

Efectos del cobalto (Co) en especies marinas de fitoplancton.

¹*Linares, F. y ²Croot, P.

1 Department of Analytical and Marine Chemistry. Gothenburg University and Chalmers University of Technology. S-412 96 Göteborg, Sweden. Dirección actual: Departamento El Hombre y su Ambiente. Universidad Autónoma Metropolitana–Xochimilco. Calz. del Hueso 1100. Villa Quietud. Coyoacán. 04960. México, D.F. México.

2 Department of Biogeochemistry. IFM-GEOMAR, Kiel University, Germany.

* microphytobenthos@gmail.com

RESUMEN

El efecto de cobalto (Co) en especies de fitoplancton fue investigado en el campo y en experimentos de laboratorio. Muestras fueron colectadas de la Costa Oeste de Suecia (COS) a bordo del B/I "Skagerrak" en Julio de 1997; además, cultivos de fitoplancton fueron cultivados a diferentes adiciones de Co en el laboratorio. Se desarrolló un método de detección para Co total y disponible. Utilizamos voltametría adsorbtiva de redisolución catódica, (VARC) por pulso diferencial (PD), el cual dio mejores resultados que barrido lineal, utilizando el sistema nítrico Co-níoxime. En la COS las concentraciones de Co fueron más altas en la superficie, disminuyendo conforme aumentaba la profundidad. Casi todo el Co presente en la superficie estaba en forma disponible. Concentraciones generales de Co fueron más altas a lo largo de la COS que en otras partes del Skagerrak. Los experimentos de laboratorio mostraron que por lo menos dos de las especies de fitoplancton (*Synechococcus* sp. y *Chaetoceros* sp.) tienen un requerimiento de Co como ion libre, sin embargo no es absoluto. Por otro lado, la haptophyta *Prymnesium parvum* no presentó requerimiento de Co en su forma iónica, pero puede necesitar vitamina B12. Es posible también que el Co este compitiendo con el Zn en esta especie. Nuestra investigación muestra que el Co es un micronutriente importante, especialmente en la forma del complejo Co-cobalamina (B12) o cualquiera de sus análogos. La pregunta es, sin embargo, si alguna de estas especies tienen la habilidad de producir B12 para sus requerimientos metabólicos. Las haptophytas son un grupo de microalgas que se encuentran ampliamente distribuidas en aguas Suecas, y algunas de ellas son especies formadoras de florecimientos algales nocivos (i.e. *P. parvum* o *C. polylepis*). Con base en nuestros resultados, y asumiendo que estas especies tienen un requerimiento de Co como nutriente, un florecimiento de haptophytas puede ocurrir en la Costa Oeste de Suecia.

Palabras clave: Cobalto, fitoplancton, Voltametría adsorbtiva de redisolución catódica, Mar Skagerrak, Costa Oeste de Suecia,

florecimientos algales, *Synechococcus* sp, *Chaetoceros* sp, *P. parvum*.

INTRODUCCIÓN

La acumulación de trazas metálicas por fitoplancton marino ha recibido, en años recientes, considerable atención debido a que tiene relación directa con los efectos nutricionales y toxicológicos de metales, y en los ciclos biogeoquímicos de metales en sistemas marinos (Fisher y Reinfelder 1995).

Quizá la principal característica de muchos metales en el océano es que son micronutrientes esenciales, los cuales deben ser asimilados y concentrados dentro de las células para poder alcanzar sus requerimientos nutricionales. La ausencia de ciertos metales puede limitar el crecimiento de algas y, por lo tanto, la productividad primaria en amplias regiones del océano. Sin embargo, trazas metálicas pueden también ser tóxicas cuando se encuentran en altas concentraciones, y actúan de la misma forma que los nutrientes; esto es, necesitan ser introducidas en la célula para poder ver sus efectos (Fisher y Reinfelder 1995). La especiación de metales en el agua es quizás el principal factor que afecta la biodisponibilidad de metales para especies de fitoplancton marino; esta especiación es, en turno, un factor de la química del agua (Turner 1995).

Cuando trazas metálicas forman complejos con partículas orgánicas u otro agente que forme complejos, se vuelven menos reactivos a la

Efectos del cobalto (Co) en especies marinas de fitoplancton.

¹*Linares, F. y ²Croot, P.

Recibido: 1 de Junio de 2011.

Aceptado: 1 de Septiembre de 2011.

Publicado: 1 de Noviembre de 2011.

superficie de las células de fitoplancton; la razón es que estas partículas y los agentes que forman complejos compiten por los mismos sitios de unión en la membrana plasmática del fitoplancton. Así, la presencia de metales en forma de complejos y la adsorción en las partículas podría explicar la baja toxicidad de distintas trazas metálicas presentes en el agua, incluso si su concentración total es alta.

Las trazas metálicas pueden influir en el crecimiento y en la acumulación de biomas de especies de fitoplancton (Harrison and Morel 1983; Murphy et al. 1984; Rueter y Morel 1981; Sunda *et al.* 1981; Sunda y Huntsman 1983). Dicho efecto puede ser positivo, al incrementar el crecimiento y la reproducción de fitoplancton; o puede ser negativo limitando o inhibiendo la productividad. Por lo tanto, la distribución de trazas metálicas en el océano, las fuentes y las rutas que siguen, pueden ser factores importantes cuando se quiere determinar la composición de especies en aguas oceánicas y neríticas.

El cobalto es una traza metálica que se presenta en agua marina principalmente en forma del ion Co^{2+} , como en forma de complejos con carbonates, sulfates y con cloro (Ahrlund 1975; Morel y Hering 1993); puede también existir Co^{3+} en forma de complejos orgánicos dentro del rango de pH en aguas naturales. Co^{2+} existe en forma de catión divalente, el cual forma complejos orgánicos disponibles, mientras que Co^{3+} forma complejos inertes u óxidos (Moffett y Ho 1996). El Co es rápidamente removido del agua de mar por medio de mecanismos bióticos y abióticos. En aguas poco profundas, cerca de la costa, hasta un 98% del metal puede ser encontrado en sedimentos y suspendido en forma de partículas (Robertson *et al.* 1973).

El cobalto es necesario para el fitoplancton en la síntesis de cianocobalamina (vitamina B12) y por lo tanto es una traza metálica importante. Esto es particularmente cierto ya que las concentraciones de cobalto en aguas oceánicas son extremadamente bajas, e.g. 4–50 pM en el Pacífico Norte (Martin and Gordon 1988; Martin *et al.* 1989) y 20 pM en el Atlántico Norte (Granéli y Haraldsson 1993); mientras que son, por ejemplo, un poco más elevadas en áreas costeras del oeste de Suecia, e.g. 100-1000 pM (Granéli y Haraldsson 1993). Knauer

et al. (1982) ha estimado que el tiempo de residencia del cobalto es de entre 30 y 50 años.

Estudios han demostrado que el cobalto puede estimular el crecimiento de cianobacterias, así como el proceso de fijación de nitrógeno (Granéli y Risinger 1994; Holm-Hansen *et al.* 1954; Iswaran y Rao 1964). Price y Morel (1990) han demostrado que el cobalto puede substituir al zinc en procesos metabólicos dentro de las células del fitoplancton. El fitoplancton requiere de la vitamina B12 para su crecimiento (Granéli y Risinger 1994; Guillard y Cassie 1963; Ohwada y Taga 1972; Swift 1980; Swift 1981).

Con base en lo anterior, es claro que el Co es una traza metálica importante para el fitoplancton. Nuestro objetivo es definir la relación que existe entre las concentraciones de cobalto en el agua y los niveles de producción de especies comunes en aguas Suecas, tomando en consideración sus tasas de crecimiento y la forma en que se ven afectadas por el Co.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área de estudio

El fiordo de Gullmar, el cual se encuentra localizado a lo largo de la Costa Oeste de Suecia, entre Göteborg y Tjörn, ha sido objeto de frecuentes observaciones oceanográficas y biológicas. Una característica de que lo diferencia es el hecho de que es el único fiordo en Suecia que presenta un manto. El fiordo mide 30 km de largo y 3 km de ancho, con una profundidad máxima de 120 m, y con una profundidad en el manto de 45 m (Lindahl y Hernroth 1983). La estratificación del agua dentro del fiordo es permanente e importante. Normalmente se forman tres capas en la columna de agua.

La primera es una capa superficial muy delgada que se extiende hasta una profundidad de aproximadamente 20 m. Este cuerpo de agua, el cual proviene de la Corriente del Báltico y por lo tanto posee altos niveles de nutrientes, domina la zona eufótica del fiordo y es de baja salinidad (18–30). Por debajo de esta se encuentra un cuerpo de agua cuyo origen es del Skagerrak, esta agua

Efectos del cobalto (Co) en especies marinas de fitoplancton.

¹*Linares, F. y ²Croot, P.

Recibido: 1 de Junio de 2011.

Aceptado: 1 de Septiembre de 2011.

Publicado: 1 de Noviembre de 2011.

Tabla 1. Ubicación de las estaciones de muestreo analizadas durante el crucero de investigación a bordo del R/V Skagerak, así como aquellas ubicadas en el Fiordo de Gullmar; se incluye la profundidad máxima y la de muestreo. * Información de profundidad se muestra solo para las estaciones en las que se colecta agua.

Estación	Latitud	Longitud	Prof. (m)	Prof. muestreo (m)*	Comentario
OT1	58°11'N	11°27'E	15	5,12	Ellösefjord
OT2	58°13'N	11°32'E	14,5	5	SO de Koljöfjord
OT3	58°18'N	11°34'E	43	10,30	Kungsviken
OT4	58°16'N	11°40'E	55	5,30	Kalvöfjord
OT5	58°18'N	11°46'E	41	5,30	Havstensfjord
OT6	58°20'N	11°52'E	46	5,30	Byfjorden (Uddevala)
OT7	58°12'N	11°51'E	25	5	Ljungkile
OT8	58°06'N	11°48'E	37	5,25	Stenungsund
OT9	57°55'N	11°41'E	51	3,10,30	Marstrand (Älgön)
GF1	58°19'N	11°32'E	119	5,6,20,50,90	Djuphalan
GF2	58°16'N	11°29'E	57	7,8,20	Ingela's
GF3	58°23'N	11°37'E	61	4,5,8,20	Bjorkholmen
GF4	58°15'N	11°22'E	53	1,12	Fjord entrance

Tabla 2. Número de clon, medio de cultivo y origen de las especies de fitoplancton muestreadas.

Especie	Clon No.	Medio	Aislado por	Origen
Dinoflagellates				
<i>P. micans</i> ¹	LAC 44	f/2 - Si		Lund
<i>A. carterae</i>	LAC 1	f/2 - Si	E. Graneli	Lund
Prymnesiophyta				
<i>E. huxleyi</i>	92A	f/2 - Si	W. Blackley	MarBot
<i>P. parvum</i>	LAC 39	f/2 - Si		Lund
<i>P. pouchetii</i>	LAC 31	f/2 - Si	L-Å. Gisselson	Lund
<i>C. polylepis</i>	LAC 52	f/2 - Si	L. Elder	Lund
Cyanobacteria				
<i>Synechococcus</i> sp.	DC2	f/2 - Si	L. Brand	MarBot
Diatoms				
<i>Chaetoceros</i> sp.	LAC 19	f/2 + Si	L-Å. Gisselson	Lund

presenta una salinidad que oscila entre 31–33 y normalmente cubre un rango de profundidad que va de 20 a 50 m. Finalmente existe un cuerpo de agua profundo que se encuentra por debajo de la profundidad del manto, con salinidad que varía de 34–35, que proviene del Mar del Norte y que cubre la mayor parte de la cuenca profunda del fiordo (45–120 m). Se puede encontrar una termoclina algo pronunciada dentro del fiordo de Mayo a Septiembre a una profundidad de 15 a 20 m (Lindahl y Perissinotto 1987). El Fiordo de Gullmar se ve afectado por cambios en los patrones de viento que afectan la aparición y distribución vertical de distintas masas de agua. Es importante mencionar que el agua que se encuentra por debajo del manto, esto es, el agua cuerpo de agua profunda, es remplazada normalmente solo a finales del invierno o a principio de la primavera cuando las condiciones

permiten una circulación profunda (Lindahl y Dahl 1988).

Experimentos de Campo

Muestras de agua de mar fueron colectadas para su análisis a lo largo de la costa Noroeste de Suecia y dentro del Fiordo de Gullmar. Del 27 al 31 de Julio se realizó un crucero de investigación a bordo del "R/V Skagerrak", donde se colectaron muestras de nueve estaciones (OT1–OT9) a lo largo de la costa Noroeste de Suecia. En adición a esto, muestras de agua también fueron colectadas para su análisis en cuatro diferentes estaciones dentro del Fiordo de Gullmar, aunque estas muestras solamente fueron usadas para el desarrollo del método de detección de Co. La posición, profundidad de la estación y la profundidad de muestreo se muestran en la Tabla 1. En todas las

Efectos del cobalto (Co) en especies marinas de fitoplancton.

¹Linares, F. y ²Croot, P.

Recibido: 1 de Junio de 2011.

Aceptado: 1 de Septiembre de 2011.

Publicado: 1 de Noviembre de 2011.

estaciones se obtuvo un perfil de clorofila *in situ* utilizando un CTD (Conductividad, Temperatura y Profundidad). Muestras para el análisis de trazas metálicas, además de muestras para el análisis de pigmentos y nutrientes fueron colectadas usando botellas Go-Flo a diferentes profundidades dependiendo tanto de la clorofila máxima y la máxima profundidad.

Muestreo de Trazas Metálicas

Las muestras de polietileno usadas para las muestras de trazas metálicas fueron lavadas con 1M de HCl previo a su uso, enjuagadas con agua Milli-Q (18.2 MOhmz de calidad de agua), y enjuagadas con agua de la muestra dos veces antes de llenar la botella. Finalmente, las botellas fueron colocadas dentro de bolsas de polietileno y dentro de un refrigerado hasta que fueran analizadas. A lo largo del muestreo se tuvo especial cuidado con el manejo del agua para evitar cualquier tipo de contaminación por metales.

Todas las muestras fueron filtradas utilizando presión de aire a través de un filtro Nuclepore (0.4 μm) antes de ser analizadas. Todos los experimentos voltamétricos se llevaron a cabo usando un voltámetro $\mu\text{Autolab}$ (Echochemie) con una celda voltamétrica Metrohm VA 663, la cual estaba conectada un electrodo de gota de mercurio (EGM), el voltámetro y el EGM fueron controlados por computadora con el programa GPES 4.4 (Echochemie) para Windows.

Análisis of Cobalto

Una solución buffer de amonio 1M fue preparada al añadir 16 mL de $\text{NH}_{4\text{conc}}$ a 174 mL de agua Milli-Q, se añadieron también 10 mL de HCl concentrado. Una solución 5M de nitrito, la cual ayuda a mejorar la señal del cobalto, fue preparada al añadir 34.5 g de NaNO_2 a 100 mL de agua Milli-Q. Finalmente, una solución 10 mM de Nioxime (ciclohexano-1,2-dicetona dioxime) fue usada para la formación de un complejo Co(II)-nioxime. Para la determinación del blanco, agua de mar del Océano Atlántico que había sido previamente digerida por UV, fue utilizada. Esta agua fue purificada al pasarla a través de una columna Chelex-100, la cual tiene una eficiencia para

remover cobalto del 95% (Vega y van den Berg 1997). Para la determinación del cobalto disponible por voltametría adsorptiva de redisolución catódica (VARC), 20 mL de muestra fueron puestos en la celda voltamétrica, el pH fue ajustado con la adición de 400 μL del buffer pH 9.1 de amonio (1M). Después de esto, se añadieron 40 μL de 10 mM nioxime y 4 mL de 5M NaNO_2 . La muestra fue purgada durante cuatro minutos antes de la digestión por nitrógeno; esto fue hecho para remover al oxígeno disuelto de la muestra (Bobrowski 1990; Bobrowski y Bond 1992; Donat y Bruland 1988; Gao *et al.* 1996). El potencial de deposición fue de -0.9 V por 60 segundos. Después de la medición inicial, adiciones subsecuentes de 40 μL de 50 nM (nanomol/Kg) Co fueron hechas para mejorar la señal. Concentraciones de cobalto fueron calculadas utilizando la información estándar de las señales de adición.

El cobalto total fue calculado con el mismo procedimiento previamente descrito, excepto que las muestras fueron irradiadas con luz UV para romper cualquier tipo de complejos orgánicos. Se utilizó un sistema UV (ACE Glass), el cual tenía una lámpara UV de 1200 W. Las muestras fueron irradiadas durante 3 horas en tubos de cuarzo que habían sido previamente limpiados con ácido.

Experimentos de laboratorio

Se realizaron experimentos utilizando cultivos para determinar la respuesta de especies de fitoplancton a diferentes concentraciones de cobalto. En casi todos los experimentos, agua de mar filtrada (0.4 μm de diámetro de poro) para el medio de cultivo fue colectada en la Estación de Investigación Marina de Kristineberg, en el Fiordo de Gullmar, utilizando una bomba de agua profunda. Las únicas excepciones fueron tres experimentos en los que las replicas fueron realizadas utilizando agua de mar filtrada del Atlántico (Ocean Scientific International, General Purpose Seawater, GPS-1). En todos los cultivos la salinidad fue ajustada a 26 con la adición de agua Milli-Q.

Varios puntos necesitan ser discutidos cuando se quiere crecer cultivos de fitoplancton utilizando poblaciones naturales y agua de mar natural, con la intención de evitar cualquier tipo de

contaminación en el medio de cultivo y para obtener resultados que sean lo mas cercanos posibles a lo que sucede en la naturaleza. El primero de estos puntos es el uso de contenedores de vidrio y de plástico para los cultivos. Se ha encontrado que la adsorción de varios metales en las superficies de cristales y de plásticos es rápida y extensa (Huntsman y Sunda 1980). La contaminación por metales en muestras de agua analizadas ha eliminado la evidencia de limitación de trazas metálicas en el medio (Brand *et al.* 1983). Existe también la tendencia del fitoplancton y de las bacterias de crecer y acumularse en las paredes de estos contenedores, que producen densas poblaciones que se encuentran distribuidas de manera desigual, y que no se asemejan a las que se encuentran en la naturaleza.

El segundo punto tiene que ver con los cambios químicos del medio de cultivo y de los metales que han sido añadidos a este en la escala del tiempo. En la mayoría de los casos, la adición de un quelante a un medio rico en metales requiere un periodo de equilibrio en el cual de forma el complejo quelante-metal. Si esto no se mantiene en mente, los resultados obtenidos podrían incluir errores y por lo tanto una interpretación precisa de los cambios en crecimiento es imposible. En todos los casos, el agua de mar utilizada en los medios de cultivo fue esterilizada utilizando la técnica de microondas descrita por Keller *et al.* (1988). Esta técnica es rápida y no contamina el medio de cultivo con trazas metálicas, y tampoco causa precipitación. Todas las soluciones stock y de nutrientes fueron esterilizadas en la misma forma que el agua de mar.

El medio de cultivo para todos los experimentos fue preparado de la siguiente forma: 50 μL de 0.886 M nitrato (NO_3^-), 0.0746 M fosfato (PO_4^{3-}) y 10 mM de hierro (FeIII) como complejo de citrato fueron añadidos, cada uno, como nutrientes; además, se añadieron 50 μL de 0.089 M silicato a las diatomeas. 50 μL de una solución stock de vitaminas f/2 se añadieron solamente a los cultivos control. 100 μL de 50 mM (0.05M) EDTA (ácido etilen-diamino-tetra-acético) fueron añadidos a cada cultivo como agente para formar complejos, para una concentración final de 100 μM EDTA. Finalmente, adiciones de cobalto fueron hechas al

añadir 10 μL y 100 μL de 50 μM cobalto para una concentración final de 10 nM y 100 nM respectivamente, dejando un cultivo sin adición de cobalto. Todos los cultivos se hicieron con cuatro replicas para cada concentración de Co (0, 10 y 100 nM), mientras que un solo experimento tuvo tres replicas.

Todos los cultivos fueron inoculados con 1mL de cultivos stock de fitoplancton para cada una de las especies que fueron estudiadas. Aquellos que fueron cultivados en el departamento de Química Analítica y Marina (AMK) permanecieron bajo constante iluminación a una temperatura de 22 °C, mientras que los que crecieron en el departamento de Botánica Marina (BM) estuvieron bajo un ciclo de iluminación (11 hL:13 hO) proporcionado por lámparas fluorescentes blancas.

Las especies control en los cultivos (Tabla 2) incluyeron cuatro Prymnesiophyta (*Emiliana huxleyi*, *Prymnesium parvum*, *Phaeocystis pouchetii* y *Chrysochromulina polylepis*), una diatomea (*Chaetoceros* sp.), dos dinoflagelados (*Prorocentrum micans* y *Amphidinium carterae*) y una cianobacteria (*Synechococcus* sp.). Del primer set de experimentos (AMK), la fluorescencia de la clorofila a fue obtenida diariamente utilizando un fluorómetro. Estos cultivos incluían a *P. micans*, *A. carterae*, *C. polylepis* y *Synechococcus* sp.

De los cultivos realizados en MB, solamente cuatro especies respondieron al medio de cultivo y fueron utilizadas en los experimentos del cobalto. Tres de ellas (*P. parvum*, *P. pouchetii* y *E. huxleyi*) fueron contadas diariamente durante cinco días utilizando un Citómetro de Flujo FACSCalibur (Becton y Dickinson), mientras que *Synechococcus* sp. fue contada manualmente cada segundo día durante 10 días utilizando un microscopio de luz. Las concentraciones de células por litro fueron calculadas y graficadas.

RESULTADOS

Desarrollo del método de detección del CoII

La primera etapa involucro el desarrollo de un método de detección de Co que se adapte a las necesidades de las muestras a analizar. Utilizamos

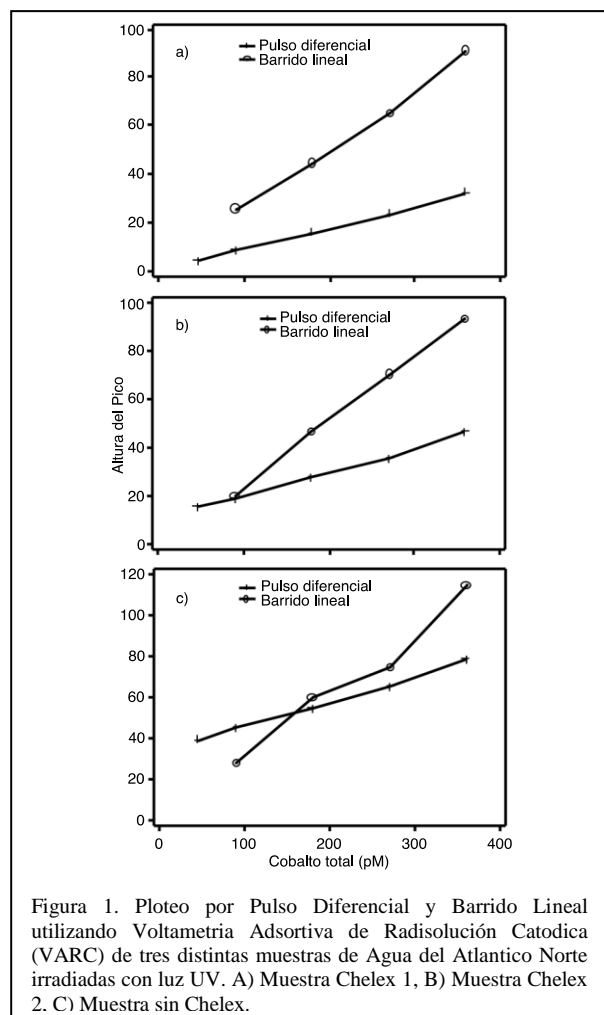
voltimetría adsorptiva de redisolución catódica, (VARC) para la determinación de cobalto disponible y total.

La medición del blanco fue de 46 pM (picomol/Kg) (± 12 pM 3SD) y la precisión analítica al nivel de 100 pM fue aproximadamente de 6%.

Adiciones estándar de Co a agua de mar del Atlántico Norte, previamente irradiada con luz UV, se muestran en la Fig. 1, estas muestras habían sido introducidas a través de una columna Chelex y después fueron analizadas utilizando pulso diferencial (PD) y barrido lineal (BL). En todos los casos encontramos que la sensibilidad [$\text{nA nM}^{-1} \text{min}^{-1}$] era mas alta con BL que con PD, sin embargo el cociente entre la señal obtenida y el ruido

producido por el método era mejor con PD. Para todas las adiciones de Co, obtuvimos una respuesta lineal con PD, mientras que BL mostro respuestas no lineales a altas concentraciones de Co con un cambio en el potencial de pico, lo cual complicaba más el análisis del pico máximo.

Un ejemplo de experimentos con adiciones estándar en agua en agua que no ha sido irradiada con luz UV, usando PD y BL puede ser observado en la Fig.2. En este caso, tres distintas muestras (dos del Fiordo de Gullmar: GF3 colectada en 970613 y GF2a en 970709; y una del Mar de Skagerrak colectada en 961002) fueron analizadas utilizando PD y BL. Estas muestras se comportaron de forma similar que las muestras de la Fig.3. Mientras que la sensibilidad también fue mas alta con BL que con PD, PD proporciono mejores respuestas lineares que BL.



Experimentos de Campo

Las concentraciones de cobalto disponible y total para las muestras colectadas a lo largo de la costa Oeste de Suecia (muestras OT), de Orust a Tjörn, se muestran en la Tabla 3. Se incluye también los cocientes entre Co disponible/total para las mismas muestras OT. Las concentraciones mas bajas de cobalto fueron encontradas en la estación OT (Stenungsund) a 25 metros (ca. 150 pM), mientras que la concentración mas baja de cobalto disponible se encontró en la estación OT5 (Fiordo de Havstens) a 30 metros de profundidad (ca. 30 pM). La temperatura *in situ*, la salinidad y la clorofila a para las estaciones OT1 a OT9 fueron graficadas en la Fig.3. Finalmente, la concentración de cobalto total (pM) obtenido en cuatro estaciones del Fiordo de Gullmar, en dos distintas fechas (4 de Julio y 29 de Agosto, 1997) se muestran en la Fig. 4. En general, los datos muestras que en el fiordo, las concentraciones de Co son más altas en regiones cercanas a la tierra, hacia la región de Bjorkholmen.

Experimentos de laboratorio

Resultados de los experimentos con cultivos en el laboratorio se muestran en la Fig. 5.

Tasas de crecimiento relativas (μ), las cuales representan duplicaciones por día calculadas a partir del Log de la clorofila *a in situ*, fueron

Efectos del cobalto (Co) en especies marinas de fitoplancton.

¹Linares, F. y ²Croot, P.

Recibido: 1 de Junio de 2011.

Aceptado: 1 de Septiembre de 2011.

Publicado: 1 de Noviembre de 2011.

comparadas, para cada especie de fitoplancton, con las concentraciones estimadas de cobalto disponible (pCo). Se hizo distinción entre los agentes de formación de complejos EDTA y DTPA (ácido dietilen-triamino-pentacético), ya que parecían afectar los resultados de forma distinta, debido a las diferencias observadas en las concentraciones de metales libres de otros metales involucrados, particularmente Zn (ver Tablas 4a,b).

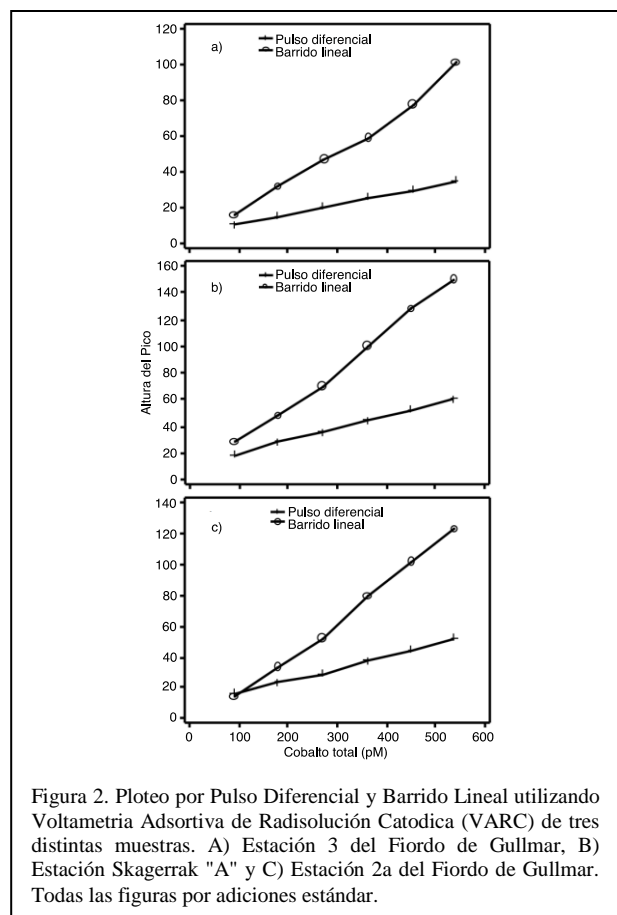


Figura 2. Ploteo por Pulso Diferencial y Barrido Lineal utilizando Voltametría Adsorptiva de Radisolución Catódica (VARC) de tres distintas muestras. A) Estación 3 del Fiordo de Gullmar, B) Estación Skagerrak "A" y C) Estación 2a del Fiordo de Gullmar. Todas las figuras por adiciones estándar.

DISCUSIÓN

Desarrollo del Método de Detección del Co (II)

Avances recientes en técnicas de muestreo y métodos analíticos para la medición de trazas metálicas en aguas naturales han permitido, hasta cierto punto, avances extensos en el entendimiento de la química de trazas metálicas en el océano (Jickells y Burton 1988).

En un primer grupo de experimentos se probó el efecto catalítico del nitrito. Según Bobrowski y Bond (1992), la sensibilidad de un complejo de cobalto (*i.e.* Co-DMG, Co-Nioxime) es mejorada hasta 20 veces por el efecto catalítico del nitrito; nuestras pruebas mostraron dicho incremento en la señal del Co y todos los subsecuentes experimentos contenían nitrito en ellos (Figuras 1 y 2).

Mientras desarrollábamos nuestro método de detección de Co, un artículo de Vega y van der Berg (1997) fue publicado. El método descrito por Vega y Van den Berg era similar a la metodología que nosotros habíamos desarrollado, basado en el trabajo de Bobrowski y Bond (1992), para la determinación directa de niveles picomolares de cobalto por VARC utilizando un complejo cobalto-nioxime con catálisis por nitrito. Utilizamos el método de Vega y van den Berg, durante el resto de nuestros experimentos, sin ningún tipo de modificación a su protocolo.

Una pregunta importante que surgió mientras realizábamos nuestras mediciones de la traza metálica fue: ¿qué especie de cobalto es la que estaba siendo medida por método VARC? De acuerdo con Byrne *et al.* (1988), Co^{2+} forma solo complejos débiles en agua de mar y a pH de 8.2 hasta un 74% del metal se encuentra en forma de ion libre hidratado. Por otro lado, de acuerdo a Zhang *et al.* (1990), Co (II) puede formar complejos orgánicos fuertes en agua de mar. Sin embargo, durante de la etapa de deposición del método VARC por PD, la mayoría de los complejos orgánicos de Co^{3+} son reducidos a Co^{2+} (e.g. Costa *et al.* (1971) encontró que complejos de Co^{3+} -DMG parecían sufrir una reducción irreversible a Co^{2+}), y por lo tanto el analito medido por el voltámetro se cree que es Co^{2+} .

VARC mide los iones metálicos libres y metales que son fácilmente disociados de complejos o de partículas coloidales. Este método no mide, por si mismo, el contenido total de cobalto pero si mide la cantidad del analito en forma libre. Este cobalto libre puede ser visto como un análogo de la forma biológica disponible del metal, el cual incluiría la forma iónica libre, así como cualquier otra especie que pueda ser desasociada fácilmente en una

Efectos del cobalto (Co) en especies marinas de fitoplancton.

¹*Linares, F. y ²Croot, P.

Recibido: 1 de Junio de 2011.

Aceptado: 1 de Septiembre de 2011.

Publicado: 1 de Noviembre de 2011.

solución acuosa. Ciertos complejos metálicos se encuentran unidos a compuestos orgánicos de forma que estos no pueden ser separados durante la escala de tiempo de nuestras mediciones, y por lo tanto el

Bobrowski (1990) reportó una mejor sensibilidad utilizando BL para el sistema Co-nioxime nítrico. Curiosamente, cuando comparamos los resultados de la figura 3.2 con las muestras que fueron irradiadas por luz UV (Figura 1); la sensibilidad se redujo solo ligeramente, indicando un efecto pequeño del material surfactante natural el cual puede competir por espacio en la gota de mercurio. Observamos respuestas lineares a las adiciones de cobalto por PD, y señales significativas de Co en la adición de nivel cero, lo cual puede indicar lo siguiente: (1) formación de fuertes complejos orgánicos de Co por el Co residual no disponible, (2) la existencia de una cantidad de Co-nioxime disponible en la muestra original y (3) la rápida formación de complejos del Co añadido por nioxime, sugiriendo que la competición de

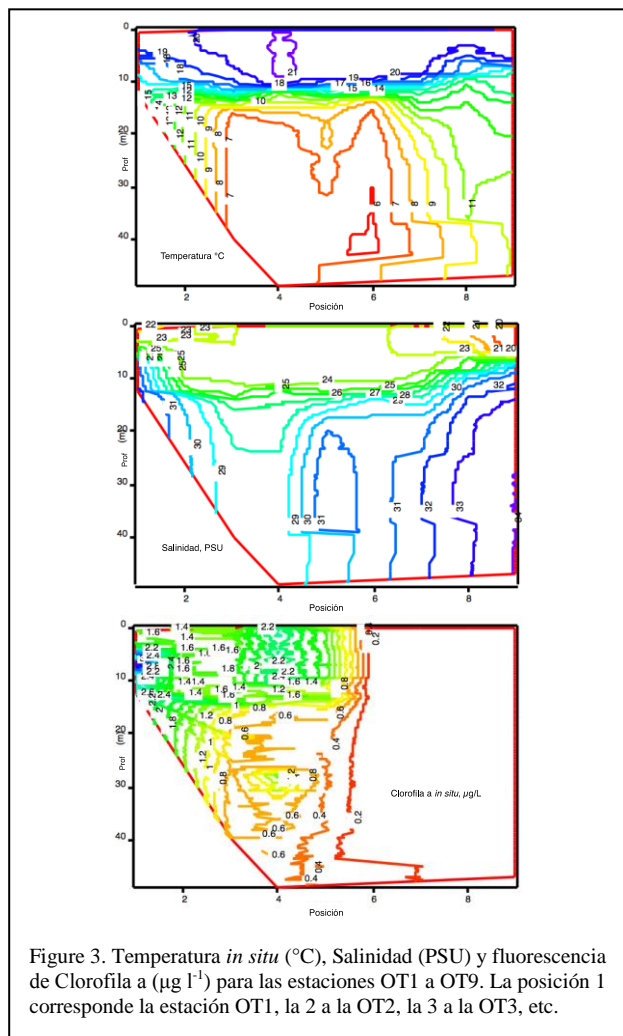


Figure 3. Temperatura *in situ* (°C), Salinidad (PSU) y fluorescencia de Clorofila a ($\mu\text{g l}^{-1}$) para las estaciones OT1 a OT9. La posición 1 corresponde a la estación OT1, la 2 a la OT2, la 3 a la OT3, etc.

el metal no es detectado. Para la medición de cobalto total, la irradiación UV de la muestra destruye estos complejos orgánicos de cobalto, permitiendo que el cobalto inorgánico pueda ser medido directamente por VARC.

Inicialmente examinamos la sensibilidad para cobalto usando el protocolo de Vega y van der Berg, bajo condiciones de pulso diferencial (PD) y de barrido lineal (BL) (Figuras 1 y 2). Vega y van der Berg encontraron que PD proporcionaba mejores resultados utilizando nioxime, sin embargo

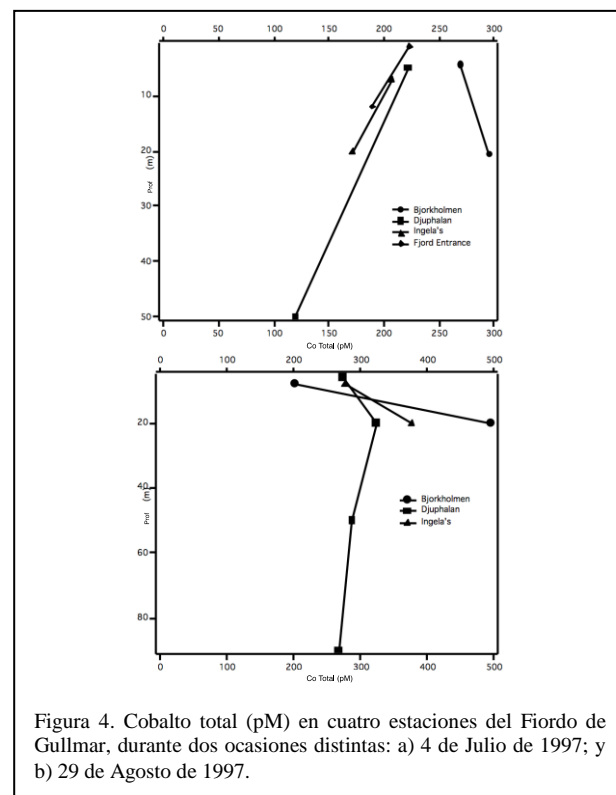


Figura 4. Cobalto total (pM) en cuatro estaciones del Fjord de Gullmar, durante dos ocasiones distintas: a) 4 de Julio de 1997; y b) 29 de Agosto de 1997.

complejos naturales de Co es pequeña o inexistente. Con base en los experimentos previamente descritos, concluimos que PD sería el mejor método

Efectos del cobalto (Co) en especies marinas de fitoplancton.

¹*Linares, F. y ²Croot, P.

Recibido: 1 de Junio de 2011.

Aceptado: 1 de Septiembre de 2011.

Publicado: 1 de Noviembre de 2011.

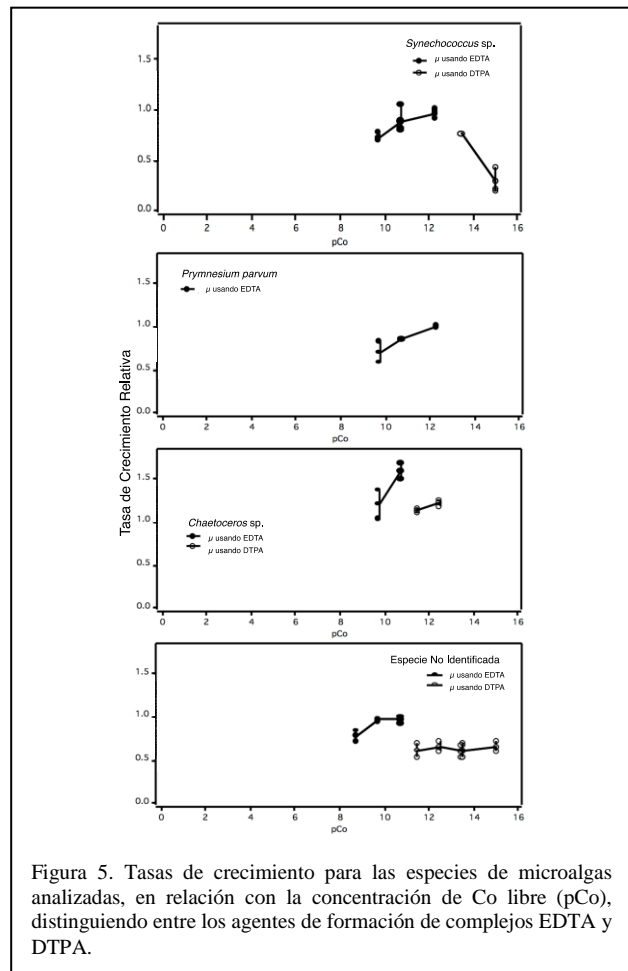


Figura 5. Tasas de crecimiento para las especies de microalgas analizadas, en relación con la concentración de Co libre (pCo), distinguiendo entre los agentes de formación de complejos EDTA y DTPA.

para la determinación de cobalto disponible y total. Esto es en contraste con lo que Bobrowski y Bond (1992) sugieren, quienes encontraron que BL resultaba en una mejor resolución y mostraba ventajas relacionadas con la velocidad de medición; sin embargo, sus experimentos hicieron uso de DMG como agente para la formación de complejos, mientras que nosotros decidimos usar Nioxime. De acuerdo a Donat y Bruland (1988), Nioxime tiene un alto nivel de selectividad para Co, similar al de DMG, y forma complejos con Co (II) mejorando la adsorción en el electrodo de gota de mercurio. También encontraron que la sensibilidad del Co en presencia de Nioxime era de 2.5 a 20 veces más grande para muestras con un buffer de amonio que aquellas en presencia de DMG. Finalmente, Nioxime forma complejos mas fuertes con Co (II), además de que Zhang *et al.* (1990) había

demostrado que el lapso de detección de DMG era mas débil que en complejos naturales.

Experimentos de Campo

En el transecto OT (Tabla 1), las concentraciones más altas de cobalto total y disponible fueron encontradas en la superficie en la estación OT4 (cerca del fiordo Kalvö). Sin embargo, los valores en esta estación son inusualmente grandes (ca. 1200 pM para el cobalto total y el disponible), comparados con los de las otras estaciones, lo cual puede indicar que las muestras estaban contaminadas antes de ser analizadas. También es posible, sin embargo, que haya existidos escurrimientos industriales en la zona. Según el Reporte de la Química del Agua de Mar IV del Departamento de Química Analítica y Marina (GU/CTH) (1967) (AMK 1967), se encontraron niveles muy bajos de O₂ en el sistema de fiordos de Uddevalla, particularmente en Koljo (58°13.65N 11°34.40E) y Byfjorden (58°20.00N 11°52.65E). Adicionalmente sugieren que posiblemente existan altos niveles de metales en Havstensfjord (58°18.60N 11°45.20E) probablemente causado por las industrias localizadas cerca de Stengunsund. Estas muestras tenían un olor suboxico y análisis subsecuentes demostraron que se encontraban otros metales en la muestra, como el Cu y el Zn, en altas concentraciones (Croot, *pers. comm.*).

De la información colectada en los sitios OT es claro que la concentración de cobalto era mas alta en la superficie decreciendo gradualmente con la profundidad (Tabla 1), de acuerdo con Granéli y Haraldsson (1993), en aguas costeras las concentraciones de trazas metálicas pueden ser apreciablemente mas altas que en mar abierto debido a la adición de metales provenientes de agua de rio. Por otro parte, se estima que dos tercios del flujo de cobalto al Océano se deriva de agua que proviene de los ríos (Chester 1990).

Lo que es aun mas interesante es que las concentraciones de cobalto fueron, en general, mas altas en la Costa Oeste de Suecia que en el Skagerrak (ver Croot *et al.* 2002). La influencia de la Corriente del Báltico se aprecia claramente en la Costa Oeste de Suecia. En este aspecto, agua del

Atlántico Norte analizada por Granéli y Haraldsson (1993) contenía cerca de 20 pM de Co total, mientras que las concentraciones fueron un poco más altas para el Báltico y el Kattegat.

que predominan en el área durante esa temporada. Finalmente, aunque tampoco obtuvimos información de pigmentos para las estaciones del fiordo de Gullmar; lo que es interesante notar es que

Tabla 3. Cobalto total y disponible para las estaciones OT. Se muestra el cobalto no disponible, así como el cociente de Cobalto disponible/total.

Estación	Prof. (m)	Disponible [Co] pM	Total [Co] pM	No Disp. [Co] pM	Disp./Tot [Co]
OT1	5	167	224	57	0.75
OT1	13	94			
OT2	5	105	262	157	0.4
OT3	10	159	392	232	0.41
OT3	30	699	174		4.01a
OT4	5	1250	1161		1.08b
OT4	30	454	586	132	0.78
OT5	5	267	513	246	0.52
OT5	30	28	181	153	0.16
OT6	5	308	358	50	0.86
OT6	30	405	384		1.05b
OT7	5	258	335	76	0.77
OT8	5	121	202	80	0.6
OT8	25	82	149	67	0.55
OT9	3	144	184	40	0.78
OT9	10	150	185	35	0.81
OT9	30	62	164	102	0.38

De acuerdo con la Tabla 1, las concentraciones más altas de cobalto no disponible para las estaciones OT también se encontraron en la superficie en las estaciones OT3 y OT4, las cuales fueron las que presentaron los valores más altos de cobalto total y disponible. El cociente de cobalto disponible/cobalto total (Tabla 1) muestra que por lo menos un 50% del cobalto que se encuentra en la superficie está en forma disponible, con valores que incrementan a un 80–85% en las estaciones OT6 y OT7 (Byfjorden cerca de Uddevalla). Cuando se

comparan estos valores con la fluorescencia *in situ* (Figura 4), las algas mostraron una tendencia a concentrarse en la capa de mezcla y se congregaron just por encima de la picoclina, donde se encuentra la mayor parte del cobalto disponible.

No fue posible obtener información individual de pigmentos para las estaciones OT, y por esta razón no podemos obtener ningún tipo de conclusión con respecto a que grupos algales son los

los valores de cobalto fueron, en general, más altos en Bjorkholmen, que se encuentra más hacia el interior. Las concentraciones de cobalto tendieron entonces a disminuir en dirección hacia la entrada del fiordo; la importancia de esto es que, bajo condiciones de lo soporten, un florecimiento algal que requiere Co como nutriente puede comenzar desde el interior del fiordo y desplazarse hacia la entrada del fiordo y al mar abierto. Sin embargo, se necesitan más estudios para poder entender mejor estas relaciones.

Experimentos de laboratorio.

Synechococcus sp. pareció ser afectada por DTPA y por bajas concentraciones de Co (Figura 3.5), mientras que creció bastante bien con EDTA y con altas concentraciones de Co. Granéli y Risinger (1994) encontraron que las tasas de crecimiento del alga *Chrysochromulina polylepis* no se veían afectadas por adiciones de Co que tenían a EDTA como agente de formación de complejos. Sin

Efectos del cobalto (Co) en especies marinas de fitoplancton.

¹Linares, F. y ²Croot, P.

Recibido: 1 de Junio de 2011.

Aceptado: 1 de Septiembre de 2011.

Publicado: 1 de Noviembre de 2011.

Tabla 4a. Composición del medio de iones metálicos libres (EDTA).

Metal	Total [M] nM	log([M]tot/[M]f)	-log([M]f)
Co	0.3	2.72	12.24
Cu	6	5.21	13.43
Cd	0.3	2.87	12.39
Fe	500	11.51	17.81
Mn	100	0.28	7.28
Zn	10	2.91	10.91

Cociente [M]tot/[M]f calculado para cada metal bajo las siguientes condiciones: 10 μ M EDTA en agua marina de KMF (S=26), log K^{*}Co(II)EDTA = 7.72, log K^{*}CuEDTA = 10.21, log K^{*}CdEDTA = 7.87, log K^{*}Fe(III)EDTA = 7.72, log K^{*}MnEDTA = 5.28 y log K^{*}ZnEDTA = 7.91.

Tabla 4b. Composición del medio de iones metálicos libres (DTPA).

Metal	Total [M] nM	log([M] tot/[M]f)	-log([M]f)
Co	0.3	5.51	15.03
Cu	6	7.79	16.01
Cd	0.3	5.44	14.96
Fe	500	14.24	20.54
Mn	100	1.84	8.84
Zn	10	4.64	12.64

Cociente [M]tot/[M]f calculado para cada metal bajo las siguientes condiciones: 10 μ M EDTA en agua marina de KMF (S=26), log K^{*}Co(II)DTPA = 10.51, log K^{*}CuDTPA = 12.79, log K^{*}CdDTPA = 10.44, log K^{*}Fe(III)DTPA = 19.24, log K^{*}MnDTPA = 6.84 and log K^{*}ZnDTPA = 9.64.

embargo, debe notarse que los experimentos que contenían EDTA fueron cultivados en el Departamento de Botánica Marina (MB), mientras que los que contenían DTPA fueron cultivados en el Departamento de Química Analítica y Marina (AMK). Las diferencias en las condiciones de crecimiento pudieron haber afectado también a las tasas de crecimiento de las muestras, ya que notamos que algunas especies nunca crecieron debido a la diferencia en temperatura o la falta de algún nutriente cuando estuvieron en AMK.

La biomasa y la productividad de especies de picoplancton en el mar (*i.e.* *Synechococcus* sp.), es tal que estas especies juegan un papel significativo en el reciclaje de metales en ecosistemas marinos; adicionalmente, estas especies son importantes en el Skagerrak durante el verano (Karlson y Nilsson 1991). Fisher (1985) encontró que la acumulación de metales por parte de *Synechococcus* sp. era rápida, estableciendo un equilibrio después de 24 horas. Adicionalmente,

células de *Synechococcus* sp. acumulaban metales en proporción a la concentración del metal disuelto que se encontraba en el medio de cultivo. En nuestros experimentos, *Synechococcus* sp. fue de las especies que creció bien a pesar de la falta de enriquecimiento nutricional (*i.e.* B₁₂) y las tasas observadas parecen indicar que *Synechococcus* sp. no necesita B₁₂ para crecer, y también de que tiene bajos requerimientos de Co. En este aspecto, Sunda y Huntsman (1995) encontraron que a pesar del pequeño diámetro celular de *Synechococcus* sp. (ca. 0.7 μ m), el cual incrementa la difusión de trazas metálicas a través de la célula debido a su alto cociente de superficie: volumen, las tasas de asimilación de Co fueron de un tercio a una decima parte de aquellas encontradas en otras especies de algas.

El hecho de que en nuestros experimentos *Synechococcus* sp. parecía no ser afectada por altos niveles de Co (Figura 5) indica que su requerimiento no es absoluto, pero que sin embargo existe. Sunda y Huntsman (1995) encontraron esta misma tendencia con *Synechococcus bacillaris* y subsecuentemente encontraron que el alga parecía necesita Co pero no Zn para crecer. En este sentido, durante uno de nuestros primeros experimentos, encontramos un efecto negativo en el crecimiento de *Synechococcus* sp. cuando se añadió Zn al medio de cultivo con DTPA.

Las tasas de crecimiento en *Prymnesium parvum* (Fig. 5) disminuyeron conforme los niveles de Co aumentaron, esto puede indicar que el alga no presenta un requerimiento estricto para Co²⁺ pero puede requerir de B₁₂; es posible también que el Co este compitiendo con el Zn a altas concentraciones, mostrando por lo tanto el resultado obtenido. Sin embargo, el único agente para formación complejos que se uso fue EDTA y por lo tanto no se pudo realizar ninguna comparación con otros agentes de formación de complejos. Muggli y Harrison (1996) encontraron que existía un efecto del EDTA en células algales cuando este se encontraba en altas concentraciones. Algunos estudios han demostrado que cuando se añade Co en forma de B₁₂, la producción de metionina incrementa en *Prymnesium parvum* (Swift 1980). *Prymnesium parvum* es una Haptophyta que puede provocar

Efectos del cobalto (Co) en especies marinas de fitoplancton.

¹Linares, F. y ²Croot, P.

Recibido: 1 de Junio de 2011.

Aceptado: 1 de Septiembre de 2011.

Publicado: 1 de Noviembre de 2011.

florecimientos algales nocivos (van den Hoek *et al.* 1995). Swift (1980) argumenta que la mayoría de las especies de Haptophyta requieren solamente de tiamina, sin embargo algunas especies requieren también de Co en forma de B₁₂ además de la tiamina.

Chaetoceros sp. (Fig. 5) mostró un incremento en su tasa de crecimiento cuando contenía EDTA, pero no mostró ningún efecto aparente a bajas concentraciones de Co con DTPA. Sin embargo, las diferencias en estas tasas de crecimiento fueron significativas cuando comparamos a estos dos agentes. Ambos sets de experimentos tenían las mismas condiciones y las diferencias se atribuyen ya sea al agente mismo (*i.e.* EDTA o DTPA), o a que el alga se vio afectada negativamente por las adiciones de Co. Zuleika Segatto (1996) encontró que la biomasa de la diatomea marina *Skeletonema costatum* se veía afectada por adiciones de Co. Otra posible explicación puede ser que la mayoría de las diatomeas requieren de Co en forma de B₁₂ para crecer (Swift 1980), mientras que solamente un porcentaje muy pequeño no tiene ningún tipo de requerimiento.

Finalmente, cultivamos una microalga verde (Fig. 5), que presentaba dos flagelos (380 μm³ de volumen, esférica con un radio de 4.5 μm³ y aislada en Marzo de 1997 en la Estación de Investigaciones Marinas de Kristineberg (KMF)). Esta alga fue cultivada bajo distintos niveles de pCo utilizando los dos agentes de formación de complejos (EDTA y DTPA). Mientras que alga creció bien en todas las concentraciones de Co, hubo algunas diferencias menores con respecto a los agentes usados. DTPA tuvo un efecto mínimo en el crecimiento del alga, mientras que EDTA promovió mejores tasas de crecimiento. No fue posible para nosotros el identificar al alga, pero con base en estos resultados podemos decir que la especie parece no requerir Co o B₁₂, ya que no hubieron diferencias significativas entre las adiciones y el control. Hay algunas especies de microalgas que no requieren de Co para su crecimiento (Swift 1980), sin embargo, sin la identificación adecuada de la especie en cuestión, no podemos concluir con certeza si la alga requiere o no de Co.

Diferencias entre requerimientos de Co²⁺ y B₁₂ en fitoplancton.

Las especies de fitoplancton utilizadas durante este estudio comprenden un grupo heterogéneo de grupos taxonómicos, las cuales parecen ser afectadas de distintas formas por el Co. La microalga *Synechococcus* sp. mostró un requerimiento de Co²⁺, sin embargo este no fue absoluto. Por otro lado, la Haptophyta *P. parvum* no mostró un requerimiento estricto de Co²⁺ pero no pareció ser afectada por bajas concentraciones de Co. Estudios han demostrado que algunas de estas especies necesitan de B₁₂ para crecer (Swift 1980). Granéli y Risinger (1994) en un experimento de la Haptophyta *Chrysochromulina polylepis* con Co y B₁₂, encontraron que la acumulación de clorofila terminaba después de 8 o 9 días para todos los tratamientos excepto aquellos que tenían vitamina B₁₂ como fuente de Co. Finalmente, la diatomea *Chaetoceros* sp. no presentó ningún requerimiento estricto de Co pero si fue estimulada por el mismo; esto puede ser explicado por el hecho de que esta especie requiere de B₁₂. Swift (1981) encontró que, por lo menos en el Golfo de Maine, en Estados Unidos, diatomeas céntricas presentes durante el afloramiento de primavera no presentaban ningún requerimiento estricto de B₁₂ pero si eran estimuladas por la vitamina.

Como se ha mencionado en otros sitios (Ohwada y Taga 1972; Swift 1980), es posible que las diferencias observadas entre las concentraciones de vitamina B₁₂ y las de otras vitaminas como tiamina o biotina en especies de fitoplancton, pudieran sugerir que tiamina y biotina son producidas y excretadas en el medio por especies dominantes del fitoplancton (siguiendo cercanamente la tendencia de clorofila a); mientras que la vitamina B₁₂ estaría siendo asimiladas por estas mismas especies durante estos periodos (*i.e.* diatomeas auxotróficas). Esto confirmaría entonces la importancia de B₁₂, y de Co²⁺, como nutriente.

Existen diferencias en la forma en que los organismos acumulan Co. En aguas naturales parece provenir directamente de la dieta, mientras que en experimentos en laboratorio el Co es acumulado principalmente desde el agua. Estudios han demostrado que además de asimilar B₁₂ del medio,

Efectos del cobalto (Co) en especies marinas de fitoplancton.

¹*Linares, F. y ²Croot, P.

Recibido: 1 de Junio de 2011.

Aceptado: 1 de Septiembre de 2011.

Publicado: 1 de Noviembre de 2011.

algunas especies de fitoplancton pueden secretar una proteína al medio que hace que la vitamina no este disponible para otros organismos (Droop 1968). De hecho el remplazo de un ligando por otra molécula (ya sea otro ligando o una molécula solvente) es una de las reacciones fundamentales que se pueden presentar con iones metálicos en soluciones, y comúnmente es una característica importante en sistemas biológicos (Costa *et al.* 1971).

CONCLUSIONES

El método de detección de cobalto fue adecuado para la medición de Co total y disponible. Adicionalmente, se obtuvieron mejores resultados con pulso diferencial que con barrido lineal utilizando el sistema de nitrito Co-nioxime.

Casi todo el Co que se encuentra en la superficie esta de forma disponible. A lo largo de la Costa Oeste de Suecia, las concentraciones de Co fueron más altas en la superficie, las cuales fueron disminuyendo conforme aumentaba la profundidad.

Las altas concentraciones de cobalto (total y disponible) pueden ser atribuidas ya sea a escurrimientos locales provenientes de la costa, o al origen del agua, la cual parece provenir del Mar Báltico.

Con base en los experimentos de laboratorio, podemos concluir que por lo menos dos de las especies de fitoplancton analizadas (*Synechococcus* sp. y *Chaetoceros* sp.) requieren de cobalto en forme de ion libre, pero dicho requerimiento no es absoluto. La Haptophyta *P. parvum* no mostro un requerimiento estricto de la forma ionica libre del Co, pero es posible que necesite de B₁₂. Es posible también que el Co este compitiendo con el Zn.

Nuestros resultados muestran que el Co es un micronutriente importante, especialmente cuando se encuentra en forma del complejo Co-cobalamina (B₁₂), la pregunta es si estas especies tienen o no la habilidad de producir B₁₂ para sus procesos metabólicos. Las Haptophyta forman un grupo de microalgas que se encuentran fácilmente en aguas Suecas, y que contiene a especies toxicas formadoras de florecimientos algales nocivos (*i.e.* *P.*

parvum). Con base en nuestros resultados, asumiendo que esta especie tenga un requerimiento de Co como nutriente, un florecimiento de microalgas Haptophyta puede originarse ya sea en el Skagerrak o en la Costa Oeste de Suecia.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo realizado durante este estudio no hubiera sido posible sin la asistencia de las siguientes personas: Dr. Greg Morrison, Dr. David Turner, Dra. Margareta Wedborg y Dr. Bengt Karlson por sus valiosos comentarios al manuscrito original. El personal del departamento de Química Analítica y Marina (AMK), así como el del Departamento de Botánica Marina (MB) por proveer los laboratorios necesarios para realizar los experimentos. El personal del R/V 'Skagerak' y el del 'Arne Tiselius'; así como el personal de la Estación de Investigaciones Marinas de Kristineberg por asistencia logística. El financiamiento de estudio fue proporcionado por una beca de de la Fundación para la Cooperación Internacional en Investigación y Educación de Alto Grado (STINT).

BIBLIOGRAFÍA

- Ahrland, S. (1975). Metal complexes in seawater. In: Goldberg, E. D. (ed.) Dahlem workshop on the nature of seawater. Verlagsgesellschaft, Berlin, p. 219-244.
- AMK. (1967). Analysis of seawater in the Uddevalla fjord system.
- Bobrowski, A. (1990). Determination of Cobalt by Adsorptive Stripping Voltammetry using Cobalt (II)-Nioxime- Nitrite Catalytic System. Analytical Letters. 23: 1487-1503.
- Bobrowski, A., Bond, A. M. (1992). Exploitation of the Nitrite Catalytic Effect to Enhance the Sensitivity and Selectivity of the Adsorptive Stripping Voltammetric Method for the Determination of Cobalt with Dimethylglyoxime. Electroanalysis. 4: 975-979.
- Brand, L. E., Sunda, W. G., Guillard, R. R. L. (1983). Limitation of marine phytoplankton reproductive rates by zinc, manganese and iron. Limnology and Oceanography. 28: 1182-1198.
- Byrne, R. H., Kump, L. R., Cantrell, K. J. (1988). The Influence of Temperature and pH on Trace Metal Speciation in Seawater. Marine Chemistry. 25: 163-181.
- Chester, R. (1990). Marine geochemistry. Unwin Hyman, London; Boston

- Costa, G., Puxeddu, A., Reisenhofer, E. (1971). Polarographic Study of some Schiff's base and Bisdimethylglyoximato Cobalt Complexes: Axial Ligand Exchange. Collection Czechoslovakian Chemical Communications. 36: 1065-1078.
- Donat, J. R., Bruland, K. W. (1988). Direct determination of dissolved cobalt and nickel in seawater by differential pulse cathodic stripping voltammetry preceded by adsorptive collection of cyclohexane-1,2-dione dioxime complexes. Analytical Chemistry. 60: 240-244.
- Droop, M. R. (1968). Vitamin B12 and marine ecology IV: the kinetics of uptake growth, and inhibition in *Monochrysis lutheri*. J. Mar. Biol. Ass. 48: 689-733.
- Fisher, N. (1985). Accumulation of metals by marine picoplankton. Marine Biology. 87: 137-142.
- Fisher, N. S., Reinfelder, J. R. (1995). The trophic transfer of metals in marine systems. In: Tessier, A., Turner, D. R. (ed.) Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. John Wiley and Sons. Ltd., p. 363-406.
- Gao, Z., Siow, K. S., Yeo, L. (1996). Determination of cobalt by catalytic-adsorptive differential pulse voltammetry. Analytica Chimica Acta. 320: 229-234.
- Granéli, E., Haraldsson, C. (1993). Can increased leaching of trace metals from acidified areas influence phytoplankton growth in coastal waters. Ambio. 22: 308-311.
- Granéli, E., Risinger, L. (1994). Effects of cobalt and vitamin B12 on the growth of *Chrysochromulina polylepis* (Prymnesiophyceae). Marine Ecology Progress Series. 113: 177-183.
- Guillard, R. R. L., Cassie, V. (1963). Minimum Cyanocobalamin Requirements of some Marine Centric Diatoms. Limnology and Oceanography. 8: 161-165.
- Harrison, G. I., Morel, F. M. M. (1983). Antagonism between cadmium and iron in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. J. Physiol. 19: 495-507.
- Holm-Hansen, O., Gerloff, G. C., Skoog, F. (1954). Cobalt as an essential element for blue-green algae. Physiol. Plantarum. 7: 665-675.
- Huntsman, S. A., Sunda, W. G. (1980). The role of trace metals in regulating phytoplankton growth. In: Morris, I. (ed.) The Physiological Ecology of Phytoplankton. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p.
- Iswaran, V., Rao, S. (1964). Role of cobalt in nitrogen fixation by *Azetobacter chroococcum*. Nature. 203: 549.
- Jickells, T. D., Burton, J. D. (1988). Cobalt, Copper, Manganese and Nickel in the Sargasso Sea. Marine Chemistry. 23: 131-144.
- Karlson, B., Nilsson, P. (1991). Seasonal distribution of picoplanktonic cyanobacteria of *Synechococcus* type in the eastern Skagerrak. Ophelia. 34: 171-179.
- Keller, M. D., Bellows, W. K., Guillard, R. R. L. (1988). Microwave treatment for sterilization of phytoplankton culture media. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 117: 279-283.
- Knauer, G. A., Martin, J. H., Gordon, R. M. (1982). Cobalt in northeast Pacific waters. Nature. 297: 49-57.
- Lindahl, O., Dahl, E. (1988). On the Development of the *Chrysochromulina polylepis* Bloom in the Skagerrak in May-June 1988. In: al., E. G. e. (ed.) Toxic Marine Phytoplankton. Elsevier, p. 189-194.
- Lindahl, O., Hernroth, L. (1983). Phyto-Zooplankton Community in Coastal Waters of Western Sweden - An Ecosystem Off Balance? Marine Ecology Progress Series. 10: 119-126.
- Lindahl, O., Perissinotto, R. (1987). Short-term variations in the zooplankton community related to water exchange processes in the Gullmar fjord, Sweden. Journal of Plankton Research.
- Martin, J. H., Gordon, R. M. (1988). Northeast Pacific iron distributions in relation to phytoplankton productivity. Deep-Sea Research. 35: 177-196.
- Martin, J. H., Gordon, R. M., Fitzwater, S. E., Broenkow, W. W. (1989). VERTEX: phytoplankton/iron studies in the Gulf of Alaska. Deep-Sea Research. 36: 649-680.
- Moffett, J. W., Ho, J. (1996). Oxidation of cobalt and manganese in seawater via a common microbially catalyzed pathway. Geochimica et Cosmochimica Acta. 60: 3415-3424.
- Morel, F. M. M., Hering, J. G. (1993). Principles and Applications of Aquatic Chemistry. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- Muggli, D. L., Harrison, P. J. (1996). EDTA suppresses the growth of oceanic phytoplankton from the Northeast Subarctic Pacific. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 205: 221-227.
- Murphy, L. S., Guillard, R. R., 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. Biology and Oceanography. 3: 187-201.
- Ohwada, K., Taga, N. (1972). Distribution and Seasonal Variation of Vitamin B12, Thiamin and Biotin in the Sea. Marine Chemistry. 1: 61-73.

Efectos del cobalto (Co) en especies marinas de fitoplancton.

¹*Linares, F. y ²Croot, P.

Recibido: 1 de Junio de 2011.

Aceptado: 1 de Septiembre de 2011.

Publicado: 1 de Noviembre de 2011.

- Price, N. M., Morel, F. M. M. (1990). Cadmium and cobalt substitution for zinc in a marine diatom. *Nature*. 344: 658-660.
- Robertson, D. E., Silker, W. B., Langford, J. C., Petersen, M. R., Perkins, R. W. (1973). Transport and depletion of radionuclides in the Columbia River. In: (ed.) *Radioactive contamination of the marine environment*. IAEA, Vienna, p. 141-158.
- Rueter, J. G., 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*. 26: 67-73.
- Sunda, W. G., 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*. 28: 924-934.
- Sunda, W. G., Huntsman, S. A. (1995). Cobalt and Zinc interreplacement in marine phytoplankton: Biological and geochemical implications. *Limnology and Oceanography*. 40: 1404-1417.
- Swift, D. G. (1980). Vitamins and phytoplankton growth. In: Morris, I. (ed.) *The Physiological Ecology of Phytoplankton*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p.
- Swift, D. G. (1981). Vitamin levels in the Gulf of Maine and ecological significance of vitamin B12 there. *Journal of Marine Research*. 39: 375-403.
- Turner, D. R. (1995). Problems in trace metal speciation modeling. In: Tessier, A., Turner, D. R. (ed.) *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. John Wiley and Sons. Ltd., p. 150-189.
- Van den Hoek, C., Mann, D. G., Jahns, H. M. (1995). *Algae, an introduction to phycology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Vega, M., van den Berg, C. M. G. (1997). Determination of Cobalt in Seawater by Catalytic Adsorptive Stripping Voltammetry. *Analytical Chemistry*. 69: 874-881.
- Zhang, H., van den Berg, C. M. G., Wollast, R. (1990). The Determination of Interactions of Cobalt (II) with Organic Compounds in Seawater using Cathodic Stripping Voltammetry. *Marine Chemistry*. 28: 285-300.
- Zuleika Segatto, A. (1996). Effects of cobalt and humic substances on the growth of bloom-forming marine phytoplankton. Department of Ecology, Marine Ecology. 33.