

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



TESIS DOCTORAL

**INTERACCIÓN DE CU (II) Y PB (II) CON LIGANDOS
ORGÁNICOS FITOPLANCTONICOS EN AGUA DE
MAR**

LUIS MIGUEL LAGLERA BAQUER

Las Palmas de Gran Canaria, Diciembre de 1998

28/1998-99

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO

Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo. Sr. Rector Magfco. de esta Universidad, el/a aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.

Terminada la lectura y contestadas por el/a Doctorando/a las objeciones formuladas por los señores miembros del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de *Sobresaliente Cum laude por unanimidad*

Las Palmas de Gran Canaria, a 26 de ~~.....~~ro de 1999.

El/a Presidente/a, ~~Dr. D.~~ Juan Francisco Arenas Rosado,

El/a Secretario/a, ~~Dr. D.~~ Jorge Triana Mendez,

El/a Vocal: Dr. D. Miguel Angel Esteso Díaz,

El/a Vocal: Dr. D. Angel Luque Escalona,

El/a Vocal: Dr. D. ~~Jesús Pérez Peña,~~

El Doctorando: Dr. D. Luis Miguel Laglera Baquer,

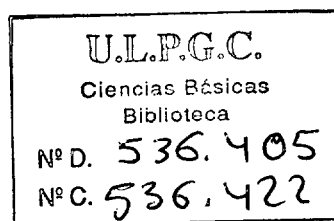
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE QUIMICA



TESIS DOCTORAL

**INTERACCION DE Cu(II) Y Pb(II) CON
LIGANDOS ORGANICOS FITOPLANCTONICOS
EN AGUA DE MAR**



LUIS MIGUEL LAGLERA BAQUER

1999

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE QUIMICA

TESIS DOCTORAL

**INTERACCION DE Cu(II) Y Pb(II) CON
LIGANDOS ORGANICOS FITOPLANCTONICOS
EN AGUA DE MAR**

Tesis presentada por D. **Luis Miguel Laglera Baquer**

Dirigida por los doctores D. **Melchor González Dávila** y
D^a **Juana Magdalena Santana Casiano**

El director

El co-director

El Doctorando

~~M.~~ González Dávila

J.M. Santana Casiano

L.M. Laglera Baquer

MELCHOR GONZALEZ DAVILA, PROFESOR TITULAR DEL AREA DE QUIMICA-FISICA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA Y JUANA MAGDALENA SANTANA CASIANO, PROFESORA TITULAR DEL AREA DE QUIMICA-FISICA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,

HACEN CONSTAR

que la presente memoria “Interacción de Cu(II) y Pb(II) con ligandos orgánicos fitoplanctónicos en agua de mar” para optar al grado de Doctor en Ciencias del Mar ha sido realizada en los laboratorios de la sección de Química-Física bajo nuestra dirección, autorizando con esta fecha su presentación y defensa.

Para que así conste a los efectos oportunos.

Las Palmas de Gran Canaria, a 17 de diciembre de 1998.

Fdo. Melchor González Dávila

Fdo. J.Magdalena Santana Casiano

JORGE TRIANA MENDEZ, CATEDRATICO DEL AREA DE QUIMICA ORGANICA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE QUIMICA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

CERTIFICA:

Que la presente memoria “Interacción de Cu(II) y Pb(II) con ligandos orgánicos fitoplanctónicos en agua de mar”, que presenta el Licenciado D. Luis Miguel Laglera Baquer para optar al grado de Doctor en Ciencias en Mar por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, ha sido realizada en los laboratorios de la sección de Química-Física y autorizo con esta fecha su presentación según acuerdo unánime del Consejo de Departamento.

Y para que así conste firma el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria, a 17 de diciembre de 1998.



Fdo. Jorge Triana Méndez

Agradecimientos:

En primer lugar agradezco el gran apoyo, ánimo y disponibilidad dados por los doctores Melchor González Dávila y Magdalena Santana Casiano, directores de este trabajo.

Al resto de los profesores del área de Química-Física (Jesús, Joaquín, Dolly, Cayetano, José Alberto) por sus explicaciones sobre la voltametría siempre que fueron solicitadas.

A Pedro y Víctor por sacarme las castañas informáticas del fuego.

A los profesores D. Rafael Robaina y D. Angel Luque por permitir el uso de su cámara de cultivo y su ayuda en general en la parte biológica de esta memoria. Así como dar las gracias a Marta y Pili por su ayuda en el mantenimiento de los cultivos.

A todos aquellos que me han ayudado y soportado durante los últimos años.

A MI FAMILIA

CAPITULO 1. INTRODUCCION

1.1	Descripción de la interacción entre el plancton y la especiación metálica en el océano	3
1.2	Objetivos de la tesis	17

CAPITULO 2. TECNICAS INSTRUMENTALES

2.1	Descripción de la técnica de voltametría de redisolución	21
2.1.1	Barrido anódico	24
2.1.2	Barrido catódico	26
2.2	Fundamentos de la voltametría catódica de redisolución con catecol	27
2.3	Fundamentos de la voltametría anódica de redisolución	32
2.4	Obtención de capacidades complejantes	33
2.4.1	Valoraciones metálicas	33
2.4.2	Isoterma de Langmuir	37
2.4.2.1	Linealización de Scatchard	39
2.4.2.2	Linealización de van den Berg/Ruzic	40
2.4.3	Ventanas espectrales	41
2.4.4	Medios naturales	45
2.4.4.1	Representación de Scatchard	46
2.4.4.2	Representación de van den Berg/Ruzic	48
2.4.5	Obtención de los parámetros de complejación de forma independiente	49
2.4.6	Desarrollo de un modelo iterativo mixto	56
2.5	Obtención de capacidades adsorptivas	64

CAPITULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1	Puesta a punto de la voltametría anódica	73
3.1.1	Tiempo de deposición	73
3.1.2	Altura de pulso	74
3.1.3	Aplicación a la determinación de concentraciones totales en disolución	75
3.2	Puesta a punto de la voltametría catódica	76
3.2.1	Concentración de catecol	77

3.2.2	Tiempo de deposición	78
3.2.3	Velocidad de barrido	79
3.2.4	Altura de pulso	81
CAPITULO 4. DESCRIPCION DE LAS ALGAS		
4.1	Morfología	87
4.2	Propiedades ácido-base	88
CAPITULO 5. ESTUDIOS DE ADSORCION		
5.1	Adsorción de cobre	99
5.1.1	Cinética	99
5.1.2	Determinación de capacidades complejantes	101
5.1.3	Determinación de capacidades adsortivas	106
5.1.4	Especiación en un agua próxima a costa	113
5.1.5	Presencia de otros metales en el medio	115
5.1.5.1	Complejación	116
5.1.5.2	Adsorción	118
5.1.6	Efecto del pH	121
5.1.7	Efecto de la salinidad	124
5.1.8	Efecto de la temperatura	128
5.2	Adsorción de plomo	131
5.2.1	Cinética	131
5.2.2	Determinación de capacidades complejantes	133
5.2.3	Determinación de capacidades adsortivas	137
5.2.4	Especiación en un agua próxima a costa	143
5.2.5	Presencia de otros metales en el medio	145
5.2.5.1	Complejación	145
5.2.5.2	Adsorción	148
5.2.6	Efecto del pH	152
5.2.7	Efecto de la salinidad	154
5.2.8	Efecto de la temperatura	157
5.3	Aspectos relevantes de la adsorción	160

CAPITULO 6.	COMPLEJACION	
6.1.	Cultivo en agua oceánica superficial	175
6.2.	Cultivo en agua de mar artificial	185
6.3.	Cultivo en agua oceánica profunda	193
6.4.	Cultivo en agua de mar irradiada	201
6.5.	Aspectos relevantes de la complejación	212

CAPITULO 7. CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

ANEXOS

INTRODUCCION

1.1 DESCRIPCIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL PLANCTON Y LA ESPECIACIÓN METÁLICA EN EL OCÉANO.

El estudio de los metales traza en sistemas acuáticos es de especial importancia debido a su influencia en la concentración, productividad y metabolismo de los organismos, y especialmente del fitoplancton, que constituye el inicio de la cadena trófica. Esto viene dado por su doble papel como micronutrientes esenciales por un lado, y como inhibidores del crecimiento por otro (Brand *et al.*, 1983; Sunda 1990), llegando algunos (Cu, Zn, Ni) a generar los dos efectos en función de la magnitud de su presencia en el medio, y de las especies planctónicas presentes. La baja concentración en que se hallan presentes en las aguas superficiales oceánicas (del orden de picomolar [10^{-12} M] a nanomolar [10^{-9} M]) hace especular incluso con la posibilidad de que resulten limitantes en el crecimiento de ciertas especies planctónicas, como sucede en el caso de los nutrientes mayoritarios: nitrógeno, fósforo y silicio (Brand *et al.*, 1983).

El estudio de estas interacciones sólo ha sido posible desde el desarrollo en los últimos años de técnicas ultralimpias y nuevos métodos analíticos mucho más sensibles, que han permitido conocer las verdaderas concentraciones de estos elementos en el medio marino, varios órdenes de magnitud por debajo de lo antes pensado (ver tabla I).

Como resultado de este avance analítico se ha profundizado sensiblemente en el conocimiento de las distribuciones, especiación y ciclo biogeoquímico de los metales traza en el océano. De este modo se conoce en la

<u>METAL</u>	<u>TIPOS DE AGUAS</u>	<u>CONC. (nM)</u>
Fe	Océano Pacífico	0.05 - 0.5
	Aguas costeras	4 - 23
	Estuarios	60 - 250
Mn	Océano Pacífico	0.3 - 4
	Océano Antártico	0.08
	Mar de los Sargazos	2 - 5
	Aguas costeras	21
	Estuarios	16 - 400
Cu	Océano Pacífico	0.4 - 1.4
	Mar de los Sargazos	1.2
	Aguas costeras	4.1
	Bahía Narragansett	3 - 260
Zn	Océano Pacífico	0.06 - 0.24
	Mar de los Sargazos	0.06
	Aguas costeras	2.4
	Estuarios	60 - 600
Mo	Océanos Pacífico y Atlántico	107
Co	Oc. Pacífico	0.004 - 0.05
	Bahía S. Francisco	0.25 - 1.5

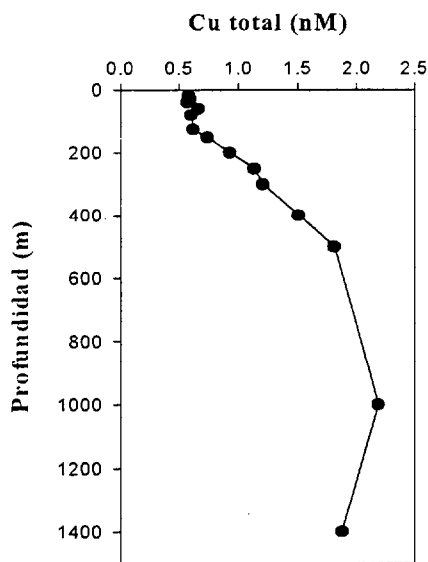
Tabla I. Se muestran las concentraciones totales típicas de varios metales en diversos tipos de aguas marinas (Sunda, 1990).

actualidad el importante papel que juega la especiación química de metales traza en la química marina de estos elementos, mucho mayor de lo pensado en principio (Whitfield y Turner, 1987).

Las concentraciones de los metales traza sufren por otra parte, gradientes horizontales y verticales en el medio marino. Las concentraciones en aguas costeras suelen ser alrededor de un orden de magnitud mayor para cada elemento que en aguas oceánicas, y en bahías y estuarios estos valores se incrementan varios órdenes de magnitud. Esto sugiere una importante influencia tanto del aporte de aguas continentales como de la contaminación antropogénica.

En cuanto a los perfiles verticales de distribución de estas especies varían fuertemente en función del metal objeto de estudio, tanto en su concentración como en su especiación. Las concentraciones totales disueltas de cinc, hierro y cadmio son en profundidad entre 10 y 1000 veces mayores con un incremento constante y se hallan muy bien relacionadas con las variaciones en profundidad de las concentraciones de silicio en el caso del cinc, fosfato para el cadmio, y del nitrato en el caso del hierro. Este hecho implica un fuerte control de tipo biológico de las concentraciones de metales traza en el mar.

En cambio, los casos del plomo, molibdeno y manganeso son totalmente diferentes. El molibdeno no presenta cambios de concentración con la profundidad, y el



Gráfica 1. Ejemplo de perfil de cobre en aguas oceánicas (Coale y Bruland, 1990).

manganeso y plomo, en cambio, ofrecen un máximo superficial (debido a un gran aporte de origen terrestre), con un máximo secundario en ocasiones para el caso del manganeso, situado en la profundidad de mínima concentración de oxígeno, lo que sugiere una dependencia de su concentración con procesos químicos.

Para el caso del cobre, uno de los metales objeto de estudio en este trabajo, su distribución es intermedia entre un nutriente y un elemento de fuerte presencia superficial, mostrando un ligero incremento en concentración con la profundidad que debe implicar alguna relación con los organismos del medio, como se muestra en la gráfica 1.

1.1 DESCRIPCIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL PLANCTON Y LA ESPECIACIÓN METÁLICA EN EL OCÉANO.

El estudio de los metales traza en sistemas acuáticos es de especial importancia debido a su influencia en la concentración, productividad y metabolismo de los organismos, y especialmente del fitoplancton, que constituye el inicio de la cadena trófica. Esto viene dado por su doble papel como micronutrientes esenciales por un lado, y como inhibidores del crecimiento por otro (Brand *et al.*, 1983; Sunda 1990), llegando algunos (Cu, Zn, Ni) a generar los dos efectos en función de la magnitud de su presencia en el medio, y de las especies planctónicas presentes. La baja concentración en que se hallan presentes en las aguas superficiales oceánicas (del orden de picomolar [10^{-12} M] a nanomolar [10^{-9} M]) hace especular incluso con la posibilidad de que resulten limitantes en el crecimiento de ciertas especies planctónicas, como sucede en el caso de los nutrientes mayoritarios: nitrógeno, fósforo y silicio (Brand *et al.*, 1983).

El estudio de estas interacciones sólo ha sido posible desde el desarrollo en los últimos años de técnicas ultralimpias y nuevos métodos analíticos mucho más sensibles, que han permitido conocer las verdaderas concentraciones de estos elementos en el medio marino, varios órdenes de magnitud por debajo de lo antes pensado (ver tabla I).

Como resultado de este avance analítico se ha profundizado sensiblemente en el conocimiento de las distribuciones, especiación y ciclo biogeoquímico de los metales traza en el océano. De este modo se conoce en la

<u>METAL</u>	<u>TIPOS DE AGUAS</u>	<u>CONC. (nM)</u>
Fe	Océano Pacífico	0.05 - 0.5
	Aguas costeras	4 - 23
	Estuarios	60 - 250
Mn	Océano Pacífico	0.3 - 4
	Océano Antártico	0.08
	Mar de los Sargazos	2 - 5
	Aguas costeras	21
Cu	Estuarios	16 - 400
	Océano Pacífico	0.4 - 1.4
	Mar de los Sargazos	1.2
	Aguas costeras	4.1
Zn	Bahía Narragansett	3 - 260
	Océano Pacífico	0.06 - 0.24
	Mar de los Sargazos	0.06
	Aguas costeras	2.4
Mo	Estuarios	60 - 600
	Océanos Pacífico y Atlántico	107
Co	Oc. Pacífico	0.004 - 0.05
	Bahía S. Francisco	0.25 - 1.5

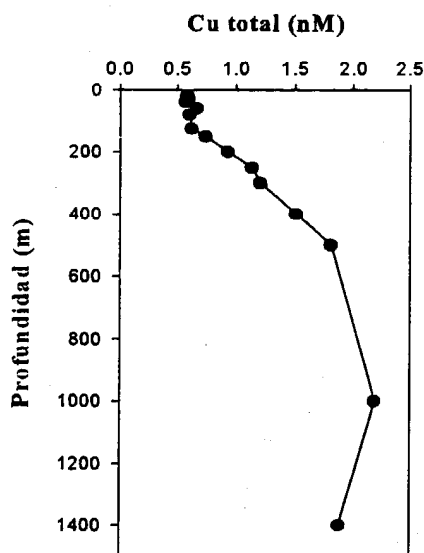
Tabla I. Se muestran las concentraciones totales típicas de varios metales en diversos tipos de aguas marinas (Sunda, 1990).

actualidad el importante papel que juega la especiación química de metales traza en la química marina de estos elementos, mucho mayor de lo pensado en principio (Whitfield y Turner, 1987).

Las concentraciones de los metales traza sufren por otra parte, gradientes horizontales y verticales en el medio marino. Las concentraciones en aguas costeras suelen ser alrededor de un orden de magnitud mayor para cada elemento que en aguas oceánicas, y en bahías y estuarios estos valores se incrementan varios órdenes de magnitud. Esto sugiere una importante influencia tanto del aporte de aguas continentales como de la contaminación antropogénica.

En cuanto a los perfiles verticales de distribución de estas especies varían fuertemente en función del metal objeto de estudio, tanto en su concentración como en su especiación. Las concentraciones totales disueltas de cinc, hierro y cadmio son en profundidad entre 10 y 1000 veces mayores con un incremento constante y se hallan muy bien relacionadas con las variaciones en profundidad de las concentraciones de silicio en el caso del cinc, fosfato para el cadmio, y del nitrato en el caso del hierro. Este hecho implica un fuerte control de tipo biológico de las concentraciones de metales traza en el mar.

En cambio, los casos del plomo, molibdeno y manganeso son totalmente diferentes. El molibdeno no presenta cambios de concentración con la profundidad, y el



Gráfica 1. Ejemplo de perfil de cobre en aguas oceánicas (Coale y Bruland, 1990).

En cambio, los casos del plomo, molibdeno y manganeso son totalmente diferentes. El molibdeno no presenta cambios de concentración con la profundidad, y el manganeso y plomo, en cambio, ofrecen un máximo superficial (debido a un gran aporte de origen terrestre), con un máximo secundario en ocasiones para el caso del manganeso, situado en la profundidad de mínima concentración de oxígeno, lo que sugiere una dependencia de su concentración con procesos químicos.

Para el caso del cobre, uno de los metales objeto de estudio en este trabajo, su distribución es intermedia entre un nutriente y un elemento de fuerte presencia superficial, mostrando un ligero incremento en

El efecto que un metal puede causar sobre el fitoplancton en general puede estudiarse a varios niveles: la especiación del propio metal en el medio (que afectará a los pasos siguientes), interacción superficial e interna con moléculas de origen o pertenencia fitoplanctónica (procesos de adsorción e inclusión celular), efecto del metal en procesos metabólicos y de crecimiento celular, y la repercusión sobre la población fitoplanctónica en general, producción primaria y composición de especies.

Así mismo el último paso de estudio de esta interacción es evaluar el efecto del fitoplancton sobre la concentración y especiación del metal en un claro ejemplo de retroalimentación. El fitoplancton es el principal regulador en aguas superficiales de la cantidad y formas en que se presentan los metales traza, tanto por generar la complejación orgánica de especies metálicas inorgánicas con moléculas exudadas por la propia alga, como por facilitar el hundimiento de especies metálicas adsorbidas sobre material celular particulado (Whitfield y Turner, 1987) o hacer disminuir la concentración por ingestión (Bruland *et al.*, 1991).

Especiación de metales en agua de mar

Los metales traza disueltos en el agua de mar pueden hallarse tanto libres en forma iónica, como complejados con moléculas inorgánicas y orgánicas. La interacción que presente ese metal con los grupos funcionales del alga y exudados es función de su especiación, y por lo tanto también lo serán fenómenos como la biodisponibilidad o toxicidad del elemento traza. Los complejos que dominan la especiación de cada elemento traza varían tanto según la afinidad al metal del grupo funcional que posean, como de su estructura.

El cobre, presenta una complejación orgánica que según algunos autores alcanza de un 90 a más del 99 %, obtenidos estos datos por diversas técnicas (van den Berg 1984; Sunda y Hanson 1987; Moffett y Zika 1987). La complejación inorgánica del cobre se ve dominada por las especies CO_3^{2-} y OH^- . Como la concentración de estas dos especies depende del pH y de la temperatura del agua, la especiación inorgánica del cobre se verá afectada de igual forma, variando por tanto sobre todo con la profundidad. Coale y Bruland (1990) calculan una relación entre cobre complejado inorgánicamente y cobre iónico libre en disolución de entre 19 a 25 para aguas superficiales y de alrededor de 2 a 2.5 para aguas profundas. El cobre también forma complejos

inorgánicos en menor medida con Cl^- , B(OH)_4^- y SO_4^{2-} . En cualquier caso tanto en aguas oceánicas superficiales o profundas, como en aguas costeras o en estuarios, la fracción mayoritaria del cobre disuelto es cobre complejado orgánicamente. Sin embargo, a pesar de esta importancia, no se sabe nada sobre la estructura molecular de estos compuestos y sólo existen hipótesis sobre el origen biológico de una parte de los mismos (Coale y Bruland, 1990; Xue y Sigg, 1993; Moffett, 1995).

El plomo es un elemento objeto de muchos estudios por su gran toxicidad y por los importantes aportes antropogénicos al medio que constituyen la fuente predominante de su incorporación a los océanos (Schaule y Patterson, 1981; Flegal y Patterson, 1983; Boyle *et al.*, 1986). Los estudios de Cadopaglio *et al.* (1990) indican que la fracción de plomo que se compleja orgánicamente es del orden del 50% del total en disolución, siendo la cinética de complejación del plomo con los ligandos orgánicos no tan rápida como la observada para el cobre (Plavsic *et al.*, 1982; Coale y Bruland, 1988). El proceso de complejación del plomo con ligandos orgánicos va a afectar a la entrada de este metal tóxico en la cadena trófica marina y a su ciclo de sedimentación marina, por lo que resulta de gran importancia el desarrollo de nuevos estudios que combinen la descripción de su especiación, con la determinación del efecto de esta especiación sobre los individuos (adsorción e incorporación) y comunidades algales (crecimiento). La concentración de plomo iónico libre permanece en niveles subpicomolares en aguas oceánicas y representa aproximadamente el 1.4 % de la concentración total de plomo, cerca de la mitad del valor esperado si sólo se consideran las interacciones con los ligandos inorgánicos del medio (Turner *et al.*, 1981). La complejación inorgánica del plomo se ve dominada por las especies Cl^- , CO_3^{2-} y OH^- , alcanzándose un valor para el coeficiente de reacción inorgánica del plomo con estas moléculas de 35.5 para un pH=8.1 (Millero y Hawke, 1992).

La especiación del hierro resulta muy importante debido a que es el principal micronutriente, y es mucho más compleja, ya que además de complejos orgánicos e inorgánicos, puede encontrarse en agua de mar en dos estados de oxidación diferentes: Fe(III) y Fe(II). Su solubilidad es muy baja, y la concentración total disuelta suele ser del orden de subnanomolar. La forma termodinámicamente estable es el Fe(III) en aguas oceánicas, pero existen varios procesos capaces de reducir el Fe(III), que mantienen una pequeña presencia de formas inorgánicas de Fe(II), las cuales en condiciones del agua de mar tienen una vida media de varios minutos y vuelven a

oxidarse a Fe(III) (Rue y Bruland, 1995; Millero *et al.*, 1995). La especiación inorgánica de ambas formas del hierro también difiere mucho. El Fe(III) aparece principalmente como producto de reacciones de hidrólisis ($Fe(OH)_2^+$, $Fe(OH)_3^0$, $Fe(OH)_4^-$), y el ion férrico libre (Fe^{3+}) es una especie muy poco abundante y de escasa reactividad por su poca tendencia a deshidratarse. En cambio el Fe(II) existe principalmente como ion ferroso libre (Fe^{2+}), el cual resulta mucho más soluble y reactivo que el férrico (Millero *et al.*, 1995).

En cuanto a la complejación orgánica del hierro se conoce muy poco y sólo recientemente han aparecido trabajos relacionados con ella. Según las publicaciones de Wu y Luther (1995) y de Rue y Bruland (1995), entre un 99% y un 99.9% del hierro disuelto presente en aguas superficiales marinas se encuentra complejado por moléculas orgánicas de naturaleza desconocida, altísima constante de estabilidad y en concentración que sobrepasa al total de hierro disuelto. Esto hace que la fracción en forma de hidróxidos férricos sea menor del 1% y que el ion férrico libre prácticamente no exista.

Para el resto de los elementos traza hay una gran variedad de comportamientos, desde el del manganeso que apenas presenta complejación y aparece casi en su totalidad como Mn inorgánico en disolución, hasta los referidos de cobre e hierro, totalmente complejados orgánicamente. El Zn aparece en torno a un 98% complejado orgánicamente en disolución.

El estudio de la complejación orgánica de los metales traza resulta por lo tanto fundamental para describir su especiación en medios acuáticos, pero hasta la fecha no existen datos definitivos sobre el alcance exacto de esta complejación, de la naturaleza de estos compuestos y de su origen, por lo que son necesarios nuevos estudios sobre la interacción de metales traza con moléculas presentes en disolución o en las membranas celulares para comprender su efecto sobre las poblaciones algales.

Papel de la especiación en la ingestión de metales traza por el fitoplancton

La disponibilidad que experimenta un determinado metal en disolución para el fitoplancton viene fuertemente influida por su especiación. Las células vivas adsorben iones metálicos en sus superficies y pueden además incorporarlos internamente enlazándolos y bombeándolos a través de las membranas celulares. Se ha demostrado que por norma general la velocidad de incorporación al interior celular de un metal traza

concreto viene dada por la actividad del ion libre en el medio y no como podría suponerse por la concentración total (Sunda y Guillard 1976, Anderson y Morel 1978, 1982, Stauber y Florence, 1987). Es decir, que la fracción complejada orgánicamente, que para muchos metales traza es mayoritaria, no resulta disponible para el fitoplancton. Esto ha sido confirmado para varios metales (Cu, Zn, Fe, Mn, Cd), ligandos complejantes, organismos y a través de varias respuestas fisiológicas: ingestión, toxicidad y limitación del crecimiento por falta de micronutrientes. Aunque últimamente se cree que existe un número muy limitado de compuestos orgánicos que también pueden atravesar las membranas celulares del fitoplancton, como es el caso de los complejos entre el hierro y sideróforos descrito por Nielands (1981).

Para explicar la importancia de la especie iónica libre hay que tener en cuenta que el fenómeno de la incorporación de metales traza es un proceso cinético que se puede dividir en dos fases (Khummongkol *et al.*, 1982; Gadd, 1988; Xue *et al.*, 1988; Harris y Ramelow, 1990 entre otros). Una primera fase de rápida adsorción del metal iónico a ligandos situados en la superficie celular, también conocida como adsorción, y una segunda fase más lenta de incorporación intracelular por difusión pasiva a través de la membrana celular.

La naturaleza de la unión de metales sobre superficies celulares es doble: por un lado se produce un fenómeno de intercambio iónico basado en la interacción electrostática que ocurre con otros cationes como elementos alcalino, alcalino-térreos y otros metales de transición (Crist *et al.* 1990, 1992, 1994); por otro lado, la liberación de protones cuando otros metales son adsorbidos demuestra la existencia de enlaces del tipo covalente para metales traza (Van Cutsem y Gillet, 1981; Crist *et al.* 1988), y por lo tanto el fenómeno de la adsorción sobre superficies biológicas va a depender fuertemente del pH. Para el estudio de la asociación de los metales traza a la superficie celular resulta muy importante determinar la constante superficial de la reacción entre los grupos funcionales y los metales pesados.

En el proceso de inclusión celular sucede que al ser la membrana impermeable a especies cargadas o polares en general, los iones metálicos deben asociarse a ligandos transportadores especializados y luego disociarse al alcanzar el interior celular. Existen excepciones a esta regla con complejos orgánicos, apolares en las condiciones del agua de mar, capaces de atravesar la membrana celular (HgCl_2 , CH_3HgCl , vitamina B_{12} y algunos quelatos de hierro).

Metales traza como micronutrientes

Muchos metales actúan como cofactores en gran número de enzimas, constituyendo éste su papel más importante en la fisiología de las algas.

Fe	Citocromo f	Transporte de electrones en la fotosíntesis
	Citocromos b y c	Transporte de electrones en la respiración y la fotosíntesis
	Ferredoxina	Transporte de electrones en la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno
	Proteínas ferro-sulfurosas	Transporte de electrones en la respiración y la fotosíntesis
	Catalasa	Degradación de H_2O_2 a H_2O y O_2
	Peroxidasa	Reducción de H_2O_2 a H_2O
	Quelataza	Síntesis de porfirina y ficobiliproteínas
Fe y Mo	Nitrogenasa	Fijación de nitrógeno
	Nitrato y nitrito reductasas	Reducción de nitrato a amonio
Mn o Fe	Dismutasa	Desprotonación de radicales O_2^- a O_2 y H_2O_2
Mn	Enzima envolvente del O_2	Oxidación del agua a O_2 en la fotosíntesis
Zn	Polimerasas del ADN y ARN	Replicación y transcripción de ácidos nucleicos
	Anhidrasa carbónica	Hidratación y deshidratación de CO_2
	Fosfatasa alcalina	Hidrólisis de ésteres de fosfato
Cu	Plastocianina	Transporte de electrones en la fotosíntesis
	Citocromo c oxidasa	Transporte de electrones mitocondrial
	Oxidasa del ascorbato	Reducción y oxidación del ácido ascórbico
Co	Vitamina B_{12}	Reacción de transferencia de carbón e hidrógeno
Ni	Ureasa	Hidrólisis de la urea

Tabla II. Descripción de la función que desempeñan algunas enzimas y proteínas con propiedades óxido-reductoras en la fisiología celular y que poseen a metales traza en el papel de cofactores (Sunda, 1990)

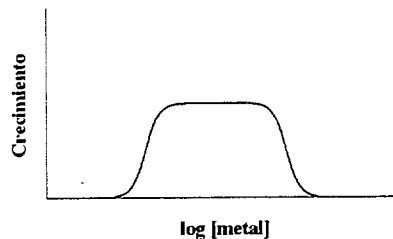
En la tabla II puede apreciarse la enorme importancia del hierro en el conjunto de la fisiología celular de las algas, apareciendo tanto en las cadenas de transporte de electrones de la fotosíntesis y la respiración, como en la síntesis de clorofila y ficobiliproteínas, en la degradación química de moléculas con el grupo funcional peróxido, potencialmente tóxicas y en la fijación celular del nitrógeno. También aparecen el resto de los metales traza de función fisiológica conocida y estudiada y las enzimas de las que forman parte.

El que un determinado metal traza resulte limitante para el crecimiento fitoplanctónico dependerá de las especies presentes en el medio, ya que cada una tendrá unos requerimientos enzimáticos propios.

Como en el caso de los nutrientes mayoritarios, el crecimiento de la población planctónica en condiciones limitantes para un metal traza, es proporcional a la concentración del metal en el interior celular. Y tal y como se ha reseñado anteriormente la incorporación del elemento traza es proporcional a la concentración exterior del metal iónico libre, con lo que puede hallarse una relación matemática para cada especie entre la concentración en el medio de un micronutriente concreto y el crecimiento celular. La incorporación se produce por ligandos específicos transportadores de la membrana que pueden llegar a saturarse y limitar de este modo el crecimiento a pesar de haber una gran cantidad de metal exteriormente. Por lo tanto los parámetros que se interrelacionan en el estudio de la limitación del crecimiento del fitoplancton son muchos y algunos de difícil estimación.

Metales traza como inhibidores del crecimiento

La mayor parte de los metales resultan tóxicos en el medio marino a concentraciones elevadas. Incluso de algunos (Hg, Ag, Pb) no se conoce un requerimiento fisiológico y sólo son capaces de perjudicar el crecimiento celular. Otros como por ejemplo cobre y zinc pueden ser limitantes a bajas concentraciones de su especie iónica libre y tóxicos a mayores. Es decir, presentan un intervalo de concentraciones en que no afectan al crecimiento para una determinada especie planctónica, como es el caso expuesto en la gráfica 2.



Gráfica 2. Ejemplo de relación entre crecimiento y concentración para el caso de un metal con comportamiento tanto de micronutriente como de efecto tóxico.

Los metales traza resultan tóxicos a los organismos debido a que pueden complejarse en puntos de coordinación esenciales de importantes moléculas biológicas, como es el caso de enzimas, sustituyendo a otro metal que sí posee los atributos químicos necesarios para conferirle actividad (radio iónico, geometría de coordinación, carga, cinética de asociación-disociación o potencial de oxidación-reducción). Esto provoca la alteración del normal funcionamiento metabólico celular. Por lo tanto, para estos puntos de coordinación de biomoléculas se producirá una competición entre metales nutrientes y metales inhibidores, siendo múltiples las combinaciones posibles.

Existen estudios del efecto del cobre sobre la enzima zinc-dependiente que regula la ingestión de ácido silícico en *Thalassiosira pseudonana* (Rueter y Morel, 1981), así como la reducción en el crecimiento celular que crea la baja presencia intracelular de Mn originada por una gran presencia de cobre en el medio (Sunda *et al.*, 1981; Sunda y Huntsmann, 1983), el cadmio origina el mismo efecto sobre el Mn y las enzimas que de éste dependen (Hart *et al.*, 1979), el Cd interfiere también en la actividad de enzimas que contienen Fe (Harrison y Morel, 1983). Otros ejemplos descritos son las interacciones entre Cu y Fe (Murphy *et al.*, 1984) y Cu y Zn (Price y Quigley, 1966; Rueter y Morel, 1981).

Por otro lado existen casos excepcionales en que dos metales que compiten por una misma posición en una determinada enzima poseen los requerimientos químicos y espaciales para conferir actividad a la enzima. Generalmente la reacción que regula la enzima pierde rendimiento con el átomo intruso pero no se detiene la acción de la misma. Es el caso estudiado por Price y Morel (1990) para el reemplazamiento del Zn por parte del Cd o el del Co como sustituto del Zn.

Debido a todas estas interacciones competitivas entre los metales traza, los estudios sobre limitación de crecimiento o toxicidad de los mismos en poblaciones fitoplanctónicas se complican debido a que el resultado va a ser función no sólo de la concentración del ion libre objeto de estudio, sino que además afecta la concentración iónica libre de todos los elementos capaces de competir con éste, tanto favorable como negativamente. De ahí la importancia de emplear técnicas limpias que minimicen la contaminación de medios de crecimiento en estudios en cultivos, y tampones metálicos que limiten la concentración de la especie iónica libre de ciertos elementos.

Efecto de los metales traza sobre comunidades planctónicas

Cada especie algal posee una determinada sensibilidad a la toxicidad y limitación nutricional de cada elemento traza. Por lo tanto el espectro de concentraciones de los distintos metales traza, y la suma de los efectos de estos sobre las especies presentes en el medio pueden determinar no sólo la cantidad de organismos planctónicos presentes, sino además la composición de especies de la comunidad algal. En general, las especies oceánicas son capaces de crecer más rápidamente a bajas concentraciones de elementos micronutrientes (Fe, Mn, Zn, Co) que las neríticas (Brand *et al.*, 1983), pero una alta cantidad en el medio de un elemento traza tóxico (Cu, Pb)

limita mucho más el crecimiento de las especies oceánicas que de las neríticas (Murphy *et al.*, 1984), en consonancia con las concentraciones presentes en el mar. Esto hace suponer que el papel de los elementos traza en regular la composición de especies planctónicas es efectivo. El mecanismo que explica este hecho es la habilidad de las especies oceánicas para alcanzar un óptimo crecimiento con una concentración interna mucho menor de metal micronutriente que para el caso de las especies neríticas. Esto se supone que se consigue sustituyendo en parte a las metaloenzimas que requieren el metal presente a muy baja concentración, por enzimas cuyo centro funcional no requiere un átomo metálico, u otras que presentan en su centro activo un elemento metálico distinto y que cumplen una función equivalente aunque se pierda en algunos casos algo de capacidad catalítica (sustitución de ferredoxina por flavodoxina en cianobacterias, citocromo c-533 por plastocianina en cianobacterias también, etc.).

Además del efecto sobre la composición de especies, resulta evidente también la interacción de los metales traza sobre la productividad del global de una comunidad fitoplanctónica, tanto por falta de un elemento micronutriente, como por presencia en exceso de uno tóxico que interfiera con uno esencial. Está documentado el pobre crecimiento planctónico en algunas zonas de afloramiento debido a la mayor proporción Cu / Mn del agua que alcanza la superficie (Sunda y Huntsman, 1983) y sobre todo la baja productividad originada por falta de hierro en aguas del Pacífico ecuatorial que presentan una baja concentración de clorofila a pesar de su alto contenido en macronutrientes. En estas últimas se han desarrollado experimentos de incubación y de enriquecimiento a gran escala espacial a nivel nanomolar (Martin y Fitzwater, 1988; Coale, 1991; Martin *et al.*, 1994). El resultado ha sido un incremento inmediato de la biomasa fitoplanctónica, la concentración de clorofila, la productividad e incluso en los experimentos de incubación un desplazamiento de las especies predominantes.

Efecto biológico sobre la especiación y concentración de metales traza

Hasta este punto se ha descrito la influencia de los elementos traza sobre el fitoplancton, pero también existe un efecto de este último sobre la cuantía y forma en que se presentan los metales traza en el medio marino en un claro ejemplo de retroalimentación. La manifestación más evidente es el perfil en profundidad que presentan muchos de ellos similar al de los macronutrientes, lo cual implica un control biológico de su concentración. Es decir, los metales traza disueltos son ingeridos en la

zona eufótica y transportados hacia el fondo con el hundimiento de partículas biológicas (fragmentos celulares o “fecal pellets”), pudiendo ser por otro lado remineralizados en profundidad por organismos microbianos. Este proceso permite mantener concentraciones suficientes en aguas superficiales para sostener las poblaciones fitoplanctónicas.

Otro efecto de las algas sobre la especiación de metales en el mar y que va a ser objeto de estudio en este trabajo es la complejación de metales por parte de ligandos orgánicos naturales disueltos y por grupos funcionales de la superficie celular. La liberación de material orgánico al medio marino por parte del fitoplancton parece ser la mayor fuente de materia orgánica disuelta en el océano abierto (Zhou y Wangersky, 1989). Estos compuestos, que presentan la propiedad de complejar a los metales presentes en el medio, son el principal factor de especiación para la mayoría de ellos (Cu, Zn, Pb, Fe, etc.).

Por ejemplo para el caso del cobre el principal efecto es que reducen fuertemente la presencia de la especie tóxica del mismo, el ion libre (Cu^{2+}). La concentración de cobre en agua de mar oscila entre 10^{-9} M y 10^{-8} M, la complejación inorgánica a un pH_{NBS} de 8.2 reduciría la concentración de ion cúprico a un valor aproximado entre 10^{-9} y $10^{-10.5}$ M, cantidades que son tóxicas para varias especies planctónicas (Brand *et al.*, 1986). Pero en el medio marino la complejación por parte del material orgánico disuelto hace descender la concentración de ion cúprico libre a valores entre 10^{-12} y 10^{-14} M (Coale y Bruland, 1990), favoreciendo ampliamente la productividad de la comunidad fitoplanctónica. Experimentos con cultivos monoalgales (*Synechococcus* sp. por Moffet *et al.*, 1990) han demostrado la capacidad de ciertas especies para liberar exudados de enorme afinidad por el cobre. Por lo tanto la toxicidad del cobre para el fitoplancton viene determinada por la presencia de exudados liberados por este mismo en el medio, incluso se especula con que esta secreción de exudados tenga por principal objeto la disminución de la toxicidad de ciertos elementos traza. La complejación orgánica del cobre descrita por Coale y Bruland (1990) también varía con la profundidad ya que las concentraciones de complejos orgánicos de mayor afinidad hallados se correlacionan bien con los perfiles de productividad primaria, es decir, una alta presencia superficial con desaparición en profundidad. Este fenómeno hace suponer que los ligandos de mayor afinidad por el cobre, que aparecen cerca de la superficie, son en realidad exudados algales, y llegan a complejar más del 99% del cobre superficial. Con la profundidad los complejos hallados son más débiles y no se puede asegurar su origen

biológico, situándose en profundidad el alcance de la complejación orgánica según estos autores en un 90 - 95%.

En el caso del otro metal que será objeto de estudio, el plomo, también resulta de gran importancia la especiación orgánica. Sus concentraciones en aguas oceánicas son menores: 10^{-11} - 10^{-10} M (Capodaglio *et al.*, 1990), pero es un elemento de gran toxicidad sin función biológica conocida. Y al igual que sucede con el cobre, la complejación por parte de los ligandos orgánicos en disolución reduce la presencia del plomo iónico, la especie que es asimilada por las membranas biológicas, a concentraciones del orden de 10^{-13} M. En este caso el porcentaje de plomo complejado orgánicamente en disolución en aguas oceánicas lo sitúan Capodaglio *et al.*, 1990 entre un 50 y un 80%.

Para el metal traza más importante como micronutriente para el plancton y objeto de estudios previos por parte de este grupo de investigación, el hierro, la presencia de material orgánico en disolución, también es crítica para su especiación e interacción con el fitoplancton. Una gran parte del hierro presente se halla complejado de forma orgánica. Según Wu y Luther (1995) y Rue y Bruland (1995) el hierro disuelto se halla complejado en más de un 99% en el agua de mar. De estos compuestos se ha demostrado que son químicamente reversibles, y por lo tanto asimilable el hierro complejado a ellos, a largo plazo, si la especiación es alterada. De todas formas se cumple la paradoja de que la concentración de hierro inorgánico que permanece en el medio no es suficiente para mantener la productividad que se manifiesta en el medio marino, y según la creencia generalizada anterior la fracción complejada orgánicamente no es disponible para el fitoplancton. Las explicaciones posibles sugeridas y que están por comprobar a este hecho son que por un lado sí existen ciertos compuestos orgánicos férricos directamente involucrados en el transporte a través de la membrana celular del hierro como parece ser el caso de los sideróforos liberados por las cianobacterias en condiciones limitantes de hierro en el medio. Estos, son compuestos con una enorme afinidad para complejar al Fe(III) (constante de estabilidad en torno a 10^{32}), y que podrían penetrar con el Fe(III) complejado en las células por la acción de permeasas de la membrana, liberando el metal en el interior celular. Se desconoce si este caso existe con otras moléculas orgánicas o incluso si es posible que otros metales aparte del hierro sean asimilados en pequeñas cantidades por esta vía.

La otra posible explicación al efecto positivo de la materia orgánica disuelta en la asimilación de hierro es la complejación de óxido férrico sobre materia orgánica que debe favorecer una posible reacción de transferencia de electrones fotoinducida con el

resultado de la formación de Fe(II) (especie biodisponible), y por tanto aumentando la presencia de la fracción de hierro asimilable por las algas.

En la descripción del fenómeno de la complejación hay que tener en cuenta además las interacciones de los ligandos orgánicos estudiados con otros metales traza presentes. Por ejemplo en el caso de sideróforos se ha descrito la capacidad complejante que poseen sobre el cobre (McKnight y Morel, 1980), que sin ser este complejo tan estable como el formado con el hierro sí que puede ser relevante en ciertas circunstancias, adquiriendo estos compuestos por lo tanto la doble función tanto de facilitar el mantenimiento en disolución e ingestión del hierro, como la reducción de la toxicidad del cobre.

Es evidente por lo tanto el profundo desconocimiento actual sobre la complejación orgánica de metales traza en el medio marino, tanto de la naturaleza de estas moléculas como de delimitar con precisión la fracción asimilable de la concentración total en disolución de un elemento concreto.

1.2 OBJETIVOS DE LA TESIS

El objetivo fundamental de la presente tesis doctoral ha sido el estudio del efecto de la presencia de células fitoplanctónicas sobre la especiación de los metales traza (Cu, Pb) en el medio marino a través de la interacción de estos con los grupos funcionales de sus superficies (adsorción) y de los compuestos orgánicos que exudan (complejación).

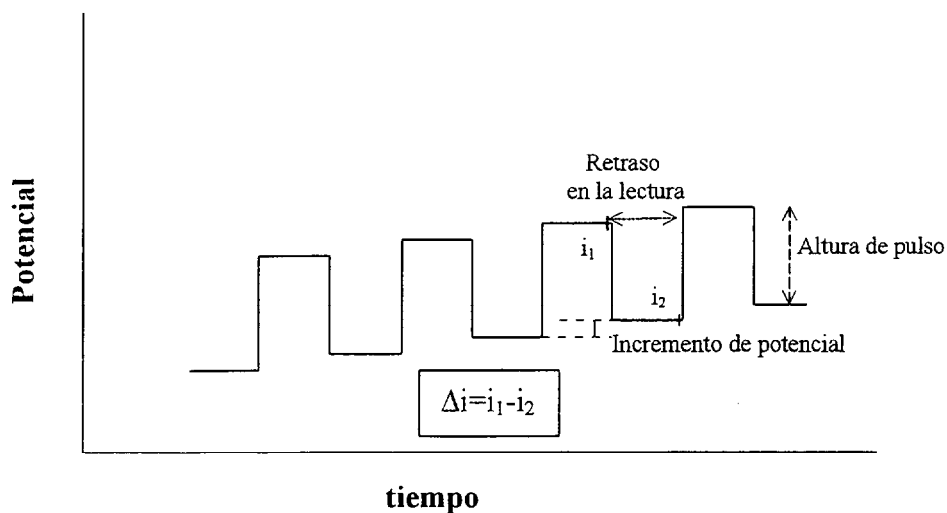
Para alcanzar este objetivo general indicado, fue necesario alcanzar una serie de objetivos específicos que se resumen en:

- 1º Definición, debido a la heterogeneidad de los grupos funcionales susceptibles de adsorber o complejar a los cationes en disolución, de dos tipos distintos de dichos grupos, y la realización de estudios que, por primera vez, siguieran la evolución de los mismos a lo largo de un cultivo en diferentes condiciones de trabajo.
- 2º Optimización de un modelo de ajuste iterativo de los datos procedentes de las valoraciones metálicas tanto del medio como de las superficies de las algas, con el fin de obtener los valores de los parámetros que describen las características de los diversos grupos funcionales presentes de forma independiente entre sí.
- 3º Análisis comparativo del alcance de las reacciones de complejación por parte de la materia orgánica disuelta y de los exudados algales, y de adsorción por parte de las superficies biológicas en el medio marino.
- 4º Determinación del efecto de las variables fisico-químicas sobre la reacción de adsorción de los distintos tipos de grupos funcionales de la superficie de diatomeas.
- 5º Estudio de la liberación de exudados por parte de diatomeas en función de la naturaleza del medio. Efecto sobre la reacción de complejación global de los diversos medios.

TÉCNICAS INSTRUMENTALES

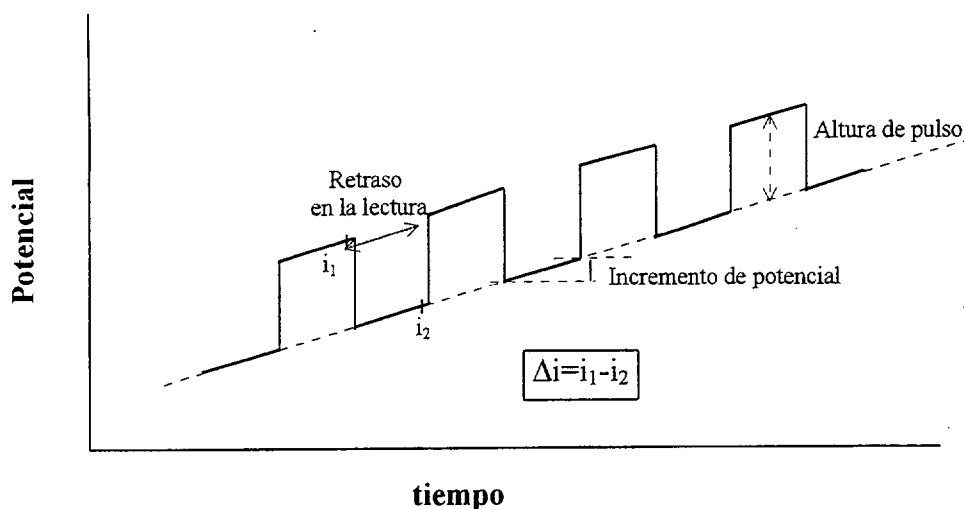
2.1 DESCRIPCION DE LA VOLTAMETRIA DE REDISOLUCION

En estudios de complejación y adsorción de metales en medios naturales es preciso utilizar una técnica sensible que estime la cantidad de metal disuelto en el medio. En este caso se ha utilizado la voltametría para conocer la concentración en sus distintas especies de cobre o plomo disuelto en el agua de mar. La técnica se fundamenta en aplicar un barrido de potencial a la disolución que altere el estado de oxidación del compuesto a cuantifica, y detectar la variación de corriente que se verifica. El cambio de potencial respecto al tiempo más intuitivo utilizable es el lineal, pero para incrementar la sensibilidad del método se emplean variaciones a partir de pulsos que posibilitan una continua oxidación y reducción de los compuestos a detectar, y por tanto un incremento en la señal obtenida. En este trabajo se han utilizado los dos métodos mostrados en las gráficas 3 y 4, pulso diferencial y barrido en onda cuadrada.



Gráfica 3. Evolución del potencial frente al tiempo, en un barrido de potencial en forma de **onda cuadrada**. El dato de intensidad de corriente que se utiliza finalmente corresponde a la resta de los valores medidos en los puntos i_1 e i_2 . Asimismo, aparecen los parámetros que caracterizan este barrido de potencial.

En ambas gráficas se aprecian cuales son los momentos en que se toma una medida de la señal de corriente (i_1 , i_2). El retraso respecto al momento en que se verifica el pulso se debe a que de esta forma se eliminan posibles interferencias de corrientes no faradaicas que aparecen en la superficie del electrodo como consecuencia del cambio de potencial, y que se reducen con el tiempo mucho más rápidamente que las faradaicas. La resta de los valores durante y después del pulso elimina el efecto del incremento de



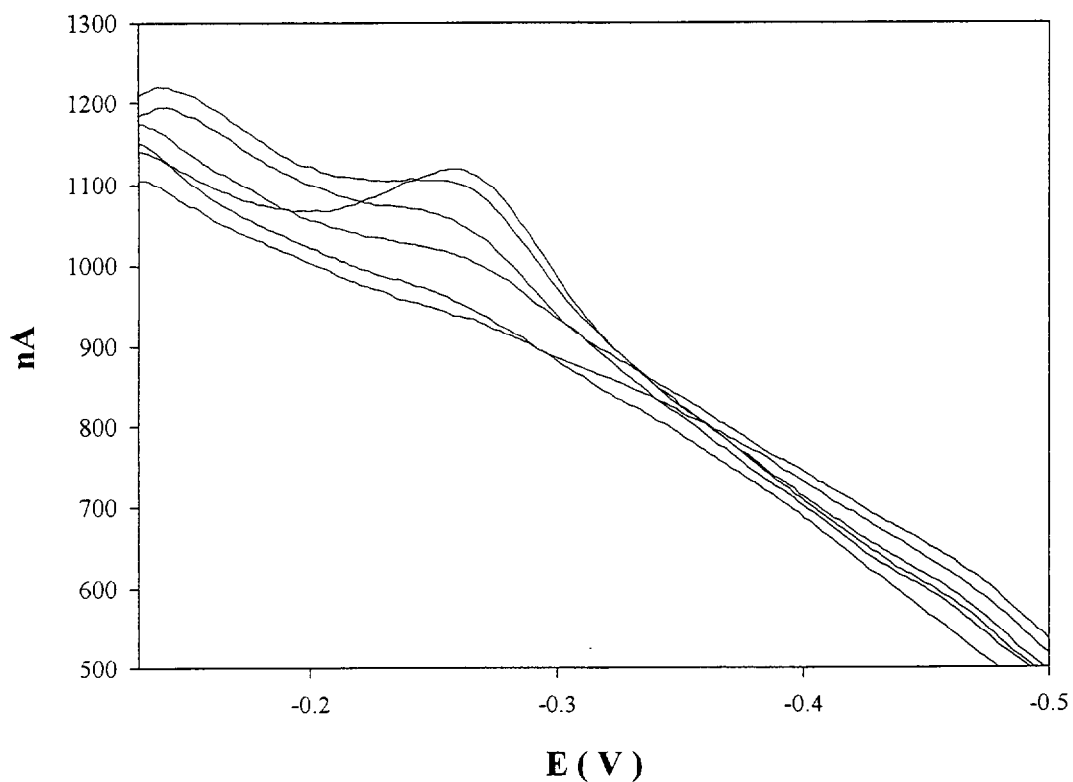
Gráfica 4. Esquema de la forma que tiene la variación del potencial frente al tiempo en un barrido de **pulso diferencial** con los parámetros que caracterizan al mismo.

potencial sobre la intensidad de corriente de la celda y da como resultado una gráfica con forma de un pico sobre una línea base, el cual es directamente proporcional a la concentración de la especie que experimenta la reacción redox sobre la superficie del electrodo.

Para las medidas voltamétricas se ha dispuesto de un sistema de electrodos PAR 303A (EG&G) situado en el interior de una cámara de flujo laminar, al cual se acopla la muestra situada en recipientes de teflón de 15 ml. El sistema consta de:

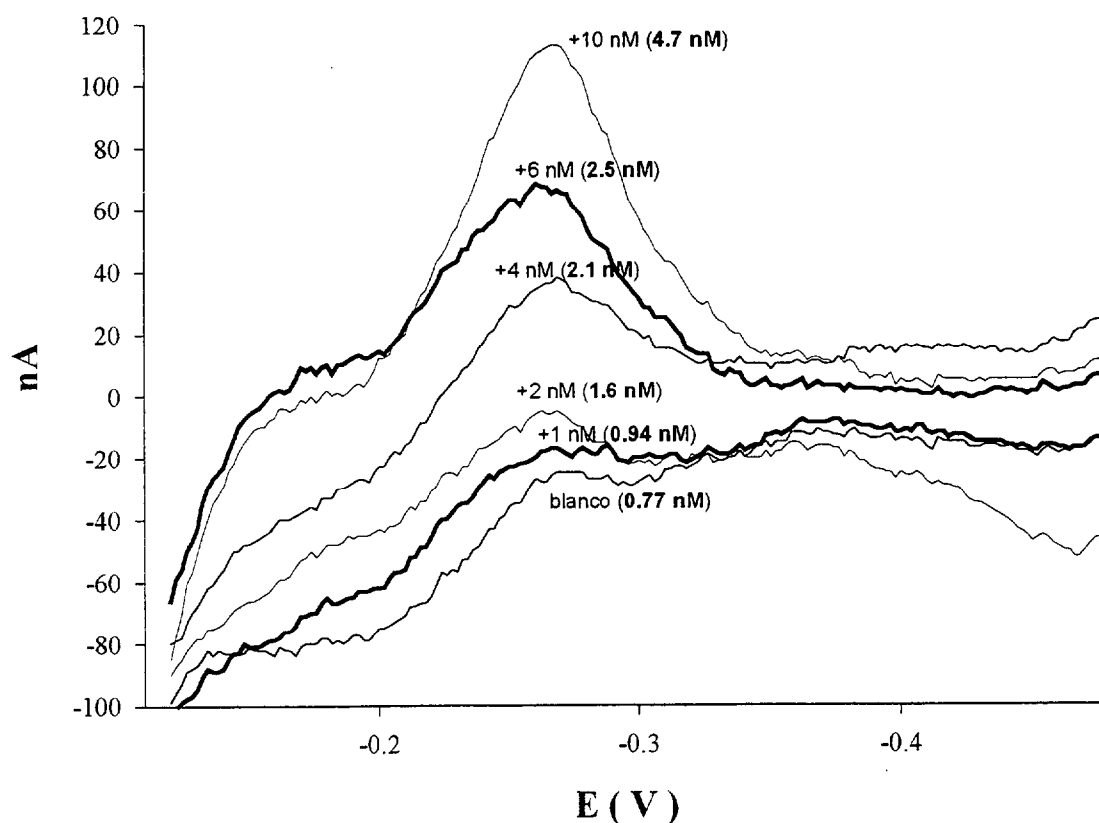
- Un electrodo de trabajo o microelectrodo que en este caso es un electrodo de gota colgante de mercurio, constituido por una gota de este metal que pende de la punta de un capilar unido a un depósito de mercurio. En su superficie se produce la reacción redox de interés. Su pequeño tamaño es debido a la necesidad de disponer de un electrodo fuertemente polarizable.
- Un electrodo de referencia, que en este caso es uno de Ag / AgCl (saturado en KCl). Mantiene su potencial estable y conocido durante todo el proceso, sea cual sea la composición de la muestra.
- Un contraelectrodo o electrodo auxiliar. Constituido por un alambre de platino. Su función es permitir la conducción eléctrica de la fuente de alimentación al electrodo.
- Un tubo unido exteriormente a una botella de nitrógeno C-55 que sirve para purgar la muestra desplazando al O₂ con N₂ saturado en agua, previamente a la medición.
- Un agitador magnético que se sitúa en el fondo de la célula de teflón.

El agitador se mueve por la acción de un agitador magnético electrónico PAR 315. La celda polarográfica se halla a su vez conectada a un analizador PAR 384B (EG&G) que se encarga de controlar los parámetros del barrido de potencial y el análisis de la señal eléctrica generada y permite la representación de los voltagramas al estar conectado a una impresora directamente. Pero para aumentar la resolución en la obtención de altura de pico a través de restas de blancos y aumento de la escala de la representación, los voltagramas fueron recogidos en un ordenador a través de una conexión RS232 en ficheros de datos, para ser trabajados con programas de representación gráfica y aumentar la resolución (ver gráficas 5 y 6).



Gráfica 5. Polarogramas obtenidos mediante voltametría catódica en muestras de agua de mar ($\text{pH}_{\text{NBS}}=7.8$; $[\text{catecol}]=2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{Cu}]=5.2 \text{ nM}$). Corresponden a la muestra sin cobre añadido, y adiciones de 2, 4, 6, 10 y 15 nM de Cu^{2+} . Se observa el cambio de pendiente producido por la reducción sobre la superficie del electrodo del cobre presente. La muestra no se halla irradiada y los valores de cobre corresponden a adiciones al medio y no a concentraciones totales.

Existen dos variantes de esta técnica voltamétrica, ambas han sido utilizadas en el desarrollo experimental:



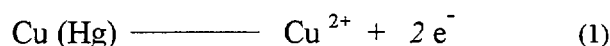
Gráfica 6. Representación de los polarogramas de la misma serie de muestra que los representados en la gráfica 5 correspondientes a las adiciones sobre el medio original marcadas en la gráfica, tras haberles sido sustraídos los valores de un polarograma obtenido sin ninguna adición de catecol. La cifra entre paréntesis y en negrita corresponde a la concentración de cobre lábil de la muestra (no complejado orgánicamente) que genera el pico.

2.1.1 Barrido anódico

En este caso se aplica un potencial a la muestra más negativo que el potencial en el que se produce la oxidación de la especie a determinar. Mientras la disolución permanece a este potencial se agita la misma para favorecer que la especie se acumule sobre el electrodo de trabajo (en este caso, supone que el cobre forme una amalgama con el mercurio del electrodo de gota colgante). Naturalmente este método resulta muy práctico para metales capaces de amalgamarse con el mercurio fácilmente en estado reducido como Cu, Pb, Cd, etc. En el caso de otros metales incapaces de amalgamarse, este método no resulta eficaz.

Después se procede a desplazar el potencial a valores más positivos hasta producirse la oxidación completa de la especie a cuantificar, midiéndose la corriente

generada según la siguiente reacción de reducción descrita para el caso particular del cobre:



La corriente que se detecte debida a esta reacción será por tanto proporcional a la concentración de especie metálica presente.

En este método, se considera que la fracción de metal que alcanza el electrodo y que verifica el cambio de estado de oxidación o fracción lábil, es aquella compuesta por el metal iónico en disolución y el complejoado por moléculas inorgánicas. El uso de esta técnica ha sido criticado por la posible sobreestimación de la fracción inorgánica del metal, debido a la posibilidad de que algunos complejos orgánicos se reduzcan en el electrodo o que alguno de los complejos metálicos se disocie en la capa de difusión durante la etapa de preconcentración. La disociación de complejos interviene cuando la vida media de un enlace entre un ligando y un metal sea comparable o menor que su tiempo de residencia en la capa de difusión. Capodaglio *et al.* (1995) determinan en su trabajo estas dos variables y obtienen tiempos de residencia en la capa de difusión del electrodo varios órdenes de magnitud menores que las vidas medias de las reacciones de complejación metálica de los ligandos incluidos dentro de la ventana espectral de la técnica anódica, para el caso del cobre y del plomo. Asimismo tampoco encontraron evidencia de compuestos orgánicos reducibles mediante esta técnica.

Hay que considerar que el empleo de un potencial de deposición más negativo aumentará el grosor de la capa de difusión del electrodo, y la tendencia a reducir al material orgánico en disolución. Existe un método denominado DeFord-Hume, que calcula en función del desplazamiento del pico de la oxidación del metal, a medida que se añaden cantidades del mismo, la fracción de metal complejoado orgánicamente que se disocia y que es por tanto detectado en el voltograma. De acuerdo con los experimentos realizados por otros autores en que se ha calculado esta fracción con un potencial de deposición similar al que se va a utilizar en este trabajo (González Dávila *et al.*, 1995; Gonçalves *et al.*, 1987), resulta ser una parte mínima del total del cobre complejoado orgánicamente. Por ello no ha sido tenida en cuenta en el desarrollo experimental de este trabajo y se ha considerado como fracción estimable, al metal presente en el medio en sus distintas formas inorgánicas.

Si la muestra es llevada a un pH ácido (<3) el metal se disocia totalmente de estos compuestos orgánicos y es posible dar concentraciones totales de metal disuelto en el medio.

2.1.2 Barrido catódico

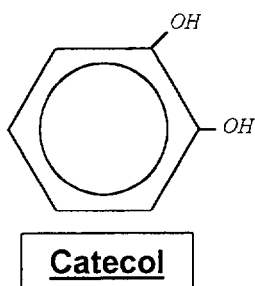
La técnica se fundamenta en introducir una especie orgánica en el medio con gran afinidad por el metal objeto de estudio para formar un complejo estable. El complejo organometálico resultante debe tener gran tendencia a adsorberse sobre una gota de mercurio, bien por un proceso físico de adsorción, bien por una atracción electrostática de la gota de mercurio. La disolución es agitada durante un periodo a un potencial propicio para conseguir este proceso. A la gota de Hg se le aplica un barrido de potencial partiendo de valores más positivos que el potencial de reducción del compuesto hasta más negativos, obteniéndose una corriente catódica que presentará un pico proporcional a la concentración del complejo presente en el medio.

El paso de esta técnica en que se procede a la concentración de los complejos sobre la superficie de la gota, hace que esta técnica sea mucho más sensible que la técnica de barrido anódico (se obtienen sensibilidades unos dos ordenes de magnitud mayores).

Según el metal del que se desee obtener su concentración se debe escoger uno u otro complejante, teniendo en cuenta que debe ser muy específico para el metal requerido y que tendrá que adsorberse el complejo resultante con facilidad sobre el electrodo de Hg. Para el caso de determinación de cobre disuelto, se han desarrollado técnicas de medida con diversos complejantes como la oxina (van den Berg, 1986), catecol (van den Berg, 1984), tropoleno (Donat y van den Berg, 1992), benzoiloacetona (Moffett, 1995) y salicilaldoxima (Campos y van den Berg, 1994). El utilizado para estudios de complejación suele ser el catecol debido a que su afinidad por el cobre es tal que una fracción importante del cobre permanece complejo a ligandos existentes de forma natural en el medio y mediante el proceso que se describirá en el apartado de obtención de capacidades complejantes, se puede determinar las características de estos complejos naturales. Además de esto ofrece una gran sensibilidad. Otros complejantes como la oxina presentan una enorme afinidad por el cobre y no son tan prácticos debido a que desplazan a prácticamente todos los complejos naturales del medio. Pueden resultar válidos si lo que se quiere obtener es información de los complejos de muy alta

constante de estabilidad condicional, pero que se hallan presentes a muy baja concentración, o simplemente dar concentraciones totales mediante esta técnica.

Para el caso específico del análisis de cobre mediante la adición de catecol y posterior análisis por voltametría de redisolución catódica, al añadir el complejante a un



medio, los complejos órgano-metálicos resultantes se adsorben sobre la gota de mercurio formando una película sobre la misma a potenciales que permiten la presencia del cobre en el medio en forma iónica. Cuando el potencial es llevado a valores más positivos, aparece un pico en la señal de corriente a valores muy próximos al potencial de reducción del cobre en ese medio. No

aparece ninguna señal de reducción del catecol (van den Berg, 1984). Por lo tanto el pico que presenta el polarograma es proporcional a la concentración del complejo cobre-catecol.

Sucede al igual que en el caso anódico, que la proporción de metal que el complejante añadido no ha logrado desplazar de sus complejos con los ligandos naturales del medio, no se reduce en la superficie del electrodo y constituye una fracción indetectable. La medida de la concentración total de metal disuelto requiere desplazar o eliminar todos estos complejos. La técnica que se suele utilizar es irradiar previamente a la adición del complejante artificial la muestra con radiación ultravioleta en un medio muy oxidante para lograr la degradación de toda la materia orgánica disuelta, y eliminar la competencia que el complejante artificial pudiera encontrarse. De este modo se calcula la concentración total por voltametría catódica.

2.2 FUNDAMENTOS DE LA VOLTAMETRÍA ADSORTIVA DE REDISOLUCIÓN CATÓDICA CON CATECOL

La determinación de los parámetros de complejación para los ligandos orgánicos naturales disueltos está basada en la competición entre estos ligandos y el complejante catecol añadido al medio en exceso (van den Berg 1984). La concentración de los complejos Cu-catecol en el equilibrio va a ser función entre otros parámetros de la concentración y constantes de estabilidad de los ligandos naturales de la muestra. Tras equilibrar los complejos naturales de la muestra con el catecol durante el tiempo necesario, la concentración de sus complejos con el cobre se mide por voltametría

catódica de redisolución. A continuación se reseñan los fundamentos teóricos que justifican el empleo de esta técnica.

En la muestra original de agua de mar la concentración y especiación del cobre vienen dadas por la expresión:

$$[\text{Cu}]_{\text{TOT}} = [\text{Cu}'] + \sum [\text{CuL}_x] \quad (2)$$

siendo $[\text{Cu}]_{\text{TOT}}$ la concentración total de cobre presente en la disolución, $[\text{Cu}']$ la concentración de cobre en todas sus formas inorgánicas y $\sum [\text{CuL}_x]$ la concentración de cobre complejada por los ligandos orgánicos presentes en el medio original (L_x).

Además la concentración de metal en las diversas formas inorgánicas presentes en el medio y el metal libre en forma iónica, se puede expresar por la siguiente relación:

$$[\text{Cu}'] = [\text{Cu}^{2+}] \cdot \alpha_{\text{Cu}} \quad (3)$$

donde α_{Cu} es el coeficiente α (Ringbom y Still, 1972) o fracción de Cu^{2+} libre para el cobre, que corrige las reacciones inorgánicas laterales de complejación del Cu^{2+} en el agua de mar.

Su valor viene dado por la expresión:

$$\alpha_{\text{Cu}} = 1 + \sum (K_i^* \cdot [L_j]) + \sum (K_{a,i}^* / [\text{H}^+]) \quad (4)$$

siendo K_i^* la constante de estabilidad del complejo de Cu^{2+} con los ligandos inorgánicos del medio (L_j): Cl^- , CO_3^{2-} , $\text{B}(\text{OH})_4^-$ y SO_4^{2-} . $K_{a,i}^*$ es la constante de acidez del Cu^{2+} , estas constantes son válidas a una fuerza iónica determinada y están definidas para la escala libre de protones.

En presencia de catecol, el cobre existente en el medio se distribuye en las siguientes especies:

$$[\text{Cu}]_{\text{TOT}} = [\text{Cu}'] + \sum [\text{Cucatec}_i] + \sum [\text{CuL}_x] \quad (5)$$

$\sum [\text{Cucatec}_i]$ es la concentración de cobre complejado por el catecol

La relación entre la concentración de cobre iónico libre y las concentraciones de iones de catecol libres (cat') y los complejos cobre-catecol ($\sum [\text{Cucatec}_i]$), viene dada por las ecuaciones 6 y 7:

$$\sum [\text{Cucatec}_i] = [\text{Cu}^{2+}] \cdot \alpha_{\text{Cucatec}} \quad (6)$$

para el caso del cobre con el catecol, i puede valer 1 y 2. α_{Cucatec} es el coeficiente α del cobre con el catecol.

$$\alpha_{Cu_{cat}} = K'_{Cu_{cat}} \cdot [cat'] + \beta'_{Cu_{cat}_2} \cdot [cat']^2 \quad (7)$$

donde K' y β' son las constantes de estabilidad condicionales para la formación de complejos con catecol, en la forma que especifican los subíndices, y $[cat']$ es la concentración de catecol no complejada por el cobre. Las constantes de estabilidad condicionales han de ser calculadas para las condiciones experimentales presentes (fuerza iónica, salinidad y pH) a partir de las constantes de estabilidad que pueden ser obtenidas en la literatura existente (van den Berg, 1984) y que se ven reflejadas en la tabla III.

Complejo	Log K^*	Tipo de constante
$Hcat^-$	-13.0	$K_{a,1}^*$
H_2cat^0	-9.23	$K_{a,2}^*$
Cu_{cat}^0	13.71	K_1^*
$Cu_{cat}_2^{-2}$	24.93	$\beta_{1,2}^*$
Mg_{cat}^0	5.7	K_1^*

Tabla III. Constantes de estabilidad estequiométricas (K^*) del catecol, las cuales se obtuvieron interpolando sus valores válidos a fuerzas iónicas de 0.1 y 1.0 M (Martell y Smith, 1977) a 0.7, ya que la variación de estas constantes con la fuerza iónica no sigue la ecuación de Davies.

El coeficiente- α (α_{cat}) o proporción de catecol libre en el medio que corrige las reacciones colaterales del catecol con otros cationes del medio, es calculado a partir de:

$$\alpha_{cat} = 1 + \frac{[H^+]^2}{(K_{a,1}^* \cdot K_{a,2}^*)} + \frac{[H^+]}{K_{a,1}^*} + [Mg^{2+}] \cdot K_{Mg_{cat}}^* \quad (8)$$

A pH alrededor de 8 o menos, la reacción colateral del Mg^{2+} es despreciable comparada con la que sucede con los H^+ , por lo que α_{cat} depende prácticamente por completo de la competición de los protones. Valores para las constantes de estabilidad condicionales se obtienen de la siguiente forma:

$$K'_{Cu_{cat}} = \frac{[Cu_{cat}]}{[Cu^{2+}] \cdot [cat']} \quad (9)$$

además, por definición:

$$[cat'] = \alpha_{cat} \cdot [cat^{2-}] \quad (10)$$

por lo tanto

$$K'_{Cu\text{cat}} = K^*_{Cu\text{cat}} / \alpha_{cat} \quad (11)$$

$$\beta'_{Cu\text{cat}_2} = \beta^*_{Cu\text{cat}_2} / \alpha_{cat}^2 \quad (12)$$

La concentración de Cu^{2+} libre en presencia de ligandos inorgánicos y catecol puede ser calculada directamente de la concentración total de cobre disuelto, y de los coeficientes- α .

$$[\text{Cu}^{2+}] = ([\text{Cu}] + \sum [\text{Cu}\text{cat}_i]) / \alpha' \quad (13)$$

siendo

$$\alpha' = \alpha_{\text{Cu}} + \alpha_{\text{Cu}\text{cat}} \quad (14)$$

El valor de $\alpha_{\text{Cu}\text{cat}}$ depende la concentración de catecol, y tanto éste, como el valor de α_{Cu} , dependen asimismo del pH y de la composición del agua de mar. La fuerte dependencia del coeficiente- α respecto del pH a valores próximos a los encontrados en aguas marinas puede observarse en la figura 7.

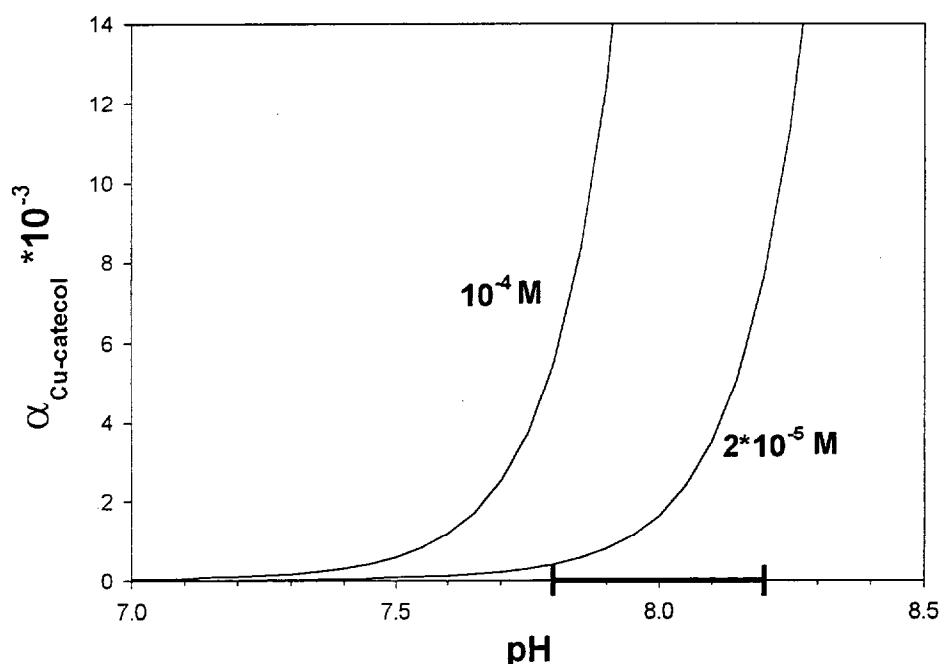


Figura 7. Evolución del valor del coeficiente- α del catecol respecto del cobre iónico libre disuelto, según el pH del medio (escala NBS). Los casos reflejados corresponden al de un medio de salinidad 35‰ y concentraciones de catecol de $2 \cdot 10^{-5}$ M y 10^{-4} M. El segmento indica el intervalo de pH que suele encontrarse en medios naturales.

De igual forma, en la figura 8 queda reflejado el efecto de la concentración del compuesto complejante.

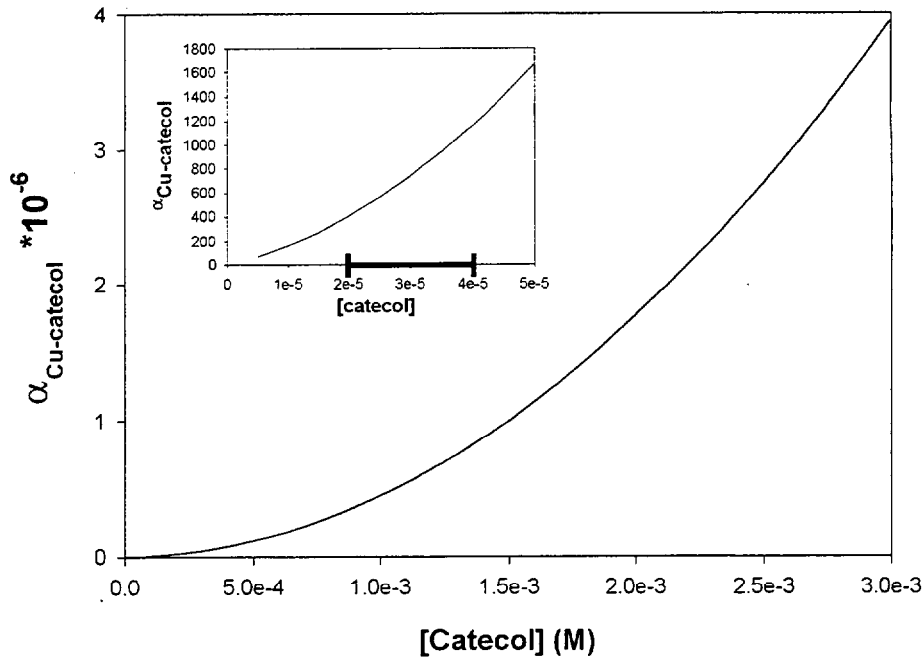


Figura 8. Evolución del valor del coeficiente- α según la concentración de catecol añadido al medio. El caso reflejado corresponde al de un medio de salinidad 35‰ y pH 7.8 (NBS). El segmento corresponde a las concentraciones de catecol utilizadas en los estudios de complejación en este trabajo.

Como se ha descrito previamente, la concentración de cobre complejado, tanto por el catecol, como por moléculas inorgánicas, y además, el cobre iónico libre en disolución, resultan reducibles en la superficie del electrodo al aplicarse un barrido catódico de potencial. A esto se le conoce como fracción lábil:

$$[Cu] + \sum [Cu_{cat}_i] = i_p / S \quad (15)$$

En esta expresión i_p (Amperios) es la altura de pico y S (Amperios mol^{-1}) es la sensibilidad, que se determina a grandes concentraciones de Cu^{2+} en las cuales todos los ligandos orgánicos L_x se hallan saturados. De todo esto se deduce que la concentración de complejos del tipo $\text{Cu}L_x$ puede ser calculada a partir del balance de masas y de la altura de pico medida.

$$\sum [CuL_x] = [Cu]_{TOT} - i_p / S \quad (16)$$

Dada la fuerte dependencia de la concentración de ion cúprico libre con el valor que pueda tomar el coeficiente- α del cobre con el catecol, un aumento del pH o de la concentración de catecol provocará una disminución de esta especie. Esto se traduce en un incremento de la competencia con los ligandos orgánicos naturales en equilibrio con el ion cúprico. Por lo tanto, para un mismo medio, la cantidad de cobre unido a los ligandos naturales, que se estima como la resta respecto del total del unido al

complejante artificial, se verá reducida si se aumenta la concentración de catecol, o se aumenta el pH del medio.

Resulta de gran importancia obtener la concentración de cobre iónico libre en disolución en el medio original, ya que como se ha reseñado en la introducción es la especie cúprica que resulta tóxica a los organismos. Esto se consigue a partir del balance de masas del medio original

$$[Cu]_{TOT} = [Cu^{2+}] \cdot \alpha_{inor} + \sum [CuL_x] \quad (17)$$

Una vez obtenida la capacidad complejante del medio, como se verá posteriormente, la concentración de cobre unida a los ligandos naturales del medio puede expresarse como una función exclusivamente de la concentración de ion cúprico libre y de los parámetros de complejación del medio calculados, y por un proceso iterativo de cálculo numérico se consigue obtener $[Cu^{2+}]$ en el medio original (ver la subrutina que comienza en la línea 7000 del anexo 1).

2.3 FUNDAMENTOS DE LA VOLTAMETRÍA ANÓDICA DE REDISOLUCIÓN

En esta técnica no se realizan adiciones de ningún complejante al medio (sólo de una disolución tamponadora sin capacidad complejante alguna por el metal de estudio). Por lo tanto el balance de masas del metal en disolución corresponde al descrito para el caso anterior en el medio original.

$$[M]_{TOT} = [M'] + \sum [ML_x] \quad (18)$$

donde la concentración total de metal en disolución es igual a la suma de la concentración de metal complejoado inorgánicamente ($[M']$), y de la concentración del complejoado por los ligandos orgánicos naturales del medio ($\sum [ML_x]$).

Para cualquier metal queda definido un coeficiente alfa que describe la proporción entre las concentraciones de las especies complejadas inorgánicamente y la del ion libre, como en el caso visto del cobre.

$$[M'] = [M^{2+}] \cdot \alpha_M \quad (19)$$

dado que α_M es el coeficiente que corrige las reacciones de complejación con los ligandos inorgánicos del medio, su cálculo vendrá dado por la expresión 20.

$$\alpha_M = 1 + \sum (K_i^* \cdot [L_j]) + \sum (K_{a,i}^* / [H^+]) \quad (20)$$

donde K_i^* es la constante de estabilidad del complejo de M^{2+} con los ligandos inorgánicos del medio (L_j): Cl^- , CO_3^{2-} , $B(OH)_4^-$ y SO_4^{2-} . $K_{a,i}^*$ es la constante de acidez del M^{n+} , estas constantes son válidas a una fuerza iónica determinada y están definidas para la escala libre de protones.

Recordar que para una determinada técnica analítica se considera como fracción lábil a aquella que la técnica es capaz de estimar. En el caso de la voltametría anódica de redisolución, esta fracción la compone la cantidad de metal que se encuentre en forma inorgánica, teniendo en cuenta que, como se ha citado previamente, se han despreciado posibles aportes del metal complejado orgánicamente a la definición de lábil. Los compuestos orgánicos no permiten el cambio de estado de oxidación del metal que complejan. Por lo tanto, la fracción lábil toma la expresión:

$$[M'] = i_p / S \quad (21)$$

donde i_p es la altura de pico obtenida en el voltagrama (Amperios) y S es la sensibilidad del método (Amperios mol^{-1})

Durante la valoración metálica se estimará la cantidad de metal complejado orgánicamente mediante el balance de masas expresado previamente en la ecuación 18 y que queda en función de la fracción complejada de la forma:

$$\sum [ML_x] = [M]_{tot} - i_p / S \quad (22)$$

La concentración de metal iónico libre en disolución puede estimarse a partir del valor de $[M']$ del medio antes de realizar adiciones, y del valor del coeficiente alfa. Si no se dispone de este primer valor o no se desea utilizar por el alto error que lleva asociado, al igual que para el caso catódico puede generarse una expresión en que esta concentración sólo es función de la concentración de metal disuelto total y de los parámetros de complejación del medio. Mediante un proceso iterativo de cálculo numérico similar al mostrado en la subrutina referida en el caso anterior del anexo 1 (línea 7000) se puede obtener la concentración de $[M^{n+}]$.

2.4 OBTENCION DE CAPACIDADES COMPLEJANTES:

2.4.1 Valoraciones metálicas

Para la determinación de las capacidades complejantes de la materia orgánica disuelta de un medio en un principio se recurría a separar las distintas fracciones del

medio por métodos tales como la ultrafiltración, diálisis o cromatografía, midiendo posteriormente la cantidad presente de metal en cada fracción y en el medio original. A la fracción no complejada (la parte de metal no retenida por los sistemas citados, es decir, el que se considera libre en disolución) se la consideraba una aproximación de la cantidad de ion libre metálico.

El método más utilizado en la actualidad es una valoración del medio con el metal respecto del cual se va a calcular la capacidad complejante. Esto permite estimar no sólo la capacidad complejante, sino dar además una constante condicional de estabilidad de los complejos metal-ligando orgánico natural del medio. Mediante el uso de una técnica suficientemente sensible y selectiva se determina la especiación del metal en el medio a cada concentración añadida, a partir de la estimación de alguna de las fracciones presentes: metal libre, metal unido a los complejos orgánicos e inorgánicos del medio o ligando orgánico libre. Ejemplos de estas técnicas son las voltametrías anódica y catódica de redisolución, equilibración con MnO_2 , diálisis, equilibrio con resinas de intercambio iónico y métodos basados en indicadores biológicos. La técnica escogida y que ya ha sido ampliamente utilizada para este propósito es la voltametría catódica de redisolución (van den Berg, 1984; Donat y van den Berg, 1992; Xue y Sigg, 1990, 1993, 1995; etc) que estima la concentración de metal libre en el medio a partir del equilibrio de esta especie con un complejo orgánico artificial de características y concentración perfectamente conocidas.

Para el estudio de la adsorción sobre la superficie celular, el recurso globalmente empleado es considerar a esta superficie como una gran molécula polifuncional con múltiples tipos de puntos de enlace. Por lo tanto el estudio tanto de la complejación de metales por parte moléculas orgánicas disueltas, como la adsorción de los mismos sobre la superficie celular resulta equivalente en todo su desarrollo, y sólo variarán las unidades en que se presentarán los resultados, moles por litro de disolución para la complejación, y moles por gramo seco de alga o moles por célula para la adsorción. Estas últimas unidades mencionadas resultan muy útiles para poder comparar los resultados obtenidos en diferentes trabajos.

A continuación se detalla el proceso de obtención de capacidades complejantes para el cobre de un medio de cultivo por voltametría de redisolución catódica. Se debe tener en cuenta que todas las ecuaciones son válidas para el caso de otros metales o complejantes distintos, así como para el caso de la voltametría de redisolución anódica, si se cambia la definición de fracción lábil.

Conociendo la concentración total disuelta del metal presente en el medio previamente a la valoración, las cantidades añadidas, y, a partir de la técnica polarográfica descrita, la especiación del medio a las diversas adiciones de metal, se determinan las características complejantes del medio natural. La figura que resulta si se representa la altura de pico obtenida (que para el caso de la voltametría de redisolución catódica de adsorción es proporcional a la cantidad de metal que se halla en el medio en forma iónica libre, más el complejoado inorgánicamente, más el unido al complejante orgánico de trabajo, en este caso el catecol y para la voltametría anódica a la concentración de metal libre y complejoado inorgánicamente en el medio; ecuaciones 15 y 21), frente a la concentración de metal añadido al medio es para ambos casos del tipo mostrado en la figura 9.

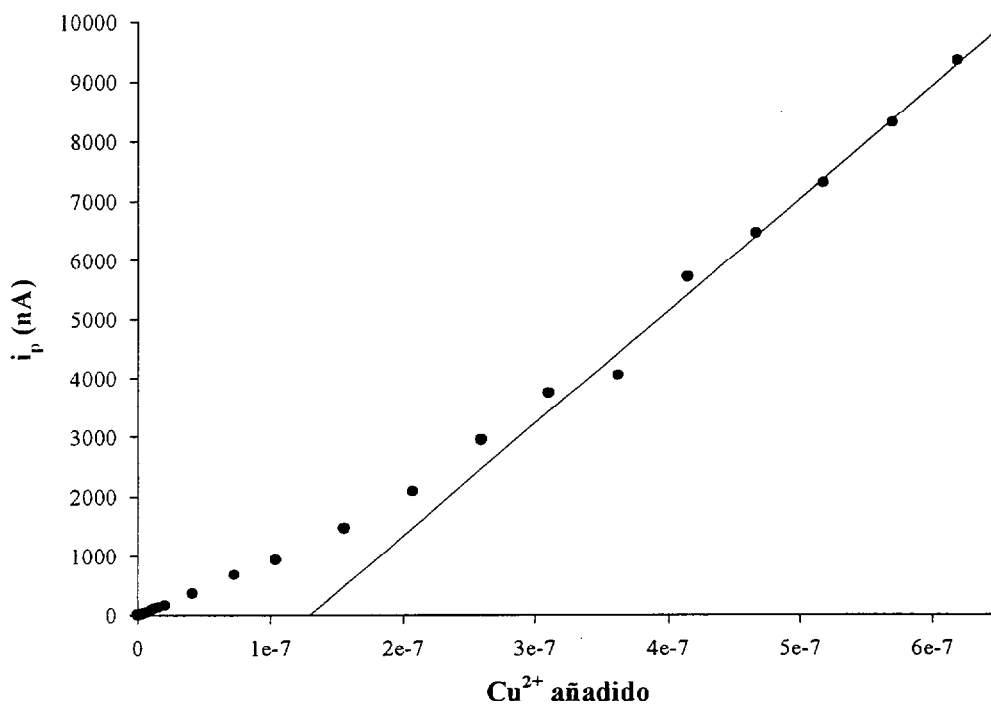


Figura 9. Muestra la altura del pico de reducción del cobre obtenido por voltametría catódica en presencia de catecol en agua de mar para sucesivas adiciones de cobre al medio.

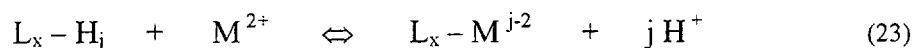
La curvatura inicial es debida a que gran parte del cobre que se aporta al medio inicialmente se compleja con ligandos naturales del medio y no puede ser detectado por la técnica polarográfica (estos compuestos naturales no son capaces de adsorberse sobre la gota de mercurio y no cambian de estado en el barrido de potencial). Pero a cantidades mayores de metal disuelto, los ligandos naturales del medio con mayor afinidad que el catecol por el metal de estudio se hallan ya complejados y los de menor afinidad desplazados por el complejante artificial y por lo tanto todo el metal que se

aporta al medio se compleja con el catecol presente (el cual ha sido añadido en gran exceso respecto de la concentración de ligandos naturales del medio, unos dos órdenes de magnitud). En esta situación la altura de pico que se obtiene es proporcional a la concentración de metal añadido.

La misma representación, en el caso de agua de mar irradiada con UV (en la que toda la materia orgánica ha resultado oxidada y por lo tanto el medio no es capaz de complejar orgánicamente a los metales), debe dar una línea recta paralela a la regresión lineal que aparece en la figura, y que equivale a la sensibilidad del método.

Una simple extrapolación de la zona lineal de la función obtenida hasta el eje de abscisas da una aproximación a la concentración de metal que es capaz de complejar el medio, pero este procedimiento da lugar a errores muy significativos en la determinación de capacidades complejantes, como describe Ruzic (Ruzic, 1996) para el caso de formación de complejos de no muy alta afinidad, ya que en esta situación la curva converge a su zona asintótica a medida que avanza la valoración de forma muy suave.

La solución adoptada en este tipo de estudios es considerar un modelo que sólo contempla la formación de complejos simples entre el metal disuelto y los complejos naturales del medio, con una estequiometría del tipo 1:1.



La ecuación refleja la complejación de un ion metálico sobre un ligando (L_x) que sufre para ello una desprotonación, pero también puede suceder que según el pH del medio ese grupo se encuentre más o menos protonado, o que lo que se verifique sea una reacción de intercambio iónico si el metal, al átomo que sustituye, es un catión mayoritario del medio (como Na^+ , Ca^{2+} o Mg^{2+} para el agua de mar) u otro metal traza diferente. La naturaleza de estos ligandos no es bien conocida. Se sabe que los ácidos fúlvicos y húmicos procedentes de la degradación de la materia orgánica complejan fuertemente al cobre (Tipping y Hurley, 1992) y que ligandos orgánicos de origen planctónico y de muy distinto peso molecular como polisacáridos, polifenoles, aminoácidos, polipéptidos y proteínas también juegan un papel (Langston y Bryan, 1984). Deben desarrollarse técnicas analíticas como HPLC acoplada con FTIR y espectroscopía de masas para determinar individualmente los compuestos extracelulares.

La constante de estabilidad de la anterior ecuación es igual a:

$$K_{ML} = \frac{[L_x - M] \cdot [H^+]^b}{[L_x - H_j] \cdot [M^{2+}]} \quad (24)$$

Para hacer posible un tratamiento de los datos de la valoración metálica se define a partir de la ecuación antes reseñada una constante de estabilidad condicional para la reacción de unión del metal libre en forma iónica con los ligandos naturales, que para el caso del cobre toma la forma:

$$K'_{CuL_x} = [CuL_x] / ([Cu^{2+}][L_x]) \quad (25)$$

$[L_x]$ es la concentración del ligando natural (L_x) no complejada por el Cu^{2+} .

El valor de K'_{CuL_x} depende de la composición de la disolución (pH, concentración de otros cationes, etc.) y es por tanto denominada constante de estabilidad condicional.

En una primera aproximación al cálculo de capacidades complejantes se considera al conjunto de los ligandos del medio (o a los de la superficie celular), como un conjunto de puntos de enlace homogéneo. Esto permite el cálculo de una capacidad complejante y una constante condicional de estabilidad. Naturalmente el caso dista de la realidad, ya que la naturaleza de las moléculas orgánicas presentes en medios acuáticos con afinidad por unirse a metales traza es muy diversa, desde ácidos fúlvicos y húmicos a exudados algales con varios grupos funcionales muy distintos. Pero esta enorme simplificación en algún caso se ajusta al comportamiento observado en la valoración del medio. De este modo el valor de la constante de estabilidad condicional será un valor ponderado de las constantes de los ligandos presentes, y permitirá en igualdad de condiciones experimentales la comparación entre medios.

2.4.2 Isoterma de Langmuir

A partir de la definición de K' y de la ley de masas aplicada al ligando:

$$[L_x]_{TOT} = [L_x] + [CuL_x] \quad (26)$$

sustituyendo en la definición de la constante de estabilidad del cobre con los ligandos naturales (ecuación 25), se obtiene:

$$K' = \frac{[CuL_x]}{([L_x]_{TOT} - [CuL_x]) \cdot [Cu^{2+}]} \quad (27)$$

$$K' \cdot [L_x]_{TOT} \cdot [Cu^{2+}] - K' \cdot [CuL_x] \cdot [Cu^{2+}] = [CuL_x] \quad (28)$$

$$[CuL_x] = \frac{K' \cdot [L_x]_{TOT} \cdot [Cu^{2+}]}{1 + K' \cdot [Cu^{2+}]} \quad (29)$$

A esta última expresión se la conoce como isoterma de Langmuir. Matemáticamente es equivalente a la ecuación de Michaelis-Menten usada para cinéticas enzimáticas. En la figura 10 se presenta un ejemplo de representación de esta ecuación para una muestra de agua de mar:

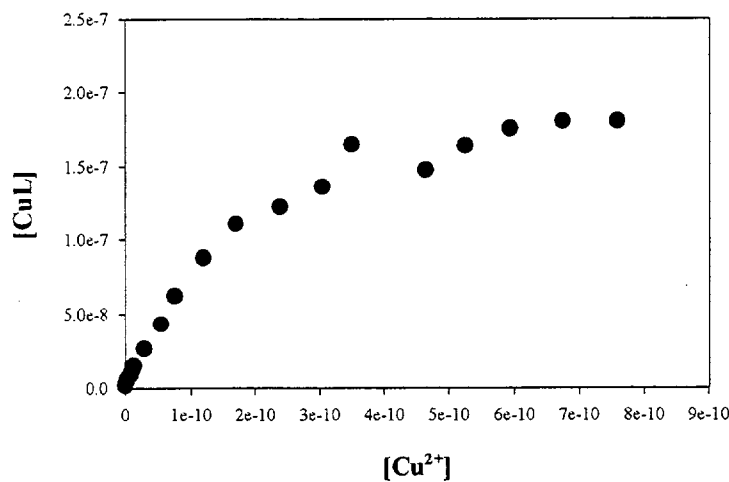


Figura 10. Isoterma de Langmuir para los datos presentados en la figura 9.

Como se puede contemplar corresponde a una curva de saturación. El valor al que tiende equivale a la concentración en la que por hallarse todos los ligandos naturales del medio complejados, ya no retienen las adiciones de metal y es el complejante añadido (y lábil para el caso de voltametría catódica de redisolución) el que se une al metal disuelto.

Mediante un ajuste no lineal por mínimos cuadrados pueden hallarse la capacidad complejante de los ligandos del medio ($[L_x]_{TOT}$), y la constante de estabilidad condicional de los mismos (K'). Aunque para facilitar esta tarea varias linealizaciones de los datos han sido propuestas por algunos autores:

2.4.2.1 LINEALIZACION DE SCATCHARD

Propuesta inicialmente por G. Scatchard en el estudio de complejación de iones y proteínas (Scatchard, 1949; Scatchard *et al.*, 1957). Partiendo de la isoterma de Langmuir, puede obtenerse la siguiente linealización:

$$[CuL_x] = \frac{K' \cdot [L_x] \cdot [Cu^{2+}]}{1 + K' \cdot [Cu^{2+}]} \quad (30)$$

$$[CuL_x] + K' \cdot [Cu^{2+}] \cdot [CuL_x] = K' \cdot [L_x] \cdot [Cu^{2+}] \quad (31)$$

$$[CuL_x] / [Cu^{2+}] = K' \cdot (-[CuL_x] + [L_x]) \quad (32)$$

Una representación de la proporción entre metal complejoado y metal iónico libre frente a la concentración del metal complejoado va a dar una recta cuya pendiente es $-K'$ y que además cumple que el valor de esta recta en su corte con el eje de abscisas es igual a la concentración de ligandos del medio multiplicado por el valor de K' .

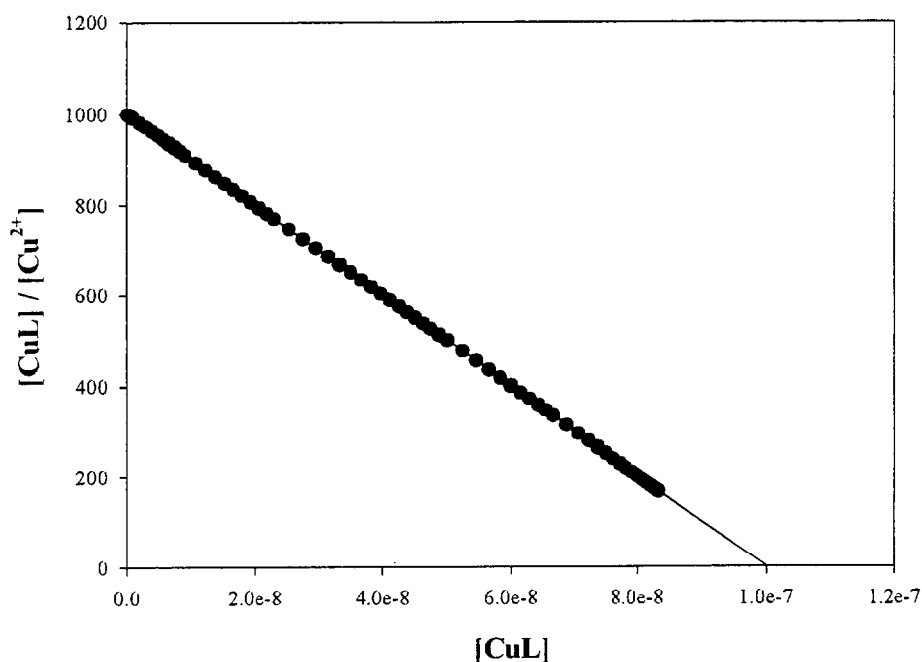


Figura 11. Linealización de Scatchard de una valoración metálica ideal. Datos generados para una capacidad complejante de concentración de ligando = 10^{-7} M y $\log K' = 10$

2.4.2.2 LINEALIZACION DE VAN DEN BERG-RUZIC

Método propuesto primeramente por van den Berg y Ruzic para experimentos de determinación de capacidades complejantes por equilibración con MnO_2 (van den Berg 1979, van den Berg y Kramer 1979; Ruzic 1982, 1984). A partir de la ya descrita isoterma de Langmuir para una valoración metálica (con cobre por ejemplo) de un medio complejante:

$$[CuL_x] = \frac{K' \cdot [L_x] \cdot [Cu^{2+}]}{1 + K' \cdot [Cu^{2+}]} \quad (33)$$

Se puede para su más fácil resolución, linealizar de la siguiente forma:

$$1 + K' \cdot [Cu^{2+}] = \frac{K' \cdot [L_x] \cdot [Cu^{2+}]}{[CuL_x]} \quad (34)$$

$$\frac{[Cu^{2+}]}{[CuL_x]} = \frac{[Cu^{2+}]}{[L_x]} + \frac{1}{K'_{CuL_x} \cdot [L_x]} \quad (35)$$

Los dos parámetros que definen la complejación del medio se determinan construyendo un gráfico de $[Cu^{2+}]/[CuL_x]$ como función de $[Cu^{2+}]$.

Sustituyendo en la última ecuación las concentraciones por los parámetros obtenidos en los voltagramas según la voltametría catódica de redisolución, ésta queda de la forma

$$\frac{i_p}{(S \cdot [Cu]_{TOT} - i_p)} = \frac{i_p}{(S \cdot [L_x])} + \frac{\alpha'}{K'_{CuL_x} \cdot [L_x]} \quad (36)$$

Valores para $[L_x]$ y K'_{CuL_x} pueden ser obtenidos a partir de esta ecuación, mediante la representación de $i_p/(S \cdot [Cu]_{TOT} - i_p)$ frente a los valores de i_p/S , como puede observarse en la figura 12. La inversa de la pendiente es $[L_x]$ y la ordenada en el origen permite conocer K'_{CuL_x} .

El coeficiente alfa que aparece en la última expresión corresponde al coeficiente alfa general ($\alpha' = \alpha_{Cu} + \alpha_{catecol}$) en el caso de estar trabajando con voltametría catódica de redisolución. Si la técnica utilizada es la voltametría anódica de redisolución, el valor de este coeficiente alfa es el del cobre inorgánico (α_{Cu}).

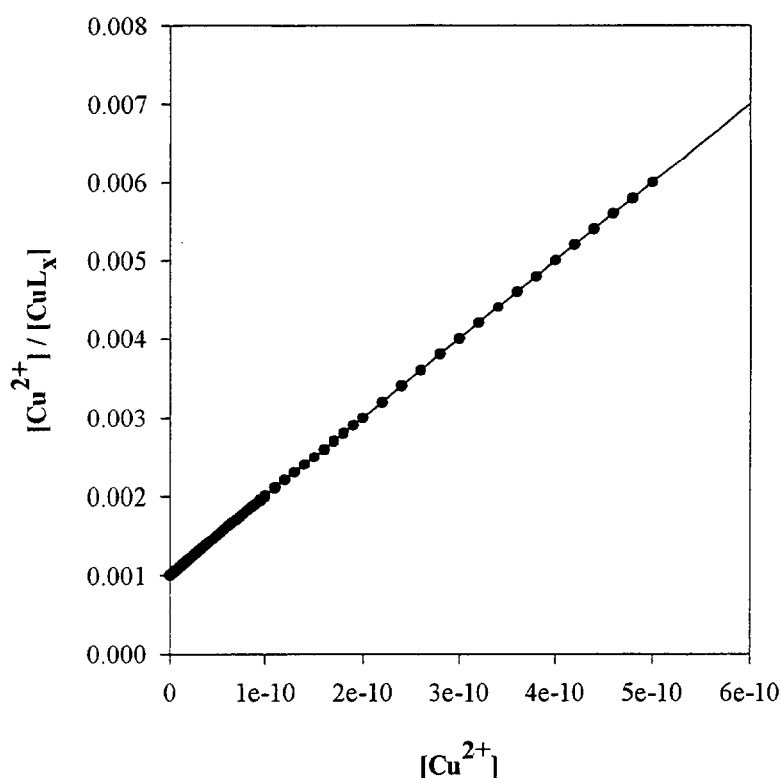


Figura 12. Linealización de van den Berg-Ruzic de una valoración metálica ideal. Datos generados para una capacidad complejante de concentración de ligando = 10^{-7} M y $\log K' = 10$.

2.4.3 Ventanas espectrales

Ambas figuras utilizan la concentración de metal unido a los ligandos naturales. Hay que recordar que esta cantidad para un mismo medio depende de la concentración de catecol utilizada en el proceso de obtención del polarograma. Una mayor cantidad desplazará a aquellos complejantes naturales que complejan al cobre de manera más débil, permaneciendo inalterables los de constante de estabilidad condicional mayor. Por lo tanto un aumento en el valor del coeficiente- α del catecol provoca que el valor de la constante de estabilidad promediada estimada aumente.

También resulta importante la concentración inicial de metal disuelto en el medio, ya que si la concentración de ligando es mucho menor que la de metal se hallará completamente saturado y no participará en el equilibrio ante las adiciones de metal. A este concepto se le conoce como ventana espectral, y se refiere a las características de los ligandos que una determinada técnica puede estudiar en unas condiciones fijadas.

De igual forma que para el resto de las especies complejantes, se puede definir un coeficiente- α para la relación entre la concentración libre de metal en el medio (el cobre

en el caso que refleja la ecuación 37) y los distintos tipos de ligandos naturales (L_i) presentes en el medio y complejados por el metal.

$$\alpha_{CuL} = \frac{[CuL]}{[Cu^{2+}]} = \frac{\sum [CuL_i]}{[Cu^{2+}]} = \sum K_i \cdot [L_i] \quad (37)$$

Este coeficiente es función de la concentración del ligando natural, de su constante de estabilidad por el metal, y del cobre total disuelto en el medio. En el caso de trabajar en voltametría catódica de redisolución, es función además de la concentración de ligando artificial añadida al medio

Para las técnicas utilizadas en este trabajo para determinar capacidades complejantes se definen de la siguiente manera sus ventanas espectrales:

- Voltametría anódica: esta técnica no es capaz de ofrecer estimaciones de aquellos complejos de menor α_{CuL} que la que presenta el cobre con los ligandos inorgánicos del medio. Como estos van a estar siempre presentes en exceso una adición de cobre se complejará preferentemente con estos ligandos inorgánicos. Por otro lado el límite de sensibilidad marca el límite de los ligandos de mayor constante de estabilidad. Si no se puede estimar la cantidad de metal libre en el medio a una determinada concentración total de metal, los tipos de ligandos que ya se hallen saturados no entrarán en equilibrio con las sucesivas adiciones de metal, y si bien su concentración sí es tenida en cuenta, no su afinidad por el metal, y el valor de K' es subestimado. Debido a la poca sensibilidad del método, la concentración límite estimable es más grande que en otros métodos, y la constante de complejación condicional es mucho menor de la obtenida por el resto de los métodos.

- Voltametría catódica: también el límite de sensibilidad supone el límite de los compuestos de mayor α_{CuL} que pueden medirse, éste será función de la concentración de ligando artificial añadido (catecol). Por el otro extremo, aquellos compuestos de α_{CuL} menor que la que presenta el ligando artificial añadido, como éste es añadido siempre en exceso respecto a la concentración de los ligandos naturales, son desplazados durante la fase de equilibrio de la valoración y no se tienen en cuenta en el cálculo de CuL durante la valoración.

En general se considera que la fracción de ligandos que cualquiera de las dos técnicas puede estimar es aquella cuyo valor de α_{CuL} se encuentra un orden de magnitud por encima y por debajo del valor de $\alpha_{Cu\text{catecol}}$, siendo este valor siempre el centro de la ventana espectral ($\alpha_{Cu\text{inorgánico}}$ para el caso de voltametría anódica) (van den Berg *et al.*,

1990). Esto implica que sea cual sea el coeficiente- α seleccionado en función de la concentración de catecol y pH prefijados, habrá fracciones de moléculas disueltas con capacidad para complejar al metal de estudio, y que no intervendrán en la determinación de la capacidad complejante del medio.

De igual modo se conoce que dado que aquellos complejos de mayor α_{CuL} se encuentran en medios naturales en menores concentraciones, el desplazar a mayores valores la ventana espectral (subiendo $\alpha_{\text{Cu catecol}}$), supone el obtener valores menores de la capacidad complejante y mayores de la constante de estabilidad asociada a los mismos (van den Berg *et al.*, 1990). Por lo tanto, si como es nuestro caso se desean comparar capacidades complejantes entre distintos medios, se debe trabajar dentro de la misma ventana espectral, o ser consciente de que no se está estimando la misma fracción.

De hecho, van den Berg y Donat (1992) encuentran una relación lineal entre $\log \alpha_{\text{Cu complejante artificial}}$ y $\log \alpha_{\text{CuL}}$ para estudios realizados con medios de diversa, diferentes complejantes artificiales y con distintos metales. Esto debe significar que la variedad de complejantes naturales en disolución es muy grande y que se hallan formando casi un espectro continuo de valores de la constante de estabilidad. El que funcione para diversos metales en la misma relación puede hacer suponer que una buena parte de la materia complejante orgánica no sea específica y pueda complejar cualquiera de los metales traza presentes.

En general en los trabajos pioneros de determinación de capacidades complejantes en medios naturales con catecol (van den Berg, 84; Xue y Sigg, 1990) se aconseja tomar una concentración de complejante tal que ésta genere la mitad de la máxima señal posible. Pero un valor muy alto de $\alpha_{\text{Cu catecol}}$ hace que una importante fracción de materia complejante de no muy alto valor de constante de estabilidad sea ignorada. Quizás esto en agua oceánica de una concentración total de cobre subnanomolar, en que la especiación se ve dominada por completo, por complejantes naturales de muy alta constante de estabilidad y escasa concentración (>99% según Coale y Bruland, 1990), sea deseable. Pero las medidas en cultivos parten de concentraciones algo mayores de cobre y como se verá reflejado la existencia de complejantes de baja constante de estabilidad adquieren un papel importante (20-50% de la especiación del cobre en este trabajo). Miller y Bruland (1997) apuntan que es deseable utilizar valores bajos de $\alpha_{\text{Cu catecol}}$, ya que mientras a estos valores se tiene una buena descripción de los ligandos

presentes de baja constante de estabilidad condicional, la concentración de los ligandos de mayor K' es estimada aceptablemente si se desarrolla un método con un buen límite de sensibilidad, a pesar de que K' queda ligeramente subestimada. En cambio, a altos valores de $\alpha_{\text{Cu}^{2+}}^{\text{Cu}^{2+}}$ la presencia de ligandos de baja K' queda totalmente oculta para el método. Es necesario por lo tanto en los experimentos de complejación llegar a un compromiso entre sensibilidad y toma de una ventana espectral adecuada y desplazada a valores bajos a ser posible. Por otro lado, y para una mejor caracterización, es recomendable llevar a cabo la determinación de la capacidad complejante de un mismo medio con distintas ventanas espectrales para tener un esbozo de la complejación total del medio.

A pesar de resultar algebraicamente equivalentes las linealizaciones presentadas previamente, se puede observar en las figuras 11 y 12 que para el caso propuesto por Scatchard, los valores hallados a menor concentración de metal poseen más peso estadístico comparado con el resto de valores de la valoración. La linealización de van den Berg/Ruzic otorga más peso estadístico a los valores obtenidos a mayor concentración de metal. Esto se debe a que la representación de Scatchard se basa en representar el valor de la concentración de metal complejado en el eje de abscisas. Esta cantidad al comienzo de la valoración aumenta considerablemente, ya que prácticamente todo el metal añadido al medio va a resultar complejado por los ligandos naturales de la muestra, mientras que al final de la valoración, los ligandos naturales del medio se hallan completamente valorados por el metal añadido, y sucesivas adiciones de metal suponen un incremento mínimo de la concentración de metal complejado (incluso por debajo del error asociado al método analítico). La representación de van den Berg-Ruzic, en cambio, se basa en la representación en el eje de abscisas de la concentración de ion metálico libre en disolución (directamente proporcional al cobre lábil estimado). Al comienzo de la valoración, el metal añadido se une a los ligandos naturales del medio y la concentración de ion libre en disolución apenas varía, por el contrario, en la zona final de la valoración, cuando los ligandos naturales del medio se encuentran saturados, prácticamente la totalidad del metal añadido se incorpora a la fracción lábil al método voltamétrico.

No existe un criterio definido en el caso de valores reales (con desviaciones del caso ideal por los errores analíticos que se presentan), de qué representación es la más útil para este proceso. Según S.C. Apte los resultados que se obtienen por la linealización de Scatchard son menos consistentes, ya que se concede mayor

importancia a los puntos sujetos a mayores errores relativos (Apte *et al.*, 1988). Pero un trabajo más reciente de Miller y Bruland (1997) trabajando con datos artificiales con errores prefijados, muestra que el error que se produce en el caso de considerar un solo tipo de ligando depende de la relación entre los coeficientes- α del complejante artificial escogido y de los ligandos naturales.

Se considera un medio con un ligando en disolución con un valor de α_{CuL} fijado. Si se toma un valor de $\alpha_{\text{Cu catecol}}$ mucho mayor que éste, el error analítico se acumula en los últimos puntos de la valoración ($[\text{Cu}]_{\text{tot}} \approx [\text{Cu cat}]$) y por lo tanto la representación de van den Berg se verá más perjudicada en su fiabilidad. En el caso contrario sucede que la representación de Scatchard es la más perjudicada por la distribución de errores debido al distinto peso estadístico de los datos de la valoración (el bajo valor de $\alpha_{\text{Cu catecol}}$ provoca un bajo límite de sensibilidad que afecta a las estimaciones de las pequeñas adiciones iniciales de cobre). Por lo tanto no parece ser una linealización más precisa que la otra en el cálculo de los parámetros de complejación de un sistema considerado homogéneo.

2.4.4 Medios naturales

Pero para el caso de medidas de complejación de metales en medios naturales (agua de mar de cualquier procedencia, agua dulce de lagos o ríos) no se obtiene un gráfico lineal como los antes mostrados, sino que lo que se presenta es una evidente curvatura en la distribución de los puntos de la valoración metálica del medio. El caso del cobre es muy evidente y es el más trabajado (van den Berg, 1984; Coale y Bruland, 1988, 1990). Para el hierro han aparecido recientemente estudios mostrando esa misma curvatura en la distribución (Rue y Bruland, 1995). Este fenómeno es debido a la presencia de varias clases de ligandos para el metal con muy distinta afinidad para el mismo, y de forma lógica el metal se unirá en primer lugar al comenzar la valoración a aquellas moléculas complejantes por las que siente una mayor afinidad, cuando estos ligandos de mayor constante de estabilidad condicional se hallan saturados, el cobre que continúa añadiéndose al medio se compleja a otro tipo de ligandos de menor afinidad por éste. Esto provoca un cambio de pendiente en las linealizaciones, ya que la proporción entre metal complejado y metal iónico libre ($[\text{CuL}]/[\text{Cu}^{2+}]$), no crecerá del mismo modo ante incrementos en la concentración de metal iónico libre originadas por la mayor concentración total de metal.

El resultado en ambos gráficos de linealización es una curva con dos zonas aproximadamente lineales, de las que la más cercana al origen pertenece a la zona de predominio del grupo de ligandos de mayor constante de estabilidad condicional, y la otra a la de ligandos de menor afinidad por el metal. Para el tratamiento de los datos se suele considerar al conjunto de los ligandos naturales del medio (o de la pared celular) como un sistema heterogéneo de un número finito de tipos de ligandos distintos. Tomando sólo dos tipos de ligandos, el comportamiento que describe la isoterma de Langmuir calculada y el que presenta la mayoría de los medios naturales se asemejan enormemente, por lo que de forma generalizada se emplea para el estudio de la capacidad complejante del cobre por parte de medios acuáticos un modelo de complejación de estequiometría 1:1 heterogéneo, considerando dos especies de ligandos presentes. Respecto al razonamiento hecho anteriormente sobre la heterogeneidad de los ligandos del medio, es válido de la misma forma y hay que tener en cuenta que las dos constantes que se consigan serán valores ponderados de las afinidades de los distintos ligandos presentes.

El estudio mediante linealizaciones de la complejación queda de la siguiente manera:

2.4.4.1 REPRESENTACION DE SCATCHARD

Sposito se fundamenta en el teorema de la interpolación para exponer que cualquier reacción de adsorción en la cual el coeficiente de distribución (concentración adsorbida respecto a la libre) es una función finita y decreciente de la cantidad adsorbida y se extrapola a cero a un valor finito de esta cantidad, puede ser representada matemáticamente por una ecuación de Langmuir de “dos superficies” (o dos tipos de ligandos en nuestro caso) (Sposito, 1982).

$$q(c) = \frac{b_1 \cdot K_1 \cdot c}{1 + K_1 \cdot c} + \frac{b_2 \cdot K_2 \cdot c}{1 + K_2 \cdot c} \quad (38)$$

siendo $q(c)$ la cantidad de un ion reactivo adsorbida cuando la cantidad del ion en la fase acuosa es c . b_1 , b_2 , K_1 y K_2 son parámetros constantes.

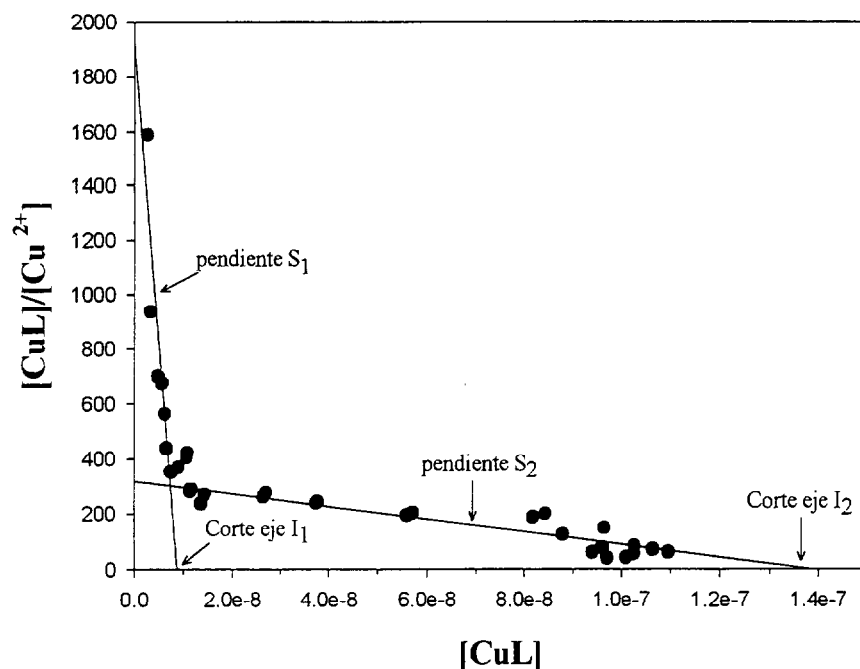


Figura 13. Ejemplo de representación de Scatchard tomado de datos procedentes de este trabajo. Las dos rectas son regresiones lineales de los puntos donde actúan predominantemente una u otra clase de ligandos. Estudio por voltametría catódica de redisolución. Adiciones de cobre a la muestra en el intervalo: 1-350 nM. [catecol]= 2×10^{-5} M. pH= 7.8

Para el caso que nos ocupa, la ecuación queda de la forma:

$$[CuL] = \frac{C_{L_1} \cdot K_1 \cdot [Cu^{2+}]}{1 + K_1 \cdot [Cu^{2+}]} + \frac{C_{L_2} \cdot K_2 \cdot [Cu^{2+}]}{1 + K_2 \cdot [Cu^{2+}]} \quad (39)$$

esta ecuación se resuelve figuramente mediante una representación equivalente a la descrita para un solo tipo de ligando. Es decir, q frente al llamado coeficiente de distribución $K_d \equiv q/c$. En el caso de la complejación de Cu en el agua de mar el resultado es representar $[CuL]$ frente a $[CuL]/[Cu^{2+}]$.

La determinación de los cuatro parámetros que definen la complejación del medio se realiza a partir de las ecuaciones de las rectas obtenidas, de tal forma que la recta de mayor pendiente ofrece las características del ligando de mayor constante de estabilidad condicional y la otra del total de la complejación del medio. Los cuatro parámetros se obtienen de la siguiente forma (en la figura 13 aparece el significado de I y S):

$C_{L1} = I_1$	$C_{L2} = I_2 - I_1$
$K_1 = [S_1]$	$K_2 = [S_2]$



La transformada de Scatchard de los datos presenta el inconveniente de que si se ha llegado a una saturación efectiva de los ligandos del medio, como el eje de abscisas es precisamente la concentración de cobre complejado, los valores tienden a formar una línea vertical en el final del gráfico que dificulta una buena obtención de los parámetros de L_2 . Esto se debe al escaso peso estadístico que toman estos datos finales de la valoración en comparación con los demás, y al tipo de representación. La figura 13 resulta un buen ejemplo de lo referido.

2.4.4.2 REPRESENTACION DE VAN DEN BERG/RUZIC

El aspecto de esta linealización es el mostrado en la figura:

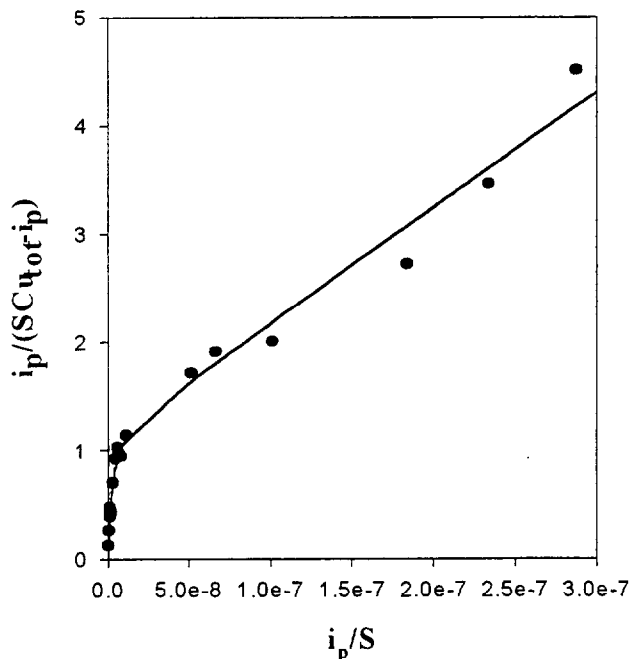


Figura 14. Ejemplo tomado de los experimentos que forman parte de este trabajo, de gráfico que muestra una linealización de van den Berg-Ruzic de una valoración de un medio por adición de cobre. Adiciones de cobre a la muestra en el intervalo: 1-350 nM. [catecol]= 2×10^{-5} M. pH= 7.8

Al igual que en la otra linealización pueden obtenerse los cuatro parámetros de complejación de las dos rectas presentadas, siendo las constantes de estabilidad condicional obtenidas a partir de los cortes de las dos rectas con el eje OY, y las capacidades complejantes las inversas de las dos pendientes, restando en el caso de C_{L2} , el valor obtenido para C_{L1} .

La distribución de errores durante la valoración es la misma que la referida para el caso homogéneo. Un alto valor de $\alpha_{\text{Cu catecol}}$, provocará un aumento del error asociado a los últimos puntos de la valoración, es decir, los valores de K_{L2} y $[L_2]$ se hallarán sometidos a una mayor incertidumbre. Para el caso de elegir un valor de $\alpha_{\text{Cu catecol}}$ pequeño la estimación de K_{L1} y $[L_1]$ será la que se vea afectada (en Miller y Bruland, 1995).

2.4.5 Obtención de los parámetros de complejación de forma independiente

Las soluciones figuras presentadas son aproximaciones a la verdadera determinación de las capacidades complejantes de un medio. Las dos rectas obtenidas a partir de los datos no describen el comportamiento del medio durante toda la valoración.

Para tener una idea de lo válida que resulta esta resolución, se construye una serie de datos artificiales de una valoración metálica de un medio y se intenta obtener su capacidad complejante con los métodos descritos.

Se generan estos valores artificiales de la siguiente forma. Se supone un medio en el que existen dos clases de ligandos todos iguales entre sí para una misma clase y por lo tanto en disolución sólo habrá ligandos en concentraciones conocidas y con constantes de estabilidad condicional iguales para todas las moléculas de un mismo grupo y de valor predeterminado. Las características seleccionadas para estos ligandos se muestran en la tabla IV.

	L_1	L_2
Capacidades Complejantes (* 10^8 M)	2	10
$\log K'$	12	10

Tabla IV.

Las variables escogidas son similares a valores reflejados en la bibliografía. A continuación se describe el proceso de generación de estos valores ideales para el caso de trabajar con voltametría catódica de redisolución:

- Se supone que en el medio existe una concentración total de Cu de forma que el valor de cobre iónico libre que queda en disolución es de $5e-14$ ($pCu=13.3$), valor muy próximo al de la literatura.

- Se calcula a partir de la isoterma de Langmuir para dos tipos de ligandos la concentración de cobre complejado a los ligandos naturales del medio que existirá si en el medio se halla la concentración de $[Cu^{2+}]$ tomada, sustituyendo los valores de capacidad complejante y constante de estabilidad condicional fijados.

$$[CuL] = \frac{C_{L_1} \cdot K_1 \cdot [Cu^{2+}]}{1 + K_1 \cdot [Cu^{2+}]} + \frac{C_{L_2} \cdot K_2 \cdot [Cu^{2+}]}{1 + K_2 \cdot [Cu^{2+}]} \quad (40)$$

el valor resultante es de 1.0024 nM.

- Si se considera que se ha estado trabajando en un medio a pH de 7.8 y con una concentración de catecol de 5×10^{-5} (valores aproximados a los utilizados por diversos autores), el valor del coeficiente α del cobre con el catecol es de 1677. De la misma forma se considera que los parámetros de frecuencia y altura de pulso del barrido de potencial en onda cuadrada efectuado en la obtención del polarograma ha permitido obtener una sensibilidad de 10 nA/nM. De esta forma y partiendo del hecho de que $[Cu^{2+}] = i_p / S\alpha'$, se calcula el valor de altura de pico (i_p) que se obtendría en un supuesto análisis de esta muestra ideal. El resultado es de 0.8385 nA. Y a partir de esto, se calcula el dato de cobre lábil (que corresponde a la suma de las concentraciones de cobre-catecol y cobre inorgánico) como $Cu_{l\acute{a}bil} = i_p / S$, (8.385×10^{-11} M).
- Por último, al disponer de los valores de cobre lábil y cobre complejado, se calcula el cobre total disuelto presente en la muestra como la suma de ambos. El resultado es 1.0862 nM.

A partir de este proceso se genera una serie de valores de $[Cu^{2+}]$ y se construye una valoración de este medio ideal y sus correspondientes linealizaciones para comprobar la validez de los ajustes sugeridos. Los resultados se muestran en la figura 15.

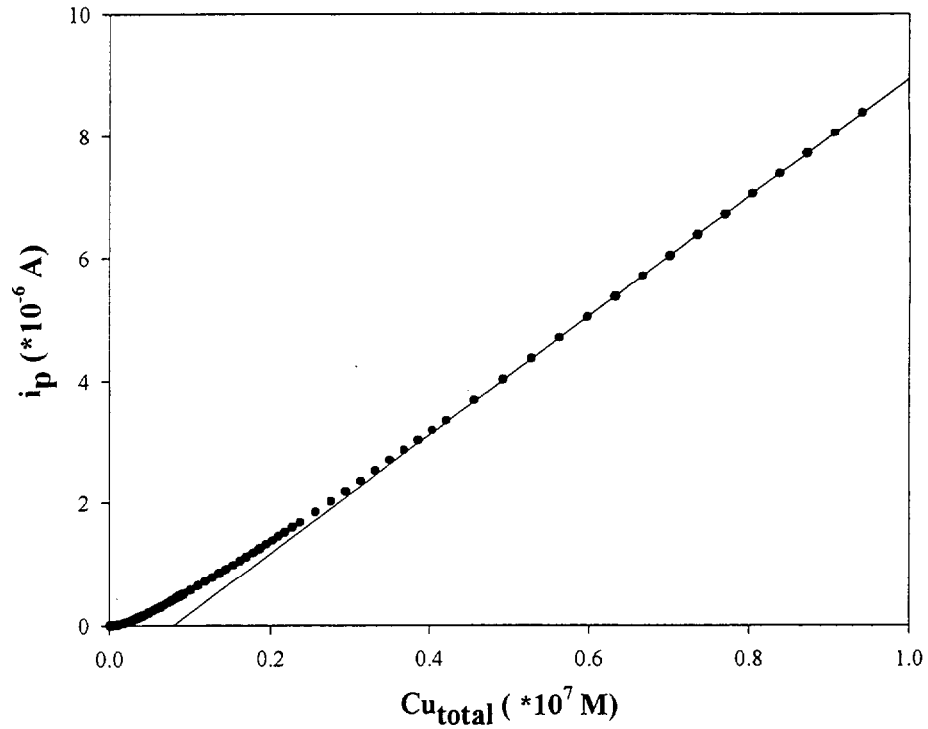


Figura 15. Valoración cúprica teórica de un medio de características complejantes como las referidas en la tabla IV. Sensibilidad del método = 10 nA nM^{-1} .

Las linealizaciones resultantes son las expuestas en las figuras 16 y 17:

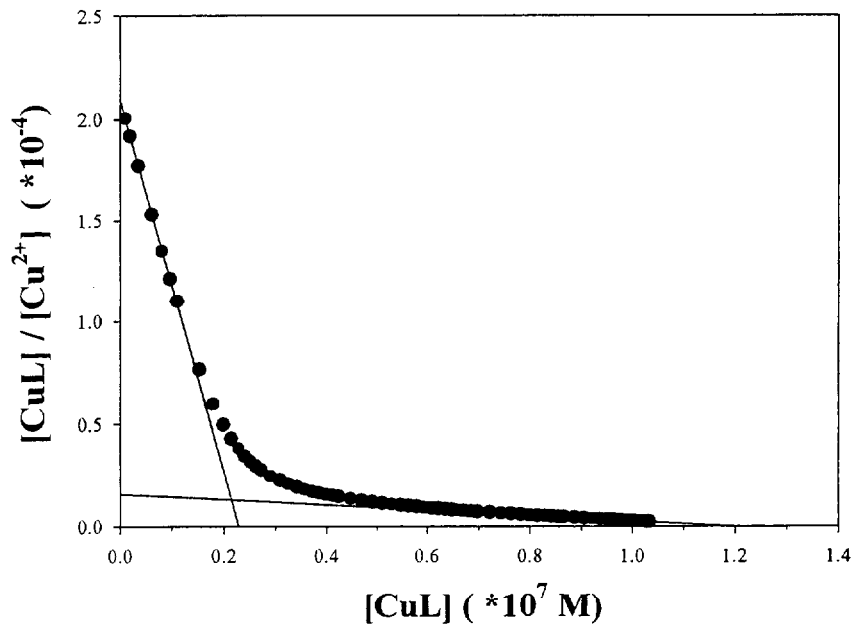


Figura 16. Representación de Scatchard de la valoración metálica presentada en la figura 15.

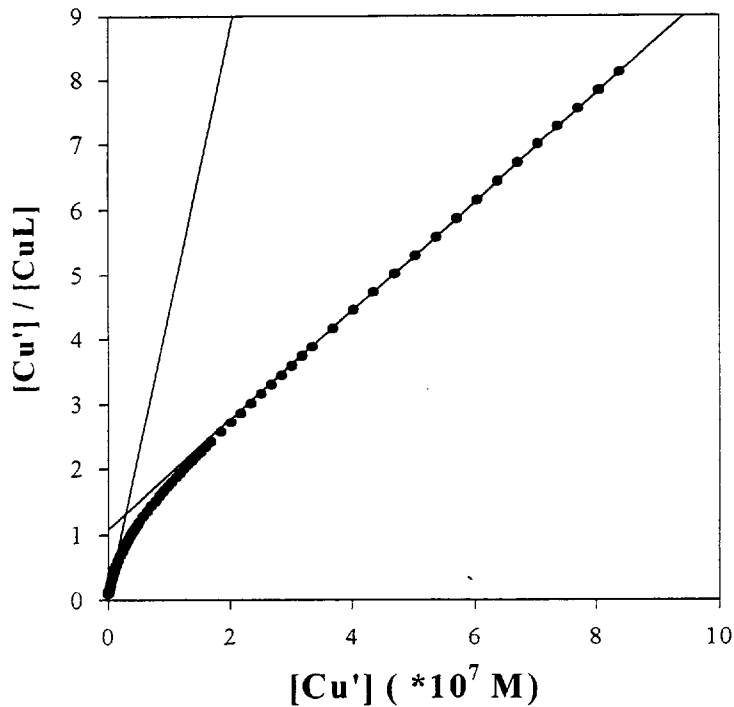


Figura 17. Representación de van den Berg-Ruzic de la valoración metálica presentada en la figura 15.

Los valores que resultan de ambas linealizaciones (son algebraicamente equivalentes y por tanto arrojan el mismo resultado en ausencia de errores analíticos) en el caso de tomar los seis primeros y los seis últimos datos, son los que aparecen en la tabla V.

En cualquier punto de la valoración alguna cantidad de metal va a hallarse complejado con cada uno de los dos ligandos (incluso a muy bajas concentraciones de metal, alguna pequeña fracción se hallará complejada con el ligando de tipo 2). Esto hace que cuando se considera que en una zona predomina un solo tipo de ligando y se considera la concentración de metal complejado por ese tipo de ligando igual a la concentración calculada total de metal

	L ₁	L ₂
Capacidades Complejantes (* 10⁸ M)	2.28 (+14%)	9.64 (-3.6%)
log K'	11.96 (-8.8%)	10.112 (+29.4%)

Tabla V. Valores de los parámetros de complejación obtenidos figuramente de la serie de datos artificiales referida. Entre paréntesis la variación porcentual respecto de los valores a partir de los que se ha generado la serie de datos de la valoración metálica

complejado, no se tenga en cuenta la cantidad unida al otro tipo y se sobrestimen las concentraciones empleadas en las transformadas. Otra consecuencia es que las soluciones de los parámetros de complejación de ambos ligandos no son independientes de entre sí, y el valor de uno afecta al otro haciendo que los valores de constante de

estabilidad condicional sean intermedios a los verdaderos. Lo mismo sucede para las capacidades complejantes de ambos ligandos.

Van den Berg ya apunta que la ecuación a resolver para hallar la solución de este problema es la siguiente (van den Berg 1982,1983):

$$\frac{[Cu^{2+}]}{([CuL_1] + [CuL_2])} = \frac{[Cu^{2+}]}{([L_1] + [L_2])} + \frac{\left(\frac{[CuL_1]}{K'_{CuL_1}} + \frac{[CuL_2]}{K'_{CuL_2}} \right)}{([CuL_1] + [CuL_2]) \cdot ([L_1] + [L_2])} \quad (41)$$

Esta ecuación no puede ser resuelta de forma inmediata ya que las concentraciones de CuL_1 y CuL_2 no se pueden conocer por separado. Sin embargo, van den Berg (1984) propone basándose en el hecho de que esta figura curva de la linealización de la isoterma de Langmuir ofrece dos zonas aproximadamente rectas en las cuales los complejos formados por el cobre y uno de los tipos de ligandos del medio son completamente predominantes frente al otro tipo, el trabajar sólo con estos puntos de predominancia de un solo tipo de ligando y eliminar en esos puntos mediante un proceso iterativo y estimaciones sucesivamente refinadas, la concentración del otro ligando. Los pasos a seguir son:

Con los datos correspondientes a bajas concentraciones de cobre, donde la complejación por parte del ligando de mayor afinidad por el cobre es mayoritaria, en una representación de van den Berg/Ruzic, se obtiene la recta a la que se aproximan estos primeros puntos. Esta resulta ser una estimación inicial de la capacidad complejante de este ligando ($[L_1]_{TOT}$), y de su constante de estabilidad condicional (K'_{CuL_1}). Para calcular la contribución de este ligando a la complejación total, se opera de la siguiente forma:

$$[L_1]_{TOT} = [CuL_1] + [L_1] \quad (42)$$

$$K'_{CuL_1} = \frac{[CuL_1]}{[L_1] \cdot [Cu^{2+}]} \quad (43)$$

sustituyendo en esta última ecuación

$$[CuL_1] = \frac{K'_{CuL_1} \cdot [Cu^{2+}] \cdot [L_1]_{TOT}}{1 + K'_{CuL_1} \cdot [Cu^{2+}]} \quad (44)$$

A partir de esta expresión se puede eliminar el efecto del primer ligando sobre la complejación del medio. De este modo se procede a calcular la cantidad de cobre que se

haya complejado al segundo ligando tomando los valores de la zona final de la valoración donde éste compleja de forma mayoritaria:

$$[CuL_2] = [Cu]_{TOT} - [CuL_1] - i_p/S \quad (45)$$

Para obtener estimaciones ahora de los parámetros de complejación de este ligando se procede a representar $[Cu^{2+}]/[CuL_2]$ como función de $[Cu^{2+}]$ con estos últimos puntos. La recta que mejor ajusta a estos valores da una estimación de $[L_2]_{TOT}$ y K'_2 . A partir de una ecuación similar a la última reseñada, se calcula la cantidad de $[CuL_2]$ presente en los primeros valores, se procede a eliminar la concentración de cobre unida a L_2 del total de cobre complejado, y se traza una nueva recta representando $[Cu^{2+}]/[CuL_1]$ frente a $[Cu^{2+}]$ con los primeros valores de la valoración. De esta forma comienza un proceso iterativo que converge en soluciones depuradas de los parámetros de complejación de ambos ligandos. En el anexo 1 se ofrece el algoritmo que resuelve de forma rápida este caso. Este resulta ser el único método descrito en la bibliografía para el cálculo independiente de los parámetros de complejación.

El resultado converge tras cinco iteraciones si se toman los doce primeros y últimos elementos de la supuesta valoración y es el mostrado en la tabla VI:

	L₁	L₂
Capacidades Complejantes (* 10⁸ M)	2.00	10.00
log K'	12.000	10.000

Tabla VI. Parámetros de complejación de la valoración modelo referida obtenidos a partir del algoritmo mostrado en el anexo 1.

El tomar más puntos no afecta al resultado, simplemente se necesitan más iteraciones para conseguir el mismo valor.

Por lo tanto este método iterativo logra eliminar la interdependencia que existe entre los parámetros de complejación a la hora de ser calculados, y da valores de capacidad complejante y constante de estabilidad condicional válidos para ambos tipos de ligandos. La importancia de este proceso queda puesta de manifiesto en las figuras 18 y 19. Estas muestran para una valoración metálica de un medio real las dos representaciones linealizadas referidas.

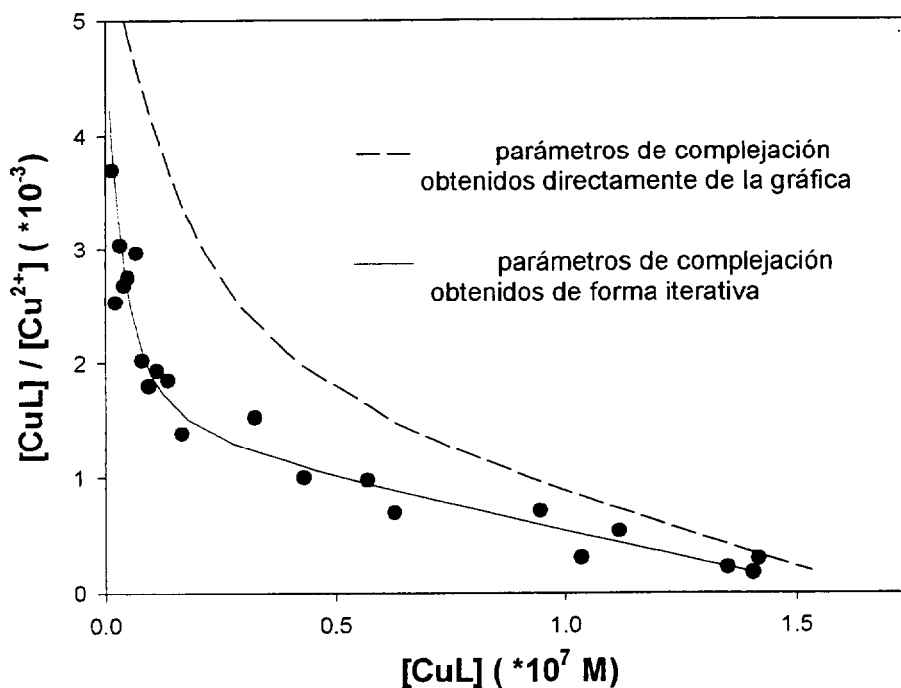


Figura 18. Linealización de Scatchard de una valoración metálica de un medio de agua de mar. Solución sin iterar: $L_1= 1.35 \cdot 10^{-8}$ M (11.6); $L_2= 1.534 \cdot 10^{-7}$ M (10.04). Solución iterada $L_1= 3.8 \cdot 10^{-9}$ M (11.83); $L_2= 1.5 \cdot 10^{-7}$ M (10.16).

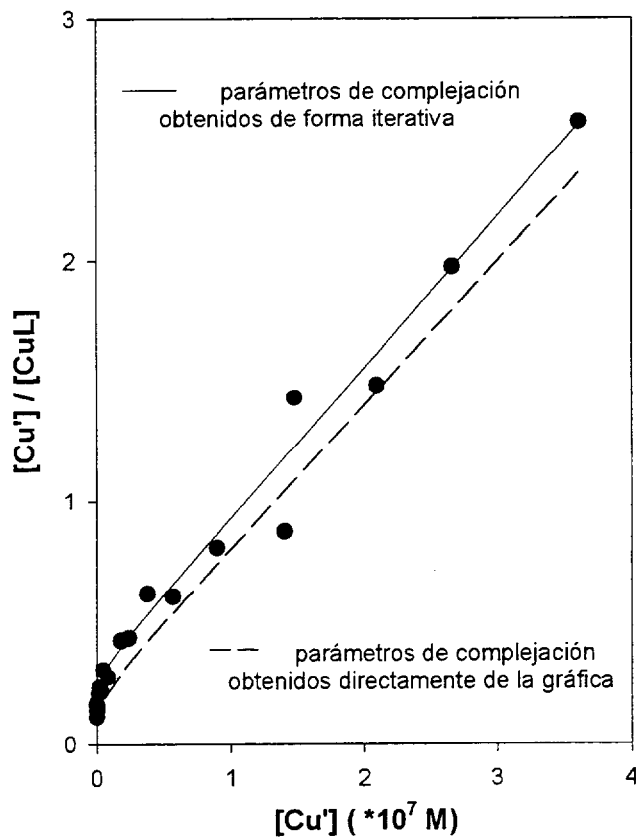


Figura 19. Linealización de van den Berg de una valoración metálica de un medio de agua de mar. Solución sin iterar: $L_1= 1.35 \cdot 10^{-8}$ M (11.6); $L_2= 1.534 \cdot 10^{-7}$ M (10.04). Solución iterada: $L_1= 3.8 \cdot 10^{-9}$ M (11.83); $L_2= 1.5 \cdot 10^{-7}$ M (10.16).

Los puntos corresponden a los valores obtenidos mediante voltametría de redisolución catódica y transformados según las relaciones descritas en los ejes entre la concentración de metal iónico libre medido (o propuesto en el caso teórico) y la de metal complejoado (calculado restando del total, la medición de libre y complejoado artificialmente por el catecol). Las líneas corresponden a los valores de CuL calculados a partir de los valores de cobre iónico libre obtenidos por voltametría y de los parámetros de complejación resultantes de los procesos iterativos aplicando la ecuación (40).

Se observa como, si la obtención de los parámetros no es independiente entre sí, en cada punto se sobrestima la concentración de metal complejoado con la clase de ligando predominante en ese tramo de la figura debido a la presencia de una pequeña cantidad de metal que en realidad se encuentra complejoado por el tipo de complejante minoritario en ese tramo. Esto hace que el cálculo de los parámetros de complejación sea erróneo. Cuando se pretende calcular la concentración de metal complejoado a partir del cobre iónico existente en el medio según la siguiente expresión, se está ofreciendo un valor de la concentración de metal complejoado mucho mayor de la que existe en el medio.

$$[CuL] = \frac{C_{L_1} \cdot K_1 \cdot [Cu^{2+}]}{1 + K_1 \cdot [Cu^{2+}]} + \frac{C_{L_2} \cdot K_2 \cdot [Cu^{2+}]}{1 + K_2 \cdot [Cu^{2+}]} \quad (46)$$

Este hecho se manifiesta en la desviación de la recta calculada a partir de los valores de Cu^{2+} obtenidos en la valoración metálica (como $i_p \cdot S^{-1} \cdot \alpha^{-1}$) y de los de CuL obtenidos con la expresión anterior, respecto de los puntos de la figura, en que CuL se ha obtenido restando al valor de cobre total, el del cobre lábil.

Es evidente, aunque no aparezca en la bibliografía, la posibilidad de construir un método similar a partir de la linealización de Scatchard. Al ser procesos algebraicamente equivalentes el resultado para el ejemplo teórico expuesto es el mismo. En el anexo 2 se encuentra el algoritmo que resuelve la obtención de los parámetros de complejación de un medio a partir de la linealización reseñada.

2.4.6 Desarrollo de un modelo iterativo mixto de determinación de capacidades complejantes

Pero para el caso de medios reales en los que la estimación del metal lábil se encuentra sujeta a errores, suele resultar muy difícil obtener una serie de datos que tras

las sucesivas iteraciones converja a una solución lógica. Esto es debido a la forma que toma la linealización de van den Berg-Ruzic a bajas concentraciones de metal. Estos primeros datos de la valoración metálica poseen menor peso que los que determinan la capacidad complejante de los ligandos de menor constante de estabilidad condicional, y se sitúan muy próximos al origen de la figura. Con frecuencia se obtienen rectas a través del ajuste que cortan el eje de abscisas en un valor negativo, de lo que resulta un valor de la constante de estabilidad condicional negativo, con lo que la iteración queda interrumpida.

Otra dificultad, pero para el caso de la transformada de Scatchard, como se describió previamente, es el encontrar frecuentemente cúmulos de puntos en la parte final de la valoración, donde los ligandos se encuentran saturados por las adiciones de metal, y se forman estructuras que dificultan el cálculo de rectas por mínimos cuadrados. La razón es que en esta zona es mayor la imprecisión del método analítico que el incremento en la concentración de complejo metal-ligando que produce la adición de metal ante un complejo prácticamente saturado.

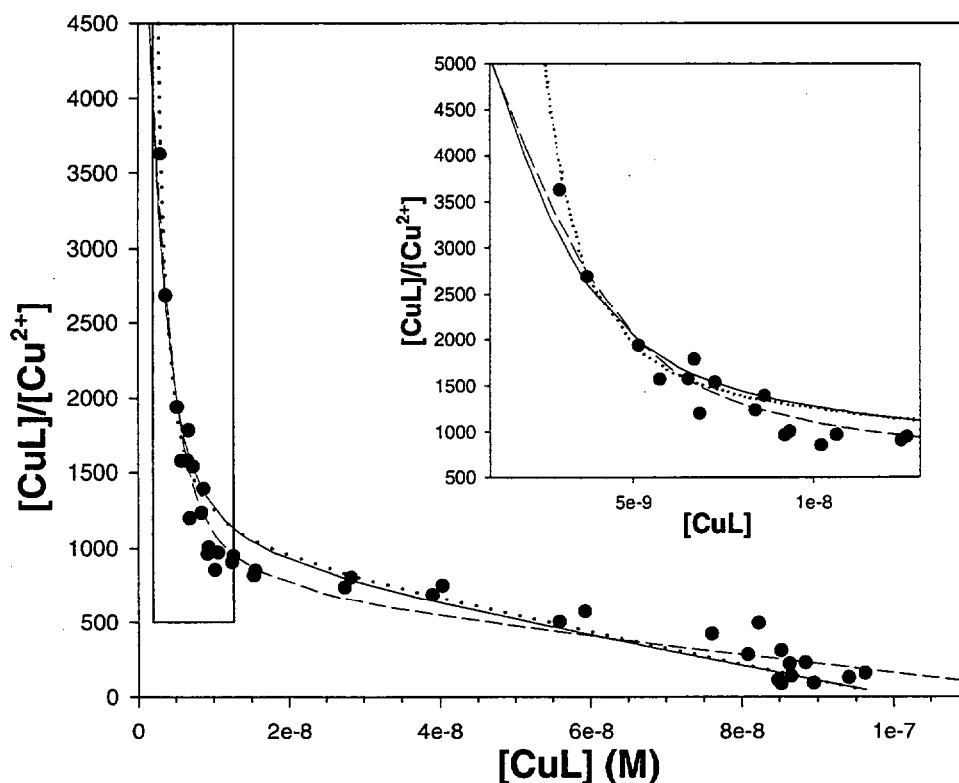


Figura 20. Representación de Scatchard de una de las valoraciones metálicas presentadas en este trabajo. La figura insertada es una ampliación de la zona de la figura incluida en el cuadro presente en la misma. — Método mixto — Método de Scatchard — Método de van den Berg/Ruzic

Por otro lado, como se puede observar en las figuras 20 y 21, cada uno de los métodos expuestos, tiende a ajustar con mayor eficacia los parámetros del tipo de ligando para el cual los datos obtenidos en la valoración, tienen más peso estadístico. L_1 en el caso de la linealización de Scatchard y L_2 para el caso de la de van den Berg-Ruzic. En las figuras 20 y 21 aparece el ajuste correspondiente a un tercer método, que es el propuesto en este trabajo y que resulta mixto de los dos anteriores.

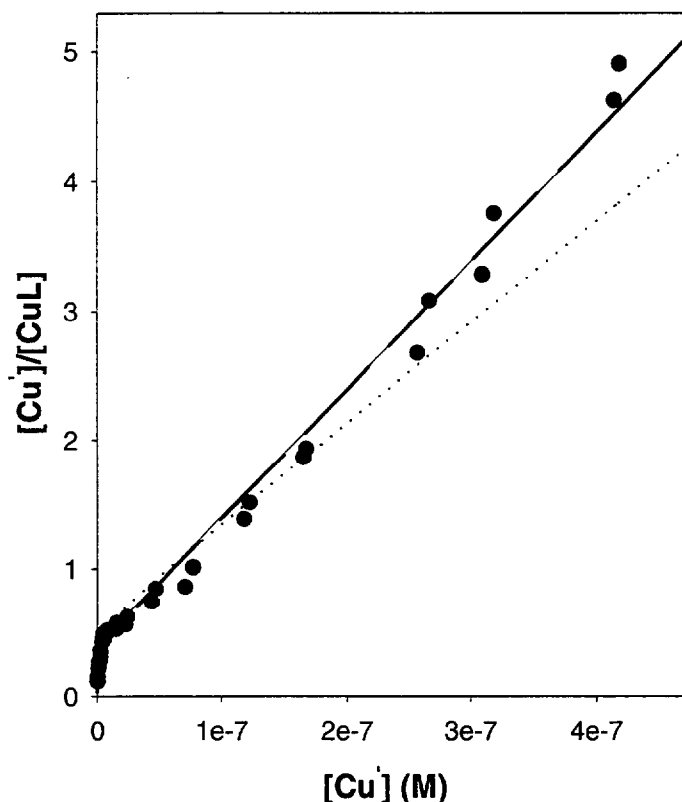


Figura 21. Representación de van den Berg-Ruzic de una de las valoraciones metálicas presentadas en este trabajo. — Método mixto — — — Método de van den Berg-Ruzic. Método de Scatchard.

En el anexo 3 se expone el algoritmo que calcula la capacidad complejante de un medio en el que se hallan presentes dos tipos de ligandos de forma independiente tomando para el cálculo del denominado tipo L_1 datos según la representación de Scatchard, y para el cálculo de L_2 datos linealizados según la expresión de van den Berg-Ruzic. De este modo no se otorga un peso estadístico mayor a una variable respecto de la otra en el proceso de iteración, y se evita la posibilidad de obtener un valor negativo para K_1 .

Transformada lineal en que se basa la iteración	$[L_1] \cdot 10^9 M$	$\log K_{L1}$	$[L_2] \cdot 10^8 M$	$\log K_{L1}$
Van den Berg-Ruzic	2.6 \pm 0.24	12.83 \pm 0.5	9.78 \pm 0.22	10.013 \pm 0.05
Scatchard	4.5 \pm 0.27	12.08 \pm 0.08	12.36 \pm 0.7	9.742 \pm 0.04
Mixta	3.5 \pm 0.35	12.19 \pm 0.15	9.78 \pm 0.24	9.976 \pm 0.05

Tabla VII. Muestra los valores de los parámetros de complejación de un mismo medio obtenidos utilizando en el proceso iterativo de interdependencia de las variables, las transformadas lineales reseñadas de la ecuación de Langmuir. En todos los casos se tomaron del fichero de la valoración cúprica, 10 datos para el cálculo de L_1 y 28 para el cálculo de L_2 .

La tabla VII muestra los parámetros de complejación obtenidos para la valoración metálica mostrada en las figuras 20 y 21 según los tres métodos referidos anteriormente. El fichero de partida, correspondiente a datos obtenidos en este trabajo, es exactamente el mismo en los tres casos, todas las variables empleadas tales como sensibilidad del método, coeficiente alfa de cobre con el catecol o con los ligandos inorgánicos del medio, etc, son exactamente las mismas. A su vez se han cogido el mismo número de datos del comienzo y del final de la valoración para el cálculo de los parámetros de complejación de cada uno de los tipos de ligando.

De esta forma, la única diferencia en el proceso de obtención de los datos que muestra la tabla VII es el distinto peso estadístico que otorga cada una de las transformadas lineales a los datos iniciales y finales respectivamente.

La tabla muestra la gran divergencia existente en los valores obtenidos según el método empleado. Las diferencias suelen oscilar entre un 20 y un 40% para los distintos parámetros. Los valores de concentración total de los ligandos son mayores para el caso del método basado en la representación de Scatchard, y las constantes de estabilidad condicional asociadas menores que para el caso propuesto por van den Berg. Los valores del proceso mixto se hallan intermedios.

El método de van den Berg-Ruzic es el único reseñado en la bibliografía y ajusta los valores de $[L_2]$ y K_{L2} muy eficazmente como puede verse en la figura 20 y que corresponde a la representación que otorga a los mismos un mayor peso estadístico. Pero si se observa en la representación de Scatchard el ajuste que realiza sobre los valores iniciales de la valoración, éste resulta muy pobre. Esto es imposible de apreciar sobre la figura 21, por el escaso peso estadístico de estos primeros valores. De igual forma, una representación de los parámetros obtenidos según la linealización propuesta

por Scatchard ofrece un buen ajuste de los valores iniciales de la valoración, pero la representación de estos valores según la figura de van den Berg-Ruzic ofrece un ajuste nulo de los seis puntos finales de la valoración, que por el escaso peso que toman en la transformada reseñada apenas son tenidos en cuenta en el proceso matemático. La representación de los parámetros obtenidos según el método mixto propuesto es intermedia, y aunque el ajuste de los primeros valores resulta no ser óptimo, la curva solución acaba convergiendo con la que se obtiene por el método de Scatchard, siendo el tramo final de las curvas prácticamente coincidente. Asimismo, en la otra representación (figura 21), resultan indistinguibles los tramos finales de las curvas obtenidas por este método mixto y por el de van den Berg. Dado que ambas transformaciones son matemáticamente equivalentes, éste parece un buen método de compromiso para dar valores fiables en ambos extremos de la valoración metálica.

La fiabilidad de los ajustes puede estudiarse sobre una representación de la isoterma de Langmuir de esta valoración metálica (figura 22).

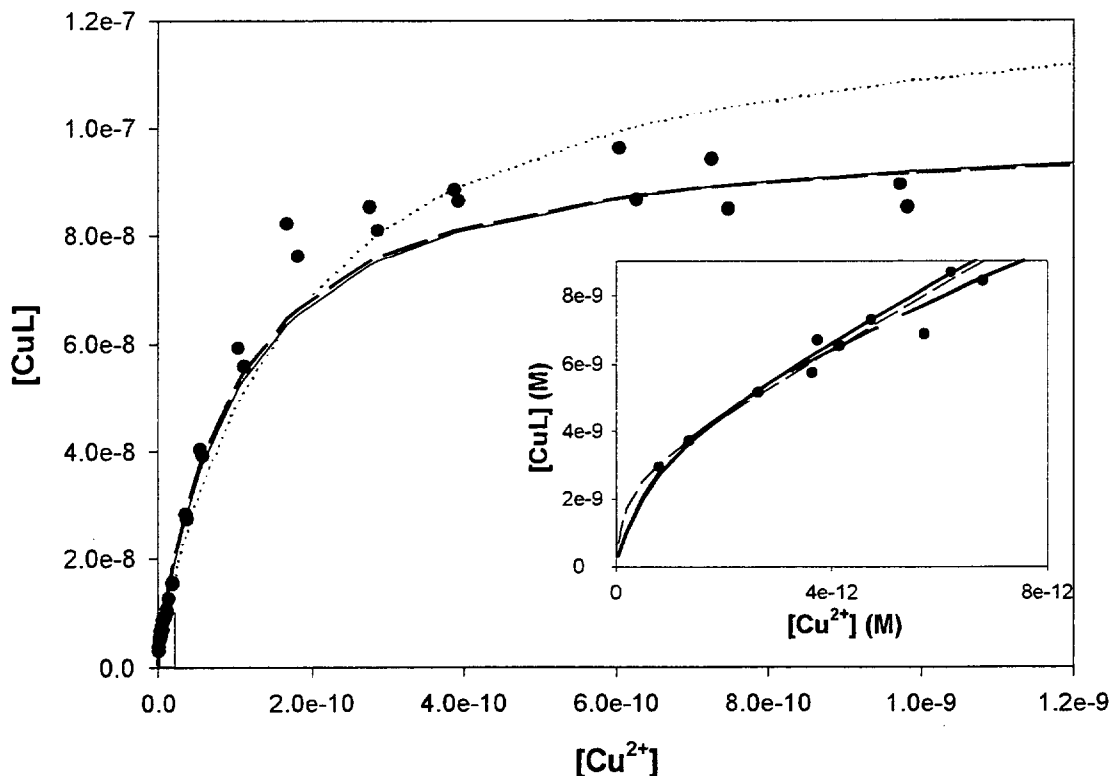


Figura 22. Isoterma de Langmuir de la valoración metálica presentada en las figuras 20 y 21. Método mixto ———. Método de van den Berg-Ruzic - - - - - . Método de Scatchard - · - · - · . La figura insertada corresponde a una ampliación de la zona del recuadro situada en el origen.

En la figura 22 se aprecia el enorme error que la linealización de Scatchard provoca en el cálculo de la capacidad complejante total del medio debido al mínimo peso estadístico que otorga a los valores de la valoración metálica donde se ha conseguido la saturación, mientras que los otros dos métodos convergen al mismo valor que la serie de valores puntuales. Se distingue como, sin embargo, el ajuste que realiza sobre los valores iniciales es mucho mejor. También se puede observar como la solución mixta acaba por converger cerca del origen con el resultado que ofrece la linealización de Scatchard.

Un ejemplo más evidente puede ser el expuesto en las figuras 23 y 24. Los datos corresponden a la valoración metálica mostrada por van den Berg en el trabajo en que presentaba el método iterativo referido (1984). El ajuste de los valores calculados por su método en la representación propuesta previamente por él mismo y Ruzic parece bueno, pero una representación de Scatchard de los mismos, otorgando mayor peso específico a los valores de menor concentración total de cobre, muestra el pobre ajuste al valor inicial de la valoración, dado que el peso estadístico otorgado al mismo es muy pobre según el método propuesto en el trabajo.

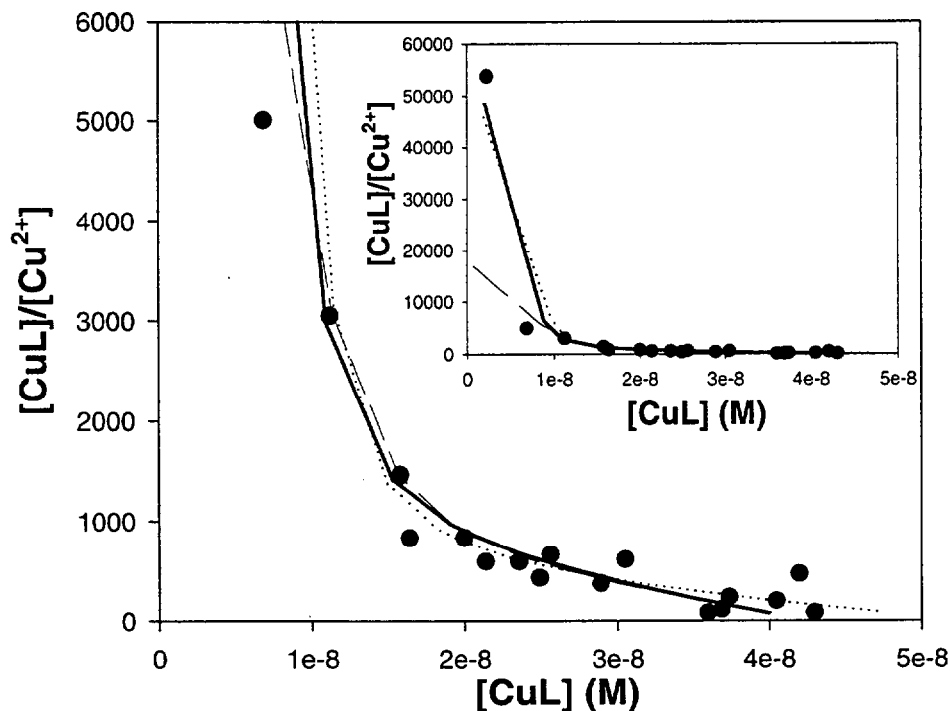


Figura 23. Linealización de Scatchard de la valoración metálica de van den Berg (1984). La figura pequeña insertada muestra la valoración completa. ————— Método mixto
 - - - - - Método de van den Berg-Ruzic. Método de Scatchard.

Las figuras 23 y 24 muestran además los ajustes calculados a partir de los otros algoritmos, y que corresponden a los valores presentados en la tabla VIII. De igual forma al caso anterior se ha respetado el proceso de tal manera que la única diferencia en la obtención de los valores es el diferente peso estadístico otorgado a los tramos iniciales y finales por los distintos métodos.

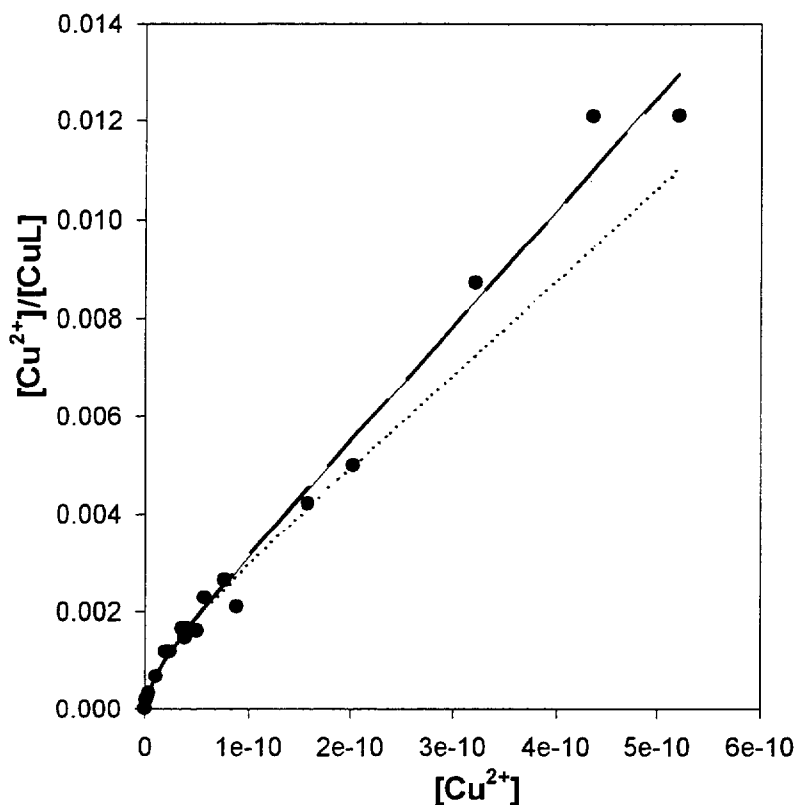


Figura 24. Linealización de van den Berg-Ruzic de la valoración metálica de van den Berg (1984). ————— Método mixto ——— Método de van den Berg-Ruzic. - - - - - Método de Scatchard.

Transformada lineal en que se basa la iteración	$[L_1] \cdot 10^9 M$	$\log K_{L1}$	$[L_2] \cdot 10^8 M$	$\log K_{L2}$
Van den Berg-Ruzic	10.8 ± 0.4	12.21 ± 0.16	3.24 ± 0.17	10.27 ± 0.1
Scatchard	10.1 ± 0.5	12.74 ± 0.11	4.29 ± 0.5	10.08 ± 0.09
Mixta	9.6 ± 0.3	12.86 ± 0.1	3.4 ± 0.16	10.36 ± 0.1

Tabla VIII. Muestra los valores de los parámetros de complejación obtenidos de la valoración cúprica presentada por van den Berg (1984). En todos los casos se tomaron del fichero de la valoración cúprica, 5 datos para el cálculo de L_1 y 16 para el cálculo de L_2 . $\alpha' = 310$.

Por lo tanto el método propuesto parece más adecuado que el tradicionalmente empleado en la obtención de las capacidades complejantes de un medio, debido a la mejor resolución que se obtiene de los parámetros del tipo de ligando de mayor constante de estabilidad condicional, sin perder precisión en el cálculo de los de menor constante.

Cualquiera de los procesos descritos de iteración poseen el inconveniente de que mientras es posible hacer las variables que describen cada uno de los dos tipos de ligandos independientes entre sí, no resulta posible realizar un cálculo independiente para cada uno de los tipos de ligandos de la concentración total respecto de su constante de estabilidad condicional. Es frecuente no encontrar una tendencia en valores calculados de cualquiera de estos dos parámetros dado que en muchos casos se obtienen sobrestimaciones de uno que hace que el otro de un valor más bajo del que podría esperarse en esa situación del experimento y viceversa. De ahí que en los resultados de los estudios de capacidades complejantes hayamos incluido además de una representación de la evolución en cultivos de los parámetros de la complejación orgánica del medio, una representación del valor del producto de la concentración de ligando por su constante de estabilidad ($C_{Lx} \cdot K_{Lx}$). Este producto, que será denominado fuerza complejante, resulta proporcional a la concentración de metal complejoado con esa clase de ligando, y da una idea de su eficacia y capacidad para retirar al metal en disolución y complejarlo al incluir no sólo su concentración total. Otros autores (Miller y Bruland, 1997), refieren como fuerza complejante el valor del coeficiente- α del complejo cobre-ligandos naturales y que se define como:

$$\alpha_{CuL_i} = \frac{[CuL_i]}{[Cu^{2+}]} \quad (47)$$

Pero este valor no es adecuado para el experimento presente, ya que el valor de $[Cu^{2+}]$ depende para un mismo medio de la concentración total de cobre disuelto existente en éste, y en estudios de complejación en presencia de algas los procesos de inclusión celular o adsorción sobre las paredes del recipiente de cultivo van a hacer variar esta concentración. Por lo tanto este parámetro no resulta útil para observar la evolución de las características de los tipos de ligandos calculados y comparar valores de medios con distinta concentración total de cobre disuelto.

La tabla IX ofrece los valores de este producto para las capacidades complejantes calculadas según los métodos referidos previamente en el primer caso expuesto. Se observa la coincidencia entre los valores ofrecidos por el método mixto y

el de Scatchard para L_1 , y como el valor del método de van den Berg-Ruzic y el del propuesto se hallan bastante próximos para el otro tipo de ligando.

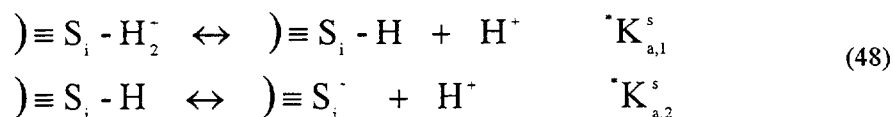
Transformada lineal en que se basa la iteración	$[L_1]^* K_{L1}$	$[L_2]^* K_{L2}$
Van den Berg-Ruzic	17578	1007
Scatchard	5410	682
Mixta	5410	925

Tabla IX. Muestra los valores de los productos de los parámetros de complejación de un mismo medio obtenidos utilizando las transformadas lineales reseñadas de la ecuación de Langmuir en el proceso iterativo de interdependencia de las variables.

2.5 OBTENCION DE CAPACIDADES ADSORTIVAS

Ya se ha definido previamente a este proceso como un equilibrio de formación de complejos superficiales con la interacción, mediante una reacción de complejación, de un ion con grupos superficiales. En este caso se estudia el enlace de metales traza sobre la superficie de algas. Sobre esta base, el desarrollo es prácticamente idéntico al de la complejación, ya que la naturaleza química de las reacciones que se verifican es la misma, y los grupos funcionales de la superficie celular, deben hallarse relacionados con los de la materia orgánica disuelta. Al igual que en el caso referido, la naturaleza del enlace puede ser doble: el enlace con un punto de la superficie libre, o una reacción de intercambio iónico con protones u otros cationes del medio.

Por lo tanto, si los grupos estudiados son susceptibles de complejarse con los protones disueltos, el alcance de la adsorción dependerá de los equilibrios ácido-base de estos grupos funcionales superficiales:

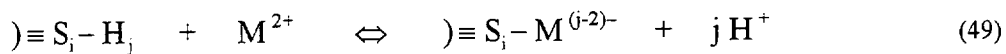


En esta ecuación, $)\equiv S_i$ representa a un grupo funcional cualquiera de la superficie celular con capacidad para complejar a un ion metálico libre en disolución. Los más importantes son: amino, fosfato, sulfhidrilo, hidroxilo y cadenas laterales funcionales de residuos de aminoácidos tales como la histidina, cisteína, ácido aspártico y ácido glutámico (Sigg, 1987; Mohl et al., 1988; Huang *et al.*, 1990). Al igual que en el caso de la complejación, no es bien conocida la naturaleza y sobre todo la proporción de estos

grupos, pero su estudio se dificulta por la gran variedad de las características superficiales del plancton en función de la especie, y del estado fisiológico de la misma. De tal forma que en un medio natural la adsorción celular que se verifique dependerá no sólo de parámetros físico-químicos, sino además de la distribución de especies.

Previamente a los estudios de adsorción y complejación se muestran los resultados de la valoración ácido-base de suspensiones de algas para determinar las constantes de acidez de sus grupos funcionales superficiales y obtener hipótesis sobre la naturaleza de los mismos.

Para el caso del estudio de la adsorción de un metal sobre la superficie celular se considera la formación de complejos superficiales sobre los sitios activos que sufren una reacción de desprotonación, del mismo tipo de la de complejación descrita, expresada de forma que la carga superficial no es considerada.



i representa el tipo de sitio superficial. Se considera en general a la superficie del alga como a una superficie lisa dotada de macromoléculas polifuncionales. El equilibrio de la reacción de adsorción viene regido por la constante:

$$K_{ij} = \frac{[) \equiv S_i - M] \cdot [H^+]^j}{[) \equiv S_i - H_j] \cdot [M^{2+}]} \quad (50)$$

Esta constante resulta independiente del pH, pero no así de la carga superficial, la cual depende del alcance de la complejación de metales, iones mayoritarios y protones. Sin embargo, es posible considerar a la superficie como si no presentara carga neta superficial y no existieran interacciones electrostáticas por parte de otros grupos funcionales de la superficie y utilizar constantes de equilibrio intrínsecas. Los valores de K_{ij} obtenidos por este procedimiento son una expresión semiempírica del efecto medio del enlace de iones metálicos en una superficie polifuncional, válidos para un intervalo de ocupación superficial relativa.

De igual forma que para la complejación, se considera que la estequiometría de la relación de enlace entre el metal y los grupos funcionales de la superficie del alga es 1:1. Y también se define una constante de estabilidad condicional (es función del pH) de la reacción descrita para simplificar el trabajo.

$$K'_{H,j} = \frac{[) \equiv S_i - M]}{[) \equiv S_i -] \cdot [M^{2+}]} \quad (51)$$

donde $[] \equiv S_i - []$ representa a aquellos grupos funcionales de la superficie del alga que no se encuentran complejados por el metal de estudio (libres, protonados, o unidos a otros cationes del medio). La relación entre ambas constantes de estabilidad es la siguiente:

$$K'_{H,i} = \frac{K_{ij}}{1 + K_{a,i} \cdot [H]} \quad (52)$$

El valor de $K_{a,i}$ para el pH en que se ha realizado el experimento de adsorción, puede ser obtenido de la valoración ácido-base de los grupos superficiales del alga.

Para el caso de la adsorción se define la concentración celular máxima adsorbible (Γ_{max}). Corresponde al número promedio por célula de grupos funcionales superficiales susceptibles de adsorber al metal de estudio. El balance de masas de esta variable es la siguiente.

$$\Gamma_{max} = [] \equiv S^- + \sum [] \equiv S-H_j + [] \equiv S-M \quad (53)$$

Los sumandos de la ecuación representan sucesivamente a los grupos funcionales libres más los que se hallan complejando a otros cationes presentes en el medio (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , otros elementos traza, etc), los protonados en diverso grado y los unidos al metal de estudio.

La isoterma de Langmuir que describe el alcance de la complejación en el sistema, se expresa en este caso como la cantidad de grupos funcionales de cada célula que se encuentran complejados por el metal de la valoración.

$$\Gamma = [] \equiv S - M = \frac{K'_{H,j} \cdot [M^{2+}] \cdot \Gamma_{max}}{1 + K'_{H,j} \cdot [M^{2+}]} \quad (54)$$

Γ se expresa en moles de metal complejado célula⁻¹.

La obtención de los parámetros de adsorción de esta ecuación se realiza a través de la aplicación de las dos linealizaciones presentadas previamente para resolver la complejación. La isoterma de Langmuir para el caso de la adsorción queda de la siguiente forma:

Linealización de van den Berg-Ruzic

$$\frac{[M^{2+}]}{\Gamma} = \frac{[M^{2+}]}{\Gamma_{max}} + \frac{1}{K'_{H,j} \cdot \Gamma_{max}} \quad (55)$$

Linealización de Scatchard

$$\frac{\Gamma}{[M^{2+}]} = K'_{H,j} \cdot (\Gamma + \Gamma_{\max}) \quad (56)$$

La resolución figura de ambas ecuaciones es idéntica al caso de la complejación.

Pero las superficies algales no constituyen un medio homogéneo. Los grupos funcionales de su superficie son muy variados en composición y estructura. De tal forma que al igual que en el caso de la complejación se obtiene una distribución de grupos funcionales de diversa afinidad por el metal objeto de estudio. Esto repercute lógicamente en el mismo aspecto curvo de la distribución de puntos de las representaciones de ambas linealizaciones que en el caso de la complejación, siempre que la técnica utilizada sea lo suficientemente sensible. Esto es consecuencia de que el metal del medio tenderá a unirse primero a los grupos funcionales que presenten una mayor afinidad por él, e irá sucesivamente, a medida que aumente su concentración en el medio y estos grupos se saturen, adsorbiéndose sobre aquellos grupos con menor afinidad. De esta forma la capacidad máxima adsorptiva celular queda definida como la suma de las capacidades adsorptivas de todos los grupos funcionales presentes en la superficie algal capaces de enlazar al metal estudiado.

$$\Gamma_{\max} = \sum_{i=1}^n \Gamma_{\max,i} = \sum_{i=1}^n \frac{\Gamma_{\max,i} \cdot K'_{H,i} \cdot [M^{2+}]}{1 + K'_{H,i} \cdot [M^{2+}]} \quad (57)$$

Se han desarrollado modelos con múltiples puntos de enlace (Wilkinson, 1988), pero resultan de difícil solución. En la mayor parte de los casos, y al igual que sucede con la resolución de la complejación, si se considera la presencia teórica de solamente dos tipos de ligandos, la solución se ajusta bien a los datos obtenidos. Es necesario reseñar que estas dos clases de ligandos solución serán medias ponderadas de los diversos grupos funcionales que haya sobre la superficie del alga. La ecuación a resolver es la siguiente:

$$\Gamma = \frac{\Gamma_{\max,1} \cdot K'_{H,1} \cdot [M^{2+}]}{1 + K'_{H,1} \cdot [M^{2+}]} + \frac{\Gamma_{\max,2} \cdot K'_{H,2} \cdot [M^{2+}]}{1 + K'_{H,2} \cdot [M^{2+}]} \quad (58)$$

Esta ecuación no es posible resolverla directamente y al igual que para el caso anterior se definen las dos linealizaciones ya descritas para el caso de la adsorción en

una superficie heterogénea con dos tipos de grupos funcionales. Todo el proceso descrito para la complejación es válido para el caso de la adsorción. Se debe proceder a la resolución figura de los dos tramos de la curva para cada linealización y con estos datos obtener una solución iterativa que ofrezca una solución de los parámetros de un tipo de grupos funcionales independiente respecto de la solución del otro tipo. En las figuras 25 y 26 aparecen datos correspondientes a valoraciones metálicas (cúpricas en este caso) de la superficie de diatomeas y como el considerar un modelo heterogéneo con la existencia de dos tipos de grupos superficiales capaces de adsorber al cobre se ajusta de forma más que aceptable a la distribución de puntos.

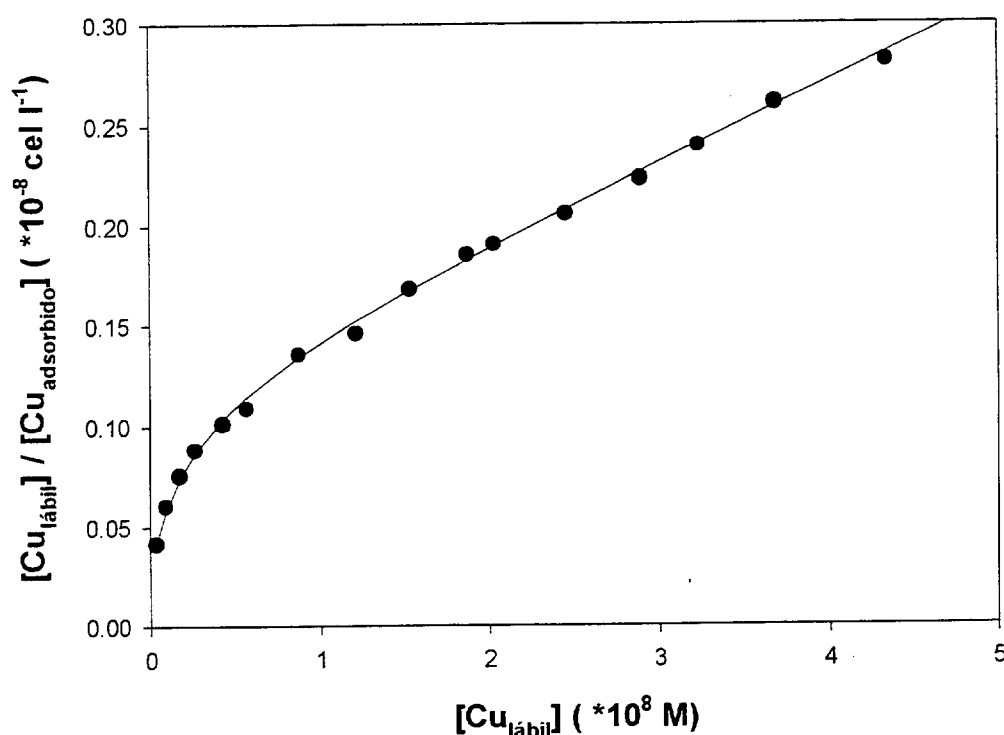


Figura 25. Ejemplo de transformada de van den Berg-Ruzic para datos de metal adsorbido sobre una suspensión algal. La línea corresponde a la obtención de la fracción adsorbida a partir de los valores de metal iónico libre de la valoración y los parámetros de adsorción obtenidos mediante el método mixto.

En este caso tampoco será posible que el valor calculado de la capacidad máxima de adsorción para un determinado grupo de ligandos superficiales sea independiente del valor asociado de constante de estabilidad condicional a ese grupo.

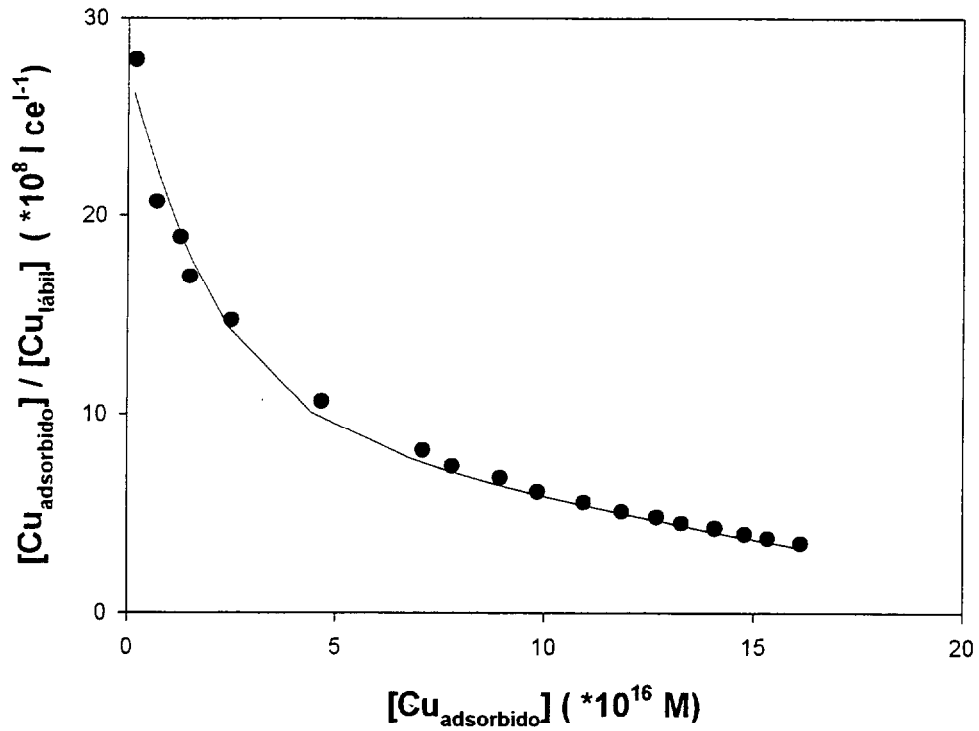


Figura 26. Ejemplo de transformada de Scatchard para datos de metal adsorbido sobre una suspensión algal. La línea corresponde a la obtención de la fracción adsorbida a partir de los valores de metal iónico libre de la valoración y los parámetros de adsorción obtenidos mediante el método mixto.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 PUESTA A PUNTO DE LA VOLTAMETRIA ANODICA

Esta técnica fue utilizada para la determinación de concentraciones tanto de cobre, como de plomo inorgánico en disolución. También se empleó para la determinación de concentraciones totales de cobre en disolución previa adición de 20 μl de HCl concentrado (con el fin de deshacer todos los complejos del medio entre el cobre y los ligandos orgánicos naturales). El tipo de barrido de potencial empleado fue el de pulso diferencial (ver figura 5).

Los pasos seguidos para el análisis de las muestras fueron los siguientes:

- Purga con N_2 saturado en agua con agitación durante 6 minutos para conseguir retirar todo el oxígeno de la muestra.
- Comienza la obtención del polarograma
 - Periodo de agitación de la muestra con el potencial de la misma fijado a -0.6V para el caso del cobre y -0.8 V para el caso del plomo. Un desplazamiento a menores valores de potencial no aumenta el pico obtenido.
 - Diez segundos de quiescencia para evitar la convección en la muestra durante el siguiente paso.
 - Barrido de potencial de la muestra en pulso diferencial.

Se realizaron experimentos para optimizar los parámetros de los que depende la técnica y a continuación se detallan los resultados.

3.1.1 Efecto del tiempo de deposición

Sobre una muestra de 10 ml de agua de mar acidificada (20 μl HCl conc.) se realizaron varias medidas de concentración total de cobre variando el parámetro de estudio, observándose una larga dependencia lineal de la sensibilidad con la duración del proceso de acumulación de analito en la gota de mercurio. El estudio se repitió para el caso del plomo.

Se aprecia en la figura 27 una linealidad duradera de la sensibilidad en función del tiempo de deposición. Por razones de disponibilidad temporal, finalmente los análisis se realizaron con diez minutos de deposición como máximo.

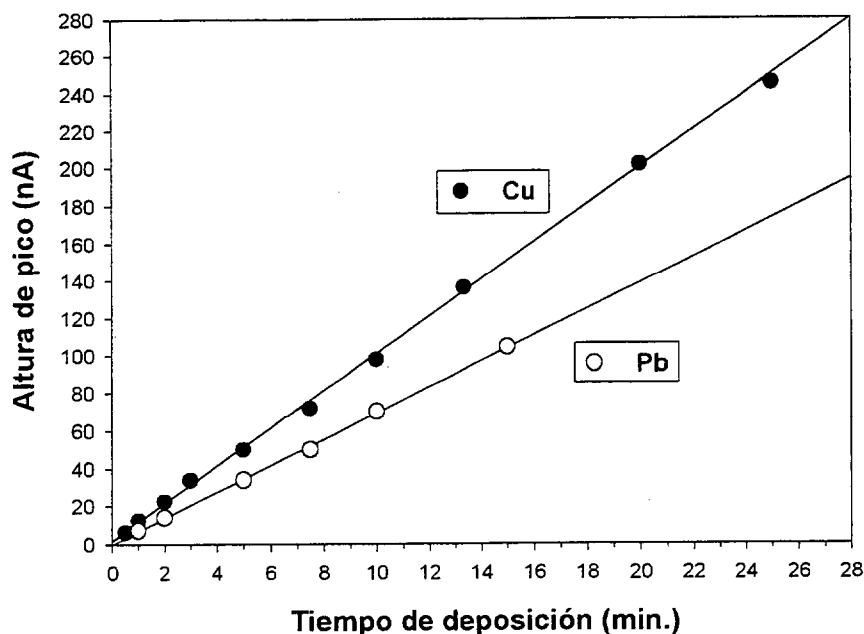


Figura 27. Muestra la evolución de la altura de pico de reducción del cobre y del plomo, en el caso de aumentar el tiempo de deposición del catión sobre el electrodo de mercurio. Muestras: agua de mar de [Cu]= 45 nM; [Pb]= 15 nM. Potencial de deposición= -0.65V. Altura de pulso= 50 mV. Incremento de potencial= 2 mV.

3.1.2 Efecto de la altura de pulso

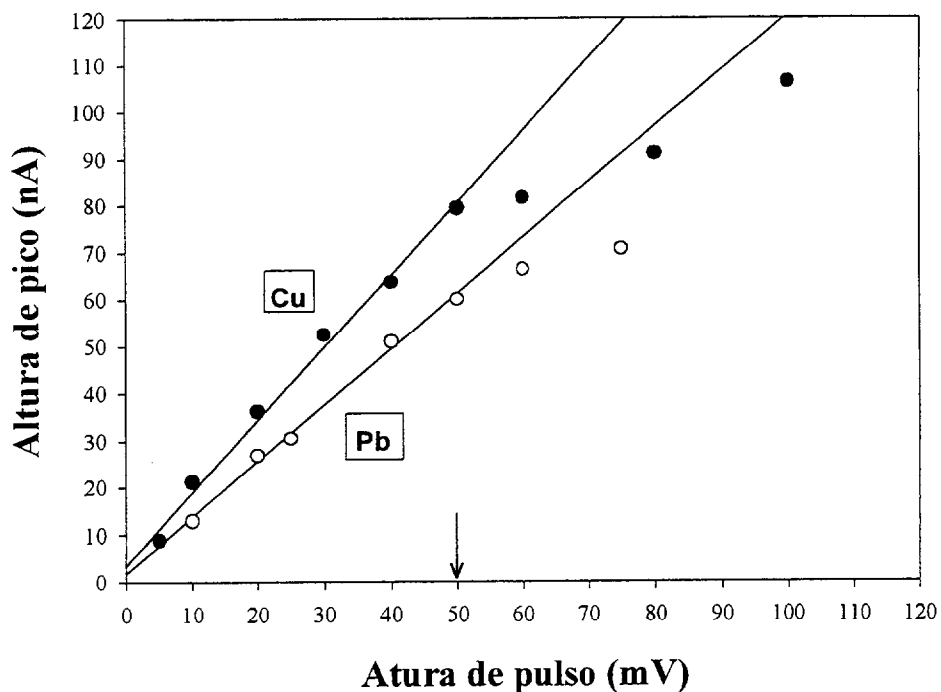


Figura 28. Muestra la evolución de la altura de pico de reducción del cobre y del plomo, en el caso de aumentar la altura de pulso del barrido de potencial en forma de pulso diferencial. Muestras: agua de mar de [Cu]= 35 nM; [Pb]= 12 nM. Tiempo de deposición= 10 min. Potencial de deposición= -0.65V. Incremento de potencial= 2 mV.

A una muestra acidificada (20 μl HCl conc.) de agua de mar se le realizaron varios análisis variando el salto de potencial que experimenta cada pulso durante el barrido para ver su efecto sobre la determinación de la concentración de cobre. El experimento fue repetido para el caso del plomo. Ambas series de experimentos se presentan en la figura 28.

Se aprecia un incremento en la altura de pico a medida que se incrementa la altura de pulso hasta un valor en torno a 50mV, que es el seleccionado para llevar a cabo los experimentos de este trabajo.

3.1.3 Aplicación a la determinación de concentraciones totales en disolución

La figura 29 muestra un ejemplo de la aplicación de la voltametría de redisolución anódica para la determinación de concentraciones totales de cobre y plomo en disolución. Para ello el medio fue acidificado y permitido su equilibrio durante 45 minutos para lograr la total disociación de todos los complejos orgánicos en disolución.

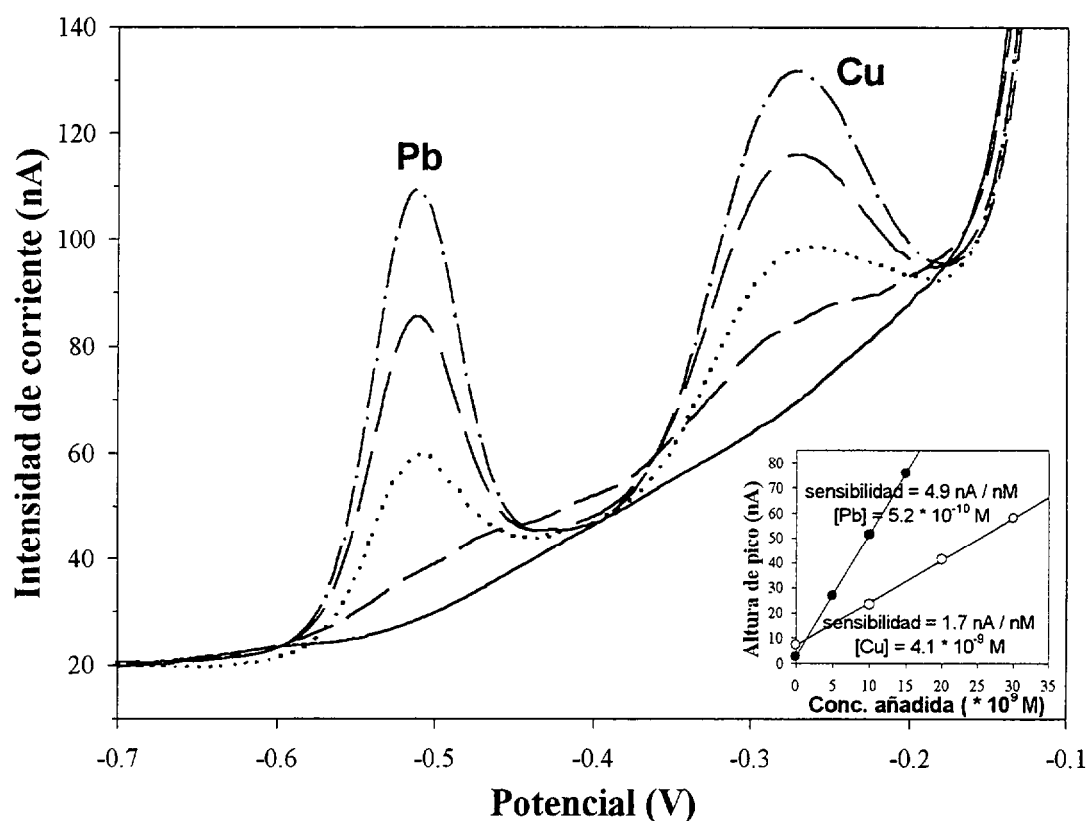


Figura 29. Ejemplo de determinación simultánea de concentración de plomo y cobre en agua de mar por voltametría de redisolución anódica. La línea continua corresponde a la muestra a pH entorno a 8. (-----) Muestra acidificada con HCl concentrado (pH=2). El resto de las curvas corresponden a adiciones de 5, 10 y 15 nM de plomo y de 10, 20, 30 nM de cobre respectivamente. Tiempo de deposición= 10 min. Altura de pulso= 50 mV. Potencial de deposición= -0.8 V. Incremento de potencial= 2 mV. La figura insertada muestra el cálculo de la sensibilidad y la concentración total a partir de las alturas de pico.

3.2 PUESTA A PUNTO DE LA VOLTAMETRIA CATODICA

Este método analítico para determinar concentraciones de cobre en agua de mar fue diseñado en primer lugar por van den Berg en 1984. En este trabajo establece como condiciones ideales el trabajar a un pH de 7.7 conseguido con una adición del tampón HEPES $7 \cdot 10^{-3}$ M (obtenido a partir de una disolución 1M en NaOH 0.5M), una concentración de catecol de $2 \cdot 10^{-5}$ M, depositar tres minutos a un potencial de -0.05 V y un posterior barrido de potencial en pulso diferencial. Los pasos seguidos para la obtención de los polarogramas en las distintas muestras se basan en los estudios previos de van den Berg (van den Berg, 1984, van den Berg *et al.*, 1990) y Sigg (Xue y Sigg, 1993) para el estudio también de capacidades complejantes en medios naturales por voltametría de adsorción catódica. La diferencia en este caso es la utilización para el barrido de potencial de la muestra de la onda cuadrada ante la imposibilidad del analizador EG&G PAR 384B de trabajar con incrementos de potencial del tipo pulso diferencial en un barrido catódico.

Los pasos seguidos para el análisis de las muestras fueron los siguientes:

- Purga con N_2 saturado en agua con agitación durante 5 minutos para conseguir retirar todo el oxígeno de la muestra.
- Adición de 50-100 μ l. de una disolución de catecol para obtener una concentración en la muestra de 2 a $5 \cdot 10^{-5}$ M de catecol (complejante artificial). El que la purga se halle previamente a la adición de catecol se debe al hecho de que éste resulta muy fácilmente degradable y de esta forma se le preserva durante largo tiempo de una posible oxidación.
- Cinco minutos de purga con agitación para favorecer la reacción y equilibrio del catecol con el cobre y los ligandos presentes en el medio. El valor de pico permanece estable durante horas si la muestra es preservada durante este periodo de la presencia de O_2 mediante la purga continua con N_2 .
- Comienza la obtención del polarograma
 - Periodo de agitación de la muestra con el potencial de la misma fijado a -0.05 V para conseguir la adsorción de los complejos cobre-catecol sobre la gota de mercurio. Este valor de potencial es el aconsejado por

van den Berg y Sigg, y según se comprobó, cambios entre -0.1 y $+0.1$ no afectan a la altura del pico.

- Diez segundos de quiescencia para evitar la convección en la muestra durante el siguiente paso.
- Barrido de potencial de la muestra en onda cuadrada.

A continuación aparecen los experimentos realizados para optimizar los parámetros de las diversas fases descritas.

3.2.1 Efecto de la concentración de catecol

Para determinar como afecta este parámetro a la señal de la reducción del cobre sobre el electrodo se realizaron sucesivas adiciones de catecol a una misma muestra, permitiendo que antes de cada medida se equilibrara perfectamente el catecol con las especies del medio, dejando transcurrir un mínimo de siete minutos de equilibrio en condiciones de purga con N_2 saturado en agua. El resultado se presenta en la figura 30 y concuerda con los resultados de van den Berg (1984) y de Xue y Sigg (1993). Se aprecia un aumento progresivo en la señal hasta un máximo que se consigue en el intervalo $8 \times 10^{-4} \text{ M} - 10^{-3} \text{ M}$.

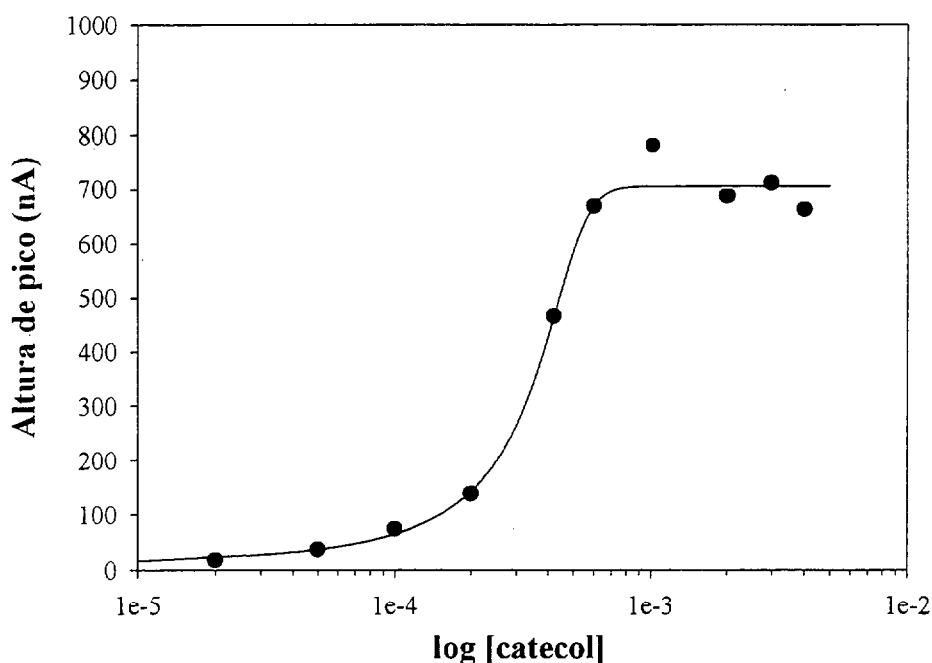


Figura 30. Evolución de la altura de pico de la oxidación del cobre de una muestra de agua de mar en función de la concentración añadida al medio de catecol.

El experimento se realizó en una muestra de 10 ml de agua de mar con 5 nM de cobre presentes, a un pH de 7.8 (NBS) conseguido con una concentración 10^{-2} M de tampón HEPES y con dos minutos de deposición a -0.05 V. Los voltogramas fueron obtenidos con una velocidad de barrido de 240 mV/s y una altura de pulso de 45 mV. Las disoluciones de catecol de partida fueron de 0.2 M y $5 \cdot 10^{-3}$ M que permitieron obtener todo el rango de concentraciones reflejado en la figura sin adiciones mayores de 200 μ l.

La concentración escogida de catecol debe ser lo suficientemente alta para que los polarogramas presenten un pico definible con el que trabajar, pero a su vez hay que tener en cuenta que dependiendo de la fracción de complejantes orgánicos de la que se desee obtener su capacidad complejante, hay que escoger la concentración de catecol. El coeficiente alfa ($\alpha_{\text{Cu-catecol}} = \frac{\sum[\text{Cucatecol}]}{[\text{Cu}^{2+}]}$) de la reacción de unión del cobre y el catecol determina la fracción de complejos naturales que es posible estudiar en esas condiciones, es decir la ventana espectral aludida con anterioridad, y su evolución en función de la concentración de catecol aparece en la figura 8. A menor $\alpha_{\text{Cu-catecol}}$ es posible detectar complejantes orgánicos naturales de menor constante de estabilidad con el cobre. Por ello la elección de la concentración de catecol ha sido arbitraria con el fin de obtener una ventana espectral amplia, en el intervalo $2-4 \cdot 10^{-5}$ M.

3.2.2 Efecto del tiempo de deposición del complejo

Las condiciones utilizadas fueron: 10 ml de agua de mar con una concentración de cobre $4.5 \cdot 10^{-8}$ M con un pH 7.8 (NBS) y una concentración de catecol de $2 \cdot 10^{-5}$ M, condiciones muy similares a las utilizadas posteriormente en la obtención de voltogramas durante el desarrollo experimental.

Como se observa en la figura 31 la linealidad durante el proceso de adsorción del complejo cobre-catecol se mantiene hasta los dos minutos, después de los cuales un efecto de saturación de la superficie de la gota de mercurio por parte del catecol adsorbido debe desarrollarse y aumentar la duración del proceso no conlleva un incremento proporcional de la deposición. Por lo tanto son esos dos minutos el tiempo escogido para la deposición a lo largo de todo el proceso experimental.

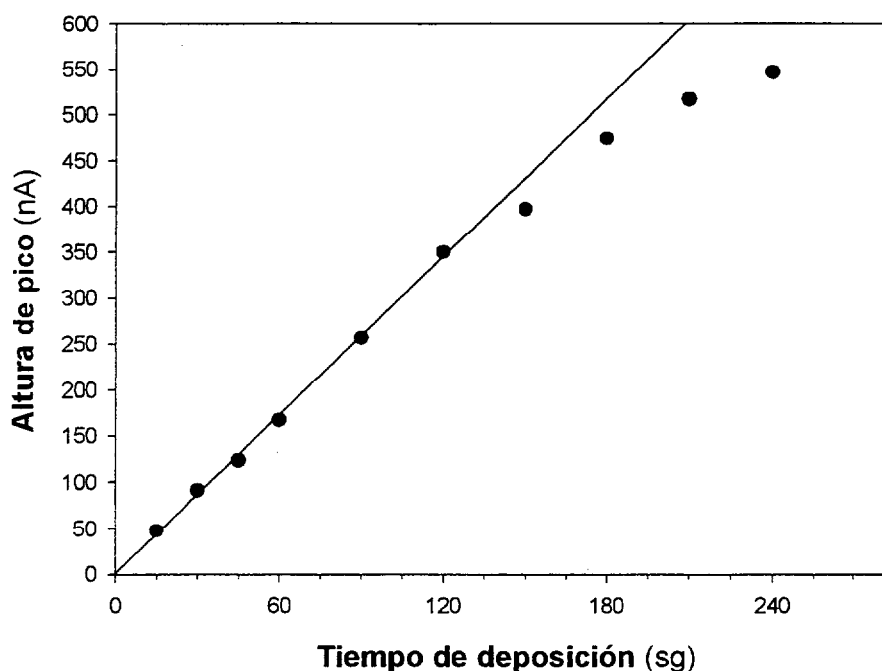


Figura 31. Evolución de la altura de pico de oxidación del cobre en una muestra en presencia de $2 \cdot 10^{-5}$ M de catecol en función del tiempo de deposición del complejo cobre-catecol sobre el electrodo de mercurio. Velocidad de barrido de 240 mV/s, altura de pulso de 45 mV. Tiempo de deposición= 120 s. Potencial de deposición a -0.05 V.

3.2.3 Efecto de la velocidad de barrido

Este parámetro puede ser modificado tanto variando el número de pulsos de potencial que genera el analizador por segundo (frecuencia), como alterando el incremento de potencial que tiene lugar entre dos pulsos consecutivos.

El intervalo de frecuencias que permite el equipo utilizado es restringido y por tanto también el de velocidades de barrido que se pueden emplear, llegando a un valor tope de frecuencia de 120Hz. A una muestra de agua de mar a pH 7.8 (NBS) por la adición de HEPES y a la que se le ha añadido cobre para dar una concentración final de $4.5 \cdot 10^{-8}$ M, se le realizan una serie de medidas variando la frecuencia de pulsos del polarograma.

El resultado es una respuesta lineal de la altura de pico respecto de la frecuencia en todo el intervalo que permite el equipo, por lo que el valor máximo posible de frecuencia (120 Hz) fue el seleccionado para este trabajo.

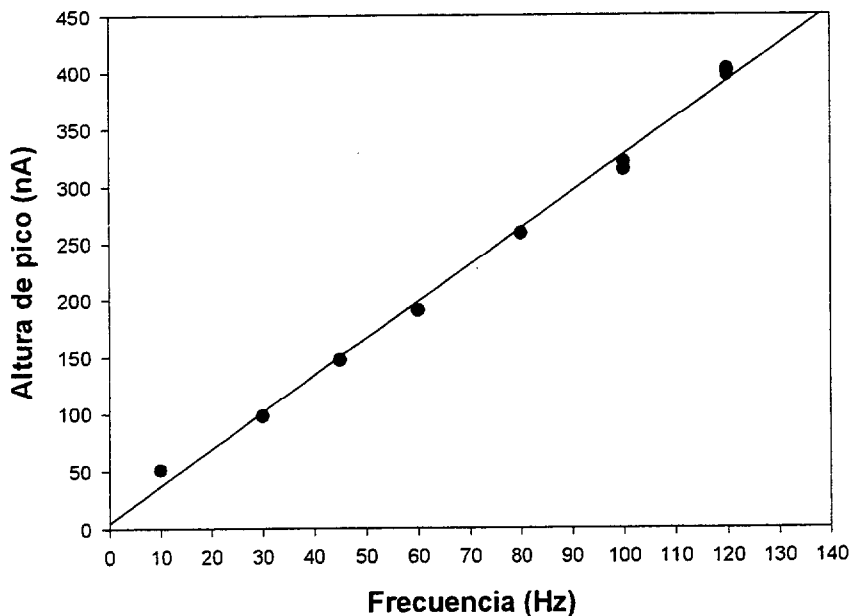


Figura 32. Evolución de la altura del pico de oxidación del cobre en función de la frecuencia de pulsos en una muestra de agua de mar en presencia de 2×10^{-5} M de catecol. 90 s de deposición a -0.05 V, con 45 mV de altura de pulso y 2 mV de incremento de potencial.

Otro método de alterar la velocidad de barrido de potenciales es aumentar el salto de potencial que ocurre entre pulso y pulso. El analizador 384B sólo permite otorgar valores pares a esta variable.

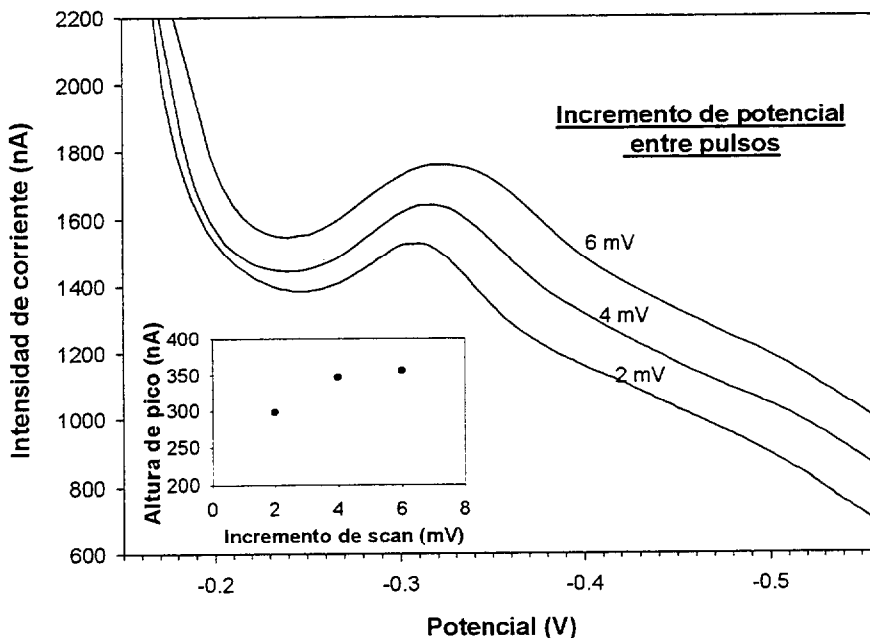


Figura 33. La figura muestra los polarogramas obtenidos a partir de una misma muestra de agua de mar a diferentes incrementos de potencial entre pulsos. La figura insertada muestra la altura de pico obtenida en los tres polarogramas presentados. 90 s de deposición a -0.05 V, con 45 mV de altura de pulso. Frecuencia= 120 Hz.

El aumentar la velocidad de barrido elevando el incremento de potencial entre pulsos parece llevar consigo un incremento mínimo de la sensibilidad, pero en cambio el pico sufre un importante ensanchamiento nada deseable a la hora de definirlo correctamente para trazar la tangente y cuantificarlo, por lo que el valor escogido de incremento de potencial entre pulsos es el mínimo, 2 mV, que con una frecuencia de 120 Hz supone una velocidad de barrido seleccionada de 240 mV/s.

3.2.4 Efecto de la altura de pulso

Al igual que en los casos anteriores a una muestra de agua de mar se le realizaron sucesivas medidas en presencia de $2 \cdot 10^{-5}$ M de catecol variando este parámetro para optimizar el valor escogido.

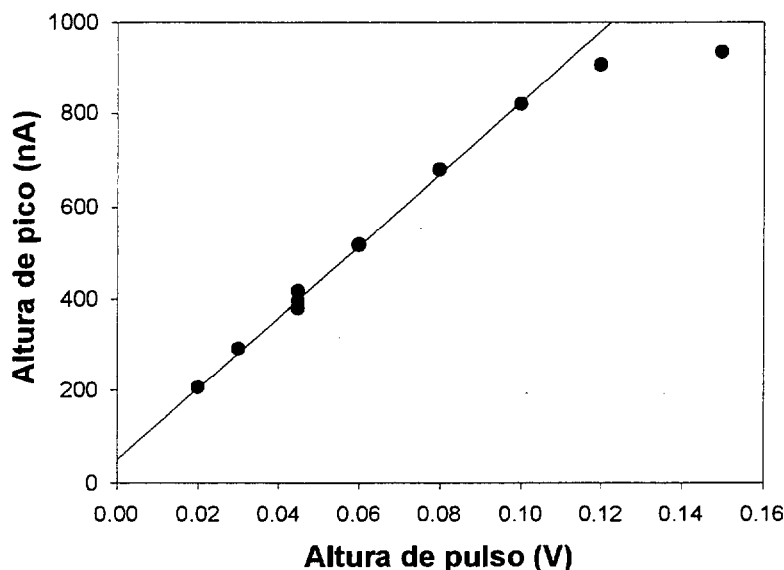


Figura 34. Muestra la evolución de la altura de pico de oxidación del cobre en presencia de catecol en función de la altura de potencial de los pulsos aplicados durante la obtención de los polarogramas. Muestra: [Cu]= 55 nM. pH=7.8 (NBS). Velocidad de barrido= 240 mV s⁻¹. Tiempo de deposición= 90 s.

La figura 34 muestra un aumento en la sensibilidad a medida que se incrementa la altura de potencial que se experimenta en cada pulso hasta un valor de 100 mV. A 180 mV la señal se pierde. El origen del incremento en la altura de pico es debido a un ascenso tanto en la intensidad catódica registrada debida a la mayor magnitud del pulso como en la intensidad anódica que origina la oxidación del Cu provocada por el descenso de potencial de la parte final del pulso. Por otro lado se verifica un desplazamiento de la altura de pico hacia potenciales más positivos con este incremento (ver figura 35).

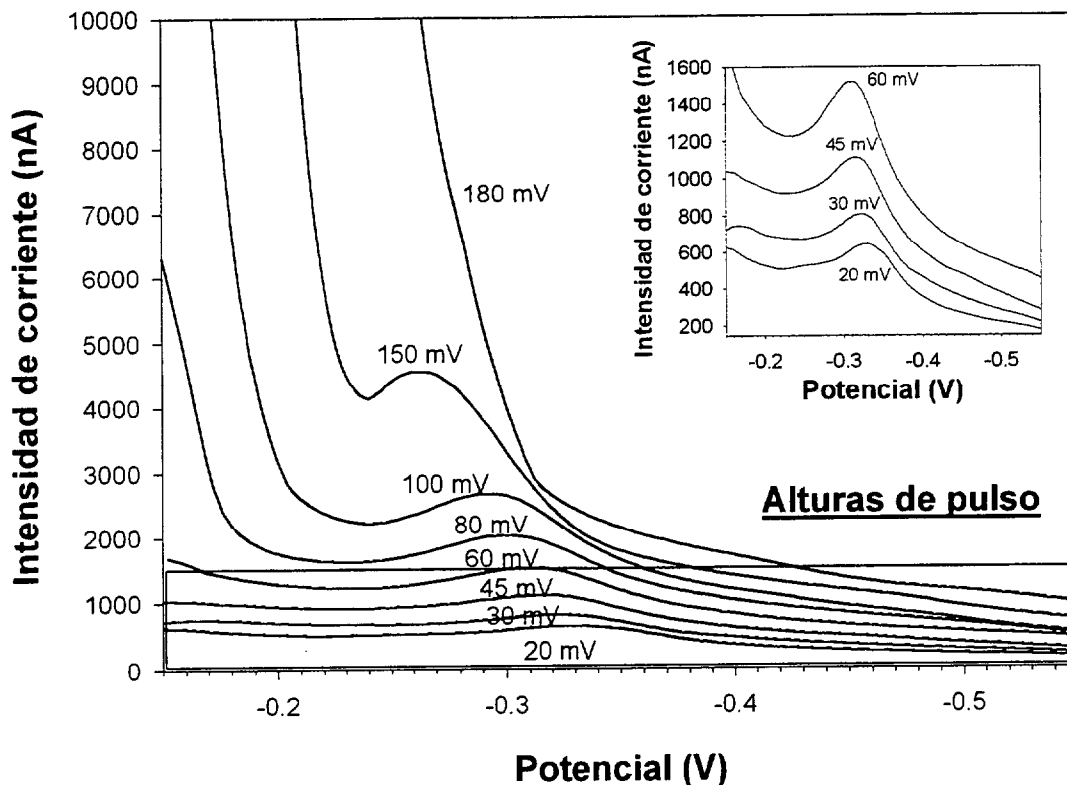


Figura 35. Polarogramas correspondientes a las alturas de pico presentadas en la figura 34. Los números indican la altura de pulso a que han sido obtenidos. La figura insertada corresponde a la zona de la figura incluida en el recuadro.

Este desplazamiento del potencial de pico origina que el pico se vaya solapando progresivamente con el del mercurio, pasando de ser un pequeño pico en la base del pico del mercurio a valores de 20-30 mV, a ser un hombro de gran tamaño sobre el pico del Hg a valores de 150 mV, e incluso a una altura de pulso de 180 mV, el pico del cobre ya no existe englobado por el del mercurio. Como durante el proceso de obtención de alturas de pico en los polarogramas se va a producir una resta de blanco resulta imprescindible hallar un valor de altura de pulso que permita una alta sensibilidad con un mínimo solapamiento entre los picos descritos, es decir, que reduzca la línea base del polarograma para permitir una resta de señales efectiva. Hay que tener en cuenta que los picos mostrados corresponden a una alta concentración de cobre (55 nM), y que será necesario resolver picos de mucha menor magnitud. Para seleccionar un valor adecuado se ha representado la proporción entre la altura de pico obtenida a los distintos valores de altura de pulso y el mínimo que alcanza el polarograma a potenciales más positivos que el pico del cobre y que es a partir de donde se traza la tangente para cuantificar un pico (considerando a esto como un valor de la línea base).

El resultado es una parábola cuyo mínimo se halla en torno a 0.045 V, que es el valor finalmente escogido como altura de pulso en los polarogramas.

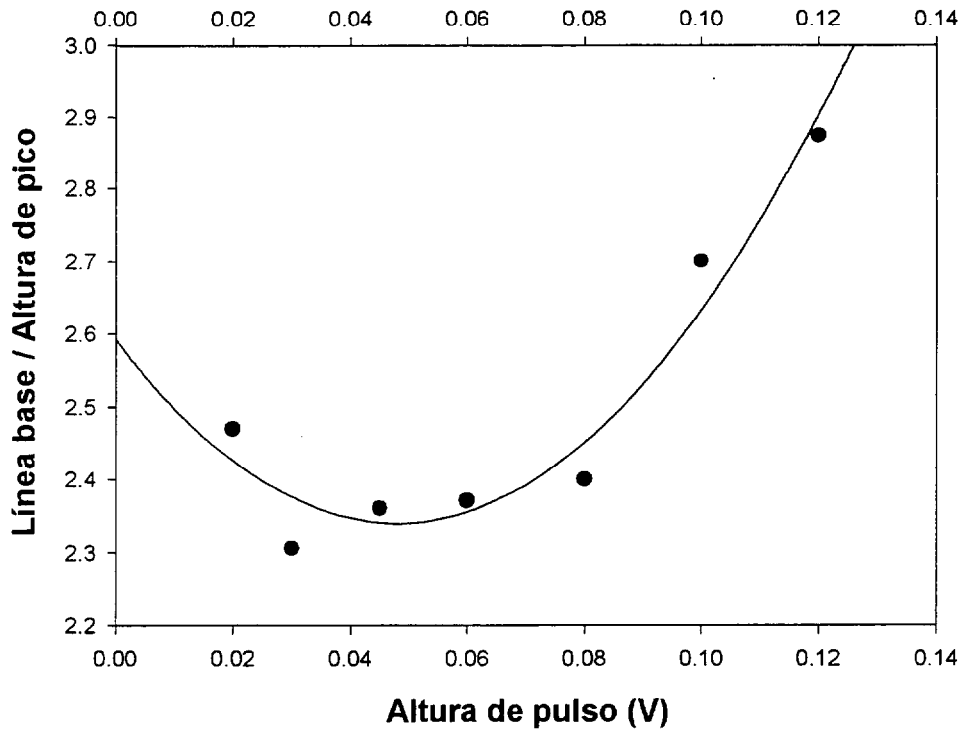


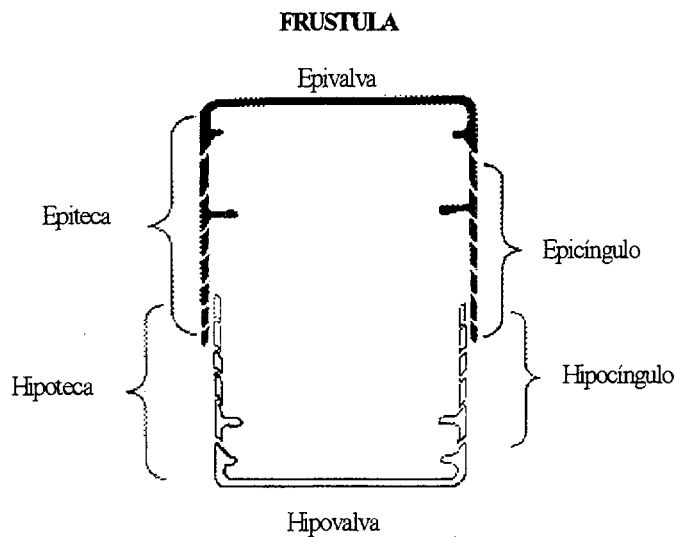
Figura 36. Representación de la relación línea base/altura de pico frente a la altura de pulso de los polarogramas antes presentados.

**DESCRIPCION Y PROPIEDADES ACIDO BASE
DE LAS ALGAS**

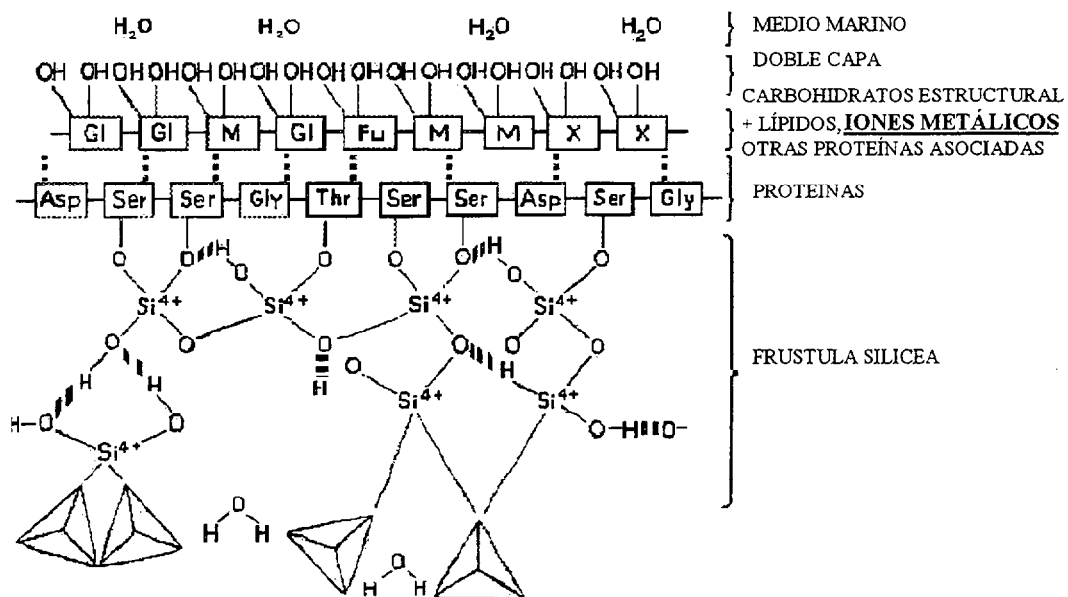
4.1 MORFOLOGIA

Las dos algas seleccionadas, *Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira weissflogii* son diatomeas, por tanto pertenecen a la división Crisofita, clase Bacilaroficea. Las diatomeas son las responsables de la mayor parte de la producción primaria oceánica y son mayoritarias en regiones tan importantes como las zonas de afloramiento y las plataformas continentales. Su principal característica viene dada por la estructura y composición de su pared celular. Durante la formación de la misma se deposita sílice que llega a ser su principal constituyente en muchos casos (10-85% según especies). La fracción orgánica de esta pared la constituyen proteínas

(enriquecidas en glicina, serina y tiomina) y polisacáridos, y en mucha menor medida lípidos y hexosaminas. A medida que la célula madura se incrementa la presencia de carbohidratos en la superficie de la pared celular. La estructura de esta pared es muy peculiar, y consta de una frústula formada por dos teclas situadas



de forma opuesta de modo que la célula queda incluida entre ellas. A la superficie mayor y plana de estas teclas se le llama valva y a sus laterales cíngulo. A continuación se presenta un esquema de la zona externa de la pared celular de diatomeas.



En cuanto a la liberación de materia orgánica al medio, no se conoce de forma detallada. En general, los productos más frecuentes son polisacáridos y ácido glicólico (Darley, 1979), pero varían su concentraciones y naturalezas en función de múltiples factores: luminosidad, condición fisiológica, composición celular, densidad de población, etc. Entre los componentes de los polisacáridos exudados se han detectado gran variedad de moléculas (ramosa, manosa, galactosa y fructosa según Darley, 1979).

Con el fin de poder extrapolar los resultados al conjunto de las diatomeas se han escogido dos de características opuestas. *Phaeodactylum tricorutum* pertenece al tipo pennales (caracterizadas por una forma alargada vistas desde su plano valvar), vive en zonas intermareales preferentemente (por lo tanto soporta salinidades elevadas), carece de sílice en su pared celular y es solitaria (aunque a concentraciones muy elevadas las células suelen agruparse uniéndose por su plano valvar). *Thalassiosira weissflogii* es por el contrario una diatomea central (simetría circular desde su plano valvar), que habita en zonas de estuario (por lo que prefiere bajas salinidades) y posee una pared celular altamente silificada, colonial con estructuras filamentosas quitinosas que unen las distintas células.

4.2 PROPIEDADES ACIDO-BASE

En el estudio de la interacción de los metales traza con el material particulado resulta de especial importancia el comportamiento anfotérico de las superficies biológicas, dado que la adsorción de un catión debe venir precedida en muchas ocasiones de una desprotonación del grupo funcional superficial. Por todo ello se llevó a cabo una caracterización de las propiedades ácido-base de las superficies de las dos diatomeas objeto de estudio.

Las constantes de equilibrio que rigen las reacciones de las sucesivas protonaciones de un grupo funcional de la pared celular del alga son:

$$K_{a1}^s = \frac{\{\equiv SH\} \cdot [H^+]}{\{\equiv SH_2^+\}} \quad (59)$$

$$K_{a2}^s = \frac{\{\equiv S^-\} \cdot [H^+]}{\{\equiv SH\}} \quad (60)$$

A estas constantes de equilibrio se les conoce con el nombre de constantes microscópicas. Esto es debido a que son propias de un grupo funcional concreto, para

una carga de la superficie del alga concreta. Esto se explica por el hecho de que la pérdida de un protón de este grupo origina una reducción local de la carga superficial del alga, afectando a las constantes microscópicas de los grupos adyacentes. Por lo tanto esta constante de acidez microscópica (proporcional a la energía libre de protonación, $\Delta G_{\text{protonación}} = -RT \ln K^s$), consta de dos términos.

$$\Delta G_{\text{protonación}} = \Delta G_{\text{intrínseca}} + \Delta G_{\text{electrostática}} \quad (61)$$

El primero viene dado por la energía del proceso de disociación exclusivamente, y resulta proporcional a la constante de acidez intrínseca de la reacción de desprotonación de ese grupo funcional superficial. El otro término corresponde a la energía necesaria para exportar a ese protón desde la superficie del alga hasta el seno de la disolución. Es por lo tanto función de la carga que posea la superficie biológica y se expresa a través del factor de Boltzman :

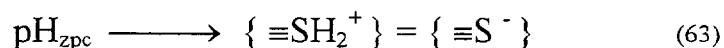
$$K_{\text{al}}^s = K_{\text{al(intrínseca)}}^s \cdot \exp\left(\frac{F\Psi_s}{RT}\right) \quad (62)$$

Ψ_s es el potencial interno de superficie, o sea, la diferencia de potencial existente entre el punto superficial donde se encuentra el grupo funcional y el seno de la disolución.

$K_{\text{al(intrínseca)}}^s$ equivale a la constante de acidez del grupo funcional en el supuesto de que todos los demás grupos de la superficie del alga no poseyeran carga.

El valor de Ψ_s no es posible calcularlo experimentalmente. Pero sin embargo es posible determinar las constantes microscópicas integradas de la superficie del alga experimentalmente a varias cargas superficiales y extrapolar su cálculo para una carga superficial cero y obtener de este modo las constantes de acidez intrínsecas de la superficie del alga.

Para ello es necesario definir previamente el pH de cero carga superficial (pH_{zpc}): es el pH del medio donde se encuentra el alga en el que la carga del total de la superficie del alga es nula. Corresponde por tanto al pH en el que la concentración de grupos funcionales biprotonados (de carga positiva) iguala a la de desprotonados (dotados de carga negativa).



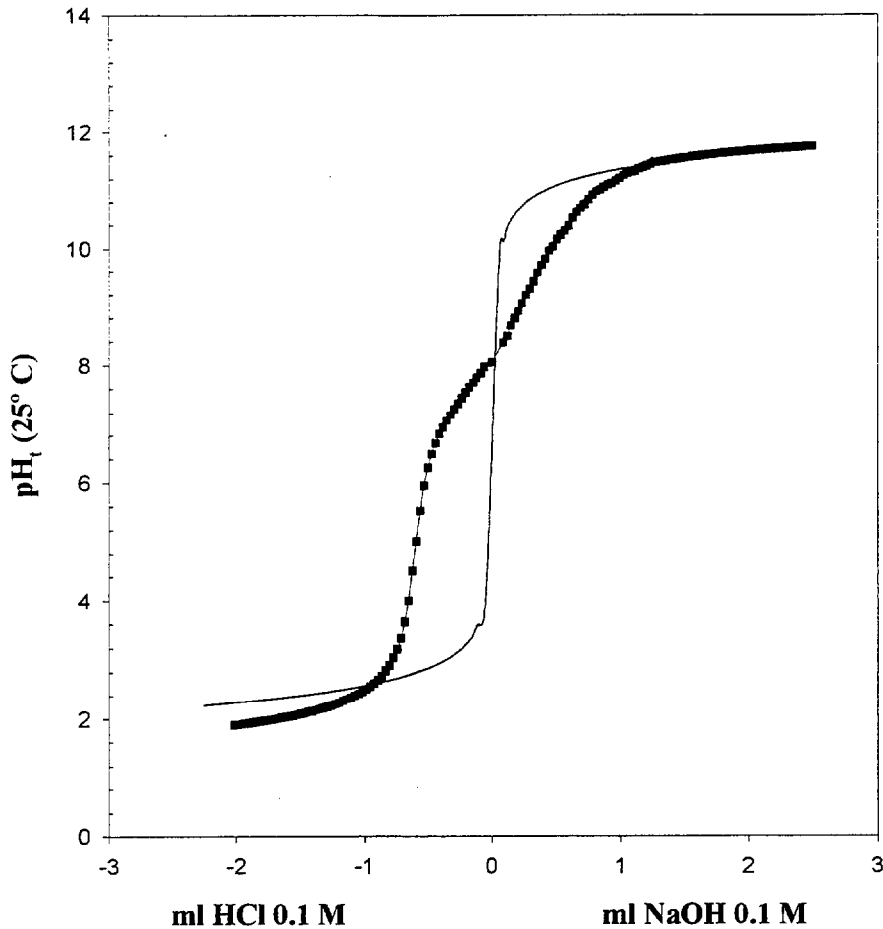


Figura 37. Valoración acidimétrica de una suspensión de 4 g l⁻¹ de *Phaeodactylum tricorutum* en NaCl 0.7 M. La línea corresponde a una valoración de una disolución 0.7 M en NaCl.

Para el cálculo de lo antes referido es preciso realizar una valoración ácido-base de la superficie del alga. Esto se consigue a través de valoraciones con ácido y con base de suspensiones altamente concentradas de las diatomeas de trabajo con el fin de poder detectar las diferencias de pH entre una valoración del medio por separado y del medio con las algas. En las figuras 37 y 38 aparecen las valoraciones ácido-base de las superficies tanto de *Phaeodactylum tricorutum* como de *Thalassiosira weissflogii*.

El siguiente paso consiste en el cálculo de la carga superficial celular durante las valoraciones. Esta variable se obtiene a partir de la expresión:

$$Q = \left\{ \equiv \text{SH}_2^+ \right\} - \left\{ \equiv \text{S}^- \right\} = \frac{c_{\text{Ac}} - c_{\text{Bas}} + [\text{OH}^-] + [\text{H}^+]}{a} \quad (64)$$

donde c_{Ac} y c_{Bas} son las concentraciones de ácido y base añadidas al medio de valoración y a es el número de células por litro, o el número de gramos de alga en peso seco por litro, dependiendo de las unidades de trabajo.

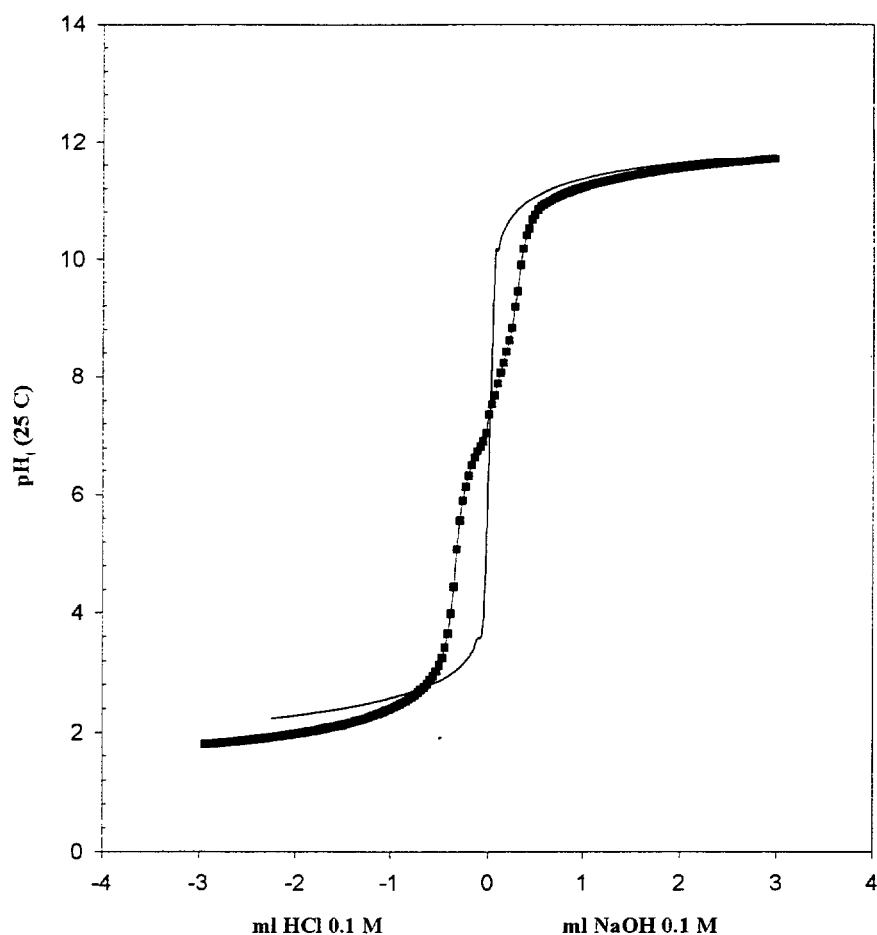


Figura 38. Valoración acidimétrica de una suspensión de 4 g l^{-1} de *Thalassiosira weissflogii* en $\text{NaCl } 0.7 \text{ M}$. La línea corresponde a una valoración de una disolución 0.7 M en NaCl .

Es necesario también determinar la máxima capacidad de intercambio de protones de la superficie, obtenido a través del cálculo de los protones consumidos por el alga durante la valoración (concentración de ácido añadido menos pH).

Los valores de las constantes de acidez intrínsecas se obtienen mediante una representación de las constantes de acidez condicionales obtenidas a cada pH , frente a la carga superficial que corresponde a las células a ese pH . El resultado es una distribución lineal cuyo corte en el eje de ordenadas da una estimación del valor de las constantes intrínsecas de las dos reacciones de protonación de la superficie de la diatomea. Los valores de las constantes de acidez condicionales se calculan a cada pH considerando que la carga superficial (Q) es igual a la concentración de grupos completamente protonados ($\{ \equiv \text{SH}_2^+ \}$) a valores de pH menores que el pH de carga superficial nula, e igual a la concentración de grupos funcionales superficiales completamente desprotonados ($\{ \equiv \text{S}^- \}$), a pH mayores que el pH_{zpc} . De tal forma que la aproximación al valor de la especie unida a un solo protón y de carga nula es la resta al valor de la

capacidad máxima de protonación, de Q en cada punto. La figura 39 es el resultado del proceso descrito para *Phaeodactylum tricornutum*. El resultado para *Thalassiosira weissflogii* aparece en la figura 40.

El valor preciso del pH de carga superficial cero se obtiene promediando el resultado anterior (ecuación 65).

$$pH_{zpc} = \frac{1}{2} [pK_{a1}^s(\text{intrinsec o}) + pK_{a2}^s(\text{intrinsec o})] \quad (65)$$

En el caso de las dos diatomeas estudiadas la gran heterogeneidad de los grupos funcionales presentes en su superficie (grupos amino, hidroxilo, ácido, etc.) permite el cálculo de al menos tres pK a través de las valoraciones acidimétricas de sus superficies. Los resultados de las constantes de acidez aparecen en la tabla X.

pK_{a1}	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	9.12 ± 0.02	<i>Thalassiosira weissflogii</i>	9.14 ± 0.02
pK_{a2}		6.68 ± 0.03		6.72 ± 0.03
pK_{a3}		3.77 ± 0.02		3.96 ± 0.02

Tabla X. Valores de las constantes de acidez intrínsecas determinadas de las superficies de *Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira weissflogii* mediante valoraciones acidimétricas.

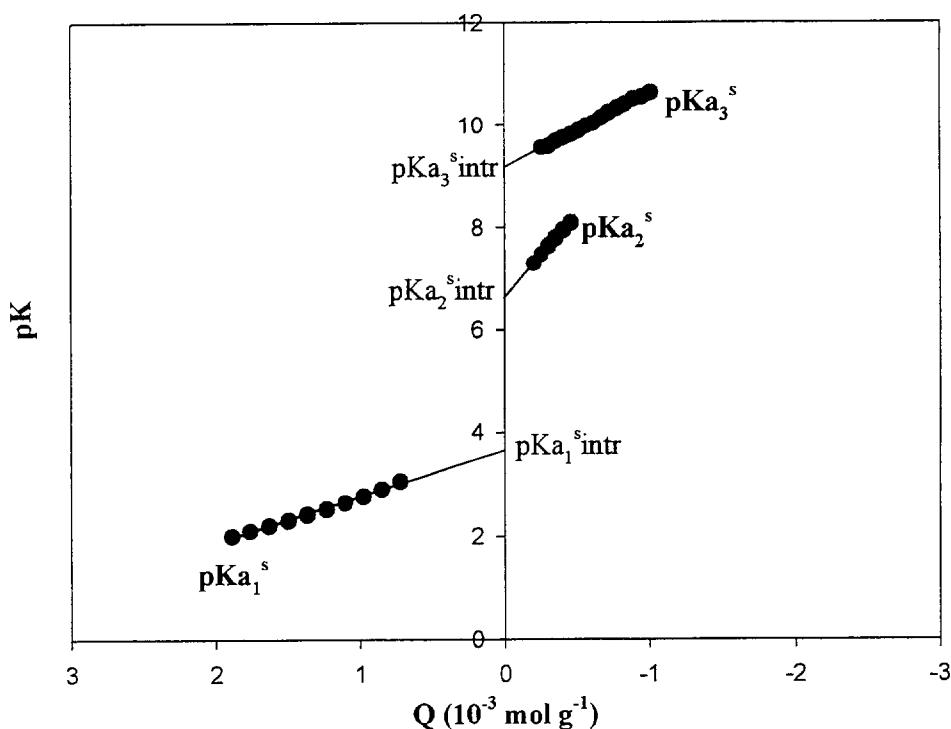


Figura 39. Cálculo de las constantes de acidez intrínsecas de la superficie de *Phaeodactylum tricornutum*.

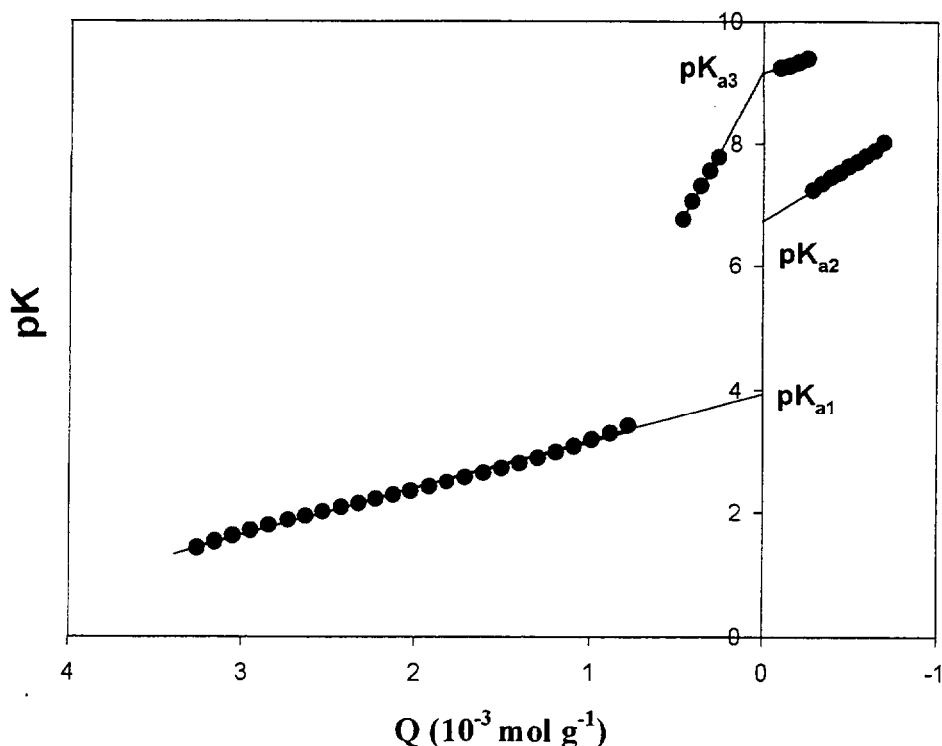


Figura 40. Cálculo de las constantes de acidez intrínsecas de la superficie de *Thalassiosira weissflogii*.

Resulta posible estimar la naturaleza de parte de los grupos superficiales de la superficie de ambas diatomeas en función de los valores de sus constantes de acidez. Los pK_{a1} justo por debajo de 4 deben estar relacionados con la presencia grupos terminales carboxílicos de proteínas que presentan una desprotonación a pH en torno a 4. Los valores de pK_{a3} de 9.1 de ambas diatomeas están relacionados con la existencia de grupos α -amino de asparagina, alanina o leucina en la parte proteica de la pared celular (pK entre 8 y 9.5), o con el grupo oxidrilo fenólico de la cadena lateral de tirosina. Valores muy próximos de estas dos constantes de acidez referidas fueron encontrados en la superficie de la diatomea *Cyclotella cryptica* por Kiefer *et al.* (1997). En cuanto al valor de pK_{a2} en torno a 6.7 se halla relacionado con la presencia de aminas primarias, probablemente debidas a la presencia de quitina ($pK_{a2}=6.8$; González-Dávila y Millero, 1990).

ESTUDIOS DE ADSORCION

En el medio marino resulta importante para determinar la especiación de metales considerar la fracción de los mismos que es enlazada por las membranas y paredes celulares del plancton. Al ser la adsorción el paso previo a la inclusión intracelular de elementos traza (Khummongkol *et al.*, 1982; Gadd, 1988; Xue y Sigg, 1990; González, 1995 y otros) es importante estimar la magnitud y fuerza de este enlace superficial. Para determinar el alcance de la adsorción por parte de la superficie de diatomeas se procedió a valorar distintas suspensiones de dos especies seleccionadas (*Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira weissflogii*) con un metal (plomo y cobre para cada caso) utilizando la técnica de voltametría anódica de redisolución.

Las algas fueron conservadas hasta el momento de ser utilizadas en los experimentos, en crecimiento en una cámara de cultivo en un medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962).

Las adiciones de Cu(II) y Pb(II) se realizaron a partir de diluciones de disolución standard para espectroscopia de absorción atómica (Aldrich) en agua bidestilada con un sistema Milli-Q

Los análisis fueron realizados utilizando los parámetros descritos en el apartado de optimización de la técnica de voltametría anódica de redisolución: 50 mV de altura de pulso, 2 mV s⁻¹ de velocidad de barrido, -0.6 V (Cu²⁺) o -0.8 V (Pb²⁺) de potencial de deposición y con un tiempo de deposición de 2 minutos. Para esto se dispuso del equipo electroquímico mencionado en el apartado de descripción de la técnica voltamétrica.

Para poder diseñar un experimento que permita evaluar el alcance de la reacción de adsorción de los elementos traza en disolución con las superficies biológicas es necesario realizar un estudio previo de la cinética de adsorción y de inclusión celular del cobre y plomo con las algas referidas. Este proceso ya ha sido definido por varios autores como un modelo en dos pasos (Khummongkol *et al.*, 1982; Xue y Sigg, 1990; González, 1995), uno primero de adsorción que transcurre en el orden de unos pocos minutos, y uno posterior de difusión a través de membrana, que supone la inclusión intracelular del metal.

Las figuras 41, 42 y 66, 67 muestran esta cinética y parecen fijar en un tiempo de hasta quince minutos el intervalo que emplean las superficies biológicas para equilibrarse con el metal presente en disolución para el caso del cobre, y dar paso a la difusión a través de la membrana del metal. En los estudios cinéticos con plomo este

tiempo parece ser más corto y son unos diez minutos los que invierte el primer paso de adsorción en completarse. De ahí el siguiente diseño experimental:

Cada muestra del cultivo creciendo en un medio de cultivo f/2 (Guillard y Ryther, 1962) era retirada en fase de crecimiento exponencial y centrifugada a 4000 rpm durante 15 minutos. El extracto celular era lavado cuatro veces con agua filtrada por 0.45 μm con filtros lavados en medio ácido para evitar contaminaciones y se estimaba la concentración celular final mediante el empleo de un hemocitómetro. De la suspensión resultante se tomaba un volumen tal que un litro de agua de mar (de origen 1 milla al noroeste de la isla de Gran Canaria, a profundidad de 10 metros, y filtrada por 0.45 μm) tomara una concentración celular en la diatomea de estudio de entre 1 y $3 \cdot 10^7$ cél l⁻¹. Esta suspensión fue guardada en el refrigerador un máximo de 24 horas para permitir el equilibrio entre el alga y el medio, pero impedir por otra parte la división celular durante este periodo y minimizar su metabolismo.

La suspensión fue dividida en submuestras a las que se dejaba alcanzar la temperatura de estudio en un baño termostático con agitación e inmediatamente se añadía la disolución de cobre o plomo de tal forma que la suspensión alcanzaba una concentración entre $1-100 \cdot 10^{-9}$ M. El pH era regulado mediante la adición de HCl o NaCl (0.1 M). Tras 10 ó 15 minutos de equilibrio, según el metal estudiado, la muestra era filtrada por 0.45 μm . De este modo se permitía que la suspensión de diatomeas experimentara la adsorción sobre la superficie celular del metal en disolución, pero sin permitir que comenzara el proceso de inclusión intracelular.

Para poder estimar las distintas especies presentes del metal se dividía la muestra filtrada en dos. La primera era analizada directamente por voltametría de redisolución anódica, por lo que quedaba medida la fracción de cobre o plomo libre y complejoado inorgánicamente que es lábil para la técnica descrita. La segunda muestra era acidificada y tratada con microondas (630 vatios, 30 minutos) para lograr la destrucción de la materia orgánica presente en disolución. Por lo tanto una vez descompuestos los ligandos disueltos del medio la muestra era analizada por voltametría anódica de redisolución obteniéndose la concentración total disuelta de metal (complejado tanto inorgánica como orgánicamente). La cantidad de metal adsorbido se estima por diferencia entre la cantidad reseñada y el metal total presente en la muestra (metal presente en el agua utilizada de partida más la cantidad añadida antes de los diez minutos de equilibrio).

La precisión de la estimación de la fracción asimilada fue comprobada tras disgregar una suspensión de células de *Phaeodactylum tricorutum* en una mezcla concentrada de $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ (1:1). De tal forma que el cobre detectado en esta muestra ácida era similar dentro del error experimental a la resta respecto del cobre añadido del cobre total disuelto del medio.

5.1 ADSORCIÓN DE COBRE

5.1.1 Cinética

En las figuras 41 y 42 se muestran las cinéticas de asimilación de Cobre(II) en presencia de $2.03 \cdot 10^7$ células l^{-1} de *P. tricorutum* y $2.08 \cdot 10^7$ células l^{-1} de *T. weissflogii*, respectivamente. Se ha representado en ambos casos, la variación en la concentración tanto de cobre lábil, como de complejoado por los ligandos en disolución, así como en la concentración asimilada (adsorbida más la incluida intracelularmente).

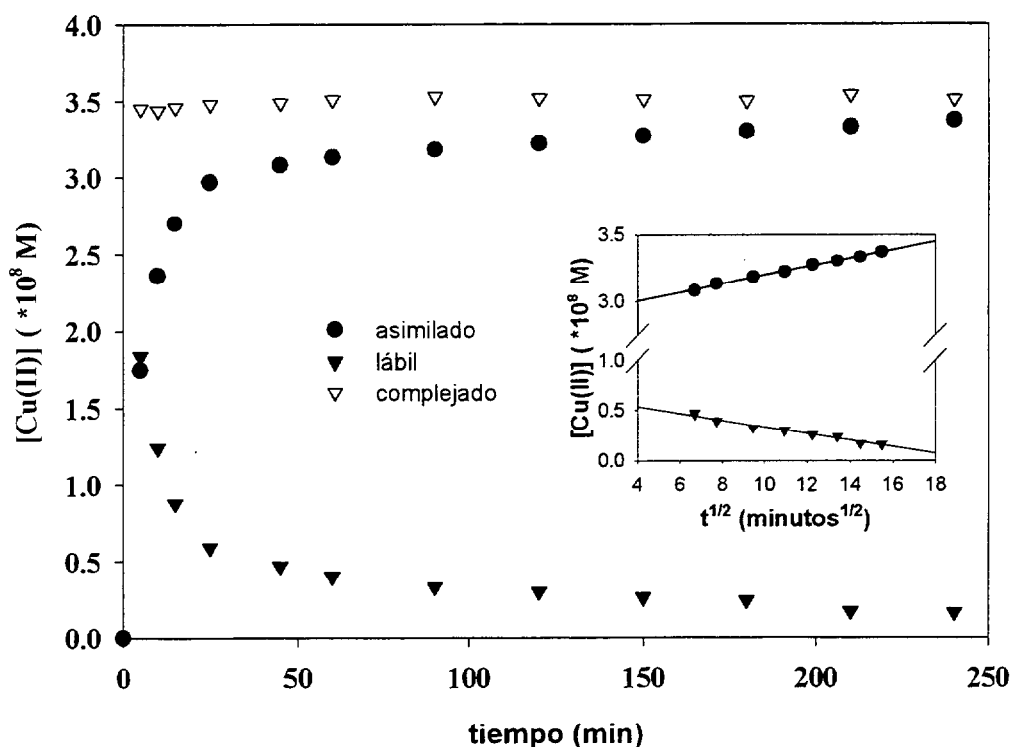


Figura 41. Cinética de asimilación del Cu(II) por parte de *Phaeodactylum tricorutum* ($2.03 \cdot 10^7$ cél. l^{-1}). $[\text{Cu(II)}]_{\text{añadida}} = 7.02 \cdot 10^{-8} \text{ M}$. La figura insertada ofrece la variación de las fracciones asimilada y lábil con la raíz del tiempo una vez que comienza la inclusión.

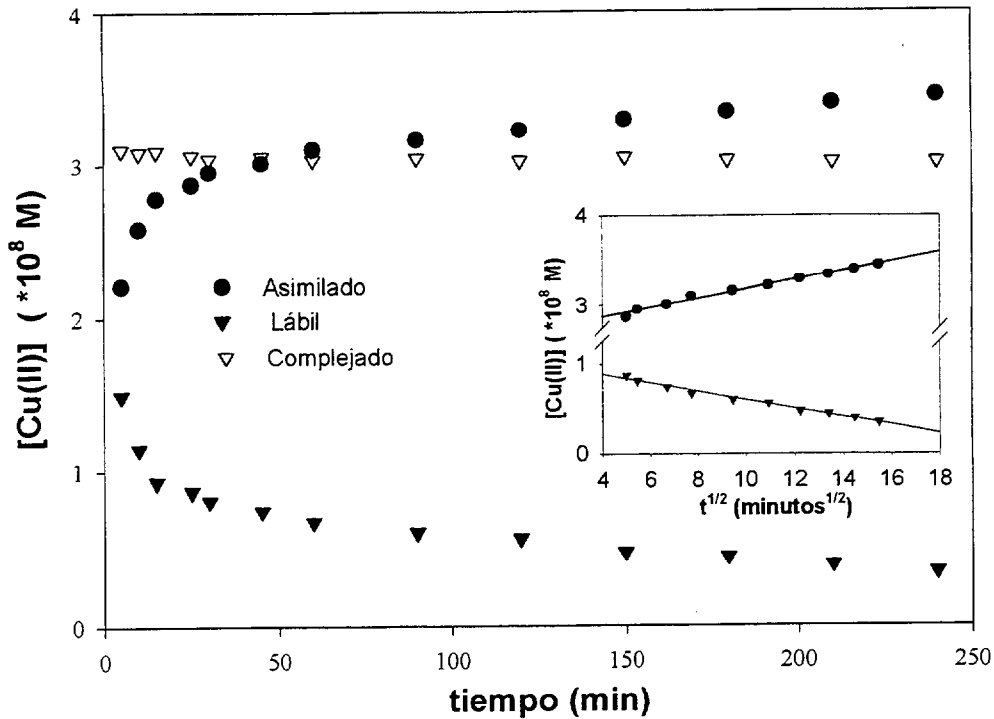


Figura 42. Cinética de asimilación del Cu(II) por parte de *Thalassiosira weissflogii* ($2.08 \cdot 10^7$ cél. l^{-1}). $[Cu(II)]_{añadida} = 6.8 \cdot 10^{-8}$ M. La figura insertada ofrece la variación de las fracciones asimilada y lábil con la raíz del tiempo una vez que comienza la inclusión.

La concentración de cobre inorgánico disuelto (lábil), decrece rápidamente en ambos casos durante los primeros minutos, hasta que su concentración alcanza valores inferiores a 2.5 nanomoles en el caso de *P. tricorntutum* y menores de 5 nanomoles para *T. weissflogii*. A partir de este instante, su concentración disminuye más lentamente. Después de este periodo de rápida desaparición, tanto la concentración de cobre asimilado como la de lábil varían con la raíz cuadrada del tiempo, indicando que esta segunda etapa de inclusión de cobre es un proceso controlado por difusión. De acuerdo con el modelo difusional parabólico de Crank (1976), la concentración de cobre asimilado después de los primeros 15 minutos de contacto de la disolución con las algas, viene descrita por las siguientes ecuaciones:

Phaeodactylum tricorntutum:

$$[Cu(II)]_{asimilado} = 2.82(\pm 0.03) \cdot 10^{-8} + 0.037(\pm 0.003) \cdot 10^{-8} \cdot (t)^{1/2} \quad (66)$$

Thalassiosira weissflogii:

$$[Cu(II)]_{asimilado} = 2.66(\pm 0.02) \cdot 10^{-8} + 0.051(\pm 0.002) \cdot 10^{-8} \cdot (t)^{1/2} \quad (67)$$

La concentración de Cu(II) asimilada por ambas algas es similar, con un valor de $1.66 \cdot 10^{-15}$ moles Cu(II)/célula asimilado al cabo de 4 horas de contacto, lo que se corresponde con un 50% de la concentración inicial. Por otra parte, la concentración de cobre disuelto y complejoado orgánicamente se corresponde con el 50% y 45% de la

concentración inicial para la suspensión de *P. tricornutum* y *T. weissflogii*, respectivamente. De esta manera, entre el 95 y el 99 % del cobre inicial añadido, esta presente complejado orgánicamente con los ligandos del medio, tanto disueltos como en la superficie e interior de las células. Sólo un 1% para el caso de *P. tricornutum* y un 5% para la suspensión de *T. weissflogii* esta presente como cobre inorgánicamente disuelto, del que considerando un coeficiente α de 25.7 (Santana Casiano *et al.*, 1995) da como resultado después de 4 horas de equilibrio, un pCu de 10.2 y de 9.84, respectivamente. También puede ser observado de las figuras 41 y 42, que la incorporación de cobre por parte de ambas células procede del cobre presente en forma inorgánica, que también sigue una cinética en dos pasos, con el segundo paso caracterizado por una cinética lenta descrita por una dependencia lineal con la raíz cuadrada del tiempo. En todo momento, la concentración de cobre disuelto y complejado orgánicamente se reduce ligeramente con el tiempo, lo cual es consistente con lo indicado anteriormente y con una competición entre los ligandos orgánicos producidos o excretados por las células de fitoplancton en la suspensión celular y sus grupos funcionales, por el ion cúprico en disolución.

De acuerdo con los resultados de la cinética de incorporación, y dado que en este apartado estamos interesados en el estudio del proceso de adsorción de los metales traza sobre los grupos superficiales de las células de fitoplancton, el tiempo requerido para el equilibrio de adsorción se ha determinado como la intersección de las dos líneas de comportamiento cinético descrito, y mantenido en todos los estudios en 15 minutos.

5.1.2 Determinación de capacidades complejantes

Dado que el cobre evidencia tener una gran afinidad por los ligandos presentes en disolución en medios naturales, y que esto supone una competencia con el cobre adsorbido sobre la superficie celular, previamente al estudio de las capacidades de enlace de las superficies algales, se determinó la capacidad complejante de las muestras de agua de mar a utilizar con los ligandos presentes de forma natural. Las figuras 43 y 44 muestran claramente como la adición de algas al medio cambia la capacidad complejante del agua de mar.

La obtención de los parámetros de complejación se hizo asumiendo un modelo de complejación basado en una estequiometría 1:1 de la reacción de enlace del cobre y los

ligandos. El gráfico de linealización basado en el método de van den Berg-Ruzic presenta un aspecto lineal, y por lo tanto se calcularon los parámetros de complejación (concentración total de ligando y constante de estabilidad condicional asociada), correspondientes a la supuesta presencia en el medio de un solo tipo de ligando. Se debe tener en cuenta que los parámetros de complejación que se obtengan son medias ponderadas de los compuestos de diversa naturaleza y características complejantes que estén presentes en el agua de mar. Asimismo existe la limitación de utilizar la voltametría de redisolución anódica, cuya ventana espectral asociada impide estimar el aporte al valor de la constante de estabilidad condicional de ligandos de muy alta constante de estabilidad.

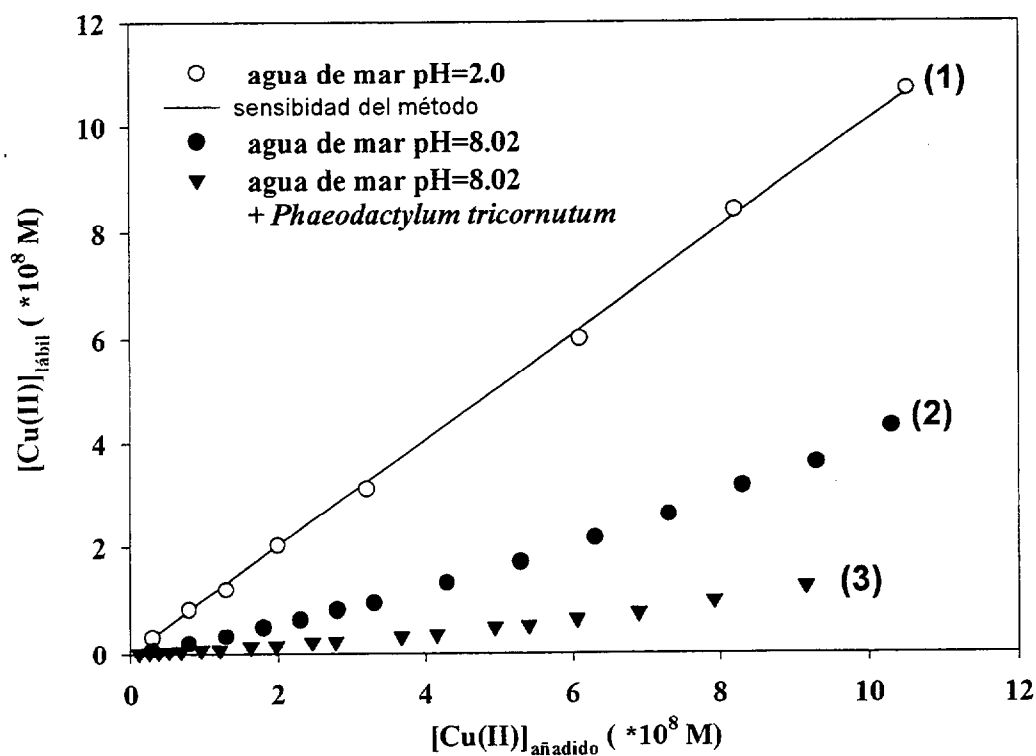


Figura 43. Valoración cúprica del agua de mar en ausencia de algas y tras 36 horas en equilibrio con *Phaeodactylum tricornutum* ($2.06 \cdot 10^7$ cél. l⁻¹).

Las figuras 43 y 44 muestran claramente como la adición de algas (curva 3) cambia la capacidad complejante natural del agua de mar (relación entre las curvas 1 y 2) después de un tiempo de equilibrio. Para ello se dejaba a una muestra de agua de mar equilibrar durante 36 horas con una suspensión de la diatomea. Tras este periodo de equilibrio eran retiradas las células de fitoplancton por filtración por gravedad (sin el

empleo de presión para evitar la lisis celular) y se añadía el metal a la concentración deseada. Después de 12 horas de equilibrio se procedía a determinar la especiación de la muestra. El incremento en la presencia de ligandos orgánicos en disolución debido a la exudación de los mismos por parte de las diatomeas, es el responsable del descenso de la cantidad de cobre lábil estimada (correspondiente a la fracción de metal que permanece complejada por ligandos inorgánicos, o como ion libre, en el seno de la disolución).

La curva 1 representa en ambos casos la determinación de la concentración de cobre total en el agua de mar natural después de la adición de diversas concentraciones de cobre, eliminado el efecto complejante de la materia orgánica disuelta, acidificando a pH=2 con HCl 1.0 M y realizando sobre la muestra un tratamiento de microondas.

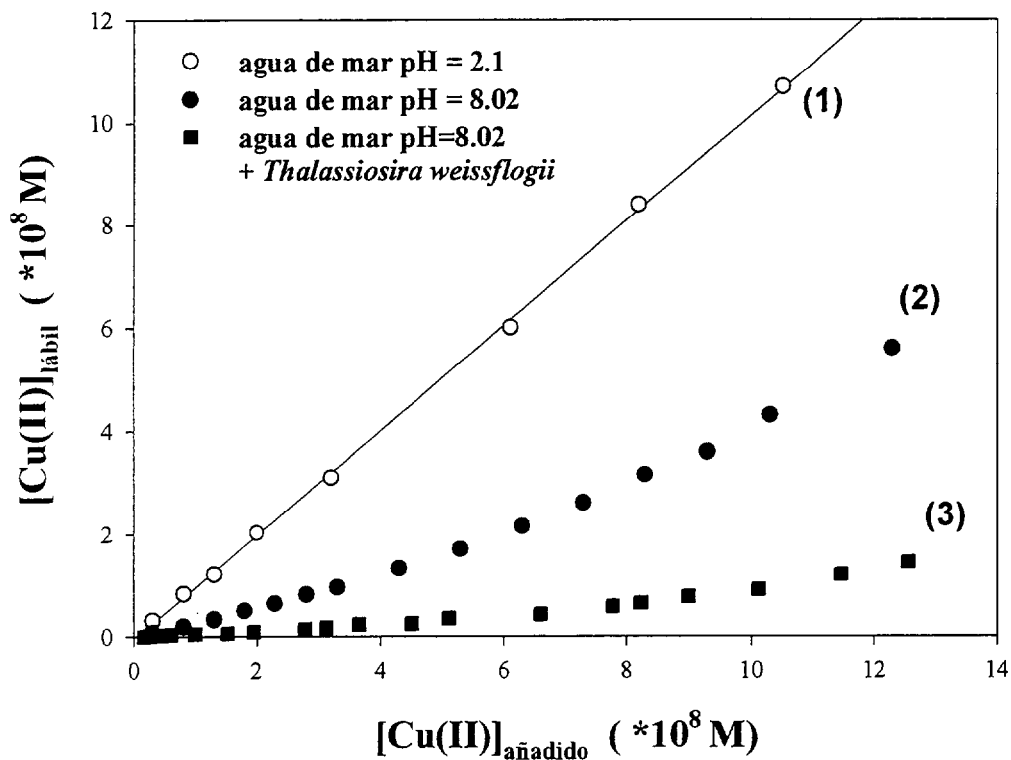


Figura 44. Valoración cúprica del agua de mar en ausencia de algas y tras 36 horas de equilibrio con *Thalassiosira weissflogii* ($2.21 \cdot 10^7$ cél. l⁻¹).

Haciendo uso del método de las adiciones estándares se comprueba que la determinación de cobre por este método se encuentra dentro del error experimental del mismo.

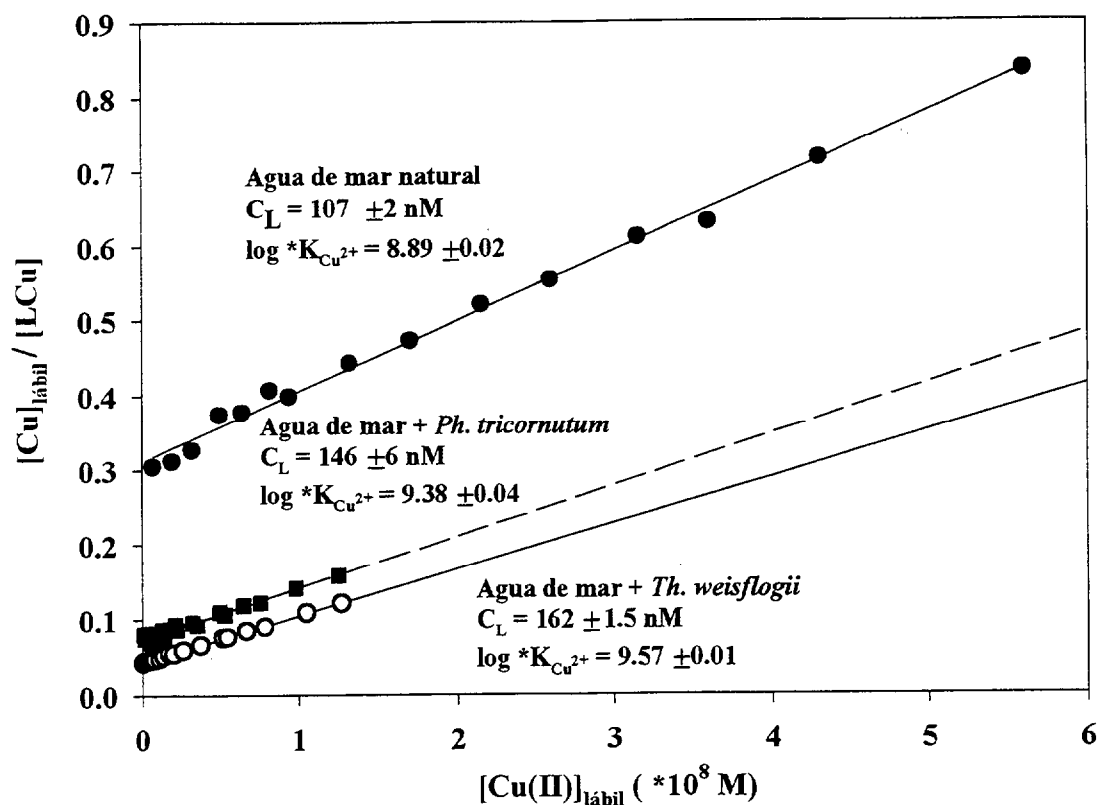


Figura 45. Representación de van den Berg-Ruzic de los valores de obtenidos en la valoración cúprica del agua de mar utilizada en el experimento, tanto sola, como con la incorporación de *Phaeodactylum tricoratum* ($2.06 \cdot 10^7$ cél. l^{-1}) y *Thalassiosira weissflogii* ($2.21 \cdot 10^7$ cél. l^{-1}).

La figura 45 muestra la determinación de la capacidad complejante del agua de mar tanto en la ausencia como después de la presencia de $2.06 \cdot 10^7$ células l^{-1} de *Phaeodactylum tricoratum* y $2.21 \cdot 10^7$ células l^{-1} de *Thalassiosira weissflogii* representada de acuerdo con la expresión de van den Berg-Ruzic

$$\frac{[Cu^{2+}]}{[L - Cu]} = \frac{[Cu^{2+}]}{C_L} + \frac{1}{K'_{cond(Cu^{2+})} C_L} \quad (68)$$

donde C_L es la concentración total de ligandos y $K'_{cond(Cu^{2+})}$ la constante de estabilidad condicional con respecto a la concentración de metal libre. De acuerdo con Millero y Hawke (1992) y Santana Casiano *et al.* (1995) para un $pH = 8.02$ se ha utilizado un valor, para normalizar la constante de estabilidad condicional con respecto a la concentración libre de cobre, del coeficiente α de 25.7.

La tabla XI, muestra un resumen de los datos obtenidos para cada una de las dos algas analizadas en presencia de agua de mar superficial tomada a 1 milla de la costa de Gran Canaria.

C_L (nM)	$\log *K_{Cu'}$	$\log *K_{Cu^{2+}}$	alga	C_L (nM)	$\log *K_{Cu'}$	$\log *K_{Cu^{2+}}$
107 ± 2	7.48 ± 0.02	8.89 ± 0.02	Phaeod. tricornutum	146 ± 6	7.97 ± 0.04	9.38 ± 0.04
			Thalass. weissflogii	162 ± 2	8.16 ± 0.01	9.57 ± 0.01

Tabla XI. Parámetros de complejación del agua de mar previamente a la adición de las algas (columnsa 1 a 3) y después de la adición de las diatomeas (columnas 4 a 6), transcurridas 36 horas de contacto. Valores a $pH_{total}=8.02$. $\alpha_{Cu'}=25.7$. Concentraciones de algas utilizadas: $2.06 \cdot 10^7$ células l^{-1} de *Phaeodactylum tricornutum* y $2.2 \cdot 10^7$ células l^{-1} de *Thalassiosira weissflogii*.

La concentración total de ligandos para el agua de mar original es de 107 ± 2 nM, con un valor medio para la constante de estabilidad condicional de 8.89. Estos valores son consistentes con valores publicados por otros autores para aguas oceánicas, aún considerando que se utilizan diferentes ventanas de detección (González Dávila, 1995; Seritti et al., 1986; Buckley y van den Berg, 1986). La Tabla XI también muestra como la adición de las células de fitoplancton incrementa los valores de la concentración de ligandos hasta 146 ± 6 nM para el caso de la adición de $2.06 \cdot 10^7$ células l^{-1} de *P. Tricornutum*, y hasta 162 ± 2 nM para la adición de $2.2 \cdot 10^7$ células l^{-1} de *T. weissflogii*, incrementándose de manera importante también la fuerza media de los ligandos presentes después de la adición de las algas, pasando a 9.38 y 9.57, respectivamente, para las células estudiadas.

Considerando que este método de tratamiento de las interacciones metal-ligando orgánico sólo determina constantes medias ponderadas, sí que se puede concluir a partir de estos resultados que estas algas exudan al medio ligandos con una constante de estabilidad superior a la media ponderada de los existentes en el medio original y que van a contribuir a incrementar el valor de la constante de estabilidad condicional de la complejación, y la concentración de cobre ligado orgánicamente, alterando de esta manera la especiación del cobre.

Si consideramos que la adición de estas concentraciones de algas al medio incrementa el valor de la concentración de ligandos en 40 nM para la *P. tricornutum* y la constante en 0.5 unidades, se puede realizar una determinación aproximada de las características del conjunto de los ligandos exudados por estas células al medio, considerando un balance de masas para los mismos. A través de este cálculo, se obtiene que para el caso de células de *Phaeodactylum tricornutum*, los ligandos de esta

diatomea deben poseer un valor de la constante de estabilidad condicional del orden de 9.8. Para el caso de *Thalassiosira weissflogii*, los ligandos deben poseer una constante de complejación de aproximadamente 10. Este cobre disuelto ligado orgánicamente está compitiendo en todo momento con el cobre que puede ser adsorbido por los grupos superficiales, por lo que es importante caracterizar el proceso de adsorción al objeto de realizar modelos de especiación del cobre en el medio marino.

5.1.3 Determinación de capacidades adsortivas

Las figuras 46 y 47 presentan las isothermas de adsorción superficial de las curvas de valoración cúprica obtenidas a partir de suspensiones de *Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira weissflogii* a dos concentraciones distintas de ambas diatomeas, manteniendo las muestras a $\text{pH}_{\text{total}} = 8.02$. El método de trabajo aparece descrito al inicio de este capítulo de adsorción.

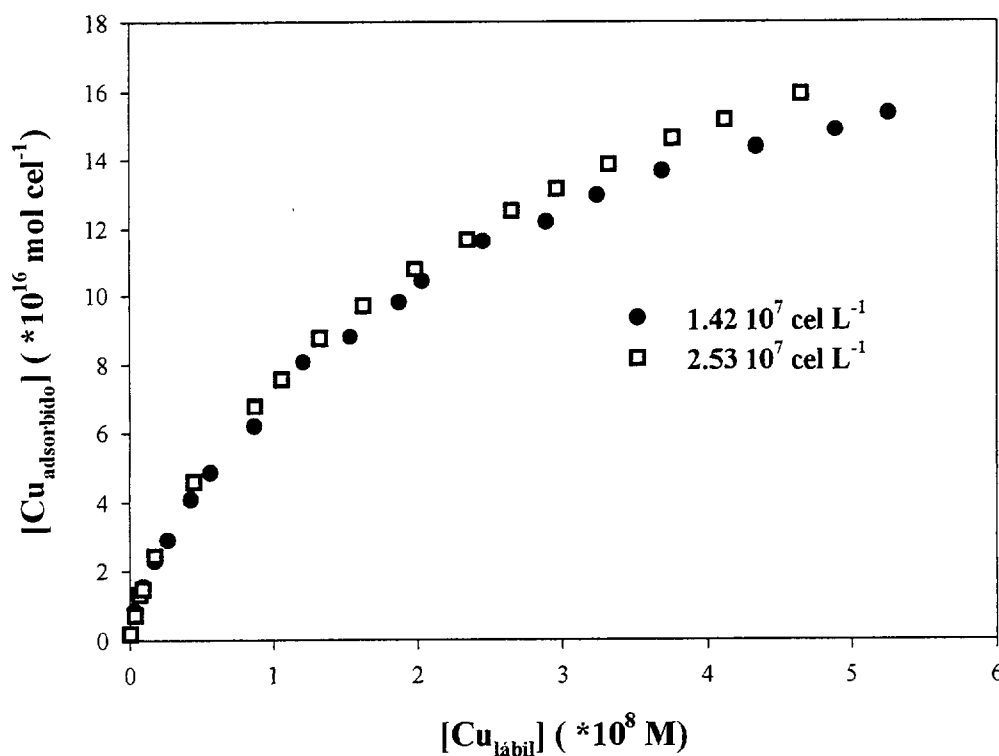


Figura 46. Isotherma de Langmuir de la adsorción de cobre sobre la superficie de *Phaeodactylum tricornutum* a dos concentraciones celulares diferentes.

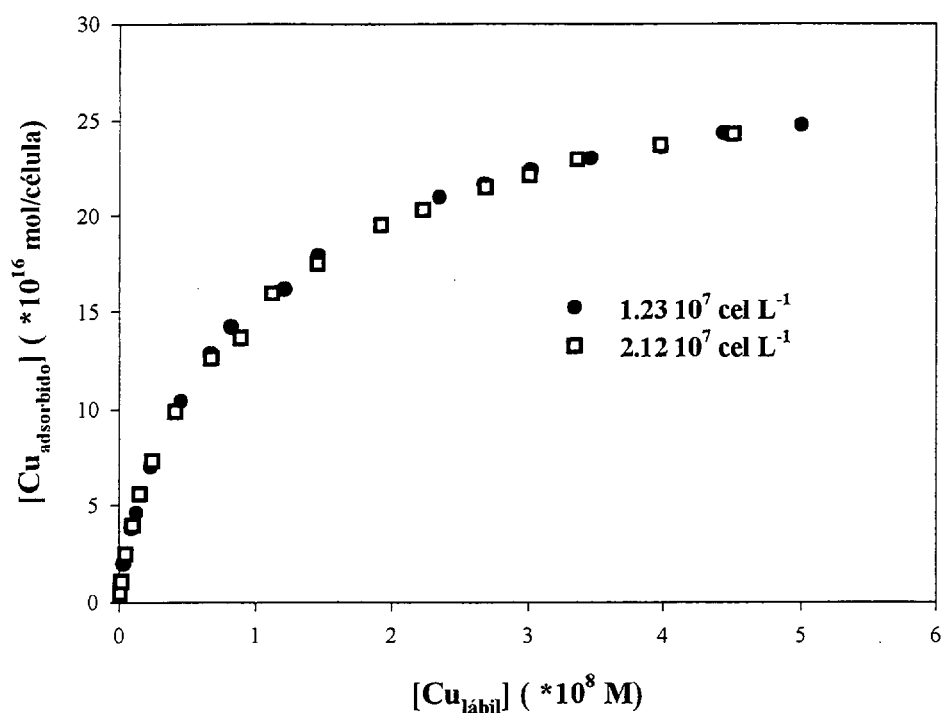


Figura 47. Isoterma de Langmuir de la adsorción de cobre sobre la *superficie Thalassiosira weissflogii* a dos concentraciones celulares diferentes.

A partir de esos datos experimentales, es posible determinar las constantes condicionales y capacidades máximas de adsorción para las algas objeto de estudio bajo las condiciones experimentales aquí mantenidas. Para ello se empleó tanto un ajuste no lineal por mínimos cuadrados de la isoterma de Langmuir aplicando un modelo homogéneo de la superficie celular, como el método mixto iterativo descrito en el apartado de cálculo de capacidades complejantes de este trabajo, que ofrece soluciones para la existencia de dos tipos de grupos funcionales superficiales. Esto es posible debido a que la naturaleza de las reacciones de complejación y adsorción son iguales y a que es posible realizar las mismas consideraciones de partida, como son la estequiometría 1:1 de la reacción, y la imposibilidad de que la fracción de metal enlazada por los ligandos orgánicos resulte lábil para la técnica de voltametría de redisolución anódica.

Por lo tanto se realizó un cálculo de los parámetros de adsorción de los ligandos de mayor constante de estabilidad condicional, a partir de los primeros puntos de la valoración, mediante la transformada de Scatchard, y se utilizaron los últimos puntos, para obtener los mismos parámetros, pero de aquellos ligandos superficiales de menor afinidad por el cobre, con el uso de la transformada de van den Berg-Ruzic. El proceso se repitió hasta converger en una solución, que son las que muestra la tabla XII.

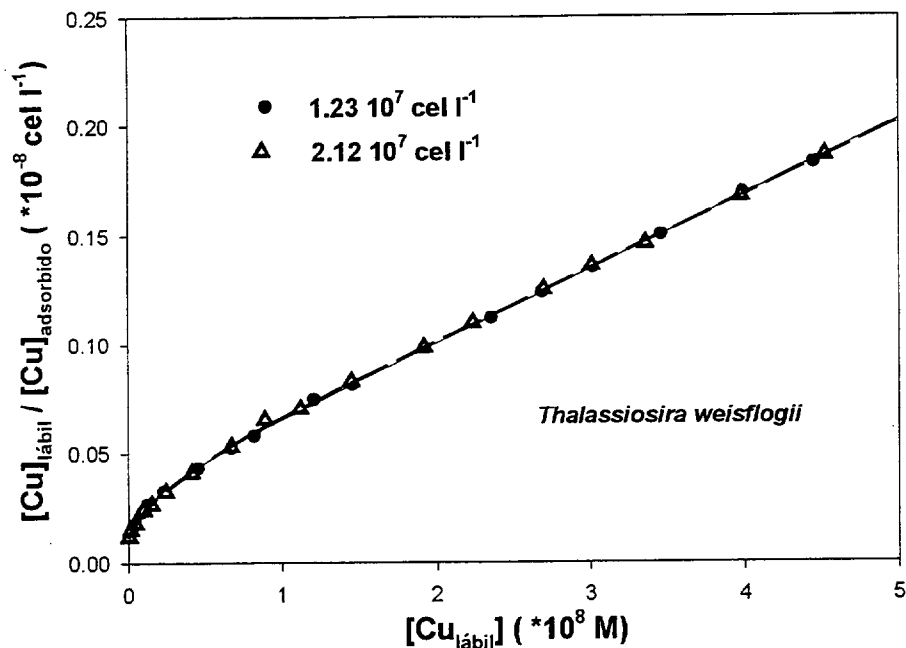


Figura 48. Representación de la linealización de van den Berg-Ruzic de las isothermas de adsorción presentadas en la figura 47. Corresponden a una valoración cúprica de dos suspensiones de *Thalassiosira weissflogii* con distinta concentración celular. Las líneas corresponden a la representación de las concentraciones de cobre calculadas a partir de los parámetros de adsorción obtenidos por el procedimiento iterativo propuesto en este trabajo.

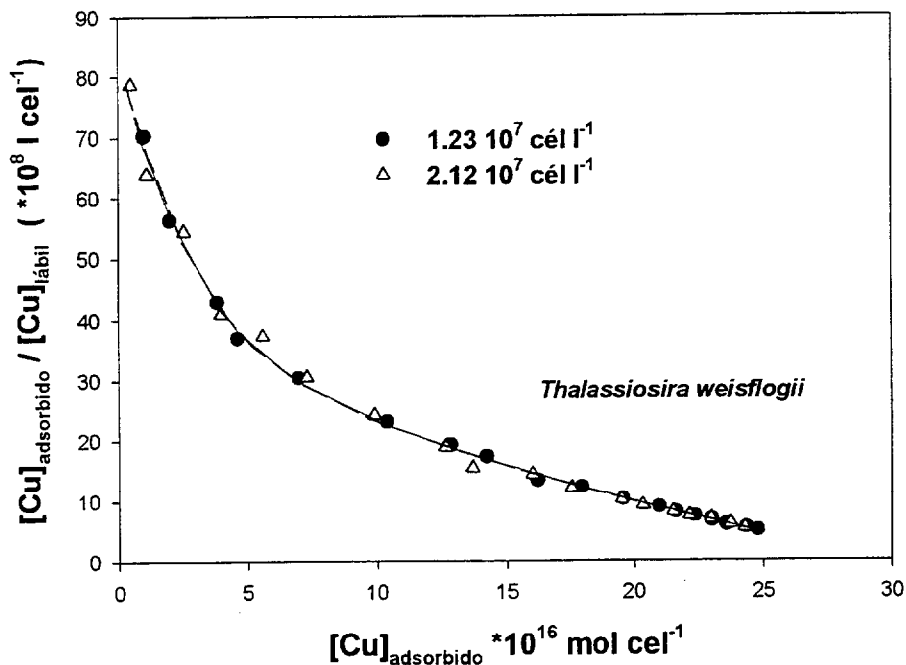


Figura 49. Representación de la linealización de Scatchard de las isothermas de adsorción presentadas en la figura 47. Corresponden a una valoración cúprica de dos suspensiones de *Thalassiosira weissflogii* con distinta concentración celular. Las líneas corresponden a la representación de las cantidades de cobre calculadas a partir de los parámetros de adsorción obtenidos por el procedimiento iterativo propuesto en este trabajo.

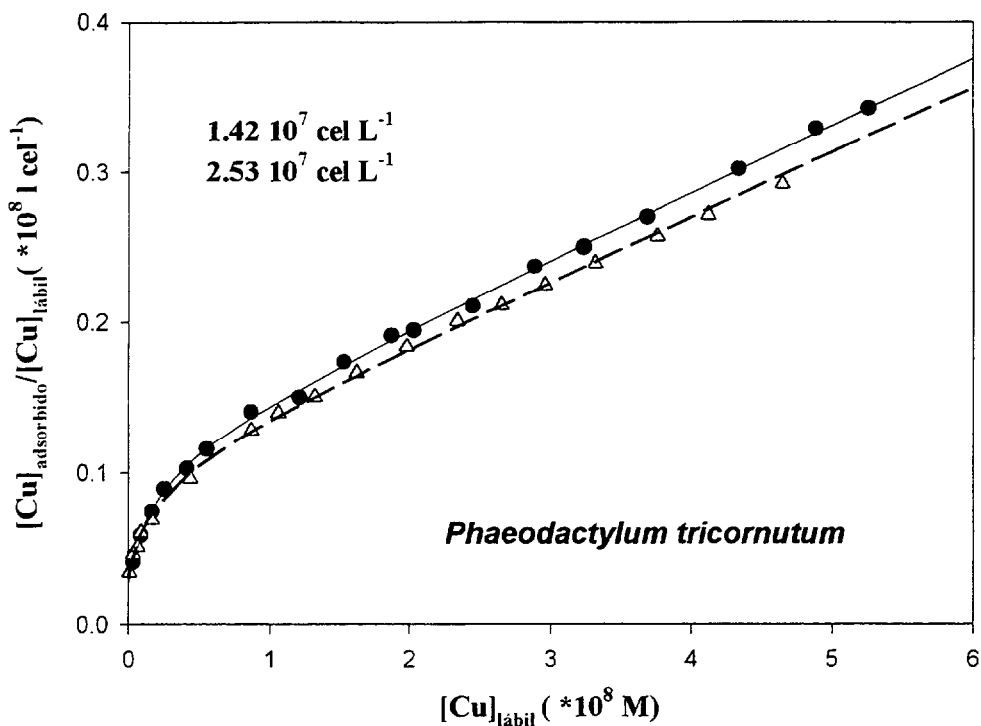


Figura 50. Representación de la linealización de van den Berg-Ruzic de las isothermas de adsorción presentadas en la figura 46. Corresponden a una valoración cúbica de dos suspensiones de *Phaeodactylum tricornutum* con distinta concentración celular. Las líneas corresponden a la representación de las cantidades de cobre calculadas a partir de los parámetros de adsorción obtenidos por el procedimiento iterativo propuesto en este trabajo.

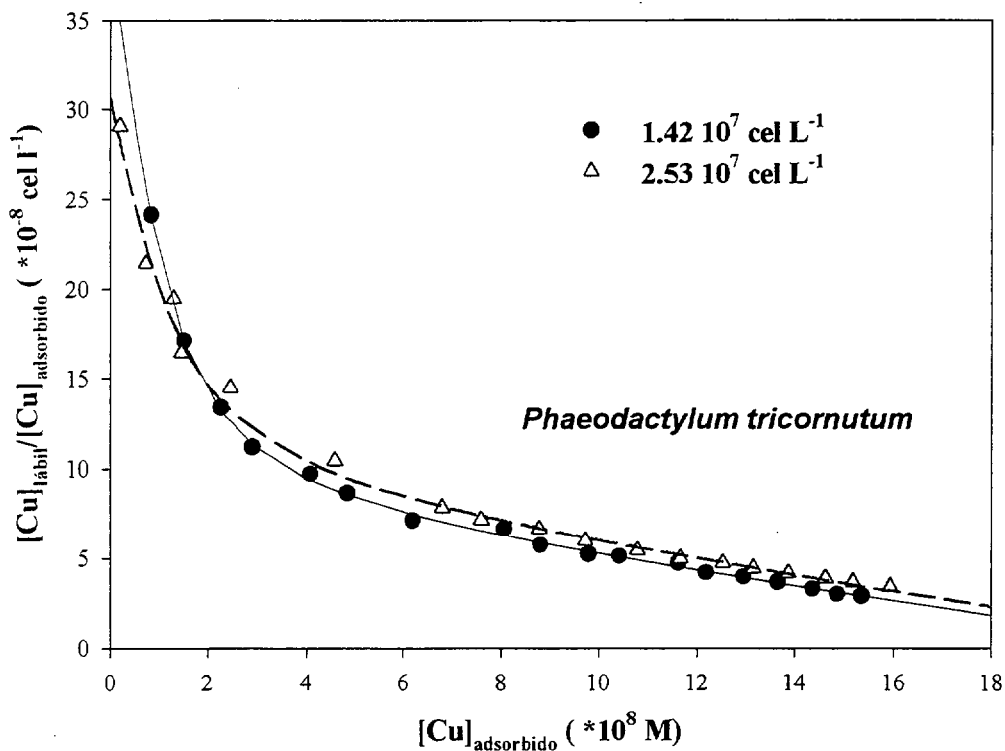


Figura 51. Representación de la linealización de Scatchard de las isothermas de adsorción presentadas en la figura 46. Corresponden a una valoración cúbica de dos suspensiones de *Phaeodactylum tricornutum* con distinta concentración celular. Las líneas corresponden a la representación de las cantidades de cobre calculadas a partir de los parámetros de adsorción obtenidos por el procedimiento iterativo propuesto en este trabajo.

Todas las figuras presentan una evidente curvatura que ha hecho necesario considerar a la superficie de ambas algas de una naturaleza heterogénea y de este modo calcular los parámetros de adsorción considerando la existencia de dos grupos mayoritarios de ligandos superficiales. La tabla XII ofrece el resultado de los parámetros de adsorción para ambas algas. Se debe tener presente que los datos son medias ponderadas de los distintos grupos presentes en la superficie del alga, que tendrán un intervalo de afinidades distintas por el cobre en disolución.

Las constantes de adsorción que se determinan haciendo uso de las ecuaciones (51), (55) y (56) son constantes condicionales, y por tanto dependen de las variables físico-químicas del medio, y del pH del mismo especialmente. Sin embargo, si consideramos la competición del protón por los mismos sitios en los que tiene lugar la adsorción del cobre a través de la expresión de la constante de acidez de estos grupos funcionales, podremos determinar las constantes de adsorción intrínsecas, válidas a cualquier valor de pH, mediante el empleo de la ecuación 50. Para ello se hace uso de las constantes de acidez microscópicas calculadas a cada adición de ácido o base en el apartado de determinación de las propiedades ácido base de las diatomeas objeto de estudio. Los valores obtenidos son de $\log K_{a3}^s = 9.11$ para *Phaeodactylum tricornutum* y $\log K_{a3}^s = 9.30$ para *Thalassiosira weissflogii*, ambos a $\text{pH}_{\text{NBS}} = 8.02$ en NaCl 0.7 M. A partir de estos se pueden determinar las constantes intrínsecas de adsorción del cobre que se presentan en las tablas XII y XIII. Estas constantes intrínsecas son independientes del pH y por lo tanto pueden ser utilizadas para extrapolar los resultados a cualquier otro pH.

Al igual que para lo antes indicado para el caso de la determinación de la capacidad complejante, en las superficies biológicas existen varias clases de sitios superficiales de adsorción, constituidos probablemente por ligandos tanto monodentados como bidentados. Como estos ligandos poseen diferentes afinidades por los metales, los iones metálicos se adsorberán al principio con los ligandos de alta afinidad y posteriormente con los de menor afinidad. En este sentido, la aplicación de un modelo que considere al menos la existencia de dos tipos de sitios es razonable físicamente. Como se puede observar, los valores obtenidos para las diferentes constantes expresadas en las unidades correspondientes por célula, son coincidentes dentro de los errores experimentales.

Alga	cél Γ^{-1} (10^7)	$\Gamma_{\max,1}$ $\cdot 10^{16}$	$\log *K_{H,1}^S$	$\log K_{\beta,1}^S$	$\Gamma_{\max,2}$ $\cdot 10^{16}$	$\log *K_{H,2}^S$	$\log K_{\beta,2}^S$
<i>Phaeod. tricornutum</i>	1.42	1.2 ± 0.1	10.82 ± 0.05	11.94 ± 0.15	21.4 ± 0.5	8.98 ± 0.02	10.10 ± 0.12
	2.53	1.2 ± 0.2	10.67 ± 0.08	11.79 ± 0.16	22.2 ± 0.3	9.01 ± 0.02	10.13 ± 0.12
<i>Thalass. weissflogii</i>	1.23	2.7 ± 0.1	10.74 ± 0.04	12.04 ± 0.16	26.8 ± 0.2	9.37 ± 0.01	10.67 ± 0.11
	2.12	2.7 ± 0.3	10.75 ± 0.06	12.05 ± 0.13	26.7 ± 0.3	9.37 ± 0.01	10.67 ± 0.12

Tabla XII. Parámetros de capacidad adsorptiva de cobre correspondientes a las superficies celulares de *Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira weissflogii*. Las columnas 5 y 8 muestran los parámetros de adsorción intrínsecos (válidos para cualquier pH). La obtención de los parámetros ha sido independiente entre los dos distintos tipos de ligandos superficiales considerados utilizando el método iterativo descrito en este trabajo. Constantes condicionales a pH=8.02. $pK_{\text{Phaeodactylum tricornutum}}(\text{pH}=8.02)=9.11$. $pK_{\text{Thalassiosira weissflogii}}(\text{pH}=8.02)=9.30$.

Los valores obtenidos por el modelo heterogéneo (tabla XII) muestran que la constante de adsorción de los grupos superficiales de menor constante de estabilidad condicional para el caso de la *T. weissflogii* (9.37) es mayor que los de la *P. tricornutum* (9.0), con lo que los sitios de interacción para la *Thalassiosira weissflogii* son más afines por el cobre que los de la *Phaeodactylum tricornutum*, poseyendo además una mayor capacidad máxima de adsorción por célula. La gran diferencia en la constante de estabilidad condicional del segundo tipo de ligandos superficiales definido sugiere que la naturaleza y composición de los mismos debe diferir en gran medida de una diatomea respecto de la otra.

En cuanto a los sitios superficiales de mayor constante de estabilidad condicional, los grupos funcionales de ambas diatomeas tienen una afinidad similar por el ion cúprico en disolución (en torno a 10.75), pero la concentración de estos grupos es del 45% por célula en *Phaeodactylum tricornutum* respecto de la otra diatomea.

La tabla XIII resume las constantes condicionales determinadas utilizando el modelo homogéneo (un único tipo de ligandos superficiales) para las dos algas. Los datos correspondientes a considerar la existencia de un solo tipo de ligando superficial del alga se han presentado para poder comparar la naturaleza de estos ligandos con la de los exudados liberados por las diatomeas y de los que sólo se ha podido obtener una única constante de estabilidad condicional

alga	cél l ⁻¹ (10 ⁷)	Γ _{max} 10 ¹⁶ (mol cél ⁻¹)	log K' _H ^S	log K' _β ^S	log K' _{CuL} (medio)	log K' _{CuL} (exudados)
<i>Phaeod. tricornutum</i>	1.42	20.5 ± 0.5	9.13 ± 0.02	10.25 ± 0.11	9.38 ± 0.04	~ 9.8
	2.53	22.2 ± 0.8	9.11 ± 0.03	10.25 ± 0.12		
<i>Thalass. weissflogii</i>	1.23	28.1 ± 0.4	9.52 ± 0.03	10.82 ± 0.12	9.57 ± 0.01	~ 10.0
	2.12	27.8 ± 0.7	9.52 ± 0.02	10.83 ± 0.11		

Tabla XIII. Muestra para las dos algas los parámetros de adsorción para un supuesto caso de superficie homogénea. La sexta columna muestra la capacidad complejante del medio tras experimentar un equilibrio de 36 horas con una concentración celular de $2.06 \cdot 10^7$ cél l⁻¹ de *Phaeodactylum tricornutum* y de $2.21 \cdot 10^7$ cél l⁻¹ de *Thalassiosira weissflogii*. La última columna muestra los valores estimados durante la determinación de capacidades complejantes de la constante de complejación condicional que deben tener los exudados de las dos algas referenciadas. Las constantes condicionales son a pH_{total}=8.02.

Cuando se comparan los valores obtenidos a través del modelo homogéneo para la adsorción sobre los ligandos superficiales con las correspondientes constantes de complejación por parte de los ligandos disueltos del medio (Tabla XIII), para el caso descrito de dejar estabilizarse una suspensión de diatomeas durante 36 horas, se observa que la fuerza de ambos ligandos son similares (9.53 y 9.57) para el caso de la *T. weissflogii* y ligeramente más altas para los ligandos del medio (9.38 y 9.12) en el caso de suspensiones de *P. tricornutum*. De esta manera, la adición de cobre al medio llevará consigo la competitividad de los ligandos presentes en el agua de mar y de los exudados excretados por el alga con los grupos superficiales de las mismas, manteniendo en todo momento los valores de cobre libre por debajo de los valores nocivos para las células del fitoplancton a concentraciones totales de metal como las del océano. Pero hay que tener en cuenta que la capacidad complejante del medio será también función del alcance de la liberación de exudados por parte de las algas del medio, que como ya se ha descrito excretan compuestos de mayor afinidad por los metales en disolución que la media ponderada de los preexistentes, y que los presentes en la pared celular de las diatomeas.

El hecho de que las afinidades de los exudados que excretan las dos diatomeas sean bastante mayores que las de los grupos funcionales de la superficie del alga (4 veces mayor para el caso de *Phaeodactylum tricornutum* y 3 veces para *Thalassiosira weissflogii*) hace que sea muy importante para el estudio de la especiación de metales en el medio el estudio de la liberación de exudados por parte de las algas. A mayor

liberación de exudados al medio en presencia de una concentración relativamente constante de algas, resultará más difícil que una parte del metal en disolución quede adsorbido sobre superficies algales.

5.1.3 Especiación en un agua próxima a costa

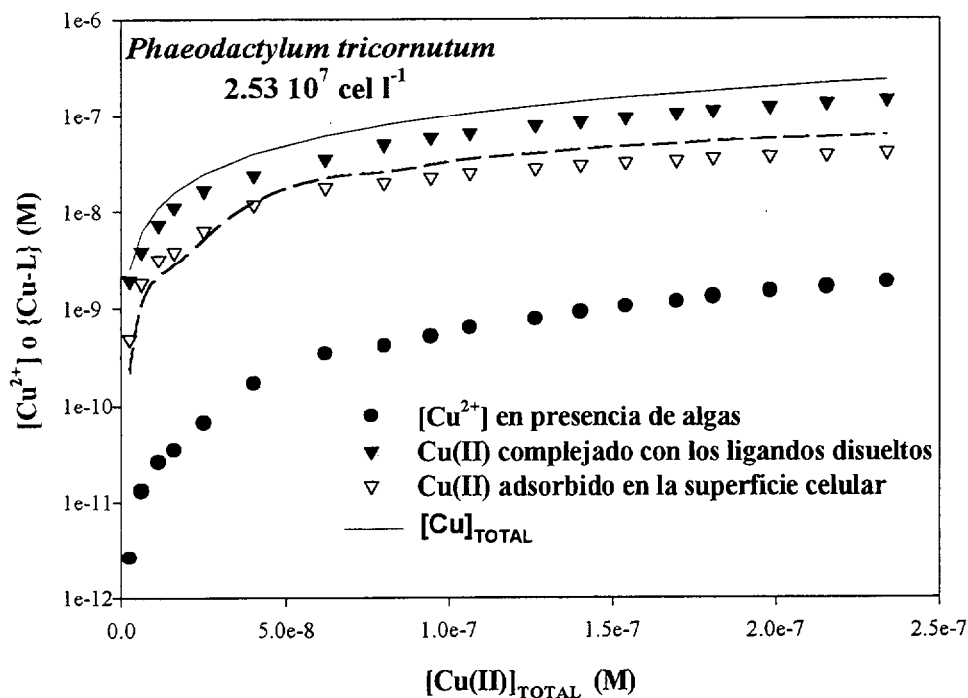


Figura 52. Especiación del cobre en el agua de mar de procedencia próxima a costa con la adición de *Phaeodactylum tricorutum*. Concentración celular $2.53 \cdot 10^7$ células l^{-1} . $pH_{total}=8.02$. La línea discontinua representa la concentración de cobre complejoado orgánicamente que habría con los valores de cobre iónico existentes en el medio en el agua de mar estudiada en el apartado de complejación ($[L]=107nM$; $\log K'=8.89$).

En las Figuras 52 y 53 se encuentra representada la especiación del cobre en la presencia de ambas algas a $pH_{total} = 8.02$ para un agua de mar distinta a la anterior y tomada al norte de Gran Canaria, muy próxima a la costa, junto con la concentración de cobre complejoado que habría en idénticas condiciones, en el agua antes utilizada en la obtención de capacidades complejantes, para poder comparar la especiación en ambas aguas. Este agua es de origen más costero que la anterior, por lo que posee una mayor concentración de cobre inicial (2.75 nM frente a 1.2 nM que tenía la utilizada en los experimentos previos), así como una mayor capacidad complejante de menor constante de estabilidad promediada, característica de este tipo de aguas (Seritti *et al.*, 1986).

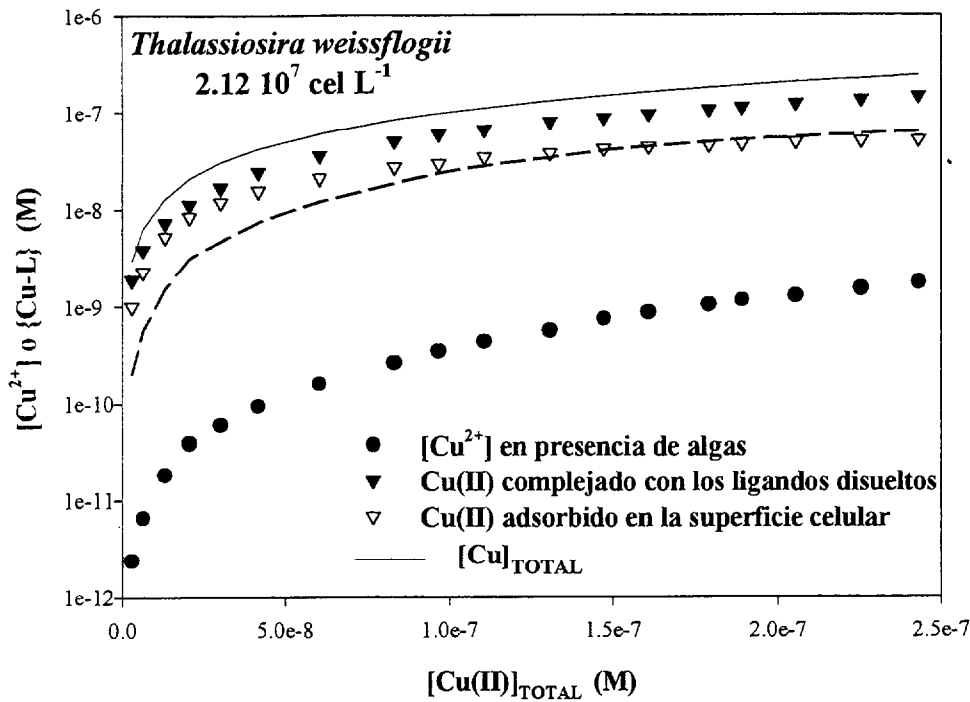


Figura 53. Especiación del cobre en agua de mar de origen costero con la adición de *Thalassiosira weissflogii*. Concentración celular en las muestras de 2.12 10⁷ cél l⁻¹. pH_{total}=8.02. La línea discontinua representa la concentración de cobre complejado orgánicamente que habría con los valores de cobre iónico existentes en el medio en el agua de mar estudiada en el apartado de complejación ([L]=107nM; log K'=8.89).

Es posible calcular a través del número de células presentes, la capacidad adsorptiva de la suspensión celular en moles por unidad de volumen: 5.7·10⁻⁸ M (log K'_{pH=8.02}=9.1) en el caso de *Phaeodactylum tricoratum* y 5.9·10⁻⁸ M (log K'_{pH=8.02}=9.5) para *Thalassiosira weissflogii* según el modelo homogéneo. Esto supone que en el caso de realizar este experimento en el agua de mar de los casos anteriores la adsorción debe prevalecer sobre la complejación a concentraciones bajas de cobre en disolución debido a su menor constante de estabilidad condicional, como puede verse en las figuras 52 y 53. En el caso de *T. weissflogii* al ser mayor su afinidad superficial por el cobre, este predominio de la adsorción sobre la complejación se manifestará en casi todo el intervalo de concentraciones añadidas de cobre utilizado.

Se puede observar que después de 15 minutos de contacto entre las células de fitoplancton con la disolución de cobre en esta agua de origen más costero, va a ser complejada en disolución una mayor concentración de cobre por los ligandos disueltos en el medio procedente del agua costera que por la superficie de las diatomeas, siendo esta diferencia mayor para el caso de la *P. tricoratum*, como consecuencia de la menor afinidad de sus grupos funcionales superficiales por el cobre disuelto que para el caso de *T. weissflogii*. Esto significa que este agua de mar debe poseer una mayor capacidad

complejante que el agua de origen más oceánico, y que su constante de estabilidad condicional es mayor incluso que la constante de estabilidad de los ligandos superficiales de las dos diatomeas. Este hecho queda de manifiesto en la especiación obtenida en el medio sin adiciones de cobre (primer valor de las figuras 52 y 53). En el medio en presencia de *P. tricornutum*, de una concentración de cobre de 2.5 nM, aparecen 1.9 nM complejados en disolución y 0.48 nM adsorbidos sobre la superficie del alga (la concentración complejada por el agua más oceánica a ese valor de pCu sería de 0.23 nM). La especiación en presencia de *T. weissflogii* es la siguiente: de 2.96 nM totales aparecen 1.9 nM como complejados y 1.0 nM como adsorbidos (en el otra agua de mar la cantidad complejada a ese valor de pCu sería de 0.2 nM). Por lo tanto en esta agua más próxima a costa debe existir un conjunto de ligandos en disolución con una constante de complejación condicional mayor que la constante de estabilidad condicional de los grupos funcionales de la superficie de las diatomeas más afines por el cobre.

Estos estudios ponen de manifiesto la importancia de los ligandos orgánicos que existen en disolución en el medio marino y que reducen los valores de las concentraciones de metal libre a niveles no tóxicos, controlando de esta manera la especiación y la biodisponibilidad de los mismos.

Por lo tanto, el agua de mar utilizada en este estudio, posee una mayor capacidad complejante (del orden de $2\text{-}3 \cdot 10^{-7}$ M) de una mayor constante de estabilidad condicional con relación al agua de origen oceánico empleada antes. Esto no apoya la hipótesis de Seritti *et al.* (1986) mencionada para el caso de la comparación de la capacidad complejante cúprica de aguas oceánicas y costeras. Pero como se puede desprender del cálculo de las características complejantes de los exudados de algas, la actividad biológica en la zona de muestreo, va a resultar tan determinante para las características complejantes de la muestra de agua de mar como su cercanía a la costa, haciendo posible este tipo de aguas de gran capacidad complejante de una alta afinidad por el cobre.

5.1.5 PRESENCIA DE OTROS METALES EN EL MEDIO

En un medio tan complejo como lo es el agua de mar, se encuentran en todo momento una serie de metales que pueden interaccionar con sitios de adsorción de la

superficie de las algas y con los ligandos disueltos en el medio. Al objeto de estudiar la especificidad de estos ligandos por el cobre, se realizaron estudios en los que se adicionaba un exceso de Plomo (II) (100 nM) respecto al cobre añadido en cada muestra de la valoración metálica.

5.1.5.1 COMPLEJACIÓN

Para comprobar el efecto sobre los ligandos disueltos originalmente en el agua de mar utilizada, se añadió el plomo a las muestras que previamente habían permanecido 36 horas en equilibrio con las dos diatomeas objeto de estudio ($2.06 \cdot 10^7$ células l^{-1} *Phaeodactylum tricorutum* y $2.21 \cdot 10^7$ células l^{-1} *Thalassiosira weissflogii*). El resultado se ofrece en la tabla XIV, y en las figuras 54 y 55, y muestra la gran especificidad por el cobre frente al plomo que deben poseer los ligandos capaces de complejar al cobre de los medios estudiados (suma de los ligandos presentes en el medio original y de los ligandos exudados por las diatomeas). La constante de estabilidad condicional obtenida es la misma, por lo que se está estudiando la misma fracción de materia orgánica disuelta. En cambio, la capacidad complejante, lejos de disminuir, como debería suceder si el plomo fuera capaz de desplazar a iones cúpricos complejados, incluso parece experimentar un ligero incremento, pero que se halla dentro del error experimental.

Por lo tanto, dado que el conjunto de los ligandos que hay en el medio y que son capaces de complejar al cobre, son altamente específicos, se puede concluir que los ligandos exudados por las dos diatomeas tras 36 horas de equilibrio con el agua de mar, y que son una parte importante del total de ligandos en disolución, también poseen una alta especificidad por el cobre frente al plomo.

C_L (nM)	$\log *K_{Cu}^{2+}$	alga	C_L (nM)	$\log *K_{Cu}^{2+}$
146 ± 6	9.38 ± 0.04	Phaeod. tricorutum	152 ± 6	9.35 ± 0.06
162 ± 2	9.57 ± 0.01	Thalass. weissflogii	172 ± 6	9.50 ± 0.06

Tabla XIV . Comparación entre los parámetros de complejación para el cobre del agua de mar utilizada en este trabajo tras 36 horas de equilibrio con $2.06 \cdot 10^7$ células l^{-1} *P. tricorutum* y $2.21 \cdot 10^7$ células l^{-1} *T. weissflogii*. Los datos corresponden al medio tras la retirada de las células (columnas 2 y 3) y al medio tras la retirada de las células y adición posterior de 100 nM de Pb (columnas 4 y 5).

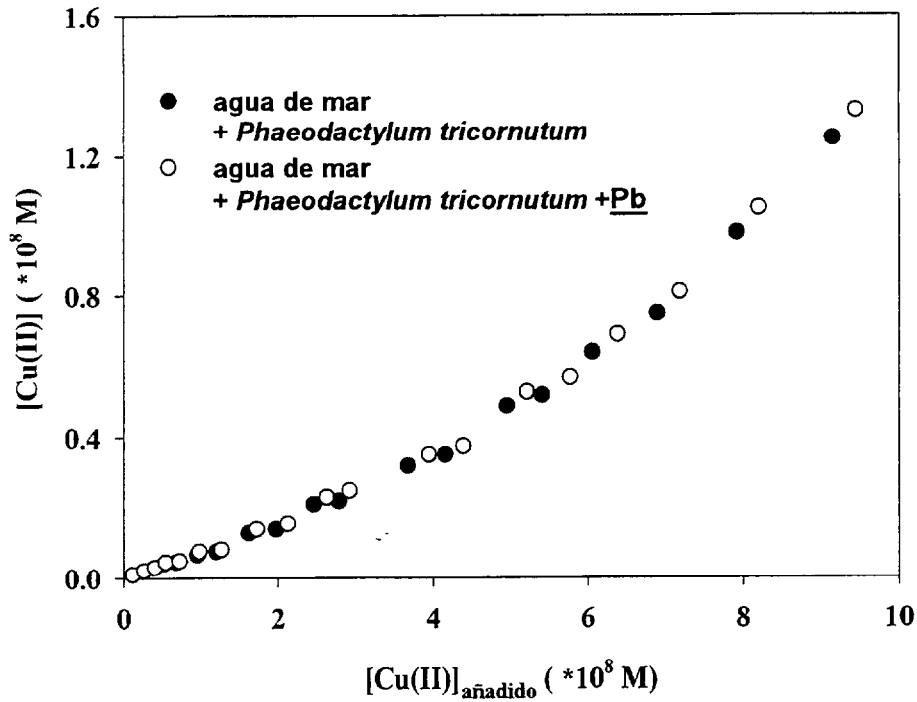


Figura 54. Valoraciones metálicas del agua de mar tras 36 horas de equilibrio con una suspensión de $2.06 \cdot 10^7 \text{ cel l}^{-1}$ de *Phaeodactylum tricorutum*, en presencia y en ausencia de una adición de 100 nM de Pb(II).

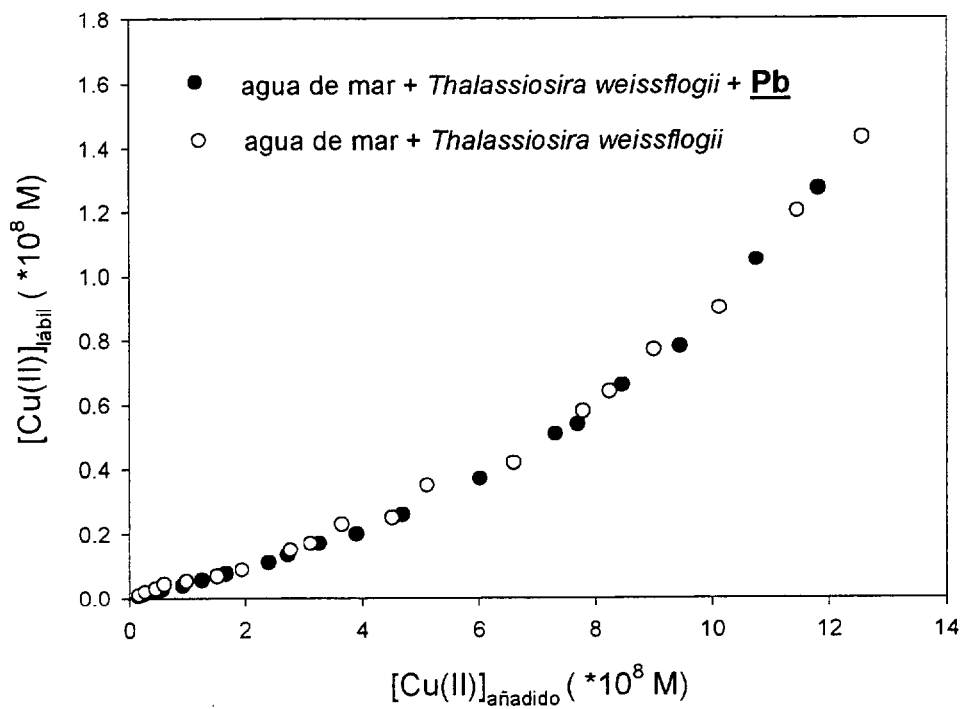


Figura 55. Valoraciones metálicas del agua de mar tras 36 horas de equilibrio con una suspensión de $2.32 \cdot 10^7 \text{ cel l}^{-1}$ de *Thalassiosira weissflogii*, en presencia y en ausencia de una adición de 100 nM de Pb(II).

5.1.5.2 ADSORCION

De igual modo se determinó el efecto de una adición de plomo sobre los grupos funcionales de la superficie de las diatomeas que se encuentren adsorbiendo al cobre. Para ello se añadió plomo en una concentración de 100 nM a cada muestra en equilibrio con la adición de cobre previamente a la inclusión de la suspensión celular del alga, permitiéndose posteriormente equilibrar durante quince minutos la superficie del alga con la disolución para alcanzar el máximo de adsorción. Una adición de 100 nM de plomo al medio de estudio supone añadir una concentración entre 2 y 3 veces la concentración de grupos funcionales capaces de adsorber al cobre, ya que la capacidad adsortiva de una suspensión de $1.42 \cdot 10^7$ cel l⁻¹ de *Phaeodactylum tricorutum* en unidades de concentración por unidad de volumen es aproximadamente de 33 nM, y de 60 nM para una suspensión de $2.12 \cdot 10^7$ cel l⁻¹ de *Thalassiosira weissflogii*. Los resultados obtenidos considerando tanto un modelo homogéneo, como uno heterogéneo se ofrecen en la tabla XV.

Alga		$\Gamma_{\max,1} 10^{16}$	$\log^* K_{H,1}$	$\Gamma_{\max,2} 10^{16}$	$\log^* K_{H,2}$	$\Gamma_{\max} 10^{16}$	$\log^* K_H$
<i>Phaeod. tricorutum</i>	- Pb	1.2 ± 0.6	10.75 ± 0.24	21.8 ± 0.5	9.00 ± 0.02	21.4 ± 0.7	9.12 ± 0.05
	+ Pb	0.8 ± 0.2	10.52 ± 0.2	18.7 ± 0.6	9.08 ± 0.03	18.1 ± 0.6	9.18 ± 0.03
<i>Thalass. weissflogii</i>	- Pb	2.7 ± 0.3	10.75 ± 0.06	26.8 ± 0.3	9.37 ± 0.01	27.9 ± 0.14	9.52 ± 0.01
	+ Pb	1.6 ± 2.0	10.89 ± 0.6	26.3 ± 0.6	9.43 ± 0.03	25.3 ± 0.8	9.59 ± 0.03

Tabla XV. Parámetros de capacidad adsortiva de cobre de las superficies celulares de *Phaeodactylum tricorutum* y *Thalassiosira weissflogii* en ausencia y en presencia de 100 nM de Pb en el medio. Las columnas 3 a 6 presentan los resultados de considerar un modelo heterogéneo de dos tipos de grupos funcionales. Las columnas 7 y 8 presentan los resultados según el modelo homogéneo. Constantes condicionales a pH=8.02.

En el caso de *Phaeodactylum tricorutum* el resultado considerando la existencia de un único tipo de ligando es de una pequeña disminución de la capacidad adsortiva total (de un 15%). La aplicación de un modelo heterogéneo a los resultados para obtener parámetros de adsorción para dos tipos de ligandos superficiales deja ver como la sustitución del cobre por parte del plomo afecta a todos los ligandos superficiales en general. Los ligandos del tipo de mayor constante de estabilidad condicional reducen su concentración al 65% de forma general, por lo que se puede deducir que estos ligandos superficiales de *Phaeodactylum tricorutum* muestran una

baja especificidad por el cobre en presencia de plomo en el medio. En cuanto a los grupos funcionales de la superficie de la diatomea de menor afinidad por el cobre ven reducida su concentración en un 15% aproximadamente, lo que los hace bastante más selectivos a pesar de su menor afinidad para enlazarse con el cobre. El desplazamiento de la línea discontinua mostrada en la figura 56 (calculada con los parámetros de adsorción obtenidos en ausencia de un aporte al medio de plomo) respecto del ajuste realizado de los datos en la zona donde predomina la adsorción sobre los grupos funcionales minoritarios de mayor constante de estabilidad condicional, es bastante grande indicando el desplazamiento del cobre adsorbido sobre este tipo de ligandos de menor constante de estabilidad condicional. Asimismo, tanto en la isoterma de Langmuir, como en la zona de predominio de los ligandos de menor constante de estabilidad condicional de la representación de Scatchard, se observa como el ajuste en presencia de plomo en el medio tiende a un valor menor de capacidad adsortiva.

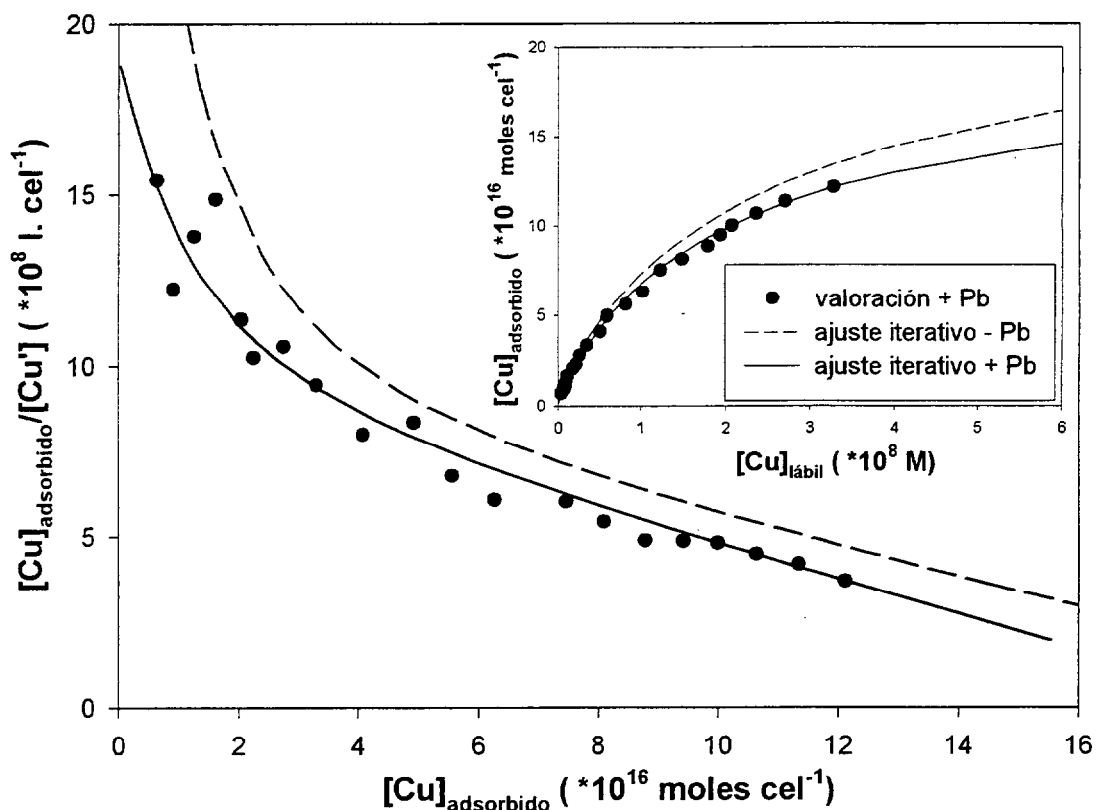


Figura 56. Representación de la linealización de Scatchard de la valoración de la superficie de *Phaeodactylum tricornutum* con cobre en presencia de 100 nM de Pb. La figura incluida en el recuadro muestra la isoterma de Langmuir de los mismos datos. La línea discontinua representa los valores que se obtienen calculando la fracción adsorbida con los parámetros de adsorción obtenidos en ausencia de un exceso de cobre en el medio.

En cuanto al caso de la diatomea *Thalassiosira weissflogii*, la reducción de la capacidad adsortiva que muestra el modelo homogéneo es menor (10%). En el modelo homogéneo hay que destacar que la dispersión de los puntos obtenidos al comienzo de

la valoración origina que el error en el cálculo de los parámetros de adsorción sea muy grande, y los resultados deben tomarse teniendo en cuenta esta limitación. Es posible que el incremento en el valor de la constante de estabilidad se origine simplemente en una subestimación del valor de la capacidad adsorptiva, ya que como se ha reseñado el método iterativo permite obtener los parámetros de complejación o adsorción de manera independiente entre los dos grupos definidos, pero no son independientes los dos parámetros de un mismo grupo de ligandos. En todo caso se observa en la figura 57 como la curva discontinua, obtenida con los parámetros de adsorción en ausencia de adiciones de plomo al medio, queda por encima de los valores obtenidos en la valoración. Esto apoya el resultado reflejado en la tabla XV que muestra una disminución de la capacidad adsorptiva de los grupos superficiales de mayor constante de estabilidad condicional (40%). También viene avalado por la reducción del producto $\Gamma_{\max,1} * K_1'$ en un 20% (que en el apartado de complejación es llamado fuerza complejante), el cual da idea de la afinidad de un grupo funcional para enlazar a un determinado metal total, ya que no depende sólo de su afinidad, sino también de su concentración.

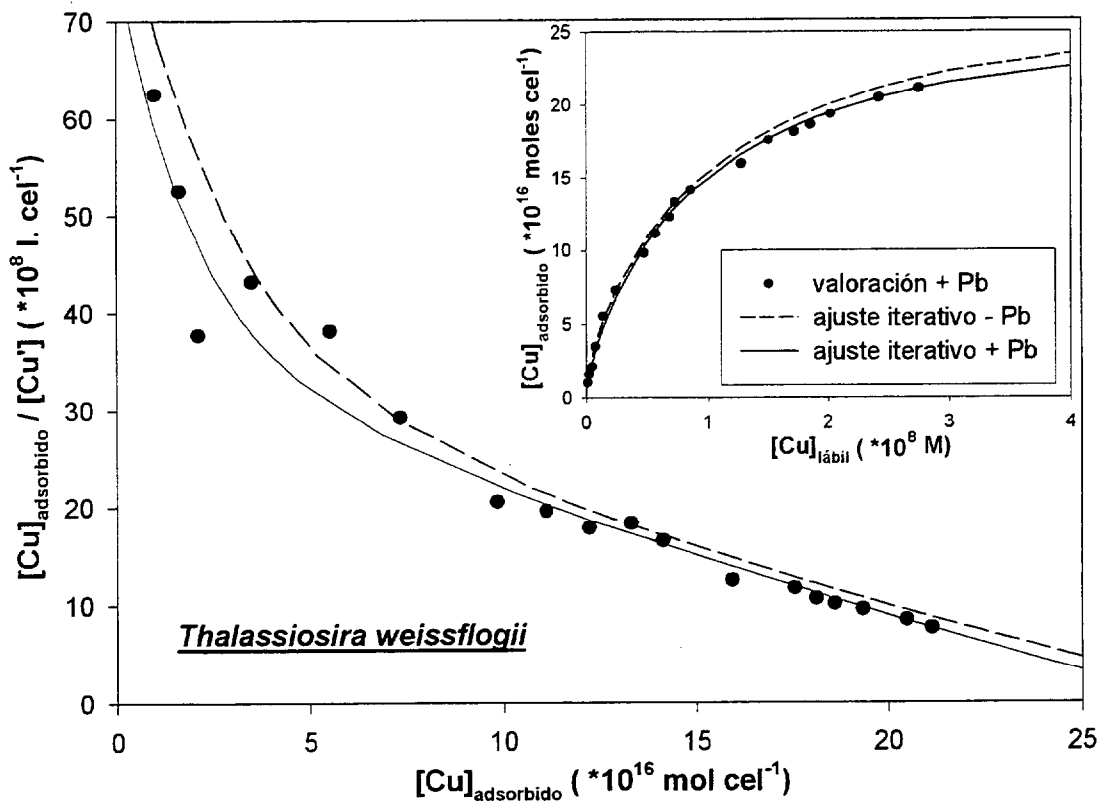


Figura 57. Representación de la linealización de Scatchard de la valoración de la superficie de *Thalassiosira weissflogii* con cobre en presencia de 100 nM de Pb. La figura incluida en el recuadro muestra la isoterma de Langmuir de los mismos datos. La línea discontinua representa a los valores que se obtienen calculando la fracción adsorbida a partir de los parámetros de adsorción obtenidos en ausencia de un exceso de cobre en el medio.

La determinación de los parámetros de adsorción de los ligandos de menor afinidad por el cobre no está sujeta a grandes errores, y de la misma se desprende la mínima influencia de la adición de plomo sobre la capacidad de enlazar al cobre de este tipo de ligandos superficiales, y por lo tanto su alta especificidad (el descenso en el valor de $\Gamma_{\max,2}$ se halla dentro del error experimental).

En la figura 57 se observa como el ajuste iterativo de los parámetros de adsorción obtenidos en presencia de 100 nM de plomo y el ajuste obtenido en su ausencia son muy similares en la región donde predominan aquellos ligandos por menor afinidad por el cobre. Asimismo la isoterma de Langmuir muestra líneas muy próximas que indican la alta especificidad en general de los grupos mayoritarios de la superficie de *Thalassiosira weissflogii*.

Por lo tanto se puede deducir de los experimentos reseñados la gran especificidad de los grupos superficiales de menor constante de estabilidad de ambas diatomeas, ya que una adición muy grande de plomo al medio reduce su capacidad de adsorción del cobre entre un 10 y un 15%. Resultan bastante más selectivos por el cobre frente al plomo los grupos superficiales de *Thalassiosira weissflogii* que los de la otra diatomea. En cambio los grupos funcionales que adsorben al cobre con mayor afinidad, debido a su mayor constante de estabilidad condicional, son desplazados en mayor medida (del 20 al 45%) por una adición de plomo, mostrando una baja especificidad. Al igual que para el otro grupo de grupos funcionales, los pertenecientes a *Thalassiosira weissflogii* son sustituidos en menor medida. Por lo que se puede concluir que la superficie de *Phaeodactylum tricornutum*, además de poseer una menor densidad de grupos funcionales susceptibles de adsorber al cobre por célula, resulta menos específica ante una presencia de plomo en el medio que la de *Thalassiosira weissflogii*.

5.1.6 Efecto del pH

El concepto de complejación superficial utilizado en esta memoria para describir el equilibrio de adsorción nos ha permitido considerar dicho equilibrio como si se tratara de un equilibrio en disolución representado por las ecuaciones (48) y (49). De esta manera, se justifica el uso del valor del pH como una variable clave que gobierna la extensión de la adsorción. Mediante el uso de una curva de valoración acidimétrica de la suspensión de algas a una concentración constante de metales se puede obtener directamente la dependencia de la interacción del metal con el pH.

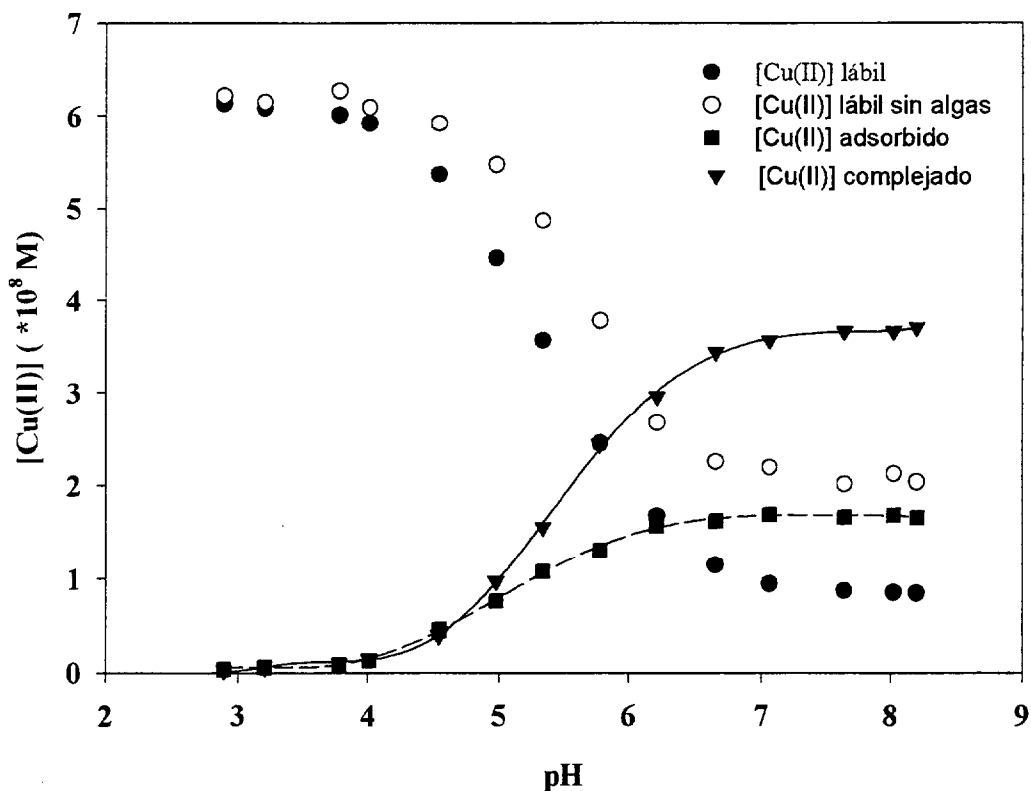


Figura 58. Efecto del pH sobre la especiación del cobre en presencia de $2.1 \cdot 10^7$ cél l^{-1} de *Phaeodactylum tricornutum*. $[Cu]_{TOTAL} = 6.2 \cdot 10^{-8}$ M.

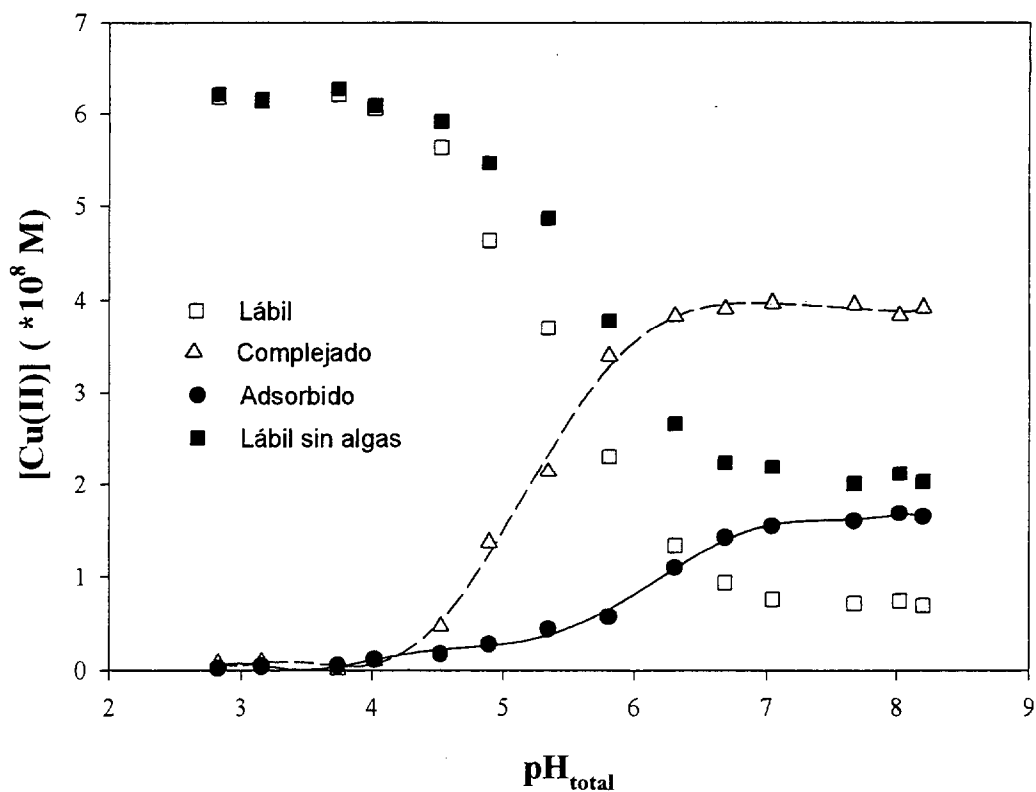


Figura 59. Efecto del pH sobre la especiación del cobre en presencia de $1.19 \cdot 10^7$ cél l^{-1} de *Thalassiosira weissflogii*. $[Cu]_{TOTAL} = 6.27 \cdot 10^{-8}$ M.

Las figuras 58 y 59 muestran el efecto del pH en los procesos de adsorción para la adición de 62 nM de Cu(II) a una suspensión celular, previamente acondicionada al pH de estudio, de $2.1 \cdot 10^7$ células l^{-1} de *P. tricornutum* y $1.2 \cdot 10^7$ células l^{-1} de *T. weissflogii* en el intervalo de pH de 3 a 8.4, respectivamente. En dichas figuras se muestran también los cambios en la especiación del cobre en disolución (tanto lábil como complejado orgánicamente), así como la distribución de Cu(II) lábil en ausencia de algas.

Como se observa para otros sistemas de adsorción, existe un rango de 1-2 unidades de pH donde la extensión de la adsorción aumenta desde prácticamente un 0% hasta casi el 100%. El pH de la disolución afecta a los procesos que tengan lugar a través de su efecto sobre la especiación química, ya que la protonación y desprotonación, tanto de las especies disueltas como de los sitios superficiales van a influir en cualquiera de las reacciones químicas que tengan lugar. Estos procesos de protonación-desprotonación crearán en cada caso distribuciones de sitios superficiales positivos, negativos y neutros, relacionados con los valores del pH_{ZPC} de la superficie del adsorbente (pH en que la carga neta de la superficie es nula). El proceso de formación de complejos (tanto con la superficie como con los ligandos disueltos) es una reacción de intercambio, por lo que va a depender tanto del estado del grupo que lo abandona, como principalmente del grupo que se incorpora, con lo que la distribución relativa de sitios en la superficie de las células (lo mismo para el caso de los ligandos presentes en disolución) con respecto a la forma química de los iones en la disolución va a afectar al proceso de adsorción. En las figuras 58 y 59 se observa el efecto del pH sobre la especiación del Cu(II) inorgánico en ausencia de algas, mostrando la disminución de la concentración lábil por encima de $pH = 5$ como consecuencia de la formación de complejos orgánicos estables con los ligandos presentes naturalmente en el agua de mar y posible adsorción sobre las paredes del recipiente. Cuando se adicionan las algas, a valores de pH bajos, los protones y los iones metálicos compiten por los mismos sitios no observándose adsorción de Cobre (II). A pH superiores a 4 para *P. tricornutum* y de 4.5 para *T. weissflogii* tanto la adsorción sobre los grupos superficiales como la complejación sobre los ligandos del medio son observadas, mostrando que a partir de pH 7, la especiación del cobre es prácticamente constante. Sin embargo, sí se puede observar, principalmente en el caso de *T. weissflogii*, que los ligandos presentes en la disolución deben poseer una naturaleza distinta a la de los

grupos superficiales ya que el pH al que se alcanza el máximo de adsorción está desplazado respecto al del máximo de complejación.

De acuerdo con la ecuación (50), y tras aplicar logaritmos y cambiar el signo se obtiene la expresión:

$$\log \frac{\{S - Cu\}}{[Cu^{2+}]} = Z + n pH \quad (68)$$

donde $Z = \log K_M + \log \{SH_n\}$. Si Z se considera constante, la pendiente de dicha ecuación debería ser 2 ó 1 para la adsorción de metales a un ligando que llevara consigo la pérdida de 2 ó 1 protones, respectivamente. Sin embargo, como se ha indicado a lo largo de esta memoria, el proceso de complejación superficial puede tener lugar sobre sitios desprotonados o también sobre sitios ocupados por metales alcalino-térreos, que de esta manera no llevaría consigo el desplazamiento de protones. Cuando se determina la pendiente de los tramos en los que se produce el cambio de características de adsorción para ambas algas, se encuentra que vale 0.9 ± 0.1 y 0.63 ± 0.02 para *T. weissflogii* y *P. tricornutum*, respectivamente. Estos valores se podrían explicar considerando que para el caso de la *T. weissflogii*, el número de sitios en los que se produce un intercambio de dos protones es igual al de sitios con cero protones intercambiados, independientemente del número de sitios con intercambio de un solo protón. Para el caso de la *P. tricornutum*, se podría considerar que el número de sitios con cero protones intercambiados supera al de sitios con 2 protones intercambiados. Sin embargo, todo este razonamiento implicaría que el valor de Z permanece constante en el rango de pH de 4.5 a 7, lo cual no es así, ya que el cambio de pH afectará a la distribución de cargas sobre la superficie del alga.

5.1.7 EFECTO DE LA SALINIDAD

El efecto de la salinidad sobre las reacciones de adsorción y complejación fue estimado permitiendo el equilibrio de muestras de distinta salinidad (entre 11 para *T. weissflogii* y 14 para *P. tricornutum* y un valor máximo de 37.2‰) con una suspensión de diatomeas, manteniendo fijo el pH. Posteriormente se añadía la concentración seleccionada de Cu(II) y se procedía a los quince minutos a determinar la especiación del medio. Los resultados obtenidos para ambas diatomeas figuran en las figuras 60 y 61.

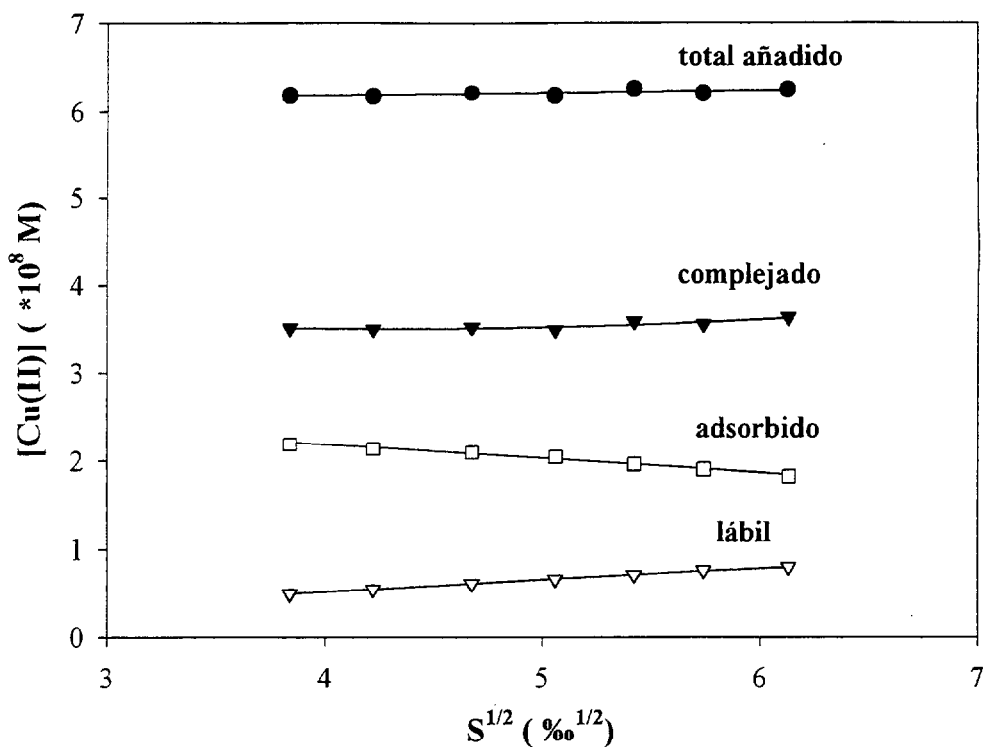


Figura 60. Efecto de la salinidad sobre la especiación de una concentración de $6.2 \cdot 10^{-8}$ M de Cu(II) en presencia de $2.4 \cdot 10^7$ cel l⁻¹ de *Phaeodactylum tricornutum*.

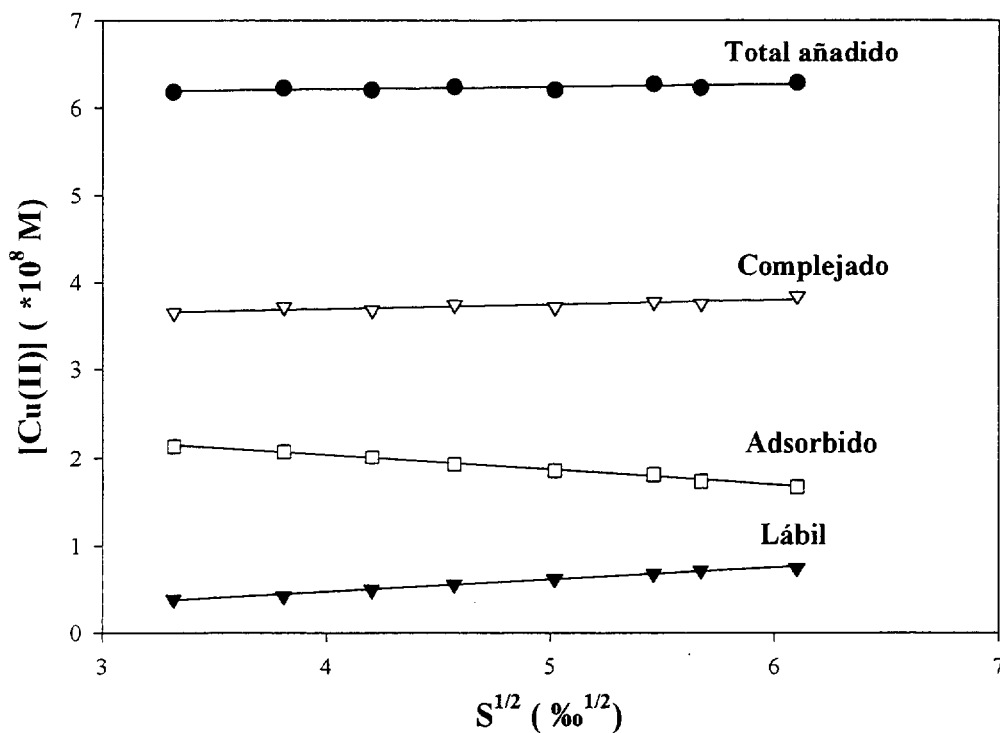


Figura 61. Efecto de la salinidad sobre la especiación de una concentración de $6.27 \cdot 10^{-8}$ M de Cu(II) en presencia de $1.26 \cdot 10^7$ cel l⁻¹ de *Thalassiosira weissflogii*.

La presencia de los cationes mayoritarios marinos en el medio (Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , etc.) supone una competencia para los metales traza en disolución por los grupos funcionales tanto superficiales como de la materia orgánica disuelta capaces de complejar iones de carga positiva en disolución. Este intercambio iónico que tiene lugar ha sido documentado para la materia orgánica disuelta por varios autores previamente (Crist *et al.*, 1990; Tipping, 1993; Huang *et al.*, 1991; Schiewer y Volesky, 1997). Este efecto competitivo queda reflejado en las figuras 60 y 61, donde una mayor salinidad del medio hace que la fracción de cobre que se adsorbe sea menor.

La fracción que se compleja con la materia disuelta del medio es prácticamente constante en todo el experimento, pero al obtenerse el medio de trabajo a partir de sucesivas diluciones del medio original, además de la fuerza iónica se habrá visto diluida la concentración de materia orgánica disuelta susceptible de complejar al ion cúprico. El estudio por tanto de la complejación no puede ser exhaustivo debido a que la materia orgánica en disolución no es la misma en las distintas muestras y que el tiempo de equilibrio concedido después de la adición del metal (15 minutos), si bien es suficiente para alcanzar un pseudoequilibrio con los grupos superficiales de las diatomeas (figuras 41 y 42), puede que no lo sea para alcanzarlo con los ligandos en disolución (resulta imposible obtener capacidades complejantes de la cantidad complejada estimada, debido a que a altas concentraciones de metal añadido se requieren más de quince minutos para alcanzar un equilibrio). Al ser el tiempo de equilibrio de la reacción de complejación o adsorción proporcional también a la fuerza iónica del medio debido a la competencia de los cationes en disolución (Hering y Morel, 1988), es posible que los valores correspondientes a las mayores salinidades no correspondan a la situación de pseudoequilibrio y que una fracción del cobre lábil en disolución pase con el tiempo a complejarse en disolución. Otro fenómeno que puede explicar la concentración constante de cobre complejado es el hecho de que una fracción de la materia orgánica disuelta no sea accesible al cobre a altas salinidades debido a que se encuentre saturada por los cationes mayoritarios del medio, cuya concentración es alrededor de tres ordenes de magnitud mayor que la concentración máxima alcanzada en las valoraciones metálicas ($\sim 10^{-6}$ M). En este caso, un descenso de la concentración en disolución de los cationes mayoritarios hace que una parte de esta materia orgánica que no podía complejar al cobre inorgánico, sea accesible para el mismo.

La adsorción sí que permite un estudio más detallado al ser suficiente el tiempo de pseudoequilibrio alcanzado y ser siempre igual la concentración de grupos funcionales en el medio. La adsorción es menor a mayor fuerza iónica del medio como podía suponerse debido al intercambio iónico que se verifica. Si dado que se conoce a $\text{pH}=8.02$ y salinidad 37.2 la capacidad adsorptiva de las células de las dos diatomeas, es posible haciendo uso de la isoterma de Langmuir (ecuación 54), y las concentraciones estimadas en este experimento de cobre lábil y cobre adsorbido, calcular la constante de estabilidad condicional de los grupos superficiales en función de la salinidad del medio a $\text{pH}=8.02$. El resultado para ambas diatomeas aparece en la figura 62.

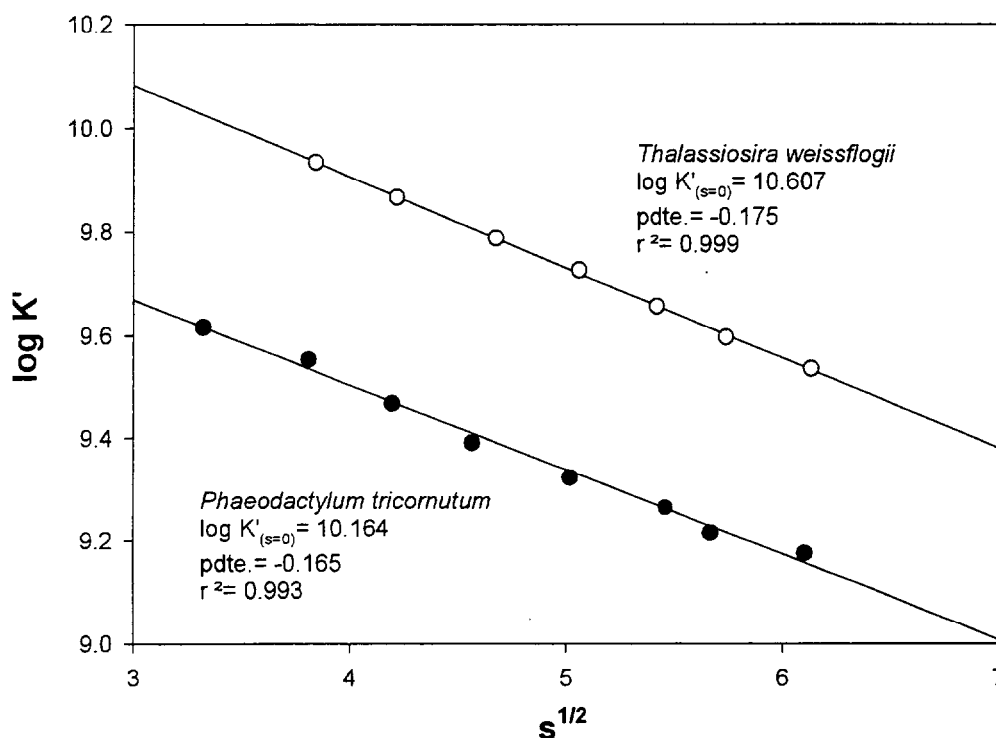


Figura 62. Efecto de la salinidad del medio sobre la constante de estabilidad condicional de la adsorción del cobre sobre la superficie de *Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira weissflogii*. Datos obtenidos a $\text{pH}=8.02$ y suponiendo constante el número de grupos funcionales capaces de adsorber al ion cúprico.

Si el resultado se hubiera desplazado de la linealidad supondría que a bajas salinidades, la cantidad de grupos funcionales capaces de adsorber al cobre es distinta. Pero la linealidad alcanzada a salinidades un 30% menores del original implica que el número de grupos funcionales capaces de adsorber al cobre es el mismo en todo el rango. Asimismo se observa como la variación de la constante de estabilidad condicional de la adsorción con la salinidad para ambas diatomeas es similar.

5.1.8 EFECTO DE LA TEMPERATURA

Para determinar la influencia de la temperatura sobre la reacción de adsorción superficial de las algas, se emplazaron varias suspensiones de diatomeas de igual concentración celular, durante quince minutos de equilibrio, con una concentración conocida de cobre, previamente acondicionadas en un baño termostático a una temperatura fijada y se procedió a estimar la especiación resultante. Los valores obtenidos aparecen en las figuras 63 y 64.

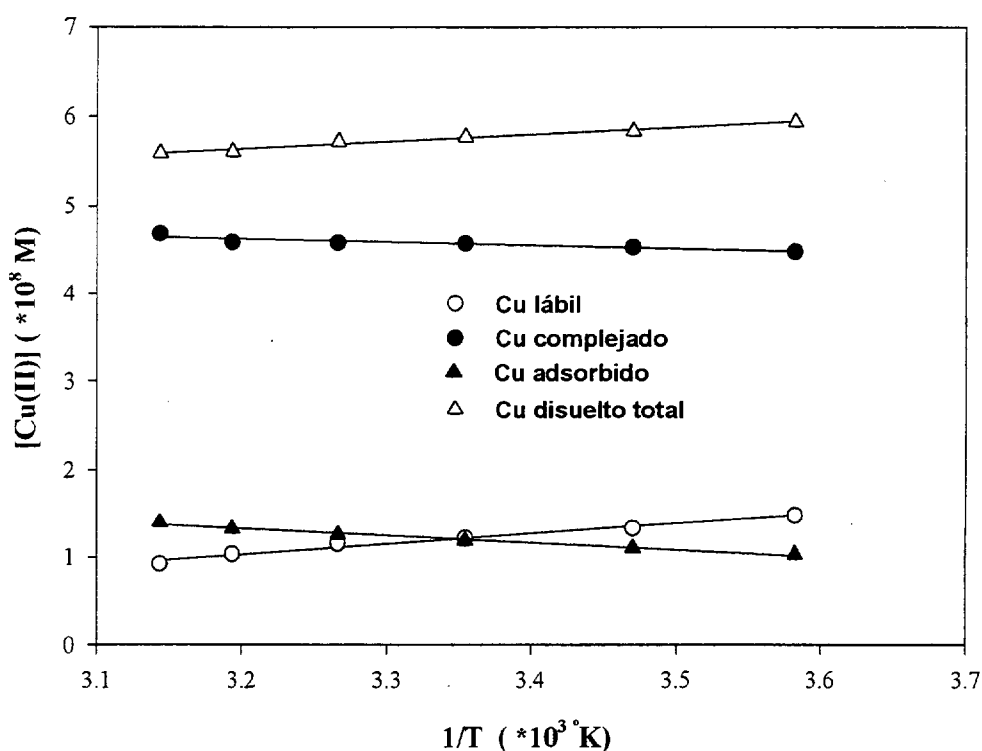


Figura 63. Efecto de la temperatura sobre la especiación del cobre en disolución en presencia de $1.4 \cdot 10^7$ cél l^{-1} de *Phaeodactylum tricorutum*. $[Cu]_{TOTAL} = 6.98 \cdot 10^{-8} M$

En la figura 63 se observa como una variación de temperatura de 45°C a 6°C no afecta en grandes proporciones a la especiación en el caso de *Phaeodactylum tricorutum*. Las fracciones que quedan más afectadas son la lábil y la adsorbida. A mayores temperaturas el proceso de adsorción se ve favorecido y aumenta la proporción de cobre que se une a los ligandos de la superficie del alga, originando una disminución del cobre presente en disolución de forma inorgánica, ya que este aumento no es a costa del cobre complejoado con los ligandos disueltos, cuya concentración apenas cambia.

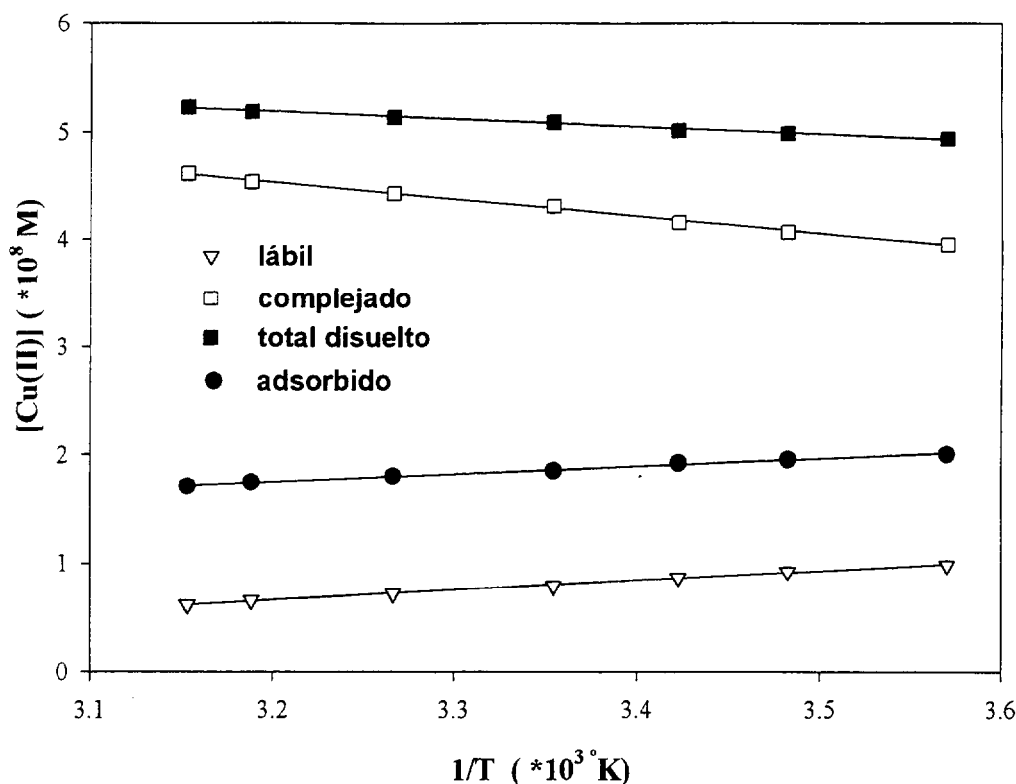


Figura 64. Efecto de la temperatura sobre la especiación del cobre en disolución en presencia de $1.27 \cdot 10^7$ cél l^{-1} de *Thalassiosira weissflogii*. $[Cu]_{TOTAL} = 6.95 \cdot 10^{-8}$ M.

En cambio el caso de la diatomea *Thalassiosira weissflogii* es diferente (figura 64). La concentración de cobre lábil en disolución también disminuye con el incremento de la temperatura, pero la concentración de cobre adsorbido sobre la superficie celular experimenta un pequeño descenso y la de cobre complejoado sufre un significativo incremento. En este caso el incremento de la temperatura del medio hace que la reacción de complejación se vea favorecida frente a la de adsorción y los ligandos del medio no sólo muestran mayor afinidad por el cobre lábil del medio, sino que además secuestran parte del cobre adsorbido.

Para explicar esta diferente tendencia y estudiar la naturaleza de la reacción de adsorción se define el coeficiente de distribución del metal objeto de estudio como la proporción entre la concentración adsorbida y la total en disolución (susceptible de ser adsorbida):

$$K_d = [Cu]_{adsorbido} / [Cu]_{disuelto\ total} \quad (69)$$

Y por tanto la energía de activación de esta reacción de adsorción (E_a) o energía específica de adsorción, en el caso de ser independiente de la temperatura, vendrá dada por la expresión de Arrhenius (basada en la ecuación de van't Hoff que ofrece la relación entre la constante de equilibrio de una reacción y la temperatura). La cual

ofrece una línea recta al representar en función de la inversa de la temperatura, el logaritmo de este coeficiente de partición:

$$K_d = A \exp(-E_a / R \cdot T) \quad (70)$$

En esta expresión A es el factor de frecuencia de la reacción, el cual es independiente de la temperatura. En la figura 65 aparece el resultado para ambas diatomeas de la energía de activación de la reacción de adsorción.

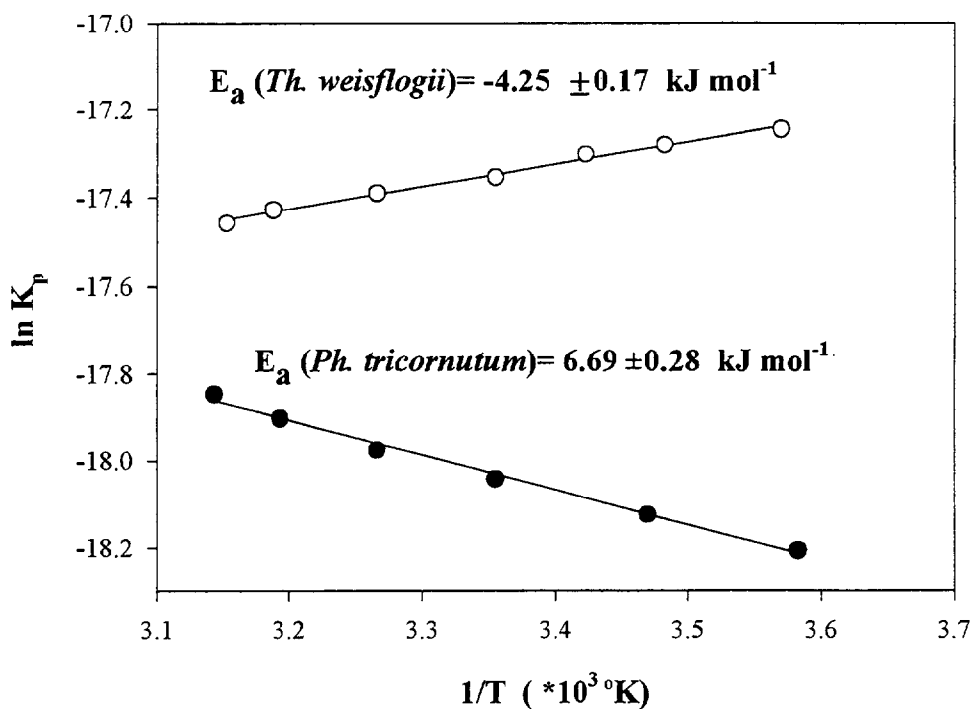


Figura 65. Relación entre la inversa de la temperatura y el logaritmo del coeficiente de distribución del cobre entre la superficie de la célula y el seno de la disolución para la reacción de adsorción de *Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira weissflogii*.

Hay que destacar el distinto signo obtenido para la adsorción del cobre en función de la especie de diatomea estudiada. *Phaeodactylum tricornutum* requiere el aporte de energía para extraer un ion cúprico de la disolución de estudio y adsorberlo sobre su superficie. En cambio, cuando *Thalassiosira weissflogii* adsorbe el cobre sobre su superficie, se libera una cantidad de energía igual a 4.25 kJ mol⁻¹. De ahí el que el aporte de energía al medio favorezca la reacción de adsorción frente al resto de reacciones que experimenta el ion cúprico en el medio en el caso de la primera diatomea. Y para el caso de *Thalassiosira weissflogii* sucede todo lo contrario, el aporte de energía al medio compensa la desventaja que le supone al resto de reacciones (sin considerar la adsorción) el que al verificarse la adsorción ocurra una liberación de energía.

5.2 ADSORCION DE PLOMO

Para el caso del estudio de la adsorción del plomo sobre la superficie de diatomeas y de la complejación por parte de sus exudados, se realizó la misma serie de experimentos que para el caso del cobre. A continuación se detallan los resultados.

5.2.1 Cinética

La figura 66 muestra los cambios de concentración de las fracciones lábil, complejada y asimilada del plomo (calculada como la concentración total menos la que se encuentra lábil y complejada en disolución), a partir de una concentración inicial de $5 \cdot 10^{-8}$ M, en función del tiempo, en presencia de una concentración celular de *Phaeodactylum tricornutum* de $1.64 \cdot 10^7$ cél. l⁻¹.

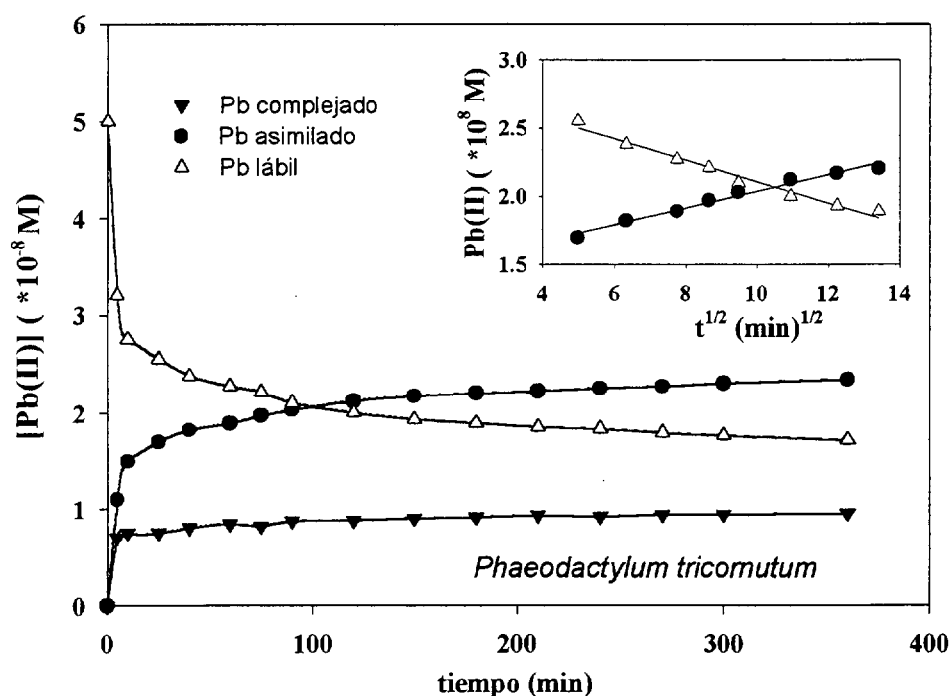


Figura 66. Cinética de asimilación del Pb(II) por parte de *Phaeodactylum tricornutum* ($1.64 \cdot 10^7$ cél. l⁻¹). $[\text{Cu(II)}]_{\text{añadida}} = 5.0 \cdot 10^{-8}$ M. En el recuadro aparecen representadas las concentraciones de plomo lábil y absorbido entre los 25 y 200 minutos para comprobar la evolución lineal de ambas variables con la raíz cuadrada del tiempo.

La figura 67 ofrece los resultados obtenidos para el mismo experimento, realizado sobre una suspensión de *Thalassiosira weissflogii* de una concentración de $1.46 \cdot 10^7$ cél l⁻¹ (concentración inicial de plomo de $6.8 \cdot 10^{-8}$ M).

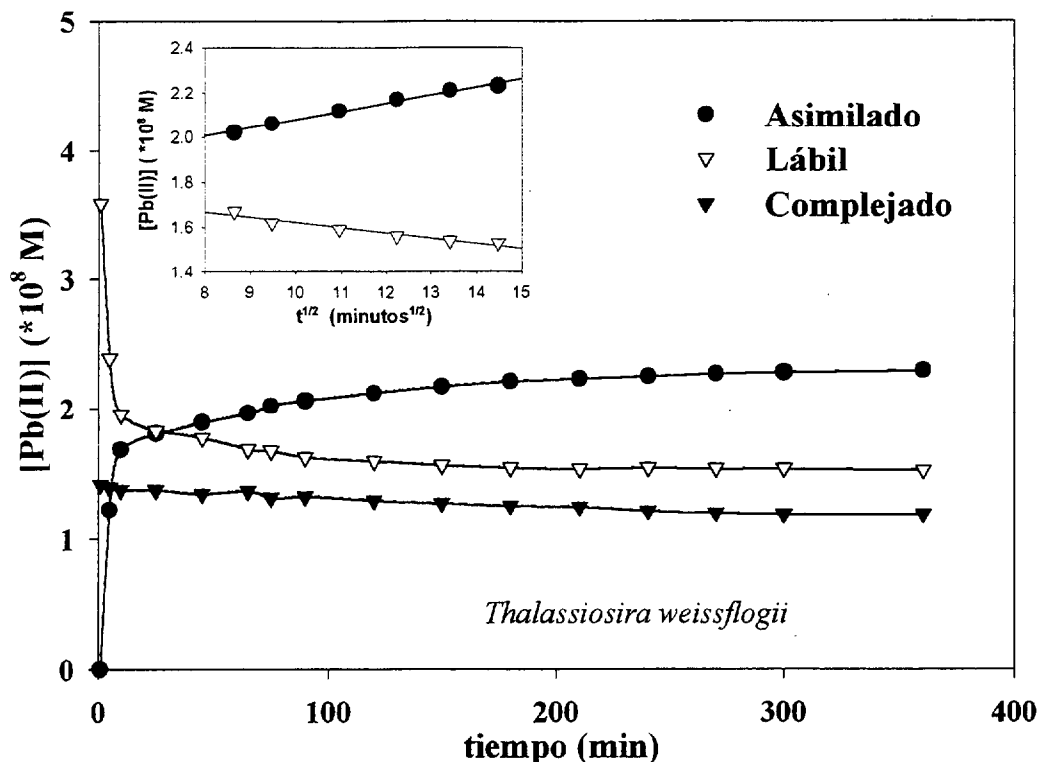


Figura 67. Cinética de asimilación del Pb(II) por parte de *Thalassiosira weissflogii* ($1.46 \cdot 10^7$ cél. l⁻¹). $[Cu(II)]_{añadida} = 6.8 \cdot 10^{-8}$ M. En el recuadro aparecen representadas las concentraciones de plomo lábil y absorbido entre los 25 y 200 minutos para comprobar la evolución lineal de ambas variables con la raíz cuadrada del tiempo.

El Pb(II) complejoado inorgánicamente (lábil) decrece rápidamente al comienzo, alcanzándose un pseudoequilibrio con la superficie algal en unos pocos minutos. Después de este intervalo, su concentración decrece lentamente. Tras este primer paso, donde el metal es enlazado por los grupos de la superficie del alga en poco tiempo, tanto la concentración de Pb(II) lábil, como de adsorbido, varían con la raíz cuadrada del tiempo. Esto indica que esta segunda fase más lenta corresponde a un proceso controlado por la difusión. Tras los diez primeros minutos, la inclusión de plomo sigue el modelo de difusión parabólico de Crank (Crank, 1976), en el caso de ambas diatomeas (ver figuras insertadas en las figuras 66 y 67):

Phaeodactylum tricorutum:

$$[Pb(II)]_{asimilado} = 1.43 (\pm 0.04) \cdot 10^{-8} + 0.061 (\pm 0.003) \cdot 10^{-8} \cdot (t)^{1/2} \quad (71)$$

Thalassiosira weissflogii:

$$[Pb(II)]_{asimilado} = 1.55 (\pm 0.02) \cdot 10^{-8} + 0.052 (\pm 0.003) \cdot 10^{-8} \cdot (t)^{1/2} \quad (72)$$

Tras seis horas de tiempo de equilibrio, un 47% del plomo ha sido retirado de la disolución por parte de *Phaeodactylum tricorutum*, bien siendo adsorbido sobre su superficie, como siendo incluido intracelularmente. En el caso de *Thalassiosira*

weissflogii esta fracción final asimilada es del 30%. Las figuras 66 y 67 muestran además que la inclusión intracelular de plomo proviene de la fracción inorgánica lábil, la cual también sigue una dependencia parabólica respecto de la raíz cuadrada del tiempo, ya que la concentración de especie complejada permanece aproximadamente constante durante todo el desarrollo del experimento. La fracción complejada con los ligandos orgánicos disueltos del agua de mar es mucho mayor en los experimentos con *Thalassiosira weissflogii* que en los realizados con la otra diatomea (11 nM frente a 8 nM al final del experimento), pero porcentualmente resultan equivalentes (un 18-19% del total en ambos experimentos).

A diferencia de los resultados obtenidos con el cobre, donde la fracción lábil al final del experimento mostrado en las figuras no era en ningún caso mayor del 5% de la cantidad de metal añadido al comienzo del experimento, en el caso del plomo, en el equilibrio que se alcanza entre las diversas concentraciones de las especies de plomo, finalmente entre un 30% (*Thalassiosira weissflogii*) y un 35% (*Phaeodactylum tricornutum*) del plomo permanece como lábil en disolución. Esto supone que el pPb al final del experimento es de 9.35 y 9.32 respectivamente (tomando un α_{Pb} de 35.5; Santana Casiano *et al.*, 1995)

El tiempo requerido para alcanzar el equilibrio de adsorción del plomo entre la disolución y la superficie algal, ha sido determinado como la intersección de las dos líneas presentes en los gráficos, y se mantiene por debajo de los 15 minutos en todos los estudios. Por ello ha sido escogido para el caso de estudios de adsorción con plomo un tiempo de equilibrio entre las algas y el medio de 10 minutos.

5.2.2 Determinación de capacidades complejantes

Dado que el plomo evidencia tener una gran afinidad por los ligandos presentes en medios naturales (Capodaglio *et al.*, 1990), y que esto supone una competencia con el plomo adsorbido sobre la superficie celular, previamente al estudio de las capacidades de enlace de las superficies algales, se determinó la capacidad complejante de las muestras de agua de mar a utilizar con los ligandos presentes. Las figuras 68 y 69 muestran claramente como la adición de algas al medio durante un tiempo de 36 horas cambia la capacidad complejante del agua de mar. Para realizar estas medidas las algas eran retiradas de la suspensión por filtración sin el empleo de presión para evitar la lisis

celular. La capacidad complejante se manifiesta en el desplazamiento de las rectas 2 y 3 respecto de la recta obtenida en el medio ácido (1) y que por lo tanto no complejaba ninguna cantidad de metal.

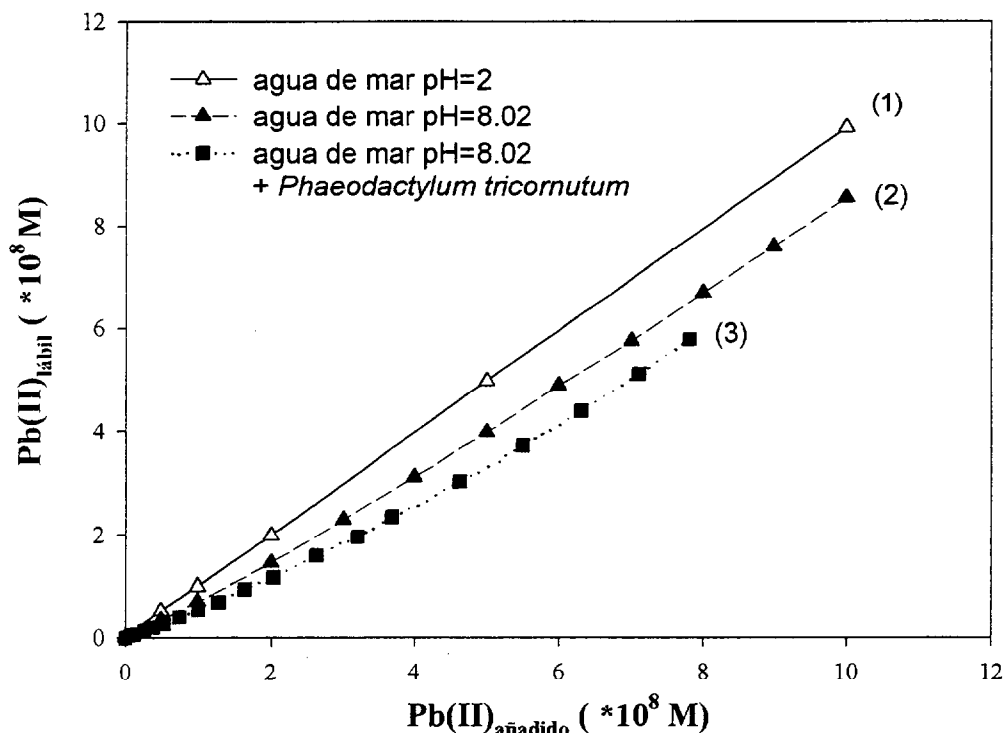


Figura 68. Concentraciones de plomo lábil y disuelto total en agua de mar en ausencia y en presencia de *Phaeodactylum tricorutum* ($1.34 \cdot 10^7$ cél. l⁻¹). Los valores en medio ácido sirven para conocer la concentración total inicial en el agua de mar y la sensibilidad del método.

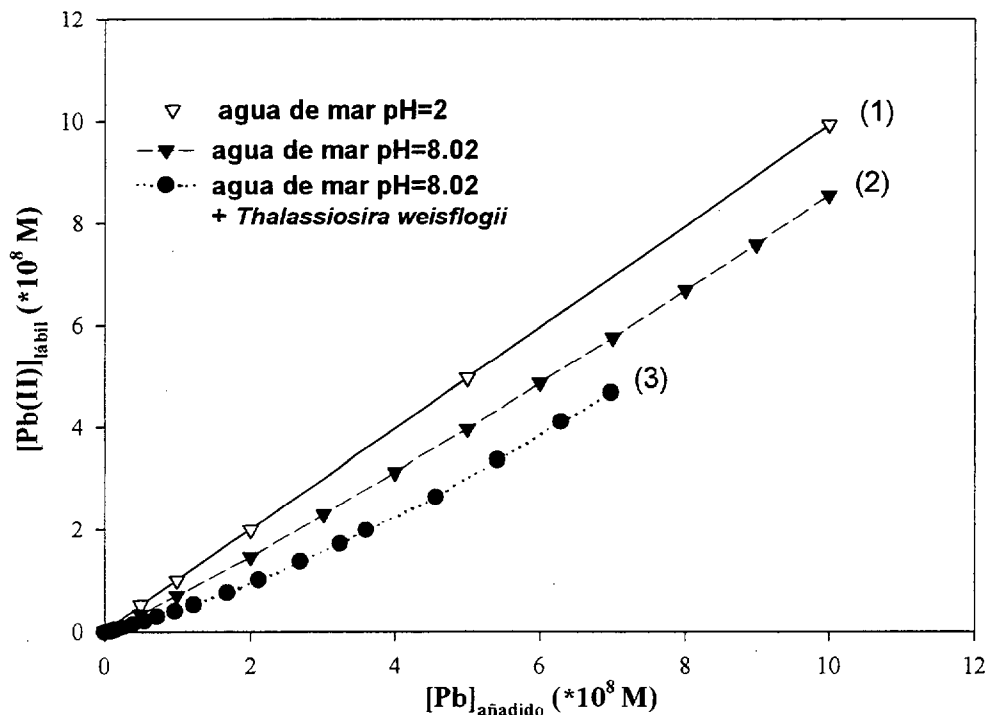


Figura 69. Capacidad complejante del plomo en agua de mar en ausencia y en presencia de *Thalassiosira weissflogii* ($1.32 \cdot 10^7$ cél. l⁻¹). Los valores en medio ácido sirven para conocer la concentración total inicial en el agua de mar y la sensibilidad el método.

La obtención de los parámetros de complejación se realizó asumiendo un modelo de complejación basado en una estequiometría 1:1 de la reacción de enlace del plomo y los ligandos. El gráfico de linealización obtenido empleando el método de van den Berg-Ruzic (descrito previamente durante el estudio de la complejación del cobre; ecuación 68), presenta un aspecto lineal (figura 70), y por lo tanto se calcularon los parámetros de complejación (concentración total de ligando y constante de estabilidad condicional asociada), correspondientes a considerar la presencia en el medio de un solo tipo de ligandos.

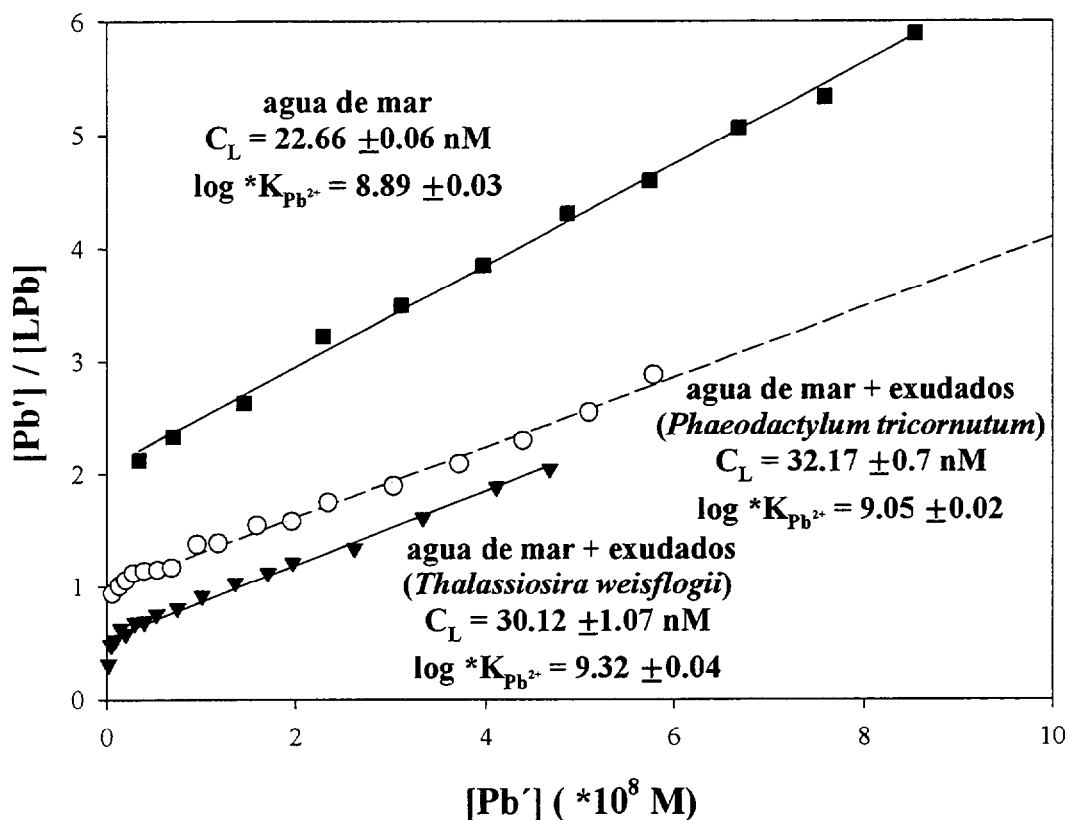


Figura 70. Representación de van den Berg-Ruzic de los valores de obtenidos en la valoración cúprica del agua de mar utilizada en el experimento, tanto sola, como con la incorporación de *Phaeodactylum tricornutum* ($1.34 \cdot 10^7 \text{ cél. l}^{-1}$) y *Thalassiosira weissflogii* ($1.32 \cdot 10^7 \text{ cél. l}^{-1}$).

La tabla XVI muestra los parámetros de complejación calculados en la muestra de agua de mar tomada a una milla de la costa de Gran Canaria utilizada en este trabajo ($22.7 \cdot 10^{-9} \text{ M}$; $K' = 8.89$). Cuando las células son añadidas, se observa un incremento tanto de la concentración de compuestos orgánicos presentes originalmente, como de su constante de estabilidad condicional. Se debe a un aporte activo al medio por parte de la diatomea de exudados celulares, o a un desprendimiento de moléculas asociadas a la pared celular, con una mayor afinidad por el plomo de la que experimentaban en su

conjunto las presentes en el agua de mar. De ahí el incremento en la constante de estabilidad condicional, que es una media ponderada de los ligandos existentes en disolución.

C_L (nM)	$\log *K_{Pb(II)}$	$\log *K_{Pb^{2+}}$	alga	C_L (nM)	$\log *K_{Pb(II)}$	$\log *K_{Pb^{2+}}$
22.7 ± 0.06	7.34 ± 0.03	8.89 ± 0.03	Pheod. tricornutum	32.7 ± 0.7	7.50 ± 0.02	9.05 ± 0.02
			Thalass. weissflogii	30.1 ± 0.7	7.77 ± 0.04	9.32 ± 0.04

Tabla XVI. Parámetros de complejación del agua de mar previamente a la adición de las algas (columnas 1 a 3) y después de la adición de las diatomeas (columnas 4 a 6), transcurridas 36 horas de contacto. Valores a $pH_{total}=8.02$. $\alpha_{Pb}=35.5$.

Si se tiene en cuenta que el resultado de los parámetros de complejación es una media ponderada de los distintos ligandos presentes en el seno de la disolución, es posible calcular los valores de los parámetros de complejación de los exudados que libera el alga para conseguir que la constante de estabilidad condicional se incremente hasta el valor reflejado en la tabla XVI. Según esto, los exudados liberados al medio por parte de *Phaeodactylum tricornutum* deben tener una constante media ponderada de estabilidad condicional en el intervalo 9.2-9.3, mientras que los exudados de *Thalassiosira weissflogii* deben tener una constante ponderada en torno al intervalo 9.7-9.8. Es necesario tener en cuenta que los ligandos tanto presentes previamente como exudados posteriormente y que no se encuentren incluidos en la ventana espectral propia del método no van a tener influencia en el resultado final conseguido.

Al igual que para el caso del cobre, los ligandos que libera *Thalassiosira weissflogii* parecen tener una afinidad bastante mayor por el metal añadido que los de la otra diatomea. De hecho, la linealización de los datos pertenecientes a esta alga muestra una ligera forma curva al comienzo de la valoración. Esto permite el cálculo de parámetros de complejación para dos tipos de ligandos disueltos. El resultado es de $[L_1]=0.9 \pm 0.9$ nM ($K_1'=10.90 \pm 0.3$); $[L_2]=33.6 \pm 1.3$ nM ($K_2'=9.17 \pm 0.03$). Este resultado no debe interpretarse exclusivamente como un aporte por parte del alga de ligandos de alta afinidad por el plomo (que sin duda ha sucedido, además del aporte de los de menor constante condicional), que no existían previamente en el agua de mar. El aporte de exudados de distinta afinidad por los metales en disolución por parte de diatomeas quedará probado en el apartado de complejación de este trabajo, pero lo que ha sucedido probablemente es que el alto límite de detección de la voltametría de redisolución

anódica ha impedido la obtención de las características complejantes de ligandos de alta afinidad por el plomo en el medio marino original y en el agua de mar en equilibrio con la otra diatomea (*Phaeodactylum tricornutum*), y sólo un mayor aporte por parte del alga, que ha hecho aumentar su importancia, los ha hecho detectables.

5.2.4 Determinación de capacidades adsortivas

A continuación se procedió a estimar los parámetros de complejación de plomo de las superficies de ambas diatomeas. Las figuras 71 y 72 corresponden a las isotermas de Langmuir obtenidas a partir de las valoraciones con plomo de dos suspensiones de distinta concentración celular de las dos diatomeas obtenidas a $\text{pH}_{\text{total}}=8.02$.

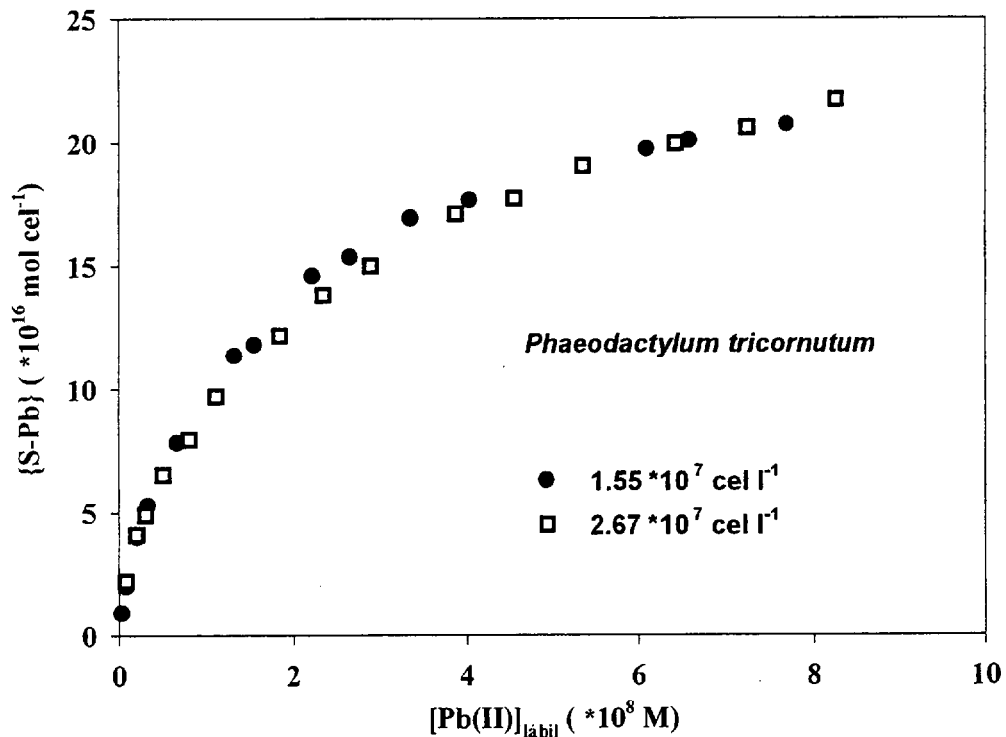


Figura 71. Isoterma de Langmuir de la adsorción de plomo sobre la superficie de *Phaeodactylum tricornutum* a 1.55 y 2.67 cél l^{-1} .

Como era de esperar para cultivos de células de igual tamaño y distribución superficial de grupos funcionales, las isotermas de adsorción obtenidas para una misma diatomea coinciden. Aunque en el caso de *Phaeodactylum tricornutum* debe tomarse con cuidado este hecho ya que se ha descrito en cultivos de elevada concentración celular la unión de las células por su cara valvar (la de mayor superficie), reduciendo el

número por célula de grupos funcionales accesibles a los cationes en disolución. El hecho de que todas las isotermas de adsorción estudiadas y puestas en unidades por célula coincidan indica que la concentración celular seleccionada es válida, y no se produce el efecto descrito.

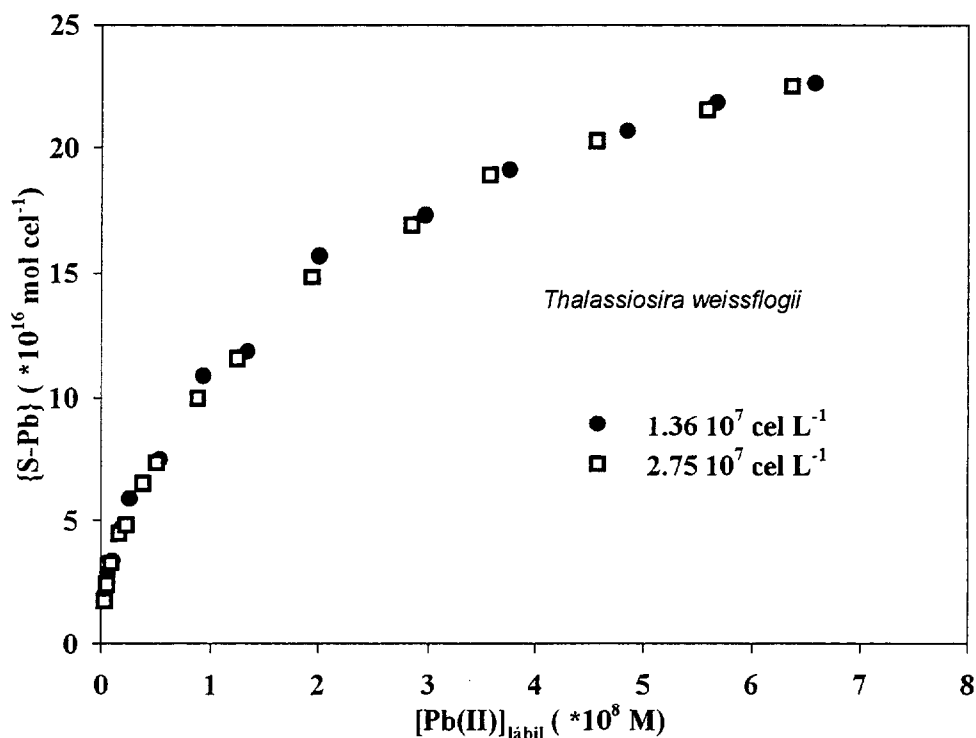


Figura 72. Isoterma de Langmuir de la adsorción de plomo sobre la superficie de *Thalassiosira weissflogii* a 1.36 y 2.75 células l⁻¹.

Las figuras 73 y 74 muestran linealizaciones según los métodos de van den Berg-Ruzic y Scatchard (definidos por las ecuaciones 55 y 56) correspondientes a valoraciones con Pb(II) de dos suspensiones celulares con distinta concentración de *Phaeodactylum tricornutum* (pH_{total}=8.02), con el objeto de apreciar con nitidez las distribuciones de valores tanto en la zona donde la adsorción es mayoritaria con los grupos funcionales de mayor constante de estabilidad condicional, como en la zona donde lo es por parte de los grupos de menor afinidad por el plomo.

Las figuras 75 y 76 son equivalentes para el caso de *Thalassiosira weissflogii*. Todas las figuras presentan los valores de la concentración de plomo adsorbido, calculados a partir del balance de masas del metal en disolución y de los valores de plomo lábil obtenidos en las valoraciones, y los calculados a partir de los parámetros de adsorción obtenidos siguiendo el modelo mixto propuesto en este trabajo, con el fin de comprobar la validez del ajuste.

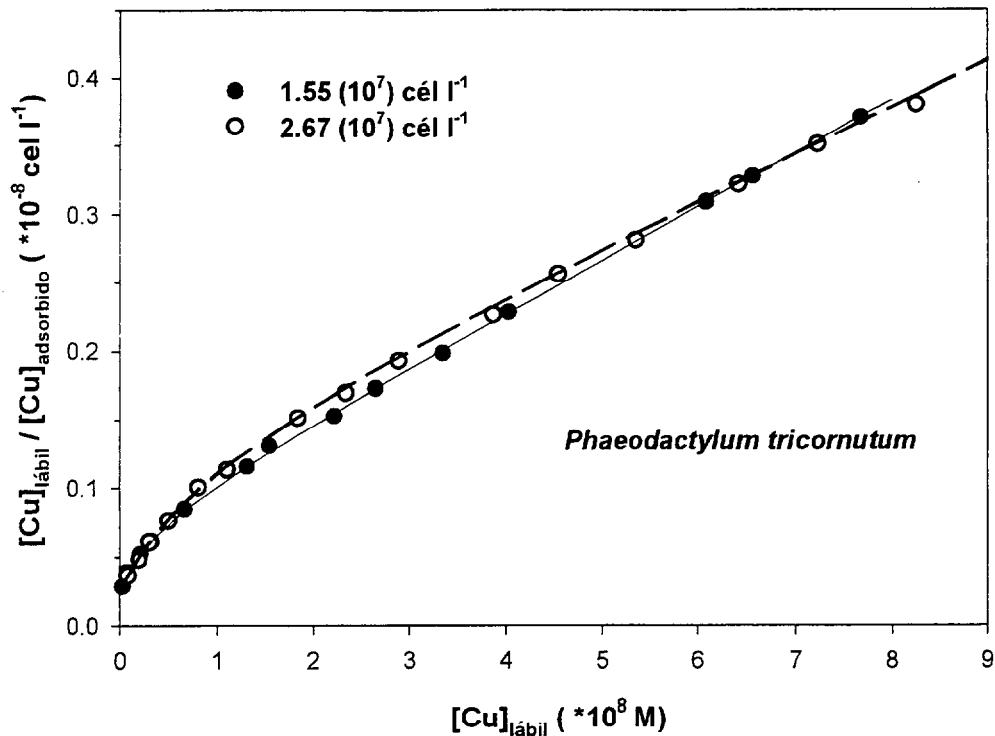


Figura 73. Representación de la linealización de van den Berg-Ruzic de las isothermas de adsorción presentadas en la figura 71. Corresponden a una valoración con plomo de dos suspensiones de *Phaeodactylum tricornutum* con distinta concentración celular. Las líneas corresponden a la representación de las concentraciones de plomo adsorbido calculadas a partir de los parámetros de adsorción obtenidos por el procedimiento iterativo propuesto en este trabajo.

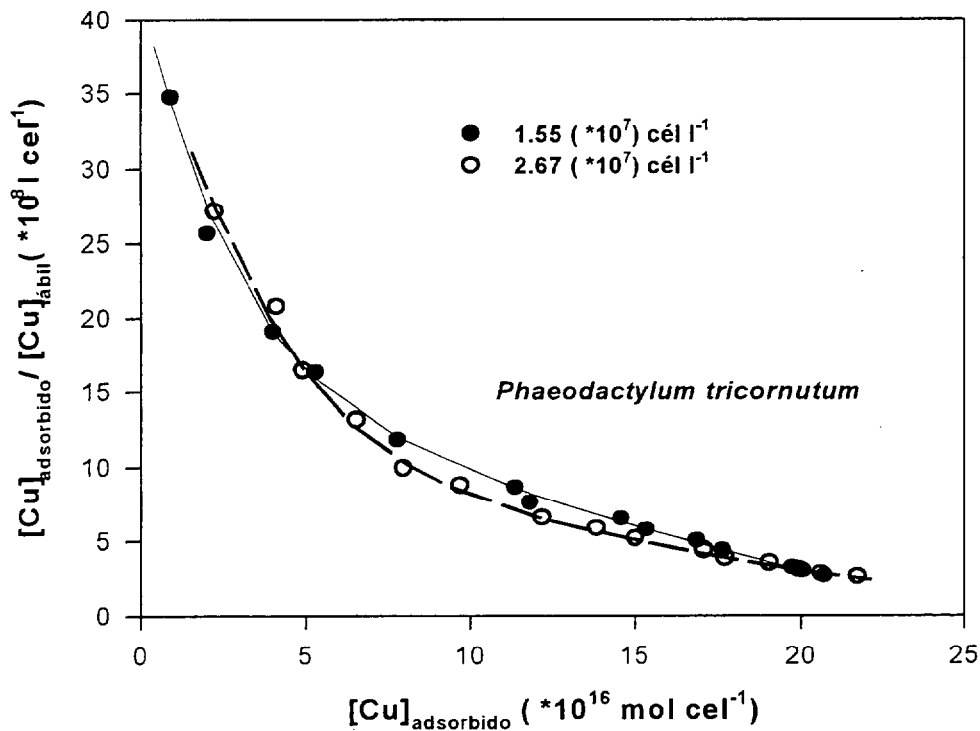


Figura 74. Representación de la linealización de Scatchard de las isothermas de adsorción presentadas en la figura 71. Corresponden a una valoración con plomo de dos suspensiones de *Phaeodactylum tricornutum* con distinta concentración celular. Las líneas corresponden a la representación de las cantidades de plomo adsorbido calculadas a partir de los parámetros de adsorción obtenidos por el procedimiento iterativo propuesto en este trabajo.

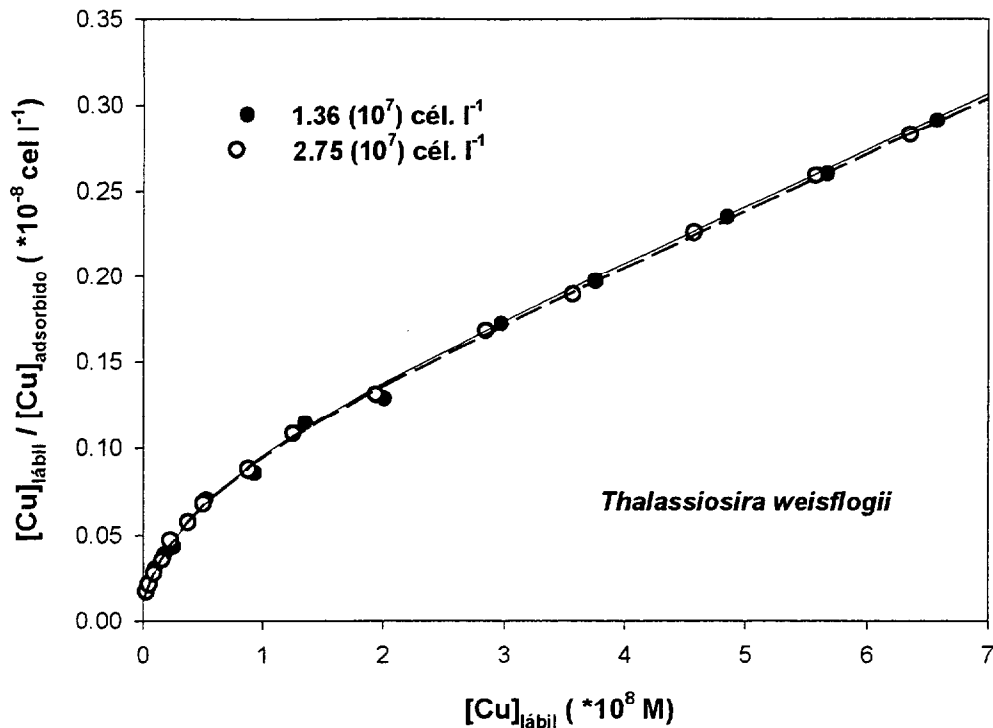


Figura 75. Representación de la linealización de van den Berg-Ruzic de las isothermas de adsorción presentadas en la figura 72. Corresponden a una valoración con plomo de dos suspensiones de *Thalassiosira weissflogii* con distinta concentración celular. Las líneas corresponden a la representación de las cantidades de plomo adsorbido calculadas a partir de los parámetros de adsorción obtenidos por el procedimiento iterativo propuesto en este trabajo.

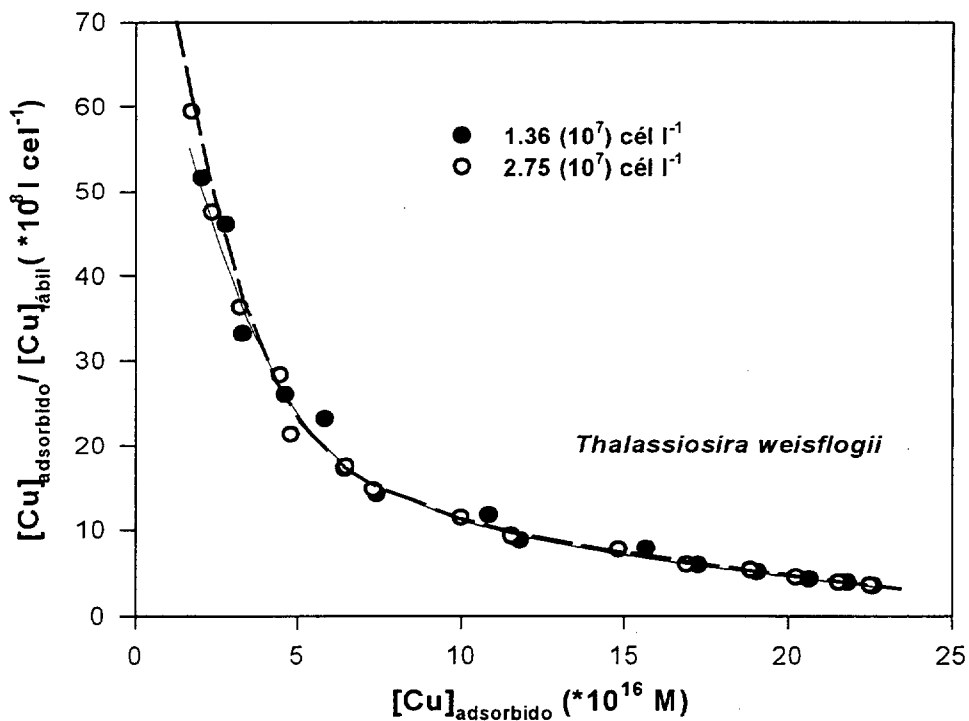


Figura 76. Representación de la linealización de Scatchard de las isothermas de adsorción presentadas en la figura 72. Corresponden a una valoración con plomo de dos suspensiones de *Thalassiosira weissflogii* con distinta concentración celular. Las líneas corresponden a la representación de las cantidades de plomo adsorbido calculadas a partir de los parámetros de adsorción obtenidos por el procedimiento iterativo propuesto en este trabajo.

En todas las figuras referidas pueden apreciarse dos segmentos lineales. Esto implica la existencia de más de un tipo de grupos funcionales, y la posibilidad de calcular parámetros de complejación para dos tipos de puntos de adsorción. Por lo tanto los iones que primero se adsorban lo harán con una constante de estabilidad condicional mayor que los que lo hagan posteriormente durante la valoración. La tabla XVII y XVIII contienen las constantes de estabilidad condicional de los grupos superficiales de las diatomeas respecto del plomo tanto para el caso de considerar un modelo heterogéneo con dos tipos de puntos de enlace superficiales, como para el de asumir un modelo homogéneo con un único tipo de ligandos.

Alga	cél l ⁻¹ (10 ⁷)	Γ _{max,1} 10 ¹⁶	log *K _{H,1}	log K _{β,1} ^S	Γ _{max,2} 10 ¹⁶	log *K _{H,2}	log K _{β,2} ^S
<i>Phaeod. tricornutum</i>	1.55	3.1 ± 0.2	10.52 ± 0.05	11.64 ± 0.15	22.9 ± 0.5	9.19 ± 0.01	10.31 ± 0.15
	2.67	4.8 ± 0.3	10.37 ± 0.05	11.49 ± 0.17	24.7 ± 0.4	8.94 ± 0.01	10.06 ± 0.11
<i>Thalass. weissflogii</i>	1.36	4.3 ± 0.8	10.76 ± 0.11	12.06 ± 0.25	27.4 ± 3.0	9.04 ± 0.02	10.34 ± 0.13
	2.75	3.8 ± 1.0	10.88 ± 0.07	12.18 ± 0.19	27.4 ± 2.7	9.08 ± 0.03	10.38 ± 0.15

Tabla XVII. Parámetros de capacidad adsorptiva de plomo correspondientes a las superficies celulares de *Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira weissflogii*. Las columnas 5 y 8 muestran las constantes de adsorción intrínsecas (válidas para cualquier pH). La obtención de los parámetros ha sido independiente entre los dos distintos tipos de ligandos superficiales considerados utilizando el método iterativo descrito en este trabajo. Constantes condicionales a pH=8.02. pK_{Phaeodactylum tricornutum}(pH=8.02)=9.11. pK_{Thalassiosira weissflogii}(pH=8.02)=9.30.

Los grupos funcionales de gran constante de estabilidad condicional de la superficie de *Thalassiosira weissflogii* muestran una mayor afinidad por el plomo que los de *Phaeodactylum tricornutum*. Para los grupos superficiales de menor afinidad por el plomo no existe una diferencia significativa entre las constantes de estabilidad de ambas algas, aunque los grupos funcionales por célula de *Thalassiosira weissflogii* son algo más numerosos. Esto supone que a bajas concentraciones de plomo disuelto en un medio en presencia de ambas diatomeas, *Thalassiosira weissflogii* presentará una mayor afinidad por la adsorción con el plomo del medio.

Las constantes de estabilidad condicional de los ligandos disueltos en el medio tras 36 horas de equilibrio son menores que las resultantes de la adsorción celular considerando un modelo homogéneo, y bastante similares a las de menor constante de estabilidad condicional de adsorción del modelo heterogéneo. Por lo tanto en el medio

que se presenta 36 horas tras la adición de las diatomeas, la tendencia del plomo va a ser a adsorberse preferentemente sobre la de complejarse en disolución.

Pero si se comparan las constantes de estabilidad de los grupos funcionales tanto de la superficie de la diatomea, como de los exudados del alga, resulta que, para el caso de *Phaeodactylum tricornutum*, los dos grupos de puntos de enlace presentan constantes de estabilidad muy similares (9.3 frente a 9.3-9.4). Esto parece sugerir la posibilidad de que las distribuciones de grupos funcionales que representan estas cifras sean de

alga	cél l ⁻¹ (10 ⁷)	Γ _{max} 10 ¹⁶ (mol cél ⁻¹)	log K' _H ^S	log K _β ^S	log K' _{PbL} (medio)	log K' _{PbL} (exudados)
<i>Phaeod. tricornutum</i>	1.55	24.1 ± 0.5	9.40 ± 0.02	10.52 ± 0.11	9.05 ± 0.04	~ 9.3
	2.67	25.0 ± 0.8	9.32 ± 0.03	10.44 ± 0.12		
<i>Thalass. weissflogii</i>	1.36	25.7 ± 0.4	9.47 ± 0.03	10.77 ± 0.12	9.32 ± 0.01	~ 9.8
	2.75	25.9 ± 0.7	9.44 ± 0.02	10.74 ± 0.11		

Tabla XVIII. Muestra para las dos algas los parámetros de adsorción para un supuesto caso de superficie homogénea. La sexta columna muestra la capacidad complejante del medio tras experimentar un equilibrio de 36 horas con una concentración celular de $1.34 \cdot 10^7$ cél l⁻¹ de *Phaeodactylum tricornutum* y de $1.32 \cdot 10^7$ cél l⁻¹ de *Thalassiosira weissflogii*. La última columna muestra los valores estimados durante la determinación de capacidades complejantes de la constante de complejación condicional que deben tener los exudados de las dos algas referenciadas. Las constantes condicionales son a pH_{total}=8.02.

naturaleza parecida. En cambio la constante de estabilidad de los exudados liberados por *Thalassiosira weissflogii* es bastante mayor que la de los grupos funcionales de la diatomea (alrededor de 9.8 sobre 9.4-9.5) considerando un modelo homogéneo. Sin embargo, si lo que se comparan son las constantes de estabilidad condicional según un modelo heterogéneo tanto de la superficie del alga como de los ligandos del agua de mar (único caso en el que es posible la comparación), la similitud de las afinidades encontradas entre los grupos funcionales de la superficie celular y de los ligandos disueltos es muy grande.

<i>Thalassiosira weissflogii</i>	log K ₁ '	log K ₂ '
Grupos superficiales	10.7-10.8	9.0-9.1
Ligandos disueltos	≈ 10.9	9.1-9.2

Tabla XIX. Comparación de las constantes de estabilidad condicionales (pH_{total}=8.02) de los ligandos superficiales y los exudados pertenecientes a *Thalassiosira weissflogii*

La tabla XIX muestra los valores de las constantes de estabilidad condicional obtenidas para los dos tipos de ligandos considerados en el modelo tanto de la superficie

como de los exudados. De estos resultados se puede interpretar que la distribución de grupos funcionales de los exudados de estas dos diatomeas es muy similar a la de los grupos funcionales superficiales responsables de la adsorción del plomo. Es posible que los grupos funcionales que poseen los exudados de estas dos diatomeas susceptibles de complejar al plomo, sean los mismos, y en una proporción similar a los que aparecen en la superficie de las diatomeas. Sin embargo es necesario recordar que esta técnica no permite precisar la naturaleza de los compuestos valorados por el metal.

5.2.4 Especiación en un agua próxima a costa

En las figuras 77 y 78 aparece la especiación del plomo para el caso de un agua de mar de origen más cercano a costa que la previamente utilizada en presencia de ambas diatomeas, así como la concentración de cobre complejado que habría en el medio en el caso de que este fuera el agua de mar tomada a una milla de la costa, para comparar la diferente especiación en función del medio utilizado.

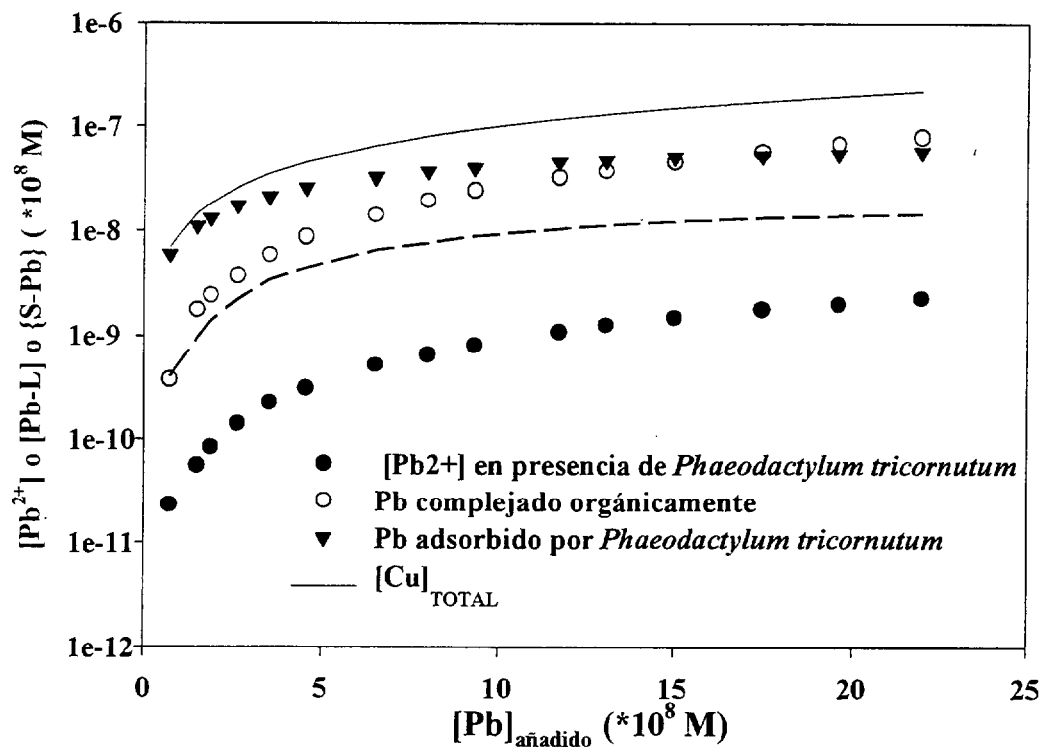


Figura 77. Especiación del plomo en las muestras utilizadas para la valoración metálica de la superficie de *Phaeodactylum tricornutum*. Concentración celular en las muestras de $2.67 \cdot 10^7$ células l^{-1} . $pH_{total}=8.02$. La línea discontinua representa la concentración de plomo complejado orgánicamente que habría con los valores de plomo iónico existentes en el medio en el agua de mar estudiada en el apartado de complejación ($[L]=22.7nM$; $\log K'=8.89$).

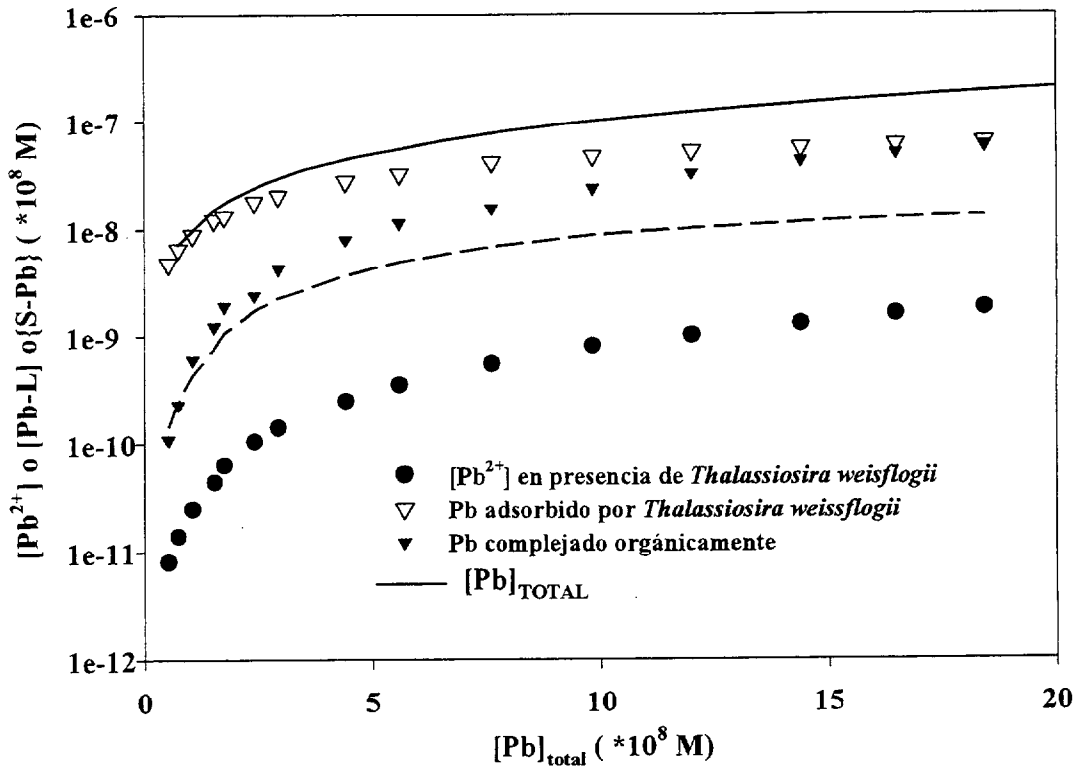


Figura 78. Especiación del plomo en las muestras utilizadas para la valoración metálica de la superficie de *Thalassiosira weissflogii*. Concentración celular en las muestras de $2.75 \cdot 10^7$ células l^{-1} . $pH_{total}=8.02$. La línea discontinua representa la concentración de plomo complejoado orgánicamente que habría con los valores de plomo iónico existentes en el medio en el agua de mar estudiada en el apartado de complejación ($[L]=22.7nM$; $\log K'=8.89$).

Este agua se diferencia de una de origen más externo a la costa en que posee una mayor concentración total disuelta de metales traza (6 nM frente a los 1.5 nM de la anteriormente empleada). La capacidad adsortiva en ambos experimentos es posible calcularla conociendo el número de células presente y las concentraciones de grupos funcionales afines por el plomo que aparecen en la tabla XVIII: $6.6 \cdot 10^{-8}$ M para *Phaeodactylum tricorutum* ($\log K'_{pH=8.02}=9.36$) y $7.1 \cdot 10^{-8}$ M para *Thalassiosira weissflogii* ($\log K'_{pH=8.02}=9.45$). Las características complejantes del agua de mar previamente utilizada ($22.7 \cdot 10^{-8}$ M; $\log K'_{pH=8.02}=8.9$) hacen que en un experimento similar con este medio, el resultado hubiera sido una pequeña concentración de plomo complejoado comparado con la fracción adsorbida, que permanecería casi un orden de magnitud por debajo en todo el rango de concentración de plomo total utilizado en la valoración. Pero en este agua de mar de origen más costero se aprecia como la concentración de plomo complejoado a bajas concentraciones totales de plomo no varía (línea discontinua y primer dato de metal complejoado de las figuras 77 y 78), lo cual es distinto de lo acontecido en el caso del cobre en el que el agua de mar más próxima a costa, poseía ligandos de gran constante de estabilidad que aumentaban en gran medida

la fracción complejada a baja concentración de cobre total disuelto. En el rango final de la valoración sí que divergen la fracción complejada estimada y la calculada para el agua de mar utilizada previamente, por lo que este agua de mar debe tener una capacidad complejante mucho mayor, en torno a $2\cdot 3\cdot 10^{-7}$ M. La constante de estabilidad promediada de estos ligandos es bastante menor que la de los grupos superficiales de ambas diatomeas, ya que a pesar de ser su capacidad complejante mayor, la concentración complejada no iguala a la adsorbida hasta que esta se encuentra muy cerca del límite de saturación.

5.2.5 Presencia de otros metales en el medio

Al igual que para el caso del cobre se estudió la especificidad de los grupos funcionales de la superficie de las algas y de los ligandos del medio por el plomo frente a la presencia en el medio de cobre.

5.2.5.1 COMPLEJACION

Para el caso de los ligandos disueltos en el medio se procedió al igual que en el caso anterior a, tras permitir el equilibrio de las algas con una muestra de agua de mar durante 36 horas, añadir a este medio que iba a ser valorado con plomo la cantidad de 100 nM de Cu(II), tras la retirada por filtración de las algas. De este modo se comprobaba el efecto de la presencia de este metal sobre los grupos funcionales que en su ausencia complejan al plomo. El resultado considerando un modelo homogéneo aparece en la tabla XX. Al igual que para el caso anterior no se ha encontrado un

C_L (nM)	$\log *K_{Pb}^{2+}$	alga	C_L (nM)	$\log *K_{Pb}^{2+}$
32.7 ± 0.7	9.03 ± 0.02	Phaeod. tricornutum	33.1 ± 1	$8.98 \pm .02$
32.1 ± 1.1	9.32 ± 0.04	Thalass. weissflogii	32.8 ± 0.7	9.17 ± 0.05

Tabla XX. Comparación entre los parámetros de complejación para el plomo del agua de mar utilizada en este trabajo tras 36 horas de equilibrio con $1.34\cdot 10^7$ cél. l⁻¹ de *Phaeodactylum tricornutum* y $1.32\cdot 10^7$ cél. l⁻¹ de *Thalassiosira weissflogii*. Los datos corresponden al medio tras la retirada de las células (columnas 2 y 3) y al medio tras la retirada de las células y adición posterior de 100 nM de Cu (columnas 4 y 5).

descenso significativo en la capacidad complejante del medio, por lo que la fracción de la materia orgánica disuelta que es capaz de complejar al plomo presente en el medio, resulta muy específica para dicho metal, y un aporte de cobre al medio no origina que parte alguna de estos ligandos disueltos resulte disponible para los iones Pb^{2+} en disolución.

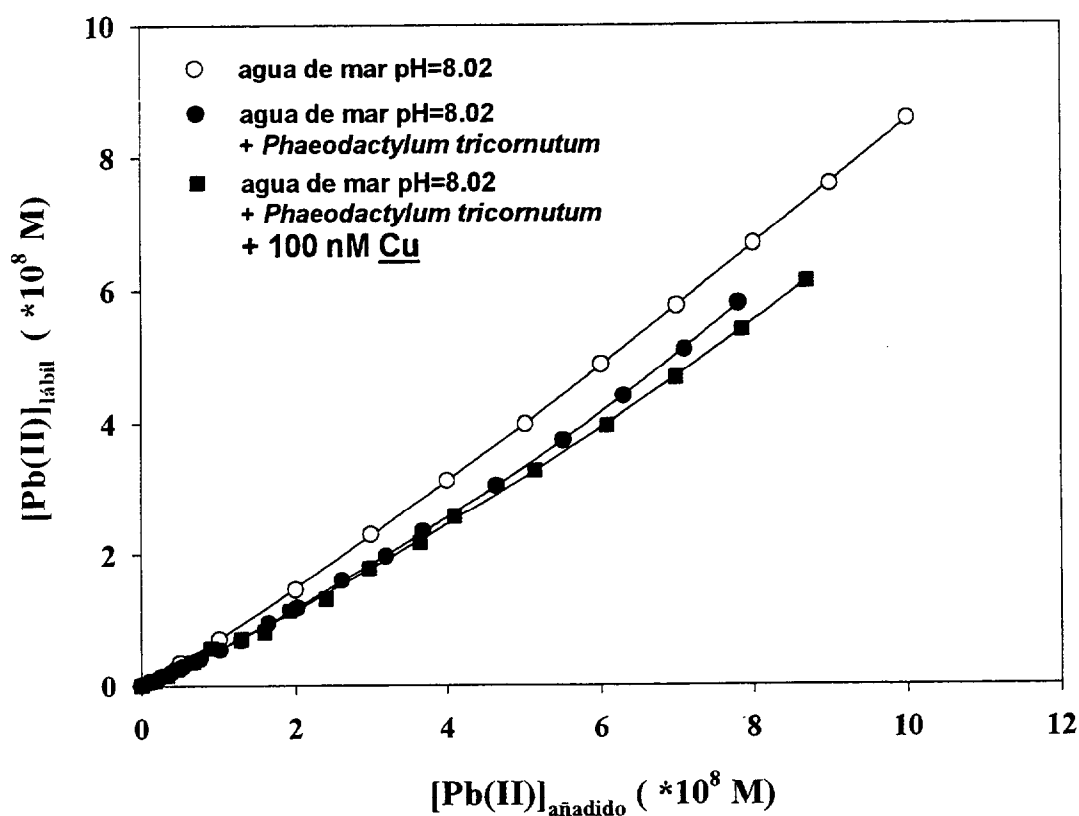


Figura 79. Valoraciones metálicas del agua de mar tras 36 horas de equilibrio con $1.34 \cdot 10^7$ cel l^{-1} de *Phaeodactylum tricorutum*, en presencia y en ausencia de una adición de 100 nM de Cu(II).

Al igual que sucedió con el cálculo de la capacidad complejante para el caso de *Thalassiosira weissflogii* previamente, también se observa una pequeña curvatura en la distribución de puntos en las linealizaciones de la isoterma de Langmuir (figura 81). Por lo tanto es posible utilizar un modelo heterogéneo considerando la existencia de dos tipos de ligandos en el medio. En la tabla XXI aparecen los valores de los parámetros de complejación obtenidos, comparándolos con los obtenidos para el mismo alga en ausencia de una adición de cobre al medio.

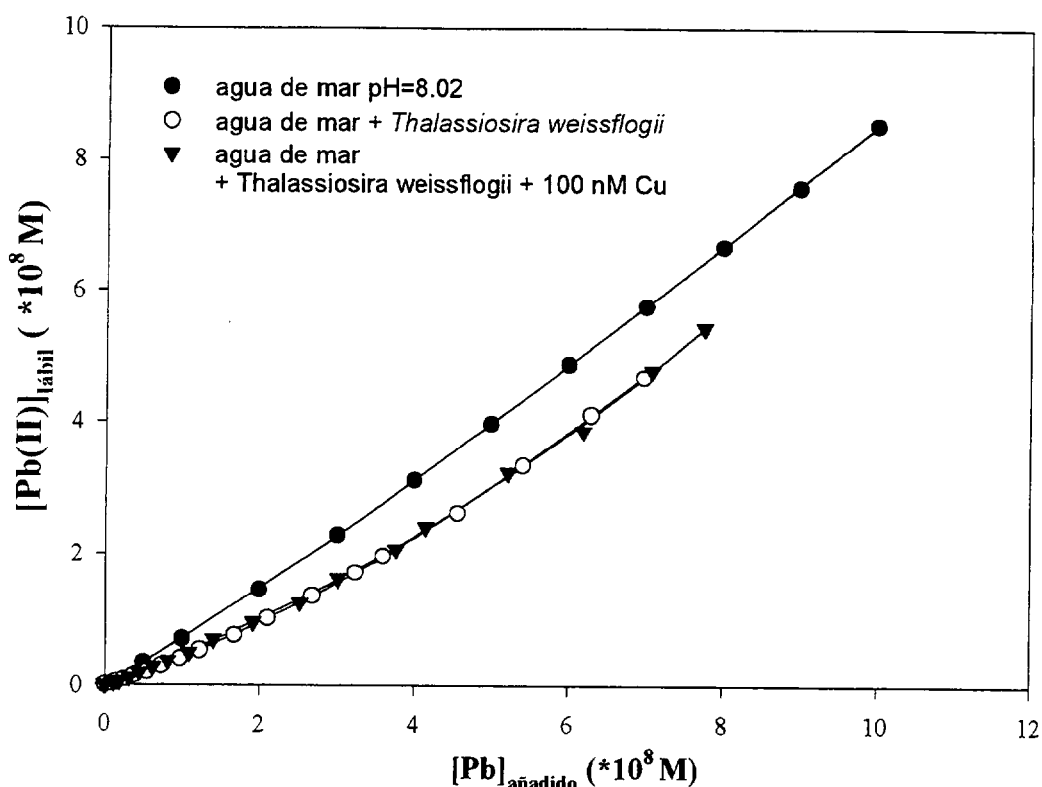


Figura 80. Valoraciones metálicas del agua de mar tras 36 horas de equilibrio con $1.32 \cdot 10^7$ cel l^{-1} de *Thalassiosira weissflogii*, en presencia y en ausencia de una adición de 100 nM de Cu(II).

Como se puede observar en la tabla XXI y en la figura 81 la complejación del medio apenas se ha visto afectada por la presencia de plomo en el medio. Esto indica que el espectro de ligandos en disolución de variada afinidad por el cobre son en general muy específicos por el plomo en comparación con el cobre.

	C_{L1} (nM)	$\log *K_{L1}$	C_{L2} (nM)	$\log *K_{L2}$
- Cu	0.9 ± 0.9	10.90 ± 0.3	33.6 ± 1.3	$9.17 \pm .003$
+ Cu	1.0 ± 0.4	10.90 ± 0.4	34.4 ± 2.1	9.07 ± 0.05

Tabla XXI. Comparación entre los parámetros de complejación para el plomo del agua de mar para *Thalassiosira weissflogii*, obtenidos según un modelo heterogéneo de la capacidad complejante, en presencia y en ausencia de un aporte de 100 nM de Cu(II)

Dado que los exudados de la diatomea son una parte significativa de estos ligandos, especialmente de los de más alta constante de estabilidad condicional, es posible suponer por tanto que estos ligandos exudados por *Thalassiosira weissflogii* con afinidad por el plomo, resultan muy específicos por este metal en comparación con lo que lo son por el cobre.

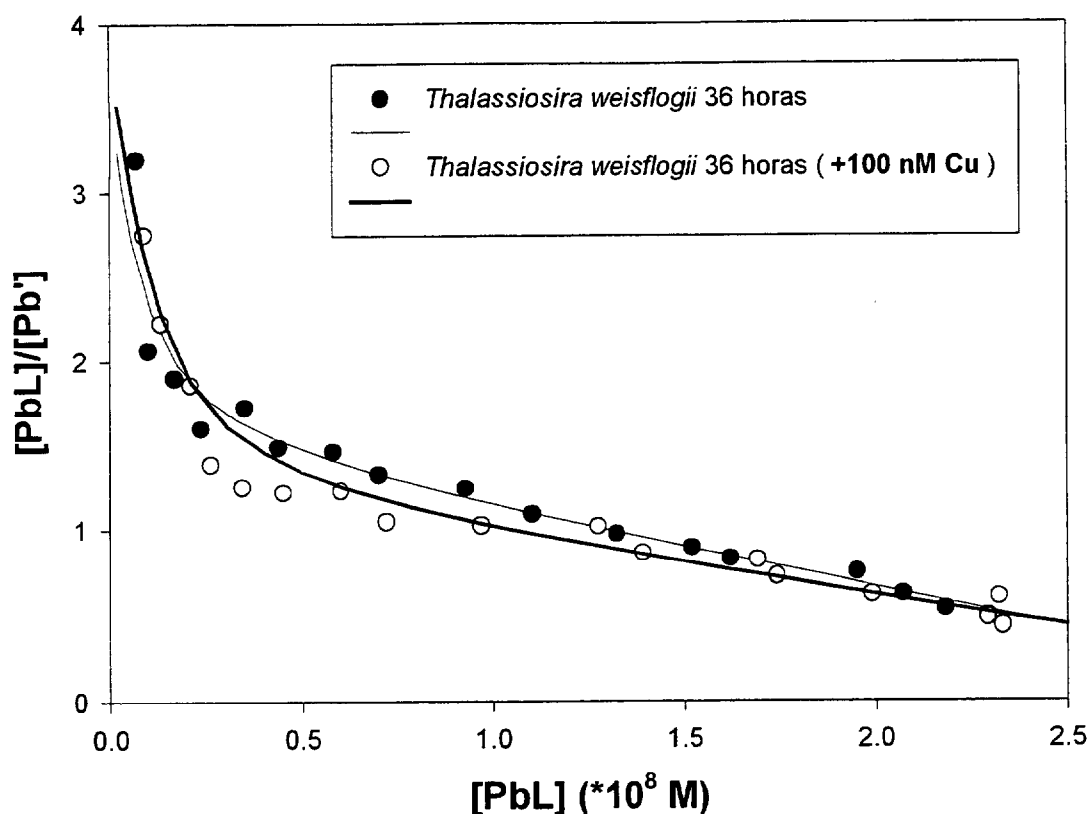


Figura 81. Transformada de Scatchard de las isoterma de Langmuir de las valoraciones con plomo(II) de agua de mar tras permanecer en equilibrio con 1.32 cel l-1 de *Thalassiosira weissflogii*, tanto en presencia como en ausencia de una adición al medio de 100 nM de Cu(II).

5.2.5.2 ADSORCION

Para estudiar como afecta la presencia de cobre en el medio a la adsorción del plomo se añadieron a las distintas muestras en equilibrio con el plomo, previamente a la adición por diez minutos de las algas, 100 nM de Cu. La concentración de grupos funcionales en moles por unidad de volumen utilizada en estos estudios es aproximadamente de 40 nM para la suspensión de $1.55 \cdot 10^7$ cél l⁻¹ de *Phaeodactylum tricorutum* y de 35 nM para la suspensión de $1.36 \cdot 10^7$ cél l⁻¹ de *Thalassiosira weissflogii*. Por lo tanto la concentración de cobre añadida supone entre 2 y 3 veces la concentración de grupos superficiales de las diatomeas. Los resultados tanto para considerar un modelo homogéneo, como uno heterogéneo de la adsorción se encuentran reflejados en la tabla XXII.

Para el caso de la diatomea *Phaeodactylum tricorutum* se observa un mínimo descenso de la capacidad adsortiva según el modelo homogéneo, como indica el que la

diferencia entre dicha capacidad con y sin adición de Cu, esté dentro del error experimental (24.5 y $23.4 \cdot 10^{-16}$ M).

El modelo heterogéneo muestra como la cantidad de ligandos superficiales de menor constante de estabilidad no cambia apenas, pero deja en evidencia que los ligandos de mayor constante de estabilidad condicional por el plomo de la superficie del alga, sí se ven fuertemente afectados por la presencia de cobre en el medio (pérdida del 60%). La reducción de la capacidad adsorptiva de este grupo de ligandos superficiales se ve acompañada por un aumento de la constante de adsorción, esto debe indicar la gran heterogeneidad de los grupos funcionales dentro de este grupo de ligandos superficiales, y como la fracción que es desplazada por el cobre será aquella de menor afinidad por el plomo dentro del intervalo de este grupo de ligandos de mayor constante de estabilidad condicional. Todas estas conclusiones deben tomarse con la reserva de estar trabajando en la región de la curva de valoración sujeta a mayores errores absolutos en la medida.

La figura 82 muestra como las dos curvas que representan a los ajustes obtenidos

Alga		$\Gamma_{\max,1} 10^{16}$	$\log^* K_{H,1}$	$\Gamma_{\max,2} 10^{16}$	$\log^* K_{H,2}$	$\Gamma_{\max} 10^{16}$	$\log^* K_H$
<i>Phaeod. tricornutum</i>	- Cu	4.0 ± 1.1	10.45 ± 0.12	23.8 ± 3.2	9.07 ± 0.26	24.5 ± 0.7	9.36 ± 0.05
	+ Cu	1.5 ± 0.6	10.86 ± 0.3	23.4 ± 0.6	9.19 ± 0.03	23.4 ± 0.6	9.32 ± 0.03
<i>Thalass. weissflogii</i>	- Cu	4.1 ± 1.6	10.82 ± 0.11	27.4 ± 3.0	9.06 ± 0.7	25.8 ± 0.14	9.46 ± 0.01
	+ Cu	3.8 ± 0.2	10.87 ± 0.09	24.9 ± 0.7	9.11 ± 0.03	23.2 ± 0.8	9.49 ± 0.03

Tabla XXII. Parámetros de capacidad adsorptiva de plomo de las superficies celulares de *Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira weissflogii* en ausencia y en presencia de 100 nM de Cu en el medio. Las columnas 3 a 6 presentan los resultados de considerar un modelo heterogéneo de dos tipos de grupos funcionales. Las columnas 7 y 8 presentan los resultados según el modelo homogéneo. Constantes condicionales a pH=8.02.

según los parámetros de adsorción que aparecen en la tabla XXII divergen fuertemente en la región donde los grupos funcionales de mayor afinidad por el plomo son mayoritarios. Asimismo la divergencia final que muestra la isoterma de Langmuir viene dada por la mayor diferencia que existen entre las capacidades adsorptivas totales obtenidas según el método iterativo ($27.8 \cdot 10^{-16}$ M cel⁻¹ frente a $25.2 \cdot 10^{-16}$ M cel⁻¹ obtenidos en presencia de Cu en el medio).

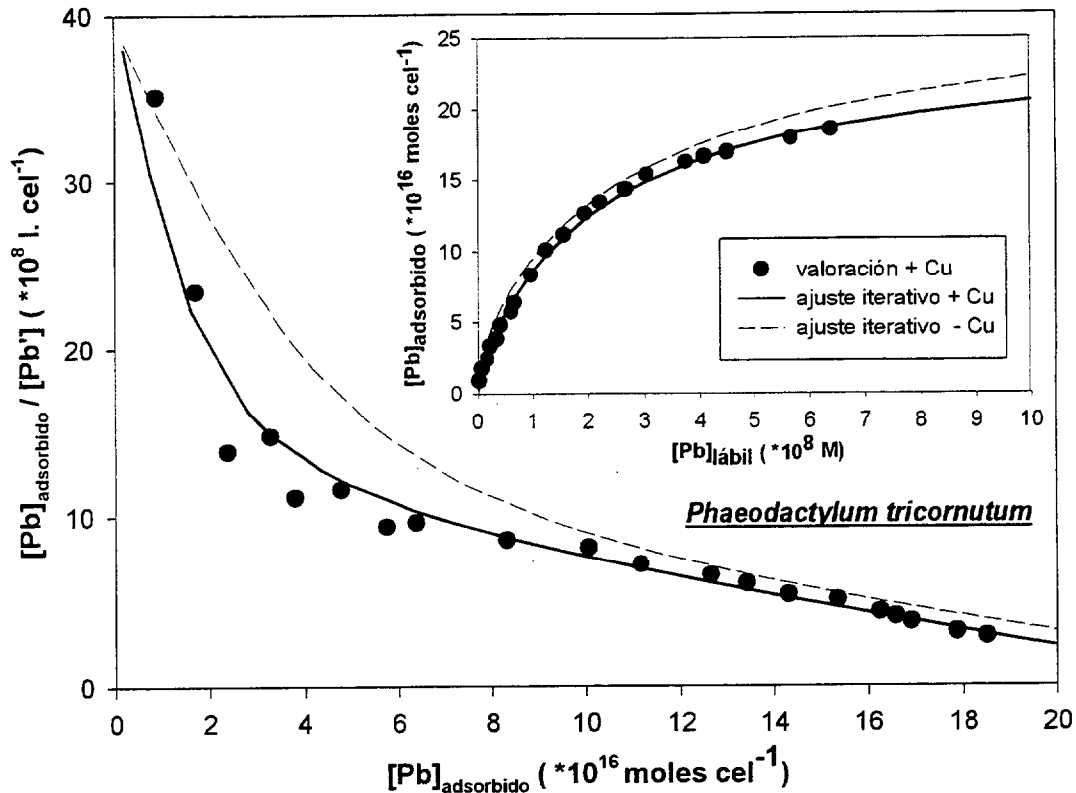


Figura 82. Representación de la linealización de Scatchard de la valoración de la superficie de *Phaeodactylum tricornutum* con plomo en presencia de 100 nM de Cu. La figura incluida en el recuadro muestra la isoterma de Langmuir de los mismos datos. La línea discontinua representa los valores que se obtiene calculando la fracción adsorbida con los parámetros de adsorción obtenidos en ausencia de un exceso de cobre en el medio.

El caso de *Thalassiosira weissflogii* es distinto. El modelo homogéneo muestra un descenso de la capacidad adsortiva de $2.6 \cdot 10^{-16} \text{ M cel}^{-1}$ (el 10% del total), lo cual no es mucho mayor que en el caso anterior. Pero el modelo heterogéneo descubre que este desplazamiento del plomo adsorbido se verifica en los ligandos de menor constante de estabilidad condicional. Mientras los ligandos de mayor afinidad por el plomo mantienen su valor de la constante de estabilidad condicional, y el descenso del valor de su concentración celular es mínimo, y se encuentra dentro del error experimental ($0.3 \cdot 10^{-16} \text{ M cel}^{-1}$), los ligandos de menor constante de estabilidad condicional son los que experimentan el descenso en su concentración significativo (el del 10% que refleja el modelo homogéneo). Por lo tanto, para el caso de esta diatomea, sus grupos superficiales susceptibles de adsorber al plomo de mayor afinidad por éste, resultan de una enorme especificidad por este metal frente al cobre. Mientras que sus grupos funcionales de menor constante de estabilidad condicional resultan selectivos en gran medida aunque una adición de 100 nM de cobre les hace reducir en un 10% su capacidad adsortiva.

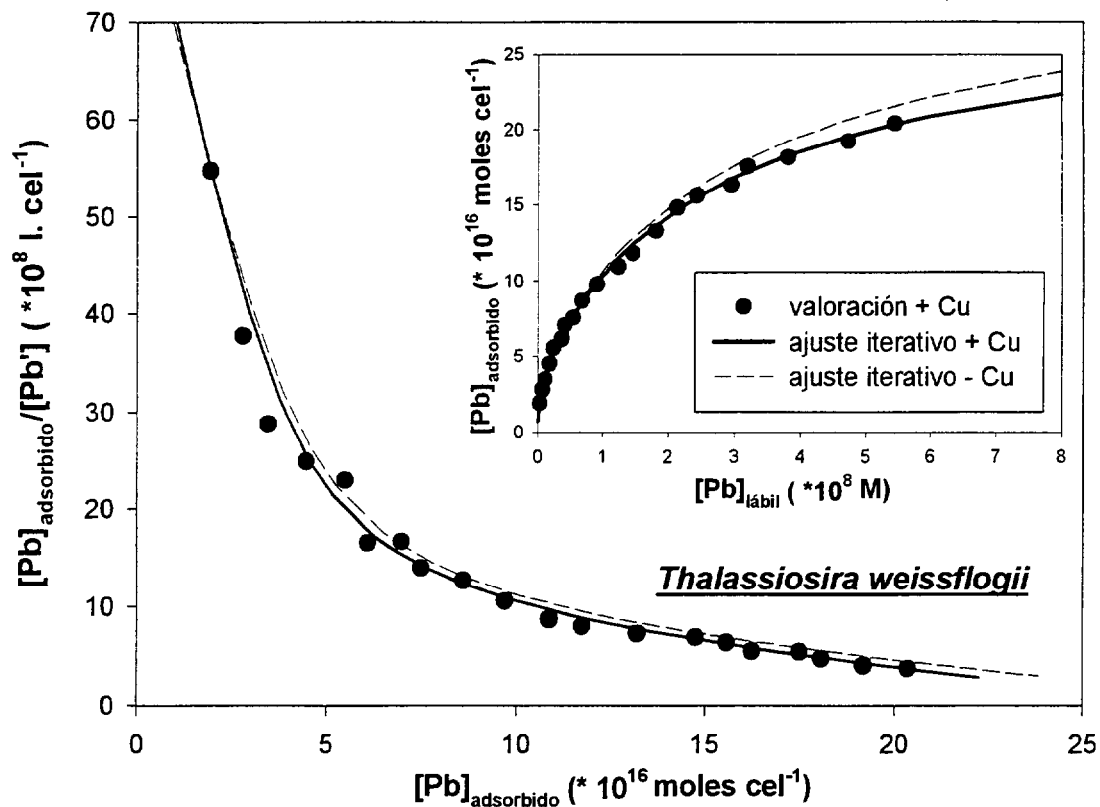


Figura 83. Representación de la linealización de Scatchard de la valoración de la superficie de *Thalassiosira weissflogii* con plomo en presencia de 100 nM de Cu. La figura incluida en el recuadro muestra la isoterma de Langmuir de los mismos datos. La línea discontinua representa a los valores que se obtiene calculando la fracción adsorbida a partir de los parámetros de adsorción obtenidos en ausencia de un exceso de cobre en el medio.

Todo el razonamiento anterior queda evidenciado asimismo en la figura 83. En la misma se puede apreciar la coincidencia de los trazos de ambas líneas en la zona de la valoración donde los ligandos superficiales de mayor afinidad por el plomo son mayoritarios. La isoterma de Langmuir que aparece en el recuadro incluido en la misma figura muestra la tendencia de la valoración en ausencia de cobre a alcanzar un valor mayor de capacidad adsortiva total.

De todo esto se deduce una gran especificidad de los grupos funcionales de la superficie de las dos diatomeas por el plomo frente al cobre en general, ya que la capacidad adsortiva de estas superficies no se reduce nunca más del 10% a pesar de la gran adición de cobre al medio. El único caso de escasa selectividad por el plomo frente al cobre es el de los grupos funcionales de mayor constante condicional de estabilidad de *Phaeodactylum tricornutum*.

5.2.6 Efecto del pH

Ya ha sido descrita en el apartado anterior de adsorción cúprica la importancia del pH como una variable clave que gobierna la extensión de la reacción de adsorción. Mediante el uso de una curva de valoración acidimétrica tomada a partir de una suspensión de algas a una concentración constante de metales se puede obtener directamente la dependencia de la interacción del metal con el pH. Las figuras 84 y 85 muestran el efecto del pH en los procesos de adsorción, considerando una adición de 65 nM de Pb(II), de suspensiones de $2.67 \cdot 10^7$ células l^{-1} de *Phaeodactylum tricorutum* y $2.7 \cdot 10^7$ células l^{-1} de *Thalassiosira weissflogii* respectivamente, en el rango de pH de 3 a 8.9. En dichas figuras se muestran también los cambios en la especiación del plomo en disolución (tanto lábil como complejado orgánicamente), así como la distribución de Pb(II) lábil en ausencia de algas.

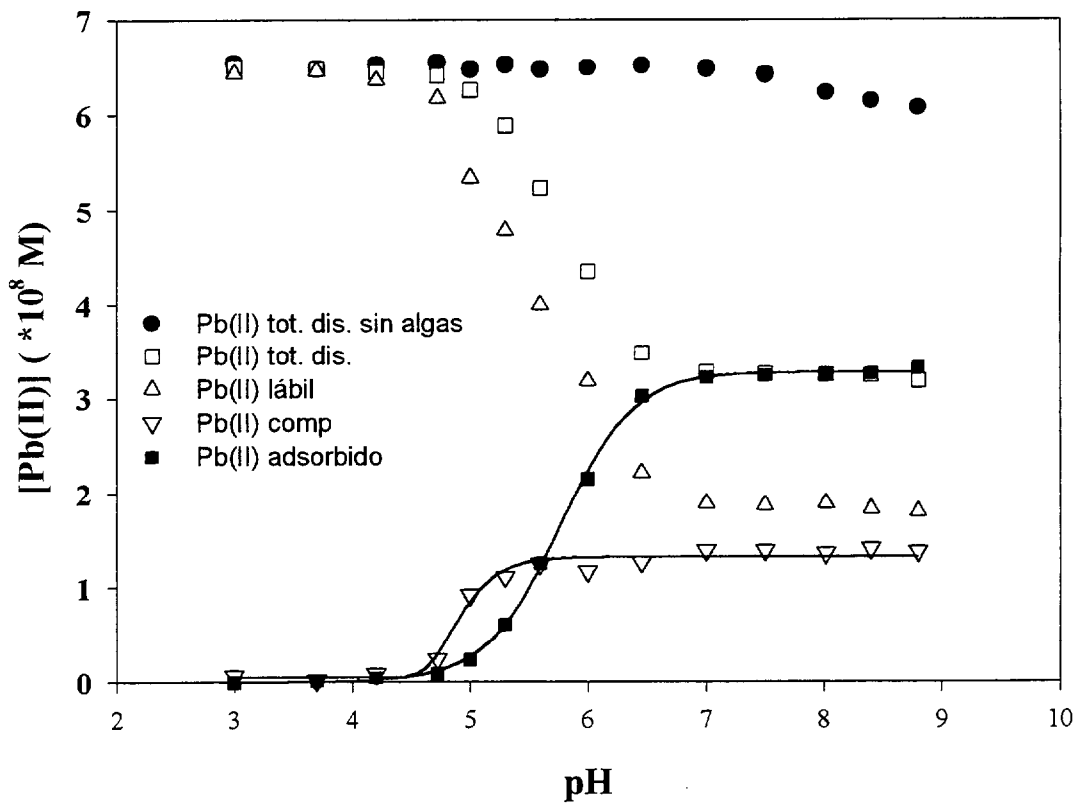


Figura 84. Efecto del pH sobre la especiación del plomo en presencia de $2.67 \cdot 10^7$ células l^{-1} de *Phaeodactylum tricorutum*. $[Cu]_{TOTAL} = 6.5 \cdot 10^{-8}$ M.

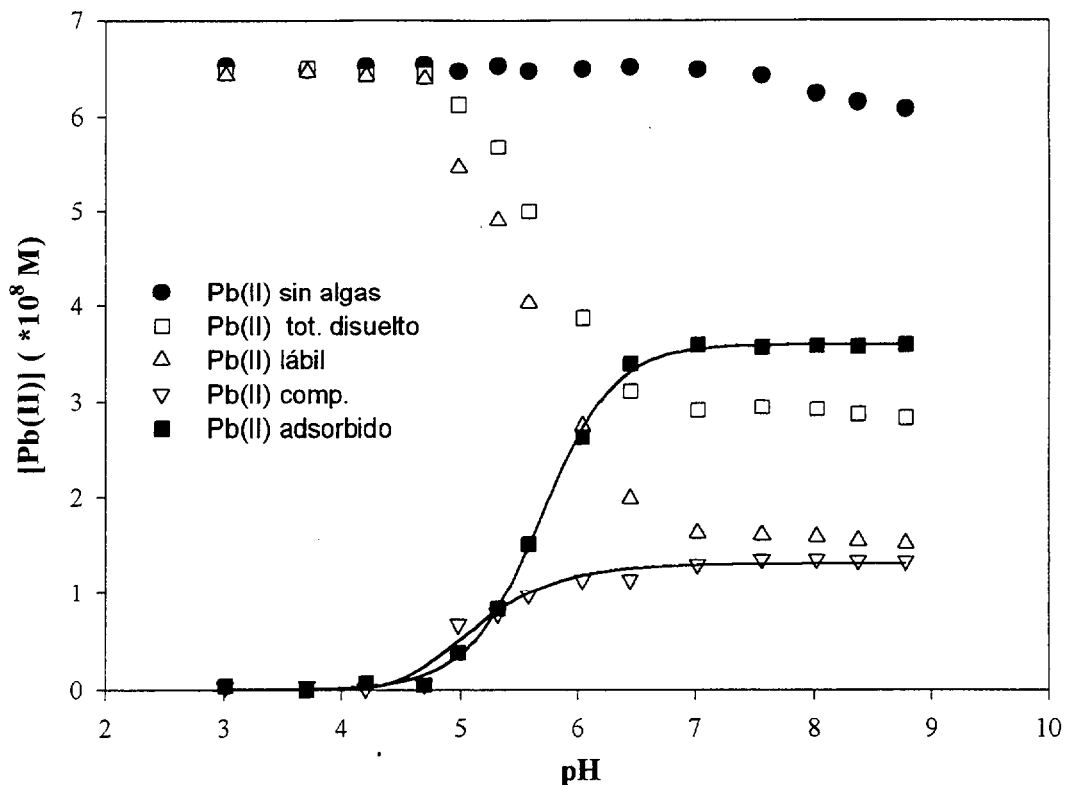


Figura 85. Efecto del pH sobre la especiación del plomo en presencia de $2.7 \cdot 10^7$ células l^{-1} de *Thalassiosira weissflogii*. $[\text{Cu}]_{\text{TOTAL}} = 6.5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$.

Como se observa para otros sistemas de adsorción, existe un intervalo de 1-2 unidades de pH donde la extensión de la adsorción aumenta desde un valor nulo hasta casi el 100% de su concentración máxima (el intervalo de pH de 5 a 7). El pH de la disolución a través de las reacciones de protonación y desprotonación, tanto de las especies disueltas como de los sitios superficiales, va a influir en cualquiera de las reacciones químicas que tengan lugar en el seno de la disolución. Ya se ha referido el impacto que estas reacciones tendrán sobre la carga neta de la superficie celular. Se observa un comportamiento bastante distinto entre la adsorción y la complejación. La complejación parece acercarse a la concentración máxima a un valor de pH menor (sobre 6 en el caso de *Thalassiosira weissflogii* y entre 5 y 5.5 para *Phaeodactylum tricornutum*). Por lo tanto este menor efecto del pH sobre la complejación parece indicar una naturaleza distinta de la distribución general de los grupos funcionales complejantes del medio (exudados más los ligandos encontrados en el agua de mar muestreada), respecto de la naturaleza del conjunto de grupos funcionales de la superficie de ambas diatomeas. Por otro lado se observa como a partir de pH 7, la especiación del plomo es prácticamente constante.

Al igual que en el caso del estudio de las reacciones de complejación y adsorción del cobre se hace uso, en el rango de pH donde se verifican las reacciones de desprotonación y unión del plomo, de la expresión:

$$\log \frac{\{S - Pb\}}{[Pb^{2+}]} = Z + n pH \quad (73)$$

donde $Z = \log K_M + \log \{SH_n\}$. Si Z se considera constante, la pendiente de dicha ecuación debería ser 2 ó 1 para la adsorción de metales a un ligando que llevara consigo la pérdida de 2 ó 1 protones, respectivamente. Ya se indicó en el estudio realizado con cobre que el proceso de adsorción superficial puede tener lugar sobre sitios desprotonados o también sobre sitios ocupados por metales alcalino-térreos, que de esta manera no llevaría consigo el desplazamiento de protones. Los valores obtenidos son de 0.95 ± 0.02 para *T. weissflogii* y 1.13 ± 0.05 en el caso de *P. tricornutum*. En este caso el promedio para *Thalassiosira weissflogii* es la pérdida de más de un protón por ion de plomo adsorbido a pesar del efecto de los cationes mayoritarios reseñado, por lo que el número de grupos que liberan más de un protón es superior al de grupos funcionales que experimentan un intercambio iónico. Para el caso de *Phaeodactylum tricornutum*, se podría considerar que el número de sitios con cero protones intercambiados supera por poco al de sitios con 2 protones. Sin embargo, todo este razonamiento implicaría que el valor de Z permanece constante en el rango de pH de 4.5 a 7, lo cual no es estrictamente así, ya que el cambio de pH afectará a la distribución de cargas sobre la superficie del alga.

5.2.7 Efecto de la salinidad

El efecto de la salinidad sobre las reacciones de adsorción y complejación fue estimado permitiendo el equilibrio de muestras de distinta salinidad (entre 14 y un valor máximo de 36‰) con una suspensión de diatomeas, manteniendo fijo el pH. Posteriormente se añadía la concentración seleccionada de Pb(II) y se procedía a los diez minutos a determinar la especiación del medio. Los resultados obtenidos aparecen en las figuras 86 y 87.

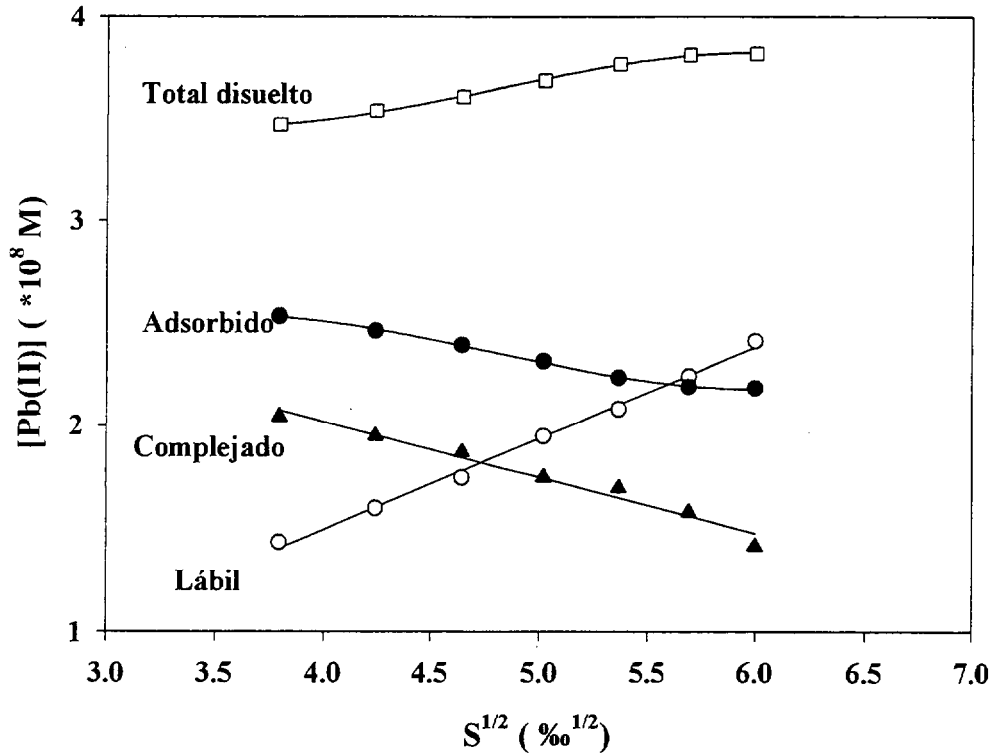


Figura 86. Efecto de la salinidad sobre la especiación de una concentración de $6.2 \cdot 10^{-8}$ M de Pb(II) en presencia de $2.67 \cdot 10^7$ cel l⁻¹ de *Phaeodactylum tricornutum*.

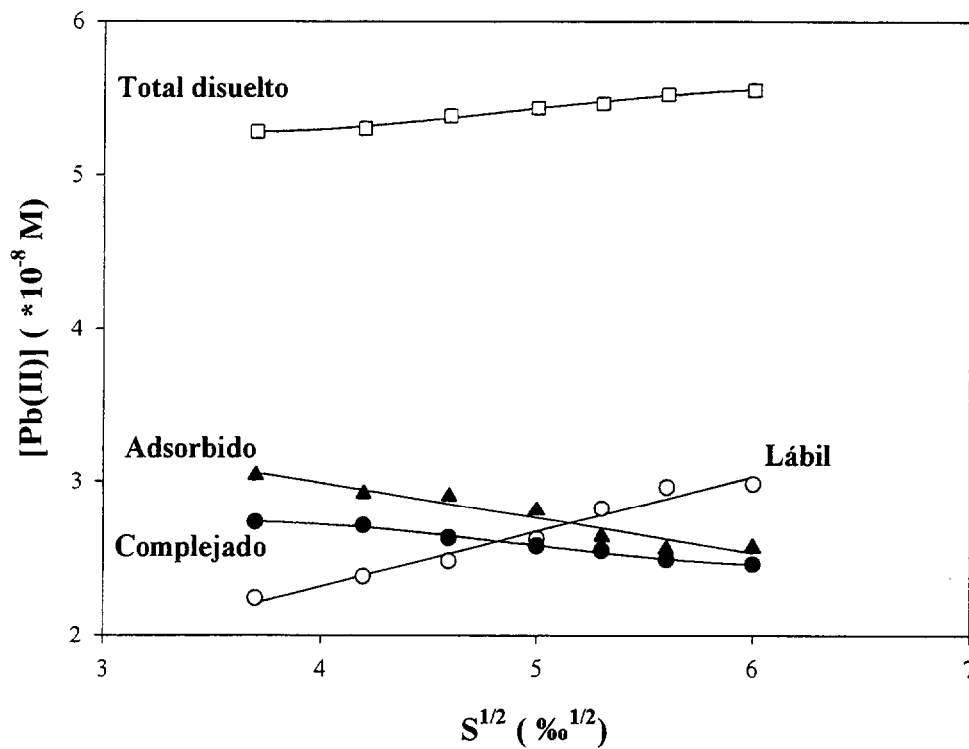


Figura 87. Efecto de la salinidad sobre la especiación de una concentración de $8.01 \cdot 10^{-8}$ M de Pb(II) en presencia de $1.41 \cdot 10^7$ cel l⁻¹ de *Thalassiosira weissflogii*.

Como ya se ha referido previamente para la adsorción de cobre, la presencia de los cationes mayoritarios marinos en el medio (Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , etc.) supone una competencia para los metales traza en disolución, por los ligandos tanto superficiales como de la materia orgánica disuelta. Esta competición queda reflejada en las figuras 86 y 87, donde una mayor salinidad del medio hace que la fracción de cobre que se adsorbe y la que se compleja sean menores.

También ha sido puesta de manifiesto la imposibilidad de estudiar en detalle el efecto de la salinidad sobre la complejación ya que el medio de estudio ha sido obtenido por sucesivas diluciones del original, con lo que la materia orgánica en disolución ha visto reducida su concentración, lo cual es contrario al aumento de la concentración de la fracción complejada observado. Esto último indica una fuerte dependencia de la complejación de plomo respecto de la presencia de otros cationes en el medio. Otro hecho que impide una cuantificación del efecto de la salinidad sobre la complejación es que el tiempo de equilibrio no parece suficiente para que la reacción de complejación alcance un pseudoequilibrio (Capodaglio *et al.*, 1990, dan tiempos mayores para la reacción de complejación de los ligandos orgánicos naturales con el plomo que con el cobre, al contrario de lo obtenido para la reacción de adsorción).

En cambio la adsorción sí que permite un estudio más detallado al ser suficiente el tiempo de pseudoequilibrio alcanzado y permanecer constante la concentración de grupos funcionales en el medio. La adsorción disminuye cuanto mayor es la fuerza iónica del medio debido al intercambio iónico que se verifica. Dado que se conoce a $\text{pH}=8.02$ y salinidad 37.2 la capacidad adsorptiva de las células de las dos diatomeas, haciendo uso de la isoterma de Langmuir (ecuación 54), y de las concentraciones estimadas en este experimento de cobre lábil y cobre adsorbido, es posible calcular la constante de estabilidad condicional de los grupos superficiales en función de la salinidad del medio a $\text{pH}=8.02$. El resultado para ambas diatomeas aparece en la figura 88.

Un desplazamiento de los resultados de la linealidad supondría que a bajas salinidades, la cantidad total de grupos funcionales capaces de adsorber al cobre es distinta, debido a que no han podido ser valorados al añadir plomo, ya que estaban adsorbiendo fuertemente a cationes mayoritarios. Pero la linealidad alcanzada a salinidades un 30% respecto de la original implica que el número de grupos funcionales capaces de adsorber al cobre es el mismo en todo el intervalo de estudio, y que la

afinidad por los cationes mayoritarios que experimentan no impide que alcancen un equilibrio con adiciones de plomo como las empleadas en este diseño experimental.

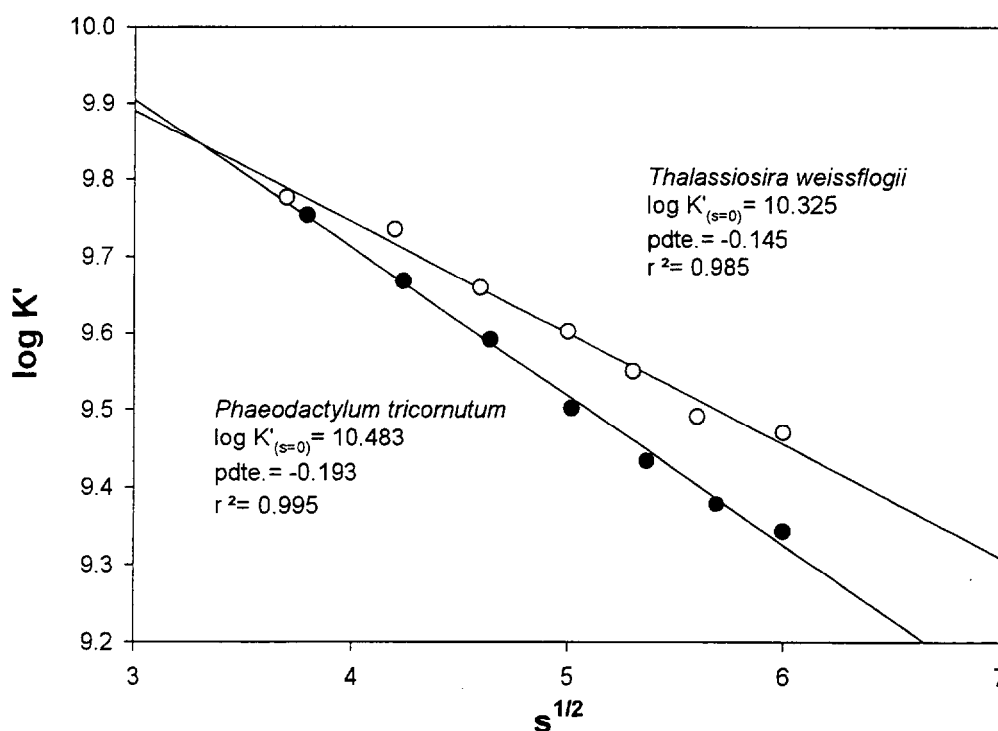


Figura 88. Efecto de la salinidad del medio sobre la constante de estabilidad condicional de la adsorción del cobre sobre la superficie de *Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira weissflogii*. Datos obtenidos a pH=8.02 y suponiendo constante el número de grupos funcionales capaces de adsorber al ion Pb^{2+} .

La figura 88 también muestra como el efecto de la salinidad es mayor sobre la adsorción de plomo por parte de *Phaeodactylum tricornutum* que en el caso de *Thalassiosira weissflogii*.

5.2.8 Efecto de la temperatura

La influencia de la temperatura sobre la reacción de adsorción superficial del plomo sobre la superficie de las algas se estimó emplazando varias suspensiones de diatomeas de igual concentración celular, durante diez minutos de equilibrio, con una concentración conocida de plomo, en un baño termostático a una temperatura fijada y estimando la especiación resultante. Los resultados aparecen en las figuras 89 y 90.

En la figura 89 se observa como una variación de temperatura de 40°C a 5°C afecta de forma significativa a la especiación en el caso de *Phaeodactylum tricornutum*.

La concentración de plomo complejado por los ligandos del medio es la que se ve menos afectada, e incrementa su concentración en un 10% aproximadamente. En cambio la concentración de plomo lábil sufre una gran disminución no sólo debido al que se incorpora a los ligandos en disolución del medio, sino que además la fracción adsorbida sobre la diatomea se incrementa en un 25% a costa principalmente de esta fracción complejada inorgánicamente.

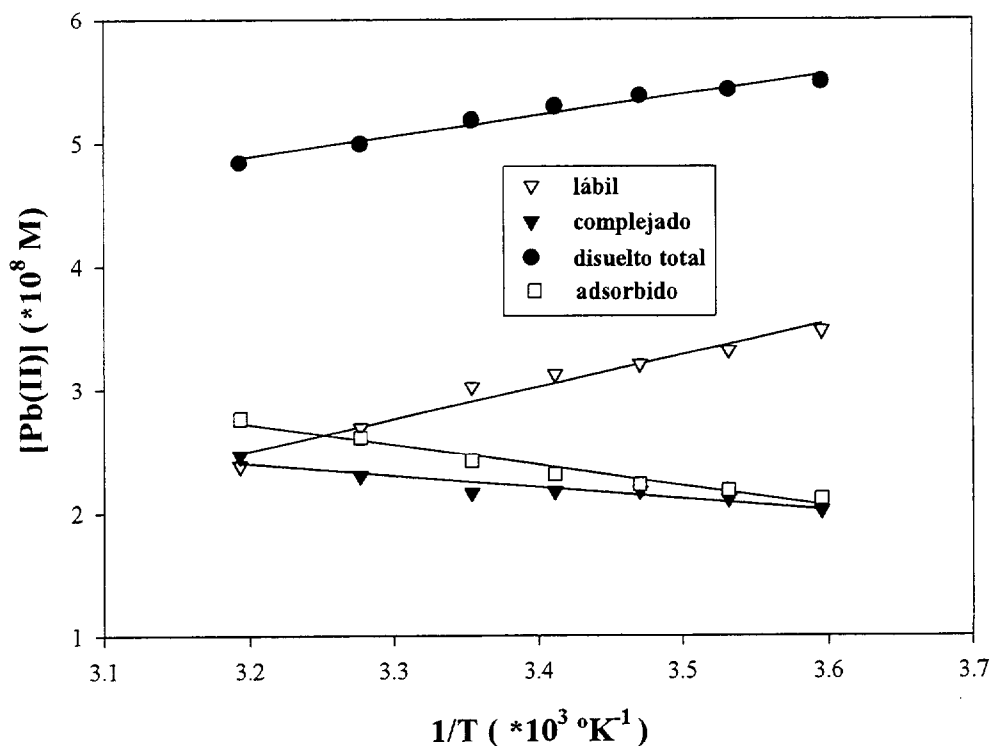


Figura 89. Efecto de la temperatura sobre la especiación del plomo en disolución en presencia de $2.74 \cdot 10^7$ cél l⁻¹ de *Phaeodactylum tricornutum*. $[Cu]_{TOTAL} = 7.58 \cdot 10^{-8}$ M

En el caso de la diatomea *Thalassiosira weissflogii* (figura 90), los cambios de concentración de todas las especies también son significativos. Las fracciones complejada y adsorbida también experimentan un incremento en su concentración a mayores temperaturas a costa de la concentración de plomo complejado inorgánicamente. En este caso el incremento de las dos especies referidas es similar y supone un incremento del 30 al 40% de su concentración a 40°C respecto a la concentración que tienen a 6°C.

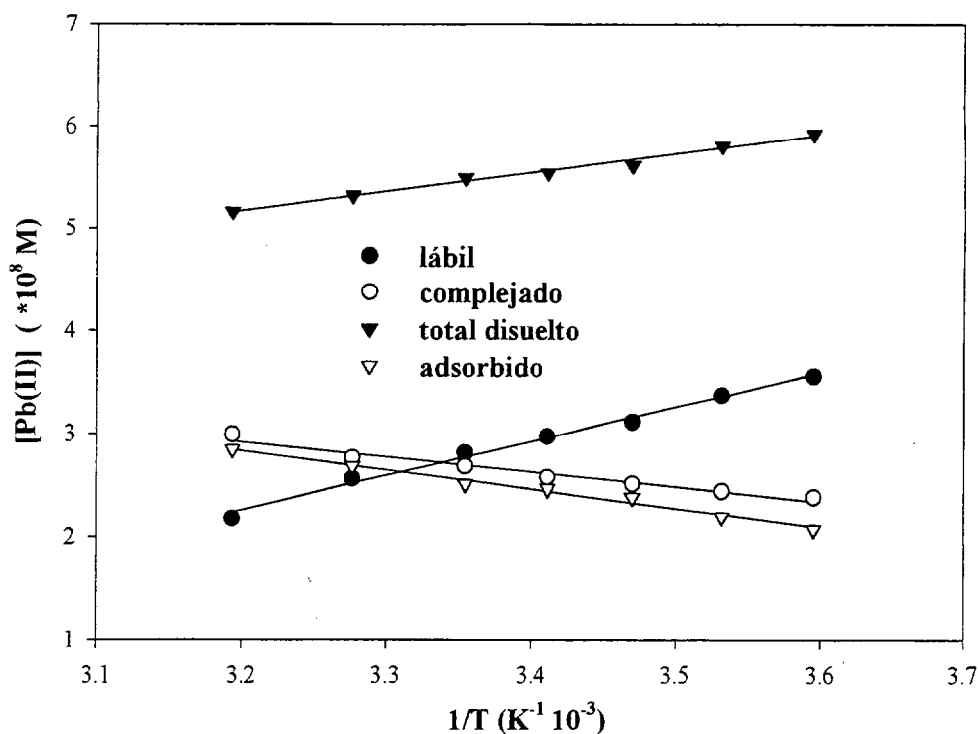


Figura 90. Efecto de la temperatura sobre la especiación del plomo en disolución en presencia de $1.36 \cdot 10^7$ cél l⁻¹ de *Thalassiosira weissflogii*. $[Cu]_{TOTAL} = 8.0 \cdot 10^{-8}$ M.

Al igual que en el caso del cobre ya referido, se define el coeficiente de distribución del metal objeto de estudio como la proporción entre la concentración adsorbida y la total en disolución (susceptible de ser adsorbida), con el fin de explicar el comportamiento de la adsorción en función de la temperatura del medio:

$$K_d = [Pb]_{adsorbido} / [Pb]_{disuelto\ total}$$

Y por tanto la energía de activación de esta reacción de adsorción o energía específica de adsorción vendrá dada en función de la inversa de la temperatura y de este coeficiente de partición por la expresión de Arrhenius:

$$K_d = A \exp(-E_a / R \cdot T)$$

En la figura 91 aparece el resultado para ambas diatomeas de la energía de activación de la reacción de adsorción del plomo.

En este caso el signo de la energía de activación de la reacción de adsorción es la misma en ambos casos y requieren ambas diatomeas el aporte de energía para extraer un ion cúprico de la disolución de estudio y adsorberlo sobre su superficie. De ahí el que el aporte de energía al medio favorezca la reacción de adsorción frente al resto de reacciones que experimenta el ion cúprico en el medio.

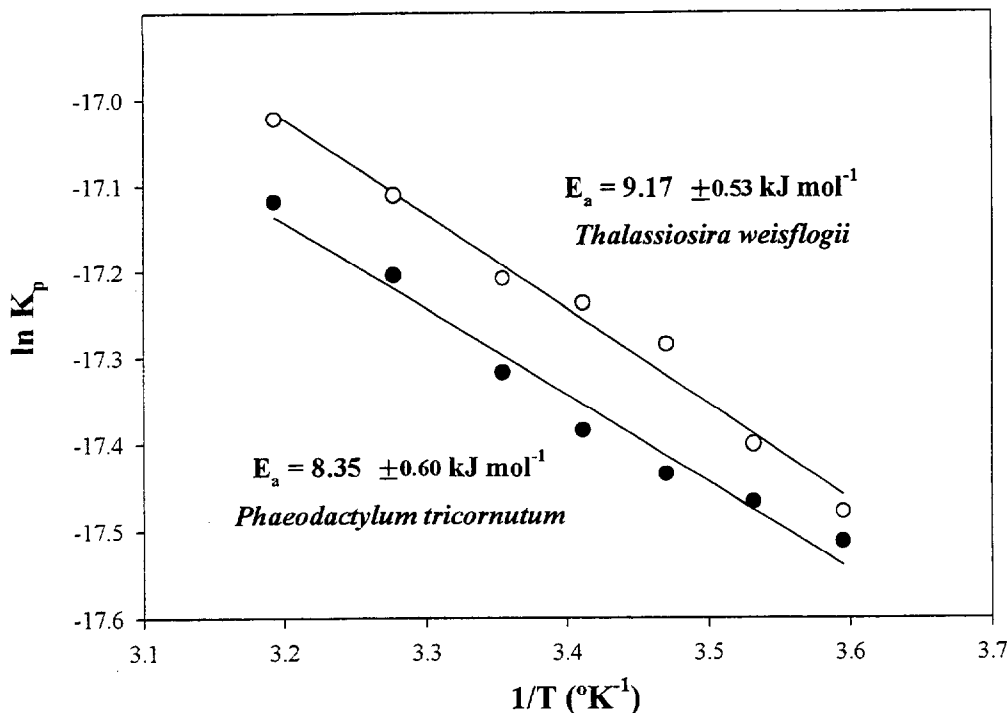


Figura 91. Relación entre la inversa de la temperatura y el logaritmo del coeficiente de distribución del plomo entre la superficie de la célula y el seno de la disolución para la reacción de adsorción en *Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira weissflogii*.

5.3 ASPECTOS RELEVANTES DE LA ADSORCION

La técnica voltamétrica de redisolución anódica ha demostrado ser un instrumento eficaz para determinar las características adsorbentes de las superficies celulares. Los resultados de las diversas valoraciones metálicas han sido gráficos bien definidos de la heterogeneidad de los grupos superficiales de la superficie de diatomeas, que han mostrado la existencia de por lo menos dos tipos de grupos funcionales en la superficie celular, en función de su afinidad por el cobre o por el plomo en disolución. Esto ha sido factible por la posibilidad de concentrar una suspensión de algas en un reducido volumen, de tal forma que las concentraciones de grupos funcionales expresadas por unidad de volumen de disolución son del orden de 2 a $8 \cdot 10^{-9}$ M para los ligandos superficiales de mayor constante de adsorción condicional y de entre 20 y $60 \cdot 10^{-9}$ M para los de menor afinidad por el metal de estudio.

En cambio la imposibilidad de poder concentrar a los ligandos existentes en disolución hace que la técnica de voltametría de redisolución anódica no pueda medir las pequeñas concentraciones de metal libre que quedan en disolución a bajas concentraciones totales de metal, condiciones en que son mayoritarios los ligandos de

mayor constante de estabilidad condicional. Por tanto el estudio detallado de las características complejantes de la materia orgánica en disolución requiere de una técnica más sensible a pequeñas concentraciones de metal en disolución.

En cuanto a los resultados mostrados en las tablas que aparecen en este apartado, las dos diatomeas muestran una afinidad similar por adsorber a ambos metales estudiados. La única tendencia clara es que la concentración de grupos superficiales por célula con gran afinidad por el cobre en ambas diatomeas es menor que para el caso del plomo ($4 \cdot 10^{-16}$ moles cel^{-1} para el Pb(II) y $1.2\text{-}2.7 \cdot 10^{-16}$ moles cel^{-1} para el Cu(II)). Las constantes de estabilidad condicional de estos grupos citados son muy similares independientemente del alga y del metal de que se trate. Los grupos superficiales de menor afinidad por el metal en disolución aparecen a concentraciones similares en ambas algas y con una constante de estabilidad condicional a pH 8.02 (el propio de aguas superficiales marinas) muy parecida, excepto para el caso de la adsorción de cobre por parte de *Thalassiosira weissflogii*, que es mayor.

alga	Metal	$\Gamma_{\max,1} 10^{16}$	$\log *K_{H,1}$	$\Gamma_{\max,2} 10^{16}$	$\log *K_{H,2}$	$\log K'_{MeL}$ exudados
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Pb	4.0 ± 0.82	10.45 ± 0.03	23.7 ± 3.0	9.06 ± 0.03	~ 9.3
	Cu	1.2 ± 1.20	10.75 ± 0.11	21.8 ± 0.8	9.00 ± 0.02	~ 9.8
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	Pb	4.1 ± 1.8	10.82 ± 0.11	27.4 ± 3.0	9.06 ± 0.02	~ 9.8
	Cu	2.7 ± 1.5	10.74 ± 0.04	26.8 ± 1.7	9.37 ± 0.01	~ 10.0

Tabla XXIII. Resumen de los parámetros de adsorción de *Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira weissflogii*, así como de la constante de estabilidad condicional de sus exudados, obtenidos por voltametría de redisolución anódica.

La gran similitud entre los parámetros de adsorción de ambas algas para los dos metales estudiados, contrasta con la diferente capacidad complejante del medio marino empleado en los experimentos para ambos metales (la capacidad complejante del cobre quintuplica a la del plomo), siendo idénticas las constantes de complejación condicionales (tablas XI y XVI). Quizás esta situación tenga que ver con una mayor habilidad por parte del plancton para liberar moléculas que complejen al cobre que para hacerlo con las que complejen al plomo. En este caso se puede estimar la cantidad de grupos funcionales liberados por cada diatomea por célula en un periodo idéntico de tiempo para ambas (a través de los estudios en que una suspensión celular fue dejada

durante 36 horas en equilibrio con el agua de mar a valorar posteriormente). El resultado es una liberación de ligandos del cobre de $18.6 \cdot 10^{-16} \text{ M} \cdot \text{cel}^{-1}$ en el caso de *P. tricorutum* y de $25.0 \cdot 10^{-16} \text{ M} \cdot \text{cel}^{-1}$ para *T. weissflogii*, mientras que los exudados afines por el plomo que aparecen son de $7.5 \cdot 10^{-16} \text{ M} \cdot \text{cel}^{-1}$ en el caso de *P. tricorutum* y de $5.6 \cdot 10^{-16} \text{ M} \cdot \text{cel}^{-1}$ para *T. weissflogii*. Además estos exudados son de mayor constante de estabilidad (como se puede apreciar en la tabla XXIII) en el caso del cobre, para ambas algas. Por tanto, parece existir en el caso de las diatomeas una capacidad mayor para regular la especiación del cobre en disolución que para hacerlo con el plomo. En un medio oceánico la importancia de este hecho se reduce, ya que las concentraciones de plomo total disuelto que se encuentran son entre 1 y 2 órdenes de magnitud menores que las de cobre (Capodaglio *et al.*, 1990; Coale y Bruland, 1990). El hecho de que sea mayor la concentración de ligandos orgánicos en el océano con afinidad por el cobre respecto a la de afines por el plomo, y que las algas sean capaces de liberarlos asimismo a un ritmo mayor está de acuerdo con la hipótesis de un origen planctónico para la gran mayoría de la materia orgánica presente en aguas oceánicas que es capaz de complejar a los metales traza.

Esta consideración explica la gran diferencia de comportamiento mostrado en la cinética de asimilación del plomo respecto del cobre en cuanto a las proporciones entre metal lábil y las otras especies metálicas del medio. El medio en ambos casos no retira de forma efectiva las formas inorgánicas en disolución y a pesar de que el valor del coeficiente alfa es mayor para el plomo que para el cobre a este pH en agua de mar, los valores encontrados de pPb (~9.3) son más bajos que los de pCu (9.8-10).

Otra diferencia entre la naturaleza de la pared celular de ambas diatomeas se evidencia en el distinto comportamiento que tienen en los experimentos de asimilación de metales. Mientras *Thalassiosira weissflogii* asimila al cobre y al plomo con un ritmo similar ($0.051 \cdot 10^{-8} \cdot t^{1/2}$ para el cobre y $0.052 \cdot 10^{-8} \cdot t^{1/2}$ para el plomo), *Phaeodactylum tricorutum* asimila el plomo a una velocidad mayor que el cobre ($0.061 \cdot 10^{-8} \cdot t^{1/2}$ frente a $0.037 \cdot 10^{-8} \cdot t^{1/2}$ para el plomo). De todos estos valores el correspondiente a la asimilación de cobre por parte de *Phaeodactylum tricorutum* es el más divergente, ya que el que corresponde a la asimilación de plomo por parte de ambas diatomeas y el de cobre por parte de *Phaeodactylum tricorutum* se encuentran bastante próximos.

La comparación entre la dependencia de las distintas reacciones de especiación con el pH ofrece varias conclusiones. Por un lado, la gran similitud de la dependencia de la adsorción respecto del pH para las dos diatomeas y los dos metales. En todos los

experimentos se alcanza un máximo de adsorción a un pH de 7.0 que permanece estable al incrementar el pH de la muestra. Esto implica que la reacción de desprotonación de los grupos funcionales es necesaria para verificarse la adsorción de metales traza sobre superficies biológicas. De igual forma remarca la gran similitud que debe existir entre las naturalezas y distribuciones de grupos superficiales con que cuentan ambas diatomeas. Parecido que ya se ha desprendido de la comparación de sus parámetros de capacidad adsortiva.

Por otro lado, el comportamiento de la complejación ante la adsorción no es tan homogéneo. La complejación del cobre en el medio en que se ha añadido *Phaeodactylum tricornutum* también se alcanza a pH=7.0. Pero en el caso del medio que contiene a *Thalassiosira weissflogii* el máximo de complejación se alcanza a un pH por debajo de 6.5. Los dos medios en equilibrio con las diatomeas se comportan de forma similar para la complejación del plomo, pero muy distinta a como lo hace la adsorción. A un pH tan bajo como 5.6 ya se ha alcanzado para ambas diatomeas un mínimo del 80% del máximo final de adsorción (la adsorción a este pH es del 40%). Por lo tanto la naturaleza de los ligandos en disolución responsables de la complejación del plomo debe ser distinta a la de los grupos superficiales con la misma misión de ambas diatomeas. Asimismo destaca como la reacción de complejación del plomo se encuentra menos afectada por la concentración de protones en el medio que la de complejación del cobre.

En cuanto a la especificidad y caracterización de las superficies de ambas diatomeas por la adsorción de un determinado metal en presencia de otro se pueden deducir varias conclusiones de los resultados.

Por una parte, los grupos funcionales de *Phaeodactylum tricornutum* de mayor constante de estabilidad condicional parecen poder adsorber casi indistintamente al cobre y al plomo ya que una adición de cualquiera de los dos desplaza fuertemente al otro. Por lo tanto una buena parte de estos ligandos superficiales de la diatomea se incluyen tanto en la concentración de la capacidad adsortiva de su superficie respecto al cobre, como aparecen también en la capacidad adsortiva frente al plomo. En cambio los grupos de menor constante de estabilidad son mucho más específicos, y una adición de cobre no reduce su capacidad adsortiva por el plomo, y una adición de plomo reduce la capacidad adsortiva del cobre en un 15%. Por lo tanto sólo una pequeña fracción de los ligandos que se incluyen en la definición de la capacidad adsortiva de cobre,

pertenece también a la concentración de grupos funcionales de baja afinidad por el plomo.

Por otra parte, en el caso de *Thalassiosira weissflogii* los ligandos superficiales de mayor constante de estabilidad condicional son bastante más específicos, y mientras una adición de cobre no es capaz de retirar al plomo complejado, una adición de plomo retira entre un 20 y un 40%. Sólo una fracción de alrededor de $1 \cdot 10^{-16}$ moles cel^{-1} de la capacidad adsorbente respecto del cobre parece tener una mayor afinidad por el plomo. El caso de los ligandos de menor constante de estabilidad es todavía más selectivo y sólo una fracción del 10% de la definición de capacidad adsorptiva respecto del plomo parece tener una mayor afinidad por el cobre.

De lo anterior puede deducirse la diferente composición de las paredes celulares de ambas diatomeas. Especialmente aquellos componentes capaces de adsorber con mayor afinidad a ambos metales, ya que responden a este experimento de adición de un segundo metal de forma muy diferente, indicando una naturaleza distinta.

Los exudados que producen las dos diatomeas y todos los ligandos de la disolución en general parecen tener una selectividad absoluta ya que ninguna adición de un segundo metal en gran cantidad hace disminuir la capacidad complejante del medio. De todas formas debe tomarse con gran reserva esta conclusión, ya que la imposibilidad de concentrar a los ligandos en disolución como sucede con las células, y la baja sensibilidad de la voltametría anódica, hace que no sea posible obtener los parámetros de complejación según el modelo heterogéneo. Los ligandos de mayor constante de estabilidad, como se indica en el apartado de complejación, se hallan presentes a una muy baja concentración respecto al total de la capacidad complejante. Además son muy importantes porque son responsables de la mayor parte de la complejación a niveles de concentración metálica nanomolar para el cobre y el plomo. A partir de los estudios realizados no es posible saber si existe un desplazamiento de uno de los metales ante la adición del otro como sucede con los grupos superficiales de mayor constante de estabilidad condicional de ambas diatomeas.

Sólo existe un caso que permite la obtención de dos tipos de ligandos en disolución, el de la complejación de plomo por parte de *Thalassiosira weissflogii*. El resultado es que ninguno de los dos tipos de ligandos desplaza al plomo ante una gran adición de cobre al medio, demostrado una gran especificidad por el plomo por parte de todo el espectro de materia orgánica capaz de complejar al plomo que hay en el agua de mar utilizada.

En cuanto a la descripción termodinámica de la reacción de adsorción de ambas diatomeas realizada destaca el hecho de que la única reacción de adsorción en la que existe una liberación de energía al medio, es la del enlace del cobre con los grupos superficiales de *Thalassiosira weissflogii*. Que puede ser interpretado como que la entalpía de hidratación del ion cúprico sea mayor que su entalpía de adsorción para esta célula.

También es determinado el efecto de las variables físico-químicas sobre la adsorción. El incremento de la salinidad provoca una competición entre los cationes mayoritarios del medio y los metales traza haciendo que la reacción de adsorción se vea dificultada. Esto se puede traducir matemáticamente en una dependencia lineal de la constante de estabilidad condicional con la raíz cuadrada de la salinidad, de tal forma que crece su valor al disminuir la salinidad del medio. De igual modo la presencia de protones supone una competencia por los grupos superficiales del alga para los metales traza, y la reacción de adsorción no se verifica a valores de pH muy ácidos independientemente del metal y alga de estudio. A valores de pH propios de aguas marinas, el efecto del pH sobre la especiación es mínimo ya que se alcanza el máximo de su valor a un pH próximo a 7. El hecho de que tanto la concentración de protones como la de otros iones mayoritarios del medio, afecte de forma importante al alcance de las reacciones de complejación orgánica en disolución y adsorción sobre superficies biológicas, es una prueba de la doble naturaleza, tanto de intercambio iónico como de desplazamiento de protones, de la reacción de enlace de los metales traza con los grupos funcionales de los ligandos naturales disueltos en el océano y de las superficies de las algas.

El efecto de la temperatura sobre la adsorción se ha visto que no es homogéneo para todos los metales y algas y es función de la energía de activación de la reacción de adsorción en el medio de estudio.

**ESTUDIOS DE DETERMINACION DE
CAPACIDADES COMPLEJANTES**

Estos estudios de determinación de capacidades complejantes utilizando la técnica voltamétrica de redisolución catódica surgen de la necesidad del empleo de una técnica más sensible a pequeñas concentraciones de metal, con el fin de poder obtener una descripción de los diversos ligandos existentes en el medio, incluso de aquellos de baja concentración y gran afinidad por el metal en disolución, que la técnica de voltametría de redisolución anódica se ha visto incapaz de resolver.

Para determinar la influencia de la presencia de plancton en el medio sobre la capacidad complejante del mismo se procedió a cultivar en recipientes de policarbonato, en condiciones de luminosidad y temperatura controladas, a la diatomea *Phaeodactylum tricorutum* con diversos medios para estudiar el tipo de exudados que es capaz de verter al medio, en que cantidad, y como va a afectar este hecho a la especiación del metal seleccionado a medida que el cultivo pasa por sus diversas fases de crecimiento. La población de diatomea se mantuvo mediante un cultivo en un medio de composición similar al f/2 definido por Guillard y Ryther (1962), y que constaba de los siguientes componentes añadidos a un agua de mar, con un posterior tratamiento de autoclavado para evitar la presencia de otras especies en el cultivo:

- Nutrientes:
 - NaNO₃ 10⁻⁴ M
 - NaH₂PO₄ 10⁻⁵ M
 - Na₂SiO₃ 10⁻⁴ M
 - NH₄Cl 10⁻⁵ M
- Metales:
 - CuSO₄ 10⁻⁹ M
 - ZnSO₄ 10⁻⁸ M
 - CoCl₂ 10⁻⁹ M
 - MnCl₂ 10⁻⁷ M
 - H₂SeO₃ 10⁻⁹ M
 - FeCl₃ 10⁻⁷ M
 - Na₂EDTA 1.1×10⁻⁶ M
- Vitaminas:
 - Tiamina 10⁻⁷ M
 - Biotín 10⁻⁸ M
 - B₁₂ 10⁻⁸ M

El proceso seleccionado fue emplazar recipientes transparentes de policarbonato de cinco litros sobre una superficie dotada de movimiento rotatorio en una cámara de cultivo (50 revoluciones por minuto). De esta forma quedaron fijadas las condiciones de luminosidad, turbulencia y temperatura de igual forma para todos los cultivos. Estas condiciones fueron de un fotoperiodo de 18 horas de luz por 6 de oscuridad diarias y de una temperatura estabilizada entre 18 y 19 °C. El movimiento del recipiente impedía la sedimentación de las células en el fondo del mismo, favoreciendo una posible oxigenación del medio. La aireación por burbujeo tuvo que ser rechazada ya que procedente del sistema de bombeo de aire o de los propios tubos que lo conducían llegaba una sustancia de naturaleza probablemente orgánica que generaba en los polarogramas un pico situado aproximadamente a $-0.15V$ que enmascaraba al que correspondía a la reducción del cobre.

La cantidad inicial de cultivo en todos los casos fue de entre 2 y 2.5 litros de medio, y la concentración inicial de *Phaeodactylum tricorutum* de 10^7 células litro^{-1} en todos los experimentos. El concentrado celular a partir del cual se extraía un volumen para su inoculación en el recipiente de policarbonato se conseguía mediante el filtrado por $0.45 \mu\text{m}$ del cultivo concentrado por gravedad, sin ayuda de presión para evitar posibles roturas celulares, y posterior resuspensión en un pequeño volumen de agua de mar filtrada por $0.1 \mu\text{m}$, repitiendo este proceso tres veces para lavar en lo posible la superficie del alga y evitar contaminaciones al medio de cultivo final. Esto último es muy importante, ya que una concentración inicial muy alta de metal, aparte de poder resultar tóxica, impide obtener dos tipos de ligandos en el medio ya que los de mayor constante de estabilidad condicional se hallan saturados, resultando además no muy representativo de lo que sucede en el medio marino. Son muchos los trabajos que se basan en concentraciones de cobre entre 10^{-8} y 10^{-7} con lo que se ven en esta situación.

El seguimiento de la concentración celular en el cultivo se llevó a cabo midiendo la absorbancia a 750 nm que experimentaba un volumen de 3 ml retirado del cultivo, emplazado en una cubeta de cuarzo de 1 cm. de paso de luz. El espectrofotómetro utilizado fue un Shimadzu UV-240. A 750 nm la absorbancia es proporcional al número de partículas presentes en el medio, por lo que es posible estimar el número de células presentes en el medio, pero no su estado fisiológico o la presencia de pigmentos.

Para calibrar esta medida se determinó previamente a los experimentos la relación entre absorbancia y número de células. A partir de una muestra de cultivo de *Phaeodactylum tricorutum* obtenida en un medio $f/2$, se obtuvo un pequeño volumen

de agua de mar (unos 50 ml) de gran concentración mediante el filtrado por $0.45 \mu\text{m}$ del cultivo, sin ayuda de presión para evitar posibles roturas celulares, y posterior resuspensión en un pequeño volumen de agua de mar filtrada por $0.1 \mu\text{m}$ para evitar la presencia de cualquier otra partícula que no fuera la diatomea. Se generaron alícuotas de la misma por dilución con agua de mar filtrada por $0.1 \mu\text{m}$. Se procedió a medir la absorbancia del agua filtrada, del concentrado celular y de las distintas diluciones celulares intermedias con relación al agua filtrada por $0.1 \mu\text{m}$ que actuaba de blanco.

Una vez medidas las absorbancias de estas suspensiones celulares, fueron fijadas inmediatamente mediante la adición de lugol, que mata e inmoviliza a la célula sin

provocar su rotura y permite una visión más fácil en un microscopio al pigmentar las estructuras celulares y aumentar su contraste. Un mínimo de dos muestras de las disoluciones fijadas de mayor concentración celular fueron emplazadas en una placa Thoma, para proceder al recuento de las células que alberga el volumen fijo y

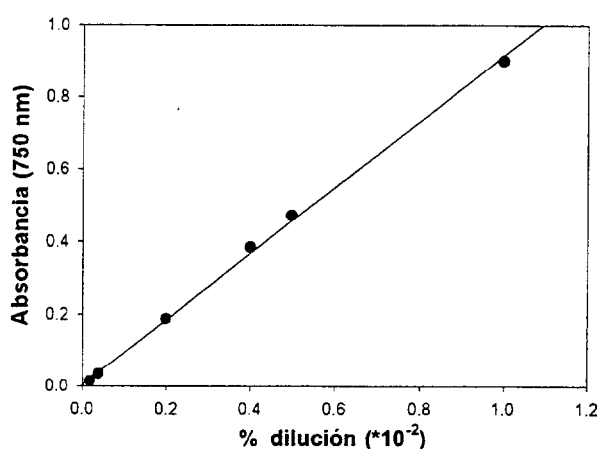


Figura 92. Relación lineal entre la dilución efectuada sobre una suspensión celular y la absorbancia medida de las diversas diluciones a 750 nm. ($r^2=0.999$)

conocido de esta placa ($4 \cdot 10^{-6}$ ml). El resultado fue una buena correlación entre el número de células en el medio y la absorbancia a 750 nm que experimenta ($r^2=0.999$), y un intervalo de linealidad mucho mayor que con el que después se trabajó. La proporción encontrada fue de $1.55 \cdot 10^{10} \pm 0.14$ células l^{-1} unidad absorbancia $^{-1}$.

Con el valor de la concentración celular se seguía la evolución del cultivo para poder obtener muestras del mismo en diversas fases de crecimiento tanto en las primeras fases de crecimiento lineal y exponencial, como justo antes del fin del crecimiento y comienzo de la fase de cultivo estacionario. La fase estacionaria de crecimiento no fue estudiada debido a que se encuentra perfectamente descrita la liberación en cultivos de exudados por parte de un enorme número de especies, tanto eucariotas como procariotas, en esta fase (Sharp, 1977; McKnight y Morel, 1979; Imber y Robinson, 1983). Estos autores sostienen que la excreción de exudados en cultivos sólo se realiza durante esta fase de crecimiento, pero es probable que la baja

sensibilidad de los métodos empleados por ellos y la menor concentración celular existente en el medio durante esta fase de crecimiento, les impidiera resolver y determinar menores cantidades de materia orgánica exudada por la especie planctónica estudiada. En los trabajos de Zhou y Wangersky (1989) y Zhou *et al.* (1989) con separación cromatofigura de compuestos con afinidad por el cobre, sí que aparece una cantidad de ligandos apreciable durante la fase de crecimiento exponencial del cultivo, pero la técnica impide estimar su afinidad por este elemento. El trabajo de Seritti *et al.* (1986) es el único que con métodos voltamétricos, establece una constante de afinidad de la materia orgánica disuelta por el metal utilizado en la valoración metálica, encontrando un aporte de exudados por parte de *Dunaliella salina* al medio de cultivo durante la fase de crecimiento exponencial. Pero la condiciones de trabajo no resultan muy limpias (concentración inicial de cobre de 6 a $16 \cdot 10^{-8}$ M, dos órdenes de magnitud mayor de la presente en aguas oceánicas), por lo que es de esperar que el cultivo se encuentre estresado desde el momento de la inoculación y no responda de la misma forma a como lo haría en ausencia de elementos tóxicos.

En nuestro estudio el medio de trabajo se obtenía retirando un volumen de entre 250 y 300 ml del recipiente de policarbonato del cultivo y dejando que se filtrara por acción de la gravedad a través de un filtro de 0.45 μ m. Del filtrado se extraían muestras para medir la cantidad total de cobre por voltimetría anódica en medio ácido y el resto era utilizado para la determinación de la capacidad complejante.

La capacidad complejante del medio se determinó a través de una valoración cúprica del mismo mediante adiciones de disoluciones de CuNO_3 de entre 10^{-6} y 10^{-4} M preparadas a partir de una disolución standard para espectroscopia de absorción atómica (BDH) en agua bidestilada con un sistema Milli-Q. Del filtrado del medio, 10 ml eran depositados en cada una de las 20-25 cubetas de teflón de 25 ml condicionadas previamente a la concentración de cobre que finalmente iban a albergar. A cada cubeta se añadían a continuación 100 μ l de una disolución 1 M en HEPES (ácido N-[2-hidroxiethyl]piperazin-N'-[2-etanosulfónico] de SIGMA) y 0.7 M en NaOH (MERCK) que mantenían a todas las muestras en un pH de 7.8 (escala NBS). Posteriormente se procedía a añadir el cobre a la muestra a partir de una disolución de una concentración tal, que nunca se emplearan más de 150 μ l para evitar la dilución de la muestra. Las adiciones de cobre escogidas fueron para elevar la concentración de cobre entre 1 nM y 0.5 μ M. De este modo, con las adiciones pequeñas, se podían determinar los parámetros

que describen la complejación de ligandos de baja presencia, pero alta constante de estabilidad, y por otro lado, las adiciones finales tenían como objetivo llegar a saturar todos los ligandos del medio y poder calcular con las últimas adiciones la sensibilidad alcanzada por el método. Estas cubetas se dejaban durante toda la noche en un recipiente plástico estanco para conseguir un total equilibrio entre los ligandos del medio y las nuevas cantidades de cobre presentes en las cubetas. La determinación de la cantidad de cobre iónico libre y la especiación en cada cubeta por voltametría catódica de redisolución quedó descrita previamente. La figura 93 muestra un ejemplo de los datos obtenidos.

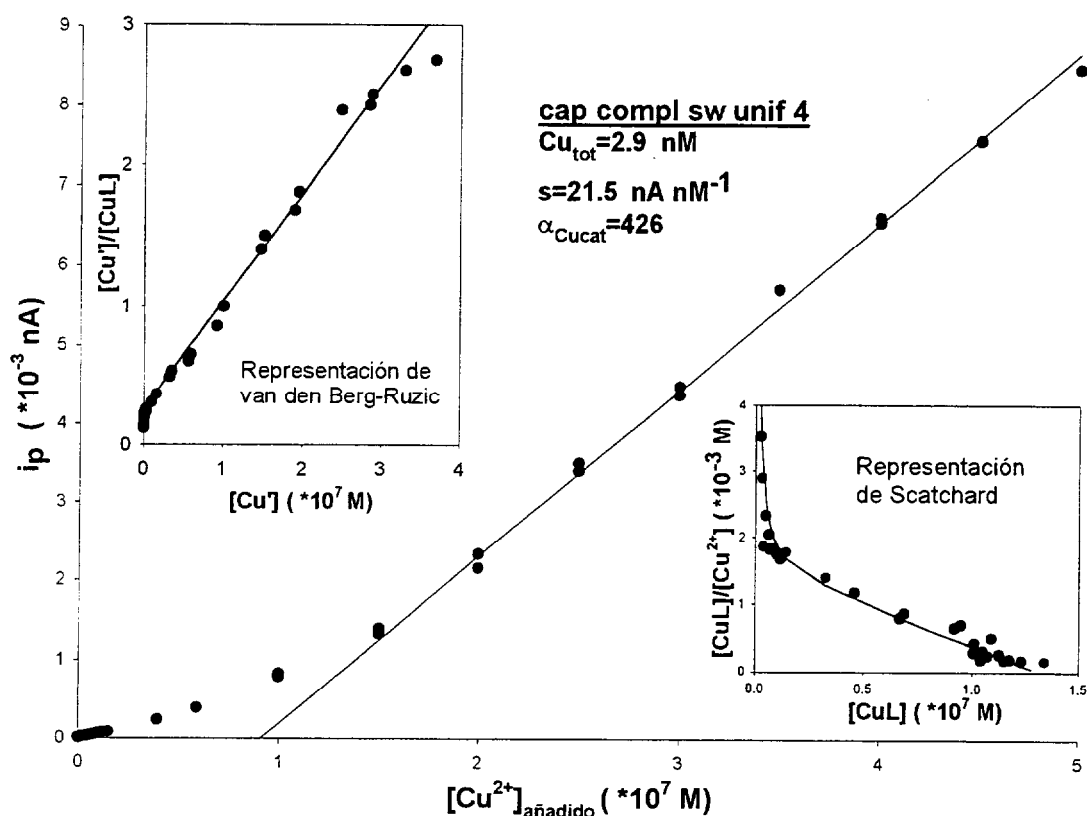


Figura 93. Ejemplo de los datos obtenidos mediante una valoración cúprica de la medida de la capacidad complejante del medio retirado del cultivo de *Phaeodactylum tricornutum*. La figura mayor corresponde a los resultados de la valoración metálica. La línea corresponde a la regresión lineal efectuada en el tramo final de la valoración donde se hallan saturados los ligandos naturales del medio, con el fin de determinar la sensibilidad del método. Las figuras insertadas corresponden a las transformadas de los datos según las linealizaciones propuestas tanto por van den Berg- Ruzic, como por Scatchard. En estas mismas figuras aparece el ajuste iterativo mixto calculado según el método propuesto en este trabajo.

En los cultivos se incluye una medida de la capacidad complejante del medio previamente a la adición de células y comienzo de la fase experimental. Este dato debe contemplarse siempre con cierta reserva respecto a los que se ofrecen del desarrollo del cultivo ya que el hecho de añadir las células al medio lo transforma radicalmente. En

primer lugar hay que considerar la posible contaminación de cobre que aporte el volumen de concentrado celular que se añade al medio para dotarle de la concentración celular deseada, lo cual haría aumentar el valor de pCu aunque no varíe la capacidad complejante. Lo mismo puede suceder para el caso de otros metales que puedan competir por los ligandos orgánicos del medio según su especificidad o incluso por el propio catecol añadido, lo cual variaría los parámetros de equilibrio entre éste y la materia orgánica del medio. Por otro lado el medio recibe un gran aporte de puntos de complejación situados en la superficie celular que luego no se ven reflejados en los estudios, pero que sí influirán en la interacción entre las algas y los metales del medio. También es posible el desprendimiento del exterior de la pared celular de moléculas pertenecientes a la misma, al añadir las células a este nuevo medio, y que las mismas sean capaces de complejar metales del medio. Por último siempre existe la posibilidad de que el recipiente de policarbonato en que se sitúa el cultivo no se encuentre perfectamente acondicionado, y libere o adsorba alguna cantidad de cobre. Para evitar esto último se ha calculado mediante un proceso de cálculo numérico el pCu que tendría ese medio original si la concentración total de cobre disuelto fuera la encontrada en la primera medición hecha al cultivo.

Por todo esto generalmente se considerará como condición inicial los valores que se muestran del volumen retirado al cultivo menos de 24 horas después del momento de inoculación en todos los experimentos de evolución de la capacidad complejante. Este periodo es demasiado breve para que exista un incremento del número de células significativo, pero por el contrario suficiente para que se haya alcanzado un equilibrio entre las algas y las especies del medio.

Los distintos medios de cultivos utilizados finalmente son fracciones del f/2 descrito antes. La razón de esto es la necesidad de conseguir un crecimiento celular en el medio lo bastante importante para que cambie las características complejantes del mismo sin dejar lugar a dudas de que el causante es la presencia de la diatomea (y no de posibles crecimientos bacterianos). Pero por otro lado se pretendía evitar que el cultivo se fuera hasta concentraciones celulares tan elevadas que forzarán un alto estrés en el cultivo por la masiva aglomeración celular.

Por último hay que destacar que al contrario de lo que sucede con los grupos funcionales superficiales, resulta imposible calcular directamente las constantes de complejación intrínsecas de los ligandos orgánicos disueltos. Esto es debido tanto a la imposibilidad de separar del total de la materia orgánica disuelta a las moléculas

capaces de complejar al metal de estudio, como a la de concentrar una gran cantidad de estos ligandos en un pequeño volumen y así poder valorarlos potenciométricamente y obtener sus constantes de acidez, necesarias para poder convertir las constantes de estabilidad condicionales que se van a obtener en intrínsecas.

6.1 CULTIVO EN AGUA OCEÁNICA SUPERFICIAL

Este cultivo fue realizado en un medio de cultivo elaborado a partir de agua de mar de procedencia superficial recogida en la estación ESTOC situada 60 millas al norte de Gran Canaria y posteriormente filtrada por $0.22\ \mu\text{m}$. No se pudo disponer de medidas eficaces para su conservación hasta 24 horas después de su recogida (congelación), y es posible que hubiera actividad biológica en el agua durante su traslado en un recipiente plástico debidamente acondicionado para evitar la contaminación por metales traza del agua de mar, lo cual hace que el dato de capacidad complejante inicial tal vez no corresponda con el existente en el medio marino por posible liberación de exudados en esas 24 horas iniciales de almacenamiento.

Para el desarrollo de este cultivo no fue posible disponer de la estimación de la altura de pico resultante del polarograma mediante sustracción de blanco. Esto hace que la precisión de la medida sea menor debido a la estimación figura de la altura de pico que debe realizarse. Esto se refleja en la mayor dispersión en los puntos obtenidos en la valoración metálica, que se traduce en una mayor desviación estándar de los parámetros de la complejación (ver tabla XIV).

Para compensar esta falta de resolución fue necesario además llevar a cabo las mediciones con una concentración mayor de catecol ($3 \cdot 10^{-5}\ \text{M}$). Esto hace que el valor del coeficiente- α del complejo Cu-catecol frente a la concentración de cobre iónico libre tome un valor de 739 al pH de 7.8 en que se llevaron a cabo las valoraciones metálicas, frente al de 406 en que se llevaron a cabo la mayoría del resto de estudios. Por lo tanto, la fracción de complejos orgánicos naturales disueltos que se corresponde a una ventana espectral algo desplazada a valores de la constante de estabilidad mayores respecto de las condiciones de los demás cultivos.

A pesar del defecto en el almacenamiento inicial reseñado, las características complejantes iniciales del medio (ver medio original en la tabla XIV), se corresponden aproximadamente con algunos valores publicados en aguas oceánicas (Moffet *et al.*, 1990; $[L_1]=2 \cdot 10^{-9}\ \text{M}$; $[L_2]=8 \cdot 10^{-8}\ \text{M}$), así como el valor hallado de pCu (concentración

de la especie tóxica del cobre) de 12.28 se encuentra entre los valores referidos por varios autores como el existente en aguas oceánicas superficiales (Coale y Bruland, 1989, 90; van den Berg, 1984).

Si se considera que la concentración total de Cu(II) al comienzo del experimento es de 3.2 nM como refiere la tabla XIV debido a posibles procesos de contaminación ya descritos, el pCu del medio una vez incorporadas las algas fue de 11.99.

Medio de cultivo utilizado:

- Nutrientes (f/10):
 - NaNO₃ 2·10⁻⁵ M
 - NaH₂PO₄ 2·10⁻⁶ M
 - Na₂SiO₃ 2·10⁻⁵ M
 - NH₄Cl 2·10⁻⁶ M
- FeCl₃ (f/10): 2·10⁻⁸ M

EVOLUCION DEL CULTIVO

La figura 94 muestra el desarrollo celular presente en el cultivo a lo largo del experimento, y los días en que se tomó una fracción del medio para su análisis.

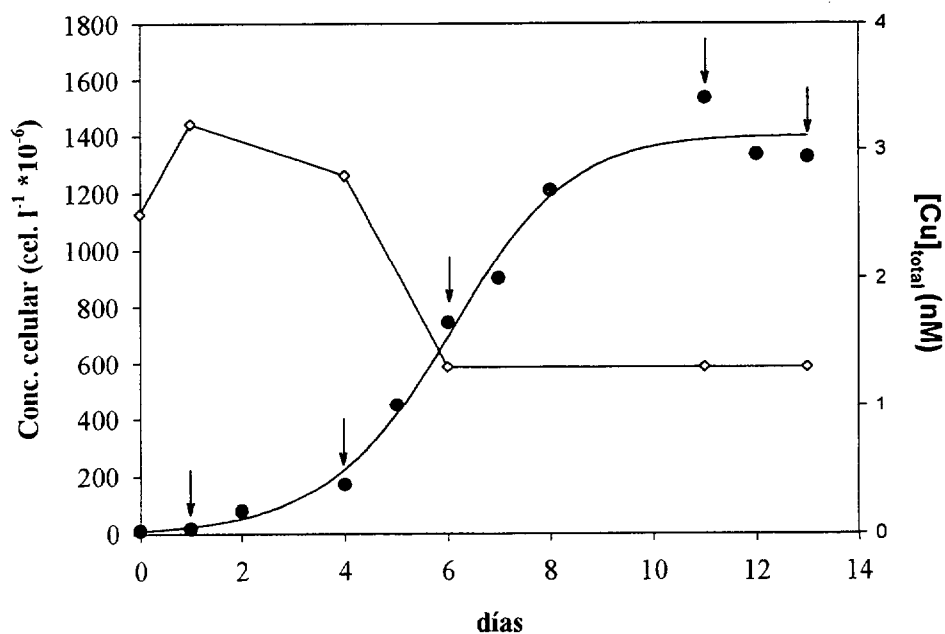


Figura 94. Muestra la evolución de la concentración celular (●) y de la concentración total de cobre disuelto (◊) a lo largo del experimento. Las flechas indican los días en que fue retirada una parte del volumen para su análisis.

Días	Cu total (nM)	Cél/l *10 ⁻⁶	[L ₁] *1e ⁹ M	Log K _{L1}	[L ₁]*K _{L1}	[L ₂] *1e ⁸ M	Log K _{L2}	[L ₂]*K _{L2}	pCu
Medio original	2.5	--	3.9 ± 1.8	11.95 ± 0.4	3476	12.0 ± 0.6	10.04 ± 0.07	1315	12.28
1	3.2	15	4.5 ± 0.5	11.91 ± 0.09	3677	11.9 ± 0.7	10.24 ± 0.09	2082	12.15
4	2.8	449	4.4 ± 1.8	11.86 ± 0.27	3188	12.6 ± 0.5	10.16 ± 0.06	1885	12.15
6	1.3	1210	6.5 ± 1.0	11.90 ± 0.11	5200	13.6 ± 0.4	10.26 ± 0.05	2489	12.71
11	1.3	1300	7.6 ± 1.1	11.93 ± 0.1	6469	13.9 ± 1.2	10.23 ± 0.15	2361	12.79
13	1.3	1330	9.8 ± 2.2	11.84 ± 0.16	6860	18.6 ± 1.3	10.13 ± 0.1	2529	12.83

Tabla XIV. Valores de capacidad complejante obtenidos en un medio a partir de agua de mar oceánica superficial. Se muestra la evolución de la concentración celular de *Phaeodactylum tricornutum*, de la capacidad complejante para dos tipos de ligandos obtenida de modo independiente y de la concentración de cobre iónico libre en el medio de cultivo a lo largo del tiempo de experimentación.

La última medida mostrada ya pertenece a la etapa de crecimiento estacionario del cultivo y no será tomada en cuenta para la evaluación de la evolución de la complejación durante la fase de crecimiento exponencial. La concentración de cobre total disuelto en el cultivo (figura 94), después de un lógico ligero incremento inicial por la adición del concentrado celular que dotaba inicialmente al medio de cultivo de una concentración aproximada de 10^7 células litro⁻¹, disminuye de forma constante, hasta alcanzar un valor constante hacia la mitad del desarrollo del cultivo. Esto supone que los procesos de adsorción e inclusión del cobre por parte de la diatomea se han detenido.

En cuanto a la evolución de las capacidades complejantes, existe un evidente incremento de la fuerza complejante de ambos ligandos durante toda la fase de crecimiento exponencial del cultivo (ver figura 95).

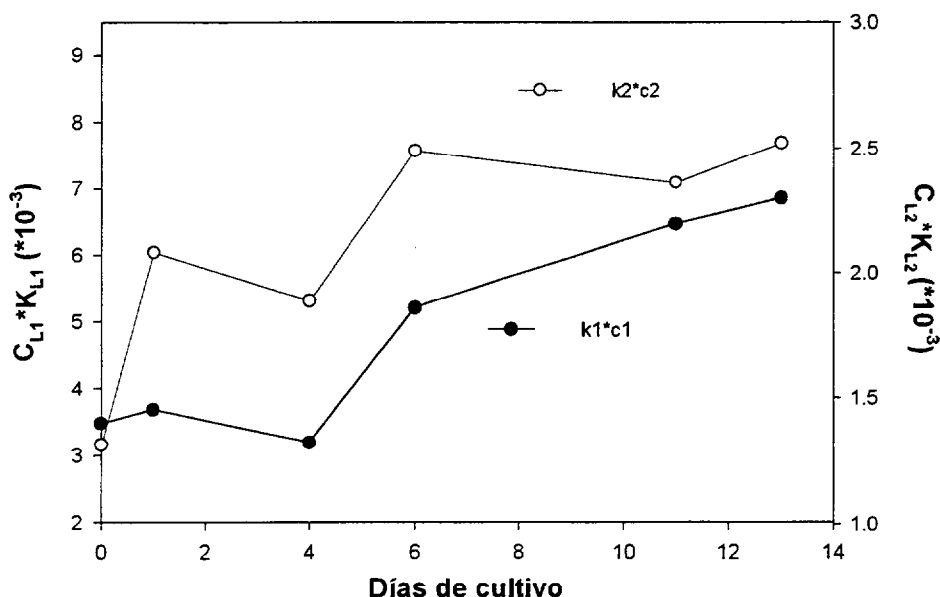


Figura 95. Muestra la evolución de la fuerza complejante a lo largo del experimento

El incremento de la fuerza complejante parece ir asociado a un incremento de la concentración total de ambos tipos de ligandos (figura 96), y no tanto a una variación de las constantes de complejación obtenidas, como puede verse en la figura 97 en las que no se observa ninguna tendencia para la evolución de K_{L1} y K_{L2} con los días de cultivo. El valor de la concentración de ligandos de mayor constante de estabilidad condicional se duplica, mientras que el valor de la concentración de L_2 experimenta un pequeño incremento (sobre 20 nM).

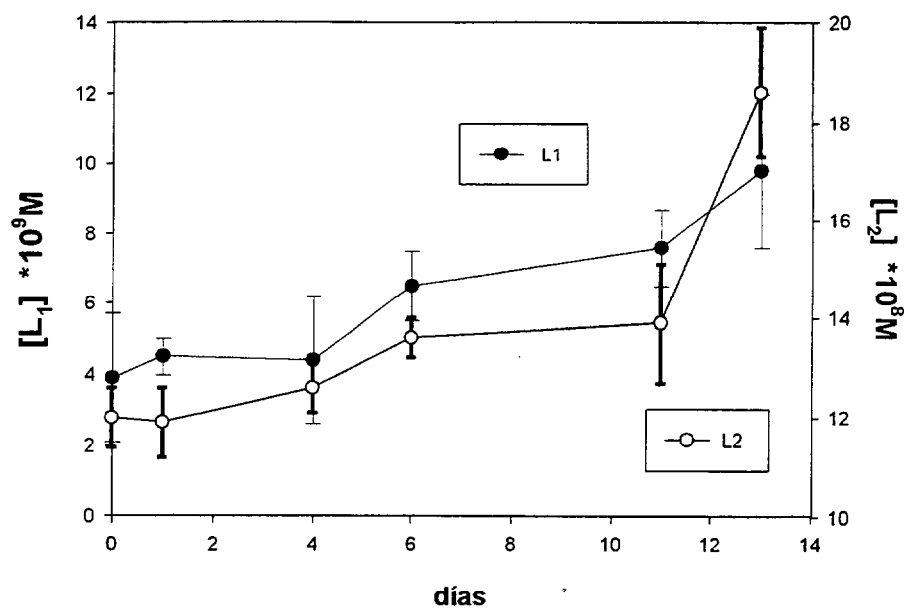


Figura 96. Evolución de la concentración total de los dos tipos de ligandos estimados.

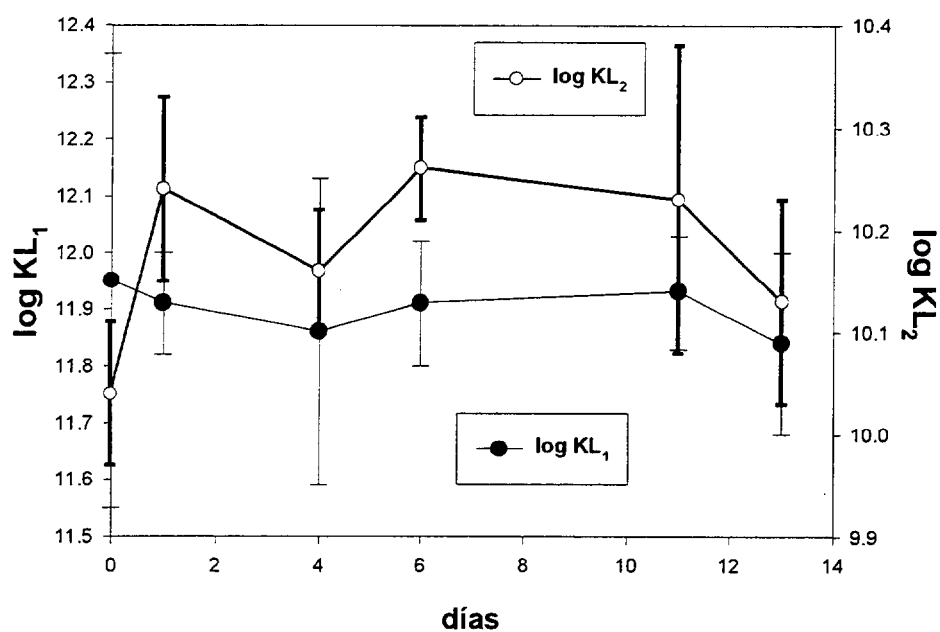


Figura 97. Evolución de la constante de estabilidad condicional de los dos tipos de ligandos estimados.

El aumento referido de la capacidad complejante durante el cultivo, unido a la disminución de la concentración total de cobre disuelto hacen que disminuya el valor de pCu progresivamente, como se aprecia en la figura 98. Por la forma de la curva que describe la concentración de cobre iónico, con un fuerte descenso inicial y una concentración más estable al final de la fase exponencial de crecimiento del cultivo, la concentración total de cobre, cuya evolución sigue un esquema idéntico (tabla XIV y

figura 94), tiene más efecto sobre este parámetro. Dado que la disminución de la concentración de cobre disuelto se debe a su adsorción sobre la superficie de la diatomea (figura 100), la adsorción resulta el factor fundamental de la regulación del valor de pCu.

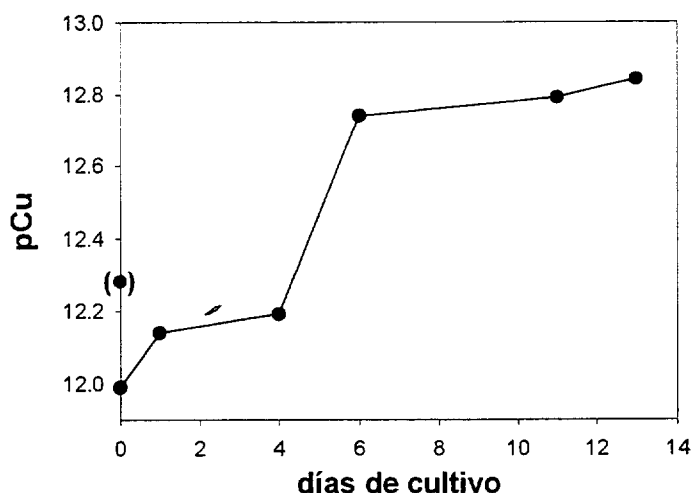


Figura 98. Evolución de pCu con el cultivo. Aparecen al comienzo tanto el valor calculado en el medio original, como el que tendría este medio en caso de tener una concentración total disuelta de cobre igual a la concentración total extracelular que muestra la figura durante el cultivo (este valor descrito en último lugar es el que aparece unido a la línea).

El valor de pCu supuestamente inicial de 11.99 se encuentra en la zona baja de los valores más altos mostrados en la bibliografía para aguas oceánicas ($pCu \approx [12-14]$), y no debe resultar tóxico en absoluto para el desarrollo de un cultivo planctónico. Es por tanto asumible que el aumento de la capacidad complejante no sea una respuesta celular a esta presencia de cobre iónico libre, aunque lo que suceda en realidad es que la capacidad complejante del medio aumenta hasta situar a este valor en torno a 12.8.

El seguimiento de la importancia comparada del efecto de los dos tipos de ligandos calculados sobre la complejación, puede seguirse en la figura 99. Se observa que el ligando de mayor constante de estabilidad condicional domina ligeramente al comienzo del experimento la complejación, pero su importancia se ve incrementada a lo largo del experimento por la reducción del valor del cobre total disuelto, ya que el crecimiento porcentual de las fuerzas complejantes de ambos tipos de ligandos es aproximadamente el mismo. La fracción complejada supone de cualquier forma más del 99% del total disuelto durante todo el cultivo.

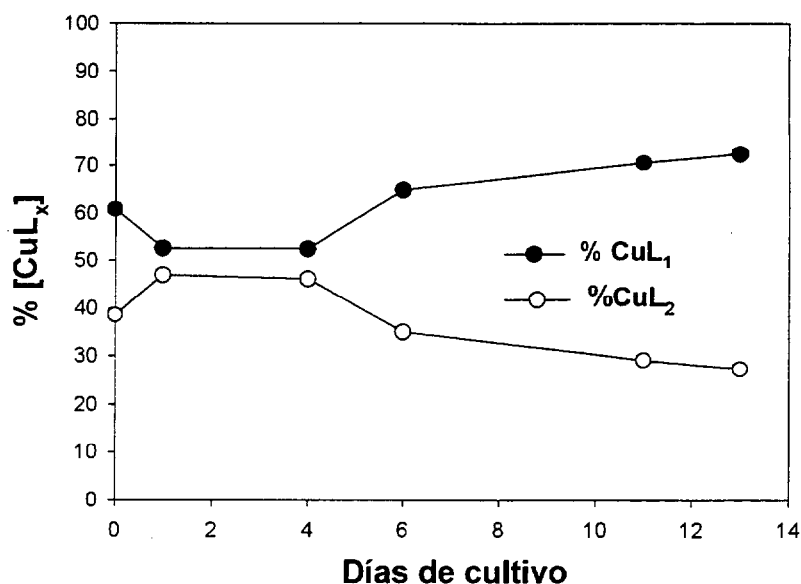


Figura 99. Muestra el porcentaje de CuL₁ y CuL₂ respecto de la concentración total de cobre disuelto a lo largo del cultivo.

Para poder tener una descripción más completa de la especiación del cobre en los cultivos de *Phaeodactylum tricorutum* se ha procedido a calcular la cantidad de cobre que se adsorbe sobre la superficie de la diatomea a medida que avanza el cultivo. Para calcular esta fracción se han utilizado los datos de capacidad adsorptiva por célula calculados en el apartado de adsorción de este trabajo. En la tabla XII aparecen descritos los grupos superficiales de *Phaeodactylum tricorutum* con los siguientes parámetros de adsorción: $\Gamma_{\max,1}=1.2 \cdot 10^{-16}$ moles·cel⁻¹ (log K_{S1}=11.86); $\Gamma_{\max,2}=21.8 \cdot 10^{-16}$ moles·cel⁻¹ (log K_{S2}=10.11), siendo estas constantes intrínsecas. La expresión que permite calcular la constante de estabilidad condicional a un pH determinado viene dada por la expresión:

$$K'_{H,j} = \frac{K_{\text{intrin},j}}{1 + K_{a,j} \cdot [H]} \quad (74)$$

$K_{a,j}$ es la constante de acidez microscópica de la superficie del alga. Es función de la interacción electrostática que efectúan los grupos adyacentes sobre cada grupo concreto, es decir, de la carga superficial celular, y ésta depende directamente del pH. Por lo tanto debe calcularse la constante de acidez a cada pH. Esto ha sido realizado sobre la valoración ácido-base efectuada a una suspensión de *Phaeodactylum tricorutum* y que aparece en la figura 37 del apartado de descripción de la superficie del alga. El valor de la constante de acidez de la superficie del alga a $\text{pH}_{\text{NBS}}=7.8$ es 8.81. Con este dato pueden calcularse las constantes condicionales de estabilidad de los

grupos superficiales de la diatomea para poder comparar el alcance de la adsorción y de la complejación. El resultado se muestra en la tabla XV:

$\Gamma_{\max,1} \cdot 10^{16} \text{ M}$	$\log K_{\Gamma_1}$	$\Gamma_{\max,2} \cdot 10^{16} \text{ M}$	$\log K_{\Gamma_2}$
1.2	10.81	21.8	9.06

Tabla XV. Resumen de los parámetros de adsorción obtenidos para la superficie de *Phaeodactylum tricornutum*. Las constantes de estabilidad son condicionales a pH=7.8 (escala NBS).

Debido a que el método analítico que permitió la obtención de los parámetros de adsorción fue la voltametría anódica de redisolución, que suele presentar una ventana espectral algo desplazada a valores menores de la constante de estabilidad condicional, es posible que la constante de adsorción correspondiente a los grupos funcionales superficiales de mayor afinidad por el cobre se encuentre ligeramente infravalorada, en comparación con la ventana utilizada en este apartado. Para conocer el efecto de este desplazamiento de la ventana espectral, es posible calcular la utilizada en el apartado de adsorción mediante el empleo de voltametría de adsorción anódica, gracias a la expresión aportada por van den Berg y Donat (1992). Según ésta, el límite superior y el centro de la ventana espectral en voltametría anódica para la determinación de cobre, viene dado por las expresiones:

$$\text{lím. sup.} = (\alpha_{\text{Cu}'} \cdot [\text{Cu}]_{\text{total}} - \alpha_{\text{Cu}'} \cdot [\text{Cu}]_{\text{lábil}}) / [\text{Cu}]_{\text{lábil}} \quad (75)$$

$$\text{Centro de la ventana espectral } (\delta) = (\text{lím sup} + \alpha_{\text{Cu}'}) / 2 \quad (76)$$

El resultado es de $\log \delta = 2.55$. Se considera en general que en todas las técnicas voltamétricas es posible detectar a aquellos ligandos cuyos parámetros de complejación generen un valor del coeficiente- α para la reacción de complejación ($[\text{CuL}]/[\text{Cu}^{2+}]$) un orden de magnitud por encima y por debajo del centro de la ventana espectral. El centro de la ventana en los experimentos de complejación con el empleo de la voltametría catódica de redisolución se sitúa, en función del pH y la concentración de catecol utilizados, entre un valor de $\log \alpha_{\text{Cu cat}}$ de 2.87 (para este medio) y de 2.6 para el resto de medios estudiados. Por lo tanto los centros de las ventanas espectrales empleadas en ambas series de estudios son muy similares y pueden utilizarse los valores de los parámetros de adsorción para obtener una aproximación de la fracción cúprica adsorbida sobre la superficie de la diatomea a medida que avanza el cultivo.

Una comparación directa entre las constantes de estabilidad condicional de los dos tipos de grupos funcionales considerados tanto en la superficie celular como en el medio de cultivo, muestra la mayor afinidad de los ligandos disueltos del medio por el cobre ($K' \approx 11.8-12.0$), frente a la que presenta la superficie celular ($K' = 10.8$). Este hecho es muy importante para un elemento como el cobre, tóxico a altas concentraciones.

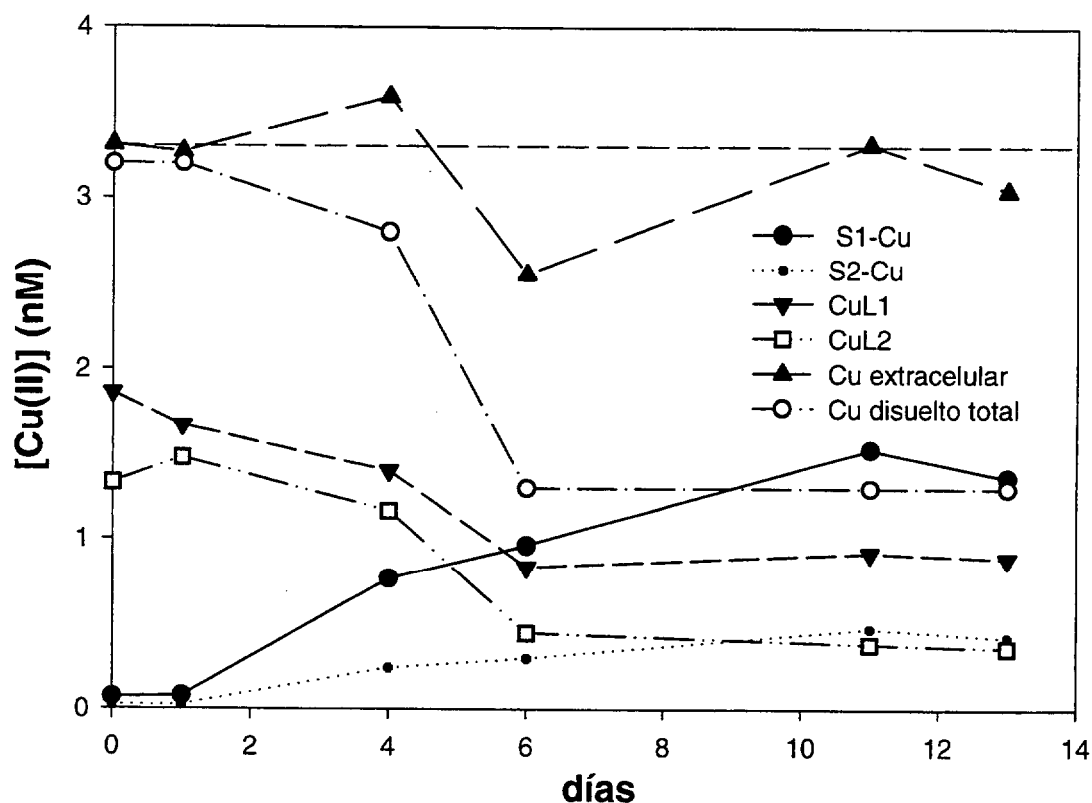


Figura 100. Evolución de las concentraciones de las distintas especies cúpricas enlazadas tanto por los distintos ligandos del medio (L_1 , L_2) como por los grupos funcionales de la superficie de la diatomea (S_1 , S_2), a lo largo del cultivo. La línea discontinua horizontal marca la concentración extracelular total de cobre inicial.

De la figura 100 se puede destacar en primer lugar la inexistencia de inclusión intracelular de cobre, a pesar del enorme crecimiento celular alcanzado (130 veces la concentración celular inicial) y del papel como micronutriente que desempeña este metal. Esto último queda reflejado en el valor constante de la concentración de cobre extracelular (total disuelto más adsorbido en la superficie celular) durante todo el cultivo.

La figura 100 muestra además un descenso de la importancia relativa de la complejación orgánica en el cultivo a medida que avanza el mismo, a pesar del aporte al medio de ligandos orgánicos por parte de la diatomea, y del aumento de la fuerza

complejante asociada a los mismos, reflejado en las figuras 95 y 96. Se observa que este comportamiento es debido al fuerte incremento de la adsorción superficial ocasionado por el gran aumento de la concentración celular de *Phaeodactylum tricornutum*. Por lo tanto el aumento del número de grupos superficiales es más importante para la especiación del cobre a medida que avanza el cultivo que el aporte de ligandos disueltos en el medio procedentes de la exudación de la diatomea, a pesar de su menor afinidad por el cobre en disolución. Esto queda reflejado en el dato de la cantidad de grupos superficiales por volumen de cultivo que existen al principio y al final del cultivo.

La tabla XVI muestra la enorme capacidad adsortiva que posee el cultivo al final del experimento (de 20 a 30 veces la capacidad complejante). Este dato es el que hace posible que a pesar de su menor afinidad por el cobre, los grupos superficiales de la diatomea presenten un mayor potencial por retirar al cobre de la forma inorgánica disuelta que el que presentan los ligandos disueltos en el medio de cultivo.

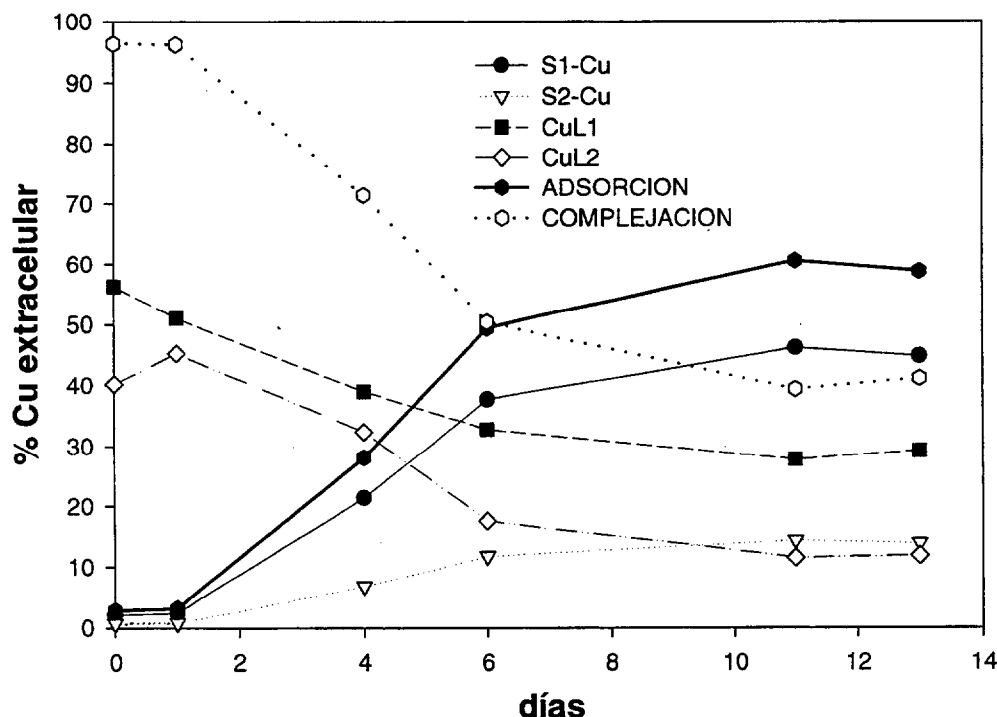


Figura 101. Porcentajes de cobre complejado con los ligandos orgánicos disueltos del medio y del cobre adsorbido sobre la superficie de *Phaeodactylum tricornutum*, respecto del cobre no incluido, a lo largo de la evolución del cultivo.

días	$\Gamma_{\max,1}$ (*10 ⁻⁹ M)	Fuerza adsortiva Tipo 1	Fuerza complejante Tipo 1	$\Gamma_{\max,2}$ (*10 ⁻⁸ M)	Fuerza adsortiva Tipo 2	Fuerza complejante Tipo 2
1	1.8	116.2	3677	3.3	32.7	2080
11	159	10268	6470	289	2957	2360

Tabla XVI. Valores de las capacidades adsorptivas de las células de *Phaeodactylum tricornutum* al comienzo del cultivo y al final del crecimiento exponencial. Aparecen los datos de las fuerzas adsorptivas de los dos tipos de grupos superficiales considerados, así como de los dos tipos de ligandos disueltos del medio

La figura 101 compara porcentualmente las reacciones de complejación y de adsorción en este cultivo. El comienzo de la figura corresponde a una situación puramente oceánica, y en ella más del 98% del cobre se encuentra complejado (99.5% del disuelto total). A medida que avanza el cultivo la fracción adsorbida consigue superar a la complejada debido a la gran concentración celular alcanzada al final del cultivo.

6.2 CULTIVO EN AGUA DE MAR ARTIFICIAL

Este cultivo fue realizado en agua de mar preparada artificialmente según la fórmula propuesta por Millero y Sohn (1992) para obtener 1 Kg de agua de mar de salinidad igual a 35‰. La tabla XVII muestra las diferentes sales y cantidades de las mismas utilizadas para conseguir esta disolución.

El objetivo de partida de este estudio consistió en conseguir un medio de cultivo sin ligandos presentes en el medio evitando el proceso de irradiación con luz ultravioleta de la muestra, el cual necesita de una adición de ácidos previa y una posterior de base para volver a situar al pH en las condiciones

Sal	g. sal / Kg.	Mol. / Kg.
NaCl	23.9849	0.41040
Na ₂ SO ₄	4.0111	0.02824
KCl	0.6986	0.00937
NaHCO ₃	0.1722	0.00205
KBr	0.1000	0.00084
B(OH) ₃	0.0254	0.00041
NaF	0.0029	0.00007
MgCl ₂	5.0290	0.05282
CaCl ₂	1.1409	0.01028
SrCl ₂	0.0143	0.00009

Tabla XVII. Composición propuesta por Millero y Sohn(1992) para elaborar 1 Kg de agua de mar artificial de salinidad 35‰

previas al proceso de destrucción de la materia orgánica presente. Se intentó generar un crecimiento de *Phaeodactylum tricornutum* en este medio añadiendo los distintos compuestos que requiere el medio de cultivo f/2 (nutrientes, metales traza y vitaminas), pero en cualquier proporción el resultado fue de crecimiento nulo (incluso haciendo el agua de mar sintética de igual concentración en nutrientes, vitaminas y metales pesados que el medio referido). Pero adiciones de un complejante sintético (EDTA) al agua de mar sintética con aporte de metales traza, vitaminas y nutrientes generaron un crecimiento de la diatomea en este medio sintético, aunque no de la magnitud de los demás cultivos presentados en este trabajo, permitiendo un estudio adecuado de su evolución.

Medio de cultivo:

- Nutrientes (f/2):
 - NaNO₃ 10⁻⁴ M
 - NaH₂PO₄ 10⁻⁵ M
 - Na₂SiO₃ 10⁻⁴ M
 - NH₄Cl 10⁻⁵ M
- FeCl₃ (f/2): 10⁻⁷ M
- H₂SeO₃, CoCl₂ (f/10) 2×10⁻¹⁰ M
- MnCl₂ (f/10) 2×10⁻⁸ M
- ZnSO₄ (f/2) 10⁻⁸ M
- Na₂EDTA(f/15) 1.65×10⁻⁷ M
- Vitaminas (f/100):
 - Tiamina 2×10⁻⁹ M
 - Biotín 2×10⁻¹⁰ M
 - B₁₂ 2×10⁻¹⁰ M

EVOLUCIÓN DEL CULTIVO

Todos los análisis fueron llevados a cabo con una concentración de catecol de 2·10⁻⁵ M ($\alpha_{\text{Cucatecol}}=406$).

Días	Cu total (nM)	Cél / l. *10 ⁻⁶	[L ₁] *1e ⁹ M	Log K _{L1}	[L ₁]*K _{L1}	[L ₂] *1e ⁸ M	Log K _{L2}	[L ₂]*K _{L2}	pCu
Medio original	2.1	--	6.1 ±2.5	11.69 ±0.3	2990	14.9 ±1	9.9 ±0.1	1192	12.39
1	3.1	16	5.2 ±0.5	11.83 ±0.1	3515	17.3 ±1.2	9.82 ±0.1	1143	12.03
4	2.2	39	5.9 ±1.51	11.71 ±0.2	3013	17.8 ±1	10.03 ±0.12	1907	12.29
7	2.5	78.5	6.5 ±1.3	11.82 ±0.2	3660	24.8 ±0.7	9.91 ±0.04	2016	12.28

Tabla XVIII. Corresponde al medio de cultivo obtenido a partir de agua de mar sintética con adición del complejante artificial EDTA. Muestra la evolución de la concentración celular de *Phaeodactylum tricornutum*, de la capacidad complejante para dos tipos de ligandos obtenida de modo independiente y de la concentración de cobre iónico libre en el medio de cultivo a lo largo del tiempo de experimentación.

El medio con agua sintética no resulta muy apropiado para el desarrollo de cultivos, y a pesar de la alta cantidad de nutrientes y micronutrientes añadidos el crecimiento celular no llega a ser muy alto (10 veces la concentración celular inicial). Este bajo crecimiento, unido a la alta capacidad complejante del medio original, dificulta el apreciar tendencias en la evolución de la capacidad complejante de ambos tipos de ligandos debido a la presencia en el medio de la diatomea, lo cual debe ser tenido en cuenta al interpretar los resultados. La evolución de la concentración celular queda reflejada en la figura 102.

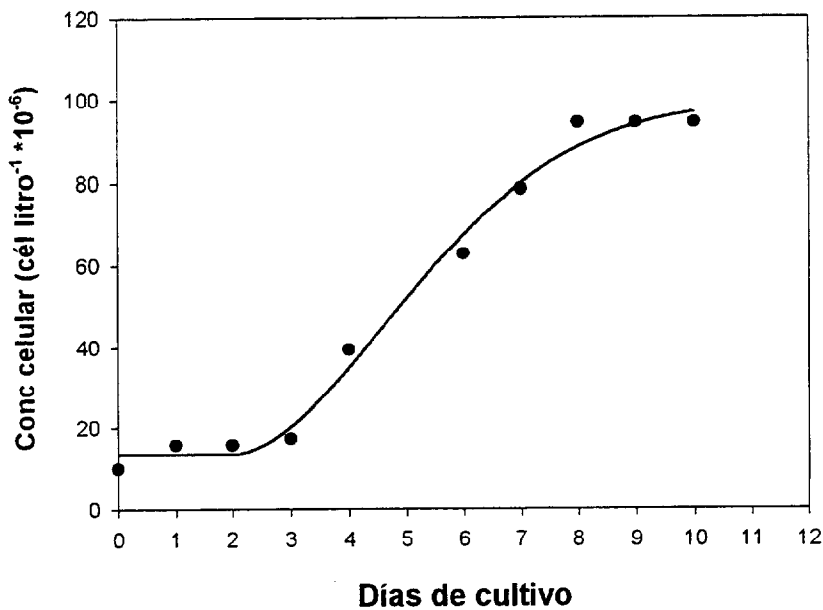


Figura 102. Muestra la evolución de la concentración celular (•) a lo largo del experimento.

Al comienzo del experimento aparece un periodo de hasta tres días en que no se aprecia un desarrollo de la concentración celular.

El medio de partida resulta altamente complejante en los dos tipos de ligandos que calcula la técnica, por lo que se debe suponer que la complejación orgánica de todos los metales del medio se ve altamente favorecida, y por lo tanto en el caso de aquellos que sean tóxicos y fácilmente complejables, este efecto se verá reducido. El pCu de partida resulta particularmente alto para una concentración de 3.1 nM (el valor calculado de pCu en el medio de cultivo para este supuesto valor de cobre total disuelto inicial es de 12.02). Esto quiere decir que la concentración de la especie tóxica del cobre, el ion libre, se encuentra en una concentración muy reducida, similar a la encontrada en medios naturales no contaminados, con alta presencia de materia orgánica en disolución. Por lo tanto es de suponer que la evolución de la capacidad complejante no será respuesta a una posible toxicidad por parte del cobre u otros metales pesados del

medio para la población de diatomeas, ya que se hallarán complejados por el EDTA en una alta proporción.

En este caso el comportamiento calculado para los dos tipos de ligandos que muestra la figura 103 es diferente. Mientras la fuerza complejante de L_2 parece aumentar con la concentración celular (hasta un 170%), el valor de la fuerza complejante del ligando de mayor constante de estabilidad condicional no parece sufrir un cambio significativo, o acaso un ligero incremento.

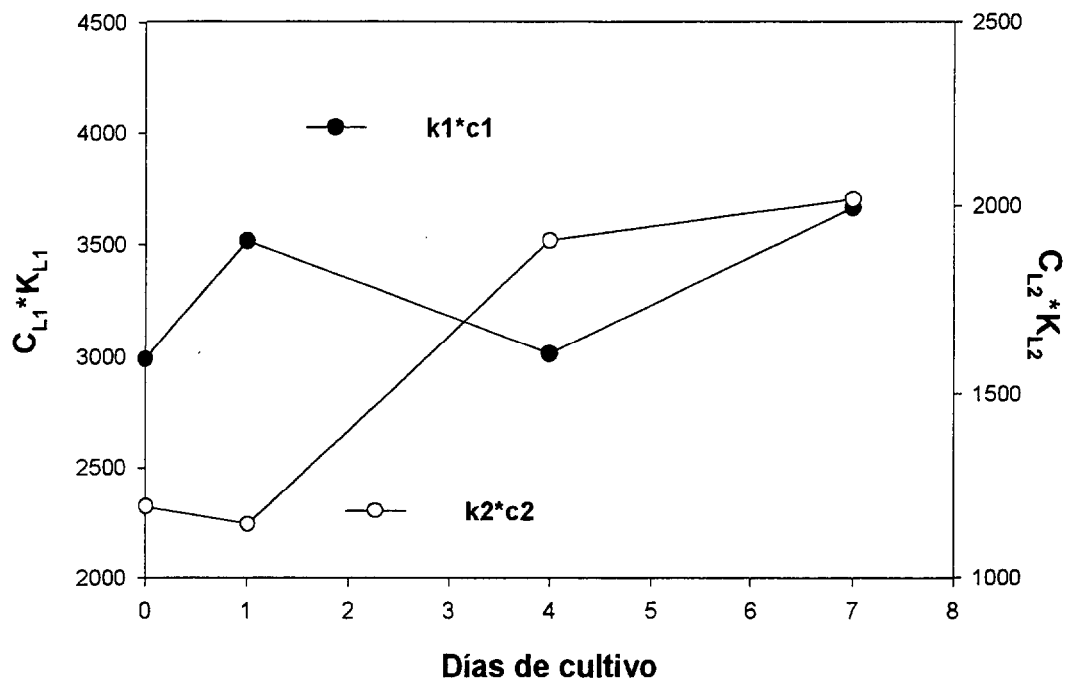


Figura 103. Muestra la evolución de la fuerza complejante a lo largo del experimento

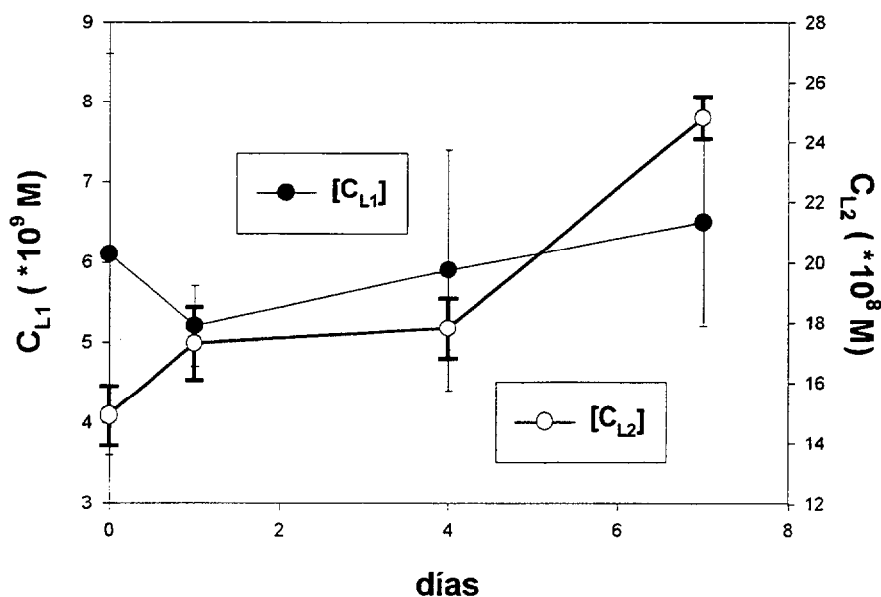


Figura 104. Evolución de la concentración total de los dos tipos de ligandos estimados.

Las variaciones de concentración y constante de estabilidad condicional no parecen tener una tendencia definida para L_1 y se hallan todas dentro de las desviaciones estándar calculadas para el resto de los días de cultivo, correspondiendo este hecho con la falta de tendencia observada en el producto $C_{L1}K_{L1}$. Esto se puede observar en las figuras 104 y 105.

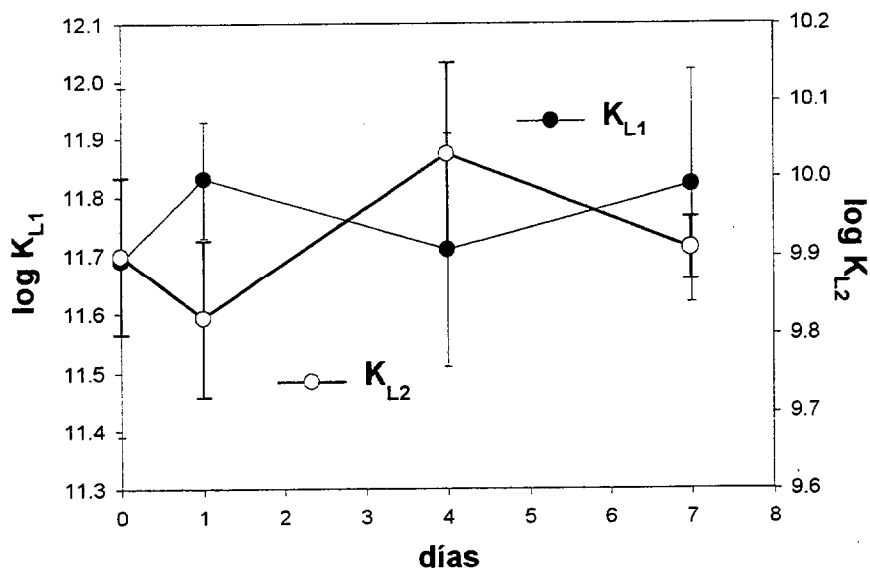


Figura 105. Evolución de la constante de estabilidad condicional de los dos tipos de ligandos estimados.

En el caso de L_2 sí se aprecia que el incremento de la fuerza complejante se debe probablemente a una liberación al medio de exudados (aumenta la concentración de este tipo de ligando) de constante de estabilidad igual o ligeramente superior (sobre 10.0-10.2).

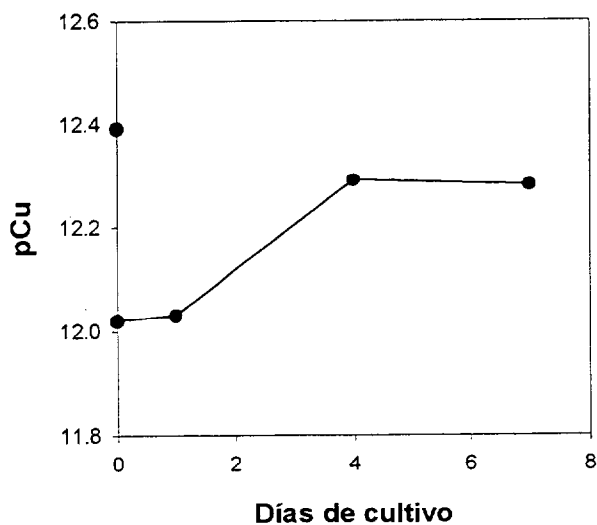


Figura 106. Evolución de pCu con el cultivo. Aparecen al comienzo tanto el valor calculado en el medio original, como el que tendría en caso de tener una concentración de cobre igual a la calculada el día uno (unida por la línea a este último dato referido).

Este aumento de la fuerza complejante de L_2 , unido al descenso de la concentración total de cobre en disolución, es el principal desencadenante del ligero aumento que experimenta pCu hasta que adquiere un valor constante. En la figura 106 se puede seguir esta evolución.

Asimismo el aumento de L_2 fuerza un mayor protagonismo de este tipo de ligandos en la especiación del cobre en el medio, como muestra la figura 107.

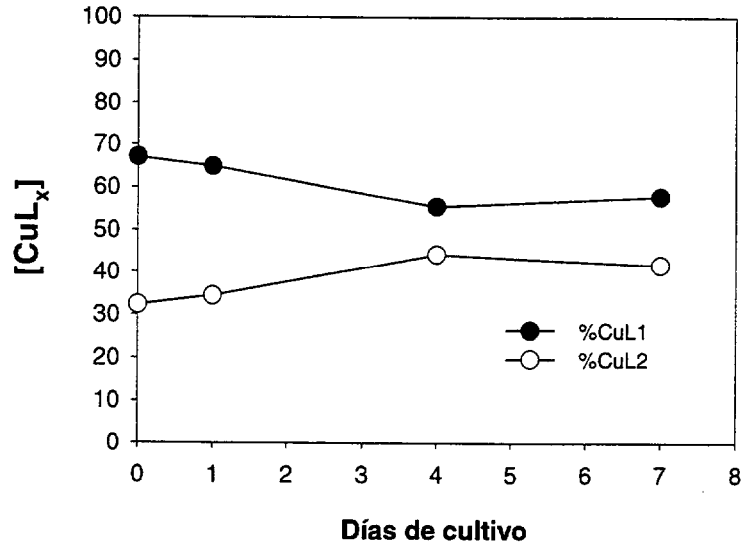


Figura 107. Muestra el porcentaje de CuL_1 y CuL_2 respecto de la concentración total de cobre a lo largo del cultivo.

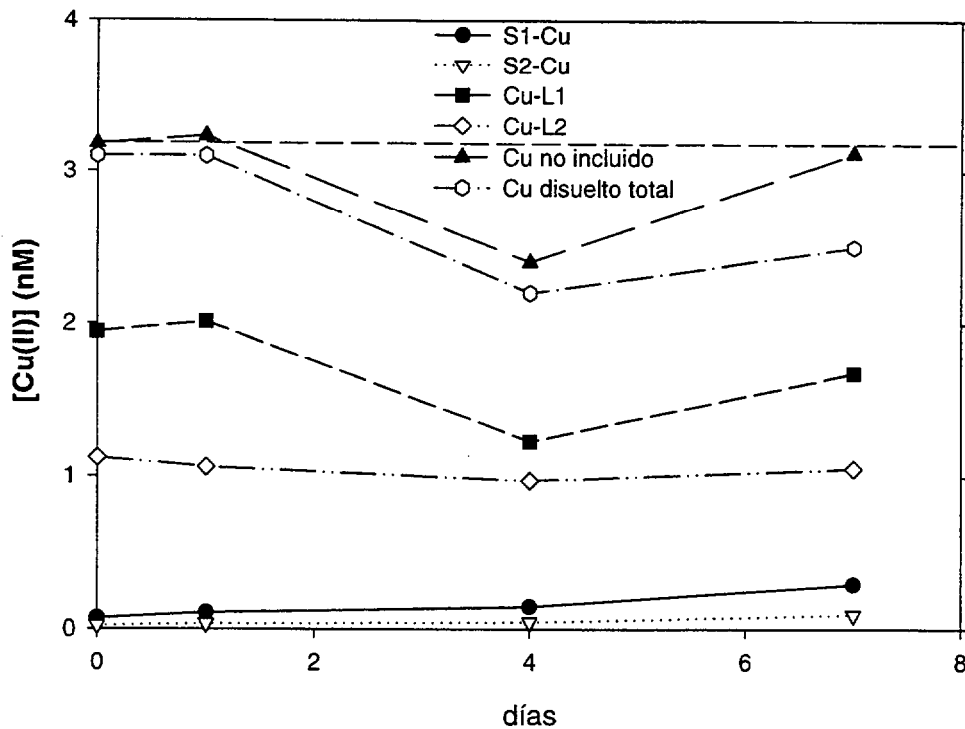


Figura 108. Evolución de las concentraciones de las distintas especies cúpricas enlazadas tanto por los distintos ligandos del medio (L_1 , L_2) como por los grupos funcionales de la superficie de la diatomea (S_1 , S_2), a lo largo del cultivo. Asimismo aparece la concentración de cobre disuelto total y la de cobre total extracelular (disuelto más adsorbido). La línea discontinua horizontal marca la concentración extracelular total de cobre inicial.

La figura 108 ofrece la especiación del cobre extracelular a lo largo del cultivo. La baja concentración celular alcanzada impide observar con claridad tendencias en el comportamiento de las distintas especies.

Al igual que en el caso anterior se observa una nula inclusión intracelular a lo largo del experimento (el bajo valor del cobre extracelular del día 4 parece venir dado por un valor excesivamente bajo del cobre total disuelto tomado ese día). La creciente fuerza complejante asociada al ligando disuelto de menor constante de estabilidad condicional, y a la adsorción debido al incremento celular provoca una pequeña disminución de la fracción unida al ligando de mayor constante de estabilidad.

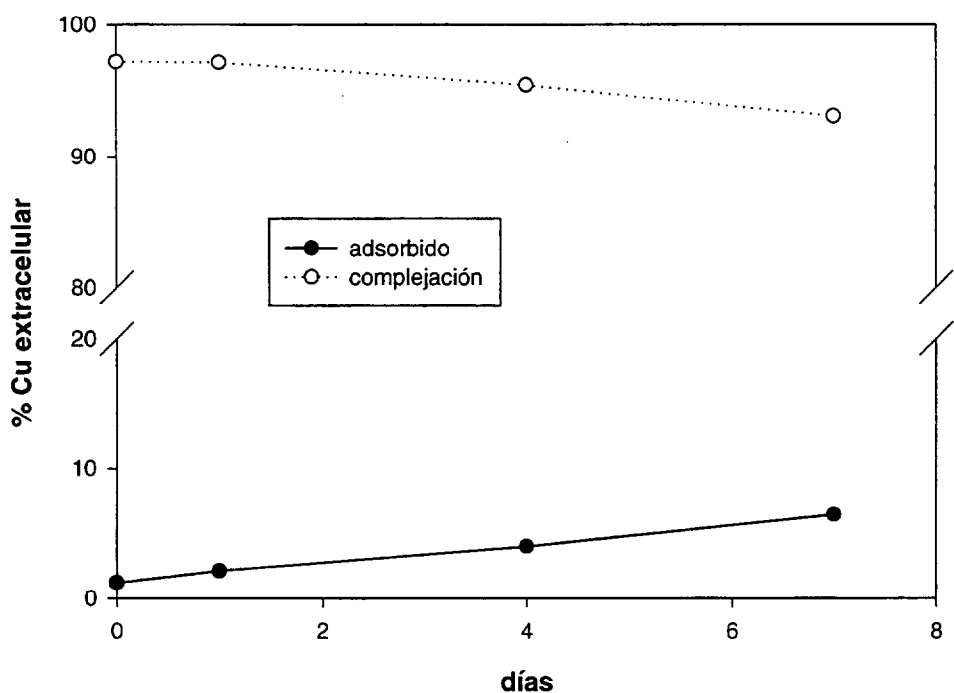


Figura 109. Porcentajes de cobre complejoado con los ligandos orgánicos disueltos del medio y de cobre adsorbido sobre la superficie de *Phaeodactylum tricornutum*, respecto del cobre no incluido, a lo largo de la evolución del cultivo.

La figura 109 muestra como una baja concentración celular hace que el fenómeno de la adsorción sea muy poco importante en magnitud comparado con el de la complejación (>95%). A esto también contribuye el que la concentración de cobre extracelular permanezca por debajo de la capacidad complejante del ligando de mayor constante de estabilidad, como puede observarse en la tabla XVIII. Este es el experimento de todos los presentados en este apartado de complejación que puede ofrecer más similitudes con un medio oceánico a pesar de la naturaleza sintética del medio, y esto es debido al bajo nivel de concentración de ion cúprico (concentraciones muy similares a las descritas para aguas oceánicas; Coale y Bruland, 1990) y a la baja

concentración celular alcanzada. Las concentraciones de la diatomea que se consiguen en este experimento son incluso superiores a las concentraciones planctónicas que se encuentran en aguas oceánicas ($\approx 10^4 \text{ cel l}^{-1}$). Por lo tanto es de esperar que en un medio oceánico la importancia de la adsorción celular frente a la complejación en la especiación del cobre(II) sea mínima.

6.3 CULTIVO EN AGUA OCEÁNICA PROFUNDA

Todos los análisis fueron llevados a cabo con una concentración de catecol de $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ($\alpha_{\text{Cu catecol}}=406$).

El siguiente cultivo se realizó a partir de muestras de agua de mar de origen oceánico y de una profundidad por debajo de la capa de mezcla (300 m), que fueron conservadas en congelación, y posteriormente filtradas por $0.45 \mu\text{m}$ previamente a la adición de hierro, nutrientes y vitaminas para poder lograr el crecimiento del cultivo. Este tipo de agua se caracteriza por tener una concentración de cobre total algo mayor que las aguas superficiales (entre 1.5 y 3 nM), pero mucho menor que las que pueden hallarse en zonas costeras. Además presentan una baja presencia de ligandos de alta constante de estabilidad y alta de ligandos de baja constante de estabilidad, siempre comparado con aguas más superficiales (todo según Coale y Bruland, 1990).

Estas son las concentraciones de las diferentes sustancias añadidas al agua de mar para constituir el medio de cultivo:

- Nutrientes (f/20):
 - NaNO_3 10^{-5} M
 - NaH_2PO_4 10^{-6} M
 - Na_2SiO_3 10^{-5} M
 - NH_4Cl 10^{-6} M
- FeCl_3 (f/20): 10^{-8} M
- Vitaminas (f/50):
 - Tiamina $4 \times 10^{-9} \text{ M}$
 - Biotín $4 \times 10^{-10} \text{ M}$
 - B_{12} $4 \times 10^{-10} \text{ M}$

Días	Cu total (nM)	Cél / l. *10 ⁻⁶	[L ₁] *1e ⁹ M	Log K _{L1}	[L ₁]*K _{L1}	[L ₂] *1e ⁸ M	Log K _{L2}	[L ₂]*K _{L2}	pCu
Medio original	2.9	--	5.7 ±0.3	11.95 ±0.25	5070	9.6 ±0.7	9.81 ±0.2	625	11.55
1	3.8	15	5.1 ±0.8	11.94 ±0.18	4441	10.0 ±0.5	9.81 ±0.07	646	11.84
5	3.3	78.5	4.1 ±0.6	11.97 ±0.16	3836	9.8 ±0.25	9.94 ±0.05	856	11.90
8	2.8	188.4	4.1 ±0.7	12.05 ±0.21	4600	10.9 ±0.25	10.00 ±0.05	1090	12.10
10	2.9	290.5	2.5 ±0.04	12.35 ±0.04	5430	12.8 ±0.5	10.04 ±0.1	1481	12.055
12	2.6	338	2.4 ±1.3	12.27 ±0.41	4470	13.1 ±0.03	10.19 ±0.05	1968	12.16

Tabla XIX. Corresponde al medio de cultivo obtenido a partir de agua de mar de origen oceánico y profundo. Muestra la evolución de la concentración celular de *Phaeodactylum tricornutum*, de la capacidad complejante para dos tipos de ligandos obtenida de modo independiente y de la concentración de cobre iónico libre en el medio de cultivo a lo largo del tiempo de experimentación.

La concentración de células inoculadas fue la misma que en los otros ejemplos (10^7 células litro^{-1}). La figura 110 muestra la evolución de la concentración celular durante el experimento. En este caso, la concentración celular llega a ser más de 30 veces la de partida.

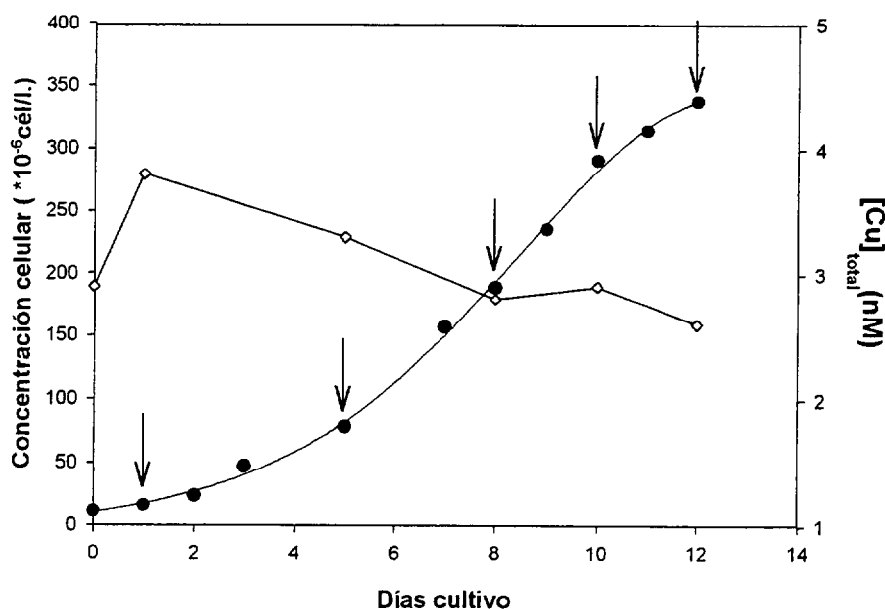


Figura 110. Muestra la evolución de la concentración celular (\bullet) y de la concentración total de cobre disuelto (\diamond) a lo largo del experimento. Las flechas indican los días en que fue retirada una parte del volumen para su análisis.

Los resultados del medio original (tabla XIX) discrepan con los resultados de Coale y Bruland (1988, 1990), que en aguas del Pacífico describen un perfil para L_1 con un mínimo superficial, un máximo en el máximo de clorofila y su desaparición por debajo de 200 m. En este caso el agua es de mayor profundidad y sí que aparece una concentración de este tipo de ligando.

La evolución de los parámetros que describen la complejación del ligando de mayor constante de estabilidad condicional (según la figura 111), muestra que la fuerza complejante del tipo de ligando de mayor constante de estabilidad condicional permanece aproximadamente constante a lo largo del desarrollo del cultivo. Sin embargo a partir de la tabla XIX y de las figuras 112 y 113 parece existir un descenso de la concentración de L_1 y un incremento del valor de K_{L1} . Esto estaría en consonancia con los resultados de Moffett (Moffett *et al.*, 1990), el cual describe la existencia de un ligando de alta constante de estabilidad en aguas oceánicas, con su máximo de concentración en la profundidad de máxima concentración de clorofila. Este ligando

prácticamente no aparece en superficie y por debajo del máximo de clorofila disminuye su concentración lentamente con la profundidad. Esta distribución la explica Moffett en función del origen biológico de este ligando y de su fotooxidación en superficie y consumo heterotrófico en profundidad. Para ello expuso una muestra de origen oceánico profundo que presentaba una cierta concentración de ligandos de alta constante de estabilidad a la luz solar durante un largo periodo y tras este proceso desaparecía la concentración de L_1 . Además demostró con periodos variables de irradiación que éste es un proceso lento que necesita varios días para completarse. En nuestro caso, esto conllevaría que esta agua de origen profundo y que la congelación preservó de la oxidación, al ser emplazada en la cámara de cultivo en condiciones de alta luminosidad, sufre una oxidación progresiva de esta fracción de su materia orgánica disuelta. El aumento de la constante de estabilidad condicional de L_1 con el tiempo puede explicarse como consecuencia de una excreción por parte de *Phaeodactylum tricornutum* de ligandos de constante de estabilidad condicional mayor a la media ponderada de los existentes en agua oceánica de origen profundo, y que aumentará la media ponderada de K' para este tipo de ligando, o quizás a que la fotooxidación sólo se verifica en los compuestos orgánicos de la zona de menor constante de estabilidad incluidos en la ventana espectral. Esta fracción correspondería a aquellos compuestos descritos por Moffet y aludidos previamente. Esto supondría que este cultivo experimenta las condiciones verificadas en un afloramiento (ascenso de aguas profundas ricas en nutrientes que originan un fuerte incremento de la productividad en superficie).

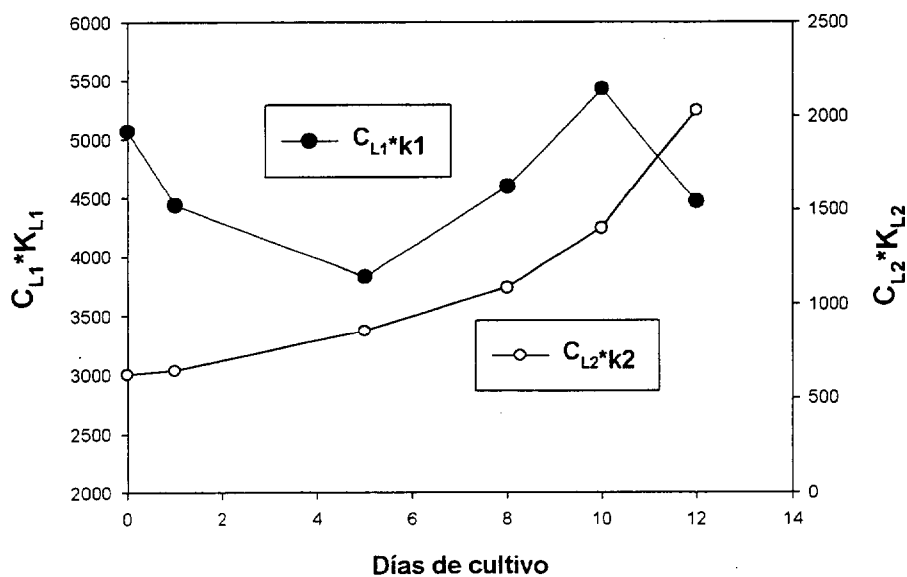


Figura 111. Muestra la evolución de la fuerza complejante a lo largo del experimento

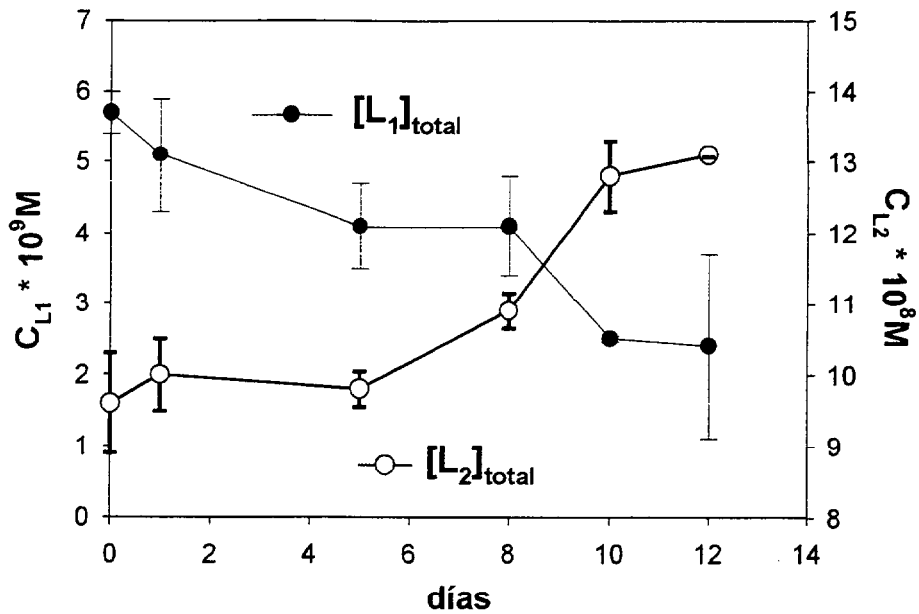


Figura 112. Evolución de la concentración total de los dos tipos de ligandos estimados.

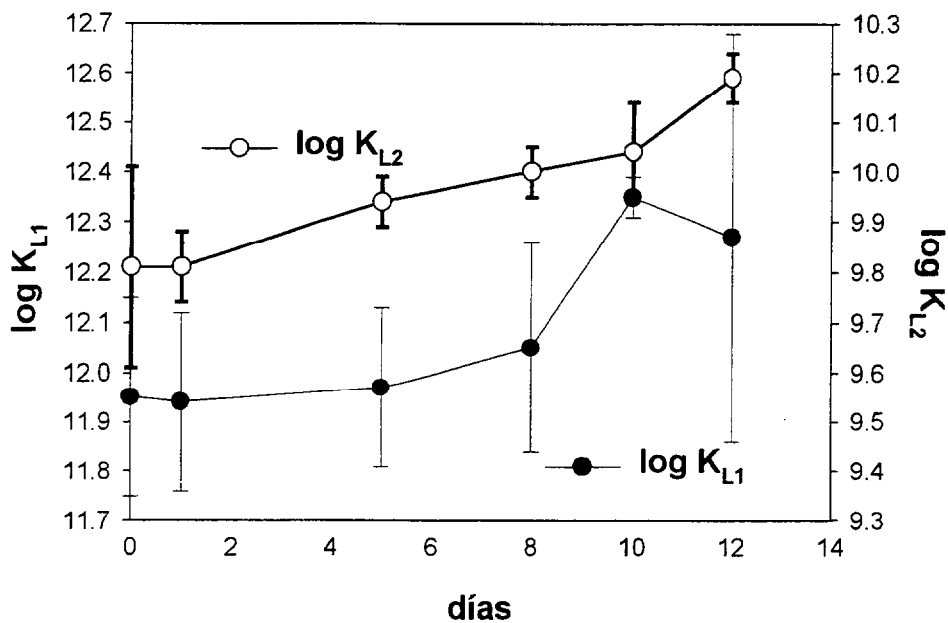


Figura 113. Evolución de la constante de estabilidad condicional de los dos tipos de ligandos estimados.

La evolución del tipo de ligandos de menor constante de estabilidad está bien definida. En la figura 111 se aprecia como la fuerza complejante se ve incrementada durante todo el cultivo.

En cuanto a la evolución de la concentración total y la constante de estabilidad condicional (ver figuras 112 y 113), ambas se incrementan durante todo el desarrollo del cultivo. Esto debe suponer que la diatomea excreta ligandos de baja constante de

estabilidad sea cual sea la fase de crecimiento, y que estos además son de mayor K_{L2} que los que existían previamente en el medio (en torno a 9.8). El valor de su fuerza complejante se triplica desde el primer día de cultivo al 12, mientras que la concentración de L_2 aumenta entre un 30 y un 40%. Por otro lado K_{L2} pasa de 9.8-9.9 a 10.1-10.2 (un aumento del 100% aproximadamente). Por lo tanto de este experimento se deduce que los ligandos excretados por la diatomea durante el experimento deben tener una constante de estabilidad condicional ponderada de 10.4-10.5.

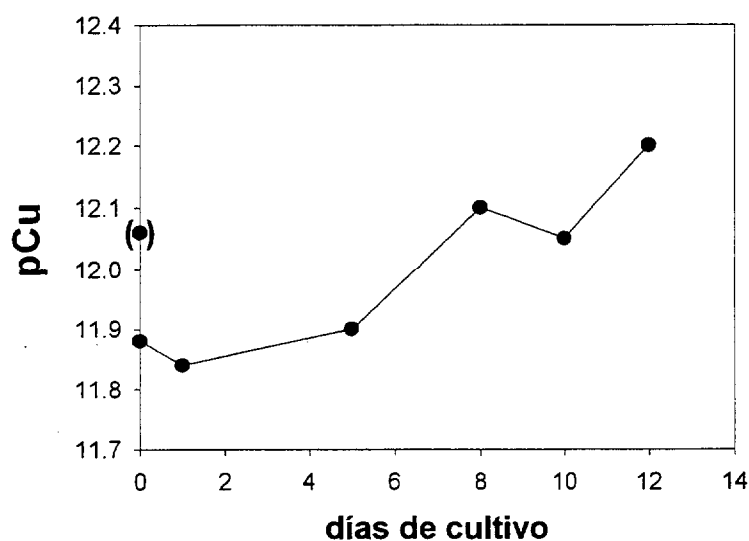


Figura 114. Evolución de pCu con el cultivo. Aparecen al comienzo tanto el valor calculado en el medio original, como el que tendría en caso de tener una concentración de cobre igual a la concentración total extracelular calculada el día uno (esta última es la que aparece unida a la línea)

En cuanto al pCu, que viene representado en la figura 114, su valor experimenta un incremento constante durante todo el experimento hasta un valor entre 12.1 y 12.2, sin que la tendencia al alza se detenga.

En esta figura se encuentra representado además el valor de pCu que tendría el medio original con los parámetros calculados y la concentración de cobre correspondiente al primer día de cultivo, y que es de 11.89. El valor de 11.89, o incluso el de 11.8 del día 1 es algo bajo para los valores de $[Cu^{2+}]$ que se suelen encontrar en medios naturales, pero la evolución del cultivo hace que se recupere rápidamente el valor a los que se ven reflejados en la bibliografía para medios naturales.

La figura 115 refleja como el descenso de la concentración de L_1 por debajo de la concentración de cobre total disuelto provoca el aumento relativo de la complejación por parte de L_2 .

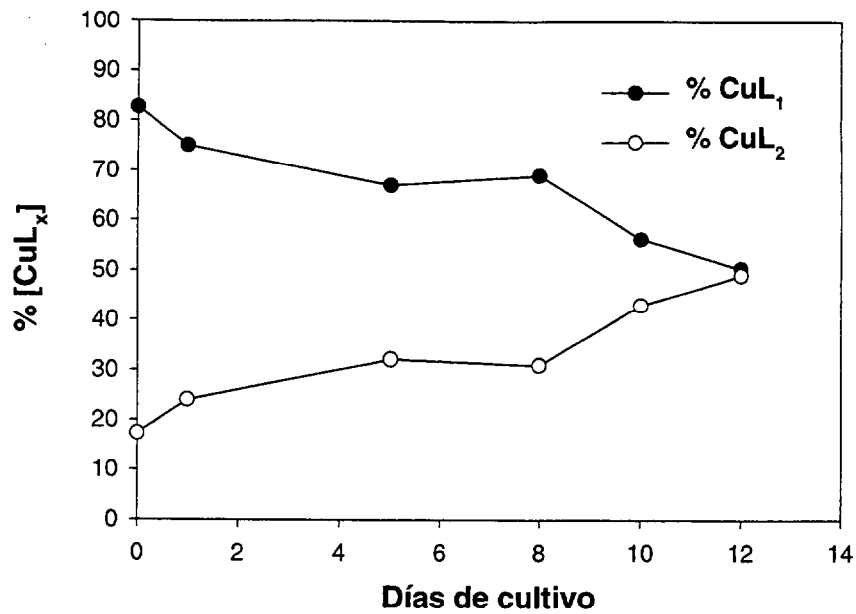


Figura 115. Muestra el porcentaje de CuL₁ y CuL₂ respecto de la concentración total de cobre a lo largo del cultivo.

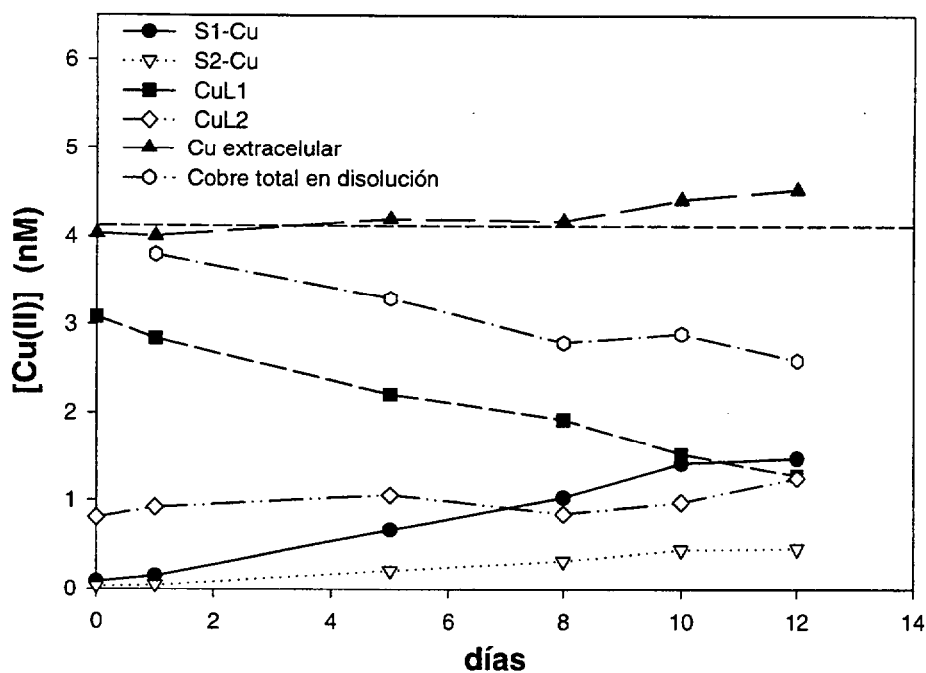


Figura 116. Evolución de las concentraciones de las distintas especies cúpricas enlazadas tanto por los distintos ligandos del medio (L₁, L₂) como por los grupos funcionales de la superficie de la diatomea (S₁, S₂), a lo largo del cultivo. La línea discontinua horizontal marca la concentración extracelular total de cobre inicial.

La figura 116 muestra la especiación extracelular del cobre a lo largo del cultivo. Se observa al igual que en los dos casos ya reflejados la ausencia de inclusión celular en este experimento ya que la concentración de cobre extracelular permanece constante.

En este caso además, la concentración de cobre extracelular inicial es aproximadamente la misma que la de ligando de mayor afinidad cúprica (4.1 nM frente a 5.1 nM), a pesar de ello un 75% del cobre en disolución se halla complejoado al comienzo por este conjunto de ligandos de mayor afinidad (70% del extracelular). Pero el hecho de que la concentración de este tipo de ligando descienda muy por debajo de la concentración de cobre en el medio hace que el papel que juegue en complejar al metal del medio sea cada vez más reducido. En cambio, la presencia del otro tipo de ligando en disolución se incrementa, así como aumenta el número de células en el medio de cultivo, todo esto origina un descenso en la proporción del cobre extracelular que aparece complejoado por el ligando de mayor afinidad cúprica. Al final de la fase exponencial de crecimiento la especie predominante del cobre en disolución es la adsorbida sobre los grupos funcionales de la superficie de la célula de mayor constante de estabilidad condicional por el cobre.

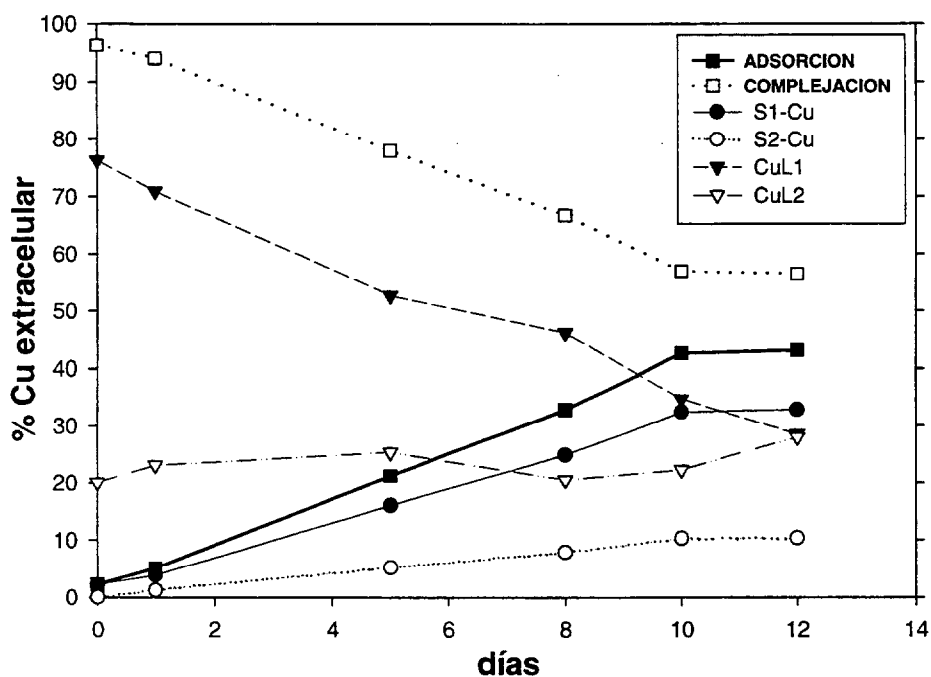


Figura 117. Porcentajes de cobre complejoado con los ligandos orgánicos disueltos del medio y de cobre adsorbido sobre la superficie de *Phaeodactylum tricornutum*, respecto del cobre no incluido, a lo largo de la evolución del cultivo.

La figura 117 ofrece los porcentajes de las reacciones de complejación y de adsorción respecto del cobre total extracelular. El comienzo de la figura ofrece una situación oceánica, en la que la baja concentración planctónica hace que la importancia de la adsorción sea mínima frente a la de complejación (el 99% del cobre en disolución se encuentra complejoado orgánicamente, y un 94% del extracelular). La incapacidad de asumir más cobre por parte de L₁ (su concentración pasa a hallarse por debajo de la

concentración de cobre extracelular) y el crecimiento celular, con el aumento del número de grupos funcionales en contacto con el medio capaces de adsorber al cobre que conlleva, provoca que la fracción adsorbida alcance el 40% finalmente.

La situación al final de la fase exponencial del cultivo (día 12) es un buen ejemplo de lo que debe suceder en un medio donde la concentración de cobre disuelto supere a la de los ligandos de constante de estabilidad mayor que la de los grupos funcionales de mayor constante de estabilidad. En este caso, la interacción entre los elementos metálicos en disolución y las superficies biológicas debe incrementarse fuertemente debido a la incapacidad de los ligandos en disolución de mayor constante de estabilidad condicional de complejar más cobre.

Por ejemplo, en un afloramiento es de esperarse que el agua que ascienda posea una concentración alta en metales de distribución similar a la del cobre, y si se cumple la fotooxidación del material orgánico disuelto susceptible de complejar al cobre observado en este experimento, la concentración de ion cúprico debe incrementarse fuertemente, así como la adsorción y una posible inclusión intracelular. Esta situación podría verse corregida por el mayor crecimiento experimentado por el fitoplancton superficial (principalmente diatomeas en casos de afloramiento), fuente de nuevo material disuelto complejante.

6.4 CULTIVO DE AGUA IRRADIADA PREVIAMENTE

Una vez demostrada la capacidad de liberar moléculas complejantes por parte de las algas en un medio de baja presencia de cobre iónico disuelto, se estudió la liberación de estos exudados en condiciones de mayor presencia de cobre iónico.

Con el fin de conseguir un medio de cultivo que permita el crecimiento de *Phaeodactylum tricoratum* pero que posea una capacidad complejante inicial menor, se procedió a irradiar con luz ultravioleta una muestra de agua de mar para destruir en parte el contenido de materia orgánica disuelta presente. Para ello al agua se le añadió HNO₃ en una proporción de 50µl por cada 100ml. de agua de mar. Esta cantidad de ácido no resultó ser suficiente para conseguir la total oxidación y destrucción de la materia orgánica disuelta, pero sí para reducir como se pretendía, sustancialmente su

concentración. Posteriormente, mediante la utilización de NaOH se situó al pH del agua de mar en un valor aproximado de 8.1 (escala NBS), propio de agua de mar superficial.

Para mantener un valor bajo de pCu se realizaron adiciones de cobre al medio de cultivo con el fin de que la concentración de cobre en disolución permaneciera durante el desarrollo del cultivo por encima de la concentración de los ligandos superficiales de mayor constante de estabilidad condicional.

El objetivo de conseguir un crecimiento significativo de la diatomea se alcanzó añadiendo al agua de mar irradiada de partida las siguientes cantidades de constituyentes de medios de cultivo:

- Nutrientes (f/20):
 - NaNO₃ 10⁻⁵ M
 - NaH₂PO₄ 10⁻⁶ M
 - Na₂SiO₃ 10⁻⁵ M
 - NH₄Cl 10⁻⁶ M
- FeCl₃ (f/10): 2 × 10⁻⁸ M
- Vitaminas (f/50):
 - Tiamina 4 × 10⁻⁹ M
 - Biotín 4 × 10⁻¹⁰ M
 - B₁₂ 4 × 10⁻¹⁰ M

La inoculación inicial fue de 10⁷ células·litro⁻¹ y el experimento se llevó a cabo en el mismo tipo de recipiente y mismas condiciones de luz y temperatura descritas para los casos anteriores.

Pero en este caso dos de las valoraciones metálicas (medio original y día 10) fueron realizadas a concentraciones de catecol diferentes del resto, y la comparación de los resultados debe tener en cuenta este aspecto debido a que el centro de la ventana espectral utilizado se ha desplazado.

Días	Cu total (nM)	Cél /l. *10 ⁻⁶	[L ₁] *1e9M	log K _{L1}	[L ₁]*K _{L1}	[L ₂] *1e8M	log K _{L2}	[L ₂]*K _{L2}	pCu
Medio original	<u>1.5</u>	--	<u>2.8</u> ±0.3	<u>12.48</u> ±0.13	<u>8248</u>	<u>1.9</u> ±0.4	<u>10.48</u> ±0.27	<u>574</u>	<u>12.53</u>
1	3.6	10	2.8 ±0.9	11.83 ±0.35	1898	4.9 ±0.5	9.74 ±0.15	269	11.30
4	2.2	62	3.3 ±0.2	11.82 ±0.07	2180	4.4 ±0.3	9.75 ±0.1	247	11.77
6	5.2	120	5.9 ±2.1	11.74 ±0.3	3210	7.2 ±0.6	9.94 ±0.15	614.5	11.58
10	<u>5</u>	<u>233</u>	<u>5.0</u> ±1	<u>11.92</u> ±0.17	<u>4159</u>	<u>9.6</u> ±0.4	<u>10.1</u> ±0.05	<u>1208</u>	<u>11.76</u>
13	6.2	400	4.3 ±0.4	12.06 ±0.19	4937	11.3 ±0.5	9.85 ±0.06	830	11.49
18	6	580	--	--	--	11.2	10.76	6445	

Tabla XX. Corresponde al medio de cultivo obtenido a partir de agua de mar irradiada con luz ultravioleta. Muestra la evolución de la concentración celular de *Phaeodactylum tricornutum*, de la capacidad complejante para dos tipos de ligandos obtenida de modo independiente y de la concentración de cobre iónico libre en el medio de cultivo a lo largo del tiempo de experimentación. La última fila no muestra datos de capacidad complejante ya que fue imposible obtener valores fiables de K_{L1} y C_{L1}, por lo que no se pudo alcanzar una solución iterativa. (valores tachados). Los datos correspondientes al medio original y al día 10 están calculados a diferente concentración de catecol (valores subrayados)

La figura 118 muestra la evolución de la concentración celular a medida que se desarrolló el experimento. El cultivo continuó creciendo hasta el día 18, mientras que en el caso anterior lo hizo solamente hasta el 13, pero hasta ese día si se comparan las figuras de crecimiento se observa que la evolución de la concentración celular fue muy similar.

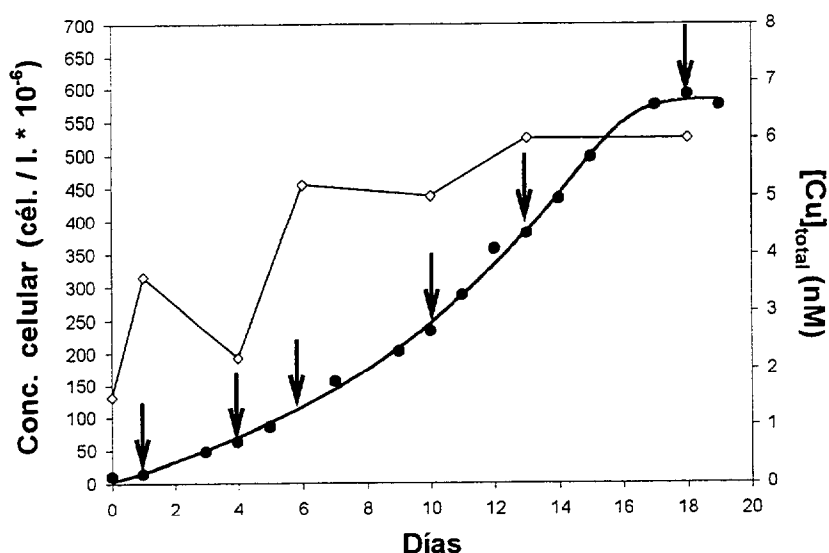


Figura 118. Muestra la evolución de la concentración celular (●) y de la concentración total de cobre disuelto (◇) a lo largo del experimento. Las flechas indican los días en que fue retirada una parte del volumen para su análisis.

El efecto de las adiciones puede ser seguido en la figura 123. La concentración inicial de cobre total previamente a la incorporación de las algas es de 4 nM. Dado que el día 4 se registra una concentración de cobre total disuelto de 2.2 nM frente a una concentración de L₁ de 3.3 nM, se procede a añadir 4 nM (primera flecha vertical de la figura 123) al medio de cultivo, llevándolo hasta una concentración total de cobre extracelular de 8 nM. El día 10 de cultivo ante el descenso del cobre total en disolución hasta un valor de 5 nM, mientras que la concentración de L₁ se había incrementado hasta un valor de 5 nM se realizó una adición de 7 nM al medio de cultivo. De esta forma se mantuvo a la capacidad complejante de los ligandos de alta constante de estabilidad condicional por debajo de la concentración total de cobre(II) en disolución. La concentración final alcanzada es de $1.7 \cdot 10^{-8}$ M, y resulta algo mayor que la que se puede encontrar en aguas costeras, pero es de la misma magnitud de la que puede encontrarse en bahías y estuarios.

Por desgracia los valores de los parámetros de complejación correspondientes a la toma de muestra a los 18 días de cultivo no son válidos debido a la presencia de un

pico en los polarogramas que enmascaraba al de la reducción del cobre. Este pico no puede deberse a la reducción de las sucesivas adiciones de cobre ya que toma el mismo valor desde el blanco hasta la adición de 10 nM de cobre, y equivale el valor de este pico a aproximadamente 3.5 nM de cobre-catecol (60% del cobre total disuelto en el medio). Por lo tanto debe tratarse de alguna otra sustancia que ha aparecido en el medio de cultivo capaz de oxidarse a un potencial similar al del cobre(II). Se ofrece el valor que puede extraerse para L_2 directamente del gráfico de la linealización de van den Berg-Ruzic con los cuatro últimos puntos, pero su alto valor parece restarle credibilidad. Gerringa describe para el caso del cultivo de la diatomea *Ditylum brightwellii* un caso similar de perturbaciones de la superficie del electrodo por la presencia de compuestos orgánicos reducibles (Gerringa *et al.*, 1995), sugiriendo una naturaleza orgánica y un origen en la diatomea cultivada para esta perturbación.

En la tabla XX aparecen los valores de los parámetros de complejación calculados durante el cultivo. Los valores calculados con ventanas espectrales distintas ofrecen posibles interpretaciones muy interesantes.

El medio original fue valorado con cobre en presencia de $4 \cdot 10^{-5}$ M de catecol ($\alpha_{\text{Cucatecol}}=1160$), es decir, que la ventana espectral detectable se ha desplazado a valores de mayor constante de estabilidad condicional. Se supone que la complejación natural que registre el primer día de cultivo debe ser muy similar, dado que apenas ha comenzado el crecimiento celular, y por tanto es posible comparar ambos valores.

En cuanto a los valores de L_2 calculados en el medio original corresponden con la hipótesis de que existe un amplio espectro de compuestos orgánicos disueltos y que cuanto más alta es su constante de estabilidad condicional, menor es su concentración (van den Berg *et al.*, 1990). Esto se traduce en detectar una menor cantidad de ligando (19 por 49 nM) de una mayor K_{L2} (10.48 por 9.74) al mover la ventana espectral mediante el uso de una mayor cantidad de catecol por muestra. Parte de los ligandos que la ventana espectral situada en valores menores de la constante de estabilidad es capaz de detectar, si existe en el medio una mayor cantidad de complejante artificial, no pueden competir por el cobre que se añade al medio, y no aparecen incluidos en la fracción de la materia orgánica disuelta definida como capacidad complejante.

En cambio el caso de L_1 es diferente. Ambas ventanas espectrales ofrecen el mismo valor de $[L_1]$ (2.8 nM), mientras que la constante de estabilidad condicional es mucho mayor (4.5 veces). Si se rechazan posibles explicaciones basándose en falsas estimaciones de la concentración de cobre total de la muestra, la diferencia en el valor

de K_{L1} corresponde al hecho de que de esos 2.8 nM, una importante fracción corresponde a ligandos que se hallan por fuera de la ventana espectral detectable con la $\alpha_{Cu\text{catecol}}$ utilizada en la muestra del día 1 (405). Su concentración es calculada ya que CuL se estima en función de restar del valor de cobre total disuelto, el cobre complejado con el catecol y con los compuestos inorgánicos, cuyas concentraciones son detectadas con la voltametría catódica. Pero se encuentran probablemente saturados con cobre y la adición menor de catecol no les fuerza a liberarlo y lograr un equilibrio, mientras que la adición mayor secuestra parte de ese cobre y se produce un equilibrio entre el catecol y estos ligandos y su constante de estabilidad condicional pasa a ser considerada. Por lo tanto deben existir ligandos en el medio de una constante de estabilidad condicional varios órdenes de magnitud mayor de 11.8.

De todo lo anterior se puede deducir que para la estimación de L_2 , el valor de concentración de catecol escogido para la mayoría de los cultivos es adecuado, ya que un valor mayor ignoraría una fracción muy importante de los ligandos del medio. Para el cálculo adecuado de L_1 es demasiado baja esta concentración de catecol y el valor de K_{L1} queda subestimado. Por un lado parece que puede ser un buen valor de compromiso, pero el valor de pCu que surge de esta estimación más realista es mucho más alto, y esto debe suponer una sobreestimación de la concentración de Cu^{2+} en el medio en el resto de los valores. Pero por otro lado esta ventana espectral tan baja permite la utilización de los valores de los parámetros de adsorción de la superficie de *Phaeodactylum tricoratum*, obtenidos a una ventana espectral muy similar, en la determinación de la especiación cúprica en suspensiones algales.

El valor correspondiente a los 10 días de cultivo está conseguido con una concentración de catecol de $3 \cdot 10^{-5}$ M ($\alpha_{Cu\text{catecol}}=760$). Esta ventana espectral es intermedia a las otras dos, y también pueden hacerse consideraciones similares a las anteriores. No existe ningún conjunto de valores al que compararse directamente, pero puede deducirse de la evolución de los parámetros representados en las figuras 120 y 121 que mientras los valores de los parámetros de L_1 siguen la tendencia general, no lo hacen así los correspondientes a L_2 , que se hallan muy por encima de la tendencia general. Esto debe significar que el desplazamiento de la ventana espectral no es lo suficiente para detectar los ligandos naturales de muy alta constante de estabilidad condicional que han sido detectados con una concentración de catecol de $4 \cdot 10^{-5}$ M en el medio original. Por otro lado, el valor de la fuerza complejante de L_2 sí se ve afectado y fuera de la tendencia general. La diferencia entre el valor estimado de la constante y el

que podía esperarse por la tendencia general (en torno a 9.9), no es tan acusada como en el caso anterior. Todo esto apoya la hipótesis referida de un espectro más o menos continuo para los ligandos con constantes de estabilidad condicional bajas (9-11), pero parece existir una discontinuidad en la distribución de constantes de estabilidad condicional en el intervalo de valores de K'_{L1} mayores (12-13).

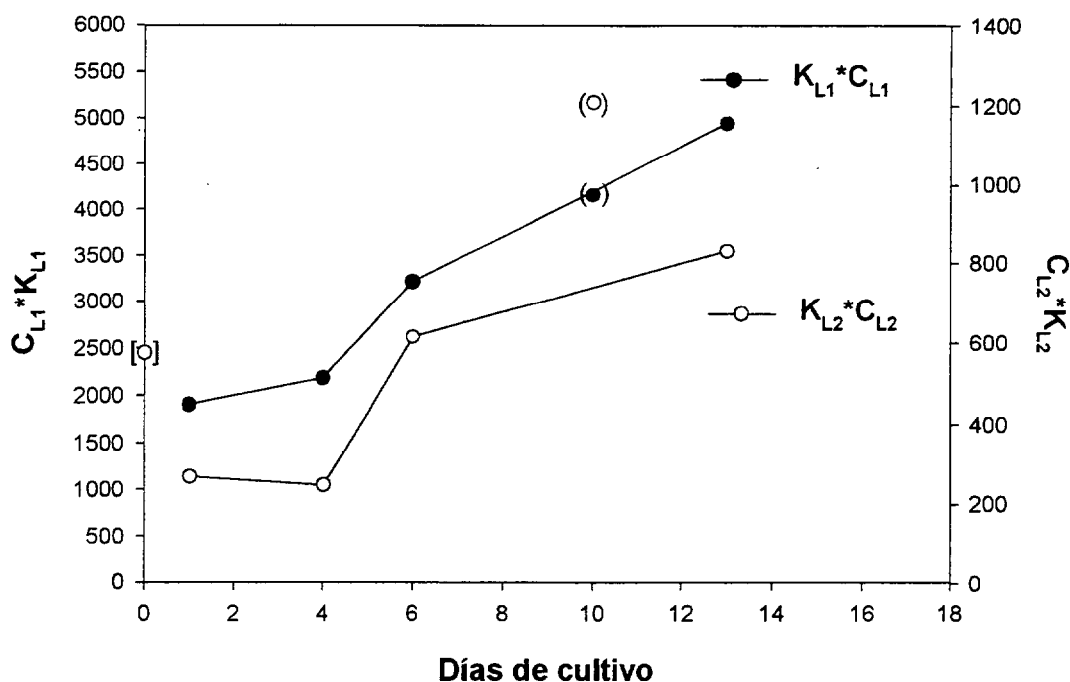


Figura 119. Muestra la evolución de la fuerza complejante a lo largo del experimento. Entre paréntesis los datos obtenidos con $\alpha_{\text{Cocatecol}}=760$. Entre corchetes el dato obtenido con un coeficiente $\alpha_{\text{Cocatecol}}=1160$.

En cuanto a las evoluciones generales de los parámetros de complejación durante el cultivo, la figura 119 muestra un incremento en la fuerza complejante de ambos tipos de ligandos estimados a lo largo del cultivo (L_1 está cerca de triplicar este parámetro y L_2 de cuadruplicarlo).

El incremento en la fuerza complejante de L_1 parece venir dado por una pequeña exudación (alrededor de 2 nM) de un complejo de mayor constante de estabilidad condicional que los preexistentes (en torno a 12.2). Esto indica el aumento de los dos parámetros de complejación de L_1 con la evolución del cultivo que muestran las figuras 120 y 121.



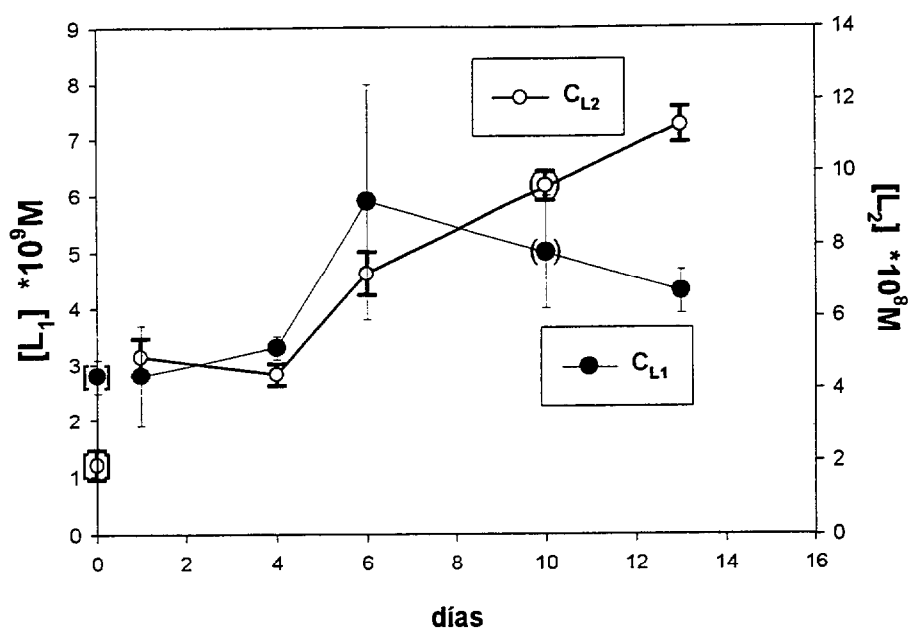


Figura 120. Evolución de la concentración total de los dos tipos de ligandos estimados. . Entre paréntesis el dato obtenido con $\alpha_{\text{Cucatecol}}=760$. Entre corchetes el dato obtenido con $\alpha_{\text{Cucatecol}}=1160$.

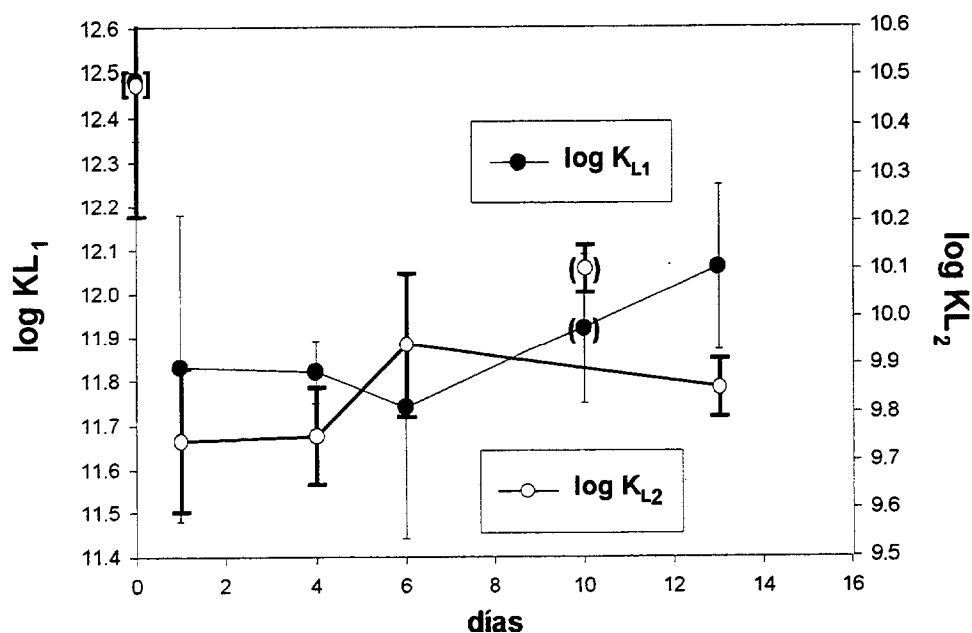


Figura 121. Evolución de la constante de estabilidad condicional de los dos tipos de ligandos estimados. . Entre paréntesis el dato obtenido con $\alpha_{\text{Cucatecol}}=760$. Entre corchetes el dato obtenido con $\alpha_{\text{Cucatecol}}=1160$.

Para el caso de L_2 el incremento de la concentración de ligando aparece muy evidente (sobre 60 nM, alcanzándose una concentración más del doble de la original) y el incremento de K_{L2} es mucho menor. De estos datos puede deducirse una excreción por parte de *Phaeodactylum tricornutum* en este cultivo de un ligando orgánico de constante de estabilidad condicional en el intervalo 9.9-10 (teniendo en cuenta la ventana espectral utilizada).

La adición de cobre al medio en valores por encima de la capacidad complejante de los ligandos de mayor constante de estabilidad condicional provoca que a pesar del incremento de su capacidad complejante, el valor de pCu permanezca en valores bajos a lo largo del cultivo (figura 122).

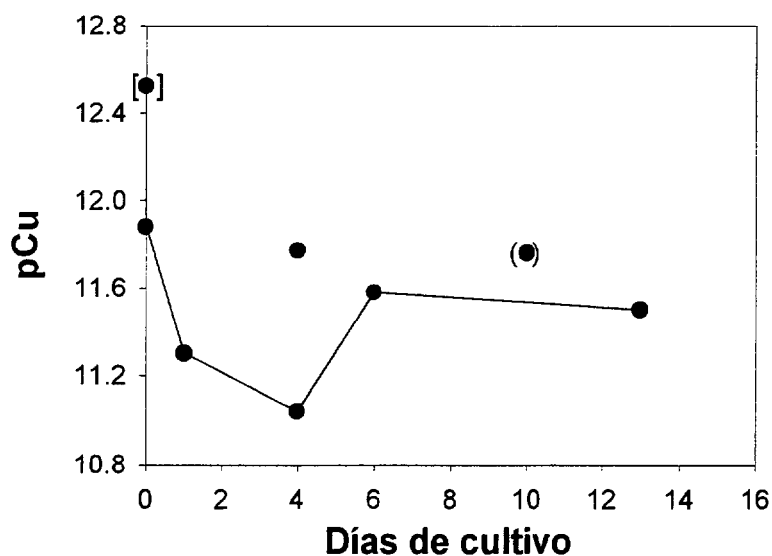


Figura 122. Evolución de pCu con el cultivo. Para el medio original aparecen tanto el valor obtenido (entre corchetes $\alpha_{\text{Cu catecol}}=1180$), como el que tendría ese medio con una concentración de cobre total en disolución igual a la del día uno. Aparecen para el dato del día 4 tanto el valor calculado como el dato que se obtendría con una concentración de cobre igual a la del día 6 (este último unido a la línea). Entre paréntesis el obtenido con $\alpha_{\text{Cu catecol}}=760$.

La mayor presencia de Cu(II) no provoca un cambio en la evolución de la concentración celular del cultivo, por lo que es de suponer que el valor de pCu mínimo que se alcanza el día 4 (11.04 si se considera una concentración de cobre total disuelto de 5.2 nM) no resulta tóxico al cultivo. A pesar del bajo nivel de pCu, el cultivo no logra provocar una fuerte y rápida complejación de forma que este valor aumente de forma significativa. Esto supondría que la excreción de ligandos por parte de la diatomea no es directamente proporcional a la concentración de cobre iónico libre, es decir, que el alga no posee un mecanismo "inteligente" que le permite secretar ligandos en función de las concentraciones ambientales de los elementos tóxicos, sino que el mecanismo que origina la liberación de exudados debe tener más que ver con la excreción procedente de residuos del metabolismo celular.

El gráfico que muestra la especiación cúprica en el cultivo deja ver la creciente importancia de la adsorción a medida que aumenta el número de células en el medio (ver figura 123).

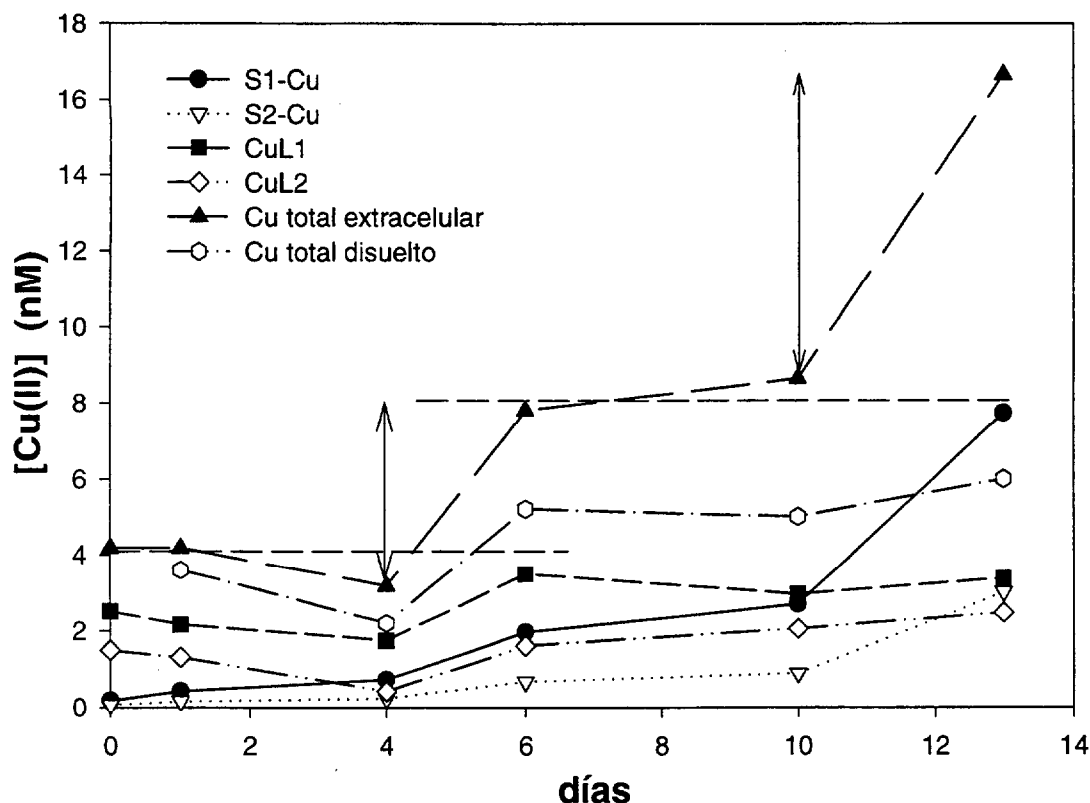


Figura 123. Evolución de las concentraciones de las distintas especies cúpricas enlazadas tanto por los distintos ligandos del medio (L_1 , L_2) como por los grupos funcionales de la superficie de la diatomea (S_1 , S_2) a lo largo del cultivo. Las flechas verticales marcan los incrementos de cobre que aparecen en el medio por adición al medio de cultivo. Las líneas horizontales discontinuas marcan las concentraciones totales extracelulares entre los días 1 y 4 y entre los días 6 y 10.

Al igual que en los casos precedentes, el gran incremento en el número de células presentes en el cultivo origina una importancia creciente de la adsorción frente a la complejación, a pesar del importante incremento de la fuerza complejante de los dos tipos de ligandos en disolución considerados. Pero la figura 123 muestra como en este caso el proceso de irradiación ha provocado el descenso inicial de la importancia de la complejación (menos del 85% del cobre extracelular del día uno aparece como complejado a pesar de la baja concentración inicial de diatomeas).

Los dos incrementos de cobre en el medio resultan interesantes para ver como afecta a la especiación del cobre la proporción entre las distintas especies susceptibles de complejarlo en el medio. La cantidad de cobre que existe en el medio el día cuatro es aproximadamente igual a la concentración de ligando disuelto del tipo L_1 (sobre 4 nM). La gran constante de estabilidad condicional de los ligandos incluidos en este grupo hacen que casi un 60 % del cobre en el medio permanezca unido a estos ligandos, y el incremento en unos 4 nM de la concentración de cobre en el medio se ve en gran medida complejado por este tipo de ligandos (su concentración aumenta hasta 3.5 nM y

sigue siendo la especie mayoritaria). Los ligandos en disolución de menor constante de estabilidad también tienen importancia en amortiguar el efecto de esta adición de cobre, ya que aumentan su importancia porcentual significativamente (ver figura 124).

El día 10 (previo a la segunda adición de Cu(II)), la especie mayoritaria continuaba siendo el cobre complejado por los ligandos de mayor constante de estabilidad a pesar de que su capacidad complejante es mucho menor que la de los grupos funcionales superficiales de mayor constante de estabilidad (5 nM de L₁ frente a 41 nM de S₁). El incremento en 7 nM de la concentración de cobre en el medio, hasta unos 16 nM (muy por encima de la capacidad complejante de L₁), es en este caso retirado de las formas inorgánicas en disolución principalmente por los grupos de la superficie del alga con mayor constante de estabilidad (5 de los 7 nM añadidos), ya que los ligandos en disolución de mayor constante de estabilidad se encuentran enlazados con cobre en un 80% de su concentración y son incapaces de asimilar una adición cúprica de esta magnitud.

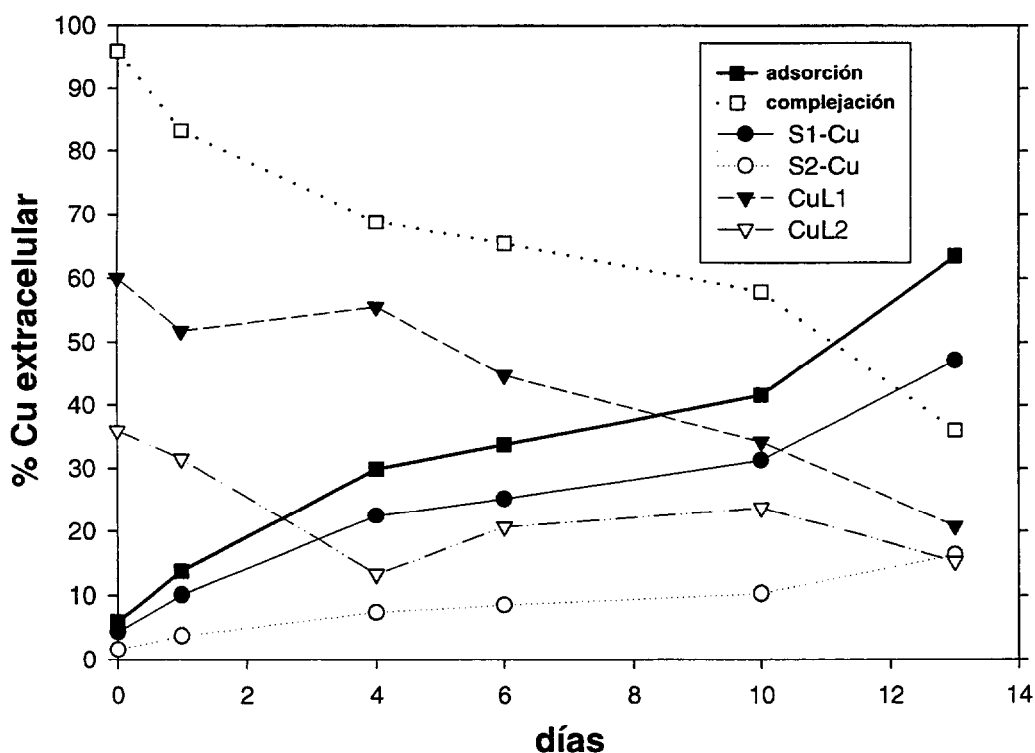


Figura 124. Porcentajes de cobre complejado con los ligandos orgánicos disueltos del medio y de cobre adsorbido sobre la superficie de *Phaeodactylum tricornutum*, respecto del cobre no incluido, a lo largo de la evolución del cultivo.

días	$\Gamma_{\max,1}$ (*10 ⁻⁹ M)	Fuerza complejante adsorción. Tipo 1	Fuerza complejante complejación. Tipo 1	$\Gamma_{\max,2}$ (*10 ⁻⁸ M)	Fuerza complejante adsorción. Tipo 2	Fuerza complejante complejación. Tipo 2
1	1.2	77	1900	2.2	22	270
13	48	3100	4940	87	892	830

Tabla XXI. Valores de las capacidades adsorptivas de las células de *Phaeodactylum tricornutum* al comienzo del cultivo y el día trece. Aparecen los datos de las fuerzas complejantes de los dos tipos de grupos superficiales considerados, así como de los dos tipos de ligandos disueltos del medio

Por lo tanto una presencia de cobre en el medio 3 o 4 veces la concentración de L_1 hará que este metal sea muy accesible para las superficies biológicas con el riesgo que supone debido al comportamiento tóxico de este metal a elevadas concentraciones intracelulares.

6.5 ASPECTOS RELEVANTES DE LA COMPLEJACION

Muy pocos trabajos existen sobre la evolución en cultivos de la capacidad complejante y los que hay lo son en condiciones muy variadas que dificultan la comparación, como son el crecimiento en turbidostatos (Zhou y Wargensky, 1989), cultivos con altas concentraciones iniciales de metales traza (Seritti, *et al.*, 1986) o muy elevadas concentraciones celulares generadas por la utilización de medios de cultivo muy concentrados (McKnight y Morel, 1979). No existen trabajos con el estudio por separado de dos tipos de ligandos en cultivos. Muchos experimentos se han desarrollado con ventanas espectrales inadecuadas por la poca sensibilidad del método utilizado o por la mala elección de alguna variable, y esto en ocasiones hace sacar conclusiones totalmente opuestas a distintos autores, como es el caso descrito sobre la posible excreción de exudados en la fase exponencial del crecimiento por parte del plancton.

La excreción de exudados por parte de la mayoría de las algas del medio, tanto eucariotas como procariotas, ya fue establecida por McKnight y Morel (1979) trabajando con 21 especies diferentes. De este trabajo también se deduce que las células procariotas son las responsables de la aparición de los compuestos de mayor constante de estabilidad condicional.

Van den Berg y Donat (1992) encuentran una relación lineal entre $\log \delta$ (definido δ como el centro de la ventana espectral utilizada, que para el caso de la voltametría

catódica de redisolución es el logaritmo del coeficiente alfa del metal de la valoración metálica y el complejante artificial añadido al medio) y $\log \alpha_{MeL}$ (la proporción hallada entre el metal complejado y el iónico libre en el medio). Esta relación resulta independiente del método utilizado (voltametría anódica o catódica de redisolución), del metal empleado en la valoración y del medio estudiado, y además de pendiente igual a la unidad. Esto supone que en los medios acuáticos naturales debe existir un amplio intervalo de ligandos naturales que ocupen prácticamente todo el espectro de posibles valores de constante de estabilidad condicional. Además estos compuestos no deben presentar una alta especificidad por un metal concreto, ya que esta relación se encuentra para el caso de distintos metales. Esta última hipótesis se ve apoyada por las altas constantes de estabilidad condicional respecto del cobre que presentan los compuestos orgánicos disueltos responsables de la mayor parte de la complejación orgánica del zinc y del hierro (sideróforos) en medios acuáticos (Xue *et al.*, 1995; McKnight y Morel, 1980). Todo lo descrito refuerza la necesidad de comenzar a estudiar en cultivos la capacidad complejante del medio definiendo el mayor número posible de compuestos.

Además de estas relaciones generales, se ha obtenido para el cálculo de la capacidad complejante en un medio marino a diferentes ventanas espectrales (van den Berg *et al.*, 1990), un descenso de la concentración de ligandos del medio cuanto mayor es la constante de estabilidad condicional calculada. Esto supondría que los ligandos del medio forman un espectro prácticamente continuo de valores de constante de estabilidad condicional, y que la concentración de un tipo de ligandos determinado es menor cuanto mayor sea la constante de estabilidad condicional respecto del cobre de su grupo funcional susceptible de complejar a este metal. Esta hipótesis debe ser tomada con reservas en función de los resultados obtenidos a distintas ventanas espectrales en el caso del agua irradiada previamente, donde se aprecian posibles discontinuidades en la distribución.

En cuanto al comportamiento de los dos tipos de ligandos observado durante el desarrollo de los cultivos, se pueden deducir las siguientes conclusiones.

El hecho más evidente que resulta de la comparación entre los diversos cultivos es que la fuerza complejante de L_2 siempre aumenta. Por otro lado los valores de $[L_2]$ correspondientes a tomas de muestras en la fase inicial del desarrollo del cultivo, son muy parecidos a los del medio inicial y apenas crecen hasta el día 4-6. Tras esto aparecen incrementos bien definidos en todos los cultivos durante la fase de crecimiento logarítmico. La fuerza complejante se ve incrementada en continuo en todos los

cultivos. Esto hace pensar en que la liberación de exudados de baja constante de estabilidad condicional es realizado por *Phaeodactylum tricorutum* en continuo sea cual sea el medio de cultivo en que se encuentre, y durante todas las fases de crecimiento. Un cultivo como el realizado en presencia de EDTA (lo que supone una fuerte complejación de las especies metálicas tóxicas del medio), con una pequeña concentración de cobre iónico libre (la especie susceptible de atravesar la membrana y que resulta tóxica a concentraciones elevadas), experimenta un gran incremento en la concentración de este ligando de menor constante de estabilidad condicional, mientras que el cultivo con menor capacidad complejante, el de agua de mar irradiada, no experimenta un crecimiento en el valor de la concentración de L_2 especialmente elevado en unidades de moles exudados por célula que aparecen en el cultivo. Esto elimina la posibilidad de que la excreción de L_2 venga dada por un mecanismo de respuesta a concentraciones elevadas de especies tóxicas, sino que más bien parece ser este tipo de ligando un producto de excreción del metabolismo de la diatomea. No queda muy claro en este trabajo si los compuestos excretados por parte del alga, son exactamente los mismos en todos los cultivos. La comparación entre los diversos medios de cultivo de las constantes de estabilidad condicional calculadas debe hacerse teniendo en cuenta que esta constante depende de la composición del medio, y si bien, debido a la disolución tamponadora utilizada, todas corresponden a un valor de pH_{NBS} de 7.8, la fuerza iónica no será exactamente la misma en todas las muestras. Si se calcula la cantidad y la constante de estabilidad que deben tener los aportes al medio de L_2 para que los parámetros de complejación tomen los valores que alcanzan al final, los valores obtenidos en los cultivos de agua de mar artificial, agua oceánica superficial, y la irradiada coinciden en el intervalo: 10.0-10.2; mientras que el aporte al medio en el cultivo de agua oceánica profunda parece ser de unos ligandos de constante de estabilidad ponderada ligeramente mayor, entre 10.4 y 10.6 (tal vez este valor mayor sea debido a la menor salinidad que poseen las aguas de esta profundidad respecto de las superficiales). No puede excluirse en este último caso que, al igual que sucede con los ligandos de mayor constante de estabilidad, una fracción de las moléculas pertenecientes a este grupo se haya fotodegradado alterando el peso estadístico de los ligandos orgánicos que permanecen en disolución.

En sus trabajos, tanto Moffett (Moffett *et al.*, 1990; Moffett, 1995), como Coale y Bruland (1988, 1990) sugieren una naturaleza refractaria y de origen no biológico de los ligandos de menor constante de estabilidad. De este trabajo se deduce que esta hipótesis,

si bien puede ser válida para una importante fracción de los ligandos en medios naturales de baja constante de estabilidad condicional, una parte significativa de estos compuestos, al menos en la capa superficial oceánica, debe provenir de las diatomeas u otras especies algales presentes en el medio.

El comportamiento de los parámetros de complejación del tipo de ligando de mayor constante de estabilidad condicional (L_1) ofrece mayores dudas en su interpretación, tanto por el mayor error que lleva asociado su cálculo, como por las tendencias muy diferentes encontradas. En el estudio llevado a cabo en agua oceánica superficial parece existir un evidente aporte de ligandos de una constante de estabilidad condicional ponderada en torno a 11.9-12 al medio por parte de la diatomea (sobre 3-4 nM durante la fase de crecimiento exponencial). En el estudio llevado a cabo en agua de mar irradiada también parece existir un pequeño aporte de ligandos de una constante de estabilidad condicional algo mayor (12.05-12.2) por parte de *Phaeodactylum tricorutum* (sobre 2 nM). En el caso del medio artificial el número de puntos estudiados es muy pequeño y existe la duda de si el aporte de este tipo de ligando es nulo o como mucho de una cantidad en torno a 1 nM de una constante de estabilidad condicional próxima a la estimada para los casos anteriores. En estos tres cultivos citados, el impacto en la concentración de L_1 es mayor en los casos en que la concentración celular que alcanza el cultivo es mayor. El resultado del agua de origen profundo es totalmente diferente ya que existe un descenso en la presencia de L_1 en el medio de cultivo, y como se ha comentado previamente debe relacionarse este hecho con el origen del medio. La desaparición de ligando de tipo L_1 en el agua de origen oceánico profundo emplazada en una cámara de cultivo, no puede excluir la posibilidad de que la diatomea se encuentre excretando compuestos como los que aparecen en los otros tres ejemplos, y que esos 2-3 nM ($K_{L_1} \sim 12.3$) que quedan finalmente en el medio sean un exudado no fotodegradable de la diatomea. De esto puede deducirse una posible excreción por parte de *Phaeodactylum tricorutum* no solamente del compuesto de estabilidad condicional baja reseñado, sino además de unos compuestos de estabilidad condicional de media ponderada en el intervalo 12-12.3 (pH=7.8), responsables de la mayor parte de la complejación del cobre disuelto en el medio siempre que su concentración se mantenga en los valores bajos propios de aguas oceánicas (0.5-3 nM Cu total disuelto).

El hecho de que las diatomeas sean capaces de excretar compuestos orgánicos al medio con una alta constante de estabilidad condicional por el cobre, debe resultar de

una importancia fundamental en la especiación del mismo, debido a la gran presencia que tienen las diatomeas dentro de las poblaciones algales oceánicas (son las poblaciones mayoritarias en zonas tan importantes como las de afloramiento y plataformas continentales; Werner, 1977). Esta excreción no parece ser respuesta a concentraciones externas, ya que se realiza con concentraciones de ion cúprico libre muy variadas ($pCu=11-12.5$) y que no deben resultar tóxicas a la diatomea, aunque no es posible determinar si han existido altas concentraciones de otro metal diferente. No resulta probable este caso debido al diverso origen de los medios utilizados y a la exhaustiva limpieza de los recipientes utilizados, que hace que la concentración de cobre de comienzo del cultivo sea siempre sólo 1 ó 2 nM mayor que al comienzo (aporte de las disoluciones de hierro, nutrientes y vitaminas).

También resulta muy importante para la comprensión de la complejación del medio la comparación de las constantes de estabilidad condicional de los exudados y de la superficie del alga (con la reserva natural que se debe tomar al ser técnicas diferentes y dotadas de una mínima diferencia entre sus ventanas espectrales). Como ya se observó en las medidas llevadas a cabo con voltametría anódica, los exudados liberados por parte de *Phaeodactylum tricornutum* son más afines por el cobre que los grupos superficiales del alga. Con la voltametría catódica, además de demostrar la existencia y complejidad de esta liberación de materia orgánica complejante, se ha podido establecer que liberan exudados de mayor constante de estabilidad (promediada) que la media ponderada de los grupos superficiales de la diatomea de mayor constante de afinidad por el cobre. Asimismo, los grupos exudados menos afines también son de mayor constante de estabilidad que los del exterior de la diatomea. Esto hará que la tendencia que tomará el medio ante la presencia de esta diatomea sea la de mantener el cobre en disolución complejoado orgánicamente, y que deje de ser accesible en gran medida no sólo a los complejantes inorgánicos, sino además a las superficies biológicas. El último medio estudiado también evidencia la importancia de la relación en medios naturales entre las concentraciones de metales en disolución y de los ligandos de alta constante de estabilidad, ya que una alta concentración total de metal (caso de aguas costeras) puede hacer que los iones cúpricos sean accesibles a las superficies biológicas a pesar de la afinidad que puedan poseer los ligandos en disolución. Moffett (1995) ya apunta incrementos en la concentración del ion cúprico en aguas en las que la concentración de cobre total en disolución supera a la de L_1 , aunque en este trabajo no se calcula la

concentración de L_2 y es posible que se esté sobreestimando ligeramente la concentración de Cu^{2+} .

La hipótesis de que si una concentración tóxica para la diatomea ($[Cu^{2+}] > 10^{-11}$ M para diatomeas según McKnight y Morel, 79) haría activar una mayor excreción de ligandos por parte del alga, como apuntan numerosos autores (Gerringa *et al.*, 1995; Coale y Bruland, 1988, 1990), no queda demostrada ni eliminada en este trabajo. Pero sí queda demostrado que este proceso “inteligente” de respuesta del alga a las condiciones ambientales no es en ningún caso la causa única de la liberación de exudados por parte de *Phaeodactylum tricorutum*, como apuntan esos mismos autores. El trabajo de Zhou y Wangersky (1989) apoya en parte esta tesis ya que encuentra en un cultivo en turbidostato de *Phaeodactylum tricorutum* un mayor crecimiento de la capacidad complejante durante periodos de iluminación que durante periodos de oscuridad, en presencia de una concentración supuestamente constante de elementos traza (no reflejan concentraciones en su trabajo). Las condiciones del estudio impidieron obtener concentraciones de ligandos exudados por la constante renovación del medio, y sólo se obtuvieron parámetros de complejación para un solo tipo de ligando. Pero sí que se determinó que la diatomea excreta algún compuesto como consecuencia del proceso de fotosíntesis que experimenta en condiciones de luminosidad, y no de las condiciones ambientales.

El caso del cultivo en el que se utilizó agua irradiada demuestra la importancia de intentar trabajar un mismo medio con varias ventanas espectrales para tener una descripción aproximada del rango completo de ligandos existentes en el medio sea cual sea su afinidad por el metal de estudio. Aunque esto resulta muy difícil, por la limitación de tiempo y de cantidad de medio, en el estudio de la evolución de capacidades complejantes en cultivos.

De igual forma no queda duda de la necesidad de trabajar con un método dotado de un límite de sensibilidad lo suficientemente bajo para que sea posible detectar dos tipos de ligandos al menos, y en bajas concentraciones. Esto queda reflejado en la incapacidad encontrada previamente para encontrar exudados de alta constante de estabilidad cuando se ha utilizado la técnica de voltametría anódica de redisolución casi en la totalidad de los casos. Hasta el momento todos los estudios en cultivo se habían resuelto con la determinación de una sola constante de estabilidad condicional, con lo que se decía que el alga aportaba al medio exudados en una determinada concentración y de una constante de estabilidad fijada. El hecho de haber encontrado estos dos tipos de

ligandos en medios de origen diferente y de que *Phaeodactylum tricornerutum* ha demostrado liberar compuestos orgánicos al medio en dos cultivos al menos de dos diferentes naturalezas (es decir, compuestos con diferente constante de estabilidad condicional), demuestra que las algas no sólo aportan un determinado ligando al medio dependiendo de la especie, sino que su metabolismo origina que aporten al medio un espectro variado de compuestos de distinta afinidad por los elementos traza del medio, y al parecer, en todas las fases de crecimiento.

Mucho se ha especulado con la posible toxicidad para el fitoplancton de las aguas de origen profundo que alcanzan la superficie en las zonas de afloramiento, debido a la mayor concentración de elementos tóxicos que presentan estas aguas y a la menor capacidad complejante que se les supone. Este fenómeno se debe ver agravado ante la aparente confirmación de la hipótesis de Moffett (Moffett *et al.*, 1990; Moffett, 1995) de que la materia orgánica de aguas profundas con alta constante de estabilidad condicional por el cobre es susceptible de degradarse en superficie. Pero si se tiene en cuenta que la gran mayoría de la producción primaria en estas áreas se debe a la presencia de diatomeas (Werner, 1979), capaces como se deduce de este trabajo de excretar un espectro de moléculas complejantes de elementos traza, la toxicidad debido a procesos de afloramiento debe reducirse considerablemente. Será importante en estas áreas determinar la relación de especies planctónicas en el medio, ya que la concentración de ion cúprico que resulta tóxica es función de la especie, así como la constante de estabilidad condicional de los exudados liberados al medio (como se ha podido apreciar en los experimentos realizados con voltametría de redisolución anódica).

El cálculo aproximado de la concentración de la fracción de cobre adsorbida sobre la superficie de la diatomea da idea además de la mínima importancia del requerimiento celular cúprico en condiciones experimentales de baja presencia de cobre total en disolución (nanomolar) y baja concentración de ion libre en disolución ($pCu > 11$ en todos los experimentos). Condiciones muy raramente empleadas experimentalmente y que son mucho más representativas de las características reales del océano.

CONCLUSIONES

La utilización de técnicas voltamétricas para la determinación de la especiación metálica en el medio marino en presencia de suspensiones celulares de las diatomeas *Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira weissflogii* ha permitido la obtención de las siguientes conclusiones:

1. La heterogeneidad de los grupos funcionales capaces de complejar al cobre y al plomo tanto de la superficie de las diatomeas de estudio como de los ligandos naturales presentes en disolución en aguas marinas, como de los exudados que dichas diatomeas liberan al agua oceánica. De este hecho se desprende la necesidad de la utilización de una técnica lo suficientemente sensible y en condiciones limpias, como para resolver los distintos tipos de ligandos existentes a pesar de la baja concentración en que se encuentran aquellos de mayor afinidad por los metales traza.
2. El insuficiente peso estadístico otorgado a la obtención de los parámetros de adsorción o complejación de los ligandos de mayor constante de estabilidad, por los métodos descritos en la bibliografía previamente. La combinación de las linealizaciones de la isoterma de Langmuir ya descritas por otros autores, da lugar a la obtención de un método iterativo que mejora el cálculo de los parámetros de complejación o adsorción de este tipo de ligandos.
3. El gran parecido de las características adsorptivas de las superficies de *Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira weissflogii* tanto para el cobre como para el plomo (ver tabla XXIII), así como la gran similitud de sus propiedades ácido-base superficiales (tabla X) sugieren una composición muy similar de la región exterior de la pared celular de ambas diatomeas.
4. La gran dependencia de la reacción de adsorción de metales traza sobre diatomeas con las propiedades físico-químicas del medio (temperatura, salinidad, pH, concentración de otros cationes). El hecho de que una alta concentración de protones o de cationes mayoritarios en el medio disminuya la concentración de la fracción metálica adsorbida implica una naturaleza doble de la reacción de adsorción. Puede producirse por desprotonación de un grupo funcional o por intercambio iónico con el mismo.

5. Los distintos grupos funcionales de las superficies de ambas algas son bastante específicos por un determinado metal traza ya que adiciones a una gran concentración de otro metal no desplaza de una forma significativa al ya adsorbido.

6. Los ligandos que exudan las diatomeas estudiadas no resultan ser tan similares como lo son sus superficies ya que sus parámetros de complejación difieren bastante tanto para el caso del cobre ($K' = 9.3 / 9.8$), como para el del plomo ($K' = 9.8 / 10$).

7. Estos exudados resultan tener una total especificidad por el metal respecto del cual se define la capacidad complejante. También presentan, si se considera un modelo homogéneo de la superficie de la diatomea, una mayor afinidad tanto por el cobre como por el plomo que la de los grupos funcionales de la superficie de las diatomeas

8. La presencia de diatomeas va a incidir en el medio marino, debido a las características comparadas de sus superficies y sus exudados, en un incremento de la importancia de la complejación orgánica disuelta respecto de la adsorción en la especiación del cobre y del plomo en disolución. La tasa de liberación de exudados por célula es mayor para los compuestos capaces de complejar al cobre que para los afines al plomo en el caso de las dos diatomeas estudiadas, de igual modo que el agua oceánica tiene una mayor capacidad complejante por el cobre que por el plomo.

9. El diferente comportamiento que poseen los ligandos en disolución y los grupos funcionales de la superficie de ambas diatomeas frente al pH y ante la presencia de otros metales traza en el medio, así como sus distintas afinidades por los metales en disolución sugieren una distinta naturaleza de las distribuciones de los grupos funcionales capaces de complejar a los metales traza de la materia orgánica disuelta y de la pared celular de diatomeas.

10. La posibilidad de obtener, mediante el empleo de la voltametría catódica de redisolución en el estudio de las capacidades complejantes del agua de mar, la existencia en disolución en aguas oceánicas de diversas profundidades de un espectro de ligandos disueltos naturales de distintas afinidades por el cobre.

11. En medios naturales, la menor concentración celular total respecto de la utilizada en estos experimentos, y la presencia de ligandos en disolución de alta afinidad por los metales en disolución (como queda de manifiesto mediante el empleo de la técnica de voltametría de redisolución catódica), debe provocar un predominio de la complejación sobre la adsorción en la especiación del cobre de varios órdenes de magnitud. Esto reduce drásticamente el posible efecto que el ion cúprico pueda tener sobre las superficies biológicas.

12. La constatación de la liberación por parte de *Phaeodactylum tricornutum* de un espectro de distintos exudados con capacidad de complejar al cobre en disolución, independientemente de la fase de crecimiento del cultivo y del medio en que se encuentre. Esta liberación no responde, al menos de forma exclusiva, a una alta concentración en el medio de ion cúprico.

13. La enorme heterogeneidad de los ligandos orgánicos naturales, tanto en la columna de agua en el océano, como de los compuestos exudados por las diferentes especies planctónicas.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson, D. M. and Morel F.M.M. (1982). The influence of aqueous iron chemistry on the uptake of iron by the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Limnology and Oceanography*. Vol. 27, 789-813.
- Anderson, D. M. and Morel F.M.M. (1978). Copper sensitivity of *Gonyaulax tamarensis*. *Limnology and Oceanography*. Vol. 23, 283-295.
- Apte S.C., Gardner M.J. and Ravenscroft J.E. (1988). An evaluation of voltammetric titration procedures for the determination of trace metal complexation in natural waters by use of computer simulation. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 212, 1-21.
- Boyle E.A., Chapnick S.D. and Shen G.T. (1986). Temporal variability of lead in the western North Atlantic Ocean. *Journal of Geophysical Research*. Vol. 91, 8573-8593.
- Brand L.E., Sunda W.G. and Guillard R.R.L. (1983). Limitation of marine phytoplankton reproductive rates by zinc, manganese and iron. *Limnology and Oceanography*. Vol. 28, 1182-1198.
- Brand L.E., Sunda W.G. and Guillard R.R.L. (1986). Reduction of marine phytoplankton reproduction rates by copper and cadmium. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* Vol. 96, 225-250.
- Bruland K.W., Donat J.R. and Hutchins D.A. 1991. Interactive influences of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters. *Limnology and Oceanography*. Vol. 36, 1555-1577.
- Buckley P.J.M. and van den Berg C.M.G. (1986). *Marine Chemistry*. Vol. 19, 281-296.
- Campos M.L.A.M. and van den Berg C.M.G. (1994). Determination of copper complexation in sea water by cathodic stripping voltammetry and ligand competition with salicylaldoxime. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 284, 481-496.

Capodaglio G., Coale K.H. and Bruland K.W. (1990). Lead speciation in surface waters of the Eastern North Pacific. *Marine Chemistry*. Vol. 29, 221-233.

Capodaglio G., Scarponi G., Toscano G., Barbante C. And Cescon P. (1995). Speciation of trace metals in seawater by anodic stripping voltammetry: Critical analytical steps. *Journal of Analytical Chemistry*. Vol. 351, 386-392.

Coale K.H. (1991). Effects of iron, manganese, copper and zinc enrichments on productivity and biomass in the subarctic Pacific. *Limnology and Oceanography*. Vol. 36(8), 1851-1864.

Coale K.H. and Bruland K.W. (1990). Spatial and temporal variability in copper complexation in the North Pacific. *Deep-Sea Research*. Vol. 37(2), 317-336.

Coale K.H. and Bruland K.W. (1988). Copper complexation in the Northeast Pacific. *Limnology and Oceanography*. Vol. 33(5), 1084-1101.

Crank, J. (1976). *The mathematics of diffusion*. Oxford University Press: New York.

Crist R.H., Martin J.R., Carr D., Watson J.R. and Clarke H.J. (1994) Interaction of metals and protons with algae. 4. Ion-exchange vs adsorption models and a reassessment of Scatchard plots; Ion-exchange rates and equilibria compared with calcium alginate. *Environmental Science and Technology*. Vol. 28(11), 1859-1866.

Crist R.H., Martin J.R., Guptill P.W., and Eslinger J.M. (1990) Interaction of metals and protons with algae. 2. Ion exchange in adsorption and metal displacement by protons. *Environmental Science and Technology*. Vol. 24(3), 337-342.

Crist R.H., Oberholser K., Schwartz D., Marzoff J., Rider D. and Crist D.R. (1988). Interactions of metals and protons with algae. *Environmental Science and Technology*. Vol. 22, 755-760.

- Crist R.H., Oberholser K., McGarrity J., Crist D.R., Johnson J.K. and Brittsan. (1992). Interactions of metals and protons with algae. 3. Marine algae, with emphasis on lead and aluminium. *Environmental Science and Technology*. Vol. 26(3), 496-502.
- Darley W.M. (1979) Biochemical composition. In: D. Werner (Editor), *The biology of diatoms*. Blackwell pp. 198-223.
- Donat J.R. and van den Berg C.M.G. (1992). A new cathodic stripping voltammetric method for determining organic copper complexation in seawater. *Marine Chemistry*. Vol. 38, 69-90.
- Flegal A.R. and Patterson C.C. (1983). Vertical concentration profiles of lead in the central Pacific at 15° N and 20° S. *Earth Planet. Sci. Lett.* Vol. 64, 19-32.
- Gadd G.M. (1988). Accumulation of metals by microorganisms and algae. In: H.J. Rehm (Editor), *Biotechnology*, 6b. VCH, Weinheim, pp. 401-433.
- Gerringa L.J.A., Herman P.M.J. and Poortvliet T.C.W. (1995). Comparison of the linear Van den Berg/Ruzic transformation and a non-linear fit of the Langmuir isotherm applied to Cu speciation data in the estuarine environment. *Marine Chemistry*. Vol. 48, 131-142.
- Gerringa L.J.A., Rijstenbil J.W., Poortvliet T.C.W., Van Drie J. and Schot M.C. (1995). Speciation of copper and responses of the marine diatom *Ditylum brightwellii* upon increasing copper concentrations. *Aquatic Toxicology*. Vol. 31, 77-90.
- Gonçalves M.L.S., Sigg L. Reutlinger M. and Stumm W. (1987). Metal ion binding by biological surfaces: voltammetric assessments in the presence of bacteria. *The Science of the Total Environment*. Vol. 60, 105-119.
- González Dávila, M. (1995). The role of phytoplankton cells on the control of heavy metal concentration in seawater. *Marine Chemistry*. Vol.48, 215-236.

Bibliografía

González Dávila M. and Millero F.J. (1990). The adsorption of copper to chitin in seawater. *Geochimica and Cosmochimica Acta*. Vol.54, 761-768.

González Dávila M., Santana Casiano J.M., Pérez Peña J. and Millero F.J. (1995). Binding of Cu(II) to the surface and exudates of the alga *Dunaliella tertiolecta* in seawater. *Environmental Science and Technology*. Vol. 29, 289-301.

Guillard R.R.L. and Ryther J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* Vol. 8, 229-239.

Harris P.O. and Ramelow G.J. (1990). Binding of metal ions by particulate biomass derived from *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda*. *Environmental Science and Technology*. Vol. 24, 220-228.

Harrison G.I. and Morel F.M.M. (1983). Antagonism between cadmium and iron in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *J. Phycol.* Vol. 19, 495-507.

Hart B.A., Bertram P.E. and Scaife B.D. (1979). Cadmium transport by *Chlorella pyrenoidosa*. *Environmental Research*. Vol. 18, 327-335.

Hering J.G. and Morel F.M.M. (1988). Kinetics of trace metal complexation: role of alkaline-earth metals. *Environmental Science and Technology*. Vol. 22, 1469-1478.

Huang C., Huang C.P. and Morehart A.L. (1990). The removal of Cu(II) from dilute aqueous solutions by *S. Serevisiae*. *Water Research*. Vol. 24, 433-439.

Huang C., Huang C.P. and Morehart A.L. (1991). Proton competition in Cu(II) adsorption by fungal mycelia. *Water Research*. Vol. 25, 1365-1375.

Imber B.E. and Robinson M.G. (1983). Complexation of zinc by exudates of *Thalassiosira fluviatilis* grown in culture. *Marine Chemistry*. Vol. 14, 31-41.

- Khummongkol D., Canterford G.S. and Fryer C. (1982). Accumulation of heavy metals in unicellular algae. *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 4, 2643-2660.
- Kiefer E., Sigg L. and Schosseler P. (1997). Chemical and spectroscopic characterization of algae surfaces. *Environmental Science and Technology.* Vol. 22, 759-764.
- Langston W.J. and Bryan G.W. (1984). The relationship between metal speciation in the environment and bioaccumulation in aquatic organism. In: C.J.M. Kramer and J.C. Duinker (Editors), *Complexation of Trace Metals in Natural Waters.* Martinus Nijhoff/Junk Publishers, The Hague, 375-392.
- Martell A.E. and Smith R.M. (1977). *Critical stability constants.* Vol. 3. Plenum Press, New York.
- Martin J.H., Coale K.H., Johnson K.S., Fitzwater S.E., Gordon R.M., Tanner S.J. Hunter C.N., Elrod V.A., Nowicki J.L., Coley T.L., Barber R.T., Lindley S., Watson A.J., Van Scoy K., Law C.S., Liddicoat M.I., Ling R., Stanton T., Stockel J., Collins C., Anderson A., Bidigare R., Ondrusek M., Latasa M., Millero F.J., Lee K., Yao W., Zhang J.Z., Friederich G., Sakamoto C., Chavez F., Buck K., Kolber Z., Greene R., Falkowski P., Chisholm S.W., Hoge F., Swift R., Yungel J., Turner S., Nightingale P., Hatton A., Liss P. And Tindale N.W. (1994). Testing the iron hypothesis in ecosystems of the equatorial Pacific Ocean. *Nature.* Vol. 371, 123-129.
- Martin J.H. and Fitzwater S.E. (1988). Iron deficiency limits phytoplankton growth in the north-east Pacific subarctic. *Nature.* Vol. 331, 341-343.
- McKnight D.M. and Morel F.M.M. (1980). Copper complexation by siderophores from filamentous blue-green algae. *Limnology and Oceanography.* Vol. 25(1), 62-71.
- McKnight D.M. and Morel F.M.M. (1979). Release of weak and strong copper-complexing agents by algae. *Limnology and Oceanography.* Vol. 24(5), 823-837.

Bibliografía

- Miller L.A., Bruland K.W. (1997). Competitive equilibration techniques for determining transition metal speciation in natural waters: Evaluation using model data. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 343, 161-181.
- Millero F.J. and Hawke D.J. (1992). Ionic interactions of divalents metals in natural waters. *Marine Chemistry*. Vol. 40, 19-48.
- Millero F.J. and Sohn M.L. (1992). Composition and stoichiometry of average seawater. In: CRC Press (Editor), *Chemical Oceanography*. Boca Raton, Florida. p. 71.
- Millero F.J., Yao W. and Aicher J. (1995). The speciation of Fe(II) and Fe(III) in natural waters. *Marine Chemistry*. Vol. 50, 21-39.
- Moffett J.W. (1995). Temporal and spatial variability of copper complexation by strong chelators in the Sargasso Sea. *Deep-Sea Research*. Vol. 42(8), 1273-1295.
- Moffett J.W. and Zika R.G. (1987). Solvent extraction of copper acetylacetonate in studies of copper(II) speciation in seawater. *Marine Chemistry*. Vol. 21, 301-313.
- Moffett J.W., Zika R.G. and Brand L.E. (1990). Distribution and potential sources and sinks of copper chelators in the Sargasso Sea. *Deep-Sea Research*. Vol. 37(1) 27-36.
- Mohl W., Motsch H. and Schweiger A. (1988). Magnetic studies of Cu(II) adsorbed on the surface of the bacterium *Klebsiella pneumoniae*. *Langmuir*. Vol. 4, 580-583.
- Murphy L.S., Guillard R.R.L. and Brown J.F. 1984. The effects of Iron and Manganese on Copper sensitivity in diatoms: differences in the responses of closely related neritic and oceanic species. *Biological Oceanography*. Vol. 3(2), 187-201.
- Nielands J.B. (1981). Iron absorption and transport in microorganisms. *Annu. Rev. Nut.* Vol. 1

Plavsic M., Krznicaric D., and Branica M. (1982). Determination of the apparent copper complexing capacity of seawater by anodic stripping voltammetry. *Marine Chemistry*. Vol. 11, 17-31.

Price N.M. and Morel F.M.M. (1990). Cadmium and cobalt substitution for zinc in a marine diatom. *Nature*. Vol. 344, 658-660.

Price C.A. and Quigley J.W. (1966). A method for determining quantitative zinc requirements for growth. *Soil Science*. Vol. 101, 11-16.

Ringbom A. and Still E. (1972). The calculation and use of α coefficients. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 59, 143-146.

Rue E.L. and Bruland K.W. (1995). Complexation of iron(III) by natural organic ligands in the central North Pacific as determined by a new competitive ligand equilibration / adsorptive cathodic stripping voltammetric method. *Marine Chemistry*. Vol. 50, 117-138.

Rueter J.G. and Morel F.M.M. (1981). The interaction between zinc deficiency and copper toxicity as it affects the silicic acid uptake mechanisms in *Thalassiosira pseudonana*. *Limnology and Oceanography*. Vol. 26, 67-73.

Ruzic I. (1996). Trace metal complexation at heterogeneous binding sites in aquatic systems. *Marine Chemistry*. Vol. 53(1-2), 1-15.

Ruzic, I. (1984). Kinetics of complexation and determination of complexation parameters in natural waters. In: C.J.K. Kramer and J.C. Duinker (Editors), *Complexation of trace metals in natural waters*, Nijhoff/Junk, The Hague, pp. 131-147.

Ruzic, I. (1982). Theoretical aspects of the direct titration of natural waters and its information yield for trace metal speciation. *Anal. Chim. Acta*. Vol. 140, 99-113.

Bibliografía

Santana Casiano J.M., Gonzalez Dávila M., Pérez Peña J. and Millero F.J. (1995). Pb²⁺ interactions with the marine phytoplankton *Dunaliella tertiolecta*. *Marine Chemistry*. Vol. 48, 115-129.

Scatchard G. (1949). The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* Vol. 51, 660-672.

Scatchard G., Coleman J.S. and Shen A.L. (1957). Physical chemistry of protein solutions. VII. The binding of some small anions to serum albumin. *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 79, 12-20.

Schaule B.K. and Patterson C.C. (1981). Lead concentrations in the Northeast Pacific: evidence for global anthropogenic perturbation. *Earth Planet. Sci. Lett.* Vol. 54, 97-116.

Schiewer S. and Volesky B. (1997). Ionic strength and electrostatic effects in biosorption of protons. Vol. 31, 1863-1871.

Seritti A., Pellegrini D., Morelli E., Barghigiani C. and Ferrara R. (1986). Copper complexing capacity of phytoplanktonic cell exudates. *Marine Chemistry*. Vol. 18, 351-357.

Sharp J.H. (1977). Excretion of organic matter by marine phytoplankton: Do healthy cells do it? *Limnology and Oceanography*. Vol. 22, 381-399.

Sigg L. (1987). Surface chemical aspects of the distribution and fate of metal ions in lakes. In: W. Stumm (Editor), *Aquatic Surface Chemistry*. Wiley, New York, NY, pp. 331-350.

Sposito G. (1982). On the use of the Langmuir equation in the interpretation of "Adsorption" phenomena: II. The "Two-Surface" Langmuir equation. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* Vol. 46, 1147-1152.

Stauber J.L. and Florence T.M. (1987). Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. *Marine Biology*. Vol. 94, 511-519.

- Sunda W.G. (1990). Trace metal interactions with marine phytoplankton. *Biological Oceanography*. Vol. 6, 411-442.
- Sunda W.G., Barber R.T. and Huntsman S.A. (1981). Phytoplankton growth in nutrient rich seawater; importance of copper-manganese cellular interactions. *Journal of Marine Research*. Vol. 39, 567-586.
- Sunda W.G. and Guillard R.L. (1976). The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. *Journal of Marine Research*. Vol. 34, 511-529.
- Sunda W.G. and Hanson A.K. (1987). Measurements of free cupric ion concentration in seawater by a ligand competition technique involving copper sorption onto C₁₈ SEP-PAK cartridges. *Limnology and Oceanography*. Vol. 32, 537-551.
- Sunda W.G. and Huntsman S.A. (1983). Effect of competitive interactions between manganese and copper on cellular manganese and growth in estuarine and oceanic species of the diatom *Thalassiosira*. *Limnology and Oceanography*. Vol. 28, 924-934.
- Tipping E. (1993). Modeling the competition between alkaline earth cations and trace metal species for binding by humic substances. *Environmental Science and Technology*. Vol. 27, 520-529.
- Tipping E. and Hurley M.A. (1992). A unifying model of cation binding by humic substances. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. Vol. 56, 3627-3641.
- Turner D.R., Whitfield M. and Dickson A.G. (1981). The equilibrium speciation of dissolved components in freshwater and seawater at 25° C and 1 atm pressure. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. Vol. 45, 855-881.
- van Cutsem P. and Gillet C. (1981). A thermodynamic study of Cu⁺⁺-Zn⁺⁺ ion exchange in the *Nitella flexilis* cell wall. *Plant soil*. Vol. 62, 367-375.

Bibliografía

van den Berg C.M.G. (1986). Determination of copper, cadmium and lead in sea water by cathodic stripping voltammetry of complexes with 8-hidroxyquinoline. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. Vol. (215), 111-121.

van den Berg C.M.G. (1984). Determination of the complexing capacity and conditional stability constants of complexes of copper (II) with natural organic ligands in seawater by cathodic stripping voltammetry of copper-catechol complex ions. *Marine Chemistry*. Vol. (15), 1-18.

van den Berg C.M.G. (1984). Determination of copper in sea water by cathodic stripping voltammetry of complexes with catechol. *Analytica Chimica Acta*. Vol. (16), 195-207.

van den Berg C.M.G. (1983). Corrections to "Determination of copper complexation with natural organics ligands in seawater by equilibration with MnO_2 . I. Theory". *Marine Chemistry*. Vol. (13), 83-85.

van den Berg C.M.G. (1982). Determination of copper complexation with natural organics ligands in seawater by equilibration with MnO_2 . I. Theory. *Marine Chemistry*. Vol. (11), 307-322.

van den Berg C.M.G. (1979). Complexation of copper in natural waters. Determination of complexing capacities and conditional stability constants in natural waters by MnO_2 , and the implications for phytoplankton toxicity. Thesis, McMaster University, Ontario, Canada.

van den Berg C.M.G. and Donat J.R. (1992). Determination and data evaluation of copper complexation in seawater using cathodic stripping voltammetry at varying detection windows. *Anal. Chim. Acta*. Vol. 257, 281-291.

van den Berg C.M.G. and Kramer J.R. (1979). Determination of complexing capacities of ligands in natural waters and conditional stability constants of the copper complexes by means of manganese dioxide. *Anal. Chim. Acta*. Vol. 106, 103-120.

van den Berg C.M.G., Nimmo M., Daly P. and Turner D.R. (1990). Effects of the detection window on the determination of organic copper speciation in estuarine waters. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 232, 149-159.

Werner D. (1977) Introduction with a note on taxonomy. In: D. Werner (Editor), *The biology of diatoms*. Blackwell pp. 1-17.

Whitfield M. and Turner D.R. (1987). The role of particles in regulating the composition of seawater. In: W. Stumm(Editor), *Aquatic Surface Chemistry*. Wiley, New York, NY, pp. 457-493.

Wilkinson L. 1988. SYSTAT: The system for statistic. SYSTAT Inc., Evanston, IL.

Wu J. And Luther G.W. (1995). Complexation of Fe(III) by natural organic ligands in the Northwest Atlantic Ocean by a competitive ligand equilibration method and a kinetic approach. *Marine Chemistry*. Vol. 50, 159-177.

Xue H.B., Kistler D. and Sigg L. (1995). Competition of copper and zinc for strong ligands in a eutrophic lake. *Limnology and Oceanography*. Vol. 40(6), 1142-1152.

Xue H.B. and Sigg L. (1993). Free cupric ion concentration and Cu(II) speciation in a eutrophic lake. *Limnology and Oceanography*. Vol. 38(6), 1200-1213.

Xue H.B. and Sigg L. (1990). Binding of Cu(II) to algae in a metal buffer. *Water Research*. Vol. 24, 1129-1136.

Xue H.B., Stumm W. and Sigg L. (1988). The binding of heavy metals to algal surfaces. *Water Research*. Vol. 22, 917-926.

Zhou X.Z. and Wangersky P.J. (1989). Production of copper-complexing organic ligands by the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* in a cage culture turbidostat. *Marine Chemistry*. Vol. 26, 239-259.

Bibliografía

Zhou X., Slauenwhite D.E., Pett R.J. and Wangersky P.J. (1989). Production of copper-complexing organic ligands during a diatom bloom: tower tank and batch culture experiment. *Marine Chemistry*. Vol. 27, 19-30.

ANEXOS

ANEXO 1

Algoritmo para el cálculo de los parámetros de complejación de dos tipos de ligandos en un medio a partir de los datos de una valoración metálica. Durante el proceso se aplica la transformada de van den Berg-Ruzic.

```

1 CLS:REM Cálculo capacidad complejante. Método mixto
2 REM Programa realizado por Luis Miguel Laglera Baquer
5 DIM AD(100),IP(100),X(100),Y(100),Z#(100)
10 INPUT"nombre del fichero donde se hallan los datos";NOMS:NOMS="c:\"+NOMS
20 OPEN NOMS FOR INPUT AS# 1
25 REM Lectura del fichero resultado de la valoración metálica
30 FOR I=1 TO 100
40 INPUT#1,AD(I),IP(I)
45 PRINT AD(I);IP(I)
50 IF EOF(1) THEN GOTO 70
60 NEXT I
70 NP=I:CLOSE(1)
75 PRINT P:NOM3$="c:\"+"res.txt"
80 INPUT"nº de datos para calcular L1";N1
90 INPUT"nº de datos para calcular L2";N2
100 CCCC=0:CLOSE(1)
110 CLS
120 INPUT"valor de la sensibilidad (nA/nM)";S
130 S=S*1E+09
140 CLS
150 INPUT"Cobre total en la muestra original (nM)";CUT
160 CUT=CUT/1E+09
205 REM Calculo del coeficiente alfa del catecol
210 INPUT"pH de trabajo";PH
220 H=10^((-1)*PH)
230 CLS
240 PRINT
250 INPUT"Concentración de catecol utilizada";CAT
260 PRINT
270 INPUT"Coeficiente alfa del cobre a ese pH";ACU
280 CLS
290 ALFA=1+H*H/1E-13/5.88843E-10+H/1E-13
300 PRINT"Alfa(cat)=";ALFA
310 B=8.511383E+24/ALFA^2
320 K=5.126807E+13/ALFA
330 PRINT:PRINT:KKK=.434294*LOG(K)
340 PRINT"K[1](Cucat)=";K;" (";KKK;")"
350 PRINT:PRINT:PKB=.434294*LOG(B)
360 PRINT"K[1,2](Cucat)= ";B;" (";PKB;")"
370 ALFA2=K*CAT+B*CAT^2
380 PRINT:PRINT:PRINT:PRINT:PRINT

```

```

390 PRINT"alfa(Cucat)=";ALFA2
395 ALFA2=ALFA2+ACU
400 FOR I=1 TO N1:REM Cálculo de la estimación inicial de CL1 y KL1
410 X(I)=IP(I)/S
420 Y(I)=IP(I)/(S*(CUT+AD(I))-IP(I))
425 NEXT I
430 A1=1:A2=N1:IF CCCC=0 THEN A2=3
440 GOSUB 1000:REM Llamada a la subrutina de regresión por mínimos cuadrados
450 KL1=KL
460 CL1=CL
465 sek1=alfa2*(bb*(1/aa*seaa/aa)+1/aa*sebb):secl1=1/bb*sebb/bb:rem Expresión
    desviación estandard de los parámetros de complejación
470 CCCC=CCCC+1
475 REM Cálculo de CuL2 eliminando la concentracióón de CuL1.Linealización de
    Scatchard
480 FOR I=NP-N2+1 TO NP
490 Y(I)= IP(I)/(S*(CUT+AD(I))-IP(I)*(1+(KL1*CL1/(KL1*IP(I)/S+ALFA2))))
500 X(I)=IP(I)/S
510 NEXT I
520 A1=NP+1-N2:A2=np
530 GOSUB 1000:REM Llamada a la subrutina de regresión por mínimos cuadrado
540 CLS
550 KL2=kl:CL2=cl
560sek2=alfa2*(bb*(1/aa*seaa/aa)+1/aa*sebb):secl2=1/bb*sebb/bb:rem Expresión
    desviación estandard de los parámetros de complejación
570PRINT "Iteración número ",CCCC
580 PRINT
600 REM presentación visual de los valores obtenidos
610 PE1=LOG(KL1)*.4342945
620 PRINT"CL1= ";CL1;"+-";secl1,"KL1=";KL1;" (";PE1;");"("+"; LOG(KL1+sek1)
    *.4342945 -LOG(KL1)*.4342945;)"
630 PRINT
640 PE2=LOG(KL2)*.4342945
650 PRINT"CL2= ";CL2;"+-";secl2,"KL2=";KL2;" (";PE2;");"("+";LOG(KL2+sek2)
    *.4342945-LOG(KL2)*.4342945;)"
660 PRINT:PRINT:PRINT:PRINT
670 INPUT""Desea hacer otra iteración?(s/n)";IT$
680 IF IT$="n" THEN GOTO 760
690 IF IT$<>"s" THEN GOTO 670
695 REM Cálculo de CuL1 eliminando la concentracióón de CuL2.Linealización de van
    den Berg-Ruzic
700 FOR I=1 TO N1
710 Y(I)=IP(I)/(S*(CUT+AD(I))-IP(I)*(1+(KL2*CL2/(KL2*IP(I)/S+ALFA2))))
720 NEXT I
730 INPUT JHGJHS:CLS
740 GOTO 430:REM Regresa a hacer otra iteración
750 CLS:REM Llamada a la subrutina que calcula pCu en el medio previo a la adición
    de catecol
760 GOSUB 7000
770 PRINT" El pCu teórico calculado es de ";LOG(CU2)*-.43429448#;"(";CU2;)"

```

```

780 PRINT N1;N2
790 XX=CU2*ALFA2/CUT
800 ALFACU=ALFA2*(1-XX)/XX
810 PRINT "alfa CuL =";ALFACU;"(";LOG(ALFA2*(1-XX)/XX)*.43429448#;")"
820 PRINT:PRINT "MEDIO ORIGINAL":REM Cálculo de la especiación del cobre en
    el medio previo a adiciones a partir del dato de Cu2+
830 PRINT "Cobre total =";CUT,"% complejado orgánicamente";
    (KL1*CL1*CU2/(1+KL1*CU2)+KL2*CL2*CU2/(1+KL2*CU2))/CUT*100
840 PRINT "CuL1 ="; KL1*CL1*CU2/(1+KL1*CU2);"("; .43429448#
    *LOG(KL1*CL1*CU2/(1+KL1*CU2)/CU2);")";"(";KL1*CL1*CU2/(1+KL1*CU2
    )/CUT*100;"% )"
850 PRINT "CuL2=";KL2*CL2*CU2/(1+KL2*CU2);"("; .43429448#
    *LOG(KL2*CL2*CU2/(1+KL2*CU2)/CU2);")";"(";KL2*CL2*CU2/(1+KL2*CU2
    ) CUT*100;"% )"
860 PRINT "Cu inorganico =";CU2*ACU;"("; CU2*ACU/CUT*100;"% )"
880 OPEN NOM3$ FOR OUTPUT AS# 3:REM Escritura de resultados en un fichero
885 PRINT#3,NOM$,N1;N2,"s=";s,alfa2
890 PRINT#3,"CL1= ";CL1;"+"-";secl1;"    ";"KL1=";KL1;" (";PE1;")";"(+
    ";LOG(KL1+secl1)*.4342945-LOG(KL1)*.4342945;")"
900 PRINT#3,"CL2= ";CL2;"+"-";secl2;"    ";"KL2=";KL2;" (";PE2;")";"(+
    ";LOG(KL2+secl2)*.4342945-LOG(KL2)*.4342945;")"
905 PRINT#3,"alfa CuL =";ALFACU;"(";LOG(ALFA2*(1-XX)/XX)*.43429448#;")"
910 PRINT#3,"MEDIO ORIGINAL:"
920 PRINT#3,"Cobre total =";CUT,"% complejado orgánicamente"
    ;(KL1*CL1*CU2/(1+KL1*CU2)+KL2*CL2*CU2/(1+KL2*CU2))/CUT*100
930 PRINT#3,"CuL1=";KL1*CL1*CU2/(1+KL1*CU2);"("; .43429448#*LOG(KL1*CL
    1*CU2/(1+KL1*CU2)/CU2);")";"(";KL1*CL1*CU2/(1+KL1*CU2)/CUT*100
    ;"% )"
940 PRINT#3,"CuL2=";KL2*CL2*CU2/(1+KL2*CU2);"("
    ;.43429448#*LOG(KL2*CL2*CU2/(1+KL2*CU2)/CU2);")";"(";KL2*CL2*CU2/
    (1+KL2*CU2)/CUT*100;"% )"
950 PRINT#3,"Cu inorganico =";CU2*ACU;"("; CU2*ACU/CUT*100;"% )"
960 PRINT#3," El pCu teórico calculado es de ";LOG(CU2)*-.43429448#;"(";CU2;")"
970 PRINT#3,"          "
980 CLOSE(2)
990 END
1000 REM Subrutina de cálculo de regresión lineal por mínimos cuadrados
1005 XM=0
1010 YM=0
1020 XY=0
1030 X2=0:se=0
1040 FOR I=A1 TO A2
1050 XM=X(I)+XM
1060 YM=Y(I)+YM
1070 XY=X(I)*Y(I)+XY
1080 X2=X(I)*X(I)+X2
1090 NEXT I
1100 YM=YM/(A2-(A1-1))
1110 XM=XM/(A2-(A1-1))
1120 BB=(XY-YM*XM*(A2-(A1-1)))/(X2-XM*XM*(A2-(A1-1)))

```

```

1125 AA=YM-BB*XM
1130 FOR i=a1 TO a2:e=y(i)-(aa+bb*x(i)):se=se+e*e:NEXT i:REM se=sumatorio de
    errores residuales
1140 var=-xm*(A2-(A1-1))/SQR((A2-(A1-1))*x2):REM Expresión del cálculo de la
    varianza
1145 s2=se/((A2-(A1-1))-2)
1150 REM expresiones para la varianza asociada a las estimaciones de la pdte y corte
    con el eje de abcisas
1160 vaa=1/(1-var^2)*s2/(A2-(A1-1)):vbb=1/(1-var^2)*s2/x2
1170 REM expresiones para la desviación estandar asociada a las estimaciones de la
    pdte y corte con el eje de abcisas
1180 seaa=sqr(vaa):sebb=sqr(vbb)
1185 REM Expresiones de los parámetros de complejacion a partir de las características
    de la recta
1190 CL=1/BB
1200 KL=ALFA2*BB/AA
1210 RETURN
1220 END
7000 REM Subrutina calculo numerico para la estimación del ion cuprico libre a partir
    del cobre total en el medio original
7010 IF CUT=0 THEN CUT=AD(1)
7020 A#=IP(1)/S/ALFA2/1000
7030 B#=IP(1)/S/ALFA2
7040 V#=A#
7050 GOSUB 8000
7060 FA#=R#
7070 V#=B#
7080 GOSUB 8000
7090 FB#=R#
7100 EPS#=IP(1)/S/ALFA2/1000000!
7120 FOR J=2 TO 1000
7130 Z#(J)=A#-(((B#-A#)/(FB#-FA#))*FA#)
7140 DIF#=ABS(Z#(J)-Z#(J-1))
7150 IF DIF#<EPS# THEN GOTO 7300
7160 B#=Z#(J)
7170 V#=B#
7180 GOSUB 8000
7190 FB#=R#
7200 NEXT J
7300 CU2=Z#(J)
7350 RETURN
7400 END
8000 REM subrutina calculo funcion obtencion de raices
8010 R#=(KL1*CL1*V#/(1+KL1*V#)+KL2*CL2*V#/(1+KL2*V#)+V#*ACU+V#-
    (CUT)):REM Función a minimizar
8020 RETURN
8030 END

```

ANEXO 2

Algoritmo para el cálculo de los parámetros de complejación de dos tipos de ligandos en un medio a partir de los datos de una valoración metálica. Durante el proceso se aplica la transformada de Scatchard.

```

1 CLS:REM Cálculo capacidad complejante. Linealización de Scatchard
2 REM Programa realizado por Luis Miguel Laglera Baquer
5 DIM AD(100),IP(100),X(100),Y(100),Z#(100)
10 INPUT"nombre del fichero donde se hallan los datos";NOMS:NOMS="c:\"+NOMS
20 OPEN NOMS FOR INPUT AS# 1
25 REM Lectura del fichero resultado de la valoración metálica
30 FOR I=1 TO 100
40 INPUT#1,AD(I),IP(I)
45 PRINT AD(I);IP(I)
50 IF EOF(1) THEN GOTO 70
60 NEXT I
70 NP=I:CLOSE(1)
75 PRINT P:NOM3$="c:\"+"res.txt"
80 INPUT"nº de datos para calcular L1";N1
90 INPUT"nº de datos para calcular L2";N2
100 CCCC=0:CLOSE(1)
110 CLS
120 INPUT"valor de la sensibilidad (nA/nM)";S
130 S=S*1E+09
140 CLS
150 INPUT"Cobre total en la muestra original (nM)";CUT
160 CUT=CUT/1E+09
205 REM Calculo del coeficiente alfa del catecol
210 INPUT"pH de trabajo";PH
220 H=10^((-1)*PH)
230 CLS
240 PRINT
250INPUT"Concentración de catecol utilizada";CAT
260 PRINT
270 INPUT"Coeficiente alfa del cobre a ese pH";ACU
280 CLS
290 ALFA=1+H*H/1E-13/5.88843E-10+H/1E-13
300 PRINT"Alfa(cat)=",ALFA
310 B=8.511383E+24/ALFA^2
320 K=5.126807E+13/ALFA
330 PRINT:PRINT:KKK=.434294*LOG(K)
340 PRINT"K[1](Cucat)=",K;" (" ;KKK;)"
350 PRINT:PRINT:PKB=.434294*LOG(B)
360 PRINT"K[1,2](Cucat)= ";B;" (" ;PKB;)"
370 ALFA2=K*CAT+B*CAT^2
380 PRINT:PRINT:PRINT:PRINT:PRINT

```

```

390 PRINT"alfa(Cucat)=";ALFA2
395 ALFA2=ALFA2+ACU
400 FOR I=1 TO N1:REM Cálculo de la estimación inicial de CL1 y KL1
405 X(I)=(CUT+AD(I))-IP(I)/S
410 Y(I)=X(I)*ALFA2/IP(I)*S
420 NEXT I
430 A1=1:A2=N1:IF CCCC=0 THEN A2=3
440 GOSUB 1000:REM Llamada a la subrutina de regresión por mínimos cuadrados
450 KL1=KL
460 CL1=CL
465 sek11=sebb:secl1=aa*(1/bb*sebb/bb)+1/bb*seaa:REM Expresión desviación
    estandard de los parámetros de complejación
470 CCCC=CCCC+1
475 REM Cálculo de CuL2 eliminando la concentracióón de CuL1.Linealizacion de
    Scatchard
480 FOR I=NP-N2+1 TO NP
490 Y(I)= IP(I)/(S*(CUT+AD(I))-IP(I)*(1+(KL1*CL1/(KL1*IP(I)/S+ALFA2))))
500 X(I)=IP(I)/S
510 NEXT I
520 A1=NP+1-N2:A2=np
530 GOSUB 1000:REM Llamada a la subrutina de regresión por mínimos cuadrado
540 CLS
550 kl2=kl:cl2=cl
560 sek12=sebb:secl2=aa*(1/bb*sebb/bb)+1/bb*seaa:REM Expresión desviación
    estandard de los parámetros de complejación
570PRINT "Iteraciøn número ",CCCC
580 PRINT
600 REM presentación visual de los valores obtenidos
610 PE1=LOG(KL1)*.4342945
620 PRINT"CL1= ";CL1;"+-";secl1,"KL1=";KL1;" (";PE1;)"";"(+
    ";LOG(KL1+sek11)*.4342945-LOG(KL1)*.4342945;)"
630 PRINT
640 PE2=LOG(KL2)*.4342945
650 PRINT"CL2= ";CL2;"+-";secl2,"KL2= ";KL2;" (";PE2;)"";"(+
    ";LOG(KL2+sek12)*.4342945-LOG(KL2)*.4342945;)"
660 PRINT:PRINT:PRINT:PRINT
670 INPUT"Desea hacer otra iteraciøn?(s/n)";IT$
680 IF IT$="n" THEN GOTO 760
690 IF IT$<>"s" THEN GOTO 670
695 REM Cálculo de CuL1 eliminando la concentración de CuL2.Linealizacion de
    Scatchard
700 FOR I=1 TO N1
705 X(I)=((CUT+AD(I))-IP(I)/S*(1+KL2*CL2/(ALFA2+KL2*IP(I)/S)))
710 Y(I)=X(I)*ALFA2/IP(I)*S
720 NEXT I
730 CLS
740 GOTO 430:REM Regresa a hacer otra iteración
50 CLS:REM Llamada a la subrutina que calcula pCu en el medio previo a la adición de
    catecol
760 GOSUB 7000

```

```

770 PRINT " El pCu teórico calculado es de ";LOG(CU2)*-.43429448#;"( ";CU2;)"
780 PRINT N1;N2
790 XX=CU2*ALFA2/CUT
800 ALFACU=ALFA2*(1-XX)/XX
810 PRINT "alfa CuL =";ALFACU;"( ";LOG(ALFA2*(1-XX)/XX)*.43429448#;)"
820 PRINT:PRINT "MEDIO ORIGINAL":REM Cálculo de la especiación del cobre en
    el medio previo a adiciones a partir del dato de Cu2+
830 PRINT "Cobre total =";CUT, "% complejoado organicamente"
    ;(KL1*CL1*CU2/(1+KL1*CU2)+KL2*CL2*CU2/(1+KL2*CU2))/CUT*100
840 PRINT "CuL1 =";KL1*CL1*CU2/(1+KL1*CU2);"("
    ;.43429448#*LOG(KL1*CL1*CU2/(1+KL1*CU2)/CU2);)"";"(" ;KL1*CL1*CU2/
    (1+KL1*CU2)/CUT*100;"% )"
850 PRINT "CuL2 =";KL2*CL2*CU2/(1+KL2*CU2);"("
    ;.43429448#*LOG(KL2*CL2*CU2/(1+KL2*CU2)/CU2);)"";"(" ;KL2*CL2*CU2/
    (1+KL2*CU2)/CUT*100;"% )"
860 PRINT "Cu inorganico =";CU2*ACU;"(" ; CU2*ACU/CUT*100;"% )"
880 OPEN NOM3$ FOR OUTPUT AS# 3:REM Escritura de resultados en un fichero
885 PRINT#3,NOM$,N1;N2, "s=";s,alfa2
890 PRINT#3,"CL1=" ;CL1;"+" ;secl1,"    ","KL1=";KL1;" (" ;PE1;)" ;"(+
    ";LOG(KL1+secl1)*.4342945-LOG(KL1)*.4342945;)"
900 PRINT#3,"CL2=" ;CL2;"+" ;secl2,"    ","KL2=";KL2;" (" ;PE2;)" ;"(+
    ";LOG(KL2+secl2)*.4342945-LOG(KL2)*.4342945;)"
905 PRINT#3,"alfa CuL =";ALFACU;"( ";LOG(ALFA2*(1-XX)/XX)*.43429448#;)"
910 PRINT#3,"MEDIO ORIGINAL:"
920 PRINT#3, "Cobre total =";CUT, "% complejoado organicamente"
    ;(KL1*CL1*CU2/(1+KL1*CU2)+KL2*CL2*CU2/(1+KL2*CU2))/CUT*100
930PRINT#3,"CuL1=";KL1*CL1*CU2/(1+KL1*CU2);"(" ;.43429448#*LOG(KL1*CL
    1*CU2/(1+KL1*CU2)/CU2);)"";"(" ;KL1*CL1*CU2/(1+KL1*CU2)/CUT*100
    ;"% )"
940PRINT#3,"CuL2=";KL2*CL2*CU2/(1+KL2*CU2);"(" ;.43429448#*LOG(KL2*CL
    2*CU2/(1+KL2*CU2)/CU2);)"";"(" ;KL2*CL2*CU2/(1+KL2*CU2)/CUT*100
    ;"% )"
950 PRINT#3, "Cu inorganico =";CU2*ACU;"(" ; CU2*ACU/CUT*100;"% )"
960 PRINT#3," El pCu teórico calculado es de ";LOG(CU2)*-.43429448#;"( ";CU2;)"
970 PRINT#3,"
    "
980 CLOSE(2)
990 END
1000 REM Subrutina de cálculo de regresión lineal por mínimos cuadrados
1005 XM=0
1010 YM=0
1020 XY=0
1030 X2=0:se=0
1040 FOR I=A1 TO A2
1050 XM=X(I)+XM
1060 YM=Y(I)+YM
1070 XY=X(I)*Y(I)+XY
1080 X2=X(I)*X(I)+X2
1090 NEXT I
1100 YM=YM/(A2-(A1-1))
1110 XM=XM/(A2-(A1-1))

```



```

1120 BB=(XY-YM*XM*(A2-(A1-1)))/(X2-XM*XM*(A2-(A1-1)))
1125 AA=YM-BB*XM
1130 FOR i=a1 TO a2:e=y(i)-(aa+bb*x(i)):se=se+e*e:NEXT i:REM se=sumatorio de
    errores residuales
1140 var=-xm*(A2-(A1-1))/SQR((A2-(A1-1))*x2):REM Expresión del cálculo de la
    varianza
1145 s2=se/((A2-(A1-1))-2)
1150 REM expresiones para la varianza asociada a las estimaciones de la pdte y corte
    con el eje de abcisas
1160 vaa=1/(1-var^2)*s2/(A2-(A1-1)):vbb=1/(1-var^2)*s2/x2
1170 REM expresiones para la desviación estandar asociada a las estimaciones de la
    pdte y corte con el eje de abcisas
1180 seaa=SQR(vaa):sebb=SQR(vbb)
1185 REM Expesiones de los parámetros de complejacion a partir de las características
    de la recta
1190 CL=-bb
1200 KL=aa/bb*(-1)
1210 RETURN
1220 END
7000 REM Subrutina calculo numerico para la estimación del ion cuprico libre a partir
    del cobre total en el medio original
7010 IF CUT=0 THEN CUT=AD(1)
7020 A#=IP(1)/S/ALFA2/1000
7030 B#=IP(1)/S/ALFA2
7040 V#=A#
7050 GOSUB 8000
7060 FA#=R#
7070 V#=B#
7080 GOSUB 8000
7090 FB#=R#
7100 EPS#=IP(1)/S/ALFA2/1000000!
7120 FOR J=2 TO 1000
7130 Z#(J)=A#-(((B#-A#)/(FB#-FA#))*FA#)
7140 DIF#=ABS(Z#(J)-Z#(J-1))
7150 IF DIF#<EPS# THEN GOTO 7300
7160 B#=Z#(J)
7170 V#=B#
7180 GOSUB 8000
7190 FB#=R#
7200 NEXT J
7300 CU2=Z#(J)
7350 RETURN
7400 END
8000 REM subrutina calculo funcion obtencion de raices
8010 R#=(KL1*CL1*V#/(1+KL1*V#)+KL2*CL2*V#/(1+KL2*V#)+V#*ACU+V#-
    (CUT)):REM Función a minimizar
8020 RETURN

```

8030 END

ANEXO 3

Algoritmo para el cálculo de los parámetros de complejación de dos tipos de ligandos en un medio a partir de los datos de una valoración metálica. Durante el proceso se aplica la transformada de van den Berg Ruzic a la estimación de los parámetros del tipo de ligando de menor constante de estabilidad y la de Scatchard a los parámetros de L_1 .

```

1 CLS:REM Cálculo capacidad complejante. Método mixto
2 REM Programa realizado por Luis Miguel Laglera Baquer
5 DIM AD(100),IP(100),X(100),Y(100),Z#(100)
10 INPUT"nombre del fichero donde se hallan los datos";NOMS:NOMS="c:\"+NOMS
20 OPEN NOMS FOR INPUT AS# 1
25 REM Lectura del fichero resultado de la valoración metálica
30 FOR I=1 TO 100
40 INPUT#1,AD(I),IP(I)
45 PRINT AD(I);IP(I)
50 IF EOF(1) THEN GOTO 70
60 NEXT I
70 NP=I:CLOSE(1)
75 PRINT NP:NOM3$="c:\"+"res.txt"
80 INPUT"nº de datos para calcular L1";N1
90 INPUT"nº de datos para calcular L2";N2
100 CCCC=0:CLOSE(1)
110 CLS
120 INPUT"valor de la sensibilidad (nA/nM)";S
130 S=S*1E+09
140 CLS
150 INPUT"Cobre total en la muestra original (nM)";CUT
160 CUT=CUT/1E+09
205 REM Calculo del coeficiente alfa del catecol
210 INPUT"pH de trabajo";PH
220 H=10^((-1)*PH)
230 CLS
240 PRINT
250 INPUT"Concentración de catecol utilizada";CAT
260 PRINT
270 INPUT"Coeficiente alfa del cobre a ese pH";ACU
280 CLS
290 ALFA=1+H*H/1E-13/5.88843E-10+H/1E-13
300 PRINT"Alfa(cat)=";ALFA
310 B=8.511383E+24/ALFA^2
320 K=5.126807E+13/ALFA
330 PRINT:PRINT:KKK=.434294*LOG(K)
340 PRINT"K[1](Cucat)=";K;" (";KKK;)"
350 PRINT:PRINT:PKB=.434294*LOG(B)
360 PRINT"K[1,2](Cucat)= ";B;" (";PKB;)"
370 ALFA2=K*CAT+B*CAT^2

```

```

380 PRINT:PRINT:PRINT:PRINT:PRINT
390 PRINT"alfa(Cucat)=";ALFA2
395 ALFA2=ALFA2+ACU
400 FOR I=1 TO N1:REM Cálculo de la estimación inicial de CL1 y KL1
405 X(I)=(CUT+AD(I))-IP(I)/S
410 Y(I)=X(I)*ALFA2/IP(I)*S
420 NEXT I
430 A1=1:A2=N1:IF CCCC=0 THEN A2=3
440 GOSUB 1000:REM Llamada a la subrutina de regresión por mínimos cuadrados
450 KL1=KL
460 CL1=CL
465 sek11=sebb:secl1=aa*(1/bb*sebb/bb)+1/bb*seaa:REM Expresión desviación
    estandard de los parámetros de complejación
470 CCCC=CCCC+1
475 REM Cálculo de CuL2 eliminando la concentracióón de CuL1.Linealización de
    Scatchard
480 FOR I=NP-N2+1 TO NP
490 Y(I)= IP(I)/(S*(CUT+AD(I))-IP(I)*(1+(KL1*CL1/(KL1*IP(I)/S+ALFA2))))
500 X(I)=IP(I)/S
510 NEXT I
520 A1=NP+1-N2:A2=np
530 GOSUB 1000:REM Llamada a la subrutina de regresión por mínimos cuadrado
540 CLS: REM Expesiones de los parámetros de complejacion a partir de las
    características de la recta (van den Berg-Ruzic)
550 KL2=ALFA2*BB/AA:CL2=1/BB
560 sek12=alfa2*(bb*(1/aa*seaa/aa)+1/aa*sebb):secl2=1/bb*sebb/bb:REM Expresión
    desviación estandard de los parámetros de complejación
570PRINT "Iteraciøn número ",CCCC
580 PRINT
600 REM presentación visual de los valores obtenidos
610 PE1=LOG(KL1)*.4342945
620 PRINT"CL1= ";CL1;"+";secl1,"KL1=";KL1;" (";PE1;)"";"(+"
    ";LOG(KL1+sek11)*.4342945-LOG(KL1)*.4342945;)"
630 PRINT
640 PE2=LOG(KL2)*.4342945
650 PRINT"CL2= ";CL2;"+";secl2,"KL2=";KL2;" (";PE2;)"";"(+"
    ";LOG(KL2+sek12)*.4342945-LOG(KL2)*.4342945;)"
660 PRINT:PRINT:PRINT
670 INPUT"Desea hacer otra iteraciøn?(s/n)";IT$
680 IF IT$="n" THEN GOTO 760
690 IF IT$<>"s" THEN GOTO 670
695 REM Cálculo de CuL1 eliminando la concentracióón de CuL2.Linealización de van
    den Berg-Ruzic
700 FOR I=1 TO N1
705 X(I)=((CUT+AD(I))-IP(I)/S*(1+KL2*CL2/(ALFA2+KL2*IP(I)/S)))
710 Y(I)=X(I)*ALFA2/IP(I)*S
720 NEXT I
730CLS
740 GOTO 430:REM Regresa a hacer otra iteración

```

```

750 CLS:REM Llamada a la subrutina que calcula pCu en el medio previo a la adición
      de catecol
760 GOSUB 7000
770 PRINT" El pCu teórico calculado es de ";LOG(CU2)*-.43429448#;"(";CU2;)"
780 PRINT N1;N2
790 XX=CU2*ALFA2/CUT
800 ALFACU=ALFA2*(1-XX)/XX
810 PRINT "alfa CuL =";ALFACU;"(";LOG(ALFA2*(1-XX)/XX)*.43429448#;)"
820 PRINT:PRINT "MEDIO ORIGINAL":REM Cálculo de la especiación del cobre en
      el medio previo a adiciones a partir del dato de Cu2+
830 PRINT "Cobre total =";CUT,"% complejado orgánicamente"
      ;(KL1*CL1*CU2/(1+KL1*CU2)+KL2*CL2*CU2/(1+KL2*CU2))/CUT*100
840 PRINT "CuL1 =";KL1*CL1*CU2/(1+KL1*CU2);"("
      ;.43429448#*LOG(KL1*CL1*CU2/(1+KL1*CU2)/CU2;)"");"(";KL1*CL1*CU2/
      (1+KL1*CU2)/CUT*100;"% )"
850 PRINT "CuL2
      =";KL2*CL2*CU2/(1+KL2*CU2);"(";.43429448#*LOG(KL2*CL2*CU2/(1+KL
      2*CU2)/CU2;)"");"(";KL2*CL2*CU2/(1+KL2*CU2)/CUT*100;"% )"
860 PRINT "Cu inorganico =";CU2*ACU;"("; CU2*ACU/CUT*100;"% )"
880 OPEN NOM3$ FOR OUTPUT AS# 3:REM Escritura de resultados en un fichero
885 PRINT#3,NOM$,N1;N2,"s=";s,alfa2
890 PRINT#3,"CL1= ";CL1;"+"-";secl1;"      ";"KL1=";KL1;" (";PE1;)"");"(+
      ";LOG(KL1+secl1)*.4342945-LOG(KL1)*.4342945;)"
900 PRINT#3,"CL2= ";CL2;"+"-";secl2;"      ";"KL2=";KL2;" (";PE2;)"");"(+
      ";LOG(KL2+secl2)*.4342945-LOG(KL2)*.4342945;)"
905 PRINT#3,"alfa CuL =";ALFACU;"(";LOG(ALFA2*(1-XX)/XX)*.43429448#;)"
910 PRINT#3,"MEDIO ORIGINAL:"
920 PRINT#3, "Cobre total =";CUT,"% complejado orgánicamente"
      ;(KL1*CL1*CU2/(1+KL1*CU2)+KL2*CL2*CU2/(1+KL2*CU2))/CUT*100
930 PRINT#3, "CuL1 = ";KL1*CL1*CU2/(1+KL1*CU2);"(";
      .43429448#*LOG(KL1*CL1*CU2/(1+KL1*CU2)/CU2;)"");"(";KL1*CL1*CU2/
      (1+KL1*CU2)/CUT*100;"% )"
940 PRINT#3, "CuL2 =";KL2*CL2*CU2/(1+KL2*CU2);
      "(";.43429448#*LOG(KL2*CL2*CU2/(1+KL2*CU2)/CU2;)"");"(";KL2*CL2*C
      U2/(1+KL2*CU2)/CUT*100;"% )"
950 PRINT#3, "Cu inorganico =";CU2*ACU;"("; CU2*ACU/CUT*100;"% )"
960 PRINT#3, " El pCu teórico calculado es de ";LOG(CU2)*-.43429448#;"(";CU2;)"
970 PRINT#3,"
      "
980 CLOSE(2)
990 END
1000 REM Subrutina de cálculo de regresión lineal por mínimos cuadrados
1005 XM=0
1010 YM=0
1020 XY=0
1030 X2=0:se=0
1040 FOR I=A1 TO A2
1050 XM=X(I)+XM
1060 YM=Y(I)+YM
1070 XY=X(I)*Y(I)+XY
1080 X2=X(I)*X(I)+X2

```

```

1090 NEXT I
1100 YM=YM/(A2-(A1-1))
1110 XM=XM/(A2-(A1-1))
1120 BB=(XY-YM*XM*(A2-(A1-1)))/(X2-XM*XM*(A2-(A1-1)))
1125 AA=YM-BB*XM
1130 FOR i=a1 TO a2:e=y(i)-(aa+bb*x(i)):se=se+e*e:NEXT i:REM se=sumatorio de
    errores residuales
1140 var=-xm*(A2-(A1-1))/SQR((A2-(A1-1))*x2):REM Expresión del cálculo de la
    varianza
1145 s2=se/((A2-(A1-1))-2)
1150 REM expresiones para la varianza asociada a las estimaciones de la pdte y corte
    con el eje de abcisas
1160 vaa=1/(1-var^2)*s2/(A2-(A1-1)):vbb=1/(1-var^2)*s2/x2
1170 REM expresiones para la desviación estandar asociada a las estimaciones de la
    pdte y corte con el eje de abcisas
1180 seaa=SQR(vaa):sebb=SQR(vbb)
1180 REM Expesiones de los parámetros de complejacion a partir de las características
    de la recta (Scatchard)
1190 CL=(-1)*AA*(BB)^(-1)
1200 KL=(-1)*BB
1210 RETURN
1220 END
7000 REM Subrutina cálculo numérico para la estimación del ion cúprico libre a partir
    del cobre total en el medio original
7010 IF CUT=0 THEN CUT=AD(1)
7020 A#=IP(1)/S/ALFA2/1000
7030 B#=IP(1)/S/ALFA2
7040 V#=A#
7050 GOSUB 8000
7060 FA#=R#
7070 V#=B#
7080 GOSUB 8000
7090 FB#=R#
7100 EPS#=IP(1)/S/ALFA2/1000000!
7120 FOR J=2 TO 1000
7130 Z#(J)=A#-(((B#-A#)/(FB#-FA#))*FA#)
7140 DIF#=ABS(Z#(J)-Z#(J-1))
7150 IF DIF#<EPS# THEN GOTO 7300
7160 B#=Z#(J)
7170 V#=B#
7180 GOSUB 8000
7190 FB#=R#
7200 NEXT J
7300 CU2=Z#(J)
7350 RETURN
7400 END
8000 REM subrutina calculo funcion obtencion de raices
8010 R#=(KL1*CL1*V#/(1+KL1*V#)+KL2*CL2*V#/(1+KL2*V#)+V#*ACU+V#-
    (CUT)):REM Función a minimizar
8020 RETURN

```

8030 END