su amistad.

Gracias mil a la Universidad del Cauca por cederme los espacios que habité durante seis años; estos fueron parte fundamental en mi normal desarrollo personal.

De forma especial, estoy agradecido con los profesores, personal administrativo, compañeros de clase y conductores de la Universidad del Valle, entidad en la que inicié y finalicé (proyecto conjunto) mi pregrado.

A Jesús Hamilton Ortíz Monedero, por darme el empujón inicial en este largo camino.

GLOSARIO

ATP: Adenosín Trifosfato.

BIOENSAYO: estudio de laboratorio donde se mide, con variables ambientales controladas, el grado de deterioro y/o acumulación de una sustancia en un organismo vivo. La duración puede ir de horas a semanas y las concentraciones, de efectivas (daño apenas apreciable) a letales.

BIOACUMULACION: proceso de incorporación de una sustancia o varias en un organismo. Los tejidos más susceptibles de acumular sustancias son en animales, el tejido adiposo, riñones gónadas e hígado y en plantas y/o microorganismos, pared celular y vacuolas.

BIOADSORCIÓN: segunda fase en el proceso de bioacumulación en plantas, en el que las sustancias adheridas a la pared celular ingresan al citoplasma. La bioadsorción es de carácter lento y energético dependiente.

CONTROL: unidad muestral que no se somete a tratamiento y/o que no contiene organismo. Se mide de igual forma que el conjunto de prueba. Constituye un punto de referencia sobre el estado normal del organismo de estudio o un indicador de efectividad de los tratamientos usados.

DIGESTIÓN ACIDA: paso inicial en el proceso de determinación de metales pesados por Espectroscopia de Adsorción Atómica, en el que se trata la muestra con ácidos fuertes (sulfúrico y nítrico), eliminándose completamente la materia orgánica y dejando solamente el metal adsorbido.

EDTA: Acido etilén diamino tetraacético.

EUA: Estados Unidos de América

Fe ⁺⁺: Catión de hierro divalente

FLUORESCENCIA: fracción de la luz recibida por las plantas que retorna al espacio, con longitud de onda mayor y cuya cantidad da idea de la eficiencia en el proceso de captación y transporte de la energía en vegetales. El fluorómetro, lanza un fuerte haz de luz y capta la fluorescencia reflejada por la planta o el número de electrones transportados entre los fotosistemas, teniendo en cuenta la intensidad lumínica externa.

HCl: Acido Clorhídrico.

LC₅₀: (*Lethal Concentration fifty*, por sus siglas en inglés). Concentración de una sustancia suficiente para seleccionar en contra, el 50% de la población de organismos estudiados. Si la sustancia es inyectada, implantada o administrada vía oral se denomina Dosis Letal.

MICROMOLES: esta unidad, representada como $\mu\text{moles}/\text{m}^2\text{s}$, es una medida de intensidad lumínica o irradianza (también llamada densidad de flujo de radiación) que se refiere a la cantidad de luz incidente sobre un área determinada por unidad de tiempo o los micromoles de Einstein que llegan provenientes de una fuente luminosa, en el rango espectral 400-700 nanómetros, durante un segundo a un metro cuadrado de superficie. Un micromol equivale a 0.22 vatios por metro cuadrado.

Mn⁺⁺: Cation de manganeso divalente.

PESO SECO: (Materia seca). Resultado de eliminar agua de una planta durante 24 horas a 50 grados centígrados. Se hace para eliminar sesgos en la determinación analítica de sustancias acumuladas, midiendo el peso antes y después de la deshidratación en un número grande de muestras y obteniendo la cantidad promedio de agua por unidad de masa o porcentaje de humedad de la muestra.

pH: Potencial de hidrogeniones. Escala que denota el grado de acidez o alcalinidad de una sustancia.

PRODUCCION FOTOSINTÉTICA: miligramos de carbono (en forma de CO₂) incorporado u oxígeno (O₂) liberado en el proceso fotosintético. Se mide por marcaje radiactivo con (C¹⁴) y/o por medición directa de la variación en la concentración de oxígeno disuelto en el medio de estudio en tiempo controlado. Es un indicador directo del estado fisiológico de la planta y está expresada en miligramos de oxígeno por litro en cada gramo de peso seco de planta y hora.

VELOCIDAD DE ACUMULACION: cociente entre la cantidad de metal acumulado (miligramos por litro) y el tiempo trascurrido (horas) en el proceso de incorporación del metal.

Zn⁺⁺: Cation de cinc divalente.

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Valores máximos admisibles de plomo, cobre y mercurio en medio acuoso para aguas colombianas	6
Tabla 2. Algunos reportes de bioacumulación en plantas	8
Tabla 3. Componentes del agua de mar artificial	12
Tabla 4. Componentes de la solución 1 del medio F2 de Guillard	13
Tabla 5. Composición de la solución 2 del medio F2 de Guillard	13
Tabla 6. Composición de la solución de metales traza	14
Tabla 7. Componentes de la solución madre de vitaminas	14
Tabla 8. Concentraciones de Pb, Cu y Hg, usados en la determinación de la fluorescencia, producción fotosintética y bioacumulación de <i>R. riparium</i> .	16
Tabla 9. Condiciones instrumentales en la determinación analítica de plomo y cobre en <i>Rhizoclonium riparium</i>	17
Tabla 10. Límites de detección para plomo y mercurio	18
Tabla 11. Características de la determinación analítica de mercurio en <i>Rhizoclonium riparium</i> .	19
Tabla 12. Equipos usados en la determinación analítica por espectroscopia de adsorción atómica de metales pesados en <i>Rhizoclonium riparium</i>	19
Tabla 13. Comparación (Tuckey HSD) entre la producción fotosintética sin perturbación y la de <i>Rhizoclonium riparium</i> sometida a cobre	21
Tabla 14. Prueba de ajuste a la curva normal de la producción fotosintética de <i>Rhizoclonium riparium</i>	22

	Pág.
Tabla 15. Prueba de comparaciones pareadas con ajuste de Bonferroni, entre los tiempos de exposición para la producción fotosintética de <i>Rhizoclonium riparium</i> .	22
Tabla 16. Prueba de Tuckey para la fluorescencia de <i>Rhizoclonium riparium</i> expuesta a mercurio durante una hora	22
Tabla 17. Prueba de Tuckey HSD para fluorescencia de <i>Rhizoclonium riparium</i> expuesta a mercurio a 144 horas	23
Tabla 18. Fluorescencia de <i>Rhizoclonium riparium</i> expuesta a plomo durante 144 horas	23
Tabla 19. Fluorescencia de <i>Rhizoclonium riparium</i> expuesta a cobre durante 144 horas	24
Tabla 20. Fluorescencia de <i>Rhizoclonium riparium</i> expuesta a mercurio durante 144 horas	24
Tabla 21. Producción fotosintética de <i>Rhizoclonium riparium</i> expuesta a plomo durante 144 horas	25
Tabla 22. Producción fotosintética de <i>Rhizoclonium riparium</i> expuesta a cobre durante 144 horas	26
Tabla 23. Producción fotosintética de <i>Rhizoclonium riparium</i> expuesta a mercurio durante 144 horas	26
Tabla 24. Bioacumulación de metales pesados en <i>Rhizoclonium riparium</i> expuesta a cobre durante 144 horas	27
Tabla 25. Factores de bioacumulación de metales pesados en <i>R. riparium</i> expuesta a cobre durante 144 horas	28

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Descripción morfológica de <i>Rhizoclonium riparium</i> .	4
Figura 2. Comportamiento de bioacumulación de metales en especies vegetales.	7
Figura 3. Espectro de emisión fluorescente en vegetales luego de un pulso de luz de saturación.	9
Figura 4. Esquema de los procesos de resistencia metálica en algas.	10
Figura 5. Localización geográfica de la bahía de Buenaventura mostrando las estaciones de muestreo.	11
Figura 6. Metodología general de trabajo.	12
Figura 7. Fluorescencia de <i>Rhizoclonium riparium</i> expuesta a plomo.	29
Figura 8. Producción fotosintética de <i>Rhizoclonium riparium</i> expuesta a plomo durante 144 horas.	30
Figura 9. Comparación entre fluorescencia y fotosíntesis en <i>Rhizoclonium riparium</i> expuesta a mercurio durante 96 horas.	31
Figura 10. Producción fotosintética de <i>Rhizoclonium riparium</i> expuesta a cobre.	32
Figura 11. Fases de perturbación fisiológica en la producción fotosintética de <i>Rhizoclonium riparium</i> durante 144 horas de exposición a cobre.	32
Figura 12. Fluorescencia de filamentos de <i>Rhizoclonium riparium</i> tratados con cobre durante 144 horas.	33
Figura 13. Filamentos de <i>Rhizoclonium riparium</i> expuestos a plomo, cobre. y. mercurio	33

	Pág.
Figura 14. Patrón de bioacumulación de <i>Rhizoclonium riparium</i> expuesta a diferentes concentraciones de plomo en 144 horas.	34
Figura 15. Patrón de bioacumulación de <i>Rhizoclonium riparium</i> expuesta a diferentes concentraciones de cobre en 144 horas.	35
Figura 16. Patrón de bioacumulación de <i>Rhizoclonium riparium</i> expuesta a diferentes concentraciones de mercurio en 144 horas.	35

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	2
1. OBJETIVOS	3
2. ANTECEDENTES	4
2.1 DESCRIPCION DE LA ESPECIE	5
2.2 BIOACUMULACION	8
2.3 FLUORESCENCIA Y PRODUCCION FOTOSINTÉTICA	10
3. METODOLOGÍA	11
3.1 COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO	12
3.2 FORMULACIÓN DEL AGUA DE MAR SINTÉTICA Y MEDIO F2 DE GUILLARD.	
3.2.2 Medio de cultivo para algas	12
3.2.1 Preparación del agua de mar sintética.	12
3.2.2 Medio de cultivo para algas	13
3.3 COLECTA DE DATOS	14
3.3.1 Fluorescencia y Oxígeno	14
3.2.2 Bioacumulación	15
3.4 PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE METALES PESADOS EN ALGAS	
3.4.1 Digestión.	16
3.4.2 Determinación analítica de plomo y cobre	16
3.4.3 Determinación del límite de detección	18
3.4.4 Determinación de mercurio por vapor frío de plasma	19
3.4.5 Materiales usados.	19
3.5 ANALISIS ESTADISTICO DE DATOS	20
4. RESULTADOS	
4.1 VALIDEZ ESTADÍSTICA	21

4.1.1 Análisis de plomo	21
4.1.2 Análisis de cobre	21
4.1.3 Análisis de mercurio	22
4.2 VALORES DE FLUORESCENCIA	25
4.3 PRODUCCION FOTOSINTÉTICA	27
4.4 BIOACUMULACION	27
4.5 FACTOR DE BIOACUMULACION	28
5. DISCUSION DE RESULTADOS	29
5.1 FLUORESCENCIA Y PRODUCCION FOTOSINTETICA DE <i>Rhizoclonium riparium</i> EXPUESTA A PLOMO	30

INTRODUCCIÓN

A diario incorporamos vía aérea, cutánea y oral, cantidades variables de metales pesados producto de quemas de basura (Russel *et al* 2003), desechos domésticos e industriales y de fuentes naturales como vetas (filones de metal) expuestas, vulcanismo (Hg^0), degradación de material vegetal (Cu^{++}) entre otras, como resultado de la alteración de los ciclos biogeoquímicos (Niagru 1996) y la formación de sumideros de metal, característica inherente de la veloz expansión demográfica humana.

Los estuarios* son los depósitos o trampas parciales de estos contaminantes, en su camino obligado hacia el mar; son también áreas de resguardo (predación) para peces juveniles, larvas de camarones y cangrejos pelágicos, así como sitio de establecimiento para los manglares con toda su fauna asociada (Prahl *et al* 1989).

Los estuarios tropicales y en particular la bahía de Buenaventura, poseen una comunidad algal poco diversa pero muy abundante. Alrededor de 10 especies de macroalgas, entre verdes (*Boodleopsis verticillata*, *Chaetomorpha californica* y *Rhizoclonium riparium*) y rojas (complejo *Bostrychetum*; Peña 1998) cubren las raíces de mangles rojos (*Rhizophora spp.*), blancos (*Laguncularia racemosa*) negros (*Avicennia germinans*) y piñuelos (*Pelliciera rhizophorae*).

Buenaventura está bien estudiada desde sus componentes fisicoquímico y biológico (Vásquez *et al* 2000, Cantera y Blanco 2001) y se cataloga como un estuario altamente contaminado por efluentes domésticos e industriales y por arrastre de material alóctono de los ríos Dagua y Anchicayá (minería con mercurio, lixiviados del relleno sanitario de la localidad y residuos de agrotóxicos).

* Son cuerpos de agua semicerrados con libre conexión con el mar abierto y dentro del cual esa agua marina está sensiblemente diluída con el agua dulce de drenajes terrestres.' (Hill 1970).

Actualmente, *R. riparium* aflora en estas aguas debido probablemente a la sobreoferta de nutrientes (Lotze *et al* 1996), compitiendo por luz y espacio y desbalanceando la comunidad algal (Ospina–Alvarez y Peña 2004).

La acumulación de desechos en los bordes oceánicos hace bajar la diversidad poblacional del sector generando carencia de alimentos para la población allí asentada (Roldán 1992). No obstante, existen organismos capaces de tolerar e incrementar sus tasas metabólicas con la presencia de contaminantes metálicos, entre ellas la microalgas *Scenedesmus quadricauda* y *Chlorella vulgaris* (Chong *et al* 2000). Estos organismos, pueden ser usados como indicadores de contaminación de los metales que acumulan y de la concentración del metal mismo en el agua. Además, las macroalgas son usadas como bioindicadores de contaminación por metales pesados dada la dificultad analítica para medir de forma fidedigna las bajas concentraciones de metal en el agua y/o el desacuerdo en cuanto a que proporción de esa cantidad es accesible a los seres vivos (Luoma *et al* 1982).

Rhizoclonium riparium (Reino Plantae, Clase Talófitos, División Chlorophyta, Orden Cladophorales, Familia Cladophoraceae), está amplia y recientemente difundida entre los rangos mareales superior e inferior, sobre las raíces de mangle rojo, *Rhizophora spp.*, predominantemente. La contaminación por metales pesados del medio acuático es un problema de características globales, por lo que se requieren métodos efectivos para la determinación del impacto sobre los organismos afectados.

El presente estudio pretende responder las siguientes preguntas; ¿Cuáles son las respuestas fisiológicas de *Rhizoclonium riparium* a la exposición a metales pesados? y de acuerdo con su nivel de tolerancia, ¿puede ser usada como indicador de contaminación por metales pesados?.

1. OBJETIVOS

GENERAL

Determinar la capacidad de tolerancia de *Rhizoclonium riparium* a distintas concentraciones de plomo, cobre y mercurio, para su posterior aplicación en programas de bioremediación, monitoreo y control ambiental

ESPECIFICOS

Determinar las respuestas metabólicas (tasa fotosintética y fluorescencia) del alga *Rhizoclonium riparium*, sometida a diferentes concentraciones de metales pesados.

Evaluar la capacidad de acumulación de plomo, cobre y mercurio en *Rhizoclonium riparium*.

HIPÓTESIS NULA

No existen diferencias significativas en la producción fotosintética, fluorescencia y bioacumulación de *Rhizoclonium riparium* expuesta a distintas concentraciones de plomo, cobre y mercurio.

HIPÓTESIS ALTERNATIVA.

Existen diferencias significativas en la producción fotosintética, fluorescencia y bioacumulación de *Rhizoclonium riparium* expuesta a distintas concentraciones de plomo, cobre y mercurio.

2. ANTECEDENTES

2.1 DESCRIPCION DE LA ESPECIE

Rhizoclonium riparium tiene distribución cosmopolita (Francoise 2001, Davy et al 2001, Yoroka et al 1999, Christensen 1994), y crece en hábitats dulceacuícolas, salobres y marinos. Tiene células entre 7 y 27 micrómetros (promedio 21 μm) de longitud y entre 1.1-4.2 μm de ancho, crecimiento intercalar, células cilíndricas, cenocíticas y cloroplasto parietal reticulado. Los filamentos son no ramificados o con ramificaciones rizoidales cortas, generalmente adheridos al sustrato (plano lodoso, troncos de mangle, estructuras civiles) y/o flotantes. (Acleto y Zúñiga 1998, Van Den Hoeck 1995).

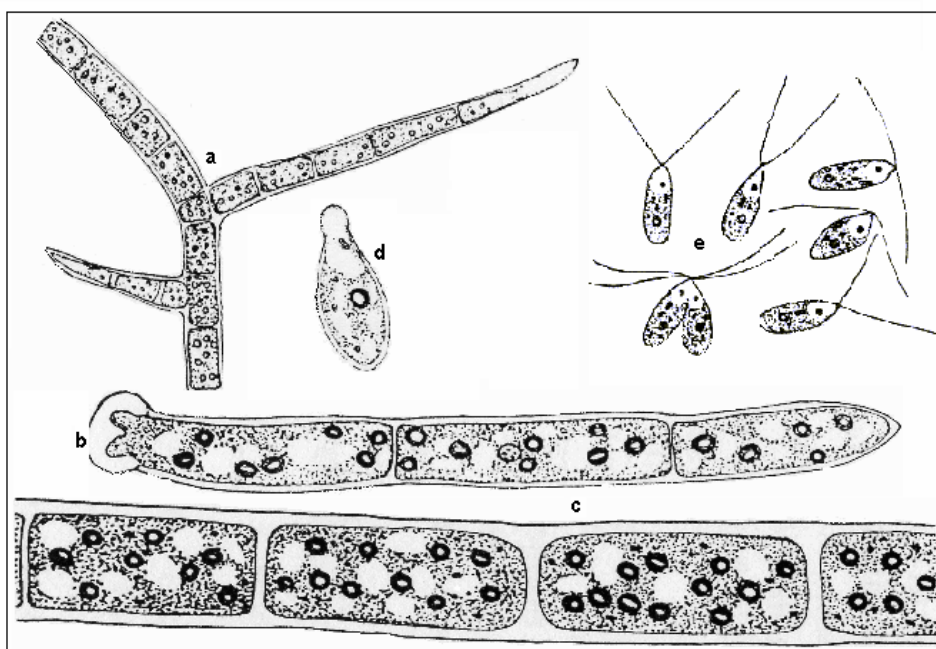


Figura 1. Descripción morfológica de *Rhizoclonium riparium*. a. Filamento heterótrico con ramitas rizoidales b. Filamento joven con disco basal c. Filamento adulto d. Zoospora germinada y e. Isogametos libres y acoplados (cuadriflagelado). Reproducido de Blidling 1957.

El número de pirenoides es de 3 a 15, con longitudes de 5 a 8 μm . y ramitas rizoidales de entre 1 y 5 células siendo la basal acintada e incolora. Con ciclo

de vida haplodiploide isomórfico (Clinton 1991), los cuerpos reproductivos son isogametos biflagelados con longitud de 11.5 a 13.2 μm . La unión sexual ocurre cuando los gametos se forman simultáneamente en plantas distintas y el cigoto genera una nueva planta sexual (Blidling 1957, ver figura 1 para detalles). La reproducción asexual se da por medio de zoosporas cuadriflageladas, liberadas a través de un poro apical.

2.2 BIOACUMULACION.

Las plantas han sido analizadas desde su potencial como bioremediadores de metales pesados, encontrándose útiles en la recuperación de suelos contaminados con cobre (Poschenrieder 2001). Whitton en 1984, describió 15 especies de algas (*Lyngbya nigra*, *Microthamnion kuetzingianum*, *Chlorella pyrenoidosa* y *Pinnularia acoricola*, entre otras) en un paralelo de observaciones de toxicidad contra reporte-autor y mencionó las ventajas de la utilización de estos vegetales en el monitoreo de sistemas contaminados con metales pesados.

Recientemente se seleccionaron *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus quadricauda*, entre nueve especies de microalgas por su potencial para retirar níquel y cinc de vertimientos industriales chinos (Chong *et al* 2000). Se ha determinado para estos metales que *Fucus ceranoides* y *F. vesiculosus* (PHAEOPHYCEAE) son acumuladoras (Barreiro *et al* 1993). Adicionalmente, en este estudio se caracterizan los sectores y/o la edad de los tejidos donde se acumula metal. Las algas marinas y estuarinas han sido trabajadas extensamente desde su potencial bioindicador (Wilson 1994, Ramírez 1987, Hall 1981, Whitton 1984, Hamilton 1987). Para ello se determina su resistencia a la exposición de metales en ensayos que van de unas pocas horas hasta varias semanas y se evalúa su capacidad de asimilación de los contaminantes *in situ* y/o en condiciones de laboratorio. Estos talófitos se estudian también, para determinar la productividad de sistemas lóticos y lénticos (Gursuch y Wang 1997, Shubert 1984), dulceacuícolas y marinos, la efectividad de agentes químicos preventores de eutroficación y para establecer límites máximos de

permisibilidad de agentes contaminantes en estuarios, ríos y el océano (ver límites de permisibilidad para plomo, cobre y mercurio en la tabla 1).

Tabla 1. Valores máximos admisibles de plomo, cobre y mercurio en medio acuoso para aguas colombianas.

Criterio de uso	Metal	Concentración (mg / L)
¹ Recreación (salpicadura)	Cu	0.1
Recreación (salpicadura)	Hg	0.01
Recreación (salpicadura)	Pb	0.01
² Pecuario	Cu	0.5
Pecuario	Hg	0.01
Pecuario	Pb	0.1
³ Consumo humano	Cu	1
Consumo humano	Hg	0.002
Consumo humano	Pb	0.05
⁴ Vertimientos	Cu	0.1
Vertimientos	Hg (inorgánico)	0.02
Vertimientos	Pb	0.5

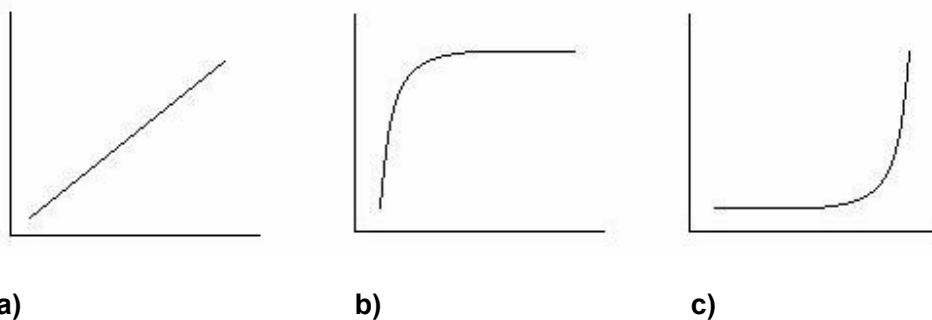
Artículos 75 (1), 41 (2). 31 (3) y 74 (4) del decreto 1584 de 1984.

En Colombia, se han determinado los niveles de cobre para el género *Caulerpa* en la Bahía de Cartagena (Panizzo et al 1998), mostrándose acumulaciones considerables del metal.

Los ecosistemas costeros están afectados por la introducción de sustancias alóctonas, entre ellas materia orgánica y metales pesados (Roldán 1992), que en concentraciones bajas son elementos importantes en el crecimiento de las plantas.

Las comunidades algales son la base de la cadena trófica estuarina y la fuente principal de oxígeno del mundo; especies oportunistas de macroalgas como los géneros *Chaetomorpha californica* y *Rhizoclonium riparium* se aprovechan de los nutrientes en exceso y eliminan los nichos de otras algas bajando la diversidad de distintas especies como moluscos, crustáceos y peces que de

ellas se alimentan. Paralelo a este proceso, los metales pesados son incorporados en ellas de forma activa o pasiva, acumulándose inicialmente en las paredes celulares al unirse con polisacáridos de alto peso molecular (el manitol y el sorbitol en algas rojas) y luego lentamente, hasta el citoplasma (Barreiro *et al* 1993). Este segundo proceso en orden secuencial se denomina bioadsorción, es de carácter más lento y energéticamente dependiente (Wang y Lewis 1998, Andrade *et al* 2000). En la figura 2 se aprecia la clasificación de las plantas de acuerdo con el tipo de bioacumulación.



a) b) c)
Figura 2. Comportamiento de bioacumulación de metales en especies vegetales; a) bioindicadoras o detoxificadoras, b) bioacumuladoras o tolerantes y c) excluyentes o evasivas. El eje x representa la concentración de metal en el sustrato mientras que el Y, la cantidad de metal bioacumulado. Tomado de Shaw 1990.

De acuerdo con la forma de la curva bioacumulación vs. concentración en el sustrato (Shaw 1990), se clasifica a las plantas como detoxificadoras, si existe proporcionalidad entre la cantidad de metal adsorbido y la concentración en el medio. Como bioacumuladoras o tolerantes, si solo se presenta asíntota horizontal a muy altas concentraciones de metal bioacumulado y, excluyentes, si la asíntota horizontal de consumo se da a altas concentraciones de metal en el medio externo (figuras 2a, 2b y 2c, respectivamente).

Las concentraciones de metales pesados en el talo o filamento del alga, pueden superar en varios órdenes de magnitud la cantidad de metal en el agua o sedimento, de allí su importancia como indicadores de contaminación hídrica. Especies invasoras como el alga verde filamentosa *Rhizoclonium riparium*, determinarían descargas puntuales de contaminantes metálicos y/o daños a corto plazo sobre su población pues su afloramiento en la bahía es reciente (Ospina-Alvarez y Peña 2004).

Las algas acumulan metales pesados de su entorno de forma pasiva, en los azúcares muy pesados de la pared celular y de forma activa y lenta hasta el interior celular en un proceso denominado bioadsorción.

Tabla 2. Algunos reportes de bioacumulación en plantas

Especie	Metal*	Concentración ($\mu\text{g} / \text{g}(\text{ps})$)**	Localidad -país	Investigadores
<i>Caulerpa sertularoides</i>	Pb	4.6 - 27	Cartagena, Colombia	Panizzo et al. 1998.
<i>Myriophyllum exalbescens</i>	Pb	66 - 350	Flin- Flon, Canadá	Franzin y McFarlane 1980.
"	Cu	27 - 240	"	"
<i>Sphagnum papillosum</i>	Cu	0.1	Ullswater, Inglaterra	Welsh y Denny 1980.
<i>Padina vickersiae</i>	Pb	5 - 22.3	La Habana, Cuba	Ramírez et al. 1987.
"	Cu	4.4 - 21	"	"
<i>Turbinaria tricostata</i>	Pb	5 - 5.6	"	"
"	Cu	1.5 ó menos	"	"
<i>Laurencia papillosa</i>	Pb	8.1 - 28.1	"	"
"	Cu	8 - 4.8	"	"
<i>Wurdemannia miniata</i>	Pb	16.3	"	"
"	Cu	7.6	"	"
<i>Cladophoropsis membranacea</i>	Pb	5.6 - 20.4	"	"
"	Cu	3.5 - 18.7	"	"
<i>Ulva lactuca</i>	Pb	6.2 - 11.1	"	"
"	Cu	2 - 3.5	"	"
Macrófitas acuáticas	Pb	18 - 37	CGSM - Colombia	Troncoso y Campos 2000
<i>Chaetomorpha antennina</i>	Pb	6.9 - 16.6	Hong Kong - China	Hamilton 1987.
"	Cu	4.5 - 39	"	"
<i>Enteromorpha compressa</i>	Pb	8 - 9.4	"	"
"	Cu	28 - 51.8	"	"
<i>Enteromorpha flexuosa</i>	Pb	7.9 - 10.2	"	"
"	Cu	8.6 - 11.6	"	"
<i>Enteromorpha linza</i>	Pb	11 - 12.5	"	"
"	Cu	2.7 - 3.7	"	"
<i>Rhizoclonium riparium</i>	Pb	7.2 - 8	"	"
"	Cu	10.8 - 11	"	"

* Pb: plomo, Cu: Cobre. ** microgramos por gramo de peso seco.

La tabla 2, muestra algunos valores de acumulación metálica por algas y macrófitas acuáticas. Dada su gran resistencia a altas concentraciones de

metal, abundancia, facilidad de colecta y trabajo en el laboratorio, las algas son usadas para monitorear la condición de ecosistemas acuáticos tales como lagos, ríos, estuarios y el océano.

2.3 FLUORESCENCIA Y PRODUCCION FOTOSINTETICA.

El diagnóstico del estado de contaminación de los ecosistemas a través de algas puede hacerse determinando la cantidad de metal acumulado por estas en condiciones ambientales controladas y determinando su viabilidad en el tiempo a través de la medición del dióxido de carbono incorporado y/o el oxígeno-fluorescencia emitidos (Wilson 1994, Lobban y Harrison 1994). Algunos investigadores han usado pruebas con variables distintas al consumo de carbono (Nyholm y Peterson 1997).

La fluorescencia sumada a la disipación de calor, es una medida alterna de la eficiencia con que las plantas convierten energía lumínica en alimento. Parte del principio que el fotosistema II, que contiene los centros captadores de luz (Sze 1998, Krall y Edwards 1992) luego de su saturación con un pulso de luz de menos de un segundo de duración y una intensidad de $9200 \mu\text{moles}/\text{m}^2 \text{ s}$, que suprime la fotosíntesis y elimina la distorsión en la medición causada por la luz externa (Photosynthesis Yield Analyzer 1999), emite luz fluorescente, captable a través de fibra óptica y medible electrónicamente. La figura 3 muestra el decaimiento del pico de emisión fluorescente luego de un pulso de luz de saturación en una planta normal.

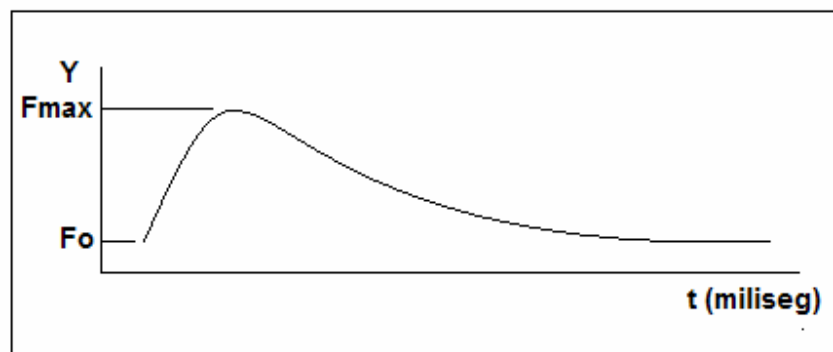
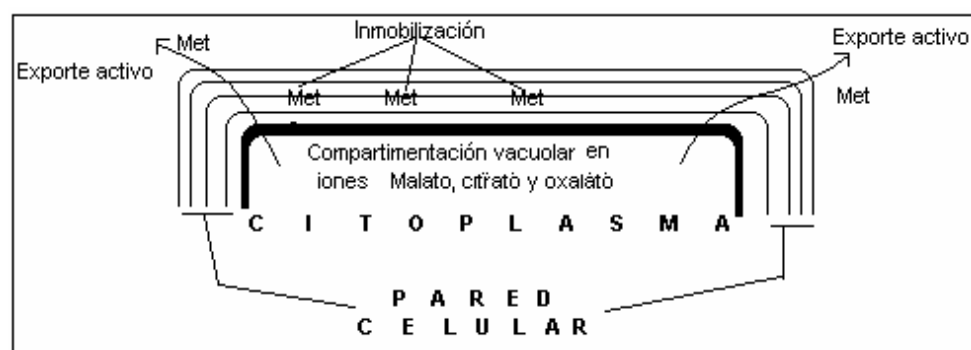


Figura 3. Espectro de emisión fluorescente en vegetales luego de un pulso de luz de saturación. Tomado de Gemel *et al* 1997. Tiempo en milisegundos.

Tanto la producción fotosintética como la fluorescencia, dan idea del estado de funcionamiento del PS II (Nyholm y Peterson 1997), del transporte de electrones entre el PSII y el fotosistema I y de la escisión del agua, aunque no hay proporcionalidad entre las variables (Hanelt y Nult 1995).

Las pruebas de toxicidad son en general, las que determinan la concentración a la que un agente contaminante causa el 50 % de muerte en la población algal estudiada (LC 50 Lethal Concentration 50 por sus siglas en inglés) y son comunes en el establecimiento de normas de permisibilidad de vertimientos.

Los vegetales han desarrollado mecanismos de adaptación a medios contaminados con metales pesados. A. J. Baker (en Shaw op. cit.) define tres de estos mecanismos a saber; la eliminación o restricción en el consumo del metal (v.g *Chlorella vulgaris* y cobre); la restricción en el transporte del mismo o compartimentalización y varios mecanismos externos, como emisión de agentes quelantes y/o variación de la especie metálica en el medio externo (ver figura 4). La biodisponibilidad de los metales pesados es un factor determinante de su grado de toxicidad; Los metales pesados pueden no ser degradados biológicamente, pero sí transformados (cambio de especie metálica) a sustancias menos tóxicas para los organismos (Rada 1998).



4. Esquema de los procesos de resistencia metálica en algas. Tomado de Raskin 1994.

3. METODOLOGÍA.

3.1 COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO

En jornadas bimensuales a la desembocadura del río Dagua y a Isla Cangrejo, en la bahía de Buenaventura, Valle del Cauca – Colombia (ver figura 5), se colectaron mechones de lama (denominación local para *Rhizoclonium riparium*) y se transportaron en recipientes plásticos con agua de mar filtrada hasta el laboratorio de Biología Vegetal Aplicada de la Universidad del Valle.

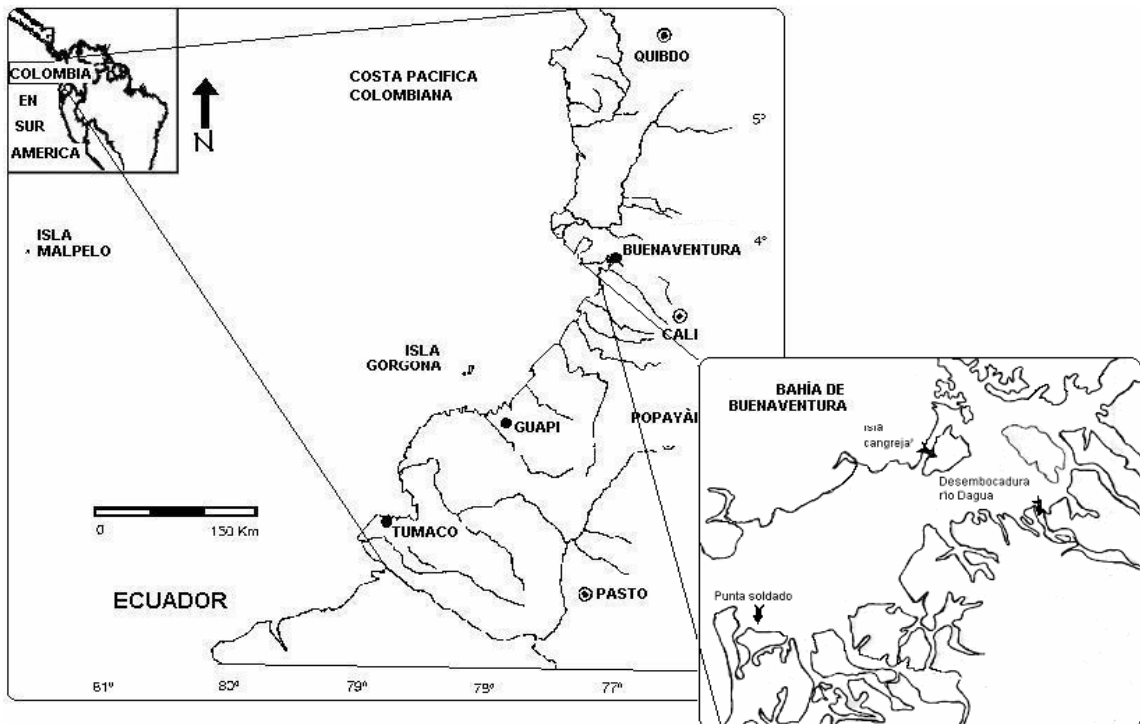


Figura 5. Localización geográfica de la bahía de Buenaventura mostrando las estaciones de muestreo.

Luego de dos semanas (fase de aclimatación) durante las cuales se realizó una selección rigurosa (separación de sedimento, fauna asociada y otras algas) dos gramos de filamentos de *R. riparium*, fueron incubados en botellas de vidrio templado (Boeco y Schott, Alemania), a una temperatura promedio de $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ($n = 100$), luminosidad $70\text{-}100\ \mu\text{moles} / \text{m}^2\ \text{s}$ (cuantómetro Licor

500, EUA) en 610 mililitros (200 mL en los ensayos de bioacumulación) del medio de cultivo F-2 de Guillard, (Stein 1980) con una salinidad de 15 ppt's (Termo Orion 150 AZ, EUA) y obviando el ácido etilendiamino tetracético EDTA, porque disminuye la accesibilidad de los iones de metal a las plantas a un pH entre 7.8 y 8.0 (fisiológico, Schott CG 842 EUA).

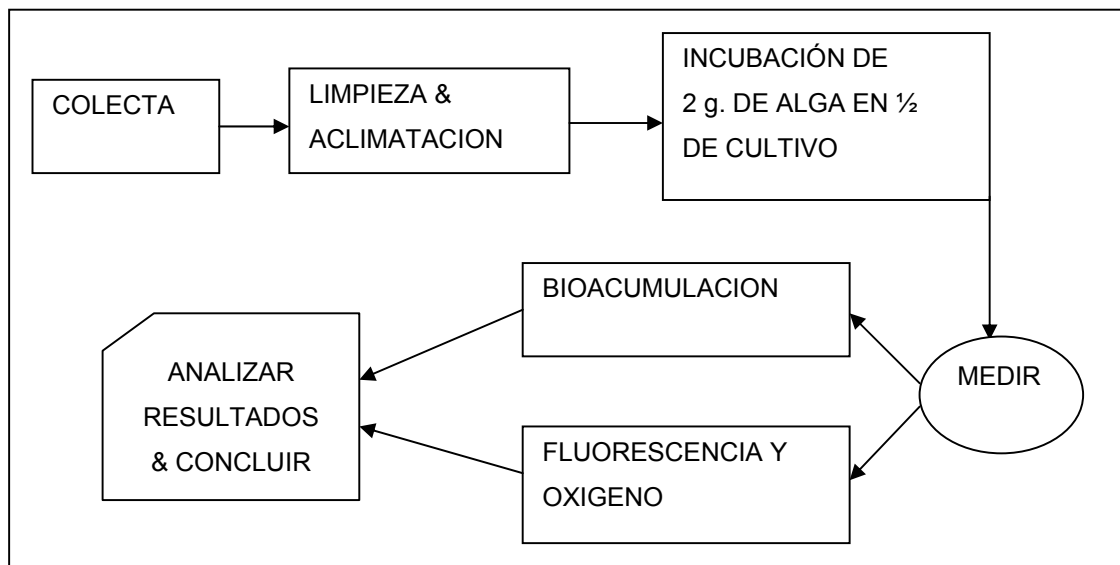


Figura 6. Metodología general de trabajo.

3.2 FORMULACIÓN DEL AGUA DE MAR SINTÉTICA Y MEDIO F2 DE GUILLARD.

3.2.1 Preparación del agua de mar sintética. (Lyman and Fleming, 1940)

Tabla 3. Componentes del agua de mar artificial

<i>Sal</i>	<i>Peso *</i>
NaCl	23.939
MgCl ₂	5.079
Na ₂ SO ₄	3.994
CaCl ₂	1.123
KCl	0.667
NaHCO ₃	0.196
KBr	0.098
H ₃ BO ₃	0.027
SrCl ₂	0.024
NaF	0.003

*Receta para 1 kilogramo de agua de mar artificial. Peso en gramos

3.2.2 Medio de cultivo para algas

Composición de la solución 1 del medio de cultivo F2 de Guillard (Alvarez 1994)

Componente	Concentración (mg/L)	Componente	Concentración (mg/L)
NaCl	471 * 10 ³	MnSO ₄	23.4
MgCl	29.5 * 10 ³	Na ₂ HPO ₄	12.3
MgSO ₄	57.5 * 10 ³	Na ₂ MoO ₄	4.1
CaCl	12.4 * 10 ³	Lic.	23.4
KCl	9.8 10 ³	Ca(C ₆ H ₁₁ O ₇) ₂	1.53
NaHCO ₃	2.5 * 10 ³	KI	0.57
SrCl	74	KBr	240
MnSO ₄	23.4 * 10 ³	CuCl	0.028
NaHCO ₃	12.3	AlSO ₄	0.3
SrCl ₂	4.1	CoSO ₄	0.34
Manganeso	0.1 µm / L	RbSO ₄	1.31
Molibdeno	0.9 µm / L	ZnSO ₄	0.24
Cobalto	0.03 µm / L	FeSO ₄	0.42

Tabla 4. Componentes de la solución 1 del medio F2 de Guillard.

El solvente fue siempre agua destilada. Las soluciones de metales traza (4 últimas filas de la tabla 6) y vitaminas (tabla 7, conservadas en frío), se dispusieron a razón de 1 mL. por litro de medio de cultivo. El pH se reguló con HCl concentrado y TRIS.

i) Composición de la solución 2 del medio F-2 de Guillard. (Guillard y Ryther 1962).

A 1 litro de agua de mar agregue lo dispuesto en la tabla 5.

Tabla 5. Composición de la solución 2 del medio F2 de Guillard

Cantidad (mL)	Compuesto	Solución madre (g)
1	NaNO ₃	75.0 δH ₂ O
1	NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	5.0 δH ₂ O
1	Na ₂ SiO ₃ . 9H ₂ O	30.0 δH ₂ O
1	Solución metales traza	Receta abajo
0.5	Solución de vitaminas	Receta abajo

ii) Metales traza

Tabla 6. Composición de la solución de metales traza.

Cantidad	Compuesto	Solución madre (g)
3.15 g	FeCl ₃ .6H ₂ O	-
1.0 mL	CuSO ₄ .5H ₂ O	9.8
1.0 mL	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	6.3
1.0 mL	ZnSO ₄ .7H ₂ O	22.0
1.0 mL	CoCl ₂ .6H ₂ O	10.0
1.0 mL	MnCl ₂ .4H ₂ O	180.0

iii) Solución madre de vitaminas

A un litro de agua destilada ponga lo contenido en la tabla 7.

Tabla 7. Componentes de la solución madre de vitaminas

Cantidad	Compuesto	Solución madre (g)
1.0 mL	Cianocobalamina (Vit. B12)	1.0
10.0 mL	Biotina	0.1
200.0 mg	Tiamina HCl	-

3.3 COLECTA DE DATOS

3.3.1 Fluorescencia y Oxígeno

Las mediciones de fluorescencia y producción fotosintética se realizaron en períodos de 1, 24, 96 y 144 horas de exposición a sales de cobre (sulfato), mercurio y plomo (cloruros, ver tabla de concentraciones de trabajo) con reactivos de calidad analítica, en un fluorómetro de luz de amplitud modulada (Minipam-Walz Alemania) y un oxímetro de cátodo activo (YSI 55 – USA) respectivamente. El alga incubada en el medio de cultivo F2 de Guillard, se sometió a un pulso de luz de saturación de 0.2 segundos de duración, frecuencia de 0.6 a 20 kilohertzios. Esta frecuencia y un filtro incorporado de 650 nanómetros eliminan el ruido de fondo de la luz externa. La distancia entre la sonda del fluorómetro y la muestra fue de 12 milímetros (PHOTOSYNTHESIS YIELD ANALYZER 1999).

Se hicieron cinco mediciones de fluorescencia por frasco de prueba, en tres frascos por concentración y tiempo. Se midió un frasco control (alga sin metal) por cada tres unidades experimentales.

Para determinar la concentración de oxígeno disuelto, se incubaron durante una hora dos gramos de alga (peso fresco) en frascos sellados con papel parafinado (para evitar intercambio gaseoso con la atmósfera) y llenos con medio de cultivo inoculado con metales pesados (Lobban y Harrison 1994, Martin y Thomas 1988).

Las mediciones de oxígeno disuelto se realizaron previa y posteriormente a la incubación de las algas introduciendo suavemente el electrodo del oxímetro y sellando hasta estabilizar la medición (el proceso toma alrededor de 200 segundos).

La fluorescencia o rendimiento fluorescente es el cociente de la diferencia entre las fluorescencias máxima y mínima sobre la máxima ($Y : (F_{max} - F_{min})/F_{max}$).

La producción fotosintética se obtuvo multiplicando la diferencia entre los valores de la concentración de oxígeno disuelto inicial y final, en tres frascos de prueba, por el cociente del volumen de trabajo (0.61 L) y el porcentaje de desecación de *Rhizoclonium riparium* durante 24 horas a 50 °C. ($PF : \Delta O_2 (0.61/0.54)$)

El mismo protocolo se usó en un organismo control (dos gramos de algas sin tratar), para cada concentración y tiempo de exposición, como medida de referencia de la producción fotosintética en condiciones de no perturbación.

3.3.2 Bioacumulación

Los datos de bioacumulación se obtuvieron en períodos de 2, 6, 12, 24, 96 y 144 veinticuatro horas, luego de los cuales las algas fueron transportadas al laboratorio de Química de Productos Naturales de la Universidad del Cauca, para digestarlas (eliminar la materia orgánica en medio ácido) y posteriormente determinar analíticamente la bioacumulación de metal en Ingeominas-Cali.

Las muestras algales se empacaron a razón de dos gramos por cada bolsa de autosellado (polietileno) y en frío, fueron transportados al laboratorio de Química de Productos Naturales de la Universidad del Cauca para los pasos subsiguientes.

Tabla 8. Concentraciones de plomo, cobre y mercurio, usados en la determinación de la fluorescencia, producción fotosintética y bioacumulación de *Rhizoclonium riparium*.

Concentración de metal en el medio (mg/L)	Bioacumulación	Fluorescencia y Producción fotosintética
0.01	Hg	Hg
0.1	Hg, Pb y Cu	Hg, Pb y Cu
1	Hg, Pb y Cu	Hg, Pb y Cu
5	Hg, Pb y Cu	Hg, Pb y Cu
10	Hg, Pb y Cu	Hg, Pb y Cu
15	Pb y Cu	Hg, Pb y Cu
20	Hg	
30		Hg, Pb y Cu
40	Pb y Cu	
60		Hg, Pb y Cu
100		Hg, Pb y Cu
150		Pb y Cu

3.4 PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE METALES PESADOS EN ALGAS

3.4.1 Digestión.

Mercurio

- i) Pesar 2 gramos de alga (+/-0.04)
- ii) Adicionar 5 mililitros de ácido nítrico concentrado y 5 mililitros de ácido sulfúrico concentrado (95-98 % de pureza)
- iii) Calentar a 60° C hasta obtener amarillo translúcido.

Plomo y cobre.

Repetir i e ii, cambiando la proporción HNO₃ / H₂SO₄ de 1 a 2 : 1.

La temperatura digestión es irrelevante en este caso

3.4.2 Determinación analítica de plomo y cobre

Este método es aplicable a agua potables, superficiales domesticas y residuales.

i) Reactivos

1 Soluciones estándar de plomo y cobre de 1000 mg/L .

2 Soluciones patrón de plomo y cobre de 100, 10, 5, 2, 1,0 y 0.5 mg/L.

A partir del stock de 100 mg/L preparar una serie de patrones que abarquen el rango de 0.5 a 2,0 mg/ L de Pb y 0.5 a 5.0 mg/L de Cu.

ii) Condiciones instrumentales

Las condiciones instrumentales para la determinación analítica de plomo y cobre se disponen en la tabla 9.

Tabla 9. Condiciones instrumentales en la determinación analítica de plomo y cobre en *Rhizoclonium riparium*

<i>Equipo o componente</i>	<i>Especificación</i>
Lámparas	plomo y cobre
Longitud de onda	217.0 y 324.8 nanómetros
Slits	0.25 y 0,5 nanómetros
Corriente	8 y 10 miliAmperios
Modo de análisis	BGC-D ₂
Gas	mezcla aire-acetileno

iii) Procedimiento

Tomar 250 mL. de la muestra preservada de acuerdo a la metodología establecida para ello y dejar que alcance la temperatura ambiente. Hacer una curva de calibración usando blanco de calibración y patrones. Hacer mediciones directas por espectroscopia de absorción atómica sobre la muestra; sí la concentración presente sobre la muestra no es detectable, proceda a concentrar la muestra 10 veces usando la técnica de evaporación a 100 °C.

Una vez concentrada y fría, medir la concentración de cobre por absorción atómica teniendo en cuenta el factor de dilución para el reporte de la concentración real así; concentración: concentración leída en muestra concentrada / factor de dilución

3.4.3 Determinación del límite de detección.

Para la determinación del límite de detección se preparan 10 patrones de 0.1 y 0.2 mg/L y 10 blancos los cuales se miden en el equipo de adsorción atómica con las condiciones instrumentales mencionadas.

La pendiente calculada para esta curva: 0.016 y 0.05 abs/ppm para plomo y cobre, respectivamente y el algoritmo $S : (\Sigma [2\{X - X_{met}\} / n-1])$, denota el límite de detección del método.

$LD = 3 * S$ (las absorbancias del blanco)/ pendiente de la curva de calibración

LD = Límite de detección del método

S_{met} = Desviación estándar de los valores de absorbancia de cada metal

X = Valor de absorbancia

X_{met} = Valor del promedio de la absorbancia para cada metal

N = Número de patrones leídos

La tabla 10 muestra los valores de límites de detección calculados.

Tabla 10. Límites de detección para plomo y mercurio*

Metal	Concentración	Desviación estándar
Pb	0.0008	+/- 2.23 x 10 ⁻⁴
Cu	0.0009	+/-2.5x10 ⁻⁵

*Se usaron 10 patrones y un M de 0.05 abs/mg/l

El límite de detección fue de 0.04 y 0.3 mg/ L para plomo y cobre.

Comentarios

Es necesario hacer la determinación de los metales en aguas cuyas concentraciones sean sólo trazas, usando métodos de extracción con compuestos orgánicos tales como APDC (ácido 1-Bencil - (2R, 4R) - 4 - aminopirrolidona -2,4- dicarboxílico) y MIBK (Metil Isobutil Cetona) y realizar las lecturas en un equipo de Absorción atómica acoplado a un horno de grafito.

3.4.4 Determinación de mercurio por vapor frío de plasma.

Las características de la determinación analítica de mercurio por plasma frío se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Características de la determinación analítica de mercurio en *Rhizoclonium riparium*.

<i>Item</i>	<i>valor</i>
Límite de detección	4.2 µg / L
Desviación estándar	0.36 µg / L
Desviación relativa	8.6 %
Error relativo	8.4 %

3.4.5 Materiales usados.

La tabla 12 muestra los materiales usados en la determinación analítica de plomo, cobre y mercurio en *Rhizoclonium riparium*.

Tabla 12. Equipos usados en la determinación analítica por espectroscopia de adsorción atómica de metales pesados en *Rhizoclonium riparium*

Equipo	Marca	Especificación
Agitador mecánico	Yankee rotator.	115V. 0.7Amp. 60 RPM's. USA
Balanza analítica	OHAUSS Adventure.	8-14.5V. 50/60HZ. 6W. Item AR3130.USA.
Estufa Kjeldhal.	COLRES.	6 boquillas.Colombia.
Espectrofotómetro de Adsorción Atómica	Shimatzu	AA 660 .
Plancha	Fisher Thermix	Model 210 t. 115V. 8.7Amp. 60Hz. 127 RPM's. Canadá
Plancha	Fisher Scientific.	120v. 7.5Amp. 60Hz. serial number 110N366. Canadá.

3.5 ANALISIS ESTADISTICO DE DATOS

Los experimentos de fluorescencia y producción fotosintética se realizaron en un diseño de medidas repetidas para grupos de organismos a evaluarse a lo largo del tiempo (Rittler 1996, Zar 1996, Scheiner y Gurevitch 1993).

Los análisis se realizaron con errores tipo alfa menores al cinco por ciento ($p < 0.05$) y usando la prueba de esfericidad de Mauchly en el paquete estadístico SPSS versión 5.0. La prueba de esfericidad de Mauchly, se usa en diseños de medidas repetidas, análogo al de Levene o Shapiro-Wilkins, a favor determinar homogeneidad de varianzas en las variables estudiadas.

La homogeneidad de varianzas u homocedasticidad, es requisito indispensable (junto con las pruebas de bondad de ajuste a la curva normal, que para el caso fue Bonferroni) para determinar diferencias significativas entre las variables estudiadas (Zar 1996). Los gráficos (incluida bioacumulación) se realizaron en el programa estadístico Statistica versión 5.1 (Statsoft 1997) y en Excel (Microsoft, 2000).

Lo valores de bioacumulación de metales pesados se analizaron desde sus representaciones gráficas, dada su fuerte correlación con las variables independientes tiempo de exposición y concentración en el medio de cultivo.

4. RESULTADOS

4.1 VALIDEZ ESTADÍSTICA

4.1.1 Análisis de Plomo

La prueba de Tuckey HSD arrojó diferencias significativas para fluorescencia de *Rhizoclonium riparium* tratada con 15 miligramos por litro de cobre, entre 24 y 144 horas (valores de p 0.001 y 0.0007 respectivamente).

4.2.2 Análisis de Cobre

La fluorescencia de *Rhizoclonium riparium* expuesta a cobre mostró homogeneidad de varianzas en los tiempos de exposición, con la prueba de Brown-Forsythe, y diferencias significativas (Tuckey) entre 5 y 100 miligramos por litro de cobre en el medio de cultivo.

La comparación de la producción fotosintética de *Rhizoclonium riparium* sometida a las distintas concentraciones de cobre y el control (sin metal) se muestra en la tabla 13 (Tuckey HSD).

Tabla 13. Comparación (Tuckey HSD) entre la producción fotosintética sin perturbación y la de *Rhizoclonium riparium* sometida a cobre

Concentración (mg / L)	p
0.1	0.99
1	1
5	0.99
10	0.99
15	0.99
30	1
60	0.99
100	0.92
150	0.29

4.2.3 Análisis de mercurio

Producción fotosintética

La prueba de Kolmogorov-Smirnov , muestra distribución normal en la producción fotosintética de *Rhizoclonium riparium* expuesto a mercurio. Ver tabla 14.

Tabla 14. Prueba de ajuste a la curva normal (Kolmogorov-Smirnov, $p > 0.2$) de la producción fotosintética de *Rhizoclonium riparium*

Tiempos de exposición	D max	P
1	0.124	> 0.2
24	0.143	> 0.2
96	0.165	> 0.2
144	0.127	> 0.2

La prueba de comparaciones pareadas con ajuste de Bonferroni, señala (p menores que 0.05) los tiempos de exposición diferentes entre sí, en la producción fotosintética de *R. riparium* expuesto a mercurio. Ver tabla 15.

Tabla 15. Prueba de comparaciones pareadas con ajuste de Bonferroni para la producción fotosintética de *Rhizoclonium riparium*.

Tiempo*	Tiempo	P
1	24	0.0005
24	144	0.008

*Tiempo en horas

Fluorescencia

En las tablas 15 y 16, se muestran las diferencias (Tuckey; p menores que 0.05) para algunas concentraciones de mercurio en la fluorescencia de *Rhizoclonium riparium* expuesta durante una y 144 horas, respectivamente.

Tabla 16 Prueba de Tuckey para la fluorescencia de *Rhizoclonium riparium* expuesta a mercurio durante una hora

Concentración	Concentración*	p
0.01	30	0.04
0.01	100	0.042
0.1	20	0.042
0.1	60	0.039
0.1	100	0.02

* Concentración en mg / L

Tabla 17. Prueba de Tuckey HSD para fluorescencia de *Rhizoclonium riparium* expuesta a mercurio a 144 horas.

Concentración *	Concentración	p
0.1	20	0.026
0.1	30	0.018
0.1	60	0.029
1	20	0.019
1	30	0.013
1	60	0.029
1	100	0.03

* Concentración en mg / L

4.2 VALORES DE FLUORESCENCIA

Los resultados de la emisión de fluorescencia por *Rhizoclonium riparium* expuesta a plomo, cobre y mercurio se disponen en las próximas tres tablas.

Tabla 18. Fluorescencia de *Rhizoclonium riparium* expuesta a plomo*.

Pb en 1/2	1	24	96	144	Pb en 1/2	1	24	96	144
0,1	587	670	417	484	15	698	680	522	508
0,1	675	654	463	526	30	468	480	424	277
0,1	673	644	503	464	30	495	453	498	216
1	613	662	437	437	30	500	620	521	310
1	648	700	449	491	60	581	472	522	217
1	546	612	369	415	60	459	506	490	237
5	579	626	460	441	60	480	441	424	442
5	628	671	417	456	100	493	524	538	462
5	608	718	402	---	100	535	610	600	375
10	602	690	482	407	100	561	436	684	492
10	647	674	517	541	150	454	565	635	456
10	684	691	606	411	150	362	419	457	371
15	668	726	634	542	150	452	359	367	393
15	681	672	628	394					

* Metal en medio de cultivo (1/2), mg / L; tiempo en horas

De forma general, la fluorescencia de *R. riparium* disminuye con el aumento de las concentraciones de plomo en el medio de cultivo.

Tabla 19. Fluorescencia de *Rhizoclonium riparium* expuesta a cobre.

Cu en ½	1	24	96	144	Cu en ½	1	24	96	144
0,1	700	519	576	595	15	583	492	597	560
0,1	700	532	632	486	30	591	633	409	130
0,1	700	580	668	528	30	612	461	177	154
1	657	524	617	541	30	491	616	293	535
1	657	544	596	525	60	565	574	362	462
1	657	545	581	602	60	501	349	461	133
5	654	529	527	450	60	593	647	412	379
5	654	509	621	650	100	587	490	194	119
5	654	512	634	596	100	692	574	415	443
10	629	547	635	572	100	650	481	389	512
10	629	485	638	635	150	640	473	180	211
10	629	344	543	447	150	520	535	272	159
15	583	534	622	509	150	628	460	234	470
15	583	542	622	471					

La fluorescencia de *Rhizoclonium riparium* a su exposición con cobre, incrementa levemente.

Tabla 20. Fluorescencia de *Rhizoclonium riparium* expuesta a mercurio*.

Hg en ½	1	24	96	144	Hg en ½	1	24	96	144
0,01	443	590	468	634	10	576	636	529	634
0,01	385	622	468	222	20	746	653	721	713
0,01	403	582	468	437	20	742	708	727	717
0,1	412	559	489	388	20	753	696	728	723
0,1	510	616	489	600	30	784	752	766	701
0,1	505	615	489	215	30	793	762	738	756
1	543	605	583	372	30	766	636	742	754
1	546	568	583	115	60	764	702	709	712
1	544	607	583	632	60	770	687	719	710
5	558	598	----	119	60	720	641	729	716
5	639	660	----	521	100	775	684	724	735
5	586	619	----	523	100	778	697	721	739
10	589	606	529	620	100	779	713	727	684
10	587	620	529	578					

* Metal en medio de cultivo (½), mg / L; tiempo en horas

Los valores de fluorescencia de *Rhizoclonium riparium* expuesta a mercurio incrementan a lo largo de las concentraciones de trabajo.

4.3 VALORES DE PRODUCCION FOTOSINTETICA

Los valores de producción fotosintética están expresados en miligramos de oxígeno producido en un litro, por cada miligramo de peso seco algal tratado en una hora; números negativos corresponden con eventos respiratorios o de consumo de oxígeno; líneas de trazos, experimentos omitidos.

Los resultados de fotosíntesis de *R. riparium* en condiciones de perturbación por plomo y cobre se disponen las tablas 21 y 22, respectivamente.

Tabla 21. Producción fotosintética de *Rhizoclonium riparium* expuesta a plomo*.

Pb en medio	1	24	96	144	Pb en medio	1	24	96	144
0,1	-0,34	-0,01	0,07	0,56	15	-0,2	-0,12	-0,15	-0,89
0,1	-0,32	0,19	0,24	0,12	30	-0,02	0,06	0,79	0,05
0,1	-0,88	0	-0,03	0,03	30	-0,01	-0,1	0,33	0,14
1	-0,43	0,24	0,03	0,32	30	-0,11	-0,07	0,25	-0,05
1	-0,25	0,11	0,08	0,15	60	-0,2	0,14	-0,02	0
1	-0,77	0,03	0,27	0,31	60	0,12	-0,18	0,01	0
5	-0,34	-0,19	0,37	0,02	60	-0,1	----	0,03	-0,06
5	-0,32	0,17	0,08	0,41	100	0,0	0,0	0,24	0,14
5	-0,35	-0,15	0,03	0	100	0,19	0,19	0,15	0,0
10	-0,06	0,96	0,11	0,17	100	0,18	0,18	0,11	0,32
10	0,06	-0,18	-0,16	0,38	150	0,09	0,09	-0,15	0,1
10	0,54	-0,26	0	0,28	150	0,25	0,25	0,15	0,2
15	0,78	-0,08	-0,06	0,17	150	-0,05	-0,05	0,06	0,08
15	-0,89	-0,26	0,14	0,27					

* unidades ; metal mg/L.; fotosíntesis mg L/g(ps) hora; tiempo en horas

En *Rhizoclonium riparium* sometida a plomo durante una 144 horas, la producción fotosintética aumenta con fuertes variaciones, a lo largo de las concentraciones de metal en el medio de cultivo.

Tabla 22. Producción fotosintética de *Rhizoclonium riparium* expuesta a cobre*.

Cu en medio	1	24	96	144	Cu en medio	1	24	96	144
0,1	0,28	-0,08	-0,09	-0,06	15	0,15	0,08	0,19	0,05
0,1	0,36	0,01	0,09	-0,11	30	0,23	0,52	0	0,47
0,1	0,55	0,03	0,53	0,03	30	0,03	0,38	0,15	0,06
1	0,37	-0,01	0,08	0,06	30	0,21	0,06	0,32	0,07
1	0,55	-0,09	-0,08	0,11	60	-0,11	0,14	0,09	0,03
1	0,28	0,15	0,15	0,11	60	-0,01	0,21	0,31	0,27
5	0,2	0,14	0,01	0,11	60	0,05	-0,02	0	0
5	0,21	-0,05	0,09	-0,08	100	0,38	0,41	0,21	0,11
5	0,25	-0,07	0,06	0,15	100	0,07	0,19	0,58	0,34
10	0,06	0,09	0,17	0,03	100	0,31	0,31	0,4	0,35
10	0,05	0,07	0,18	-0,03	150	0,16	-0,03	-0,1	-0,03
10	-0,07	0,03	0,15	0,12	150	0,15	0,08	0,02	-0,12
15	-0,01	-0,14	0,21	-0,06	150	0,21	0,1	0,17	0,05
15	0,19	-0,18	0,19	0,01					

* unidades ; metal mg/L. Fotosíntesis mg L / g(ps) hora; tiempo en horas

La producción fotosintética de *Rhizoclonium riparium* experimenta un leve incremento, paralelo al aumento de las concentraciones de cobre en el medio.

Tabla 23. Producción fotosintética de *Rhizoclonium riparium* expuesta a mercurio.

Hg en medio	1	24	96	144	Hg en medio	1	24	96	144
0,01	0,12	0,11	0,49	0,02	10	0,03	0,12	-0,01	0,11
0,01	0,01	0,25	-0,09	-0,02	20	-0,33	-0,5	0,1	0,07
0,01	0,37	0,23	-0,11	-0,53	20	-0,82	-0,28	0	0,45
0,1	0,49	0,27	0,15	0,02	20	-0,77	-0,58	0,27	0,05
0,1	0,37	0,34	0,29	-0,07	30	0,01	-0,27	0,19	1,54
0,1	0,33	0,24	0,14	0,05	30	-0,69	-0,61	-0,1	-1,53
1	-0,05	0,06	0,06	0,02	30	-0,54	-0,11	0,09	-1,01
1	-0,05	0,07	-0,2	-0,07	60	-0,42	-0,09	0,25	-0,37
1	-0,03	0,24	0,38	0,31	60	-0,11	0	0,24	-0,53
5	-0,1	0,07	-0,45	-0,02	60	0,06	0,03	0,15	-0,1
5	-0,08	0,25	0,03	-0,09	100	-0,02	0,05	0,59	-0,05
5	-0,18	0,25	0,2	-0,25	100	-0,4	-0,02	0,34	-0,03
10	0,01	0,01	0,14	-0,11	100	-0,12	0,12	0,09	-0,12
10	0,02	0,03	0,31	0,1					

La producción fotosintética de *Rhizoclonium riparium* expuesta a mercurio aumenta con el incremento de las concentraciones de metal en el medio de cultivo.

4.4 BIOACUMULACION DE METALES PESADOS EN *Rhizoclonium riparium*

La cantidad de metal incorporada por las algas en los distintos tiempos y concentraciones de plomo, cobre y mercurio se dispone en la tabla 24.

Tabla 24. Bioacumulación de metales pesados en *Rhizoclonium riparium**

Metal	Tiempo	Pb	Cu	Hg	Metal	Tiempo	Pb	Cu	Hg
0.01	2	----	----	0	10	2	0,005	0,005	0,015
0.01	6	----	----	0	10	6	0,025	0,025	0,02
0.01	12	----	----	0	10	12	0,15	0,215	0,05
0.01	24	----	----	0	10	24	0,185	0,23	0,13
0.01	96	----	----	0,005	10	96	1,08	1,205	0,33
0.01	144	----	----	0,005	10	144	1,255	1,305	0,385
0.1	2	0	0	0	15	2	0	1,4	----
0.1	6	0,005	0,015	0	15	6	1,3	2,15	----
0.1	12	0,02	0,03	0,005	15	12	2,3	2,45	----
0.1	24	0,045	0,085	0,02	15	24	4,4	5,55	----
0.1	96	0,16	0,175	0,02	15	96	6,95	7,65	----
0.1	144	0,18	0,18	0,02	15	144	7,4	10,05	----
1	2	0	0,035	0	20	2	----	----	0
1	6	0,015	0,04	0,005	20	6	----	----	0
1	12	0,08	0,155	0,01	20	12	----	----	0
1	24	0,13	0,21	0,095	20	24	----	----	0
1	96	0,175	0,26	0,135	20	96	----	----	0,005
1	144	0,255	0,28	0,175	20	144	----	----	0,005
5	2	0	0,02	0	40	2	0	0	----
5	6	0,03	0,05	0	40	6	0,005	0,015	----
5	12	0,105	0,215	0,05	40	12	0,02	0,03	----
5	24	0,135	0,265	0,225	40	24	0,045	0,085	----
5	96	0,235	0,355	0,28	40	96	0,16	0,175	----
5	144	0,285	0,385	0,315	40	144	0,18	0,18	----

* Línea discontinua: concentraciones no ensayadas en el metal.

El patrón de bioacumulación para metales pesados en *Rhizoclonium riparium* muestra un incremento constante en el tiempo. La bioacumulación de mercurio tiene una pendiente menor, seguida en ese orden por el plomo.

FACTOR DE BIOACUMULACION

El cociente entre la concentración de metal acumulado y en el medio de cultivo se dispone en la tabla 11.

Tabla 25. Factores de bioacumulación de plomo, mercurio y cobre en *Rhizoclonium riparium*

Metal en ½.	Pb	Cu	Hg	Metal en ½.	Pb	Cu	Hg
1	0,0000	0,0350	0,0000	10	0,1080	0,1205	0,0330
1	0,0150	0,0400	0,0050	10	0,1255	0,1305	0,0385
1	0,0800	0,1550	0,0100	15	0,0000	0,0933	----
1	0,1300	0,2100	0,0950	15	0,0867	0,1433	----
1	0,1750	0,2600	0,1350	15	0,1533	0,1633	----
1	0,2550	0,2800	0,1750	15	0,2933	0,3700	----
5	0,0000	0,0040	0,0000	15	0,4633	0,5100	----
5	0,0060	0,0100	0,0000	15	0,4933	0,6700	----
5	0,0210	0,0430	0,0100	20	----	----	0,00025
5	0,0270	0,0530	0,0450	20	----	----	0,00025
5	0,0470	0,0710	0,0560	40	0,0000	0,0000	----
5	0,0570	0,0770	0,0630	40	0,0001	0,0004	----
10	0,0005	0,0005	0,0015	40	0,0005	0,0008	----
10	0,0025	0,0025	0,0020	40	0,0011	0,0021	----
10	0,0150	0,0215	0,0050	40	0,0040	0,0044	----
10	0,0185	0,0230	0,0130	40	0,0045	0,0045	----

En general, la bioacumulación de metales pesados en *R. riparium* es baja. Los más altos valores se dan en plomo y cobre a 15 mg/L; para mercurio, el alga concentró tisularmente más metal a 5 mg / L.

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 FLUORESCENCIA Y PRODUCCIÓN FOTOSINTÉTICA DE *Rhizoclonium riparium* EXPUESTA PLOMO.

Los valores de fluorescencia de *Rhizoclonium riparium* expuesta a plomo durante 6 días muestran distribución normal ($p > 0.2$) y diferencias significativas entre las 24, 96 y 144 horas. El plomo se acumularía externamente durante las primeras 24 horas de exposición, por lo que no se aprecian variaciones en la emisión fluorescente y/o daños en el fotosistema II a este tiempo de exposición.

En las algas café *Padina gymnospora* (Andrade et al 2002) y *Fucus ceranoides* (Barreiro et al 1993) el plomo se acumula sobre proteínas polifenólicas de la pared celular y una vez dentro del citoplasma, afecta los procesos de transformación de energía lumínica en ATP. Como se aprecia en la figura 7, entre el alga control y las expuestas a 15 y 30 mg/L de plomo hay diferencias significativas.

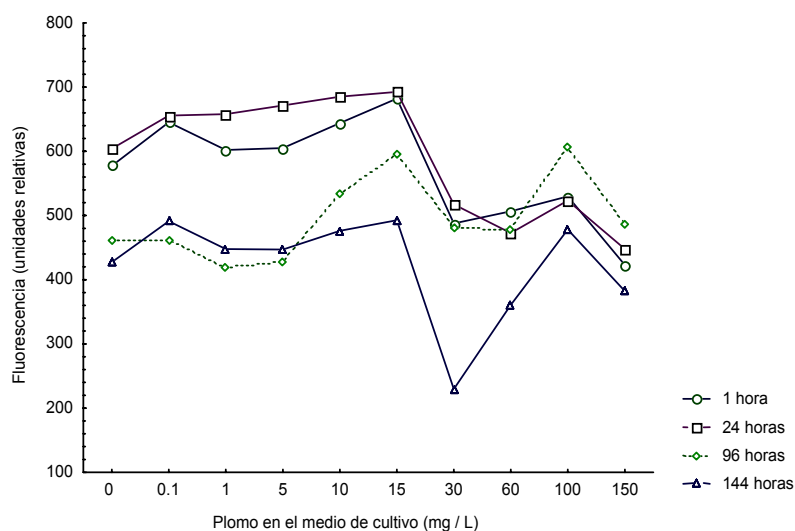


Figura 7. Fluorescencia de *Rhizoclonium riparium* expuesta a plomo

Es posible que a esas concentraciones, el agotamiento de la capacidad de captura pasiva de metales (quimiadsorción) se colmate y consecuentemente, halla un ingreso masivo de plomo al citoplasma afectando los procesos fisiológicos.

La figura 8, muestra que las variaciones en la producción fotosintética de *R. riparium* son grandes entre 10 y 15 mg/L.

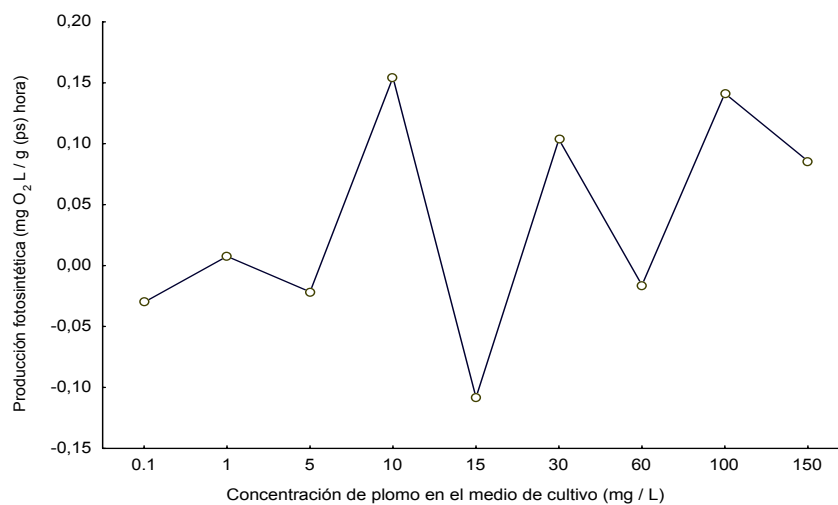


Figura 8. Producción fotosintética de *Rhizoclonium riparium* expuesta a plomo durante 144 horas.

5.2 FLUORESCENCIA Y PRODUCCIÓN FOTOSINTETICA DE *Rhizoclonium riparium* EXPUESTA A MERCURIO (P>0.05)

Existen diferencias significativas entre las plantas control y las expuestas a concentraciones de mercurio que van desde 0,01 hasta 5 mg/L.

Como se aprecia en la figura 9, hay un incremento en la fluorescencia paralelo con el aumento de la concentración de mercurio en el medio de cultivo. El alga tratada disminuye significativamente su producción fotosintética cuando se contamina con mercurio entre 0.01 y 30 mg/L.

En *Pseudomonas aeruginosa*, el consumo de mercurio se da por la unión de los iones Hg⁺⁺ con proteínas de transporte ricas en cisteína (con azufre, muy

afín al mercurio). Desde allí son llevadas al citoplasma donde se reducen por acción de la enzima reductasa mercúrica, codificada por el operón Mer T. (Chang *et al* 1997). Es posible que *Rhizoclonium riparium*, posea resistencia al tratamiento con mercurio por exclusión (bajas tasas de acumulación) y/o que volatilice enzimáticamente el catión divalente tóxico Hg⁺⁺.

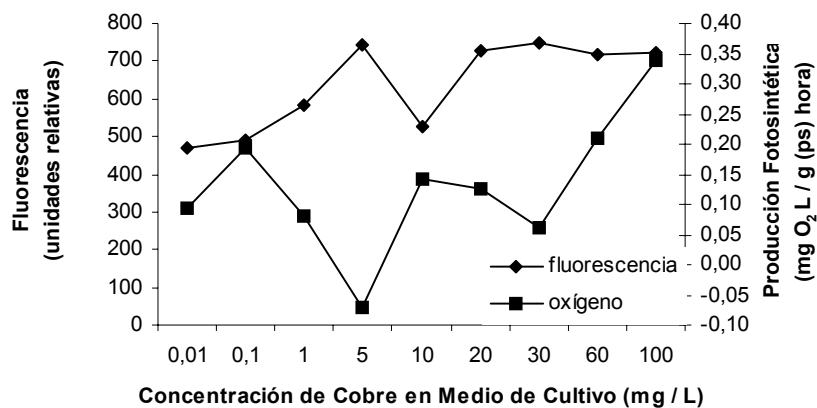


Figura 9. Comparación entre fluorescencia y fotosíntesis en *Rhizoclonium riparium* expuesta a mercurio durante 96 horas.

5.3 FLUORESCENCIA Y PRODUCCIÓN FOTOSINTÉTICA DE *Rhizoclonium riparium* EXPUESTA A COBRE 144 HORAS

La producción fotosintética de *Rhizoclonium riparium*, ilustrada en la figura 10 experimenta una disminución a través de los tiempos de exposición y las concentraciones del metal en el medio de cultivo, con diferencias significativas entre 5 y 100 mg/L.

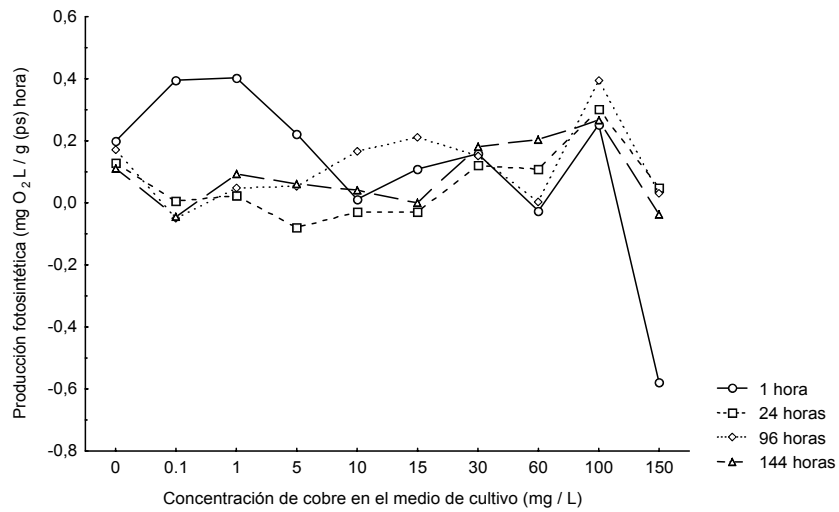


Figura 10. Producción fotosintética de *Rhizoclonium riparium* expuesta a cobre.

La figura 11, muestra una curva dosis respuesta particular para plantas en condiciones de perturbación (Larcher 1996); con una fase inicial de descenso de la producción fotosintética o fase de alarma, seguida por un incremento de la misma o fase de recuperación y finalmente una etapa de agotamiento fisiológico en las 144 horas de exposición.

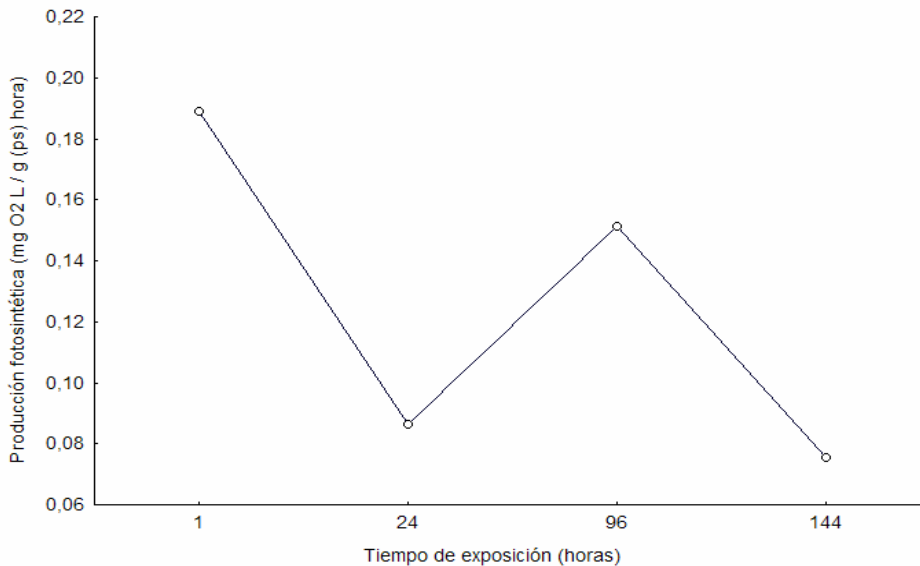


Figura 11. Fases de perturbación fisiológica en la producción fotosintética de *Rhizoclonium riparium* durante 144 horas de exposición a cobre.

La producción fotosintética de los organismos control mostró diferencias con las de las algas contaminadas con cobre a 100 y 150 mg / L (valores de p de 0.02 y 0.005 respectivamente). La figura 12, muestra un descenso considerable en la producción fotosintética para esas concentraciones.

Cuando ocurre toxicidad por cobre se forma porfirina, que es el resultado de la translocación de magnesio por cobre en la molécula de clorofila. La forma cúprica de la clorofila tiene poca actividad fotosintética y el crecimiento vegetal es reducido (Lewis *et al* 1996). El cobre actúa a concentraciones altas lo que sugiere resistencia de *Rhizoclonium riparium* hacia el metal.

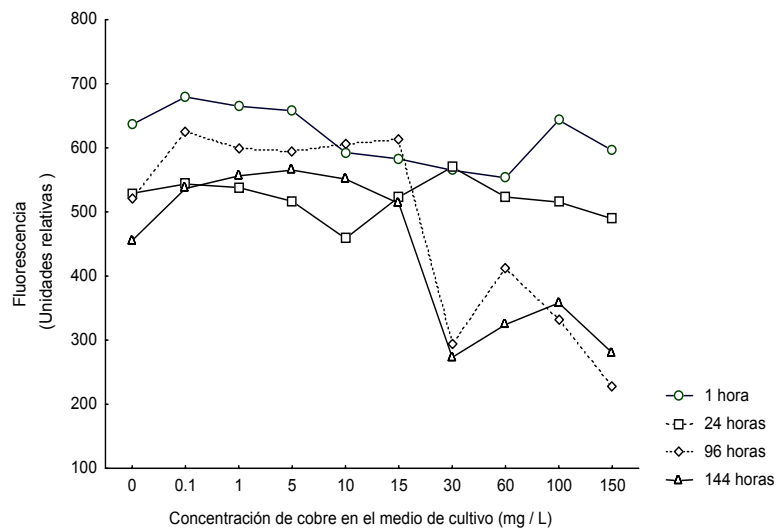


Figura 12. Fluorescencia de filamentos de *Rhizoclonium riparium* tratados con cobre durante 144 horas.

Los organismos control muestran diferencias significativas en la fluorescencia para todos los tiempos de exposición y con las algas contaminadas a 150 mg/L de cobre; resultados similares a los encontrados para la producción fotosintética en el mismo ensayo. El cobre (y otros cationes como Mn^{++} , Fe^{++} y Zn^{++}) penetran de forma pasiva al citoplasma, con un proceso alterno de producción e hidrólisis de Adenosín Trifosfato (ATP), para proveer carga interna negativa.

Hall (1981), propone que la membrana celular es el sitio inicial de toxicidad de cobre en *Chlorella vulgaris* y *Dunaliella tertiolecta*, por lo que son afectadas entonces las propiedades de retención de potasio y las función de regulación hídrica (ver figura 15b). Además, la presencia de cobre en tejidos vegetales produce fitoquelatinas con la consecuente disminución en toxicidad del catión por quelación (Lage *et al* 1996, Salisbury y Ross 1996).

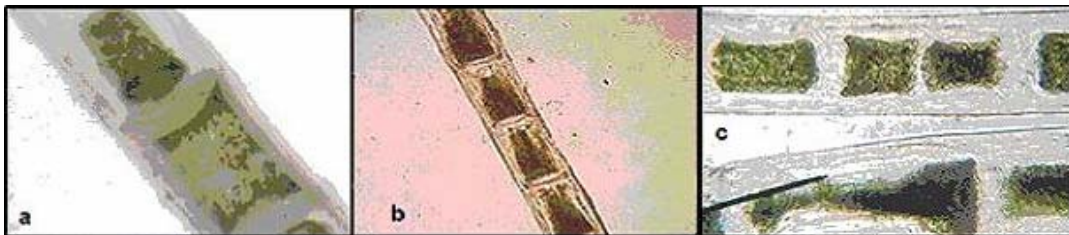


Figura 13. Filamentos de *Rhizoclonium riparium* expuesto a plomo, 40 mg/L. 13a., cobre 40 mg/L. F 13b. y mercurio 20 mg/L, F. 13c. a) analizador de imágenes Leika, 400 aumentos; b) y c) cámara digital Hewlett Packard con acoplamiento manual a microscopio óptico Zeiss. 100 y 400 aumentos aproximada y respectivamente.

5.4 BIOACUMULACIÓN DE PLOMO, COBRE Y MERCURIO.

Los procesos de adsorción (curva metal en el medio vs. metal en el alga) de Pb, Cu, muestran bajas pendientes hasta doce horas. En Hg, el cambio en la velocidad de adsorción se da a las seis horas.

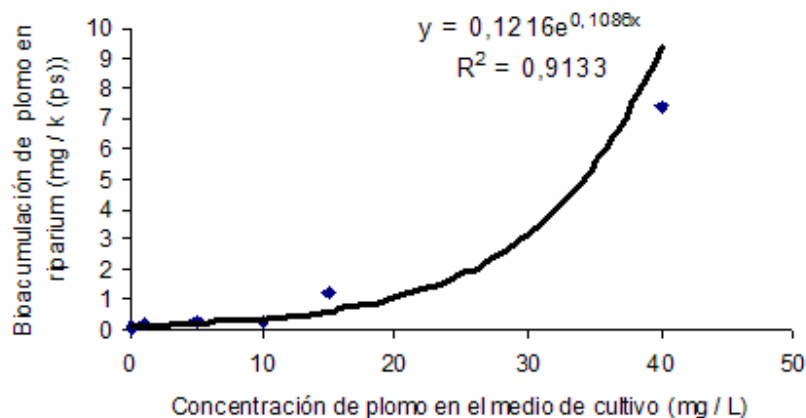


Figura 16. Patrón de bioacumulación de *Rhizoclonium riparium* expuesta a diferentes concentraciones de plomo en 144 horas.

Es posible que a esos tiempos de exposición el alga experimente un cambio en la permeabilidad de la membrana que le haga retener más metal. Se

encontró relación entre la fisiología algal y la velocidad de acumulación de metal a 15 mg/ L de cobre.

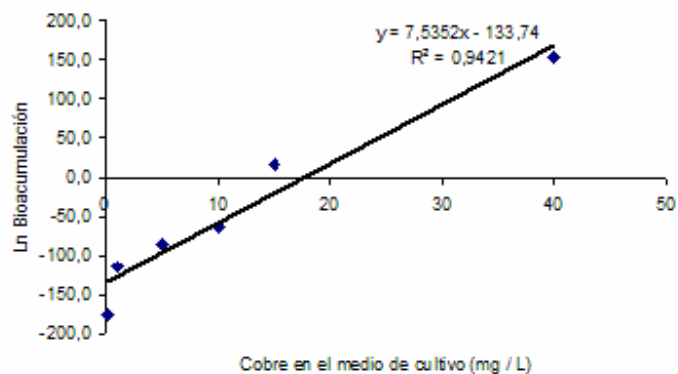


Figura 17. Patrón de bioacumulación de *Rhizoclonium riparium* expuesta a diferentes concentraciones de cobre en 144 horas.

De acuerdo con el tipo de gráfico, concentración metal en el alga (bioacumulación) vs. concentración gráfico de metal en el medio de cultivo, *R. riparium*, incorpora metal activamente durante el rango de concentraciones estudiado, con coeficientes de correlación cercanos a 100 (R^2). Ver en las figuras 16, 17 y 18, los comportamientos o patrones de bioacumulación en *R. riparium*.

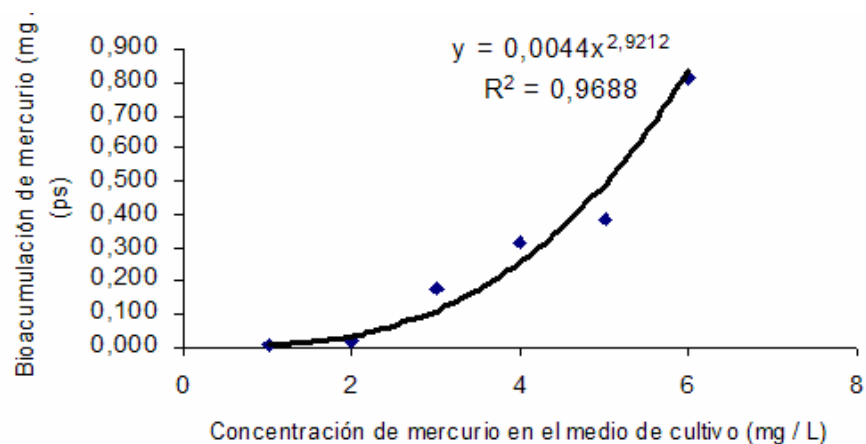


Figura 18. Patrón de bioacumulación de *Rhizoclonium riparium* expuesta a diferentes concentraciones de mercurio en 144 horas.

6. CONCLUSIONES

Los resultados de fluorescencia y producción fotosintética muestran, que el rango de concentraciones entre 10 y 30 mg/L de plomo en el medio de cultivo, afecta de forma significativa la fisiología del alga en estudio.

Filamentos de *Rhizoclonium riparium* sometidos a altas concentraciones de cobre, responden sin daños aparentes en la fotosíntesis hasta 15 mg/L, por lo que el alga se propone como bioindicadora de contaminación por cobre en aguas estuarinas hasta esa concentración.

Rhizoclonium riparium, se afecta fisiológicamente desde las primeras horas de exposición a concentraciones de mercurio, entre los 20 y 100 miligramos por litro; no obstante los procesos de adsorción se mantienen a esas concentraciones, lo que sugiere mecanismos pasivos de atrapamiento catiónico a nivel de pared y/o exparte activo.

La bioacumulación de plomo y cobre en el ensayo de laboratorio con *Rhizoclonium riparium*, supera en un orden de magnitud a las más de 14 plantas en 5 localidades distintas del globo (tabla 2), excepción hecha para *Myriophyllum exalbescens* en el lago Flin-Flon, Canadá.

El patrón de acumulación de mercurio (tabla 18), se mantiene exponencial a concentraciones del metal que superan con mucho, los valores máximos permisibles para vertimientos en Colombia.

De forma general, *Rhizoclonium riparium* muestra alta resistencia a la exposición de cobre, plomo y mercurio, hecho demostrado tanto desde los procesos fotosintéticos como desde su potencial bioacumulador.

7. RECOMENDACIONES

Debe considerarse un estudio detallado del rendimiento fluorescente $\Delta F/F_m'$, para evaluar el estado del fotosistema II en la exposición de *Rhizoclonium riparium* a mercurio.

Se propone a *Rhizoclonium riparium* como indicador de plomo, bioacumulador de mercurio y como posible bioacumulador de cobre en aguas costeras tropicales.

Se recomienda evaluar otras variables como el porcentaje de saturación de oxígeno de algas expuestas a metal y sin tratar, además de ampliar, tanto los rangos de concentración de metal en el medio de cultivo, como los intervalos de exposición.

Se plantea la posibilidad de controlar vertimientos de los metales estudiados, inoculando con cepas del alga el cuerpo de agua contaminado o tratando *in situ* (tratamiento antes del tubo efluente) las cargas contaminantes.

Es menester evaluar en paralelo el potencial bioremediador de *R. riparium* respecto de la invasión que esta ejerce sobre el nicho de otras algas, v.g el complejo *Bostrychetum*, con miras a elaborar el sustento teórico para la toma de decisiones sobre planes de mitigación de impacto ambiental por vertimientos de metal.

BIBLIOGRAFÍA

ACLETO, C y R. ZUÑIGA. Introducción a las algas. ACLETO, C Y R. ZUÑIGA (eds). México, 1998. p. 102-105.

ALVAREZ, H.G. Folleto de algas. Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral, 1994. p. 35.

ANDRADE, L. FARIÑA, M. y G. AMADO-FIHLO. *Rol of Padina gymnospora (Dictyotales, Phaeophyceae) Cell Walls in Cadmium Accumulation*. En: Phycologia. Vol. 4, No 1. 2002. p. 39-48.

APHA, AWWA, WPCF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 17 ed. Andrew D. Eaton et al (eds) Washington, D.C., EUA, 1994.

BARREIRO, R. REAL, C. y A. CARBALLEIRA. *Heavy Metal Accumulation by Fucus ceranoides in a small estuary in North-West Spain*. En: Marine Environmental Research. Gran Bretaña. Elsevier Science Publishers. Vol. 36. 1993 p. 39-61.

BENITEZ, N. Determinación de los niveles de metales pesados en organismos marinos y sangre humana en la bahía de Buenaventura. 1995. Trabajo de grado (Químico). Universidad del Valle. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Colombia.

BLIDING, C. *Studies in Rhizoclonium. 1. Life history of two species*. En: Botaniska Notiser. Upsala, Suecia. Vol. 110, No 2. 1957. p. 271-275.

CANTERA, J.R. y J.F. BLANCO. The estuary ecosystem of Buenaventura bay, Colombia. Ecological Studies. En: SEELIGER Y KJERVE (eds). Coastal marine ecosystems of Latinoamérica. Vol. 44. Berlín. Alemania: Springer Verlag, 2001.

CHANG, J. LANG, R. y CH. CHANG. *Biosorption of Lead, Copper and Cadmium by Biomass of Pseudomonas aeruginosa PU21*. En: Water Research. Gran Bretaña. Vol. 31, No 7. 1997. p. 1651-1658.

CHONG, A.M.Y. WONG, Y.S. y N.F.Y. TAM. *Performance of Different Microalgal Species in Removing Nickel and Zinc from Industrial Wastewater*. China : University of Hong Kong. En: Chemosphere. Vol. 41. 2000. p. 251-257.

CHRISTENSEN, T. KOCH, C. y H.A. THOMSON. Distribution of algae in Danish salt and brackish waters. R. Nielsen y A.M. Kristiansen (eds). Copenhagen, Dinamarca. Danske Halvalger, Ud Bredelse on Danske Navne, 1994.

CLINTON, J.D. Botánica marina. México: Limusa, 1991.

CODIGO NACIONAL DE LOS RECURSOS NATURALES RENOVABLES Y DE PROTECCIÓN DEL MEDIO AMBIENTE. Colombia. HURTADO, J.I. y L. GONZÁLEZ (eds). 2000. Colección Códigos Básicos Legis.

CORTEZ, M. Determinación de metales pesados en aguas, sedimentos y organismos marinos en la ensenada de Tumaco, bahías de Buenaventura y Málaga. 1998. Tesis de Maestría (Química). Universidad del Valle. Facultad de Ciencias. Departamento de Química.

DAVY, A.J. BISHOP, G.T. y C.S.B. COSTA. *Salicornia* L. (*Salicornia pusilla*, J. Woods, *S. ramossisima*, J. Woods, *S. europaea*, L. *S. obscura*). Citado por: BULL, P.W. y S. TUTIN. En: Journal of Ecology. Vol. 89, No 4. p. 681-707.

FRANZIN, W.G. y G.A. MCFARLANE. *An analysis of the aquatic macrophytes, Myriophyllum exalbescens, as an indicator of metal contamination of aquatic ecosystems near a base metal smelter.* En: Bull. Environ. Contam. Toxicol. Vol. 24. 1980. p. 597-605. Citado por: WANG, W. GURSUCH, J. y J. HUGHES. En: Plants for Environmental Studies. EUA: CRC Press, 1997. 563 p.

GUILLARD, R.L. y J.H. RYTHER. *Studies of Marine Planktonic Diatoms. I. Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. En: Can. J. Microbiol. Canadá: Vol. 8. 1962. p. 229-239.

GURSUCH, J.W. y J.S. HUGHES. Plants for environmental studies. EUA: CRC Press, 1997.

HALL, Ann. *Copper Accumulation in Copper Tolerant and Non-Tolerant Populations of the Marine Fouling Alga Ectocarpus siliculosus* (Dillw.) Lyngbye. En: Botanica Marina. EUA –Alemania: Vol. 24. 1981. p 223–228.

HAMILTON, E.J. *Metals in 19 Intertidal Macroalgae in Hong Kong Waters.* En: Marine Pollution Bulletin. Reino Unido: Vol. 18, No 10. 1987. p. 564-566.

HANELT, D y W. NULT. *Field Studies Shows No-Correlation Between Photosynthetic Yield and Fluorescence in the Red Artic Algae, Palmaria palmata.* En: Journal of Plant Physiology. Stuttgart. Alemania: Vol. 145. 1995. p. 31-38.

HILL, M.N. The sea. Vol. 2. Nueva York. EUA: John Wiley and Sons, 1970.

FRANCOISE, J.P. *Catalogue des algues du Nord-est de la France et Des Regions Attendantes, 1959-2001.* En: Bulletin de l'Academie Lorraine des Sciences. Francia: Vol. 40, No 3. 2001.

GEMEL, J., B. WATERS-EARHART, M. R. ELLERSIECK, A. ASFAW, G. F. KRAUSE, V. PURI y W. R. LOWER. Photosynthetic electron transport as a bioassay. En: Plants for Environmental Studies. WANG, W. GURSUCH, J. y J. HUGHES (eds). EUA: CRC Press, 1997.

- KRALL, J y G. EDWARDS. *Relation between Photosystem II Activity and CO₂ Fixation on Leaves*. En: Physiologia Plantarum. Copenhagen. Dinamarca: Vol. 86. 1992. p. 180-187.
- LAGE, O.M. SOARES, M.V. VASCONCELOS, T.S. PARENTE, A.M. y R. SALEMA. *Toxicity Effects of Copper (II) on the Marine Dinoflagellate Amphidinium carterae: Influence of Metal Speciation*. En: European Journal of Phycology. Reino Unido: Vol. 31. 1996. p. 341-348.
- LARCHER, W. Ecological plant physiology. 3 ed. Alemania: Springer Verlag, 1996.
- LEWIS, M y W. WANG. Water quality and aquatic plants. En: Plants for environmental studies. WANG, W. GORSUCH, J.W. y J.S. HUGHES (eds). EUA, CRC Press. 1996.
- LOBBAN, C y P. HARRISON. Seaweed ecology and physiology. EUA: Cambridge University Press, 1994.
- LOTZE, H.K. y N.W. SCHRAMM. *Ecophysiological traits explain species dominance patterns in macroalgal blooms*. En : J. Phycol. Vol. 36 No 3. 2001. p. 287-295.
- LUOMA, S.N. BRYAN, G.W. y W.J. LANGSTROM. *Scavenging of heavy Metals from Particulates by Brown Seaweed*. Marine Pollution Bulletin. Reino Unido: Vol. 13, No 11. 1982. p. 194-196
- LYMAN, J. y FLEMING, R.H. *Composition of Sea Water*. En: Journal of Marine Research. Vol. 3. 1940. p. 134-146.
- MARTIN, L. y T. THOMAS. Photosynthesis and respiration of aquatic macroflora using the dark and clear bottles method and the dissolved oxygen analyzer. En: LOBBAN, CHAPMAN y KREUSER (eds). Experimental Phycology. A laboratory manual. Reino Unido: Cambridge University Press, 1988.
- MIYAGI, K. *A New Type of Pyrenoid in the Genus Rhizoclonium. (Cladophorales, Chlorophyta)*. En: Phycologia. Vol. 38, No. 26. 1999. p. 72-76.
- NIAGRU, J.O. *A History of Global Metal Pollution*. En: Science. EUA: Vol. 272, No 5259. 1996. p. 223-224.
- NYHOLM, N y G. PETERSON. Laboratory bioassays with microalgae. En: Plants for Environmental Studies. WANG, W. GURSUCH, J. y J. HUGHES (eds). EUA: CRC Press, 1997.
- OSPINA-ALVAREZ, N y PEÑA, J.E. *Bostrychia calliptera (Montagne) Montagne and Rhizoclonium riparium (Roth) Harvey as Bioindicators of Heavy Metal Pollution in Buenaventura Bay, Pacific Coast of Colombia*. En: Water Science and Technology. Holanda: IHE, En prensa.

PANIZZO, L. MORA, C. y M. SOSA. Bioacumulación de metales Cu y Zn en *Caulerpa sertularoides* de la bahía de Cartagena. En: Memorias de VIII Seminario de Ciencias y Tecnologías del Mar Colombia. Santa Marta, Colombia. (oct 15)

PEÑA, E.J. Estudios ecofisiológicos de una comunidad de algas marinas bénticas asociadas al ecosistema manglar - estuario. 1998. Bahía de Buenaventura. Valle del Cauca. Colombia. Tesis Doctoral (Fisiología Vegetal). Universidad de Carolina del Sur. EUA.

PINILLA, G. Indicadores Biológicos de Ecosistemas Acuáticos. Colombia. Consejo de Investigaciones Científicas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. Compilación. 2000.

PRAHL, H. CANTERA, J.R. y R. CONTRERAS. Manglares y hombres del Pacífico Colombiano. Colombia: Fondo FEN. 1989.

PHOTOSYNTHESIS YIELD ANALYZER. MINIPAM. Portable Chlorophyll Fluometer. WALZ. Mess und Regeltechnik. Manual Book. Alemania. 1999.

PROGRAMA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD EN LABORATORIOS AMBIENTALES Y DE AGUAS PACALA. Vol. 2. 1998. No. 3.

RADA, M. Estudio y evaluación del grado de contaminación por cadmio, mercurio y plomo en aguas, peces y sedimentos del río Cauca por espectroscopía de adsorción atómica. 1998. Tesis de Maestría (Química). Universidad del Valle. Facultad de Ciencias. Departamento de Química.

RAMÍREZ, M. GONZÁLEZ, H. ABLANEDO, N. e I. TORRES. *Heavy Metals in Macroalgae of Havanas's Northern Littoral, Cuba*. En: Chemistry and Ecology. Reino Unido: Vol. 4. 1987. p. 49-55.

RASKIN, I. SMITH, R.D. y D.E. SALT. *Phytoremediation of Metals: Using Plants to Remove Pollutants from Environment*. En: Current Opinions in Biotechnology. Reino Unido: Vol. 8. 1994. p. 221-226.

RICE, D.L. y B.E. LAPOINTE *Experimental Outdoor Studies with Ulva fasciata Delile. II. Trace Metal Chemistry*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. 1981.

RITTLER, M. Statistical methods in plant environmental studies. En: WANG, W. GURSUCH, J. Y J. HUGHES. Plants for environmental studies. EUA: Lewis Pubs., 1997.

ROLDAN, P.G. Fundamentos de limnología neotropical. Medellín. Colombia: Editorial Universidad de Antioquia, Colección Ciencia y Tecnología. No 1. 1992. p. 149-151.

RUSSEL, M. LACORTE, S. y D. BARCELÓ. *Contaminación de Acuíferos por Gasolina*. En: Investigación y Ciencia. España: Prensa Científica, Vol. 323. 2003. p. 6-12.

SALISBURY, F y C. ROSS. Fisiología vegetal. Grupo Editorial Iberoamericana. México: 1996.

SCHEINER, S. y J. GUREVITCH. Design and analysis of ecological experiments. EUA: Chapman y Hall, 1993.

SHAW, A.W. Heavy metal tolerance in plants. Evolutionary aspects. EUA: CRC Press, 2000.

SHUBERT, E. Algae as ecological indicators. EUA: Academic Press, 1984.

SOKAL, R.R y F.J ROHLF. Biometry. 2 ed. EUA: W.H Freeman Company, 1981. p. 401-414.

SZE, P. A biology of algae. 3 ed. EUA: Mc Graw Hill, 1998. p. 3-5.

TRONCOSO-OLIVO, W y N.H. CAMPOS. *Disminución de Metales Pesados (Cd, Cu y Zn) por Macrófitas Acuáticas en un Canal de una Laguna Costera Tropical.* En: Revista INVEMAR. Colombia. 2000.

VAN DEN HOECK, C. Algae. An introduction to phycology. D.G. Mann Y H.M Jahns (eds). Reino Unido: Cambridge University Press, 1995. p. 408-416.

VASQUEZ, G.L. RAMIREZ, J.C. ROMERO, I.C. PEÑA, E.J. y J.R. CANTERA. Caracterización de la calidad del agua del estuario del río Dagua, Bahía de Buenaventura, Departamento del Valle del Cauca (COLOMBIA). En: IX Congreso Latinoamericano y del Caribe de Ciencias del Mar. San Andrés Isla. Colombia. (nov. 2001).

WELSH, R.P.F. y P. DENNY. *The Uptake of Lead and Copper by Submerged Aquatic Macrophytes in Two English Lakes.* J. Ecol. Vol. 68. 1980. p. 443-455. Citado por: **WANG, W. GURSUCH, J. y J. HUGHES.** En: Plants for Environmental Studies. EUA: CRC Press, 1997. 563 p.

WHITTON, B.A. Algae as monitors of heavy metals in freshwaters. En: Elliot, S.L. (ed). Algae as Ecological Indicators. EUA: Academic Press, 1984. p 257-280.

WILSON, J.G. *The Role of Bioindicators in Estuarine Management.* Estuaries. EUA: Vol 17, No 1A. 1994 p. 94-101.

YOROKO, H. NAIR, S. ESTELA, M. y M. BRAGA. *Temporal and Spatial Variations in the Structure of Macroalgal Communities Associated with Mangrove Trees of the Iha do Cardoso, São Paulo State, Brazil.* En: Rev. Bras. Bot. Vol. 22, No 2. 1999. p. 195-204.

ZAR, H. Biostatistical analysis. 3e. EUA: Prentice Hall, 1996. p. 211-337.