

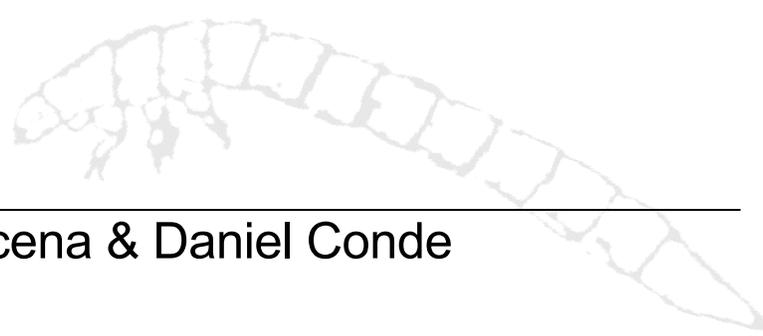
**MÉTODOS EN ECOLOGÍA  
DE AGUAS  
CONTINENTALES**

**CON EJEMPLOS DE  
LIMNOLOGÍA EN URUGUAY**

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA - FACULTAD DE CIENCIAS

editado por

Rafael Arocena & Daniel Conde



# MÉTODOS EN ECOLOGÍA DE AGUAS CONTINENTALES

CON EJEMPLOS DE  
LIMNOLOGÍA EN URUGUAY

INSTITUTO DE BIOLOGÍA  
SECCIÓN LIMNOLOGÍA

MONTEVIDEO  
1999



***MÉTODOS EN ECOLOGÍA DE AGUAS  
CONTINENTALES  
CON EJEMPLOS DE LIMNOLOGÍA EN URUGUAY***

editado por  
Rafael Arocena & Daniel Conde

*Este libro fue editado con el apoyo económico de la  
Comisión Sectorial de Investigación Científica (C.S.I.C.)  
de la Universidad de la República*

Edición D.I.R.A.C. ~ Facultad de Ciencias.

Puesta en página: Gabriel Santoro ~ Carátula: Luis Aubriot.

Foto de tapa: Bañado del Chafalote-Laguna de Castillos; tomada por Wilson Pintos

D.I.R.A.C. (División Relaciones y Actividades Culturales) es una unidad operativa  
de la Facultad de Ciencias. Director de División: Luis Elbert.

Calle Iguá 4225 casi Mataojo - 11400 - Montevideo - Uruguay

Tel. 5251711 - Fax 5258617 - e-mail: [dirac@fcien.edu.uy](mailto:dirac@fcien.edu.uy)

<http://www.fcien.edu.uy>

© Facultad de Ciencias 1999

ISBN: 9974-0-0107-2

*A la memoria del Prof. Wilson Pintos (1945-1998),  
quien iniciara la investigación sistemática  
y la enseñanza de la Limnología en Uruguay,  
alentando permanentemente nuestra formación académica.*

## Los autores\*

---

RAFAEL AROCENA	Prof. Adjunto y Co-Encargado de la Sección Limnología. Investiga el zoobentos, los sedimentos y la calidad del agua.
LUIS AUBRIOT	Ayudante de la Sección Limnología. Investiga la asimilación de nutrientes por microalgas.
SYLVIA BONILLA	Ayudante de la Sección Limnología. Investiga el fitoplancton, el perifiton y la producción primaria.
GUILLERMO CHALAR	Ayudante de la Sección Limnología. Investiga en química del sedimento y zoobentos.
DANIEL CONDE	Prof. Adjunto y Co-Encargado de la Sección Limnología. Investiga en producción primaria y química del agua.
GLORIA DANERS	Asistente del INGEPa ~ Departamento de Paleontología. Investiga en paleopalínología.
LIZET DE LEÓN	Ayudante de la Sección Limnología. Investiga el fitoplancton.
DANIEL FABIÁN	Ayudante de la Sección Limnología. Investiga el zooplancton.
JAVIER GORGA	Ayudante de la Sección Limnología. Investiga en química del agua.
NESTOR MAZZEO	Prof. Adjunto de la Sección Limnología. Investiga las macrofitas y en ecotoxicología.
FLAVIO SCASSO	Asistente de la Sección Limnología. Investiga en necton y recuperación de lagos.

Docentes de la Facultad de Ciencias - Universidad de la República.

# CONTENIDO

---

	<b>Introducción</b>	9
Capítulo 1:	<b>Métodos de investigación en Limnología</b> por Rafael Arocena	11
Capítulo 2:	<b>Morfología</b> por Rafael Arocena	18
Capítulo 3:	<b>Óptica</b> por Rafael Arocena	24
Capítulo 4:	<b>Calor</b> por Rafael Arocena	29
Capítulo 5:	<b>Hidrodinámica</b> por Rafael Arocena	34
Capítulo 6:	<b>Sedimento</b> por Rafael Arocena	40
Capítulo 7:	<b>Gases disueltos</b> por Daniel Conde & Javier Gorga	53
Capítulo 8:	<b>Material disuelto y en suspensión</b> por Daniel Conde, Javier Gorga & Guillermo Chalar	62
Capítulo 9:	<b>Composición iónica</b> por Daniel Conde & Javier Gorga	65
Capítulo 10:	<b>Carbono</b> por Daniel Conde & Javier Gorga	77
Capítulo 11:	<b>Nitrógeno, fósforo y sílice</b> por Daniel Conde, Javier Gorga & Guillermo Chalar	82
Capítulo 12:	<b>Ecología microbiana</b> por Daniel Conde	97
Capítulo 13:	<b>Fitoplancton</b> por Lizet de León, Sylvia Bonilla y Luis Aubriot	107
Capítulo 14:	<b>Epifiton algal</b> por Sylvia Bonilla	128
Capítulo 15:	<b>Microfitobentos</b> por Daniel Conde	133
Capítulo 16:	<b>Hidrófitas</b> por Néstor Mazzeo	142
Capítulo 17:	<b>Zooplancton</b> por Daniel Fabián	165
Capítulo 18:	<b>Zoobentos</b> por Rafael Arocena	182
Capítulo 19:	<b>Peces</b> por Flavio Scasso	194
Capítulo 20:	<b>Paleolimnología</b> por Gloria Daners	203
	<b>Referencias bibliográficas</b>	215

# INTRODUCCIÓN

---

EL AUMENTO DE LA POBLACIÓN MUNDIAL Y DEL CONSUMO PER CÁPITA DE agua dulce acaecido durante las últimas décadas, ha conducido a una reducción importante de la calidad del recurso, especialmente en los países del Tercer Mundo. Esto ha llevado a científicos a señalar que el principal problema ambiental a corto plazo será la disponibilidad de agua dulce apta para uso potable, para actividades agropecuarias e industriales, así como para la recreación y la conservación. Las principales alteraciones que han sufrido los cuerpos de agua dulce pueden resumirse en aquellas de índole física (canalización, desecación, embalsado), química (contaminación radiactiva, con fertilizantes, orgánica, tóxica) o sanitaria (transmisión de vectores patógenos). Tal disparidad entre demanda y disponibilidad se refleja en los costos que ha alcanzado el recurso en muchos países.

Estos problemas llevan a postular un uso racional y formas más eficaces de gestión del medio acuático, lo que requiere del conocimiento de su funcionamiento. En tal sentido, la Limnología juega un papel central en la conservación de los recursos hídricos. Margalef (1983) define la Limnología como la Ecología de las aguas continentales, mientras Cole (1983) incluye los problemas del uso del agua en el campo de estudio de esta ciencia. Aparte de definiciones, el conocimiento del funcionamiento de los ecosistemas brinda las bases para reducir el impacto antrópico, mantener los usos múltiples y restaurar los sistemas acuáticos alterados.

En Uruguay, tal vez debido a la distribución uniforme y abundante de los recursos hídricos, son relativamente escasos los estudios limnológicos realizados. Si bien la investigación se ha incrementado sustancialmente durante los últimos años, el conocimiento de estos ambientes es aún insuficiente para su correcta gestión.

Sin embargo, la creciente preocupación ambiental ha generado una demanda creciente de técnicas de campo y laboratorio, difícilmente disponibles en una bibliografía dispersa o inaccesible. Por otra parte, la variedad de métodos existente dificulta la comparación de los resultados obtenidos. Al reunir tales métodos en el presente volumen pretendemos a la vez que hacerlos accesibles, realizar un aporte a la necesaria estandarización de la metodología. La inclusión de una selección de referencias sobre otros métodos no desarrollados en el texto, más sofisticados o de reciente desarrollo, sirve de guía para aquellos interesados en profundizar en temas específicos.

El presente texto surgió originalmente como una reedición actualizada del *Manual de Prácticas de Limnología* (Pintos & Arocena 1988), destinado a estudiantes de la Licenciatura de Biología. Sin embargo, las necesidades de otras materias relacionadas, e incluso de otras carreras, reflejo de la diversidad de enfoques con que se aborda hoy la Ecología, nos condujo a enfrentar un esfuerzo mayor, destinado a satisfacer un público

más amplio y exigente. En diversas ocasiones hemos sido consultados sobre métodos limnológicos por investigadores especializados en aspectos moleculares, fisiológicos o etológicos de organismos y comunidades acuáticas, cuyos trabajos incluyen además el registro de las condiciones del medio donde éstos son colectados.

Asimismo, es cada vez más importante el tratamiento de temas ambientales en la Enseñanza Secundaria, generalmente complementado con trabajos prácticos que requieren de métodos sencillos, claramente detallados y fundamentados, pero difícilmente disponibles.

Organismos públicos a cargo del manejo y control ambiental de los ecosistemas acuáticos, encontrarán en los diversos capítulos una guía práctica para aplicar métodos de monitoreo. Entre las tareas de extensión a la comunidad que los autores del libro han desarrollado en su accionar universitario, se ha procurado asesorar y transferir la metodología antes que efectuar directamente los estudios. Organizaciones no gubernamentales y otros grupos sociales, pero también aficionados y público en general, interesados en conocer y preservar ciertos ambientes acuáticos, nos han solicitado información sobre aspectos relacionados a la calidad del agua y sobre las técnicas para su evaluación. Estos protagonistas dispondrán de un compendio con tal información en la presente edición.

Debido a que el libro sólo trata sobre técnicas de campo y laboratorio, creímos necesario incluir un primer capítulo a modo de advertencia sobre la totalidad de las fases que componen una investigación, desde la selección de un tema de trabajo hasta la comunicación de los resultados obtenidos. Nuestra intención es que el lector pueda inscribir las técnicas específicas en un contexto más amplio, seleccionándolas de acuerdo a su objetivo particular, y con el fin último de dar a conocer sus resultados.

El resto del libro sigue un ordenamiento clásico, comenzando por los aspectos físicos de los sistemas acuáticos (capítulos 2 al 5), luego los químicos (7 al 11) y por último el análisis de las distintas comunidades de organismos (12 al 19). El capítulo 6 está destinado al estudio de los sedimentos como parte activa del medio acuático, mientras que en el capítulo 20 se los analiza como registro histórico del mismo.

El tema es abordado por un especialista cuyo estilo se ha respetado, lo que necesariamente condujo a cierta heterogeneidad en la presentación de los capítulos.

Al final de cada capítulo se incluye, como corolario de los aspectos más técnicos, una sección destinada a presentar algunos resultados de trabajos limnológicos llevados a cabo en Uruguay. De esta forma, se pretende por un lado dar a conocer datos que puedan servir de referencia a los lectores, y por otro ilustrar sobre las diversas maneras de presentar resultados mediante listas, tablas y gráficas.

Con el presente texto, nuestro objetivo es introducir a un amplio rango de potenciales actores de la problemática ambiental, en la fascinante complejidad de los aspectos más aplicados de la Limnología. Es de esperar que este aporte contribuya a la toma de conciencia sobre la urgente necesidad de un uso racional del entorno en que vivimos, tarea para lo cual resulta indispensable la comprensión de su funcionamiento sobre bases científicas ciertas.

*Rafael Arocena y Daniel Conde*

# MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN EN LIMNOLOGÍA

Rafael Arocena

SI BIEN ÉSTE ES UN LIBRO SOBRE MÉTODOS PRÁCTICOS EN LIMNOLOGÍA, es conveniente señalar que la colecta y el análisis de las muestras son sólo una parte de las actividades que componen el trabajo de investigación. Este puede ser de carácter científico, básico, aplicado o técnico, o de cualquier combinación de estas u otras categorías en general difíciles de definir y a menudo discutibles. De todos modos, su práctica implica un conjunto de métodos que permiten la obtención, creación y transmisión de conocimientos. Una serie de actividades sistemáticas se suceden desde la selección del tema de trabajo hasta el objetivo final, que debe ser la comunicación de los resultados.

### 1.1. TEMA DE TRABAJO

De no estar establecido, se aconseja considerar los siguientes aspectos para la selección del tema de trabajo (Acosta Hoyos 1972, Rey 1987):

a) Necesidad de investigar el tema por la existencia de un problema no resuelto. Los problemas surgen del estado de conocimiento en el área y suelen señalarse en las conclusiones de congresos, en las revisiones y en las introducciones de los artículos científicos. En otros casos surge de la observación directa o de los reclamos de aquellos directamente afectados.

b) Conocimiento de la materia, convenientemente sistematizado en notas y fichas.

c) Capacidad para afrontar el problema de acuerdo con la propia formación y experiencia. En temas ligados a otras disciplinas, se debe solicitar la colaboración de otros profesionales.

d) Disponibilidad de tiempo y recursos materiales y humanos. Se deben considerar los plazos y las otras actividades según un plan de trabajo con un cronograma que permita evaluar la factibilidad del proyecto. También debe considerarse el interés personal en el tema, única garantía de que el trabajo se realice con la persis-

tencia y continuidad necesarias.

e) Utilidad, aplicabilidad o relevancia práctica o teórica que justifiquen el emprendimiento de una actividad costosa y garanticen que la misma no sea abandonada. En investigación científica también debe considerarse la originalidad a partir de una adecuada revisión bibliográfica y consultas a expertos a efectos de no encarar un problema ya resuelto.

## 1.2. PLAN DE TRABAJO

Una vez decidido el tema se deben planear las actividades, es decir racionalizarlas anticipadamente con planteos concretos que guíen la acción hacia un objetivo determinado. El plan de trabajo debe responder con precisión al qué, por qué, cómo, cuándo, dónde y quién. Además de establecer el trabajo a realizar, identifica sus partes principales y subordinadas, selecciona los procedimientos adecuados y los programa en el tiempo. Es una guía para buscar la información necesaria y un adelanto de la redacción. Aunque meticuloso, el plan debe ser flexible, conciso y estructurado en partes:

a) Título provisorio, breve y exacto, que refleje fielmente y con palabras clave, el contenido del trabajo.

b) Presentación concisa del tema, definiendo el problema con claridad y exactitud. Se debe escribir el estado actual del conocimiento con un balance crítico, limitándose al tema concreto aunque sin descuidar la perspectiva holística.

c) El problema debe plantearse como pregunta concisa, y su respuesta como hipótesis. Las hipótesis no se pueden probar verdaderas, sólo rechazarlas o no con determinada probabilidad de error. Su formulación es un requisito para aplicar pruebas estadísticas. La hipótesis nula es la respuesta más simple. Si es rechazada, la hipótesis alternativa se acepta como la explicación inmediata consistente con la evidencia.

d) Objetivo. Es conveniente que la introducción concluya formulando uno o varios objetivos concretos, consistentes en la validación de la hipótesis.

e) Área de estudio. Los métodos de muestreo dependen del objetivo y del área de estudio. El área debe conocerse y describirse por medio de mapas detallados, tema tratado en el capítulo siguiente.

f) Métodos de muestreo, de análisis y de procesamiento de datos. Incluye los métodos conocidos y aquéllos a investigar, implementar y ajustar, los aparatos e instrumentos, tanto disponibles como necesarios de procurar.

g) Información a reunir o resultados esperados. Consiste en la generalización posible de los resultados, sus implicaciones, la comparación con la literatura y sus relaciones con la teoría, así como las conclusiones y recomendaciones posibles.

h) Bibliografía. Lista inicial de fuentes consultadas o para consultar.

i) Cronograma. Agenda de actividades programadas en el tiempo.

## 1.3. OBJETIVOS

Para poder establecer los objetivos, es preciso tener un conocimiento profundo y actualizado del tema. Conviene leer los textos básicos y las últimas revisiones antes de

buscar nuevos trabajos, y discutirlos en seminarios. La lectura de investigación debe ser analítica y crítica, y acompañarse de apuntes, preferentemente en fichas organizadas por tema. Las fichas sirven para guiar el estudio y el trabajo, y además facilitan la redacción y las citas futuras.

Dado al volumen de publicaciones disponibles, imposible de abordar, es preciso recurrir a servicios bibliográficos como centros de documentación, bancos y bases de datos, *index* y *abstracts*.

El objetivo debe establecer claramente cuál es el sistema objeto de estudio, que puede ser desde una especie química o biológica hasta un tipo de ecosistema, pasando por varios niveles intermedios.

La definición clara de los objetivos es un paso fundamental que determina todos los pasos subsecuentes. Existe una gran variedad de objetivos posibles, como conocer la composición específica de un área mediante estudios descriptivos, correlacionar propiedades de las especies con factores ambientales, conocer la variabilidad espacial o temporal de las comunidades (Ludwig & Reynolds 1988), u otros.

## 1.4. METODOLOGÍA

Los estudios descriptivos, basados en relevamientos extensivos en el tiempo y el espacio en busca de patrones ecológicos, pueden conducir a la formulación de hipótesis causales, a ser probadas en trabajos subsecuentes. Estos pueden consistir en nuevas observaciones o experiencias.

Si las variables involucradas no son manipulables, se recurre a la observación programada de su comportamiento en la naturaleza. La observación con fines científicos difiere de la común, en que debe realizarse sobre hechos relevantes, de manera precisa, metódica y exenta de prejuicios. Debe ser registrada, repetida y cuantificada, de modo que permita el análisis estadístico de los datos.

La experimentación es un caso particular de observación de fenómenos y datos naturales, bajo condiciones controladas y mediante la manipulación de variables. En ambos casos se compara el efecto entre dos o más condiciones o tratamientos sobre uno o algunos pocos atributos. La ecología normalmente se interesa en obtener información de un gran número de variables sin manipularlas, a efectos de encontrar patrones en las comunidades bióticas.

El enfoque basado en observaciones permite dos alternativas: a) estudiar muestras obtenidas al mismo tiempo en diferentes sitios, o b) muestras del mismo lugar tomadas en distintos tiempos.

## 1.5. DISEÑO DE MUESTREO

El muestreo es la observación de un grupo de elementos representativos de un universo mayor. Para ser representativo debe ser aleatorio, lo que significa que cada elemento tiene igual probabilidad de ser escogido por un método objetivo, independiente del investigador. El valor de los datos depende de un correcto procedimiento de muestreo. Este depende de los objetivos y debe proporcionar la mayor información posible con el menor esfuerzo y tiempo empleados. El diseño debe reflejar la hipótesis nula, manteniendo constantes la mayor cantidad posible de variables ambientales (Green 1979, Ludwig & Reynolds 1988).

Una muestra es una colección de unidades de muestreo que contienen uno o varios elementos de la población. Usualmente se llama incorrectamente muestra a cada unidad de muestreo, que si es escogida aleatoriamente debe llamarse réplica. Sin em-

bargo, en el resto de este libro se empleará la palabra muestra en su significado usual, que tiene la ventaja de no diferenciar entre réplica, seudoréplica o cualquier unidad obtenida incluso por métodos no aleatorios.

La distribución de las unidades de muestreo en el espacio debe basarse en un conocimiento previo del área de estudio, al menos en su morfología representada en un mapa. Un muestreo determinístico o regular se basa normalmente en el uso de transectas o de grillas a efectos de cubrir todos los sectores del área de estudio. En cambio, en un muestreo estocástico se sortean las unidades de muestreo por métodos aleatorios.

El muestreo aleatorio puede ser simple, sobre toda el área. Pero cuando en ésta se distinguen diferentes estratos homogéneos, es preferible un muestreo aleatorio estratificado, que genera menores varianzas. Éste a su vez puede ser a porcentaje constante o variable, es decir más intenso en aquellos estratos con mayores varianzas, lo que requiere de un conocimiento más detallado del área.

Si los elementos no se pueden individualizar, se sortean sus agrupaciones naturales haciendo un muestreo por conglomerados. Éstos pueden estar en varios niveles subordinados (cuencas - cursos - estaciones - réplicas - individuos), siendo entonces el muestreo por niveles múltiples.

Una vez planificada la ubicación de las réplicas a tomar, es preciso resolver su localización en el lugar. En el caso de los lagos y lagunas, la localización puede hacerse por diferentes métodos como triangulación (Welch 1948, Dangavs 1995) o uso de GPS (*Global Positioning System*), como se describe en el capítulo 2.

El número de réplicas, el método y la frecuencia de muestreo también requieren de datos previos sobre la distribución y la abundancia de los organismos (Prepas 1984, Elliott 1977) o de los factores abióticos a estudiar:

**FRECUENCIA Y DURACIÓN:** Dependen del objetivo y de los tiempos de renovación de la comunidad, el agua u otro objeto de estudio. Puede variar desde los ciclos diarios empleados para estimar la producción/respiración mediante curvas de oxígeno, a semanal para la sucesión del plancton o anual para relevamientos de carácter general.

**TAMAÑO DE LA UNIDAD DE MUESTREO:** Considerando el mismo volumen total, muchas réplicas pequeñas brindan más información que pocas grandes. El tamaño de la unidad de muestreo depende de la distribución, densidad y tamaño de los organismos. La relación entre las dimensiones de los organismos y de la unidad de muestreo debe ser menor o igual a 0.05 (Green 1979).

**APARATO MUESTREADOR:** Existen numerosos tipos de aparatos para obtener muestras de agua, sedimentos y organismos de las diferentes comunidades, los que se verán en los respectivos capítulos. Para su selección se debe considerar la exactitud, precisión y eficiencia. La primera se refiere a la mejor aproximación entre el volumen o área muestreada y la que se supone debe muestrear según su diseño. La precisión se refiere a la repetibilidad del resultado, mientras que la eficiencia significa una baja relación entre el esfuerzo realizado y la precisión y exactitud obtenidas. También se debe verificar que el aparato muestrea la población deseada con una eficiencia igual y adecuada bajo las diferentes condiciones de muestreo.

**NÚMERO DE RÉPLICAS:** Las hipótesis son generalmente rechazadas o no, determinando si la razón entre la variación causada por el efecto hipotético (entre estaciones) y la causada por el error (dentro de cada estación) es mayor a la esperada por la hipótesis nula (falta de efecto o diferencia). Para ello se debe tomar igual número de réplicas aleatorias para cada combinación de variables. Para una distribución normal del objeto de estudio en el espacio, el número de réplicas puede obtenerse (Elliott 1977, Prepas 1984) de:

$$n = (t^2 s^2) / L^2$$

donde  $t$  es el valor de Student para el nivel de confianza escogido,  $s$  el desvío estándar y  $L$  el error admisible, expresado en las mismas unidades del objeto de estudio (número de individuos, etc.). Para una distribución desconocida con error admisible  $D$ , expresado como proporción del error estándar respecto a la media,  $\bar{x}$  (0.2 para un 20% de error admisible):

$$n = s^2 / (D\bar{x})^2$$

## 1.6. MUESTREO

Una vez definidos el número y ubicación de las unidades de muestreo, el aparato muestreador y qué variables se desean muestrear, debe prepararse minuciosamente el muestreo, sin dejar ningún detalle librado al azar. Conviene realizar una lista ordenada de las actividades a desarrollar, y a partir de ésta elaborar una lista de material y una planilla de muestreo.

El material debe reunirse con cierta antelación a efectos de poder revisarlo y eventualmente repararlo o sustituirlo. Se deben probar y calibrar todos los aparatos de medición, y lavar los muestreadores y envases para las muestras, antes de cada muestreo con abundante agua del lugar. Los envases deben etiquetarse de forma clara y duradera.

La planilla de muestreo cumple una doble función. Por un lado es una guía de trabajo para no olvidarse de tomar ninguna de las medidas y muestras que se habían planeado y hacerlo en el orden previsto. Por otra parte funciona como formulario para anotar ordenadamente los datos del muestreo: fecha, hora, mediciones, muestras, observaciones y personal que participa.

Es conveniente realizar una breve descripción de posibles características evidentes a partir de la observación de la muestra fresca. Los cambios posteriores de temperatura o el uso de conservadores o simple manipulación pueden alterar la estructura, el color, el olor, los movimientos de los animales, etc.

## 1.7. RESULTADOS

Las medidas realizadas *in situ* y los análisis de laboratorio proporcionan un conjunto de datos, que convenientemente son tabulados en matrices. Una matriz de datos es una tabla rectangular donde cada columna corresponde a una unidad de muestreo u objeto a describir, y cada fila a una variable o descriptor, o viceversa. Además de ser la herramienta básica para los análisis posteriores, la matriz de datos y los diagramas, promedios y desvíos que de ella se derivan proporcionan una primera idea de la naturaleza y estructura de los datos.

Muchas veces las tablas y gráficas muestran diferencias obvias que hacen innecesario o inapropiado el uso de comprobaciones estadísticas (Green 1979). Por otra parte, la aplicación de distintas pruebas estadísticas requiere que los datos cumplan con ciertos requisitos que son raros en ecología. Cuando los datos no cumplen los requisitos para una prueba paramétrica, su transformación a otra escala puede hacerlos aptos (Prepas 1984), antes de recurrir a pruebas no paramétricas.

En el caso de medidas continuas, como las variables químicas, y en especial para aquellas que derivan de cálculos intermedios, como las concentraciones a partir de absorbancias, se debe poner especial cuidado con el redondeo a las cifras significativas, considerando la resolución de los métodos empleados. En otras palabras, no se deben usar más dígitos que los verdaderamente significativos, ya que de otro modo pueden

aparecer diferencias irreales.

## 1.8. PUBLICACIÓN

La comunicación de los resultados y las conclusiones obtenidas es el fin último de todo trabajo científico. Su difusión depende de la rapidez con que pueda ser localizado y leído, para lo cual debe ser publicado. Sólo las publicaciones son permanentes y se pueden coleccionar, clasificar, catalogar y reproducir. La redacción debe facilitar su indexación, resumen y revisión. Debe ser breve por razones de costo, de tiempo y de ética. Sólo se debe comunicar lo que el autor tiene que transmitir, sin mostrar erudición y evitando explicaciones inútiles.

Para la redacción es aconsejable formular un título provisorio y un resumen primario. De este modo se reúnen los datos esenciales y se traza una línea directriz que evita la divagación y el detalle excesivo. Conviene escribir la primera versión de una sola vez para darle unidad y fluidez, con un estilo conciso pero claro. Luego debe ser corregido economizando palabras, evitando repeticiones y frases superfluas, y cuidando la coherencia verbal (pasado para Resultados y presente para Discusión y generalizaciones). Por último se lo debe adaptar a las instrucciones de los editores de la publicación científica seleccionada y darlo a revisar a otros colegas. Debe seguirse la estructura clásica, por ser la más simple, metódica y completa:

**TÍTULO:** Debe ser fiel al contenido, corto y específico. Conviene componerlo con palabras clave, evitando las superfluas. El título y el resumen deben ser adecuados para su indexación por lectores y documentalistas.

**AUTORES:** Sólo deben figurar quienes participaron en el planeamiento, ejecución e interpretación de los resultados, ordenados según su grado de participación. No hay que incluir personas por deferencia, gratitud o prestigio, y se deben evitar las cooperativas de autores en que los trabajos de algunos llevan la autoría de todo el grupo. Es común la inclusión en último lugar del autor *Senior* (investigador responsable o tutor de la investigación).

**RESUMEN:** Su propósito es lograr una amplia difusión de la información, por lo que debe ser claro y conciso, autoexplicativo, con resultados y conclusiones principales, destacando su valor y originalidad. Esencialmente plantea el problema y su solución, generalmente en menos de 200 palabras. Debe respetar la estructura y el equilibrio del trabajo, incluyendo las palabras clave pero sin repetir el título. Puede ser de tipo informativo (analítico) que evita la lectura del texto, o indicativo (descriptivo) de la naturaleza y propósito de un trabajo imposible de resumir, como las revisiones.

**INTRODUCCIÓN:** Resume el estado del conocimiento. Señala la naturaleza del trabajo con relación a otras publicaciones y plantea el objetivo, preguntas e hipótesis. Indica si se usan datos ya publicados, se confirman observaciones o se dan elementos nuevos. Se deben evitar extensas revisiones de literatura y muestras de erudición, haciendo referencias a revisiones recientes.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** Es un capítulo breve pero suficiente para que otro experto pueda repetir el trabajo. Cuando corresponda, incluye la descripción del área de estudio. Se deben referir las técnicas ya publicadas mediante citas, y detallar sólo las nuevas o las modificaciones introducidas.

**RESULTADOS:** Comunica la información obtenida, pero no toda sino sólo la principal y sin interpretarla, aunque analizada estadísticamente. No debe contener citas bibliográficas. Cuando hay muchos resultados numéricos o éstos deben compararse, conviene recurrir a tablas y gráficas autoexplicativas, con un título o pie explícito y sintético. Se deben evitar muchos datos individuales similares, sustituyéndolos por las medias y

desvíos o rangos. Tampoco deben incluirse datos fácilmente calculables a partir de otros datos de la misma tabla. No deben usarse más decimales que los correspondientes a la precisión de las medidas tomadas. Las figuras deben ser pocas y de muy buena calidad.

DISCUSIÓN: Es el examen de los resultados para:

- a) ligarlos a el conocimiento anterior, destacando si concuerdan o divergen de otras publicaciones,
- b) presentar claramente las conclusiones, destacando si se cumplieron los objetivos, respondieron las preguntas o probaron las hipótesis planteadas en la introducción,
- c) discutir sus implicaciones teóricas y/o prácticas,
- d) analizar la importancia del trabajo.

BIBLIOGRAFÍA: Contiene sólo las referencias citadas en el texto, que deben ser trabajos publicados o en prensa. Las citas de citas son excepcionales y sólo llevan la referencia del autor consultado. Las razones de la bibliografía son: 1) evitar sospechas de plagio, 2) permitir que el lector respalde, amplie o profundice en el tema, 3) cortesía, crédito y respeto, 4) demostrar que se consultó la literatura adecuada, 5) respaldar las opiniones propias.

## Capítulo 2

---

# MORFOLOGÍA

Rafael Arocena



LA MORFOLOGÍA ES EL ESTUDIO DE LAS FORMAS Y DIMENSIONES DE LOS cuerpos de agua, su origen y evolución, así como su papel en la estructura y funcionamiento de los mismos. La morfometría es la medición de los elementos que constituyen tales formas (Hakanson 1981). La morfología permite comparar sistemas y expresar ciertos valores (concentración, temperatura) en términos extensivos (carga, contenido calórico). Determina la relación del sedimento con el agua, el efecto del viento, la estructura térmica, la productividad total, así como la importancia de la productividad litoral en la total. Por ello, todo trabajo limnológico comienza con la descripción morfológica del cuerpo bajo estudio.

Sin mencionar los ambientes de transición, los lagos o ríos y sus afluentes no están aislados. Las características del sistema obedecen en gran medida a las de la cuenca. Por ello, la unidad de estudio debe ser el área de captura o cuenca de drenaje, de la cual el sistema recibe sus aguas y materiales.

Con un criterio principalmente morfológico se distinguen dos grandes series de aguas continentales, con varias categorías sin límites precisos: 1) lénticas o leníticas (*lenis* = quieto) como los lagos, estanques y charcos, y 2) lólicas (*lotus* = lavado) como los ríos y arroyos. Las principales diferencias radican en la corriente, la dependencia del sistema terrestre que es mayor en los segundos, y el eje principal de las variaciones, respectivamente vertical u horizontal.

### 2.1. CUENCA DE DRENAJE

El estudio de un cuerpo límnic comienza con la descripción de su cuenca mediante el uso de parámetros calculados sobre un mapa con curvas de nivel (planialtimétrico). Los mapas deben incluir la escala, las coordenadas geográficas y la orientación. La escala puede ser numérica o gráfica. La escala numérica se representa como un quebrado con la unidad por numerador. Cuanto menor es el denominador, mayor la escala, y más detalles pueden apreciarse. La escala gráfica se representa por un segmento de recta dividido en partes proporcionales a las distancias en el terreno, y

tiene la ventaja de mantenerse en las reducciones o ampliaciones del mapa.

En Uruguay, el Servicio Geográfico Militar es el organismo encargado del relevamiento territorial mediante fotos aéreas y mapas a distintas escalas. Los mapas presentan un norte geográfico, otro magnético y otro de cuadrícula. El norte geográfico corresponde al meridiano del lugar. El magnético es el indicado por la brújula y forma un ángulo con el geográfico llamado declinación magnética, que varía en el espacio y en el tiempo. El norte de cuadrícula corresponde a las verticales de la cuadrícula, paralelas al meridiano central o de referencia, pero no a los otros meridianos. En la práctica se puede asimilar al norte geográfico.

**DELIMITACIÓN DE LA CUENCA:** Para establecer sobre el mapa los límites de una cuenca se deben localizar entre las nacientes de dos sistemas fluviales vecinos, los puntos de mayor altitud valiéndose de las isolinéas e interpolando gráficamente.

**ÁREA:** La superficie de la cuenca se puede medir por distintos métodos, como la planimetría o mediante un análisis digital. Un método accesible y sencillo es el de las cuadrículas. Se superpone el papel calco con el contorno dibujado, sobre un papel cuadrículado, preferentemente milimetrado. Se cuentan las cuadrículas que tengan más de la mitad de su área dentro del contorno y se calcula el área de acuerdo con la escala.

**RANGO ALTITUDINAL:** Otra información que proporciona el mapa topográfico son las altitudes máxima y mínima de la cuenca, lo que se acostumbra indicar al describir el área de estudio.

**LARGO MÁXIMO (L):** La dimensión y la orientación del eje mayor de la cuenca son elementos descriptivos de la misma y se usa para el cálculo de otros parámetros.

**ÍNDICE DE ELONGACIÓN (E):** Describe la forma de la cuenca en relación a un círculo de igual área (A):

$$E = D / L = (2\sqrt{A}) / (L\sqrt{\pi}) = 1.128\sqrt{A / L}$$

donde D es el diámetro del círculo y L el largo máximo. En una cuenca circular E vale 1 y disminuye cuanto más alargada sea.

**INFORMACIÓN DE LA CUENCA:** Aparte de la morfología, es conveniente describir la cuenca en términos de su clima, geología, suelos, vegetación, uso de la tierra y densidad de población.

## 2.2. MORFOMETRÍA LACUSTRE

Los parámetros morfométricos se obtienen de un mapa batimétrico, así llamado porque incluye isobatas o isolinéas de profundidad. Los mapas disponibles suelen ser poco detallados o muy antiguos, debiendo considerarse que los sistemas cambian con el tiempo. Por lo tanto cada vez que se inicia un nuevo estudio suele ser necesario confeccionar el mapa batimétrico.

El contorno conviene obtenerlo de fotografías aéreas, aunque puede haber dificultades con orillas anegadas, cubiertas de macrófitas o boscosas. En ocasiones es preciso construirlo mediante triangulación u otro método (Welch 1948, Dangavs 1995). Para fines científicos interesa conocer la morfología general y los principales accidentes topográficos, mientras que para pesca y navegación se requieren más detalles.

El relevamiento de las profundidades o batimetría se realiza con ecosonda o manualmente con sondalesa, y debe estar referida a cierto nivel del agua. La ecosonda proporciona un registro continuo pero es inexacta a menos de 2 m de profundidad.

De emplearse sondalesa, el posicionamiento de cada estación puede hacerse por medio del GPS (*Global Positioning System*) o midiendo ángulos con teodolito o con goniómetro al menos con dos objetos representados en el mapa. En caso de usar ecos-

onda, se registra el perfil del fondo a lo largo de transectos entre puntos conocidos de la orilla. Un goniómetro es una brújula con un círculo graduado o limbo y un sistema de puntería o pínulas.

El GPS es un sistema de satélites que transmiten datos sumamente precisos de tiempo y localización al receptor GPS. Este colecta y procesa las señales de tres o más satélites simultáneamente, determinando la posición del usuario con una resolución de ca. 100 m. Sin embargo, esto puede mejorarse utilizando un segundo receptor ubicado en un lugar de coordenadas conocidas y realizando los cálculos correspondientes.

La campaña debe planificarse previamente sobre un mapa a la mayor escala posible, sobre el que se trazan las transectas. Es conveniente que éstas cubran homogéneamente toda el área, que sus extremos sean visibles desde la otra orilla, y que sean paralelas entre sí y perpendiculares a la costa, y cruzadas por otras transectas preferiblemente en ángulo recto.

La ecosonda consta de un transmisor que produce pulsos de cierta frecuencia, entre 15 y 250 kHz. Un transductor ubicado debajo del agua transforma los pulsos en vibraciones que envía ondas acústicas en forma de cono. Las frecuencias bajas (< 50 kHz) penetran en el sedimento proporcionando información sobre sus características físicas. La señal reflejada en el fondo es recibida, amplificada y registrada en un ecograma en términos de profundidad.

Durante el relevamiento con ecosonda se deben mantener constantes el curso y la velocidad, y anotar sobre el ecograma el inicio y el final de cada transecta.

Para construir el mapa batimétrico, se determina el intervalo de profundidad a utilizar, que surge de redondear el cociente entre la profundidad máxima y el número de isobatas, normalmente entre 5 y 20, dependiendo de la intensidad del muestreo.

Si el relevamiento se realizó con sondalesa, se señalan en el mapa todos los puntos muestreados y sus profundidades. Las profundidades escogidas para trazar las isobatas se localizan interpolando entre dos puntos contiguos. Las curvas se trazan dejando de un mismo lado los valores mayores y del otro los menores, y deben ser cerradas. En caso de usarse ecosonda, se marcan en cada tramo de la ecografía correspondiente a una transecta, los puntos que tienen las profundidades seleccionadas para las isobatas, los que se proyectan sobre la transecta trazada en el mapa.

Sobre el mapa batimétrico se miden o calculan los siguientes parámetros:

**LONGITUD MÁXIMA EFECTIVA (L):** Es la mayor distancia sobre la que puede actuar el viento, por lo que es importante para el movimiento del agua. Es el segmento de recta que une los dos puntos de la costa más alejados entre sí, sin cruzar ninguna porción de terreno. Se debe expresar su valor y orientación.

**ANCHO MÁXIMO EFECTIVO (b):** Es la mayor distancia perpendicular a (L) entre los dos puntos de la costa más alejados entre sí, sin cruzar ninguna porción de terreno.

**ALCANCE EFECTIVO (*fetch*) (f):** Es una mejor medida de cómo el viento gobierna la longitud y altura de las olas. Considera las distancias ( $x_i$ ) en 15 direcciones dispuestas cada 6° a ambos lados de una dirección central, que puede corresponder al largo efectivo, al viento dominante o a la que proporcione el máximo alcance:

$$f = \left[ \frac{(\sum x_i \cos \gamma_i)}{(\sum \cos \gamma_i)} \right] s$$

donde el denominador es constante y vale 13.5, y s es la constante equivalente a la cienmilésima parte del denominador de la escala. Es conveniente hacerlo con una plantilla en papel transparente, donde se trazan las 15 direcciones.

**LONGITUD DE LA LÍNEA COSTERA ( $L_0$ ):** Permite evaluar la producción potencial del litoral. Es casi constante en lagos naturales, pero varía en los estanques y embalses en respuesta a la lluvia, evaporación y manejo. Se puede medir, con un rotómetro o bien

con un hilo fino e indeformable ubicado sobre el contorno, entre alfileres ubicados por fuera de la línea de costa cuando ésta es entrante, y por dentro cuando es saliente.

DESARROLLO DE LA LÍNEA COSTERA (DL): Es la relación entre ésta y la circunferencia de un círculo de igual área que el lago. Si éste es circular vale 1 y aumenta cuanto más alargado y dendrítico. Indica el potencial desarrollo de la comunidad litoral en relación al área total.

$$DL = L_0 / 2\sqrt{A_0\pi}$$

ÁREA TOTAL Y POR ISOBATA ( $A_0$  y  $A_z$ ): Pueden medirse por cuadrículas, del mismo modo indicado para el área de la cuenca.

PROFUNDIDAD MÁXIMA ( $z_m$ ): Está determinada por el origen del lago, la tasa de sedimentación y el balance hídrico. En general cuanto mayor es el lago, mayor su profundidad. Debe expresarse referida a una altitud fija.

ANCHO MEDIO ( $b'$ ): Es el cociente entre el área y la longitud máxima efectiva.

CURVA HIPSOGRÁFICA: Es una gráfica que representa el área encerrada por cada isobata y permite visualizar la forma de la cubeta.

VOLUMEN (V): Se puede obtener del área encerrada por la curva hipsográfica, o de la suma de los conos truncos entre isobatas:

$$V_z = (h/3)[A_z + A_{z+1} + \sqrt{A_z A_{z+1}}]$$

PROFUNDIDAD MEDIA ( $\bar{z}$ ): Es el cociente entre el volumen y el área. Se relaciona inversamente con la productividad del lago. Ryder (1974) propuso un índice morfoedáfico para pesquerías, que es el cociente entre los sólidos disueltos totales y la profundidad media.

PROFUNDIDAD RELATIVA ( $z_r$ ): Es la relación entre la profundidad máxima y el diámetro de un círculo de igual área que el lago. Se usa para describir la estabilidad de la estratificación. Generalmente es menor a 2%, y para los más profundos, mayor a 4%.

$$z_r = (100z_m) / [2\sqrt{A_0/\pi}] = 50z_m\sqrt{\pi/A_0}$$

DESARROLLO DEL VOLUMEN (DV): Es la relación entre el volumen del lago y el de un cono de igual área y altura que el área y profundidad máxima del lago:

$$DV = V_{\text{lago}} / V_{\text{cono}} = \bar{z}A_0 / (z_m A_0 / 3) = 3(\bar{z}/z_m), \text{ o simplemente } \bar{z}/z_m$$

Ilustra la forma de la cubeta: si es cónica vale 1 ( $\bar{z}/z_m = 0.33$ ), si es un pozo profundo es menor, y en rocas erosionables donde adopta forma de olla, es mayor a la unidad. El promedio mundial es 1.4 ( $\bar{z}/z_m = 0.467$ )

### 2.3. MORFOLOGÍA FLUVIAL

Los conceptos fundamentales de geomorfología fluvial se deben principalmente a Leopold *et al.* (1964). El carácter geomórfico de un río depende de la geología, meteorología y biología de su cuenca, con la cual conforma un mismo sistema. Diferentes parámetros suelen emplearse para describir una red fluvial:

DENSIDAD DE DRENAJE: Es el cociente entre la longitud total de los cauces y el área de la cuenca. Varía entre 1 y 10 km km<sup>-2</sup>, siendo frecuentemente 2. Existe una relación

universal entre ambos parámetros:

LONGITUD DEL CANAL PRINCIPAL (L): Se relaciona linealmente con el área de drenaje cuando ambos se grafican logarítmicamente:

$$L = jA^m$$

SINUOSIDAD DEL CAUCE (S): Es la relación entre la longitud del canal principal y el segmento de recta que une el nacimiento y la desembocadura.

Los meandros se disponen a una distancia de 7 a 10 veces el ancho del curso. El largo del canal entre dos meandros de igual curvatura es 11 a 16 veces el ancho. La amplitud es más variable, dependiendo de la erodibilidad actual o pasada del terreno.

PERFIL LONGITUDINAL: Teóricamente cóncavo, por la erosión aguas arriba y la acumulación de sedimentos aguas abajo, es representado con una curva hipsométrica entre la altitud (h) y la distancia a la naciente (d). Aproxima una función exponencial negativa:

$$h = e^{-d}$$

Este perfil ideal es raro en la naturaleza, porque nuevos tributarios aportan otros materiales o porque los cursos atraviesan áreas de diferente geología.

PENDIENTE MEDIA (P): Puede calcularse a partir del perfil longitudinal:

$$P = (h_{\max} - h_{\min})/L$$

ORDEN DE LOS CURSOS (r): Los cursos pueden clasificarse en órdenes según el sistema de Horton-Strahler. Son de orden 1 los canales permanentes, con o sin agua, y sin afluentes. La unión de dos o más forman un segmento de orden 2 y así sucesivamente. Limitaciones al sistema son que las condiciones hidrológicas pueden no estar bien representadas cuando muchos tributarios entran al canal principal sin cambiar su orden, y que los cursos efímeros y los mapas a diferentes escalas pueden variar el orden. Sin embargo, se han encontrado relaciones entre el orden y varios parámetros.

ANÁLISIS DE HORTON: El número de segmentos de cada orden ( $N_r$ ) se relaciona con el orden mediante la Ley de los Números que establece una secuencia geométrica inversa:

$$N_r = ab^{-r} \quad \text{Log } N_r = \text{Log } a - r \text{ Log } b$$

donde b es la tasa de bifurcación ( $b = N_r / N_{r+1}$  generalmente entre 3 y 5, difícilmente menor a 2).

La suma de los largos de los segmentos de orden r ( $L_r$ ), así como las áreas de sus cuencas ( $A_r$ ) se relacionan en forma potencial inversa con el orden:

$$L_r = cr^k \quad A_r = c'r^{k'}$$

## 2.4. RESULTADOS

La morfometría de tres subcuencas de la Laguna de Rocha (Tabla 2.1), correspondientes a sus tres principales afluentes, muestra un ordenamiento de las mismas que obedece a diferencias geológicas, y se ve reflejado en la hidrología y en las características físico-químicas del agua y el sedimento, así como en la composición bentónica de los arroyos (Arocena *et al.*, 1996).

**Tabla 2.1.** Parámetros morfométricos de las cuencas, largo del canal principal (L) y tasa de bifurcación (b) de los tres principales afluentes de la Laguna de Rocha (tomado de Arocena *et al.* 1996).

Arroyo	Largo máximo (km)	Altitud (m)	Elongación	Superficie (km <sup>2</sup> )	L (km)	b
Rocha	68.0 NW:SE	450	0.38	534.1	60.5	5.3
Las Conchas	24.6 NNW:SSE	220	0.65	199.5	38.3	4.3
La Paloma	19.5 NNE:SSW	68	0.66	128.5	27.5	3.8

El arroyo Carrasco, en el límite entre los departamentos de Montevideo y Canelones, es un curso de orden 5 (Fig. 2.1), formado por la confluencia de los arroyos Manga y Toledo, ambos de orden 4. El sistema hidrográfico presenta además 67 cursos de orden 1, 20 de orden 2 y 6 de orden 3. El análisis de Horton resultó en una tasa de bifurcación de 0.34 (Arocena & Pintos 1988). Esto significa que en promedio, cada curso está conformado por la confluencia de tres afluentes.



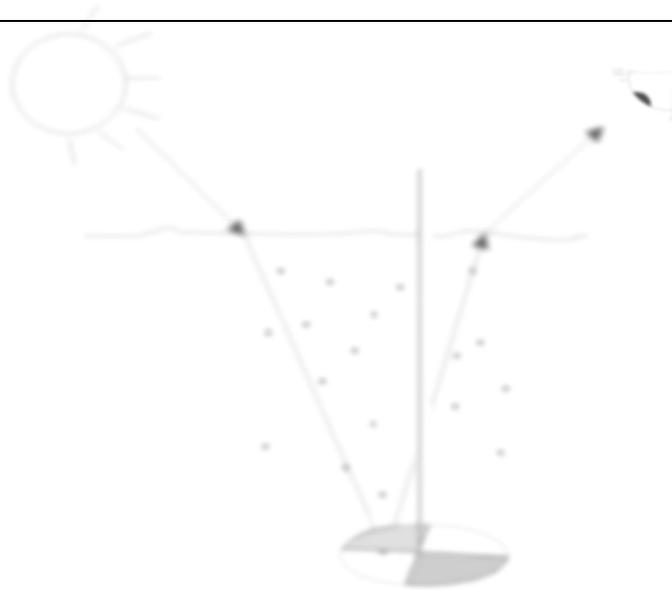
**Figura 2.1.** Orden de los cursos del sistema Arroyo Toledo-Carrasco (Arocena & Pintos 1988).

## Capítulo 3

---

# ÓPTICA

Rafael Arocena



LA LUZ VISIBLE Y DEMÁS ONDAS ELECTROMAGNÉTICAS DEL SOL, SON FORMAS DE ENERGÍA RADIANTE QUE AL SER ABSORBIDAS POR EL AGUA SE TRANSFORMAN EN CALOR O, MEDIANTE LA FOTOSÍNTESIS, EN ENERGÍA QUÍMICA. SU DISTRIBUCIÓN VERTICAL EN EL AGUA ES PUES UN FACTOR DETERMINANTE DE LA ESTRUCTURA TÉRMICA, LA PRODUCCIÓN PRIMARIA Y EL FUNCIONAMIENTO TODO DEL SISTEMA ACUÁTICO.

### 3.1. PRINCIPIO

La luz no es una variable única, sino un conjunto continuo de radiaciones de diferente longitud de onda ( $\lambda$ ), por lo que su medida implica la integración sobre un rango particular del espectro. Para ello se suele seleccionar la radiación fotosintéticamente activa (PAR) entre 400 y 700 nm, aunque las algas pueden fotosintetizar por fuera de este rango (350 a 720 nm). Entre 46 y 48% de la energía que llega a la superficie terrestre corresponde a la radiación PAR.

La potencia de radiación es la energía radiante por unidad de tiempo:

$$1W = 1 \text{ J s}^{-1}$$

Equivale al flujo luminoso ( $\Phi$ ), cuya unidad es el lumen (lm), producto de la intensidad luminosa ( $I$ ) por el ángulo sólido ( $\Omega$ ). La intensidad luminosa, propiedad de la fuente de luz, es una magnitud fundamental cuya unidad es la candela (cd). El ángulo sólido es la relación entre el área de la superficie esférica interceptada y el cuadrado del radio de la esfera. Su unidad es el estereorradián (sr):

$$\Omega = A_s / r_s^2$$

$$1 \text{ sr} = 1 \text{ m}^2 \text{ m}^{-2}$$

$$1 \text{ lm} = 1 \text{ cd sr} \approx 4 \text{ mW}$$

La potencia de radiación recibida por unidad de superficie es la densidad de flujo irradiante o irradiancia ( $W m^{-2}$ ), que evaluado por la sensibilidad del ojo humano es la iluminación ( $E_v$ ), medida en lux (lx):

$$1 \text{ lx} = 1 \text{ lm m}^{-2} \approx 4 \text{ erg cm}^{-2} \text{ s}^{-1} = 0.95558 \times 10^{-7} \text{ cal cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$$

Como la radiación total no es sólo luz visible, en vez de iluminación, que no es recomendada en Limnología, debe usarse la energía radiante total, cuya unidad es el langley (ly) que a  $15^\circ C$  equivale a  $1 \text{ cal cm}^{-2}$ .

El flujo luminoso también puede expresarse en cuantos  $s^{-1}$  ( $5.03 \Phi \lambda \% 10^{15}$  para cada  $\lambda$ ). Para todo el espectro, depende de la distribución de energía en el mismo, que varía con el medio, la profundidad y el tiempo.

Como las reacciones fotoquímicas dependen del número de cuantos o fotones absorbidos, puede ser útil medir la densidad de flujo fotónico en vez de la irradiancia. La radiación PAR se mide en  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  o  $\mu\text{Einstein m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , ya que un Einstein es un mol de fotones, o cantidad de fotones igual al número de Avogadro ( $6.023 \times 10^{23}$ ).

La energía de un Einstein depende de la longitud de onda, y es de  $119610083 \text{ J } \lambda^{-1}$  (nm). Para 500 nm,

$$1 \text{ E}_{500} \text{ s}^{-1} = 239220 \text{ W}_{500}$$

$$1 \mu\text{E}_{500} \text{ s}^{-1} = 0.24 \text{ W}_{500}$$

$$1 \text{ W}_{500} = 4.18 \mu\text{E}_{500} \text{ s}^{-1}$$

La conversión entre vatio (W), Einstein (E) y lux (lx) no es constante y depende de la composición espectral de la luz incidente.

La iluminación equivale a sustituir la integral de la curva de la energía vs.  $\lambda$  por la integral del producto de la energía asociada a cada  $\lambda$  por una eficiencia (% Ef) que vale 0 para  $380 > \lambda > 780$ .

$$\mu\text{Einstein s}^{-1} \times \% \text{ Ef} = \text{vattios}$$

La eficiencia varía con el tipo de visión o de fotosíntesis. La máxima ocurre a 555 nm con visión diurna y máxima sensibilidad del ojo humano ( $1 \text{ W} = 680 \text{ lm}$ ) y a 505 nm con visión crepuscular ( $1 \text{ W} = 1746 \text{ lm}$ ).

$$1 \text{ lx} \approx 1.5 \times 10^{-3} \text{ W m}^{-2}$$

$$1 \text{ W} \approx 700 \text{ lm}$$

### 3.2. IRRADIANCIA

La irradiancia es una medida necesaria para realizar balances de energía calórica y, en el rango de la radiación PAR, para estudios de producción, ya que las transferencias a niveles tróficos superiores suelen expresarse en unidades de energía. Mientras en el primer caso se requieren valores absolutos, en el segundo los relativos son suficientes.

En las termopilas (solarímetros), una superficie blanca y negra recibe la radiación y se calienta diferencialmente. Las diferencias de temperatura son una función lineal de la irradiancia. Como no son muy sensibles, se usan principalmente como estándar

de superficie. Es conveniente mantener un sensor fijo y otro móvil cuyas lecturas se registren como porcentaje del fijo. Otros detectores son marcadamente dependientes de la longitud de onda, y ninguno tiene la respuesta espectral necesaria para medir la densidad de flujo fotónico. Las fotocélulas de Selenio son las más usadas y su respuesta se aproxima a la necesaria para medidas de iluminancia.

Las medidas de densidad de flujo o irradiancia descendente dan estimaciones de la disponibilidad de luz para la fotosíntesis y son consecuencia de las propiedades de absorción y dispersión de las estructuras fotosintetizadoras y del medio. La radiación ascendente es generalmente muy pequeña en relación a la descendente y obedece a la retrodispersión por la materia en suspensión y el agua.

El sensor básico empleado para medir el flujo de luz es un fotodiodo que integra la irradiancia entre 400 y 700 nm. Los hay de tres tipos (Geider & Osborne 1992): plano ( $\pi^2$ ), semiesférico ( $2\pi$ ) y esférico ( $4\pi$ ). El primero se llama coseno-correctado, porque según la ley de Lambert el nivel de luz es el producto del flujo sobre una superficie perpendicular al haz por el coseno del ángulo de incidencia. Sin embargo, para pequeños ángulos son preferibles los colectores  $2\pi$  y  $4\pi$ , cuya respuesta es igual para todos los fotones independientemente del ángulo.

Los sensores planos son más apropiados para estudios de algunas macrófitas emergentes o con estructuras fotosintetizadoras flotantes o sobre un sustrato; los  $2\pi$  si la luz es unidireccional y los  $4\pi$  si la luz se recibe en todas las superficies.

Las mediciones subsuperficiales sufren reflexión múltiple entre la superficie del agua y el sensor, por lo que no deben hacerse a menos de 10 cm de profundidad. También debe evitarse la sombra de la embarcación. Estos sensores miden la cantidad de luz pero no su composición espectral, para lo cual puede usarse un espectrorradiómetro. Algunas longitudes de onda son más absorbidas, por lo que la composición espectral cambia con la profundidad, tornando la irradiancia cada vez más inapropiada como medida de la respuesta fotosintética.

### 3.3. TRANSMISIÓN

Al pasar por el agua, la luz es absorbida (calor) y dispersada (luz difusa), lo que que sumado constituye la extinción. El resto se transmite en un porcentaje que en agua pura es constante para cada metro (coeficiente de transmisión):

$$T\% = 100(I_z/I_0)$$

resultando en un perfil exponencial, que sigue la ley de Lambert-Bouguer:

$$\eta = \text{Ln}(I_0/I_z)/z$$

donde  $\eta$  es el coeficiente de extinción:

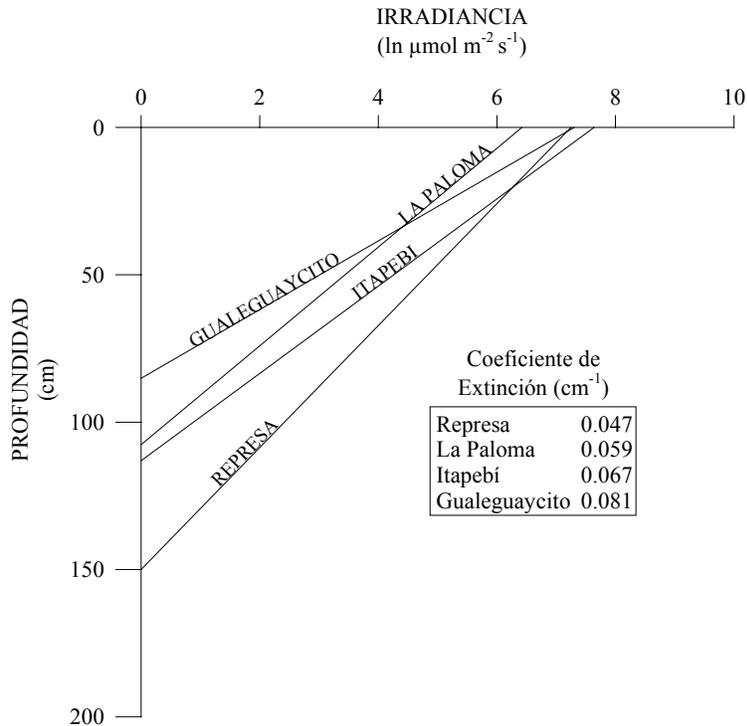
$$I_z = I_0 e^{-\eta z}$$

En ambientes naturales el coeficiente de extinción no es constante, variando (para sensores  $2\pi$ ) entre  $0.1 \text{ m}^{-1}$  en aguas muy claras a  $4.0 \text{ m}^{-1}$  en sistemas muy turbios.

El coeficiente de extinción puede obtenerse para cada metro y promediarse, o bien de la correlación entre  $\text{Ln}(I_z)$  y la profundidad ( $z$ ).

La distribución de la luz en profundidad se representa mediante perfiles (Fig. 3.1).

Los perfiles son gráficos muy usados en limnología en los que la profundidad, a pesar de ser la variable independiente, se ubica en el eje vertical y su escala se incrementa hacia abajo de manera que el cero, correspondiente a la superficie del agua, queda en la parte superior de la figura. El eje horizontal es el de la variable cuya distribución vertical se desea graficar, y se ubica en la parte superior de la figura.



**Figura 3.1.** Penetración de la radiación fotosintéticamente activa (PAR) y coeficientes de extinción en cuatro estaciones del embalse de Salto Grande en julio de 1993. Las mediciones de radiación PAR fueron realizadas con un irradiómetro equipado con un sensor  $4\pi$  (Chalar *et al.* 1993).

### 3.4. TRANSPARENCIA

Un método simple, largamente empleado para evaluar el ambiente lumínico es medir la transparencia del agua mediante el Disco de Secchi. Este es un disco normalmente de 20 cm de diámetro dividido en cuatro cuadrantes alternativamente blancos y negros. Se sumerge preferentemente al mediodía y del lado sombreado de la embarcación en posición horizontal mediante una cuerda graduada, hasta que deja de ser visible. Luego se lo asciende lentamente hasta que vuelve a ser visible. El promedio de ambas profundidades se reporta como transparencia del Disco de Secchi, la que puede variar entre 0.1 y 40 m. Experimentalmente se sabe que esta profundidad corresponde, en condiciones favorables (agua calma, alta radiación), aproximadamente a una intensidad de luz del 15% de la intensidad en superficie, de donde puede estimarse el coeficiente de extinción:

$$\eta = \text{Ln}(100/15)/z_{\text{DS}} = 1.9/z_{\text{DS}}$$

Esta relación varía, dependiendo de condiciones locales y del observador, de 1.4 a 3.

### 3.5. ZONA EUFÓTICA

La zona superior, iluminada, de un cuerpo de agua se denomina zona eufótica, mientras la profunda es la zona afótica. La zona eufótica se define como la capa de agua hasta una profundidad donde se registra el 1% de la intensidad de la luz en superficie. La importancia de esta profundidad es que equivale aproximadamente al Punto de Compensación, donde la producción primaria se iguala con la respiración.

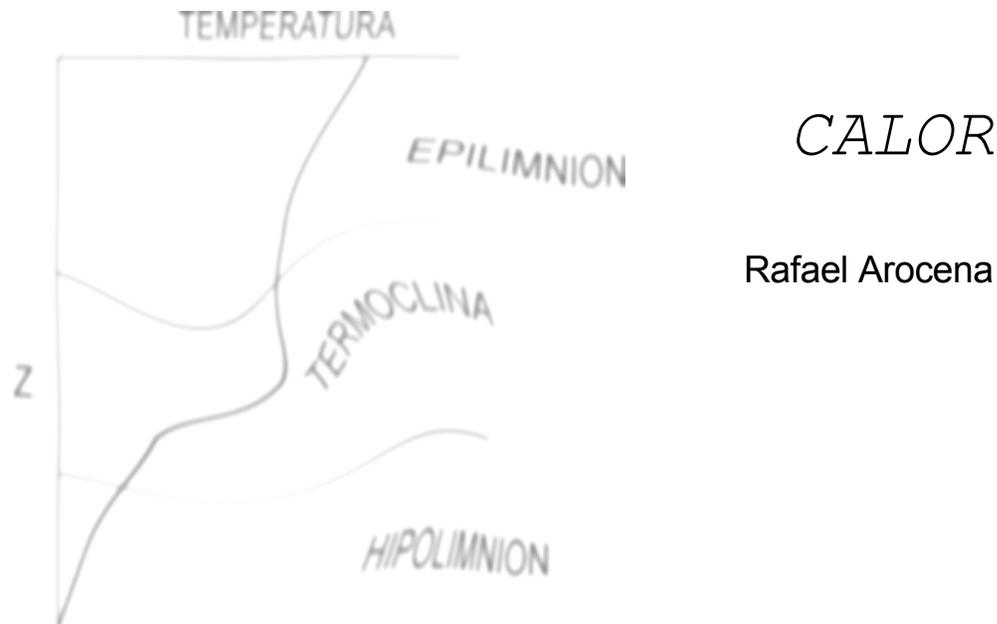
$$z_{\text{eu}} = \text{Ln}(100/1)/\eta = 4.6/\eta \quad \text{como} \quad \eta = 1.9/z_{\text{DS}}$$

$$z_{\text{eu}} = 2.4 z_{\text{DS}}$$

Según Golterman *et al.* (1978) esta relación es aproximadamente 2.5, y según Moss (1980) varía entre 2.0 y 3.3.

### 3.6. RESULTADOS

La penetración de la luz en el embalse de Salto Grande sobre el río Uruguay (Fig. 3.1, pág. anterior) varía con la concentración de sólidos suspendidos, y ésta depende de la hidrodinámica del sistema, que difiere entre las cuatro estaciones muestreadas. Las pendientes de cada curva indican el coeficiente de extinción para cada estación. La mayor penetración ocurrió en la estación Represa, más profunda y de aguas relativamente calmas, que permiten la sedimentación del material suspendido. La estación correspondiente al cauce principal del Río Uruguay (La Paloma), donde la circulación del agua produce resuspensión de sólidos, presentó un coeficiente algo mayor. Las estaciones Gualeguaycito e Itapebí corresponden a los brazos laterales y presentan los mayores coeficientes de extinción debido a la alta concentración de material en suspensión proveniente de las cuencas de drenaje.



LA RADIACIÓN SOLAR QUE INCIDE EN LA SUPERFICIE DE UN ECOSISTEMA acuático es absorbida en las primeras capas de agua, transformándose en calor. Aproximadamente 53% de su energía, principalmente asociada a longitudes de onda superior a 700 nm (rojo e infrarrojo), es transformada en calor en el primer metro. Las sustancias disueltas y la materia suspendida contribuyen poco a esta absorción. Otras fuentes de calor (atmósfera, litoral, sedimentos, afluentes, agua subterránea) suelen ser insignificantes. Las pérdidas incluyen la radiación hacia la atmósfera y el sedimento, evaporación y efluentes.

El calor es propagado muy lentamente por conducción molecular, debido a que el agua es un débil conductor, pero la acción del viento puede redistribuirlo mediante el transporte de agua o advección. Este proceso puede alcanzar a toda la columna de agua si no hay diferencias de densidad que se opongan a la mezcla, conociéndose este estado homogéneo como de inestabilidad térmica.

La densidad del agua pura es máxima a 3.94 °C (por definición 1.0000 g ml<sup>-1</sup>) y mínima para el hielo (0.9168 g ml<sup>-1</sup>). Aunque pequeñas, estas diferencias de densidad son suficientes para evitar la mezcla del agua, y aumentan a mayores temperaturas.

La concentración de sales también influye en la densidad del agua. Pero debido a que la variación espacial y temporal en un mismo sistema suele ser menor a 0.1 g l<sup>-1</sup>, la diferencia de densidad resultante es muy pequeña (equivalente a la diferencia entre 9 y 10 °C), aunque puede importar en ciertas condiciones particulares como las que se presentan en lagunas costeras y estuarios.

### 4.1. PERFIL Y CICLOS TÉRMICOS

Cuando el calentamiento del agua superficial es más rápido que su mezcla con el agua profunda todavía fría, se producen diferencias de densidad que impiden la mezcla total de la columna de agua. En consecuencia, el cuerpo de agua se estrati-

fica, diferenciándose tres zonas de la superficie al fondo:

1) Epilimnion, con agua más caliente y menos densa que circula y se mezcla.  
2) Metalimnion, donde ocurre un pronunciado gradiente térmico. El plano horizontal que une los puntos de máxima inflexión térmica es la termoclina. En lagos templados se considera termoclina a una diferencia térmica mayor a 1°C por metro. En los cálidos es suficiente 0.1 °C por metro (Coche 1974, Lewis 1983, Henry & Barbosa 1989), debido a que un mismo incremento térmico produce a altas temperaturas una mayor diferencia de densidad que a bajas temperaturas, debido a lo cual estos lagos son tan estables como los templados, a pesar de sus menores diferencias de temperatura.

3) Hipolimnion, con agua profunda más fría y densa, generalmente calma, constituyendo una masa de agua más vieja, aislada de la capa superficial.

Esta estructura es llamada estratificación directa, y se la encuentra durante el verano en lagos templados, dependiendo de la profundidad y de la exposición al viento. La mezcla del epilimnion puede disminuir en períodos cálidos y calmos, formándose uno o varios metalimnion secundarios, menos estables que el principal.

En sistemas de morfología compleja con varias depresiones, la posición y estabilidad del metalimnion puede variar espacialmente. En lagos o zonas someras falta, pero puede haber una disminución de la temperatura con la profundidad si el área está protegida del viento.

Al inicio de la estratificación la mayor discontinuidad térmica comienza en la profundidad y se eleva hasta estabilizarse. Cuando la temperatura del aire desciende, el epilimnion se enfría, aumenta su densidad y se hunde, mezclándose por convección. El metalimnion desciende hasta el fondo y desaparece.

En algunos casos, como lagos muy profundos, la mezcla se atenúa y detiene antes de llegar al fondo. Son los lagos meromícticos, donde se forma una capa profunda más densa, el monimolimnion, separado del mixolimnion superior que circula periódicamente por la quimoclina o quimolimnion, gradiente abrupto y permanente de salinidad o de sólidos suspendidos.

Este ciclo general varía con el clima y la morfología, lo que condujo a sucesivas clasificaciones. Entre las numerosas categorías de Hutchinson y Löffler (1956, Wetzel 1983), están los cálidos monomícticos, correspondientes al clima templado cálido oceánico. Están siempre a más de 4 °C y se estratifican en primavera y mezclan en otoño. Los polimícticos, de circulación continua o casi continua, pueden ser fríos o cálidos (Ruttner 1963). En éstos la circulación es interrumpida por estratificaciones breves y débiles, que se rompen fácilmente por un enfriamiento rápido debido al viento. Lewis (1983) los subdivide en continuos y discontinuos según se mezclen diariamente o no.

## 4.2. ESTABILIDAD Y RESISTENCIA TÉRMICA RELATIVA

La estratificación térmica puede ser expresada como resistencia a la mezcla por medio de la estabilidad (S), o trabajo por unidad de área necesario para mezclar toda la columna de agua hasta alcanzar una temperatura uniforme sin adición ni sustracción de calor (Birge 1915). Dokulil (1984a) presenta la fórmula de Schmidt dada por Hutchinson (1957), levemente modificada:

$$S = (1/A_0) \int_{z_0}^{z_m} A_z (z - z_g) (\rho_z - \rho_m) dz$$

donde  $\rho_m$  es la densidad del agua durante la mezcla total, que sustituye el valor unitario sólo aplicable a lagos templados dimícticos ( $T_m = 4$  °C).  $A_0$  es el área superficial,  $A_z$

$$z_g = 1 / \left( V \int_{z_0}^{z_m} z A_z dz \right)$$

el área y  $\rho_z$  la densidad, correspondientes a cada profundidad  $z$ , y  $z_g$  la profundidad del centro de gravedad para el volumen  $V$ , según:

Ambas integrales pueden obtenerse por planimetría.

La cantidad de trabajo por unidad de área que realiza el viento para distribuir el calor estival en todo el lago es:

$$B = (g/A_0) \int_{z_0}^{z_m} \bar{z} A_z (\rho_s - \rho_w) dz$$

donde  $\rho_s$  y  $\rho_w$  son las densidades extremas de verano e invierno a cada profundidad  $z$ .

Otro modo de medir la resistencia a la mezcla en cada capa de agua es la Resistencia Termica Relativa:

$$RTR = (\rho_t - \rho_b) / (\rho_4 - \rho_5) = (\rho_t - \rho_b) / (8 \times 10^{-6})$$

donde  $\rho_t$  es la densidad en la parte superior y  $\rho_b$  en la inferior de la capa de agua,  $\rho_4$  y  $\rho_5$  la densidad a 4 y 5 °C, respectivamente.

### 4.3. BALANCE TÉRMICO ANUAL

Es la diferencia entre el calor máximo y mínimo contenidos en una masa de agua durante un año, es decir el intercambio calórico con el exterior ( $\text{cal cm}^{-2} \text{año}^{-1}$ ). Permite medir el efecto amortiguador de un lago sobre el clima local. Incluye factores como la elevación de la temperatura de fondo, la energía absorbida por los organismos y el efecto de afluentes y efluentes. El intercambio con el fondo puede importar en sistemas someros, pero el factor principal del balance es el intercambio de calor con el aire. Este se obtiene multiplicando la profundidad media (en cm) por la diferencia entre las temperaturas medias de verano e invierno (Margalef 1983).

Sin embargo, en estas determinaciones se deben usar las temperaturas máximas y mínimas de los distintos estratos, ya que los estratos inferiores, de menor volumen, realizan un aporte de calor menor que los superiores. El balance térmico puede calcularse graficando el producto  $A_z (T_{vz} - T_{iz})$  contra la profundidad  $z$ .  $A_z$  es el área y  $T_{vz}$  y  $T_{iz}$  las temperaturas de verano e invierno a cada profundidad. El área encerrada por la curva se integra por planimetría y divide por  $A_0$  (Wetzel 1983) para obtener el intercambio por unidad de área.

El flujo neto de calor ( $H_n$ ) a través de la superficie del agua incluye:

$$H_n = H_s + H_a + H_{br} + H_c + H_e + H_p$$

donde  $H_s$  es la radiación solar neta absorbida,  $H_a$  la radiación atmosférica neta absorbida,  $H_{br}$  la retrorradiación,  $H_c$  la transferencia de calor por convección,  $H_e$  por evaporación y  $H_p$  por precipitación. Esta ecuación puede ser resuelta si se disponen de datos meteorológicos del lugar (Stefan & Ford 1975).

### 4.4. MUESTREO

Normalmente es suficiente medir las temperaturas a lo largo de un perfil vertical en el punto de máxima profundidad. En lagos compuestos de varias depresiones pueden importarse las variaciones horizontales, y son necesarias varias estaciones de muestreo, por lo que conviene verificar al principio de la investigación si tal variación es relevante.

El número y la localización de puntos en el perfil vertical dependen de la profundidad, del gradiente térmico y el grado de detalle requerido. Tras un primer muestreo a intervalos regulares conviene aumentar el número de puntos en el metalimnion.

La duración depende del ciclo térmico, pero será de un año cuando se hace por primera vez y en general donde importa la variación climática estacional. En estos casos la frecuencia mínima es la estacional, con la que pueden observarse distintas estructuras térmicas, pero no los procesos que conducen a las mismas. Además, un solo muestreo estacional puede no ser representativo si las condiciones meteorológicas prevalentes no son las típicas de la estación. Una frecuencia mensual puede ser suficiente para caracterizar el ciclo térmico, y es la más común en la literatura. Pero un estudio detallado del ciclo térmico y la estratificación requiere una frecuencia semanal. El mejor diseño es el que combina diferentes frecuencias, aumentándolas en los momentos de mayor cambio como la formación y ruptura de la termoclina, lo que en Uruguay sucede en primavera y otoño, respectivamente.

La temperatura puede medirse *in situ*. De no ser esto posible, la medición puede realizarse en forma inmediata en muestras de agua subidas a superficie. El agua, gracias a su alta capacidad calorífica, conserva la temperatura el tiempo suficiente para ello. Para facilitar esta operación, las botellas de muestreo tipo Ruttner o Schindler están provistas de un termómetro en su interior.

Las botellas muestreadoras son recipientes generalmente cilíndricos, de dos a seis litros de capacidad, abiertos en los dos extremos y con un sistema de cierre que se acciona a la profundidad deseada.

Las botellas deben ser de un material inerte como vidrio, acrílico o plástico de buena calidad. La botella Ruttner (Fig. 4.1) es un cilindro transparente montado sobre una estructura metálica cuyas tapas se cierran por medio de un resorte accionado por un mensajero. La botella Van Dorn, también cilíndrica, puede ser vertical u horizontal y sus tapas son dos sopapas unidas por dentro de la botella por una goma tensada, de modo que al descender abierta la goma está estirada y las tapas trabadas. Al liberarse éstas mediante un mensajero, la goma se contrae cerrando la botella. La trampa de Schindler es un muestreador prismático de acrílico transparente en el que las tapas, unidas por bisagras a lados opuestos de ambas aberturas, se abren hacia arriba y así permanecen durante el descenso gracias a un imán ubicado en el asa de la botella y al propio flujo ascendente del agua. Al detenerse, la misma presión del agua, o un pequeño tirón son suficientes para que se cierre, sin necesidad de mensajeros.

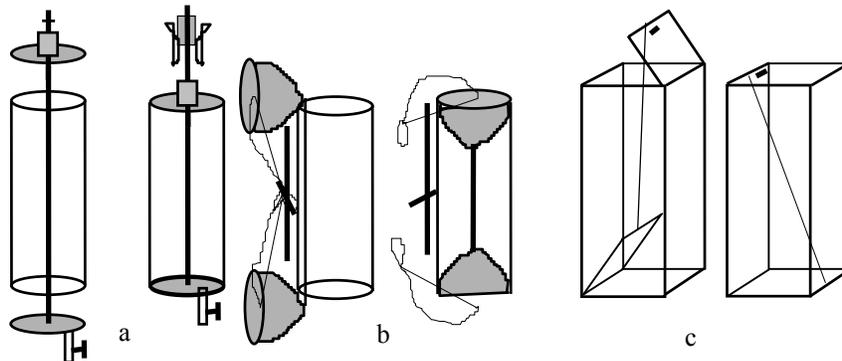


Figura 4.1. Botellas muestreadoras de agua: a) Ruttner, b) Van Dorn y c) Schindler, abiertas y cerradas.

Para la medición *in situ*, realizada en el pasado con termómetros de inversión, actualmente se usan sensores electrónicos (termocuplas, termistores). Estos se basan en que la resistencia de un conductor varía con la temperatura. Son de lectura instantánea y permiten hacer rápidamente un perfil detallado. Conectados a una planilla (termógrafo) proporcionan un registro continuo. Para obtener un valor más exacto, se mide al bajarlo y al subirlo, y se toma el promedio de ambas lecturas.

#### 4.5. RESULTADOS

Un perfil de temperatura muestra con una línea continua la estructura térmica en un momento dado. La resistencia térmica relativa suele graficarse mediante barras horizontales superpuestas a dicho perfil. El ciclo térmico anual se representa mediante un diagrama en que el eje vertical representa la profundidad y el horizontal el tiempo. A cada fecha y profundidad corresponde un valor de temperatura. Entre valores vecinos se interpolan los enteros que se unen con líneas suavizadas. Estos diagramas, además de describir el ciclo y la estructura térmicas, permiten cuantificar la capacidad de transporte del sistema, su estabilidad y la resistencia térmica. En la figura 4.2 se presenta un ciclo térmico anual para el lago Ton-Ton (Canelones).

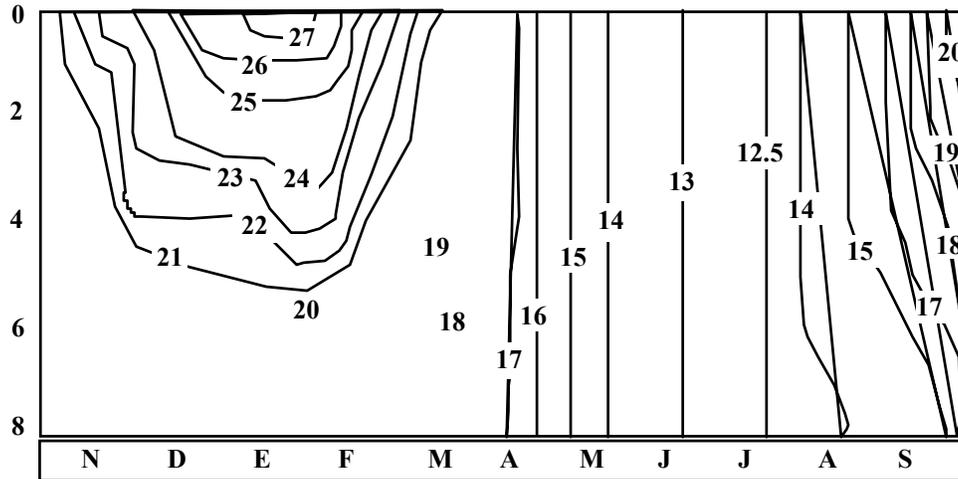


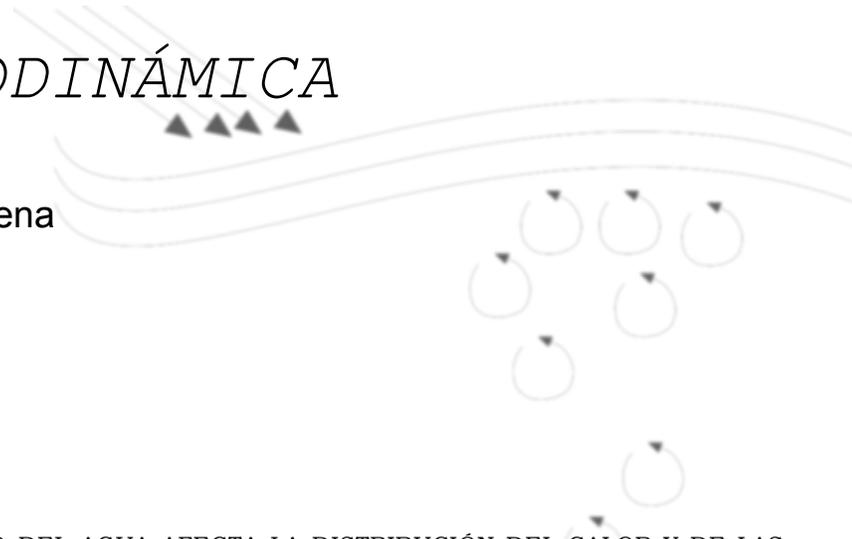
Figura 4.2. Ciclo térmico del lago Ton Ton durante 1986. El lago es monomítico cálido y presenta una estratificación estable desde fines de octubre hasta marzo (tomado de Sommaruga 1991).

## Capítulo 5

---

# HIDRODINÁMICA

Rafael Arocena



EL MOVIMIENTO DEL AGUA AFECTA LA DISTRIBUCIÓN DEL CALOR Y DE LAS demás propiedades y componentes en los ecosistemas acuáticos. Es generado principalmente por el viento y comprende un espectro de oscilaciones rítmicas en la superficie y zonas profundas de los cuerpos de agua. La morfometría, la estratificación y la exposición al viento, son los factores más importantes que determinan dichos movimientos (Wetzel 1983).

Cuando el agua en contacto con una interfase (aire, fondo u otra capa de agua de distinta densidad), supera cierta velocidad crítica de pocos  $\text{mm s}^{-1}$ , su movimiento se desordena, aparecen remolinos (*eddies*) y el flujo laminar se convierte en turbulento, el cual es el comúnmente encontrado en los sistemas acuáticos (Hutchinson 1957). Así se mezclan las capas de diferente densidad, formándose un gradiente de velocidad (*shear*) y otro de densidad, perpendiculares a la dirección de la corriente.

### 5.1. TURBULENCIA

La magnitud de la turbulencia depende de la relación entre la tasa a la cual los remolinos deben trabajar contra la gravedad para superar el gradiente de densidad, y el gradiente de velocidad o *shear stress* (Mortimer 1961). Esta relación es expresada por el número de Richardson:

$$Ri = g(\delta\rho/\delta z) / [\rho(\delta u/\delta z)^2]$$

donde  $g$  es la aceleración gravitacional ( $980.6 \text{ cm s}^{-2}$ ),  $\rho$  la densidad,  $\delta\rho/\delta z$  su gradiente vertical y  $\delta u/\delta z$  el gradiente vertical de velocidades horizontales. Valores inferiores a 0.25 indican un flujo turbulento.

Por otro lado, la turbulencia depende de la relación entre el cambio de velocidad y las propiedades viscosas del líquido, relación que puede ser definida por el número adimensional de Reynolds:

$$Re = \rho UL/\eta = UL/\nu$$

donde  $U$  es la velocidad media,  $L$  la distancia sobre la cual la velocidad es alterada,  $\eta$  la viscosidad y  $\nu$  la viscosidad cinemática ( $1.004 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  en agua dulce a  $20^\circ \text{C}$ ). Cuando  $Re$  excede un valor crítico (entre 500 y 2000 para el agua) el flujo es turbulento, porque tanto  $U$  como  $L$  aumentan y las fuerzas viscosas son insignificantes. El número de Reynolds para el canal fluvial puede calcularse de su profundidad y la velocidad media del agua. Para profundidades mayores a 10 cm, es suficiente una velocidad de  $10 \text{ cm s}^{-1}$  para que el flujo sea turbulento.

Un descriptor del flujo, fácilmente calculable para corrientes, es el de Froude:

$$F = U/\sqrt{gz}$$

o relación entre las fuerzas inerciales y las gravitacionales, que diferencia entre flujos tranquilos ( $F < 1$ ) y turbulentos ( $F > 1$ ).

La velocidad del agua en contacto con el fondo es nula, por lo que debe existir una zona de agua profunda, denominada capa límite, donde se produce un fuerte gradiente de velocidades. Su espesor depende de la rugosidad del fondo, la que puede obtenerse del tamaño de grano del sedimento (Allan 1995).

## 5.2. TRANSPORTE TURBULENTO

La distribución del movimiento turbulento puede estimarse por el transporte de una propiedad cualquiera a través de un plano, como el producto del gradiente perpendicular al plano por un coeficiente de intercambio. Así, el coeficiente de difusión turbulenta  $A$  (*Austausch, eddy diffusion*) mide la intensidad de la mezcla en un gradiente de temperatura. El flujo de calor a través de una sección  $dx^2$  es:

$$\delta Q/\delta t = A\sigma\rho(\delta T/\delta z)\delta x^2$$

donde  $\delta Q/\delta t$  es el flujo de calor ( $\text{cal s}^{-1}$ ) que corresponde a la tasa promedio del cambio de temperatura de  $1 \text{ cm}^3$  de agua entre dos puntos en el tiempo  $t$ ,  $\delta T/\delta z$  es el gradiente vertical de temperatura ( $^\circ\text{C cm}^{-1}$ ),  $\sigma$  el calor específico ( $1 \text{ cal g}^{-1} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ) y  $\rho$  la densidad ( $1 \text{ g cm}^{-3}$ ). Para  $1 \text{ cm}^3$  de agua:

$$A = (\delta Q/\delta t)/(\delta T/\delta z)$$

Valores típicos de  $A$  para aguas superficiales bien mezcladas van de 0.2 a  $50 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , y para el metalimnion de lagos templados, de  $4\%10^{-6}$  a  $8\%10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ .

El coeficiente  $A$  puede obtenerse de perfiles térmicos sucesivos dividiendo las calorías (o  $^\circ\text{C}$  si consideramos  $1 \text{ g}$  en  $1 \text{ cm}^3$ ) por unidad de tiempo, entre el promedio del gradiente térmico inicial y final.

Otra forma de estudiar la estabilidad vertical de la columna de agua es la frecuencia de Brunt-Vasala, basada en la diferencia de densidades en un determinado rango de profundidad:  $(g/\rho)(\delta\rho/\delta z)$ .

## 5.3. OLAS

La importancia de las olas en limnología se reduce a su acción en la orilla, ya que este movimiento básicamente se limita a las capas superficiales. El viento imprime a

la superficie del agua un movimiento de ondas superficiales viajeras, caracterizadas por su longitud ( $\lambda$ ), frecuencia ( $\nu$ ) y altura ( $h$ ). Cuando la longitud de onda de las olas superficiales es menor a 6.3 cm, éstas se denominan ondas capilares o *ripples*,

$$h = 0.105\sqrt{f}$$

usualmente observadas en las orillas de los lagos. Las de longitud mayor son las ondas de gravedad. La altura máxima que pueden alcanzar las olas en un lago es proporcional a la raíz cuadrada del alcance o *fetch* ( $f$ , ver 2.2):

Cuando las ondas superficiales encuentran menor profundidad, su longitud disminuye y la altura aumenta. Cuando la relación  $h:\lambda$  alcanza un valor 1:10, la onda se vuelve asimétrica, volcándose sobre su frente. La energía resultante transporta sedimentos a zonas más profundas e inhibe el crecimiento de organismos no adaptados a esta turbulencia.

Si la turbulencia en el epilimnion aumenta, se producen ondas internas sobre el metalimnion, las cuales se tornan inestables y colapsan (inestabilidad de Kelvin-Helmholtz). Parte del agua es entonces atrapada en la circulación epilimnética, y la superficie del metalimnion es deprimida.

## 5.4. SECAS

En sistemas grandes con vientos duraderos, el agua se acumula a sotavento donde sube su nivel, se hunde por gravedad y regresa sobre el fondo o sobre el metalimnion. Estas ondas, al ser reflejadas por las orillas producen secas (*seiches*), así llamadas por la exposición del litoral al secado periódico. La superficie del agua o la termoclina oscilan alrededor de un nodo sin movimiento vertical y con el máximo movimiento de vaivén horizontal, mientras en los extremos o antinodos sucede lo inverso. En una cubeta rectangular, muy larga y poco profunda, el periodo ( $t$ ) de la oscilación vertical superficial sería aproximadamente:

$$t = 2L/\sqrt{gz}$$

donde  $L$  es la longitud de la cubeta,  $z$  su profundidad media y  $g$  la aceleración de la gravedad. También existen secas transversales con periodos y amplitudes menores o secas múltiples muy complicadas cuando el largo y el ancho son similares. Las secas pueden ser uninodales, binodales o multinodales.

El metalimnion puede inclinarse y producirse un movimiento oscilatorio (seca interna), de amplitud y periodo generalmente mayores que en la seca superficial:

$$t = 2L/\sqrt{g(d_h - d_e)/(d_h/z_h + d_e/z_e)}$$

donde  $d_h$  y  $z_h$  son la densidad y profundidad del hipolimnion y  $d_e$  y  $z_e$  las del epilimnion. Aunque esta fórmula es para cubetas rectangulares con epilimnion e hipolimnion homogéneos, da valores cercanos a los hallados empíricamente.

Las corrientes horizontales resultantes, máximas bajo los nodos, son los mayores movimientos de agua profunda en los lagos.

## 5.5. CORRIENTES

Las corrientes son movimientos no periódicos del agua generados principalmente por el viento. La relación porcentual entre ambas velocidades se denomina factor del viento y es cercano a 2% hasta una velocidad crítica ( $\alpha$  6 m s<sup>-1</sup>), en que deja de comportarse linealmente. La rotación de la Tierra desvía las corrientes hacia la izquierda en el Hemisferio Sur en 45° de la dirección del viento en lagos con gran área (espiral de Ekman), ángulo que disminuye hasta ser insignificante en lagos pequeños y someros debido al efecto de los bordes.

Otras corrientes son las causadas por la entrada de un afluente en un sistema léntico, en el que el agua fluye dentro de un estrato de densidad similar. El agua entrante reduce su velocidad (v) mientras aumenta la profundidad (z) hasta cierta sección (A) crítica caracterizada por el número densimétrico de Froude:

$$F = (v/A) / \sqrt{g(\Delta\rho/\rho)z}$$

En lagos grandes ocurre una circulación litoral constante, debido al calentamiento más rápido de las orillas. En lagos pequeños este fenómeno dura a lo sumo unos pocos días. Vientos superiores a 3 m s<sup>-1</sup> producen corrientes verticales helicoidales, que forman celdas circulares entre líneas de convergencia y divergencia paralelas a la dirección del viento. Este tipo de circulación, llamada de Langmuir, es fácilmente observable porque en las zonas de convergencia se acumulan materiales y espuma.

## 5.6. CORRIENTE FLUVIAL

La corriente fluvial es el movimiento del agua canal abajo. Los sitios de mayor corriente y erosión son los llamados rápidos (*riffles*), y donde aquélla es más lenta y domina la acumulación, se forman los remansos (*pools*). Su velocidad depende de la pendiente, rugosidad y forma del lecho.

La velocidad en un canal abierto es máxima debajo de la superficie y en el centro del cauce, y mínima en orillas y fondo. Decece logarítmicamente con la profundidad:

$$z = a b^v \quad \text{Log } z = \text{Log } a + v \text{ Log } b$$

La velocidad media del perfil vertical coincide con la del 60% de la profundidad, y corresponde a 80% de la de superficie. Su medición se realiza con un correntómetro a una profundidad equivalente a 60% de la profundidad total, o con un flotador cuya velocidad, medida a lo largo de cierto trecho, es multiplicada por 0.8 (Allan 1995).

### 5.6.1. CAUDAL

El caudal, flujo o descarga es la cantidad de agua que lleva un río en cierto tiempo, que depende de la precipitación y escorrentía de la cuenca. El caudal (Q) es el volumen (V) que pasa a por una sección transversal (S) del canal por unidad de tiempo (t):

$$Q = V/t$$

Como el volumen es el producto de la sección transversal por un determinado largo del curso, y la sección es a su vez el producto de la profundidad media (Z) por el ancho (W), el caudal se calcula como el producto de la sección por la velocidad

$$Q = ZW(L/t) = SU$$

$$V = SL = ZWL$$

(U):

La medición debe realizarse en un sitio (estación de aforo), ubicado en un tramo recto y sin obstáculos del curso, a efectos de que la corriente sea lo más homogénea posible. Una vez medido el ancho, éste se divide en tramos iguales, convenientemente más de 6 de modo de tener por lo menos 5 puntos donde medir la profundidad y la velocidad media. Luego de calcular la sección correspondiente a cada punto, se multiplica por su velocidad media y se obtiene el caudal de la sumatoria de todos los productos.

Si en la misma estación de aforo se realizan muchas mediciones de caudal sobre un rango amplio de condiciones, y en cada oportunidad se registra el nivel en un limnómetro fijo en una de las orillas, se puede construir una curva del nivel de agua en función del caudal. El nivel también puede registrarse de manera continua mediante un limnógrafo. Una vez obtenida esta curva, es suficiente con leer el limnómetro para conocer el caudal en cualquier momento (Beaumont 1975).

El caudal se relaciona con el área de drenaje (Leopold 1964), según:

$$Q = jA^m$$

por lo que también es conveniente expresarlo como caudal relativo o específico, dividiéndolo por el área de su cuenca. Esto permite comparar cuencas de distintos tamaños. Sin embargo y debido a que la variación del caudal con el área de la cuenca no es lineal, el caudal relativo disminuye conforme el área aumenta. Un parámetro menos influenciado por el área es el coeficiente (C) de Myer-Coutagne-Pardé (Guilcher 1979):

$$C = Q/\sqrt{A}$$

### 5.6.2. HIDROGRAMA

El hidrograma es un gráfico de la variación del caudal a lo largo de un determinado tiempo. Puede proporcionar información sobre el patrón anual de descarga o sobre la respuesta inmediata del flujo a las tormentas. En general, durante una crecida el caudal aumenta más rápido de lo que desciende. La parte ascendente de la curva es cóncava, reflejando la capacidad de infiltración de la cuenca, y más pronunciada cuanto mayor es el flujo superficial. La parte descendente indica el flujo del agua almacenada en el suelo después que la lluvia cesó.

Los hidrogramas son más anchos y menos escarpados aguas abajo, donde la suma de varios tributarios resulta en una dinámica menos definida que sus eventos particulares.

El desborde anual medio es el promedio de las descargas máximas de varios años, un parámetro importante en la formación de la llanura de inundación. Los datos del hidrograma pueden analizarse para determinar la probabilidad (P) de ocurrencia de una descarga igual o mayor a cierto valor en T años:

$$P = 1/T$$

### 5.7. TIEMPO DE RENOVACIÓN

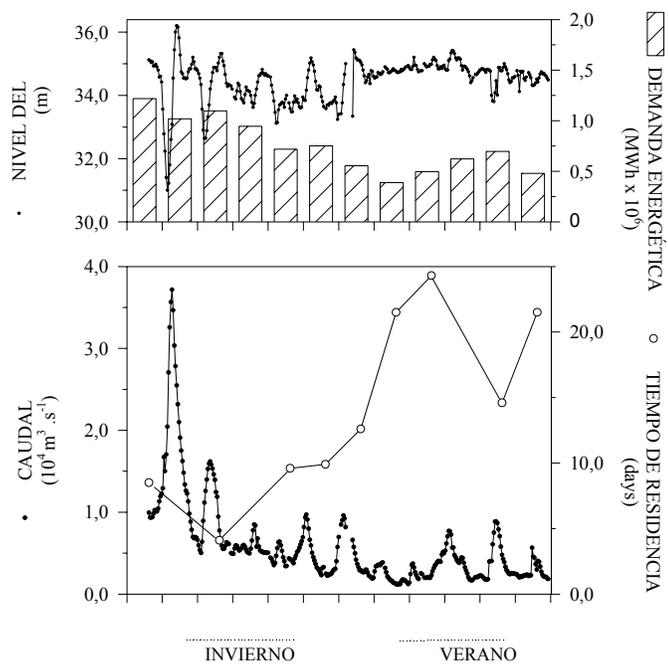
Frecuentemente interesa conocer el tiempo que la masa de agua requiere para renovarse totalmente en un ecosistema dado. Aunque distintas masas de agua pueden tener diferentes tiempos de residencia, y las sustancias presentes estar sometidas a procesos que las retengan en el sistema por un lapso mayor, existe un tiempo promedio fácilmente calculable, que brinda una primer aproximación a la dinámica del sistema.

El tiempo de renovación del agua es el cociente entre el volumen y el caudal de salida o entrada del sistema. Su recíproca es la tasa de renovación, o veces que el agua se renueva por unidad de tiempo.

## 5.8. RESULTADOS

En la figura 5.1 se presenta la dinámica anual de algunos parámetros hidrológicos del embalse de Salto Grande durante 1992 y 1993. Puede observarse una importante variación diaria del nivel de agua entre mayo y noviembre, coincidiendo con la mayor demanda energética. En la gráfica inferior se presenta el caudal erogado por la presa, mínimo a fines de diciembre, lo que resulta en un mayor tiempo de residencia durante el verano (tomado de Conde *et al.* 1996).

Figura 5.1. Aspectos hidrológicos del embalse de Salto Grande durante 1992 y 1993.



## Capítulo 6

---

# SEDIMENTO

Rafael Arocena



EL SEDIMENTO ACUMULADO SOBRE EL FONDO DE LOS ECOSISTEMAS ACUÁTICOS comprende una fase sólida y otra de agua. Esta última constituye entre 20 y 80% del peso del sedimento, dependiendo del tamaño y compactación de las partículas. Estas pueden ser de origen alóctono, autóctono o autigénicas (formadas en el sedimento mismo). También se distingue una fracción orgánica de otra inorgánica.

En la interfase agua-sedimento existe un transporte de materiales en ambos sentidos, proceso que puede afectar las propiedades químicas de la columna de agua. El tipo de sedimento determina la presencia y abundancia del bentos y brinda un registro histórico del cuerpo de agua y su cuenca, como se describe en el capítulo 20.

Las propiedades del sedimento varían horizontal y verticalmente, dependiendo fundamentalmente de la energía del agua de fondo. Las partículas menores a 1 mm se resuspenden fácilmente, formando con frecuencia una capa difusa llamada nefeloide.

### 6.1. MUESTREO

#### 6.1.1. DISEÑO

El sistema de muestreo más frecuente y sencillo para caracterizar el sedimento y su variación espacial en un cuerpo de agua, es el de tipo grilla regular, que cubre de manera homogénea toda el área. Otros diseños son el determinístico y el aleatorio, que requieren un conocimiento previo del sistema. Håkanson & Jansson (1983) dan una fórmula empírica para determinar el número necesario de muestras distribuidas regularmente:

$$n = 2.5 + 0.5\sqrt{A \text{ DL}}$$

donde A es el área superficial y DL el desarrollo de la línea de costa (ver 2.2), una medida indirecta de la rugosidad del fondo y por lo tanto de la heterogeneidad del sedimento. El área es dividida uniformemente entre el número de muestras así obtenido, proporcionando las dimensiones de cada cuadrícula. La grilla correspondiente puede ubicarse aleatoriamente sobre el mapa del lago, y los sitios de muestreo en el centro de cada cuadrícula o parte de cuadrícula que queda incluida por la línea de costa.

### 6.1.2. EQUIPOS MUESTREADORES

Para obtener muestras inalteradas de sedimentos, el muestreador debe cumplir ciertos requisitos (Håkanson & Jansson 1983):

- 1) Evitar la presión sobre el agua y el sedimento durante el descenso, para lo cual debe dejar pasar libremente el agua.
- 2) Minimizar la deformación y compactación del sedimento durante su penetración, para lo cual debe tener paredes delgadas comparadas con el área de muestreo (< 10%), lo que no se logra con tubos muy pequeños, así como superficies interiores lisas y bordes afilados. El flujo de agua hacia arriba debe ser irrestricto durante la penetración, y el aparato no puede cerrarse antes de ser subido.
- 3) No perder el material durante el ascenso. El mecanismo ideal debe cerrar *in situ* de manera firme, y en ambos extremos si se trata de un tubo.
- 4) Un muestreador transparente, al menos en uno de sus lados, permite observar y fotografiar la estructura vertical del sedimento.
- 5) A efectos de poder submuestrear, el sedimento extraído debe ser accesible desde arriba.
- 6) Para poder ser usado tanto en sustratos blandos como en duros, la estructura debe permitir el agregado de pesas intercambiables, así como un tope exterior que evite una penetración excesiva.
- 7) No debe exceder los 20 kg de peso a efectos de ser operable manualmente.
- 8) Las dragas son más apropiadas para sedimentos gruesos o ricos en conchas calcáreas con menos de 50% de agua, mientras que los *corers* o núcleos operan mejor en sedimentos finos o blandos, con más de 60% de agua.

#### DRAGAS

La draga Ekman es la más utilizada en los estudios de sedimentos y bentos (Downing 1984). Consiste básicamente en una caja de bronce o acero inoxidable abierta arriba y abajo. Dos medias tapas superiores permanecen abiertas durante el descenso, y dos mandíbulas inferiores se cierran por fuertes resortes, cortando el sedimento cuando son liberadas por un mensajero (Fig. 6.1, pág. siguiente). Esta draga no es apropiada para sedimentos arenosos o de mayor tamaño de grano, porque limita la profundidad de penetración y obstruye su mecanismo de cierre.

La draga Petersen consta de dos mandíbulas que se cierran automáticamente cuando su penetración en el sedimento libera la tensión en la cadena que las mantiene abiertas. Si bien opera en sedimentos más resistentes que la Ekman, su peso y la onda de presión resultante induciría a la pérdida de los sedimentos superficiales.

La draga Ponar ha sido modificada por Håkanson para satisfacer la mayoría de los requisitos enumerados. Es una pieza versátil, apta tanto para sedimentos resistentes como para lodo, pero su exactitud varía con el tipo de sedimento. Las mandíbulas se mantienen abiertas mediante un gancho que es liberado al llegar al sedimento, cuando cesa la tensión sobre el cable de descenso. La propia tracción del cable hacia arriba cierra las mandíbulas.

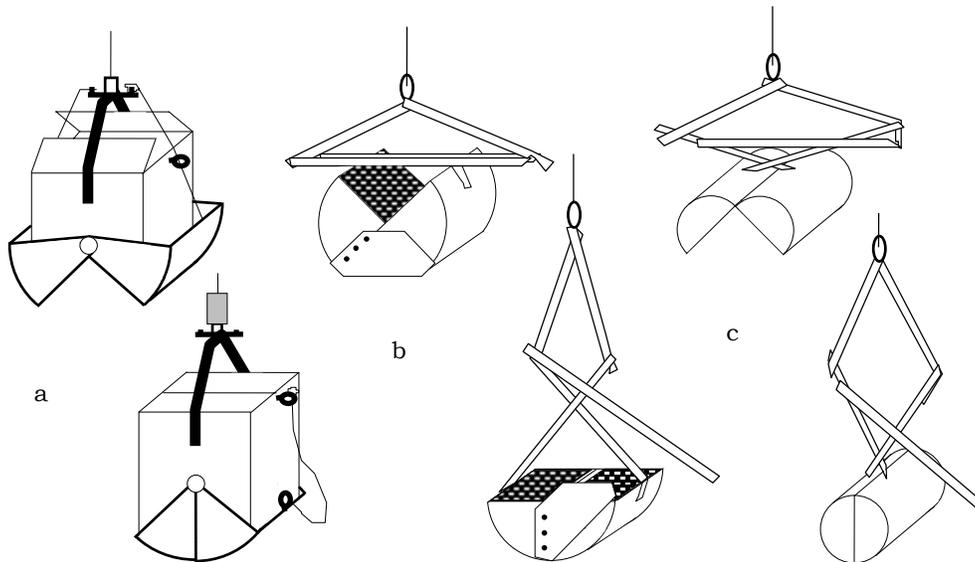


Figura 6.1. Dragas a) Ekman, b) Petersen y c) Ponar, abiertas (arriba) y cerradas (abajo).

#### CORERS

Son tubos largos y abiertos en sus extremos -normalmente de plástico o acrílico transparente- que penetran el sedimento por gravedad y luego se cierran herméticamente por arriba para evitar la presión hidrostática sobre la muestra, que de esta manera queda retenida en el tubo cuando es desenterrado y ascendido. Eventualmente, otro mecanismo lo cierra también por debajo asegurando la muestra de sedimento y agua sobrenadante durante el ascenso. Ofrece dificultades en el sedimento resistente, arenoso o de mayor tamaño de grano. Su operación puede ser manual, por buceo libre o mediante algún dispositivo (Fig. 6.2, pág. siguiente).

Entre sus muchas variantes, el Kajak y el Kajak-Brinkhurst son los más comunes. Una válvula, liberada al cesar la tracción del descenso cuando llega al sedimento, lo cierra por arriba, y su pequeña superficie de muestreo (entre 4 y 6 cm de diámetro) asegura una cohesión suficiente para que no se pierda el material obtenido, si éste es relativamente fino.

El Phleger es un muestreador pesado, en el cual un tubo de acrílico se coloca dentro de una camisa metálica, lo que permite su penetración en un sustrato más duro y grueso. La muestra puede ser retenida mediante un dispositivo llamado piel de naranja, consistente en un aro - ajustado a la abertura inferior -, del que salen varias láminas flexibles hacia adentro y arriba del tubo. Durante la penetración del sedimento, las láminas se abren hacia arriba dejando pasar la muestra, pero durante el ascenso el propio peso de ésta las cierra evitando su pérdida.

El Gilson está provisto de un largo mango, para su uso en aguas someras. La presión manual sobre el mismo facilita la penetración, y luego un simple giro activa el sistema de cierre por arriba.

También se han diseñado *corers* múltiples, que reducen el esfuerzo de muestreo al obtener varias réplicas simultáneamente.

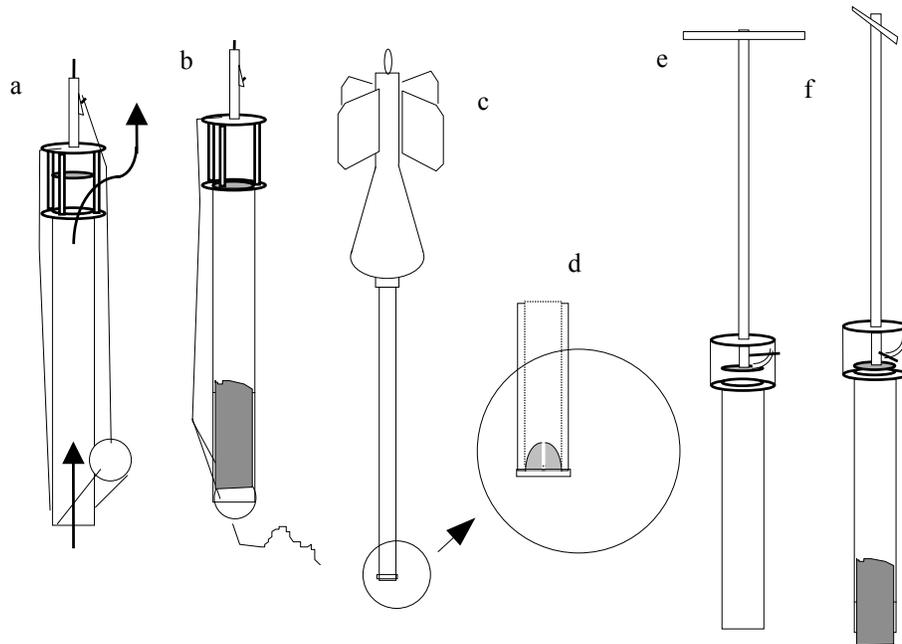


Figura 6.2. Corers tipo a) Kajak en descenso y b) en ascenso con la muestra, c) Phleger, con d) detalle del extremo inferior conteniendo el tubo y la piel de naranja, e) Gilson en posición de descenso y f) de ascenso con la muestra.

### 6.1.3. DESCRIPCIÓN Y CLASIFICACIÓN

La utilización de *corers* transparentes permite una inspección ocular inicial del sedimento *in situ*, en particular de su estructura vertical. Algunas características conspicuas como el color, consistencia, tamaño de grano, composición, presencia de restos vegetales o animales, y sus cambios en profundidad, deben ser registrados oportunamente. Esto permite una clasificación directa, como la basada en Naumann (1931):

- 1) Fracciones orgánica e inorgánica bien mezcladas, granos pequeños:
  - a) poco contenido orgánico, bien oxigenado, gris o marrón grisáceo: GYTTJA
  - b) contenido orgánico alto, anaeróbico, negro, olor a sulfhídrico: SAPROPEL
- 2) Fracción orgánica dominante, blando (como gel), color marrón sucio: DY

### 6.2. SUBMUESTREO

Las muestras obtenidas, principalmente con ciertas dragas, pueden ser muy voluminosas, o bien pueden requerirse varias réplicas de una misma muestra, por lo cual la misma debe ser subdividida. Para ello se la debe homogeneizar, mezclándola en una bandeja amplia, sobre la cual se extiende el sedimento en forma más o menos circular. Luego se procede al cuarteado, que es su división mediante dos o más diámetros, en sectores, tomándose los opuestos.

En ciertos estudios interesa conocer la distribución vertical de algunas propiedades del sedimento, para lo cual es necesario separarlo en capas. Los *corers* son los muestreadores más apropiados para ello porque colectan una columna sin de-

formar y permiten, una vez retirada el agua sobrenadante, sacar gradualmente la muestra por arriba, empujándola desde abajo con un émbolo ajustado a su diámetro interno. Un sedimento suficientemente cohesivo puede así ser llevado 1 cm o más por encima del borde superior del *corer*, y cortado con una lámina metálica delgada y filosa, por ejemplo de aluminio. Para obtener cortes más finos se requieren técnicas y aparatos especiales como el cuchillo y la guillotina electro-osmóticas o el congelamiento (Håkanson & Jansson 1983).

Los estudios de las reacciones químicas en el sedimento, o de los intercambios entre éste y el agua sobrenadante, requieren muestras del agua intersticial, libre entre los granos del sedimento. Esta agua puede obtenerse del sedimento mediante una jeringa (en el caso de sedimentos gruesos), o separarse por centrifugación, filtración o diálisis. La centrifugación es el método más simple y rápido, a la vez que el menos exacto y preciso, pudiendo inducir una oxidación de la muestra o alterar el equilibrio gaseoso. La filtración por filtros de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  es la técnica más utilizada, y si se hace en una atmósfera con nitrógeno gaseoso se puede evitar la oxidación. Las cámaras o bolsas de diálisis conteniendo agua destilada permiten un muestreo *in situ* y a varias profundidades simultáneamente. Deben permanecer en el sedimento hasta que alcanzen el equilibrio, es decir se igualen sus concentraciones con las del medio, normalmente durante una semana.

La distribución vertical de algunos parámetros medibles con electrodos finos como el pH, el potencial redox o la temperatura, puede muestrearse directamente en el *corer* apenas obtenida la muestra. Para ello se realizan pequeñas perforaciones en la pared del *corer*, las que selladas con silicona permiten el paso de los electrodos pero no del agua. La serie de perforaciones conviene realizarla a lo largo de una línea en espiral alrededor del *corer*, a efectos de no debilitarlo.

### 6.3. GRANULOMETRÍA

El tamaño de grano del sedimento influye en la composición del bentos, y su conocimiento permite identificar procesos hidrodinámicos y determinar la capacidad para atrapar elementos. El tamaño medio se relaciona inversamente con el contenido de materia orgánica, el consumo de oxígeno y el número de bacterias. Horizontalmente disminuye en los lagos con la profundidad, en lagunas costeras con la distancia al mar, y en ríos aguas abajo, debido a la disminución de la energía del agua.

Varía en 7 órdenes de magnitud desde décimas de micra hasta metros, por lo que se emplea una escala logarítmica (en base 2 porque sucesivamente se duplican los diámetros) según la nomenclatura de Wentworth y la escala de Krumbein (Tabla 6.1, pág. siguiente). Las unidades  $\phi$  equivalen al  $-\log_2$  del diámetro expresado en mm.

#### 6.3.1. ANÁLISIS

La coexistencia de varios tamaños de grano en un mismo sedimento obliga a su tratamiento estadístico. Una vez obtenida una cantidad suficiente de muestra, dependiendo del tamaño de grano (Tabla 6.2, pág. siguiente), se puede determinar su distribución de frecuencias por diversos métodos. Para tamaños menores a 64 o 32  $\mu\text{m}$  se recurre a la velocidad de sedimentación como en el pipeteado, mientras que para los mayores, al tamizado.

Tabla 6.1. Escalas de tamaño y denominación de los sedimentos según la escala de Krumbein y la nomenclatura de Wentworth.

mm	$\Phi$	Wentworth
> 256	< -8	canto rodado
128 - 256	-7	guijarro
64 - 128	-6	"
32 - 64	-5	pedras
16 - 32	-4	
8 - 16	-3	
4 - 8	-2	
2 - 4	-1	gránulos
1 - 2	0	arena muy gruesa
0.5 - 1	1	arena gruesa
0.25 - 0.5	2	arena media
0.125 - 0.25	3	arena fina
0.064 - 0.125	4	arena muy fina
0.032 - 0.064	5	limo grueso
0.016 - 0.032	6	limo medio
0.008 - 0.016	7	limo fino
0.004 - 0.008	8	limo muy fino
0.002 - 0.004	9	arcilla gruesa
0.001 - 0.002	10	arcilla media

Tabla 6.2. Tamaño de muestra mínimo para el análisis granulométrico.

Textura	Cantidad
Piedras > 10 cm	300 piezas
Grava	5000 g
Arena gruesa	200 - 300 g
Arena	100 g
Arena fina	20 g
Limo, Arcilla	5 - 20 g

#### ELIMINACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA

Cuando hay abundante materia orgánica, más comúnmente en sedimentos finos, conviene eliminarla previamente para evitar la cohesión de las partículas.

##### Procedimiento

- 1) Calentar 150 - 250 g de muestra en un vaso de precipitado Pyrex de 1 l.

- 2) Antes de alcanzar la ebullición, agregar 100 - 120 ml de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de 30 volúmenes. Esto debe hacerse con precaución debido al ataque violento del peróxido.
  - 3) Mezclar y repetir la operación hasta que cese el ataque.
  - 4) Lavar las paredes del recipiente y llevar a ebullición hasta eliminar todo el peróxido.
- TAMIZADO

Puede hacerse en el material húmedo o seco. En el primer caso, preferible en sedimentos finos, el pasaje del mismo por los tamices es favorecido por una lluvia de agua, la que debe ser colectada a la salida, pues contiene el sedimento más fino.

Se hace pasar la muestra por una columna de tamices, normalmente de 2000, 1000, 500, 250, 125, 63 y eventualmente 32  $\mu\text{m}$  (-1 a 5  $\Phi$ ), asegurados sobre un agitador potente (*sieve shaker*) durante 15 min a alta velocidad. Para estudios geológicos se emplean también los tamices intermedios, es decir cada media unidad  $\phi$ . Cada fracción se pesa a 0.1 g de resolución.

#### PIPETEADO

Las fracciones más finas se determinan sobre la base de su velocidad de sedimentación. Como ésta depende de la temperatura, todo el procedimiento debe realizarse a temperatura constante. La muestra debe estar compuesta sólo de limo y arcilla, separando el material más grueso mediante lavado por un tamiz de 63 o 32  $\mu\text{m}$ .

Se debe preparar una suspensión del sedimento en estado de dispersión, de modo que cada partícula actúe independientemente durante la sedimentación (Twenhofel & Tyler 1941). Entre 20 y 30 g de muestra pesada se colocan en un cilindro graduado de 1000 ml, conteniendo una solución 0.01 N de oxalato de sodio (0.67 g C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> por litro) o 0.04 N de carbonato de sodio (2.12 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> por litro).

Tras la dispersión se completan 1000 ml con agua destilada, y se lee la temperatura. Esta probablemente no varíe significativamente en el lapso de aproximadamente una hora durante el que se hacen las extracciones para las fracciones de hasta 8  $\Phi$ . Para tamaños menores, la temperatura debe mantenerse constante mediante un baño, de ser necesario.

La operación comienza agitando la suspensión, moviendo hacia arriba y abajo una varilla provista de un disco horizontal de diámetro similar al diámetro interno del cilindro y con orificios para permitir el pasaje del agua. Al primer tiempo y profundidad indicados en la tabla 6.3 se toman con pipeta y sin agitar 20 ml de la suspensión, los que se colocan en un pequeño recipiente, previamente pesado e identificado, donde se evaporan y pesan. El peso del sedimento (A), corregido por el peso del dispersante contenido en 20 ml y multiplicado por 50, corresponde al material menor o igual a la primer fracción en 1000 ml. Por lo tanto, este peso se debe restar del peso del sedimento total agregado (T), para obtener la primer fracción ( $T - A = \Phi 5$ ). El peso de cada extracción subsiguiente debe restarse del de la extracción anterior para obtener el correspondiente a cada fracción de tamaño.

Tabla 6.3. Tiempos y profundidades (cm) de extracción para el análisis granulométrico de limo y arcilla a diferentes temperaturas (°C).

$\Phi$	$\mu\text{m}$	Prof.	18°	20°	25°	27°
5	32.0	10	02 min 00 s	01 min 54 s	01 min 41 s	01 min 37 s
6	16.0	10	08 min 00 s	07 min 36 s	06 min 45 s	06 min 27 s
7	8.0	10	31 min 59 s	30 min 26 s	27 min 01s	25 min 49 s

8	4.0	5	63 min 58 s	60 min 51 s	54 min 02 s	51 min 39 s
9	2.0	5	04 h 16 min	04 h 03 min	03 h 36 min	03 h 27 min
10	1.0	5	17 h 05 min	16 h 14 min	14 h 25 min	13 h 46 min
11	0.5	5	68 h 14 min	64 h 54 min	57 h 38 min	55 h 05 min

### 6.3.2. CÁLCULOS

Los pesos de cada fracción obtenidos se transforman en porcentajes, y con éstos se construye un histograma (% vs.  $\Phi$ ), en el que los tamaños mayores aparecen a la izquierda, disminuyendo (aumentando  $\Phi$ ) hacia la derecha.

La distribución de tamaños puede entonces definirse por varios parámetros. La moda es el tamaño de partícula más frecuente, y puede ser más de una cuando se trata de un sedimento bimodal o polimodal. La mediana es preferible a la media en distribuciones asimétricas. El desvío estándar y la selección son medidas de la dispersión de tamaños.

Sobre el histograma se puede trazar una curva de porcentajes acumulados, que es de tipo sigmoideo si los datos se aproximan a una distribución normal. De esta curva se obtienen los cuartiles (Q%), o valores de  $\Phi$  correspondientes a determinados porcentajes, necesarios para el cálculo de los parámetros estadísticos (Folk & Ward 1957). Debido a que determinados cuartiles son difíciles de leer de una curva sigmoidea, ésta puede ser transformada en una recta, graficando sobre una escala probabilística. De allí pueden obtenerse la media ( $\bar{x}$ ), mediana (m), desvío estándar ( $\sigma$ ) y selección (s):

$$\begin{aligned}\bar{x} &= (Q16 + Q50 + Q84)/3 \\ m &= Q50 \\ \sigma &= (Q84 - Q16)/4 + (Q95 - Q5)/6.6 \\ s &= (Q95 - Q5)/2\end{aligned}$$

La asimetría es una medida de la “no normalidad”. Valores negativos indican que la distribución tiene una cola de materiales gruesos y viceversa. La curtosis es la selección en los extremos de la curva comparada con la selección en la parte central, indicadas por el grado de achatamiento de la curva.

La asimetría ( $S_k$ ) y la curtosis (K) deben obtenerse de la curva sigmoidea sin ajustar, porque estos parámetros precisamente indican cuánto se aparta la muestra de una distribución normal:

$$\begin{aligned}S_k &= (Q16 + Q84 - 2Q50)/[2(Q84 - Q16)] + (Q95 + Q5 - 2Q50)/[2(Q95 - Q5)] \\ K &= (Q95 - Q5)/[2.44(Q75 - Q25)]\end{aligned}$$

En las tablas 6.4, 6.5 y 6.6 se presentan las diferentes clases de selección, asimetría y curtosis, respectivamente, con las que puede clasificarse una muestra de sedimento.

Tabla 6.4. Clases de selección según el desvío estándar.

$\Phi$	Clase
< 0.35	muy bien seleccionada

0.35 - 0.50	bien seleccionada
0.50 - 1.00	moderadamente seleccionada
1.00 - 2.00	pobremente seleccionada
2.00 - 4.00	muy pobremente seleccionada
> 4.00	muy mal seleccionada

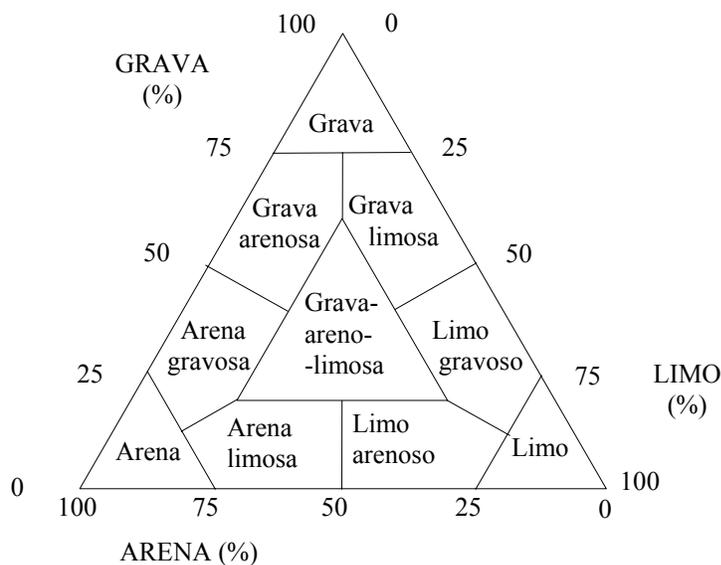
Tabla 6.5. Clases de asimetría.

Sk	Clase
-1.00 a -0.30	muy negativa
-0.30 a -0.10	negativa
-0.10 a 0.10	casi simétrica
0.10 a 0.30	positiva
0.30 a 1.00	muy positiva

Tabla 6.6. Clases de curtosis.

K	Clase
< 0.67	muy platicúrtica
0.67 - 0.90	platicúrtica
0.90 - 1.11	mesocúrtica
1.11 - 1.50	leptocúrtica
1.50 - 3.00	muy leptocúrtica
> 3.00	extremadamente leptocúrtica

Una clasificación simple del sedimento en base a su granulometría puede obtenerse ubicando los porcentajes de grava (> 2 mm), arena (0.063 - 2.0 mm) y limo/arcilla (< 63 mm), o de arena, limo y arcilla (< 2 mm), en el gráfico triangular de Shepard (Fig. 6.3).



*Figura 6.3.* Diagrama Triangular de Shepard para determinar la clase de sedimento según el porcentaje presente de cada fracción.

## 6.4. PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS

### 6.4.1. PESO SECO Y POROSIDAD

La muestra, extendida sobre una bandeja, se seca en estufa a 105 °C si es arena o grava, y a 60 °C si es sedimento más fino para evitar su floculación, hasta alcanzar un peso constante (normalmente 24 h). Si previamente conservaba su contenido normal de agua embebida, esta operación puede aprovecharse para determinar el contenido de agua por diferencia de pesos antes y después del secado, expresada como porcentaje del peso fresco o total.

El contenido de agua debe interpretarse junto con el tamaño de grano, ya que puede tanto representar la porosidad o espacio libre entre los granos, o indicar una alta cantidad de agua ligada coloidalmente. La permeabilidad es la tasa de percolación de agua a través del sedimento, y depende de la porosidad pero también del grado de interconexión entre los poros.

### 6.4.2. MATERIA ORGÁNICA

El contenido de materia orgánica puede ser estimado mediante determinación del carbono orgánico por diversos métodos, como el análisis infrarrojo y la espectrofotometría. Sin embargo, la forma más sencilla y común es la pérdida de peso por ignición. Esta equivale aproximadamente el doble del contenido de carbono cuando las pérdidas son mayores al 10%. Como sólo se trata de una aproximación gruesa del contenido orgánico, siempre debe referirse como pérdida de peso por ignición.

La muestra de sedimento debe conservarse en frío para evitar la descomposición de la materia orgánica, la que ha de determinarse lo más pronto posible. Entre 1 y 2 g de muestra seca llevada a temperatura ambiente en un desecador, se pesan a 0.1 mg y se queman en una mufla a 450 °C durante dos horas. Luego de enfriada en desecador se vuelve a pesar en la misma balanza analítica. La diferencia de pesos se expresa como porcentaje de materia orgánica en el total.

### 6.4.3. POTENCIAL DE OXIDO-REDUCCIÓN

La intensidad redox mide la tendencia relativa de una solución a aceptar o donar electrones y se la define como el logaritmo negativo de la actividad de los electrones. El potencial redox referido al electrodo de hidrógeno (Eh) es una medida de los electrones reactivos disponibles, y por tanto del estado de oxidación o reducción del sistema.

Este parámetro es un indicador de las condiciones aeróbicas, ya que por debajo de los +200 mV el oxígeno es prácticamente inexistente ( $< ca. 0.4 \text{ mg l}^{-1}$ ). La profundidad a la que se registra este valor en el sedimento varía con la oxigenación del agua sobrenadante, pudiendo incluso desplazarse hacia ésta en anaerobiosis. En tal caso, el fosfato y otros nutrientes son liberados del sedimento (carga interna). Otra profundidad de interés es la zona de discontinuidad redox o redoxclina, que corresponde al máximo gradiente vertical. El potencial redox debe corregirse para pH 7 porque disminuye 59 mV por cada unidad de aumento del pH. La temperatura tiene poca influencia, ya que al aumentar de 0 a 30 °C, el Eh disminuye de +860 a +800 mV.

Un electrodo inerte (alambre de platino dentro de una aguja hipodérmica, sellado con silicona) al ser sumergido en una solución produce un intercambio de electrones con ésta. Se forma así un potencial que, al incluirse un electrodo de referencia en el circuito, permite medir la intensidad de óxido-reducción del sistema. Si el electrodo de referencia es de hidrógeno, el potencial expresado en voltios es el Eh. En la práctica se usa un electrodo de calomel ( $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ) saturado con KCl, cuyo potencial referido al electrodo de hidrógeno (+ 240 mV) debe sumarse al potencial medido en un potenciómetro (pH-metro con escala en mV) para hallar el Eh.

*Procedimiento*

- 1) Preparar una solución estándar según ZoBell (1946): 109.72 mg de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  y 122.75 mg de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  en 100 ml de KCl 0.1 M. Su Eh a 25 °C es +430 mV.
- 2) Calibrar los electrodos de calomel y platino con la solución estándar a +190 mV (+240 mV = 430 mV).
- 3) Limpiar el electrodo de platino en una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4% y enjuagar con agua destilada desionizada.
- 4) Sumergir el electrodo de calomel en el agua sobrenadante y cerrar el circuito introduciendo el electrodo de platino en el sedimento.
- 5) Permitir la estabilización de las mismas durante algunos minutos y repetir el lavado entre lecturas.
- 6) A los valores obtenidos se debe sumar 240 mV para obtener el valor final de Eh.

#### 6.4.4. DEMANDA DE OXÍGENO

La demanda de oxígeno de un sedimento (DOS) no perturbado es una medida del metabolismo en la interfase agua-sedimento. Mide tanto la respiración de los organismos como la oxidación química. El predominio de un proceso sobre el otro varía con la oxigenación de la interfase, de modo que durante el período de anoxia la DOS química supera a la biológica.

El método consiste en la incubación en el laboratorio de una muestra de sedimento en el *corer* en que se colectó, por el que se hace circular un flujo cerrado de agua en el que se mide la concentración de oxígeno (Fig. 6.4).

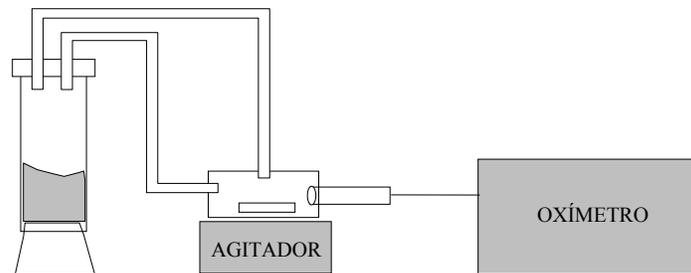


Figura 6.4. Dispositivo para la medición de la demanda de oxígeno del sedimento.

*Procedimiento*

- 1) Acondicionar la muestra a la temperatura del medio donde se colectó.
- 2) Sifonear el agua sobrenadante, filtrarla (Millipore 0.45  $\mu\text{m}$ ), airearla y regresarla al *corer* cuidando de no perturbar la superficie del sedimento.
- 3) Luego de 1 a 2 horas de aclimatación, cerrar el sistema y llenarlo con agua filtrada del lugar, cuidando que no queden burbujas y protegiéndolo de la luz.

- 4) Encender el agitador magnético ajustando su velocidad para evitar la resuspensión del sedimento.
- 5) A los 20 o 30 min comenzar a medir la concentración de oxígeno cada 30 a 60 min, durante no más de 4 h.
- 6) Calcular la DOS en  $\text{mg O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  según:

$$\text{DOS} = (C_i - C_f)V/(tA)$$

donde  $C_i$  y  $C_f$  son las concentraciones inicial y final de oxígeno ( $\text{mg l}^{-1}$ ),  $V$  el volumen de agua del sistema (l),  $t$  el tiempo (h) y  $A$  el área del sedimento ( $\text{m}^2$ ).

#### 6.4.5. NUTRIENTES

La concentración iónica en el agua intersticial es 1 a 3 órdenes de magnitud mayor que en agua sobrenadante, y presenta fuertes gradientes debido a su reducida movilidad. Su intercambio se favorece cuando las condiciones son anaeróbicas y por bioturbación. A su vez, la actividad del zoobentos aumenta la aireación del sedimento favoreciendo el atrapamiento de los iones.

La determinación del nitrógeno y fósforo total en sedimentos puede hacerse adaptando el método desarrollado para agua por Valderrama (1981) en agua:

##### *Procedimiento*

- 1) A efectos de mantener inalterada la distribución vertical de los nutrientes en el sedimento, es conveniente tomar la muestra con un *corer*, sifonear cuidadosamente el agua sobrenadante, empujar el sedimento hacia arriba con un émbolo, y cortar una pequeña capa como se describió en la sección 6.2.
- 2) Homogeneizar la muestra sobre una malla de 200 - 300  $\mu\text{m}$  para eliminar el exceso de agua.
- 3) Colocar en un frasco autoclavable de 100 - 250 ml con tapa rosca, una submuestra de entre 0.1 g si se trata de lodo y 0.3 g si es arena, pesadas a 0.1 mg.
- 4) Agregar 40 ml de agua destilada, 8 ml del reactivo oxidante (ver 11.1.5) y 1 g de  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  para aumentar su capacidad oxidante.
- 5) Autoclavar durante 1 hora a 125 °C y 1 atm. Dejar enfriar.
- 6) Filtrar (GF/C) el contenido del frasco y tomar 10 ml para determinar el fósforo total como ortofosfato, y 25 ml para determinar el nitrógeno total como nitrato por los métodos descritos en el capítulo 11.
- 7) Calcular el contenido de N y P por gramo de sedimento fresco (M), considerando que el resultado por litro obtenido de la curva de calibración (C) debe transformarse al contenido en 40 ml de muestra, correspondiente al peso fresco del sedimento autoclavado (A):

$$M = (40C)/(1000A)$$

Alternativamente, Andersen (1976) propone un método para fósforo total basado en la combustión del sedimento y su digestión con ácido sulfúrico para evitar la posible subestimación del método de Valderrama. Asimismo, el nitrógeno total puede determinarse adaptando para sedimento el método de Kjeldahl descrito para agua (ver 11.1.4)

#### 6.5. RESULTADOS

La distribución de la materia orgánica en los sedimentos recientes de la Laguna

de Rocha está asociada al tamaño de grano y al aporte de los bañados situados en las desembocaduras de los principales afluentes (Fig. 6.5, pág siguiente). La profundidad resulta un factor de nula importancia debido a su homogeneidad. El contenido de materia orgánica es en general bajo (< 5%) debido a su rápida degradación en una interfase somera y bien oxigenada (Sommaruga & Conde 1990).

El perfil vertical del sedimento del eutrófico lago Ton-Ton (Tabla 6.7, pág. siguiente) muestra una disminución en profundidad del contenido de materia orgánica, carbono orgánico y nitrógeno orgánico, así como del potencial redox.

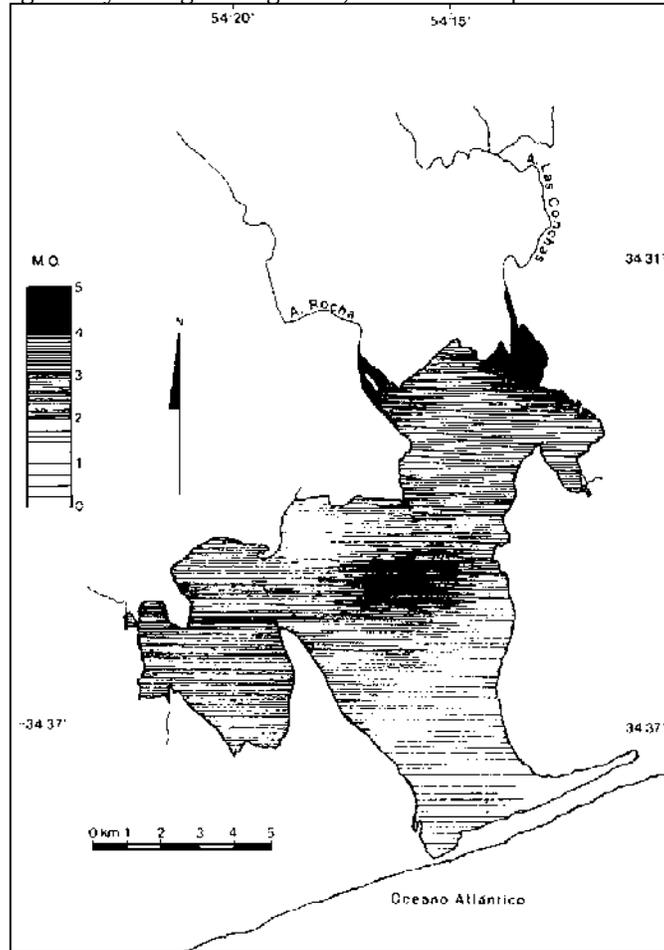
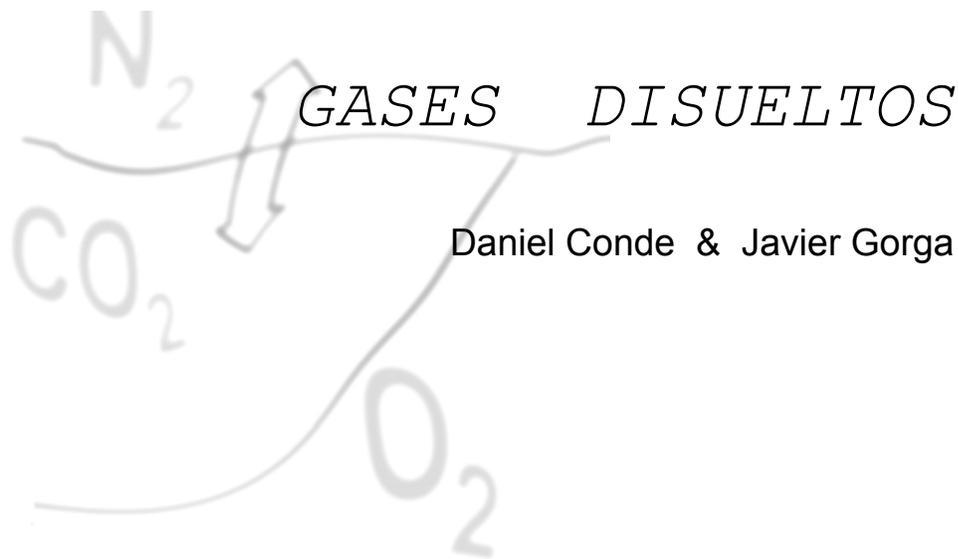


Figura 6.5. Distribución del contenido de materia orgánica (M.O. en %) en los sedimentos de la Laguna de Rocha (tomado de Sommaruga & Conde 1990).

Tabla 6.7. Media y error estándar de los valores mensuales de febrero a octubre (n=9, p=0.05) de materia orgánica como pérdida de peso por ignición, carbono orgánico y nitrógeno orgánico, y de junio a octubre de potencial redox (Eh) en los primeros 5 centímetros del sedimento del lago Ton-Ton (basado en Sommaruga 1991).

Profundidad	Materia orgánica	Carbono orgánico	Nitrógeno orgánico	Eh
-------------	------------------	------------------	--------------------	----

(cm)	(%)	(mg g <sup>-1</sup> peso seco)		(mV)
1	16.40 ± 3.03	71.48 ± 12.55	8.48 ± 1.71	90 ± 42
2	13.37 ± 2.91	61.18 ± 10.54	5.36 ± 1.12	70 ± 61
3	9.50 ± 2.19	51.50 ± 9.98	4.59 ± 1.98	44 ± 73
4	6.98 ± 1.11	44.09 ± 6.41	4.13 ± 1.16	16 ± 82
5	5.48 ± 1.06	40.25 ± 4.21	3.79 ± 0.83	-22 ± 92



Daniel Conde & Javier Gorga

EL OXÍGENO, EL DIÓXIDO DE CARBONO Y EL NITRÓGENO SON LOS GASES DISUELTOS DE MAYOR IMPORTANCIA BIOLÓGICA EN LOS ECOSISTEMAS LÍMICOS. OTROS GASES, COMO EL METANO, EL SULFURO DE HIDRÓGENO Y EL MONÓXIDO DE CARBONO, SON IMPORTANTES EXCLUSIVAMENTE EN CONDICIONES ANÓXICAS.

### 7.1. OXÍGENO

El oxígeno disuelto en el agua brinda información sobre las reacciones bioquímicas que tienen lugar en el medio, es un indicador de la carga orgánica al sistema, siendo utilizado en las determinaciones de producción primaria. Su concentración depende de parámetros físicos (presión, temperatura y concentración salina) y de factores biológicos (producción primaria y consumo oxidativo). Las aguas superficiales no contaminadas contienen entre 7 y 14 mg l<sup>-1</sup> de oxígeno disuelto, aunque en situaciones de elevada productividad primaria o turbulencia pueden registrarse valores de sobresaturación. Altas cargas de materia orgánica resultan en valores bajos de oxígeno o en anoxia (ausencia de oxígeno). En su determinación se utilizan sensores selectivos o métodos químicos.

#### 7.1.1. SENSORES

El uso de sensores brinda rapidez en las mediciones y posibilita un registro continuo de las mismas. El sensor polarográfico tipo Clark consiste en un ánodo de platino y un cátodo de oro sumergidos en un electrolito, y separados del agua por una membrana permeable al oxígeno. Este difunde hacia los electrodos produciendo una corriente eléctrica que es medida con un potenciómetro. El oxígeno reducido por unidad de tiempo es directamente proporcional a la concentración de oxígeno en el agua. Este tipo de macroelectrodos (1-5 mm de diámetro) es inexacto a con-

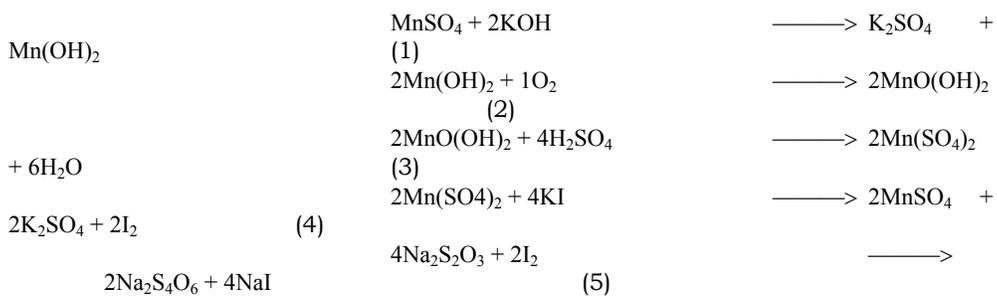
centraciones menores a 1 mg l<sup>-1</sup> de oxígeno, rango especialmente importante para muchas reacciones químicas y el metabolismo microbiano. Este problema se soluciona con el uso de microelectrodos (< 100 µm de diámetro), de rápida respuesta, pero que presentan dificultades de construcción y son frágiles. Detalles de este tipo de microelectrodos pueden obtenerse en Baumgärtl & Lübbbers (1983).

Con la mayoría de los electrodos se puede alcanzar una precisión de 50 µg l<sup>-1</sup>. Para ello se recomienda calibrar el electrodo, en aire o con una solución de concentración conocida de oxígeno, siguiendo las instrucciones específicas del equipo. Conviene reemplazar periódicamente la membrana del electrodo, especialmente si es usado en aguas de alto contenido de sulfuro de hidrógeno. Para evitar la formación de burbujas en la superficie de la membrana durante la medición, se debe agitar horizontalmente el electrodo o utilizar un agitador automático incorporado al mismo.

### 7.1.2. MÉTODOS QUÍMICOS

El primer método químico para la determinación del oxígeno disuelto fue el de Bunsen, en el que el oxígeno es liberado bajo presión reducida, colectado y medido por métodos de absorción. Su manipulación es compleja y no puede efectuarse en el campo. Se han descrito algunos métodos colorimétricos, pero son muy inexactos a bajas concentraciones.

El método químico más usado es el de Winkler de 1888, modificado por Carpenter (1964). Consiste en valorar la cantidad de yodo metálico proveniente de una serie de reacciones originadas en la oxidación de una sal manganosa por parte del oxígeno presente en la muestra de agua. Inicialmente, el sulfato manganoso (Reactivo I) reacciona con una mezcla de hidróxido de sodio-yoduro de potasio (Reactivo II), produciendo hidróxido manganoso de color blanco cuando no hay oxígeno en la muestra (1), o marrón cuando el oxígeno presente reacciona con el hidróxido manganoso, formando óxido mangánico básico (2). El ácido sulfúrico disuelve el precipitado, formando sulfato mangánico (3). La reacción entre el sulfato mangánico y el yoduro de potasio agregado previamente libera yodo produciendo un color marrón claro (4). El yodo, equivalente al oxígeno presente en la muestra, se determina por titulación con tiosulfato de sodio (5).



El método es válido para un rango de 0.04 a 62 mg l<sup>-1</sup> de oxígeno disuelto y en análisis de rutina se puede obtener una precisión de 2 µg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup>.

#### Procedimiento

- 1) Llenar una botella de vidrio de DBO (tipo Pyrex de volumen conocido y tapón

- esmerilado) con una botella muestreadora, evitando el burbujeo y desbordando 1 a 2 veces su volumen.
- 2) Agregar 1 ml de reactivo I, introduciendo la punta de la pipeta debajo de la superficie de la muestra. Mezclar y agregar 1 ml de reactivo II. Mezclar vigorosamente por inversión hasta dispersar el precipitado. La muestra puede almacenarse algunos días a temperatura constante y bajo agua para evitar la entrada de aire.
  - 3) Agregar 1 ml de ácido sulfúrico concentrado, dejándolo correr por el cuello de la botella, y mezclar vigorosamente mediante inversión hasta la disolución del precipitado. Si éste persiste agregar más ácido.
  - 4) Transferir con pipeta aforada una alícuota de 100 ml a un matraz erlenmeyer. Titular con tiosulfato de sodio 0.01 N agitando constantemente hasta obtener un color amarillo pálido. Añadir 3 gotas de almidón y continuar la titulación hasta que desaparezca el color azul y permanezca incoloro al menos 20 s.
  - 5) Calcular la concentración de oxígeno disuelto (OD) en  $\text{mg l}^{-1}$  según:

$$\text{OD} = (\text{g N } 8 \text{ f } 1000) / (V_a(V_f - 2) / V_f)$$

donde g es el gasto de tiosulfato de sodio (ml), N su normalidad y f el factor del mismo,  $V_a$  el volumen de la alícuota (ml) y  $V_f$  el volumen de la botella de DBO (ml). La concentración también puede expresarse en  $\text{ml l}^{-1}$  dividiendo los mg por 1.429, o en mM multiplicándolos por 0.0893.

#### *Blanco y Factor del tiosulfato de sodio*

Cuando se preparan reactivos nuevos o se duda de su estado, debe realizarse el ensayo en blanco. Para ello se llena sin burbujear una botella de DBO con agua destilada (de ahora en adelante AD) y se agregan en orden 1 ml de ácido sulfúrico, 1 ml de reactivo II y 1 ml de reactivo I. A una alícuota de 100 ml se le agrega una gota de almidón, y si hay coloración azul, se titula con tiosulfato de sodio 0.01 N. Si el gasto excede 0.1 ml deben prepararse nuevos reactivos.

Para determinar el factor del tiosulfato, a una botella de DBO llena con AD se añaden como en el caso anterior, los reactivos al revés. A 3 o 4 réplicas de 100 ml se agregan 20 ml de iodato de potasio 0.01 N y luego de 3 minutos se titula. Calcular el factor dividiendo 5 ml entre el gasto de tiosulfato de sodio en ml.

#### *Reactivos*

- (I) Sulfato manganoso: 400 g de  $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en AD y llevar a 1 l.
- (II) Ioduro de potasio-hidróxido de sodio: 500 g de NaOH y 150 g de KI en AD y llevar a 1 l.
- Acido sulfúrico concentrado (densidad 1.84).
- Tiosulfato de sodio 0.01 N: Disolver 2.48 g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en AD y llevar a 1 l.
- Almidón: Disolver 1 g de almidón en AD a 100 °C y llevar a 100 ml.
- Iodato de potasio 0.01 N: Disolver 0.357 g de  $\text{KIO}_3$  seco en AD. Llevar a 1 l.

### 7.1.3. PORCENTAJE DE SATURACIÓN

La concentración real del oxígeno puede expresarse como porcentaje de su concentración de saturación a la temperatura, salinidad y presión (o altitud) correspondientes. En la tabla 7.1 (pág. siguiente) se presentan estos valores para un amplio rango de temperaturas y a nivel del mar, ya que las diferencias de altitud en Uruguay no producen cambios significativos en la presión parcial de los gases di-

sueltos en el agua. La corrección por altitud se obtiene de factores (Roldán Pérez 1992) o según:

$$S_p = S(P/760)$$

donde  $S_p$  es la solubilidad a la presión P, S la solubilidad a 760 mm Hg y P la presión barométrica en mm de Hg. Por su parte, las diferencias de salinidad en el rango de las aguas continentales no son relevantes para la concentración de oxígeno.

#### 7.1.4. DÉFICIT HIPOLIMNÉTICO DE OXÍGENO

Los cambios a largo plazo de oxígeno y dióxido de carbono en el hipolimnion permiten estimar la productividad heterotrófica de un sistema acuático, asumiendo que la materia orgánica es exclusivamente sintetizada en la zona trofogénica, y tras sedimentar se descompone totalmente en el hipolimnion. A pesar de la mezcla de capas de agua o la liberación de sustancias orgánicas desde el sedimento, existe una asociación general entre estos cambios y la actividad heterotrófica total en ambientes que se estratifican periódicamente. Sin embargo, el procedimiento no puede utilizarse si el hipolimnion se torna completa o parcialmente anóxico.

Tabla 7.1. Solubilidad del oxígeno ( $\text{mg l}^{-1}$ ) en agua a nivel del mar.

T (°C)	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
8	11.47	11.44	11.41	11.38	11.36	11.33	11.30	11.27	11.25	11.22
9	11.19	11.16	11.14	11.11	11.08	11.06	11.03	11.00	10.98	10.95
10	10.92	10.90	10.87	10.85	10.82	10.80	10.77	10.75	10.72	10.70
11	10.67	10.65	10.62	10.60	10.57	10.55	10.53	10.50	10.48	10.45
12	10.42	10.40	10.38	10.36	10.34	10.31	10.29	10.27	10.24	10.22
13	10.20	10.17	10.15	10.13	10.11	10.09	10.06	10.04	10.02	10.00
14	9.98	9.95	9.93	9.91	9.89	9.87	9.85	9.83	9.81	9.78
15	9.76	9.74	9.72	9.70	9.68	9.66	9.64	9.62	9.60	9.58
16	9.56	9.54	9.52	9.50	9.48	9.46	9.45	9.43	9.41	9.39
17	9.37	9.35	9.33	9.31	9.30	9.28	9.26	9.24	9.22	9.20
18	9.18	9.17	9.15	9.13	9.12	9.10	9.08	9.06	9.04	9.03
19	9.01	8.99	8.98	8.96	8.94	8.93	8.91	8.89	8.88	8.86
20	8.84	8.83	8.81	8.79	8.78	7.76	8.75	8.73	8.71	8.70
21	8.68	8.67	8.65	8.64	8.62	8.61	8.59	8.58	8.56	8.55
22	8.53	8.52	8.50	8.49	8.47	8.46	8.44	8.43	8.41	8.40
23	8.38	8.37	8.36	8.34	8.33	8.32	8.30	8.29	8.27	8.26
24	8.25	8.23	8.22	8.21	8.19	8.18	8.17	8.15	8.14	8.13

#### Procedimiento

- 1) Determinar la concentración de oxígeno a varias profundidades inmediatamente después de la estratificación estival y realizar perfiles de temperatura cada 3 a 4 semanas a lo largo del período de estratificación.

- 2) Determinar los volúmenes ( $\text{km}^3$ ) de diferentes estratos de agua (de ca. 1 m de profundidad) del hipolimnion, así como el área superior de éste ( $A_h$ ), en  $\text{cm}^2$ .
- 3) Calcular para el inicio y el final del período de estratificación, la cantidad de oxígeno (ton) en cada estrato del hipolimnion. Sumar los resultados y obtener la cantidad de oxígeno hipolimnético para cada fecha ( $O_1$  y  $O_2$ ) en mg.
- 4) Calcular el déficit de oxígeno (D) en  $\text{mg O}_2 \text{cm}^{-2} \text{mes}^{-1}$  en el hipolimnion, para los días transcurridos (t) entre las dos fechas elegidas, según:

$$D = 30(O_1 - O_2)/A_h t$$

## 7.2. CONSUMO DE OXÍGENO

### 7.2.1. DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO

La demanda bioquímica de oxígeno (DBO) es una medida indirecta de la materia orgánica presente en efluentes y aguas contaminadas (APHA 1995) y se determina a partir de la diferencia entre la concentración de oxígeno antes y después de la incubación de muestras de agua en oscuridad a  $20^\circ\text{C}$  durante 5 días. En ocasiones el agua de desecho demanda más oxígeno que el presente en la muestra, por lo que es necesario realizar diluciones. En virtud de los requerimientos bacterianos, es necesario agregar nutrientes al agua de dilución y conservar un pH cercano a la neutralidad. En caso de existir un elevado número de bacterias nitrificantes, su consumo de oxígeno debe ser inhibida a fin de no sobrestimar los resultados del análisis (APHA 1995). También se debe incubar un blanco de agua de dilución para controlar su consumo de oxígeno o el de los reactivos.

#### *Procedimiento*

- 1) Verter 1 ml de *buffer* de fosfato,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{FeCl}_3$ , por cada litro de agua de dilución que se desee preparar. Para evitar cambios de volumen, el agua de dilución debe llevarse a  $20^\circ\text{C}$  previo a su introducción en las botellas .
- 2) La dilución puede prepararse directamente en una botella de volumen conocido, retirando una submuestra con pipeta, cuidando de no tocar los bordes. Llenar la botella con el agua de dilución de manera que al colocar el tapón se desplace el aire remanente impidiendo la formación de burbujas.
- 3) Si se determina el oxígeno por el método de Winkler, se deben preparar al menos dos muestras de cada dilución. En una de ellas se mide el oxígeno inicial y se incuba la remanente. Si se utiliza electrodo, sólo se prepara una botella de cada dilución y se mide en la misma el contenido de oxígeno, reponiendo el volumen desplazado con agua de dilución. Incubar durante 5 días a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  en oscuridad.
- 4) Además de las diluciones se debe preparar un blanco de dilución, para lo cual se llena una botella similar a las utilizadas para las muestras, se mide el oxígeno inicial y se incuba con el resto de las muestras.
- 5) Luego de 5 días se mide el oxígeno final en cada botella y se resta del inicial. A esta diferencia se resta la del blanco de dilución, para obtener la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) en  $\text{mg l}^{-1}$  según:

$$DBO = [(OD_1 - OD_2) - (B_1 - B_2)]/F$$

donde  $OD_1$  es el oxígeno inicial,  $OD_2$  el final ( $\text{mg l}^{-1}$ ) y F la fracción volumétrica decimal de muestra usada en la dilución.

### Reactivos

- Buffer de fosfato: Disolver 8.5 g de  $\text{KHPO}_4$ , 21.75 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 33.4 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 1.7 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en ca. 500 ml de AD y llevar a 1 l. El pH resultante debe ser cercano a 7.2.
- Sulfato de magnesio: Disolver 22.5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en AD y llevar a 1 l.
- Cloruro de calcio: Disolver 27.5 g de  $\text{CaCl}_2$  en AD y llevar a 1 l.
- Solución de cloruro férrico: Disolver 0.25 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en AD y llevar a 1 l.
- Sulfito de sodio 0.025 N: Disolver 1.575 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  en AD y llevar a 1 l (preparar cada vez).

### 7.2.2. DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO

La demanda química de oxígeno (DQO) es una medida del contenido de materia orgánica susceptible a la oxidación química (APHA 1995). Los métodos disponibles (reflujo abierto, y reflujo cerrado titrimétrico o colorimétrico) se basan en la digestión con un oxidante fuerte como el dicromato de potasio. En el método de reflujo abierto la muestra se digiere en presencia de un oxidante fuerte y se mide espectrofotométricamente. Para coleccionar las muestras se debe utilizar botellas de vidrio. Si el análisis no se realiza de inmediato, preservar a  $\text{pH} < 2$  con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. En las muestras con valores de DQO muy altos, se deben llevar a cabo diluciones.

### Procedimiento

- 1) Usar los siguientes volúmenes de muestra (ml) y reactivos:

Muestra	Sol. Digestora	$\text{H}_2\text{SO}_4$	Volumen final
2.5	1.5	3.5	7.5
5.0	3.0	7.0	15.0
10.0	6.0	14.0	30.0

- 2) Colocar tubos *pyrex* con tapa autoclavable conteniendo la muestra, blancos y estandar en un *block* de digestión y llevar a  $150\text{ }^\circ\text{C}$  durante 2 h.
- 3) Si hay nitritos en las muestras se debe agregar 10 mg de ácido sulfámico por cada mg de  $\text{NO}_2$  presente en la muestra.
- 4) Dejar enfriar y medir la absorbancia a 600 nm.
- 5) Preparar una curva de calibración (ver 11.1) con no menos de 5 diluciones de KHP, con valores de DQO entre 20 y  $900\text{ }\mu\text{g O}_2\text{ l}^{-1}$ .
- 6) Calcular la DQO en  $\text{mg O}_2\text{ l}^{-1}$  a partir del valor obtenido de la curva de calibración (C) y el volumen de la muestra (V), según:

$$\text{DQO} = 1000\text{ C/V}$$

### Reactivos

- Solución digestora: Disolver 10.216 g de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (secado a  $103\text{ }^\circ\text{C}$  por 2 h), 167 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. y 33.3 g de  $\text{HgSO}_4$  en AD y llevar a 1 l.
- Acido sulfúrico: Agregar  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  a  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. en una proporción de 5.5 g de  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  por kg de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Esperar 1 a 2 días para completar la disolución.
- Acido sulfámico conc.
- Estandar de ftalato de potasio (KHP): Disolver 425 mg de  $\text{HOOC}_6\text{H}_4\text{COOK}$  (secado a  $120\text{ }^\circ\text{C}$ ) en AD y llevarlo a 1 l. Esta solución tiene una DQO de  $500\text{ }\mu\text{g O}_2\text{ ml}^{-1}$ . La solución es estable por 3 meses.

### 7.3. ANHÍDRIDO CARBÓNICO

El anhídrido carbónico es *ca.* 200 veces más soluble en el aire que en el agua y se difunde por diferencias de presión según la Ley General de los Gases. Factores abióticos como la altitud, la acidez y la concentración de calcio afectan su solubilidad. Una fracción del anhídrido carbónico atmosférico que se disuelve en el agua se hidrata a ácido carbónico, que se disocia rápidamente en bicarbonato y posteriormente en carbonato. Las proporciones de estas fracciones varían con la fotosíntesis, la respiración aeróbica y la oxidación de la materia orgánica.

#### 7.3.1. ANHÍDRIDO CARBÓNICO LIBRE

La concentración de anhídrido carbónico puede calcularse por titulación con hidróxido de sodio o mediante cálculo a partir de los valores de pH y alcalinidad (ver 10.1). En el primer caso, el anhídrido carbónico reacciona con carbonato de sodio para formar bicarbonato de sodio. La precisión del método es *ca.* 10% de la concentración final.

##### *Procedimiento*

- 1) Titular 100 ml de muestra recién colectada con NaOH 0.1 N hasta pH 8.3. Si no es posible titular inmediatamente al muestreo, llenar completamente la botella y mantenerla tapada y a temperatura constante hasta su titulación.
- 2) Calcular la concentración de anhídrido carbónico (CO<sub>2</sub>) en mg l<sup>-1</sup> según:

$$\text{CO}_2 = 44g \text{ 1000 N/V}$$

donde g es el gasto (ml), N la normalidad del NaOH, 44 el peso molecular del CO<sub>2</sub> y V el volumen de la muestra (ml).

##### *Reactivos*

- Ftalato ácido de potasio 0.05 N: Disolver 10.0 ± 0.5 g de KHC<sub>8</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (secado a 120 °C) en AD y llevar a 1 l.
- Hidróxido de sodio 0.1 N: Disolver 4 g de NaOH en AD y llevar a 1 l. Estandarizar titulado el ftalato ácido de potasio 0.05 N hasta un pH de *ca.* 8.7 (determinar el punto de inflexión exacto mediante una curva de titulación). Calcular la normalidad del NaOH según:

$$N = A B / 204.2 C$$

donde A es el peso (g) de KHC<sub>8</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub> disuelto en AD, B el volumen (ml) de KHC<sub>8</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub> titulado, C el volumen (ml) de NaOH usados en la titulación y 204.2 el peso molecular del ftalato.

#### 7.3.2. ACUMULACIÓN HIPOLIMNÉTICA DE CO<sub>2</sub>

Durante el día, la concentración de CO<sub>2</sub> en el epilimnion disminuye debido a la fotosíntesis, mientras en el hipolimnion la oxidación de la materia orgánica la incrementa. Debido a que la concentración de anhídrido carbónico en el hipolimnion es directamente proporcional a la producción en el epilimnion, y suponiendo que no existen otras pérdidas o entradas, se ha propuesto la acumulación de anhídrido carbónico en el hipolimnion para clasificar los lagos desde un punto de vista trófico (Wetzel 1983). La ventaja frente al cálculo del déficit hipolimnético de oxígeno (ver 7.1.4) es que puede ser aplicada en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. A pesar que generalmente se subestiman la descomposición orgánica en el epilimnion, la

acumulación de restos orgánicos en el sedimento o se usan cocientes respiratorios bajos, el parámetro suele correlacionarse con la productividad del medio.

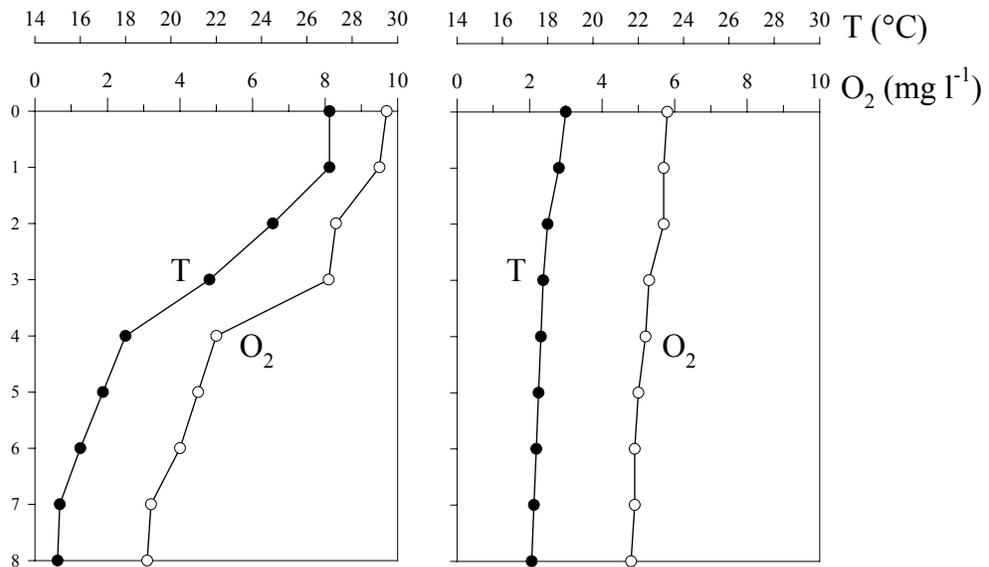
El cálculo requiere estimar los cambios y el origen de varios compuestos inorgánicos de carbono durante el período de estratificación: a)  $\text{CO}_2$  libre y bicarbonato acumulado durante la descomposición, b) fracción del bicarbonato presente como carbonato de amonio volátil de origen orgánico, c) bicarbonato no-volátil, la mitad del cual es de origen metabólico, y d) la otra mitad del bicarbonato no volátil, que se incorpora al sedimento como  $\text{CaCO}_3$ . Si la suma de estos aportes de  $\text{CO}_2$  se calcula para todo el hipolimnion y se multiplica por la relación de volúmenes entre hipo y epilimnion, se obtiene la intensidad de asimilación relativa ( $\text{mg CO}_2 \text{ l}^{-1} \text{ mes}^{-1}$ ) para todo el sistema. Este valor permite conocer la cantidad de  $\text{CO}_2$  incorporado fotosintéticamente en el epilimnion durante el período de observación (Wetzel & Likens 1991).

#### Procedimiento

- 1) Proceder como en 7.1.4 (puntos 1 y 2), y determinar además las concentraciones de  $\text{NH}_4$  (ver 11.1.3),  $\text{CO}_2$  (7.2.1) y  $\text{HCO}_3$  (10.1) para cada capa del hipolimnion.
- 2) A partir de estas concentraciones ( $\text{mg l}^{-1}$ ) se calcula la intensidad de asimilación relativa para todo el sistema, según:
  - a) la relación molecular  $\text{NH}_4:\text{HCO}_3$  es 18.04:61.02, de donde la concentración de bicarbonato de amonio ( $B$ ) es  $3.38(\text{NH}_4)$ .
  - b) la relación molecular  $\text{CO}_2:\text{HCO}_3$  es 44.01:61.02, de donde la concentración de  $\text{CO}_2$  proveniente del bicarbonato del  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (b) es  $0.721(B)$
  - c)  $x = \text{HCO}_3 - B$ , para eliminar el bicarbonato del  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ .
  - d)  $a = (x) 0.721/2$  para convertir el  $\text{HCO}_3$  a  $\text{CO}_2$ , la mitad del cual está como  $\text{CaCO}_3$ .
  - e)  $\Sigma\text{CO}_2 = a + b + \text{CO}_2$ , es el anhídrido carbónico total corregido.
  - f)  $d\text{O}_2 =$  déficit de oxígeno (oxígeno antes de la estratificación menos oxígeno medido durante la estratificación, para cada capa del hipolimnion). La relación molecular  $\text{CO}_2:\text{O}_2$  es 44:32, entonces:  $d\text{CO}_2 = 1.375(d\text{O}_2)$
  - g) cociente de respiración (RQ) es la relación entre las moléculas de  $\text{CO}_2$  liberadas en la descomposición y las de  $\text{O}_2$  consumidas ( $+d\text{CO}_2/-d\text{O}_2$ ), generalmente 0.85 (en condiciones anóxicas puede aumentar hasta 3). Asumiendo condiciones aeróbicas en el hipolimnion, el  $\text{CO}_2$  formado aeróbicamente ( $y$ ) será  $0.85(d\text{CO}_2)$
  - h) el cambio total de  $\text{CO}_2$  ( $\text{CO}_2$  total menos  $\text{CO}_2$  formado aeróbicamente) es  $d\text{CO}_2 = \Sigma\text{CO}_2 - y$
  - i) el valor de  $d\text{CO}_2$  es duplicado para estimar el  $\text{CO}_2$  equivalente en condiciones aeróbicas ( $z$ )
  - j) la acumulación hipolimnética total de  $\text{CO}_2$  ( $e \text{ mes}^{-1}$ ) será, en  $\text{mg CO}_2 \text{ l}^{-1} \text{ mes}^{-1}$ ,  $30(e)$  dividido el número total de días de estratificación, siendo  $e = z + y$
  - k) la acumulación de  $\text{CO}_2$  calculada para cada capa del hipolimnion, es sumada y multiplicada por la relación entre los volúmenes del hipo y epilimnion para obtener la intensidad de asimilación relativa ( $I_{ar}$ ) para todo el sistema, en  $\text{mg CO}_2 \text{ l}^{-1} \text{ mes}^{-1}$

## 7.4. RESULTADOS

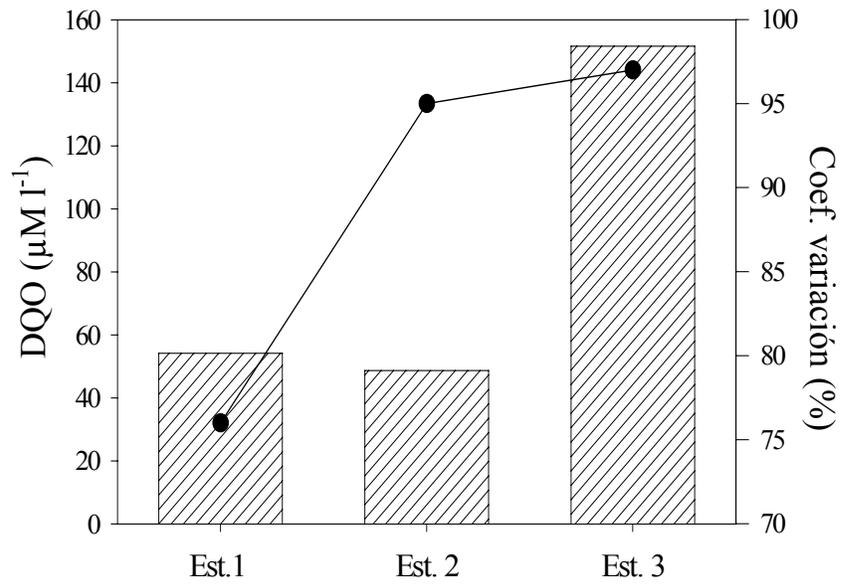
En el primer perfil de la figura 7.1 (pág. siguiente) se muestra el inicio de la estratificación típica de verano en el Lago Ton Ton, debido al aumento de la temperatura en superficie y la disminución de la acción del viento. El segundo perfil corresponde al período de mezcla en otoño, fase durante la cual la energía es



insuficiente para generar diferencias de densidad que induzcan la formación de una discontinuidad.

En la figura 7.2 (pág. siguiente) se presentan los valores de DQO obtenidos en 3 estaciones ubicadas en el curso principal del Arroyo Toledo. Las estaciones 1 y 3 se ubicaron en tramos que reciben vertidos de fábricas y presentan una alteración general del entorno debido a la actividad humana. La estación 2 se ubicó en un tramo libre de fuentes puntuales de contaminación. Se evidencia el impacto de los vertidos en los valores mayores de DQO de las estaciones 1 y 3, especialmente en esta última. El alto coeficiente de variación en la estación 2 se debe al impacto circunstancial de las aguas provenientes de la estación 1.

*Figura 7.1.* Perfiles de oxígeno disuelto y temperatura en verano y otoño en el Lago Ton Ton (Canelones) (tomado de Fabián & Schinca 1990).



*Figura 7.2.* Variación espacial de la demanda química de oxígeno en el Arroyo Toledo (Canelones) (tomado de Chalar 1994).

# MATERIAL DISUELTO Y EN SUSPENSIÓN

Daniel Conde, Javier Gorga  
& Guillermo Chalar

EL AGUA LLEVA SUSTANCIAS DISUELTAS (MENORES A 0.45  $\mu\text{m}$ ), ASÍ COMO MATERIAL particulado en suspensión (seston), el que se compone de una fracción orgánica viva (plancton) y una fracción detrítica orgánica e inorgánica (tripton). Los sólidos disueltos se pueden determinar por diferencia de peso, evaporando un volumen conocido de una muestra filtrada. El material en suspensión se obtiene filtrando un volumen conocido, mientras que el material orgánico suspendido se calcula por diferencia de peso tras eliminarlo por ignición (APHA 1995).

### 8.1. SÓLIDOS TOTALES DISUELTOS

#### *Procedimiento*

- 1) Filtrar la muestra de agua por filtro GF/C.
- 2) En un disco de evaporación prepesado (d, en g), evaporar en estufa a 180 °C una submuestra de volumen conocido (v, en ml), de modo de obtener resultados finales entre 2.5 y 200 mg de residuo. Si el volumen necesario excede la capacidad del disco, agregar sucesivamente más volúmenes.
- 3) Dejar secar 1 hora a 180 °C, colocar en un desecador y pesar el disco con el residuo (r). Calcular los sólidos disueltos totales (SDT) en  $\text{mg l}^{-1}$  según:

$$\text{SDT} = 10^6 (r - d) / v$$

### 8.2. SÓLIDOS Y MATERIA ORGÁNICA EN SUSPENSIÓN

#### *Procedimiento*

- 1) Colectar una muestra de un litro de agua. Almacenar en botella de plástico y mantener a menos de 4 °C hasta el procesamiento.
- 2) Pesar un filtro (0.45  $\mu\text{m}$  o GF/C) previamente quemado a 500 °C, con precisión de décimas de miligramo (f, en g).

- 3) Homogeneizar la muestra y filtrar un volumen conocido (v, en ml).
- 4) Secar el filtro a menos de 110 °C durante 12 h y pesarlo (r, en g).
- 5) Quemar el filtro a 475-500 °C durante 15 min y pesarlo nuevamente (q, en g).
- 6) Calcular la concentración de sólidos suspendidos totales (SST) y materia orgánica en suspensión (MOS) en mg l<sup>-1</sup> y el porcentaje de materia orgánica en los sólidos suspendidos totales (% MOS), según:

$$\text{SDT} = 10^6(r - f)/v$$

$$\text{MOS} = 10^6(r - q)/v$$

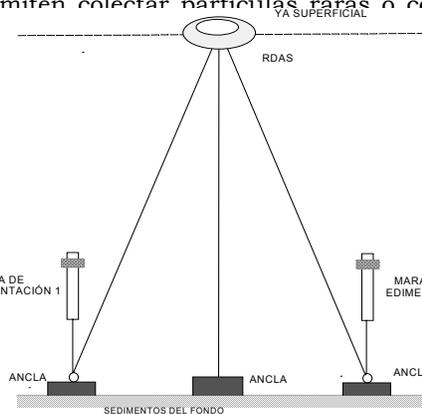
$$\% \text{MOS} = 100 \text{MOS}/\text{SST}$$

### 8.3. TASA DE SEDIMENTACIÓN

La composición y la tasa de sedimentación y de la materia particulada que decanta desde la columna de agua al sedimento brindan información relevante acerca del funcionamiento del ecosistema acuático, especialmente lagos y embalses. En éstos existe un fuerte gradiente vertical determinado por la penetración de la luz, que delimita una región donde predomina la producción y síntesis, y otra más profunda donde prevalece la descomposición y respiración. Parte del material sintetizado en los estratos superiores es reciclado, en tanto otra parte sedimenta. El flujo de materiales está constituido principalmente por organismos, detritus, partículas inorgánicas y materiales resuspendidos desde los sedimentos. Este flujo continuo de materiales representa: 1) una pérdida de nutrientes y biomasa de la zona trofógena hacia los sedimentos, 2) una fuente de alimento para la comunidad bentónica y 3) una carga interna por reincorporación de materiales mediante resuspensión hacia la región trofógena. En cuencas con alta erosión de suelos, la sedimentación puede ser muy alta y provocar efectos nocivos en la biota (obstrucción de órganos respiratorios, soterramiento de organismos) y una alta demanda de oxígeno disuelto en el agua de fondo y los sedimentos. La sedimentación en lagos y embalses puede provocar una pérdida importante del volumen (hasta 8% anual). Las tasas de sedimentación varían entre 200 y 2000 g de seston seco m<sup>-2</sup> año<sup>-1</sup> y entre 60 a 300 g de materia orgánica m<sup>-2</sup> año<sup>-1</sup> (Margalef 1983).

#### TRAMPAS DE SEDIMENTACIÓN

La distribución vertical del material particulado y su acumulación en capas más profundas o en el fondo, puede ser estudiada mediante trampas de sedimentación. A diferencia de otros muestreadores de seston (botellas, redes, bombas), las cámaras de sedimentación permiten coleccionar partículas raras o con bajos tiempos de residencia en la columna de agua. Las trampas de sedimentación consisten en una cámara cilíndrica o cónica que se coloca a una profundidad fija, o a una profundidad variable, para la captura del material que se deposita en el fondo. Las precauciones a tomar al usar estas trampas son: 1) el uso de réplicas y el tiempo de exposición, la entrada de sedimentos y la entrada de organismos. Los muestreadores más utilizados son: 1) el muestreador de sedimentación de diámetro mayor (pág. siguiente) se utiliza para estudiar la sedimentación.



Después de un tiempo es analizado y cuantitativa de la muestra. Se han usado diversos diseños en este estudio y de la fracción de material que se deposita. Algunas de las trampas más utilizadas son el número de réplicas y el tiempo de exposición de la resuspensión entre otros. Los colectores de sedimentación tienen una relación altura-dímetro. En la figura 8.1 se muestra un ejemplo de las trampas de sedimentación.

Figura 8.1. Forma de disponer trampas de sedimentación en un lago.

#### 8.4. RESULTADOS

La abundancia fitoplanctónica en el embalse Rincón del Bonete (Fig. 8.2) presentó en marzo de 1998 una relación inversa significativa ( $r^2 = 0.77$ ) con la concentración de sólidos en suspensión, fundamentalmente inorgánicos, sugiriendo una limitación lumínica para el crecimiento algal. En este sistema turbio, la radiación solar constituye un factor regulador de la abundancia y estructura de la comunidad fitoplanctónica. Esto se refleja, además, en la presencia de especies tolerantes a condiciones de baja intensidad de luz y alta turbulencia en las estaciones más turbias.

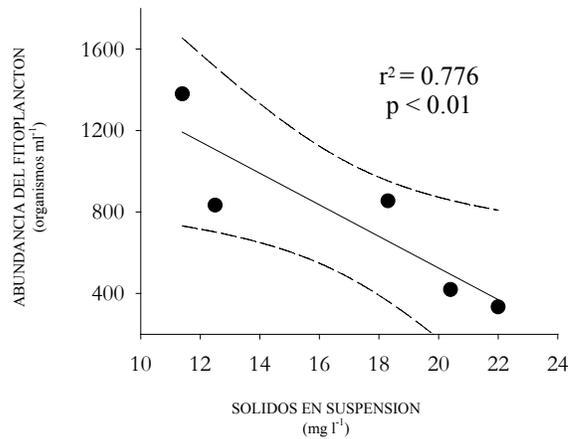


Figura 8.2. Sólidos en suspensión y sus efecto en la distribución del fitoplancton en el Embalse Rincón del Bonete en marzo de 1998 (tomado de Conde *et al.* 1998).

## Capítulo 9

# COMPOSICIÓN IÓNICA

Daniel Conde & Javier Gorga

ADEMÁS DE OXIDRILLOS E HIDROGENIONES, LOS IONES PRESENTES EN LOS ambientes límnicos pueden agruparse en: a) de origen marino ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ), b) provenientes de la atmósfera, suelos y/o rocas de la cuenca ( $\text{Si}$ ,  $\text{CO}_3^{=}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{K}^+$ ) y c) dependientes del potencial de óxido-reducción ( $\text{SO}_4^{=}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ , etc.). En la práctica, la composición iónica se expresa numéricamente como la suma de la concentración de los 8 iones principales o macroconstituyentes, parámetro similar a sólidos disueltos totales (ver 8.1). Las aguas dulces están dominadas generalmente por soluciones de compuestos alcalinos y alcalinotérreos, particularmente bicarbonatos y carbonatos, cuyo orden de importancia es  $\text{Ca} > \text{Mg} > \text{Na} > \text{K}$ , y  $(\text{HCO}_3 + \text{CO}_3) > \text{SO}_4 > \text{Cl}$ . Las concentraciones de Mg, Na, K y Cl son estables en el tiempo y dependen poco de su utilización biológica, mostrando alta correlación con la conductividad (componentes de proporcionalidad constante). Por su parte, las concentraciones de  $\text{HCO}_3$ ,  $\text{SO}_4$  y Ca están más influenciadas por la actividad biológica, por lo que algunos autores los incluyen como componentes de proporcionalidad variable, junto con los microconstituyentes ( $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NH}_4$ ,  $\text{PO}_4$ ,  $\text{SiO}_2$ , Fe, etc.). El sílice puede ser importante en ciertos sistemas de aguas alcalinas y pH elevado. La importancia ecológica de los macroconstituyentes no consiste en que sean indispensables para la vida, debido a que normalmente están en exceso, sino en su influencia sobre la presión osmótica interna de los organismos y en los equilibrios iónicos del medio externo. Las concentraciones de los macroconstituyentes muestran una elevada relación mutua, y cada uno, así como el conjunto, está altamente correlacionado con la conductividad del agua.

### 9.1. pH

El pH es el logaritmo decimal inverso de la concentración molar de iones hidrógeno. A una temperatura dada, la intensidad del carácter básico o ácido de una solución es evaluada por esta medida, en base a una escala de 0 a 14. En situación de equilibrio la concentración de hidrógeno del agua pura es  $10^{-7}$  M y su pH 7 (neutralidad). En las aguas naturales el pH varía entre 6 y 9. Los efectos letales aparecen a valores menores a 4.5 y mayores a 9.5, aunque existen organismos adaptados a valores más extremos. El pH de las aguas naturales depende de las características de la cuenca de drenaje, la fotosíntesis, la capacidad de amortiguación del medio, la oxidación de la materia orgánica y la transformación química de sustancias minerales, así como de la adición de contaminantes. El pH permite detectar zonas de contaminación industrial y calcular las diferentes formas de carbono inorgánico (ver 10.1).

Además de los métodos colorimétricos y los papeles sensibles a ciertos rangos, el pH se determina normalmente con sensores eléctricos (pH-metro), con los que se puede obtener una precisión de 0.05 unidades de pH, aunque 0.1 representa un límite aceptable. Un pH-metro consiste en un potenciómetro, un electrodo de vidrio, uno de referencia y un dispositivo de compensación de temperatura.

### ELECTRODOS

La membrana de vidrio de un electrodo de pH responde a la actividad de los iones hidrógeno mediante el desarrollo de una diferencia de potencial eléctrico en la interfase líquido/vidrio. A una temperatura constante este potencial varía linealmente con el pH de la solución a medir. El cambio en el potencial por unidad de pH es la pendiente del electrodo, la que aumenta linealmente con la temperatura. La pendiente teórica es

conocida como la pendiente Nernstian y es idéntica a la desarrollada por un electrodo de hidrógeno. El potencial observado es la suma de los potenciales separados del pH y la celda de referencia. Como el potencial en el electrodo es fijo por el electrolito, y el potencial del electrodo de referencia es constante, el cambio del potencial a cierta temperatura se debe al pH de la muestra.

#### Precauciones

Al calibrar el equipo deben equilibrarse las temperaturas del electrodo y de los *buffers* a utilizar (los equipos más modernos tienen un sistema automático de compensación de temperatura). El electrodo debe enjuagarse entre una y otra medida con agua destilada o con la solución que se va a medir. No se debe dejar secar el electrodo, pero si esto sucede debe colocarse en KOH 1.0 M por algunos minutos y luego en HCl 1.0 M, y enjuagar con abundante agua destilada.

#### Procedimiento

- 1) Medir la temperatura de las soluciones de pH estándar (*buffers*) y corregir la temperatura en el equipo. Calibrar éste con 2 soluciones estándar de pH conocido (Tabla 9.1) en los extremos del rango de la muestra.
- 2) Colocar el electrodo en la muestra y dejar estabilizar la medida. Calibrar y medir el valor de pH de la muestra, agitando horizontalmente el electrodo suavemente.

Tabla 9.1. Preparación de soluciones estándar a 25 °C (llevar a 1000 ml con AD).

Solución estándar (M)	pH a 25 °C	Peso (g)
ftalato de potasio (0.05)	4.004	10.12 KHC <sub>8</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>
fosfato de potasio (0.008) + fosfato bisódico (0.030)	7.415	1.179 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 4.303 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
bicarbonato de sodio + carbonato de sodio (0.025)	10.014	2.092 NaHCO <sub>3</sub> + 2.640 Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>

## 9.2. CATIONES

Todos los cationes pueden ser determinados por espectrofotometría de absorción atómica, en la cual la muestra es aspirada y atomizada dentro de una llama. En esta metodología, a diferencia de la espectrometría de llama, en la cual sólo se mide la cantidad de luz producida por la muestra al quemarse, se emite un haz de luz de cierta longitud de onda, que permite registrar la cantidad de luz absorbida por el elemento problema atomizado sobre la llama. Debido a que cada elemento absorbe en una longitud de onda determinada, en cada caso se utiliza una fuente de luz específica, evitando así interferencias espectrales. La cantidad de energía absorbida en la llama es proporcional a la concentración del elemento. La información metodológica específica para cada ión puede consultarse en APHA (1995).

### 9.2.1. CALCIO

El calcio es un micronutriente esencial para el crecimiento de la flora acuática. Es uno de los cinco elementos más abundantes en el agua y su determinación brinda información acerca del pasaje del agua por depósitos de limo y dolomita. Se origina en la erosión del suelo y su concentración en lagos tiene poca variación vertical y estacional (10-50 mg l<sup>-1</sup>), aunque puede haber una acumulación hipolimnética por descomposición en lagos muy productivos (80 mg l<sup>-1</sup>). En aguas mineralizadas pue-

de observarse durante el verano una descalcificación epilimnética por precipitación, inducida por el sistema carbónico-carbonatos. Parte del carbonato precipitado es resolubilizado en el hipolimnion, otra fracción es adsorbida a compuestos orgánicos y parte se deposita permanentemente en los sedimentos. La absorción atómica es un método preciso para la determinación del calcio, pero la titulación con permanganato y EDTA son más adecuados para los análisis de rutina.

En la titulación con permanganato el oxalato de amonio precipita cuantitativamente formando oxalato de calcio, el que es disuelto en ácido y titulado con permanganato. La cantidad de permanganato requerido para oxidar el oxalato es proporcional a la cantidad de calcio presente en la muestra. El procedimiento se describe en APHA (1995).

En la titulación con EDTA, éste se combina primero con el calcio de la muestra. el que puede ser determinado directamente a un pH suficientemente alto para que el Mg precipite como hidróxido. Existen varios indicadores que señalan cuando todo el calcio ha reaccionado con el EDTA a un pH entre 12 y 13.

#### *Procedimiento*

- 1) Debido al alto pH de esta técnica, la titulación debe ser inmediata a la adición del indicador. Usar 50 mL de muestra o de una dilución de la misma conteniendo 5 a 10 mg de Ca.
- 2) Agregar 2 mL de NaOH o un volumen suficiente para llevar el pH a 12 - 13.
- 3) Agregar 0.1 a 0.2 g de indicador y titular gota a gota con EDTA, agitando continuamente hasta obtener el cambio de color del indicador seleccionado.
- 4) Calcular la concentración de calcio (Ca) en mg l<sup>-1</sup> según:

$$Ca = (400A8B)/V$$

donde A es el volumen (mL) de EDTA utilizado en la muestra, B el peso de CaCO<sub>3</sub> (mg) equivalente a 1 ml de EDTA y V el volumen de la muestra (ml).

#### *Reactivos*

- Hidróxido de sodio NaOH 1 N. Agregar poco a poco y agitando continuamente 40 g de NaOH en AD y llevar a 1 l.
- Indicadores: Murexida: 150 mg en 100 g de etilenglicol absoluto. Cambia del rosa a rojo. Negro azul de eriocromo: moler 200 mg de la tintura con 100 g de NaCl. Usar 0.2 g para teñir la muestra. En la titulación el color vira de rojo a azul.
- Estandar de EDTA 0.01 M: Preparar de igual manera a la descrita en el método para la determinación de la dureza. La molaridad 0.01 equivale a 400.8 µg Ca ml<sup>-1</sup>.

### 9.2.2. MAGNESIO

El magnesio es requerido por organismos fotosintéticos y hongos, pero por debajo de las cantidades disponibles en las aguas dulces, por lo que sus concentraciones son relativamente conservativas (20-30 mg l<sup>-1</sup>). Es muy soluble a pH menor a 10, por lo que raramente se encuentra en forma precipitada.

En el método gravimétrico el fosfato hidrógeno de amonio precipita con el magnesio cuantitativamente en solución amoniacal como fosfato de amonio-magnésico. El precipitado es quemado y pesado como pirofosfato de magnesio (APHA 1995). Se puede proceder mediante la destrucción de las sales de oxalato y amonio seguido de la precipitación del fosfato de amonio-magnésico o por doble precipitación sin tratamiento previo, teniendo esta última técnica menor posibilidad de pérdidas de material durante la manipulación.

*Procedimiento por remoción de oxalato y amonio*

- 1) Agregar 50 ml de HNO<sub>3</sub> conc. a la misma muestra utilizada para determinar Ca conteniendo menos de 60 mg de Mg, en un recipiente de 600 - 800 ml.
- 2) Evaporar cuidadosamente evitando la pérdida por salpicaduras. Mojar el residuo con 2 a 3 ml de HCl conc., agregar 20 ml de AD, calentar, filtrar y lavar.
- 3) Al filtrado agregarle 2 a 3 gotas de rojo de metilo y 10 ml de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Enfriar y agregar NH<sub>4</sub>OH conc. gota a gota agitando hasta que la solución vire al amarillo.
- 4) Agitar durante 5 min, agregar 5 ml de NH<sub>4</sub>OH conc. y agitar enérgicamente por 10 min. Dejar toda la noche y luego filtrar. Lavar con NH<sub>4</sub>OH 5%.
- 5) Transferir a un crisol previamente quemado y pesado, secar el precipitado cuidadosamente y calentar a 500 °C lentamente hasta obtener un residuo de color blanco. Quemar por períodos de 30 min a 1100 °C hasta peso constante.

*Procedimiento por doble filtración*

- 1) Agregar 2 a 3 gotas de rojo de metilo a la muestra utilizada para determinar Ca conteniendo menos de 60 mg de Mg. Llevar a 150 ml y acidificar con HCl 50%.
- 2) Agregar 10 ml de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, enfriar y repetir los pasos 3 y 4 de la variante anterior.
- 3) Descartar el filtrado y lavar. Disolver el precipitado con 50 ml de HCl 10% tibio y lavar el papel con HCl 1% caliente.
- 4) Adicionar 2 a 3 gotas de rojo de metilo, ajustar el volumen a 150 ml, agregar 1 a 2 ml de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y dejar precipitar. Dejar en lugar fresco no menos de 4 h.
- 5) Filtrar y lavar con NH<sub>4</sub>OH 5%.
- 6) Continuar como en el paso 5 de la variante anterior.
- 7) Calcular la concentración de magnesio (Mg) en mg l<sup>-1</sup> según:

$$\text{Mg} = (218.4P)/V$$

donde P es el peso (mg) del precipitado obtenido (Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) y V el volumen de muestra (ml).

*Reactivos*

- Rojo de metilo: Disolver 100 mg de rojo de metilo y llevar a 100 ml con AD.
- Fosfato hidrógeno de amonio: Disolver 30 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y llevar a 100 ml con AD.

**MÉTODO POR DIFERENCIA**

El magnesio puede ser estimado también como la diferencia entre dureza total (D) (ver 9.4) y dureza del calcio (DCa) expresados como mg l<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> (APHA 1995), en ausencia de metales que interfieran con la titulación del calcio y si se aplican inhibidores adecuados durante la titulación. La concentración de magnesio (Mg) en mg l<sup>-1</sup> es:

$$\text{Mg} = 0.243D - \text{DCa}$$

**9.2.3. SODIO Y POTASIO**

Los cationes monovalentes sodio y potasio están involucrados en el transporte e intercambio iónico a nivel celular, y pueden condicionar el crecimiento de algas cianofíceas en concentraciones menores a 4 mg l<sup>-1</sup>. Ambos elementos son altamente solubles, por lo que no son comunes las variaciones espacio-temporales de sus concentraciones (4-6 mg l<sup>-1</sup>).

La fotometría de llama permite la determinación directa del sodio por comparación con un estándar a 589 nm de longitud de onda. Dependiendo de la calidad del

equipo utilizado es posible detectar concentraciones de  $100 \mu\text{g l}^{-1}$ , e introduciendo algunas modificaciones, de hasta  $10 \mu\text{g l}^{-1}$ .

Los procedimientos metodológicos se describen en APHA (1995).

### 9.3. ANIONES

#### 9.3.1. BICARBONATO Y CARBONATO

El bicarbonato es la principal forma de carbono inorgánico ( $30\text{-}80 \text{ mg l}^{-1}$ ) en aguas de pH entre 6.4 y 8.3, y en general se halla combinado con calcio o magnesio, por lo que la mayoría de las aguas dulces son del tipo bicarbonato-cálcicas. A pH mayor a 8.3 tiene mayor importancia el  $\text{CO}_3$ . Las concentraciones de bicarbonato y carbonato pueden calcularse de acuerdo a la metodología descrita en 10.1 y 10.2.

#### 9.3.2. SULFATO

En general en sistemas de agua dulce el  $\text{SO}_4^-$  es el segundo anión en importancia, pudiendo ser superado a veces por el silicato, aunque en lagos ácidos es normalmente el ion principal. Su fuente principal es la precipitación atmosférica, pero también puede provenir de la oxidación de la pirita sedimentaria. Lagos volcánicos, manantiales y cuencas cerradas con alta evaporación son ambientes con una alta concentración de sulfato.

En el método turbidimétrico, el ion sulfato es precipitado en medio ácido con cloruro de bario para formar cristales de sulfato de bario de tamaño uniforme (APHA 1995). La turbidez se determina a  $420 \text{ nm}$  o con turbidímetro, aunque este último es menos sensible por lo estrecho de la escala. El método es aplicable en aguas superficiales y subterráneas, efluentes industriales y domésticos con concentraciones entre  $3$  y  $40 \text{ mg l}^{-1}$ .

##### *Procedimiento*

- 1) Poner  $100 \text{ ml}$  de muestra o de una dilución de la misma en un matraz erlenmeyer de  $250 \text{ ml}$ .
- 2) Agregar  $20 \text{ ml}$  de la solución A, o  $20 \text{ ml}$  de la solución B si la concentración esperada es menor a  $10 \text{ mg l}^{-1}$ .
- 3) Agregar cristales de  $\text{BaCl}_2$  con una espátula y agitar en forma constante durante  $60 \pm 2$  segundos. Medir la absorbancia inmediatamente a  $420 \text{ nm}$ .
- 4) Calcular la concentración de la muestra usando una curva de calibración específica. Si se usa la solución A, la concentración de sulfato se determina directamente de la curva después de restar la absorbancia del blanco. Si se usa la solución B, se debe restar la concentración del blanco a la concentración aparente de la muestra.

##### *Reactivos y serie estandar*

- Solución A: Disolver  $30 \text{ g}$  de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $5 \text{ g}$  de  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $1.0 \text{ g}$  de  $\text{KNO}_3$  y  $20 \text{ ml}$  de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (99%), en  $500 \text{ ml}$  de AD y luego llevar a  $1 \text{ l}$ .
- Solución B: Agregar al buffer A,  $0.111 \text{ g}$  de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  antes de llevar a  $1 \text{ l}$ .
- Cloruro de bario: Cristales de  $\text{BaCl}_2$  de  $63$  a  $120 \mu\text{m}$ .
- Solución estándar de sulfato: Disolver  $0.1479 \text{ g}$  de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  en AD y llevar a  $1 \text{ l}$ . Esta solución contiene  $100 \text{ mg SO}_4 \text{ l}^{-1}$ .

### 9.3.3. CLORURO

El cloruro no es un elemento dominante en sistemas de agua dulce ( $8 \text{ mg l}^{-1}$ ), pero existen excepciones en lagos con aportes oceánicos, con depósitos de evaporitas marinas o en sistemas poluidos por desechos industriales. Las variaciones que se pueden encontrar no están influenciadas por la actividad biológica, y se deben fundamentalmente a características hidrológicas de la cuenca de drenaje. Detalles de la determinación potenciométrica y por titulación con nitrato de mercurio pueden obtenerse en APHA (1995).

En el método argentométrico, el cromato de potasio en una solución neutra o ligeramente alcalina puede indicar el punto final en la valoración de los cloruros con nitrato de plata (APHA 1995). El cloruro de plata precipita cuantitativamente antes de formarse cromato de plata de color rojo. El método es aplicable a aguas superficiales y efluentes. El rango del método es de 0.15 a 10 mg de cloruro en la muestra.

#### *Procedimiento*

- 1) Tomar 100 ml de muestra o una dilución de la misma. Si la muestra es muy coloreada, agregar 3 ml de suspensión de hidróxido de aluminio, mezclar, dejar sedimentar y filtrar. Si se presume la presencia de sulfuro, sulfito o tiosulfato, agregar 1 ml de peróxido de hidrógeno 30% y calentar durante 1 min.
- 2) Ajustar el pH de la muestra entre 7 y 10 con ácido sulfúrico 1 N o hidróxido de sodio 1N. Agregar 1 ml de solución indicadora.
- 3) Titular con nitrato de plata hasta obtener un color amarillo-rosado. Titular un blanco de AD en las mismas condiciones.
- 4) Calcular la concentración de cloruro (Cl) en  $\text{mg l}^{-1}$  según:

$$\text{Cl} = (A - B)35450 \text{ N/V}$$

donde A y B son los volúmenes (ml) de  $\text{AgNO}_3$  usados en la titulación de la muestra y el blanco, respectivamente, N su normalidad y V el volumen de la muestra (ml).

#### *Reactivos*

- Nitrato de plata 0.014 N: Disolver 2.395 g de  $\text{AgNO}_3$  en AD y llevar a 1 l. Guardar en frasco ámbar y estandarizar con solución de NaCl 0.0141 N.
- Cloruro de sodio 0.0141 N: Disolver 824.0 mg de NaCl (secado a  $140^\circ \text{C}$ ) en AD y llevar a 1 l. Esta solución contiene  $500 \mu\text{g Cl ml}^{-1}$ .
- Solución indicadora de cromato de potasio: Disolver 50 g de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  en AD. Agregar solución de nitrato de plata hasta comprobar la formación de un precipitado de color rojo. Dejar reposar 12 h, filtrar y llevar a 1 l con AD.
- Suspensión de hidróxido de aluminio: Disolver 125 g de sulfato de aluminio y potasio decahidratado ( $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ ), o sulfato de amonio y potasio dodecahidratado ( $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ ) en 1 l de AD. Calentar a  $60^\circ \text{C}$  y agregar 55 ml de hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) concentrado agitando. Dejar reposar 1 h, transferir la solución a un vaso de precipitado alto y lavar el precipitado a través de adiciones sucesivas, mezclando y decantando hasta que el agua de lavado se encuentra libre de cloruros.

### 9.4. DUREZA

La dureza del agua se define como la concentración total de calcio y magnesio. Cuando la dureza es mayor a la alcalinidad determinada por la suma de carbonato

y bicarbonato, la dureza equivalente a la alcalinidad total es denominada carbonatada y el excedente no carbonatada. Si el valor de dureza es igual o menor al de la alcalinidad total, toda la dureza es carbonatada. La dureza puede determinarse en forma simple mediante el uso de *kits* de campo poco precisos, por medio de cálculo o por titulación con EDTA.

#### CÁLCULO A PARTIR DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO Y MAGNESIO

Esta metodología es aplicable a todo tipo de aguas. Brinda resultados altamente precisos, y requiere la determinación previa de las concentraciones de Ca y Mg en  $\text{mg l}^{-1}$  (APHA 1995). La dureza (D) en  $\text{mg l}^{-1}$   $\text{CaCO}_3$  será:

$$D = 2.497\text{Ca} + 4.118\text{Mg}$$

#### TITULACIÓN CON EDTA

El ácido etilendiaminotetracético y sus sales de sodio (EDTA) forman compuestos solubles en presencia de algunos cationes metálicos. Si se adiciona una pequeña cantidad de Negro de eriocromo a una solución acuosa conteniendo calcio y magnesio a  $\text{pH } 10.0 \pm 0.1$ , la solución vira al rojo (APHA 1995). Si se titula con EDTA, el Ca y el Mg forman complejos, pasando la solución a azul al completarse la reacción. Si bien la determinación es más precisa con el aumento del pH, este no debe incrementarse en exceso debido al riesgo que se formen precipitados de  $\text{CaCO}_3$  y  $\text{Mg(OH)}_2$ . Una precaución adicional consiste en llevar a cabo la titulación de cada muestra en un lapso no mayor de 5 min.

#### *Procedimiento*

- 1) Llevar 25 ml de muestra, o un volumen que requiera menos de 15 mL de EDTA en la titulación, a 50 ml con AD.
- 2) Agregar 1 a 2 ml de solución buffer para llevar el pH a 10.
- 3) Adicionar una o dos gotas de indicador Negro de eriocromo.
- 4) Agregar EDTA lentamente y agitando hasta que el color rojo desaparezca. Esperar de 3 a 5 s entre las últimas gotas. La coloración azul indica el punto final de la reacción. Tratar un blanco en condiciones similares.
- 5) Comprobar la concentración de EDTA contra un estándar de calcio, de manera que 1 ml de EDTA equivalga a 1 mg  $\text{CaCO}_3$ .
- 6) Calcular la dureza (D) en  $\text{mg l}^{-1}$   $\text{CaCO}_3$  según:

$$D = 1000(A B)/V$$

donde A es el volumen de EDTA (ml), B los mg de  $\text{CaCO}_3$  equivalentes a 1 ml de EDTA y V el volumen de la muestra.

#### *Reactivos*

- Solución buffer: Disolver 16.9 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en 143 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  conc. Agregar 1.25 g de sal magnésica de EDTA y llevar a 250 ml con AD. Si no se posee esta sal, disolver 1.179 g de sal disódica de ácido etilendiaminotetracético bihidratado y 780 mg de sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) en 50 ml de AD. Guardar en botella de plástico o borosilicato por no más de un mes.
- Negro de eriocromo: Disolver 0.5 g de polvo seco de sal sódica de ácido 1-(1-hidroxi-2-naftilazo)-5-nitro-2-naftol-4 sulfónico (N° 203 en el índice de color) en

- 100 g de 2, 2', 2'' -nitrilotrietanol (trietanolamina o 2-metoximetanol). Agregar 2 gotas por cada 50 ml de solución a titular.
- Solución estándar de EDTA 0.01 M: Pesar 3.723 g de EDTA, disolver en AD y llevar a 1 l. Estandarizar con una solución estándar de calcio, y guardar en botella de polietileno.
  - Solución estándar de calcio: Pesar 1.000 g de  $\text{CaCO}_3$  en un erlenmayer de 500 ml. Agregar HCl 50% hasta disolver el  $\text{CaCO}_3$ . Agregar 200 ml de AD y hervir para eliminar el  $\text{CO}_2$ . Enfriar y agregar unas gotas de rojo de metilo y ajustar hasta obtener un color naranja mediante la adición de  $\text{NH}_4\text{OH}$  3N o HCl 50%. Llevar a 1 l con AD. Esta solución contiene  $1 \text{ mg CaCO}_3 \text{ ml}^{-1}$ .

## 9.5. DIAGRAMAS DE MAUCHA

Los diagramas de Maucha (Fig. 9.1, pág. siguiente) permiten mostrar en forma gráfica las características iónicas de una muestra de agua. A partir de las concentraciones de los cationes y aniones expresadas en  $\text{meq l}^{-1}$  se puede construir una representación gráfica octogonal, en donde el área de cada uno de los sectores representa porcentualmente la concentración del ion respectivo.

### Procedimiento

- 1) Expresar la concentración de los cationes Ca, Mg, Na y K, y de los aniones  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^-$ , Cl y  $\text{NO}_3^-$  en  $\text{meq l}^{-1}$  usando la tabla 9.2 (pág. 74), y sumarlas.
- 2) Expresar porcentualmente las concentraciones de cada ion. Transformar cada porcentaje a valores de distancia, tomando el porcentaje mayor como 5 cm.
- 3) Dibujar un círculo de 5 cm de radio dividido en 8 sectores iguales y trazar el eje central de cada uno. Dibujar un círculo concéntrico de 1.35 cm de diámetro.
- 4) Plotear cada concentración porcentual sobre el eje central de cada sector del polígono, como se muestra en el diagrama adjunto. Para cada sector, trazar un polígono con vértices en el centro, en el valor máximo y en las intersecciones de cada lado del sector con el círculo interno.

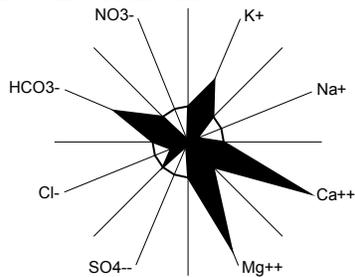


Figura 9.1. Diagrama de Maucha mostrando la composición iónica porcentual del agua.

## 9.6. CONDUCTIVIDAD

La conductividad eléctrica es el recíproco de la resistencia específica medida entre dos electrodos de  $1 \text{ cm}^2$  de área y separados por 1 cm. Es una medida de la capacidad de una solución para conducir una corriente eléctrica y aumenta con la concentración iónica, por lo que se utiliza para estimar la mineralización global del agua. Se expresa en  $\mu\text{mhos cm}^{-1}$  ( $\mu\text{ohms}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) o  $\mu\text{Siemens cm}^{-1}$  ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) y se expresa referida a 20 o 25 °C ya que la temperatura afecta la velocidad iónica, au-

mentando la conductividad en *ca.* 2% por cada °C. La conductividad es la suma de la conductividad específica de cada ion (Tabla 9.2, pág. siguiente) multiplicada por su concentración expresada en equivalentes, lo que permite verificar los resultados de los análisis. Los valores habituales de conductividad en agua dulce varían de menos de 50  $\mu\text{S cm}^{-1}$  en áreas poco mineralizadas, a 500-1000  $\mu\text{S cm}^{-1}$  en cuencas sedimentarias. La conductividad expresada en  $\mu\text{S cm}^{-1}$  multiplicada por un factor entre 0.55 y 0.7, corresponde aproximadamente al valor de sólidos disueltos totales expresados en  $\text{mg l}^{-1}$ . Asimismo, expresada en  $\text{mS cm}^{-1}$  y multiplicada por 0.6, corresponde aproximadamente a la salinidad en ‰.

La conductividad se determina con un conductímetro (electrodo selectivo acoplado a un potenciómetro) que debe ser calibrado con una solución estándar de cloruro de potasio 0.01 N (745.6 mg de KCl en 1 l de AD desionizada). A 25 °C, esta solución tiene una conductividad de 1413  $\mu\text{S cm}^{-1}$ . Los sensores de última generación permiten compensar la temperatura en forma manual o automática. Tras colocar el electrodo en la muestra, se debe esperar que la medida se estabilice. Al medir, se debe agitar horizontal y suavemente el electrodo.

## 9.7. BALANCES IÓNICOS

Teóricamente, la suma de los aniones debe igualar la suma de los cationes presentes en una muestra de agua si las cantidades son expresadas en  $\text{meq l}^{-1}$ . En forma similar, la conductividad total de una muestra de agua estimada con un conductímetro debe ser igual a la suma de las conductividades específicas de los iones presentes. En la práctica esto presenta desvíos, por lo que la realización de balances iónicos permite conocer la exactitud de los análisis realizados.

### *Procedimiento*

- 1) Expresar la concentración de los cationes y aniones en  $\text{meq l}^{-1}$  (Tabla 9.2., pág. siguiente)
- 2) Sumar separadamente los valores de los cationes y los aniones.
- 3) Calcular la diferencia entre ambos grupos y expresarla como porcentaje de la suma menor.
- 4) Calcular el aporte a la conductividad total de cada ion (Tabla 9.2).
- 5) Sumar los valores y medir la conductividad total del agua con un conductímetro.
- 6) Calcular la diferencia entre ambos valores en porcentaje. Si la diferencia es superior al 10%, al menos un análisis o la medición de la conductividad fue incorrecto.

*Tabla 9.2.* Factor para convertir la concentración de iones de mg a meq (f), y conductividad específica ( $K_i$ ) de cada ion ( $\mu\text{S cm}^{-1}[\text{meq}]^{-1}$ ).

Ion	f	$K_i$
Bicarbonato	0.016	43.6
Carbonato	0.033	84.6
Sulfato	0.020	73.9
Cloruro	0.028	75.9
Calcio	0.049	52.0
Magnesio	0.082	46.6

Sodio	0.043	48.9
Potasio	0.025	72.0

## 9.5. RESULTADOS

La dinámica espacio-temporal de la conductividad en la Laguna de Rocha depende de la mezcla de masas de agua de origen marino y continental. Esta mezcla produce un gradiente espacial que varía temporalmente con la apertura o cierre de la barra y con el régimen de lluvias de la zona (Fig. 9.2). Comúnmente, las mayores precipitaciones y la menor evapotranspiración durante el invierno resultan en mayores caudales de agua dulce que reducen significativamente los valores de conductividad.

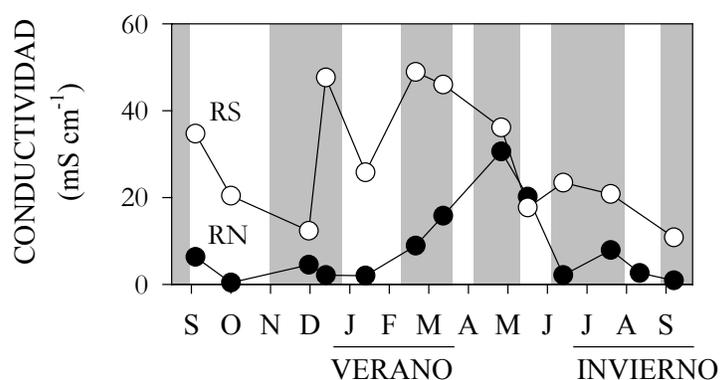


Figura 9.2. Variación mensual de la conductividad en dos estaciones de la laguna de Rocha: norte (RN) y sur (RS). Las zonas sombreadas corresponden a períodos de barra abierta (tomado de Conde *et al.* 1998).

En la tabla 9.3 se presentan los balances iónicos y de conductividad de una estación en el Arroyo Toledo (Canelones). El promedio anual de sales fue de 577 mg l<sup>-1</sup>. De acuerdo a la concentración de los diferentes iones se puede clasificar estas aguas como carbonato-sódicas.

Tabla 9.3. Balance iónico y de conductividad en el Arroyo Toledo en su tramo medio (tomado de Arocena 1991).

Ion	Balance iónico μeq l <sup>-1</sup>	Balance de conductividad K (μS cm <sup>-1</sup> )
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	22.1	
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	6000.0	246
Cl <sup>-</sup>	2980.0	206
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	1320.0	94
<i>Suma de aniones</i>	<i>10322.1</i>	
K <sup>+</sup>	370.0	25
Na <sup>+</sup>	6570.0	302
Ca <sup>++</sup>	2400.0	127

Mg <sup>++</sup>	1170.0	56
Suma de cationes	10510.0	
Diferencia Cat. – An.	187.9	
K teórica (Kt)		1056
K medida (Km)		970
Kt – Km		86
Error (%)	1.8	8.18

En la figura 9.3 se representa la composición iónica relativa de la misma estación en el Arroyo Toledo, mediante un diagrama de Maucha, en donde se aprecia la composición carbonato-sódica de las aguas.

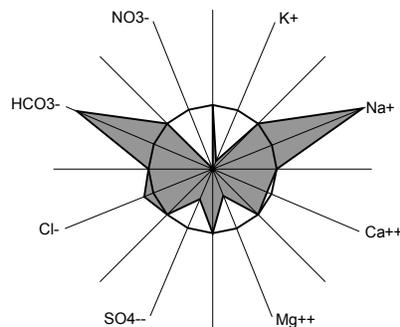
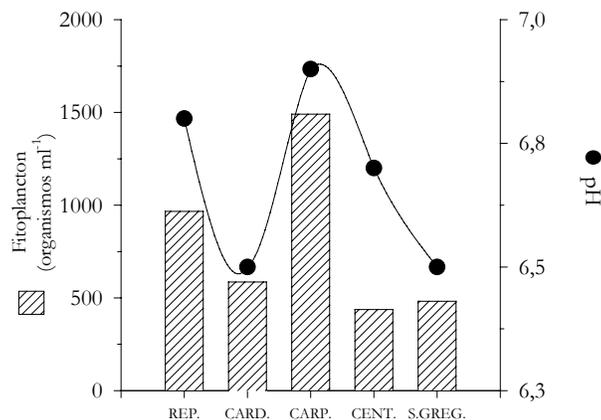


Figura 9.3. Diagrama de Maucha mostrando la composición iónica del Arroyo Toledo en su tramo medio (modificado de Arocena 1991).

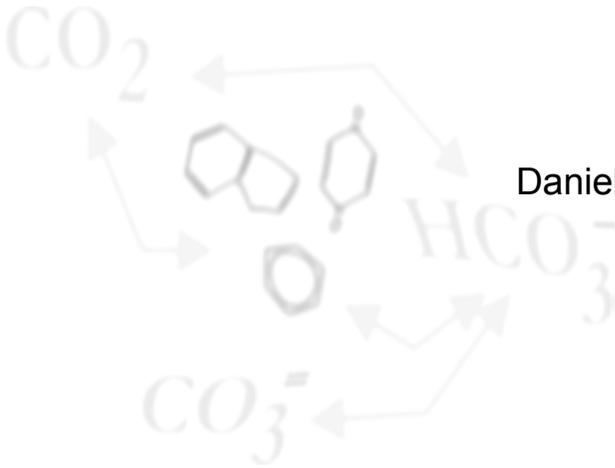
En la figura 9.4 se presenta la variación horizontal de los valores de pH y abundancia total de fitoplancton en 5 estaciones del embalse Rincón del Bonete (promedios de la zona eufótica y de la columna de agua respectivamente). En las estaciones Represa (Rep.) y Carpintería (Carp.) se registraron los máximos valores de fitoplancton, por lo cual el pH fue superior en esas estaciones como consecuencia de la utilización fotosintética del CO<sub>2</sub> por parte de las algas. La disminución de la concentración de este gas desplaza el equilibrio de las formas inorgánicas de carbono, formando ácido carbono a partir de bicarbonato, para lo cual se consumen iones hidrógeno del medio con el consiguiente aumento de pH.



*Figura 9.4.* Variación espacial de los valores de pH en relación a la abundancia del fitoplancton en el Embalse Rincón del Bonete en marzo de 1998 (tomado de Conde *et al.* 1998).

CARBONO

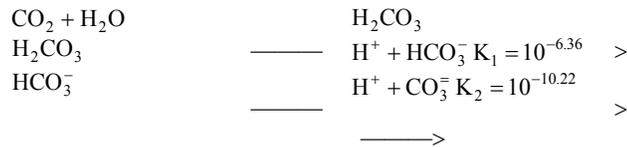
Daniel Conde & Javier Gorga



EN LAS AGUAS DULCES, EL CARBONO INORGÁNICO SE PRESENTA EN FORMA libre (CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) o disociada (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), mientras que la fracción orgánica está conformada por una variedad de compuestos en diferentes estados de oxidación. Las formas inorgánicas representan la fuente de carbono para la síntesis de nueva materia orgánica, mientras que el carbono orgánico disuelto absorbe la radiación fotosintéticamente activa y la ultravioleta, determina la movilidad y toxicidad de ciertos elementos e influye en la productividad primaria (Thurman 1985).

10.1. FRACCIONES DE CARBONO INORGANICO

A un cierto valor de pH, las especies inorgánicas de carbono se encuentran en una razón fija, de acuerdo a las constantes de equilibrio K<sub>1</sub> y K<sub>2</sub>:



por lo que el pH al que se igualan las concentraciones de HCO<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> es 6.36 y al que se igualan las de CO<sub>3</sub> y HCO<sub>3</sub> es 10.22:

$$\begin{aligned}
 \text{pH} &= \text{p}K_1 + \log\left(\frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]}\right) \\
 \text{pH} &= \text{p}K_2 + \log\left(\frac{[\text{CO}_3^{2-}]}{[\text{HCO}_3^-]}\right)
 \end{aligned}$$

A pH mayor a 10.22 predomina el CO<sub>3</sub>, entre 10.22 y 6.36 el HCO<sub>3</sub>, y a pH menor

a 6.36 el CO<sub>2</sub> libre. Las fracciones de carbono inorgánico pueden ser determinadas gráficamente (Moore 1939) o mediante fórmulas obtenidas a partir de las constantes de ionización, utilizando los valores de alcalinidad (en meq l<sup>-1</sup>) y pH de la muestra, para un contenido mineral menor a 500 mg l<sup>-1</sup>, según:

$$[\text{HCO}_3] (\text{mg CaCO}_3 \text{ l}^{-1}) = (\text{Alcalinidad} - 5.0 \times 10^{(\text{pH}-10)}) / (1 + 0.94 \times 10^{(\text{pH}-10)}) = A$$

$$[\text{CO}_3] (\text{mg CaCO}_3 \text{ l}^{-1}) = 0.94 \times A \times 10^{(\text{pH}-10)} = B$$

$$\text{CO}_2 \text{ libre (mg l}^{-1}) = 2.0 \times A \times 10^{(6-\text{pH})} = C$$

$$\text{CO}_2 \text{ total (mg l}^{-1}) = C + 0.44(2 \times A + B)$$

## 10.2. ALCALINIDAD

La alcalinidad expresa numéricamente la cantidad de bases (Ca, Mg, Na y K) en equilibrio (formando sales) con los aniones principales (HCO<sub>3</sub>, CO<sub>3</sub>, Cl y SO<sub>4</sub>). En las aguas dulces se debe principalmente a la presencia de carbonatos y bicarbonatos de metales alcalinotérreos (Ca y Mg), por ser éstos los iones más abundantes. En las aguas dulces no contaminadas de pH entre 6.4 y 8.3, la alcalinidad se debe generalmente al bicarbonato de calcio (Ca(HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). Generalmente existe un aumento de la alcalinidad con la profundidad, ya que el anhídrido carbónico aumenta por respiración y descomposición de la materia orgánica. La alcalinidad permite estimar el grado de mineralización del agua (aguas con alcalinidad por debajo de 1 meq l<sup>-1</sup> se consideran poco mineralizada) y, junto con el pH, calcular las fracciones de carbono inorgánico (ver 10.1).

### 10.2.1. MÉTODO DE WATTENBERG

La alcalinidad no-carbonatada se determina titulando una muestra de volumen conocido con un ácido fuerte de concentración conocida hasta pH 8.3. El volumen de ácido necesario (transformación de carbonatos y oxhidrilos en bicarbonatos), indica la alcalinidad total. Si el pH original de la muestra era menor a 8.3 la alcalinidad no-carbonatada es cero. La alcalinidad carbonatada se determina procediendo como en el caso anterior, pero titulando hasta un pH de 4.5-4.3 (transformación de carbonatos y bicarbonatos en CO<sub>2</sub> libre) (APHA 1995). El rango de validez del método es de 10 a 500 mg CaCO<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>.

#### *Procedimiento*

- 1) A 100 ml de muestra (V) agregar ácido sulfúrico 0.02 N (N) hasta pH 8.3 (si el pH original era mayor 8.3), controlando el descenso con un pH-metro. Medir el volumen de ácido usado (G).
- 2) Continuar la titulación hasta un pH de 4.3 a 4.9 (Tabla 10.1, pág. siguiente). Medir el volumen de ácido usado (H). Calcular la alcalinidad no carbonatada y carbonatada (Alc) en meq l<sup>-1</sup> según:

$$\text{Alc} = N (G \text{ ó } H) f 1000 / V$$

donde f es el factor del ácido (1 si la normalidad es exactamente 0.02). 1 meq l<sup>-1</sup> corresponde a 50 mg CaCO<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> = 20 mg Ca<sup>++</sup> l<sup>-1</sup>. Expresar el resultado de la alcalinidad indicando el pH final de la titulación. La alcalinidad total es la suma de la carbonatada y la no carbonatada.

### Reactivos

- Acido sulfúrico 0.02 N: Tomar 28 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> puro y llevar a 1 l con AD (solución 1 N). Tomar 5 ml de esta solución y diluir a 250 ml.

Tabla 10.1. Punto final (pH) de la titulación para determinar la alcalinidad carbonatada.

Alcalinidad (mg l <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub> )	pH
< 30	4.9
31-150	4.6
151-500	4.3
Efluentes industriales	4.5

### Factor del ácido (f)

Secar 5 g de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 250 °C por 4 h y enfriar en desecador. Pesar 2.5 ± 0.2 g y disolver en 1 l de AD. La solución es estable durante 1 semana. Titular potenciométricamente con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.02 N, una solución de 15 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 N con 85 ml de AD, hasta pH 5. Lavar el electrodo en el mismo recipiente, hervir 3 a 5 min, cubrir y dejar enfriar hasta temperatura ambiente. Continuar la titulación hasta el punto de inflexión. La normalidad del ácido se calcula a partir de:

$$N = (A B)/(53.0 C)$$

donde A es el peso (g) de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, B el volumen (ml) de solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y C el gasto (ml) de ácido. Si la normalidad del ácido es 0.02, 1 ml equivale a 1 mg CaCO<sub>3</sub>.

## 10.2.2. MÉTODO DE GRAN

El valor de alcalinidad puede ser obtenido con mayor precisión determinando el pH final de titulación a partir de la inflexión de una curva de titulación, plotando la variación de pH contra incrementos reducidos de ácido (Gran 1952). El volumen final de titulación se retroextrapola para el punto de equivalencia deseado. Los cálculos son iguales a los del método de Wattenberg, si los demás factores se mantienen iguales.

## 10.3. CARBONO ORGÁNICO

### 10.3.1. CARBONO ORGÁNICO TOTAL

Las formas orgánicas de carbono pueden ser oxidadas mediante acción biológica y procesos químicos. La determinación de DBO y DQO brinda valiosa información acerca de la magnitud de estos procesos. No obstante, la presencia de compuestos que no dependen de la actividad biológica impide calcular el carbono orgánico total (COT) a partir de los valores de DBO y DQO. El carbono orgánico total provee una medida directa y más aproximada de la cantidad de carbono presente, pero por ser independiente del estado de oxidación de la materia orgánica, no sustituye las determinaciones de DBO y DQO. Para poder determinar la cantidad de carbono, las moléculas orgánicas deben degradarse hasta obtener una forma molecular más simple que pueda medirse cuantitativamente. Esto puede lograrse de diferentes

maneras (calor, radiación ultravioleta, oxidantes químicos o una combinación de algunos de ellos) mediante la aplicación de diversos procedimientos (APHA 1995). Wetzel & Likens (1991) detallan un técnica espectrofotométrica de baja precisión para determinar la fracción particulada de carbono orgánico mediante oxidación húmeda con dicromato de potasio y ácido sulfúrico.

### 10.3.2. CARBONO ORGÁNICO DISUELTO

Debido a la variabilidad espacio-temporal de la fracción disuelta de carbono orgánico, numerosos análisis con equipos específicos de alta precisión (analizador de carbono) son requeridos para obtener resultados representativos. Debido al alto costo y tiempo de estos análisis es común relacionar la concentración real de carbono orgánico disuelto obtenida por métodos precisos con la absorbancia a longitudes de onda específicas para cada ambiente. Sin embargo, estos procedimientos deben ser calibrados frecuentemente para cada tipo de agua de diferente contenido orgánico. En Wetzel & Likens (1991) se presenta una técnica para separar la fracción orgánica disuelta de carbono y su análisis mediante transformación a anhídrido carbónico, el que es finalmente estimado con analizador infrarrojo.

## 10.4. RESULTADOS

En la figura 10.1 se muestran las curvas de titulación para la determinación de la alcalinidad en muestras obtenidas en dos zonas (control y recuperación) del arroyo Toledo (Arocena 1991). La muestra correspondiente a la zona control presentó una mayor capacidad buffer evidenciada en el mayor volumen de ácido requerido para alcanzar el punto de inflexión. La zona denominada de recuperación requirió un menor volumen de ácido para alcanzar dicho valor, determinando una menor capacidad de amortiguación. Esto permitió determinar que pese a ser considerada como una zona con mejor calidad de agua, la magnitud de los disturbios aguas arriba impidió una recuperación total.

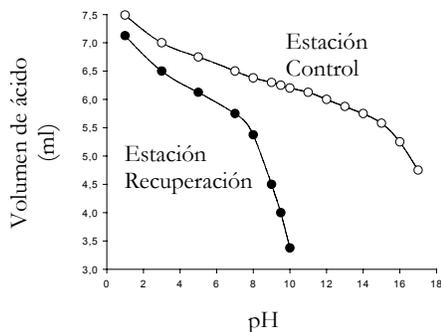


Figura 10.1. Curvas de titulación del agua de dos estaciones del arroyo Toledo para determinación de la alcalinidad (Arocena 1991).

En la figura 10.2 (pág. siguiente) se observa la relación existente entre los valores de conductividad y de carbono orgánico disuelto en 13 estaciones en la Laguna de Rocha en transectos realizados en 1997 y 1998 (Conde *et al.* 1998b). La concentración de carbono orgánico disuelto varía comúnmente de 0.5 mg l<sup>-1</sup> en la zona Sur a 11 mg l<sup>-1</sup> en la zona Norte, asociado a conductividades de 0.1 a 40 mS

cm<sup>-1</sup>. La alta variabilidad de las características climáticas de la región producen pulsos de materia orgánica disuelta de origen terrestre que llegan al medio acuático por escorrentía, donde son posteriormente diluidos con agua de origen oceánico. Este proceso produce un ambiente subacuático extremadamente variable, tanto temporal como espacialmente. El gradiente de carbono orgánico disuelto produce diferencias espaciales significativas en los coeficientes de atenuación de la radiación solar UV-B, UV-A y PAR, los que resultaron significativamente correlacionados con la concentración de carbono orgánico disuelto ( $p < 0.01$ ).

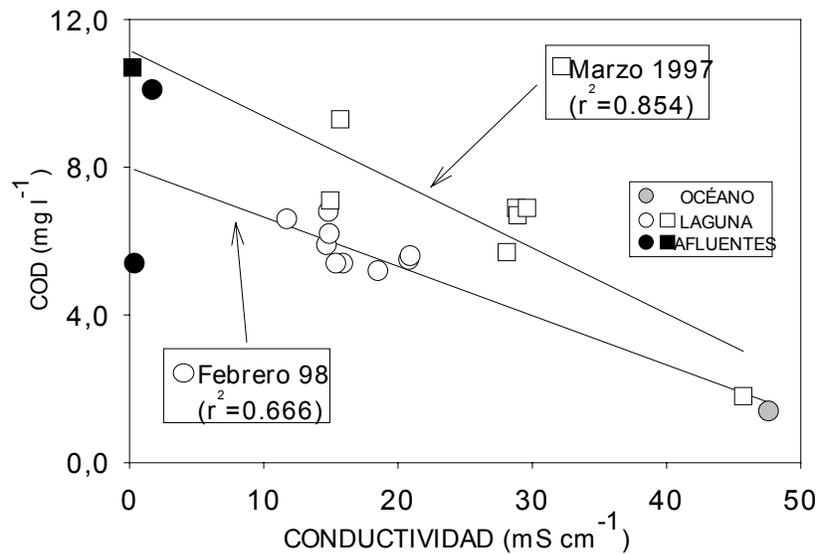


Figura. 10.2. Relación entre la conductividad y la concentración de carbono orgánico disuelto (COD) en 13 estaciones de la Laguna de Rocha, durante transectos realizados en 1997 y 1998 (Conde *et al.* 1998b).

# NITRÓGENO, FÓSFORO Y SÍLICE

*Daniel Conde, Javier Gorga  
& Guillermo Chalar*

ADEMÁS DEL OXÍGENO, EL HIDRÓGENO Y OTROS ELEMENTOS MENORES, LA composición relativa de la materia orgánica se aproxima a las relaciones atómicas C:N:P establecidas por Redfield para el plancton marino (106:16:1). Estudios recientes indican que en aguas dulces, estas relaciones son sustancialmente mayores que las propuestas por Redfield. El elemento cuya concentración externa se aproxime más al mínimo crítico necesario para los organismos será el elemento limitante (Ley del Mínimo de Liebig). Mientras el nitrógeno y el fósforo pueden tener el carácter de limitantes para la producción primaria, el carbono normalmente presenta concentraciones en el medio mayores a los requerimientos metabólicos.

La concentración de cada nutriente en una muestra de agua se obtiene desarrollando un compuesto coloreado mediante reactivos específicos. La intensidad del color medida, por espectrofotometría, será proporcional a la concentración. La espectrofotometría se basa en que cada sustancia posee un espectro molecular característico, por lo que absorbe radiaciones de longitudes de onda de acuerdo a su estructura atómica. La radiación que pasa a través de una sustancia en solución es absorbida en forma exponencial, y en cantidad proporcional a la concentración de la sustancia, según la Ley de Beer-Lambert:

$$I_t = I_0 e^{-klc}$$

donde  $I_t$  es la intensidad de la luz transmitida,  $I_0$  la intensidad de la luz incidente,  $k$  el coeficiente de absorción de la sustancia,  $l$  la longitud del trayecto óptico y  $c$  la concentración de la muestra. El triple producto  $klc$  es la absorbancia  $A$ :

$$A = \log(I_0/I_t)$$

Para transformar la absorbancia en unidades de concentración se construyen curvas de calibración con soluciones de concentración conocida, que permiten interpolar la concentración a partir de la absorbancia de las muestras problema.

BLANCOS

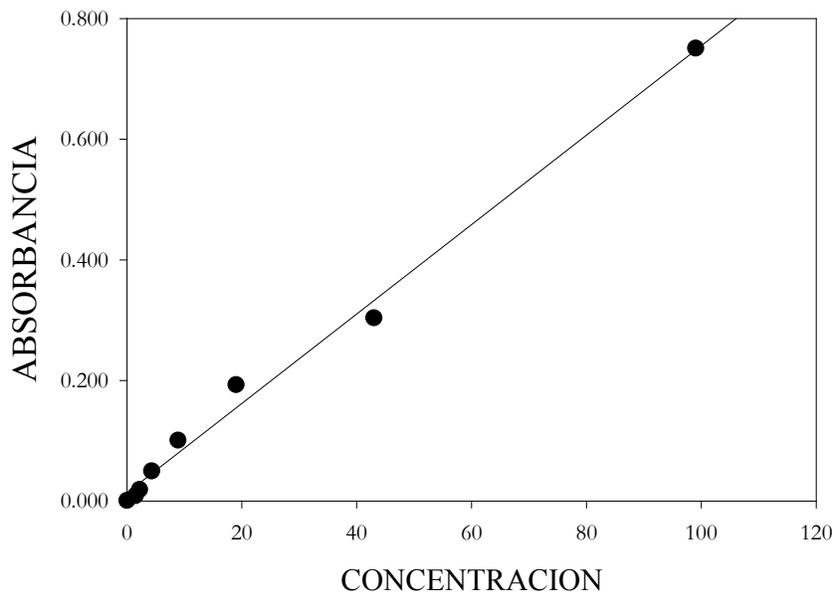
La absorbancia total ( $A_t$ ) de una muestra a cierta longitud de onda es la suma de la absorbancia específica del compuesto ( $A_c$ ), de los reactivos específicos utilizados ( $A_r$ ) y del color o turbidez de la muestra original ( $A_m$ ), de donde:

$$A_c = A_t - (A_r + A_m)$$

Para conocer la absorbancia de los reactivos y del agua, se miden los blancos de reactivos y de turbidez. El blanco de reactivos se prepara sustituyendo la muestra de agua por un volumen similar de AD, al que se trata según el mismo procedimiento que las muestras en cada análisis. El blanco de turbidez es la absorbancia de la muestra original sin reactivos. Ambos se miden a la longitud de onda correspondiente a cada análisis.

#### CURVA DE CALIBRACIÓN

Es una curva de absorbancia vs. concentración (Fig. 11.1), construida a partir de diluciones de concentración conocida de la sustancia problema, las que son tratadas en forma idéntica a la muestras. Mediante una regresión lineal simple entre las concentraciones y las absorbancias de las diluciones, o interpolando gráficamente, se obtiene la concentración de los diferentes nutrientes en las muestras. Las diluciones para las curvas de calibración se realizan en base a los detalles de la tabla 11.1 (pág. siguiente).



*Figura 11.1.* Curva de calibración para el cálculo de la concentración de nutrientes en muestras de agua, construida con datos de absorbancia y concentración de varias diluciones.

Tabla 11.1. Volumen (ml) de solución estándar (ver preparación en cada método), de solución de trabajo y agua destilada, para obtener diversas concentraciones ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) para las curvas de calibración. Primero se prepara la solución de trabajo, diluyendo la solución estándar indicada en cada método, y a partir de ésta las diluciones para cada curva.

	Amonio	Nitrito	Nitrato	Fosfato	Silicato	Sulfato
<i>Solución de trabajo</i>						
Solución estándar	1	1	10	5	10	5
Agua destilada	99	499	90	95	40	995
Concentración	280	500	10000	2500	28100	500
<i>Dilución 1</i>						
Solución de trabajo	0.5	0.5	0.4	0.5	1.0	1.0
Agua destilada	49.5	99.5	199.6	99.5	199.0	99.0
Concentración	2.8	0.5	20	12.5	140.5	5.0
<i>Dilución 2</i>						
Solución de trabajo	2.5	5	1	1	2.5	4
Agua destilada	47.5	199.5	99	49	97.5	96
Concentración	14.0	12.5	100	50	702.5	20
<i>Dilución 3</i>						
Solución de trabajo	12.5	20	5	5	10	6
Agua destilada	37.5	80	95	45	90	94
Concentración	70	100	500	250	2810	30
<i>Dilución 4</i>						
Solución de trabajo	25	50	10	15	15	7
Agua destilada	25	50	90	35	85	93
Concentración	140	250	1000	750	4215	35

## 11.1. NITRÓGENO

Las formas inorgánicas más frecuentes del nitrógeno son  $\text{N}_2$ ,  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ . Si bien el nitrógeno no forma compuestos insolubles, puede encontrarse adsorbido a partículas o asociado a compuestos húmicos. El nitrógeno orgánico incluye proteínas, péptidos, ácidos nucleicos y urea y se lo encuentra en concentraciones que varían desde cientos de microgramos en lagos hasta más de  $20 \text{ mg l}^{-1}$  en aguas de drenaje. En sistemas naturales suele encontrarse una proporción similar entre las formas disueltas orgánicas e inorgánicas. Los análisis de rutina se centran en la determinación del N total y total disuelto,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NH}_4^+$ .

### 11.1.1. NITRATO

#### MÉTODO DEL SALICILATO DE SODIO

En presencia de salicilato de sodio, el nitrato forma un compuesto de sustitución (p-nitrosalicilato) de color amarillo (Müller & Weideman 1955). El rango del

método va de 0.1 a 2 mg N-NO<sub>3</sub>-N/l y la precisión es de 0.1 mg NO<sub>3</sub>-N/l.

#### *Procedimiento*

- 1) Colocar 25 ml de muestra filtrada (GF/C) en matraz erlenmeyer de 100 ml.
- 2) Agregar 1 ml de solución de salicilato de sodio. Mezclar y evaporar la muestra en estufa a menos de 110 °C.
- 3) Con la muestra aún caliente disolver el residuo con 1 ml de ácido sulfúrico concentrado.
- 4) Agregar 50 ml de AD. Mezclar, y agregar 7 ml de solución oxidante de tartrato de sodio y potasio.
- 5) Llevar a 100 ml con agua destilada (AD) y medir la absorbancia inmediatamente a 420 nm, corrigiendo el valor con los blancos de reactivos y de turbidez.
- 6) Calcular la concentración de la muestra usando una curva de calibración.

#### *Reactivos*

- Salicilato de sodio: Disolver 0.5 g de NaHOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>COO y llevar a 100 ml de AD. Esta solución debe ser preparada cada vez.
- Ácido sulfúrico concentrado ppa (gravedad específica 1,82)
- Solución oxidante: Disolver 400g NaOH ppa en menos de un litro de AD. Luego de que enfríe, agregar y disolver 50g de tartrato de sodio y potasio ppa. Llevar a 1 l con AD y guardar en botella oscura.
- Solución estándar: Disolver 0.722 g de KNO<sub>3</sub> en AD y llevar a 1 l. La solución contiene 0.1 mg N-NO<sub>3</sub> ml<sup>-1</sup>.

### MÉTODO DE REDUCCIÓN POR CADMIO

El método se basa en la reducción del NO<sub>3</sub> a NO<sub>2</sub>, en presencia de cadmio tratado con sulfato de cobre (APHA 1995). El NO<sub>3</sub> reducido se determina luego como nitrito por lo que deben restarse los nitritos presentes en la muestra. El método es aplicable a concentraciones entre 0.01 y 1.0 mg N-NO<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>. La precisión del método es la del método de nitritos. Una variación del método consiste en reducir el nitrato a amonio por medio de Reactivo Devarda y medir el amonio producido potenciométricamente (Mertens *et al.* 1975).

#### *Procedimiento*

- 1) Preparación de la columna de cadmio: Insertar fibra de vidrio en la parte inferior de la columna de reducción. Verificar que la columna tenga suficiente Cd (al menos 18.5 cm de largo). Lavar la columna con 200 ml de NH<sub>4</sub>Cl-EDTA diluido. Activar la columna pasando 100 ml de una solución conteniendo 1.0 mg N-NO<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> en 25 ml y 75 ml de NH<sub>4</sub>Cl-EDTA. El Cd no debe estar en contacto con el aire en ningún momento. En caso que se verifique la presencia de burbujas en el interior de la columna, éstas deben ser extraídas usando una varilla de cobre o de vidrio, evitando compactar el cadmio. Para probar la eficiencia de la columna, es conveniente pasar patrones de NO<sub>3</sub> de concentración conocida y blancos. Puede prepararse una curva para determinar la eficiencia con más precisión.
- 2) Remover el material en suspensión filtrando la muestra con GF/C.
- 3) Ajustar el pH entre 7 y 9 con HCl o NaOH.
- 4) A 25 ml de muestra agregar 75 ml de NH<sub>4</sub>Cl-EDTA.
- 5) Tras verificar que la velocidad del pasaje no sobrepase los 7 a 10 ml min<sup>-1</sup>, descartar los primeros 50 ml y recoger los siguientes 25 ml. Entre cada muestra deben descartarse 75 ml, a fin de evitar contaminación.
- 6) En los 25 ml recogidos determinar el contenido de nitritos (ver 11.1.2) usando una curva de calibración preparada especialmente según los pasos 2 a 5 de este

método. Paralelamente, determinar la concentración original de nitritos en otra réplica sin reducir.

- 6) Restar a la concentración de nitritos obtenida luego de la reducción, la concentración original de nitritos de la muestra.

#### *Reactivos*

- Gránulos de Cobre - Cadmio: Lavar 25 a 40 g de gránulos de Cd con HCl 6N y enjuagar con AD. Agitar el Cd en 100 ml de CuSO<sub>4</sub> 2% durante 5 min hasta que tome color azul acerado. Lavar dejando correr AD durante 10 min.
- Cloruro de amonio - EDTA: Disolver 13 g de NH<sub>4</sub>Cl y 1.7 g de tetracetato de etilendiamina disódico (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>.2H<sub>2</sub>O) en 900 ml de AD. Ajustar a pH 8.5 y llevar a 1 l.
- Cloruro de amonio - EDTA diluido: Llevar 300 ml NH<sub>4</sub>Cl-EDTA a 500 ml con AD.
- Sulfato de cobre 2%: Disolver 20 g de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O en AD y llevar a 1 l.
- Solución estándar: ver método del salicilato de sodio.

### MÉTODO DE REDUCCIÓN POR CADMIO MODIFICADO

Una modificación al método anterior consiste en sustituir el pasaje de la muestra a través de la columna de reducción por una agitación en recipientes plásticos conteniendo cadmio (Mackereth *et al.* 1989).

#### *Procedimiento*

- 1) En frasco de plástico con tapa hermética pesar 0.6 g de Cd amalgamado y agregar 10 ml de muestra.
- 2) Agregar 3 ml de solución de cloruro de amonio 2.6% y 1 ml de solución de Borax 2.1%.
- 3) Cerrar los frascos y agitar en agitador automático por 20 min.
- 4) Tomar 10 ml de muestra y determinar el contenido de nitritos agregando 0.2 ml de cada reactivo (ver 11.1.2). Usar una curva de calibración tratada de la misma forma que la muestra. Paralelamente, determinar la concentración original de nitritos en otra réplica sin reducir.
- 5) Restar a la concentración de nitritos obtenida luego de la reducción, la concentración original de nitritos de la muestra.

#### *Reactivos*

- Cadmio amalgamado: Lavar 25 a 40 g de gránulos de Cd con HCl 6N y agregar solución de cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) 1%. Lavar el Cd con una solución de NH<sub>4</sub>Cl diluida (ver método anterior). Guardar el Cd en solución de NH<sub>4</sub>Cl diluida en oscuridad.
- Cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl) 2.6%.
- Borax (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>) 2.1%.

### ELECTRODO SELECTIVO

Se han desarrollado electrodos selectivos para la determinación directa de este ion en muestras de agua. Las principales ventajas son la precisión y velocidad de medición, pero su costo es alto y requiere de una calibración extremadamente precisa. El rango del método es 0.14 a 1400 mg l<sup>-1</sup> y el principio puede consultarse en Potterton & Shults (1967). El procedimiento y la calibración de un electrodo de este tipo puede obtenerse en Shechter & Gruener (1976) y en Yu & Berthouex (1977).

### 11.1.2. NITRITO

Existen varios métodos, como el de la sulfanilamida, para la determinación de los nitritos en el agua basados en la reacción de Griess, en la cual el ácido nitroso es transformado en un compuesto fuertemente coloreado de rojo (Strickland & Parsons 1972). El rango del método es 0.14 a 35  $\mu\text{g l}^{-1}$ .

#### *Procedimiento*

- 1) A 25 ml de muestra filtrada agregar 0.5 ml de sulfanilamida y agitar.
- 2) Esperar de 2-10 minutos y agregar 0.5 ml de N-(1-naftil)-etilendiamina y agitar.
- 3) Luego de 10 min y antes de 2 h, medir la absorbancia a 543 nm en una celda de 1 cm.
- 4) Calcular la concentración de nitritos usando una curva de calibración.

#### *Reactivos*

- Sulfanilamida: Disolver 5 g de  $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$  en una mezcla de 50 ml de HCl concentrado y aproximadamente 300 ml de AD. Mezclar y diluir a 500 ml. La solución es estable por varios meses.
- N-(1-naftil)-etilendiamina: Disolver 0.5 g de  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}$  en AD libre de nitritos y llevar a 500 ml. Almacenar la solución en frío en botella oscura. Preparar cada vez que tome color pardo.
- Solución estándar: Disolver 1.232 g de  $\text{NaNO}_2$  previamente secado a 110 °C y llevar a 1 l con AD. La solución contiene 250  $\mu\text{g NO}_2\text{-N ml}^{-1}$ .

### 11.1.3. AMONIO

#### MÉTODO DE AZUL DE INDOFENOL

Consiste en tratar la muestra con hipoclorito de sodio en medio alcalino tamponado con citrato, usando nitroprusiato de sodio como catalizador (Koroleff 1970). El rango del método es 1.4 a 350  $\mu\text{g l}^{-1}$ .

#### *Procedimiento*

- 1) Colocar 10 ml de muestra filtrada por GF/C en un tubo de vidrio de 25 ml.
- 2) Agregar 0.6 ml de reactivo A y mezclar en vortex. Luego de 2 min agregar 0.6 ml de Reactivo B, mezclar y almacenar 1 hora en la oscuridad.
- 3) Medir la absorbancia de la muestra a 630 nm.
- 4) Calcular la concentración de amonio usando una curva de calibración.

#### *Reactivos*

- Reactivo A: Disolver 17.5 g de fenol ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$ ) y 200 mg de nitroprusiato de sodio ( $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}$ ) deshidratado en AD libre de amonio y enrasar a 500 ml.
- Reactivo B: Disolver 140 g de citrato de sodio ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_3\text{O}_7$ ) y 7.5 g de NaOH en 400 ml de AD. Agregar 17.5 ml de hipoclorito de sodio concentrado ( $\text{NaClO}$ ) y enrasar a 500 ml. Filtrar por GF/C.
- Solución estándar: Disolver 0.1070 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  secado a 100 °C en AD y llevar a 1 l. La solución contiene 28000  $\mu\text{g NH}_4\text{-N l}^{-1}$ .
- Agua libre de amonio: necesaria para la preparación de las diluciones de la curva de calibración, el blanco de reactivos y el lavado del material. La misma se puede obtener por medio de a) una columna de intercambio iónico o b) por destilación:

- a) Se hace pasar AD a través de una columna conteniendo una resina de intercambio catiónico ácida y una resina de intercambio aniónico básica. Las resinas deben ser capaces de retener compuestos orgánicos que interfieren con la determinación de este nutriente.
- b) Se requiere de un destilador con columna de condensación de borosilicato o de tubos de aluminio. Se adiciona 0.1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por cada litro de AD y se destila nuevamente. Alternativamente, puede tratarse AD con suficiente bromo o cloro disuelto como para producir una cantidad de halógeno disuelto de 2 a 5 mg l<sup>-1</sup>, destilando nuevamente luego de una hora. En ambas alternativas, se deben descartar los primeros 100 ml. El almacenamiento del agua libre de amonio es complejo, ya que la contaminación con amonio gaseoso es difícil de evitar. Se debe utilizar un recipiente de borosilicato y agregar 10 g de resina de intercambio iónico por litro de agua.

### NESSLERIZACIÓN

Este método es aplicable en aguas naturales, tratadas para potabilización y efluentes altamente purificados, con poco color y concentraciones de amonio de 0.02 a 5 mg l<sup>-1</sup>. La descripción del método puede encontrarse en APHA (1995).

### ELECTRODO SELECTIVO

Al igual que los electrodos selectivos de nitrato, los de amonio ofrecen las ventajas de rapidez y alta precisión. Sin embargo, su aplicación se dificulta debido a que el amonio se pierde rápidamente por absorción y volatilización, requiriéndose grandes volúmenes de muestra. El problema puede superarse usando pequeñas celdas de teflón que se ajustan al electrodo. El rango de aplicación de esta técnica es de 1 a 1000 mg l<sup>-1</sup> y la precisión 0.1 mg l<sup>-1</sup>. Detalles sobre la construcción y uso del electrodo pueden encontrarse en Beckett & Wilson (1974) y Shibata (1976).

#### 11.1.4. NITRÓGENO KJELDAHL

Esta técnica permite la determinación de nitrógeno orgánico y no es aplicable para determinar nitratos y nitritos. Consiste en la digestión fuerte de la muestra con ácido sulfúrico y sulfato de potasio, y sulfato de mercurio como catalizador, para transformar el nitrógeno contenido en compuestos orgánicos en sulfato de amonio. Esta reacción incluye también al nitrógeno amoniacal presente en la muestra original. Durante la digestión se forma un complejo mercurio-amonio, que es descompuesto por la adición de tiosulfato de sodio. El amonio es destilado en medio alcalino y absorbido en ácido bórico o sulfúrico, y su concentración se determina por colorimetría o titulación. Si no se remueve previamente el amonio de la muestra, el resultado se expresa como nitrógeno Kjeldhal. Si ambas formas son determinadas por separado, el nitrógeno orgánico se obtiene por diferencia.

#### *Procedimiento*

- 1) Colocar un volumen de muestra (ml) según su concentración de nitrógeno orgánico (mg l<sup>-1</sup>) en un matraz Kjeldhal de 800 ml:

Nitrógeno orgánico (mg l <sup>-1</sup> )	Volumen de muestra (ml)
0 - 1	500
1 - 10	250
10 - 20	100

20 - 50	50
50 - 100	25

- 2) Agregar 25 ml de buffer de borato y NaOH 6N hasta alcanzar pH 9.5, para remover el amonio. Colocar trozos de porcelana y calentar. Se puede destilar esta fracción y determinar la concentración de amonio presente y a partir del volumen restante establecer la concentración de nitrógeno orgánico.
- 3) Digestión: verter 10 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6.7 g de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 1.25 ml de HgSO<sub>4</sub> en el matraz. Mezclar, agregar cuentas de vidrio y calentar en campana de gases hasta que el volumen se reduzca de 25 a 50 ml y se formen vapores de color blanco. Continuar la digestión por 30 min.
- 4) Dejar enfriar y llevar a 300 ml con AD. Agregar cuidadosamente 50 ml de hidróxido de sodio-tiosulfato de sodio, hasta formar una fina capa alcalina en el fondo del matraz. Conectar el sistema de destilación y agitar el matraz; se forma un precipitado de HgS de color negro y el pH aumenta a más de 11.
- 5) Destilación: destilar y colectar 200 ml por debajo de la superficie de 50 ml de la solución absorbente. Si el método seleccionado para determinar amonio es nessler y titrimétrico, la solución absorbente será de ácido bórico. Si es fenato, nessler y electrodo selectivo, será H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.04 N. Colocar el extremo del condensador por debajo de la solución absorbente y controlar que la temperatura no pase de 29 °C. Bajar el matraz evitando que el tubo toque el destilado y continuar destilando 2 min más para limpiar el condensador.
- 6) Tomar una alícuota del destilado y analizar la concentración de amonio por un método estándar. Calcular la concentración mediante una curva realizada con diluciones tratadas por el procedimiento anterior. Expresar la concentración como nitrógeno Kjeldhal u orgánico si se resta el amonio de la muestra original.

#### *Reactivos*

- Las soluciones y reactivos deben prepararse con agua libre de amonio (ver 11.1.3).
- Sulfato de mercurio: 8 g de óxido de mercurio rojo (HgO) en 100 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>2</sub> 6 N.
- Tiosulfato de sodio-hidróxido de sodio: Disolver 500 g de NaOH y 25 g de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O en agua y llevar a 1 l.
- Hidróxido de sodio 6 N: Disolver 240 g de NaOH en agua y llevar a 1 l.
- Borato buffer: Agregar 88 ml de solución de NaOH 0.1N a 500 ml de solución de tetraborato de sodio 0.025M (9.5 g Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O en 1 l de AD) y llevar a 1 l.

#### 11.1.5. NITRÓGENO TOTAL Y TOTAL DISUELTO

Para determinar el nitrógeno total (NT) de una muestra de agua, los compuestos orgánicos deben ser hidrolizados y todas las formas transformadas en nitrato, como sucede en la oxidación con persulfato de potasio (Valderrama 1981). Estas reacciones requieren de altas temperaturas y medio ácido para asegurar una total oxidación. El procedimiento en muestras filtradas permite la determinación del nitrógeno disuelto (NTD), que es sustraído a los valores de NT en la muestra sin filtrar para determinar la fracción particulada (NTP). La fracción orgánica disuelta (NOD) puede calcularse restando la suma de nitritos, nitratos y amonio (NID) al NTD.

#### *Procedimiento*

- 1) Colocar 40 ml de muestra homogeneizada sin filtrar (determina NT) o filtrada (determina NTD) en botella autoclavable con tapa rosca, y agregar 8 ml de solución oxidante. Autoclavar durante 60 min a 1 atmósfera.
- 2) Analizar nitratos por alguno de los procedimientos descritos en 11.1.1. Para los cálculos de concentración, utilizar curvas de calibración realizadas con dilucio-

nes tratadas igual que las muestras.

#### *Reactivos*

- Solución oxidante: Disolver 50 g de  $K_2S_2O_8$  y 30 g de ácido bórico en 350 ml de NaOH 1M. Completar hasta 1 l con AD. Almacenar en frasco de vidrio oscuro a temperatura ambiente protegido de la luz directa, hasta 6 a 8 meses.
- Soluciones estándar: idem 11.1.1.

### 11.2. FÓSFORO

El fósforo ocurre en aguas naturales y de desecho principalmente en forma particulada inorgánica u orgánica. Una parte generalmente menor se encuentra en forma disuelta, orgánica (nucleótidos, polinucleótidos, sustancias húmicas, poli, meta y ultrafosfatos) o inorgánica ( $PO_4^{3-}$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $H_2PO_4^-$ ). La demanda de fósforo por bacterias y algas es muy alta, debido a que las formas asimilables corresponden principalmente a las inorgánicas disueltas. El fósforo constituye en muchos sistemas el nutriente limitante de la producción primaria, resultando determinante del estado trófico de los mismos. El aumento de este elemento en el medio acuático está relacionado a diversas actividades humanas, principalmente el uso de fertilizantes y detergentes. A diferencia del nitrógeno, la forma gaseosa del fósforo no es significativa, aunque existe una reserva importante en los sedimentos, cuya liberación contribuye a la eutrofización de los ecosistemas acuáticos.

#### 11.2.1. FÓSFORO REACTIVO SOLUBLE

El fósforo reactivo soluble (PRS) se define como la fracción de fósforo en la muestra filtrada que reacciona mediante el método de Azul de molibdeno. Corresponde aproximadamente al ortofosfato.

#### MÉTODO DE AZUL DE MOLIBDENO

El molibdato de amonio y el tartrato de antimonio y potasio reaccionan en medio ácido con el ortofosfato, formando ácido fosfomolibdico, que es reducido a Azul de molibdeno con ácido ascórbico (Murphey & Riley 1962). El rango del método es 10 a 300  $\mu g P l^{-1}$  y la precisión de 10  $\mu g P l^{-1}$ .

#### *Procedimiento*

- 1) Colocar 50 ml de muestra filtrada por GF/C en erlenmeyer de vidrio de 100 ml.
- 2) Agregar 5 ml de reactivo mixto y mezclar vigorosamente.
- 3) Después de 5 min y antes de 2 a 3 h medir la absorbancia de la muestra a 885 nm, corrigiendo por el valor del blanco de reactivos y de turbidez de la muestra.
- 4) Calcular la concentración de la muestra usando una curva de calibración.

#### *Reactivos*

- Molibdato de amonio: Disolver 15 g de  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$  en AD y llevar a 500 ml. Guardar en botella plástica oscura.
- Acido sulfúrico: Agregar 140 ml de  $H_2SO_4$  a 900 ml de AD.
- Acido ascórbico: Disolver 27 g de  $C_6H_8O_6$  en AD y llevar a 500 ml.
- Tartrato de antimonio y potasio: 0.34 g de  $K(SbO)C_4H_4$  en 250 ml de AD.
- Reactivo mixto (para 10 muestras): Mezclar 10 ml de molibdato de amonio  $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ , 25 ml de  $H_2SO_4$ , 10 ml de ácido ascórbico  $C_6H_8O_6$  y 5 ml de tartrato de antimonio y potasio  $(K(SbO)C_4H_4)$ . No almacenar más de 6 h.
- Solución estándar: Disolver 219.5 mg de  $KH_2PO_4$  anhidro en AD y llevar a 1 l. La solución contiene 50  $\mu g P-PO_4 ml^{-1}$ .

### 11.2.2. FÓSFORO TOTAL Y TOTAL DISUELTO

La digestión a alta temperatura y medio ácido asegura la hidrólisis total de todas las formas de fósforo, permitiendo cuantificar el fósforo total (PT) como fósforo reactivo soluble mediante la reacción con molibdato. El mismo procedimiento en muestras filtradas permite la determinación del fósforo total disuelto (PTD), que puede ser sustraído a la concentración de fósforo total para determinar la fracción total particulada no reactiva (PTP). La fracción disuelta no reactiva (PTDnR), puede establecerse sustrayendo la concentración de PRS al valor del PTD.

Para su determinación se describe una digestión fuerte en medio ácido. También puede usarse el método de Valderrama (1981) para oxidar conjuntamente las fracciones no reactivas de nitrógeno y fósforo, aunque la digestión total debe chequearse usando varias combinaciones de oxidante y volumen de muestra (ver 11.1.5) y comparando los resultados obtenidos mediante la digestión que se describe a continuación. El método consiste en una digestión con ácido sulfúrico y persulfato de potasio a alta temperatura, según una modificación de APHA (1995).

#### *Procedimiento*

- 1) Colocar 50 ml de muestra homogeneizada filtrada (determina PTD) o sin filtrar (determina PT) en botella autoclavable con tapa rosca, y agregar 1 gota de fenoltaleína. Si se desarrolla color rosado, adicionar ácido sulfúrico de a 1 gota, hasta que el color desaparezca. Agregar 1 ml de ácido sulfúrico y 0.5 g de persulfato de potasio o 0.4 g de persulfato de amonio.
- 2) Autoclavar por 30 minutos a 1 atmósfera. Dejar enfriar, agregar 1 gota de fenoltaleína y neutralizar con NaOH 1 N hasta lograr un color rosa pálido. Considerar los volúmenes agregados para corregir por dilución.
- 3) Determinar PSR como en 11.2.1.
- 4) Calcular la concentración a partir de una curva de calibración confeccionada con estándares tratados según los pasos anteriores, ya que el color desarrollado depende de la acidez. Expresar los resultados como PT o PTD.

#### *Reactivos*

- Fenoltaleína: Disolver 5 g de fenoltaleína ( $C_{20}H_{14}O_4$ ) en 500 ml de alcohol etílico o isopropílico y agregar 500 ml de AD. Adicionar gotas de NaOH 0.02 N hasta que aparezca una coloración rosada.
- Ácido sulfúrico: Agregar 300 ml de  $H_2SO_4$  conc. a 600 ml de AD, dejar enfriar y llevar a 1 l.
- Persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ) o de amonio ( $(NH_4)_2S_2O_8$ ) puro para análisis.
- Hidróxido de Sodio 1 N: Disolver 40 g de NaOH en 500 ml de AD, dejar enfriar y llevar a 1 litro.

### 11.2.3. FRACCIONAMIENTO DE FÓSFORO

La extracción secuencial de fósforo del material en suspensión o sedimentos de fondo, posibilita la identificación de diversas fracciones de este elemento, y permite evaluar la relevancia de los procesos de adsorción y liberación. Cada fracción representa una serie de compuestos ecológicamente similares pero con diferente estructura estequiométrica. Las fracciones se caracterizan por su solubilidad en diferentes solventes o su co-solubilidad con otros elementos, y por la correlación con propiedades del material suspendido y de los sedimentos.

El análisis debe llevarse a cabo en muestras frescas, inmediatamente a la colecta. En caso contrario deben ser mantenidas a 4 °C, y los posibles efectos de la conservación deben ser evaluados. El fraccionamiento incluye varios pasos en los que se somete la muestra a diversos solventes y se determina el fósforo total de la muestra mediante hidrólisis.

La relación entre la muestra y el solvente debe ser de 1:25 a 1:50 o más en caso de concentraciones muy altas. Se deben realizar algunas pruebas a fin de determinar que esta relación sea adecuada. Como control debe corroborarse que la suma de las fracciones analizadas y el residuo final, equivalen al fósforo total de la muestra, aceptándose hasta un 10% de error. Se detallan a continuación las principales fracciones y los solventes utilizados (Psenner *et al.* 1988).

- 1) Extracción con NH<sub>4</sub>Cl a pH neutro (PL): Esta fracción se denomina lábil, y constituye el P inmediatamente disponible. Incluye el liberado por aumento de la salinidad, el que puede variar con la dureza del agua. El NH<sub>4</sub>Cl disuelve pequeñas cantidades de hierro y aluminio unido al P, y afecta la solubilidad del calcio ligado al P, influyendo en las extracciones posteriores.
- 2) Extracción con Ditionita Buffer (P-BD): Se asume que el P-BD representa las formas sensibles a cambios del potencial de óxido reducción, corresponde principalmente al P adsorbido a las superficies de hidróxidos de hierro. La ditionita es oxidada por aireación del sobrenadante filtrado. En sedimentos ricos en carbonato se utiliza borato como *buffer* en lugar de bicarbonato.
- 3) Extracción con NaOH (P-NaOH): Representa el P adsorbido a óxidos metálicos (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) y otras superficies, intercambiables con OH y compuestos fosforados solubles en bases. La diferencia entre el PT y NaOH-P se asume que representa la mayor parte del P orgánico, así como P asociado a compuestos húmicos.
- 4) Extracción con HCl (P-HCl): P asociado a carbonatos, apatita o liberado por disolución de óxidos (no adsorbido). Puede contener trazas de P orgánico hidrolizado.
- 5) P residual: Diferencia entre PT analizado por hidrólisis (11.2.2) en otra muestra y la suma de las fracciones extraídas. Incluye el P orgánico y el refractario.

#### Procedimiento

- 1) En el caso de los sólidos suspendidos, filtrar un volumen conocido de muestra con un filtro (GF/C) prelavado con HCl 0.1 N y AD.
- 2) Macerar el filtro (o poner entre 0.5 y 1.0 g en caso de sedimento fresco), en 25 ml de cloruro de amonio 1 M a 25 °C. A las 2 h mezclar y centrifugar.
- 3) Filtrar el sobrenadante, y con el residuo repetir los pasos 2 y 3.
- 4) Repetir la operación a 25 °C y con 25 ml de cada solución como se indica debajo:

Solución extractora	Tiempo (h)	Sobrenadante	Determinar
NH <sub>4</sub> Cl 1 M	2	filtrar	PRS
NH <sub>4</sub> Cl 1 M	2	filtrar	PRS
NaHCO <sub>3</sub> 0.1 M		filtrar	
+	1	aerear	PRS
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 0.1 M		oxidar	PNR
NaHCO <sub>3</sub> 0.1 M		filtrar	
+	1	aerear	PRS
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 0.1 M		oxidar	PNR
NaOH 1 M	18	filtrar	
		neutralizar	PRS
		oxidar	PNR
NaOH 1 M	1	filtrar	
		neutralizar	PRS
		oxidar	PNR
HCl 0.5 M	18	filtrar	

HCl 0.5 M	1	neutralizar filtrar neutralizar	PRS  PRS
-----------	---	---------------------------------------	----------------

#### 11.2.4. FLUJO DE FÓSFORO EN LOS SEDIMENTOS

Frecuentemente, la reducción de los aportes externos de nutrientes no garantiza una rápida recuperación de los lagos, debido a la liberación de fósforo desde los sedimentos (Hosper & Meyer 1986). Estos pueden retener o liberar fósforo, dependiendo de sus características físicas y químicas, de la concentración de oxígeno disuelto en la columna de agua y del estado trófico del ambiente.

Existen diversos procedimientos para la determinar la capacidad de fijación-liberación de fósforo en los sedimentos (Pedrozo *et al.* 1986, Rijkeboer *et al.* 1991, Olila & Reddy 1993, Daenen-Louwerse *et al.* 1993). El método que se presenta está basado en las ecuaciones de Freundlich y Langmuir:

$$SP = a C^b + PL$$

$$SP = PSC C/k + C - PL$$

donde SP es la capacidad de fijación de fósforo ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ), C la concentración de fósforo remanente en solución en equilibrio ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ), a y b son constantes, PL es la cantidad de fósforo liberada por el sedimento al ser resuspendido en agua destilada ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ), k es una constante y PSC la capacidad de adsorción máxima del sedimento ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ).

##### Procedimiento

- 1) Incubar un peso conocido de sedimento fresco centrifugado con 50 a 100 ml de soluciones con 0, 20, 50, 100, 200, 500 y 1000  $\mu\text{g l}^{-1}$  de P como  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  durante 48 h. Debe conocerse previamente la relación entre peso seco y fresco, de modo de alcanzar una relación peso seco:volumen de solución de 1:30 a 1:50. En cada tubo agregar 2 a 3 gotas de cloroformo para evitar la acción biológica. Incubar con agitación suave en oscuridad y a temperatura constante.
- 2) Tomar alícuotas de cada tubo a 1, 5, 15, 30 y 60 min, y 2, 3, 4, 24 y 48 h.
- 3) El fósforo reactivo soluble (PRS) se analiza por el método del azul de molibdeno (ver 11.2.1) y el fósforo total (PT) por digestión ácida con persulfato de potasio (ver 11.2.2). Al final de la incubación el sedimento es centrifugado, resuspendido en agua destilada y nuevamente centrifugado, midiéndose la concentración de PT en el agua sobrenadante para la determinación de PL.

#### 11.3. SÍLICE

Se encuentra fundamentalmente como ácido silícico disuelto y sílice particulado, este último como parte de organismos, adsorbido a partículas inorgánicas o formando complejos orgánicos. La principal fuente de este nutriente es la degradación de minerales ricos en silicato de aluminio. El sílice está presente en las aguas naturales en concentraciones de 1 a 30  $\text{mg l}^{-1}$  (media mundial de ca. 13  $\text{mg SiO}_2 \text{l}^{-1}$ ). Es de gran importancia para las diatomeas, que lo utilizan en la formación de sus frústulos, siendo las principales reguladoras del sílice en los sistemas acuáticos.

##### 11.3.1. SÍLICE TOTAL

El método gravimétrico brinda la concentración de sílice total en muestras con más de 20 mg SiO<sub>2</sub> l<sup>-1</sup>. Consiste en descomponer los silicatos y el sílice disuelto con ácido clorhídrico para formar ácido silícico, el que precipita parcialmente deshidratado durante la evaporación. La ignición completa la deshidratación del precipitado, el que es volatilizado como tetrafluoruro de sílice. El sílice es determinado gravimétricamente. La precisión del método alcanza 0.2 mg SiO<sub>2</sub> (APHA 1995).

#### *Procedimiento*

- 1) A una muestra de volumen conocido (V) agregar 5 ml de HCl 50%.
- 2) Evaporar hasta sequedad en cápsula de porcelana a baño María. Durante la evaporación agregar 15 ml de HCl 50% en etapas. Secar en estufa a 110 °C.
- 3) Agregar 5 ml de HCl 50%, calentar y agregar 50 ml de AD caliente. Mientras está caliente filtrar con papel de filtro, lavar el residuo de la cápsula con HCl 2% caliente y luego con un volumen mínimo de AD. Recuperar todo el volumen del lavado y dejar a un lado el filtro con el residuo.
- 4) Evaporar el filtrado y los lavados en el mismo recipiente a 110 °C y repetir el paso 3. Usar un nuevo papel de filtro cuidando de extraer todo el residuo de la cápsula de porcelana.
- 5) Colocar los dos filtros con sus respectivos residuos en un crisol de platino con tapa, secar a 110 °C y quemar a 1200 °C hasta peso constante. Se debe prevenir el calentamiento excesivamente rápido, que puede llevar a la formación de carburo de sílice. Pesar el crisol con su contenido.
- 6) Humedecer minuciosamente el residuo ya pesado con AD, agregar 4 gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50% y 10 ml de HF conc.
- 7) Evaporar lentamente evitando el salpicado y quemar a 1200 °C hasta peso constante. Registrar el peso del crisol y su contenido.
- 8) Restar el peso del crisol y su contenido luego de la deshidratación con HF, al obtenido antes del tratamiento con HF. La diferencia (A) en mg es pérdida por volatilización, y representa al sílice (SiO<sub>2</sub>) en mg SiO<sub>2</sub> l<sup>-1</sup>:

$$\text{SiO}_2 = (1000A)/V$$

#### 11.3.2. SÍLICE REACTIVO

La mayoría de los métodos están basados en la formación de un complejo silicomolibdico amarillo. A diferencia de otros métodos, la reducción del compuesto amarillo inicialmente obtenido a otro intensamente coloreado de azul, brinda una mayor precisión a la vez que elimina el fosfomolibdato y arseniomolibdato, los que podrían causar interferencias (Mullin & Riley 1955). El rango del método es de 2.8 a 3920.0 µg l<sup>-1</sup> y la precisión 7 µg l<sup>-1</sup>.

#### *Procedimiento*

- 1) Tomar 10 ml de muestra sin filtrar y agregarle 4 ml de heptamolibdato de amonio. Mezclar y dejar reposar 10 min.
- 2) Agregar 6 ml de solución reductora y agitar.
- 3) Medir la absorbancia a 810 nm luego de 2 a 3 h.
- 4) Calcular la concentración de la muestra usando una curva de calibración.

#### *Reactivos*

- Molibdato de amonio: Disolver 4 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O en 300 ml de AD. Agregar 12 ml de HCl 12 N y llevar a 500 ml. Mantener en frasco de plástico en oscuridad.
- Metol-Sulfito: Disolver 3 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> en AD, agregar 5 g de sulfato de p-metilaminofenol (metol) (C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>NO·1/2H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y llevar a 250 ml. Filtrar con papel Whatman N° 1 y almacenar en botella de vidrio. Preparar una vez al mes.

- Acido oxálico: Disolver 50 g de  $(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en AD. Enrasar a 500 ml.
- Acido sulfúrico: Agregar 250 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado a 250 ml de AD, dejar enfriar a temperatura ambiente y llevar a 500 ml.
- Solución reductora: Mezclar 50 ml de metol-sulfito ( $\text{C}_7\text{H}_9\text{NO} \cdot 1/2\text{H}_2\text{SO}_4$ ) con 30 ml de ácido oxálico ( $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$ ). Agregar lentamente y agitando 30 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y llevar a 150 ml con AD. Preparar cada vez.
- Solución estándar: Disolver 0.960 g de fluosilicato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SiF}_6$ ) en AD y llevar a 1 l La solución contiene  $140.45 \mu\text{g Si ml}^{-1}$ . Almacenar en botella de polietileno. La solución es estable por tiempo indefinido.

#### 11.4. RESULTADOS

En la figura 11.2 se observa la precipitación en la cuenca del embalse de Salto Grande, el caudal aportado por el Río Uruguay y las concentraciones de nutrientes durante el periodo mayo 1992-abril 1993. El silice reactivo y el nitrógeno total presentaron una variación inversa respecto del fósforo total, coincidiendo con la precipitación en la cuenca local. Las fracciones de fósforo mostraron una fuerte asociación con el caudal del río, evidenciando su ingreso por el cauce principal. El Río Uruguay constituiría así la mayor fuente de fósforo al embalse, aportando material inorgánico durante eventos de alto flujo de agua. Por su parte, el silice reactivo y el nitrógeno total asociados a la precipitación, indicarían un aporte local de estos nutrientes al sistema (Conde *et al.* 1996).

Debido a la falta de datos estadísticos acerca de la producción y uso de detergentes en Uruguay, la carga de fósforo al Río de la Plata desde la ciudad de Montevideo (Tabla 11.2, pág. siguiente) se calculó considerando el promedio de la concentración de fósforo analizada en detergentes comerciales y un valor conservativo en el uso del mismo ( $11.5 \text{ kg hab}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ). La carga de origen humano fue estimada a partir de la asunción de  $1 \text{ g P hab}^{-1} \text{ día}^{-1}$ , considerando una población de  $1.05\%106$  habitantes. El impacto sobre la zona costera a la cual se vierte esta carga de fósforo se ve disminuido debido al gran caudal del Río de la Plata ( $23000 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ) frente a Montevideo.

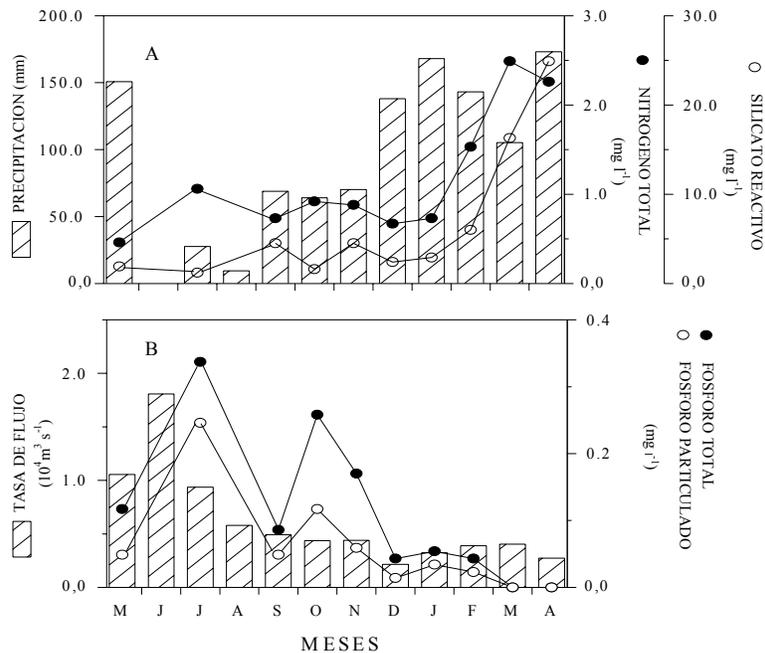


Figura 11.2. Variación de la concentración de nitrógeno total, fósforo total y particulado, y silicato reactivo en el Embalse Salto Grande, en relación a la precipitación en la cuenca cercana a la presa (A) y al caudal del Río Uruguay (B) (tomado de Conde *et al.* 1996).

Tabla 11.2. Estimación de cargas de fósforo total de origen humano y por detergentes desde la ciudad de Montevideo al Río de la Plata (Sommaruga *et al.* 1995).

Origen	Carga (kg P d <sup>-1</sup> )	%
Humano	1050	42
Detergentes	1455	58
Total	2505	100

En la tabla 11.3 se muestran las concentraciones de las formas inorgánicas de nitrógeno en el embalse del Cisne (Canelones). Los bajos valores de las tres formas de nitrógeno registradas en este sistema durante el periodo de estudio se deben fundamentalmente al elevado crecimiento de la biomasa vegetal, causando limitación por nitrógeno. Esto ha sido registrado en otros sistemas someros, y se refleja en relaciones molares N:PRS menores a 16:1.

Tabla 11.3. Concentración de las formas nitrogenadas inorgánicas en el Embalse del Cisne (tomado de Mazzeo *et al.* 1995).

Estación	µg l <sup>-1</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
Afluente	media	1.7	170.0	40.0
	mín.	0.0	40.0	0.0
	máx.	5.3	340.1	271.3
Reservorio	media	4.5	190.1	46.6
	mín.	0.0	0.0	0.0
	máx.	27.6	670.0	271.6
Efluente	media	2.5	180.0	39.2
	mín.	0.0	0.1	0.0
	máx.	8.1	410.1	258.2

# ECOLOGÍA MICROBIANA

Daniel Conde

TRADICIONALMENTE, EL ROL DE LAS BACTERIAS ACUÁTICAS SE RELACIONÓ con la descomposición de la materia orgánica, los ciclos biogeoquímicos y la producción primaria. Nuevas técnicas han permitido establecer que además, asimilan y reintroducen a las redes tróficas la materia orgánica disuelta liberada por el plancton, y sirven como alimento a los predadores de menor tamaño como micro y nanoflagelados heterotróficos y ciliados. Este concepto de anillo o *loop* microbiano explica el traspaso de la materia orgánica disuelta a la cadena trófica clásica (Pomeroy 1974).

A pesar de los avances en el estudio de los microorganismos acuáticos en las últimas tres décadas, la limitación principal continúa siendo de índole metodológico. Las técnicas tradicionales no permiten evaluar adecuadamente la actividad de los microorganismos en el ambiente. Virus, bacterias y protozoarios viven en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes. En especial, las poblaciones bacterianas pueden estar inactivas o sus metabolismos ser extremadamente bajos.

La microscopía de epifluorescencia, la incorporación de timidina o leucina y las técnicas de biología molecular (PCR, inmunofluorescencia, identificación de oligonucleótidos, hibridación de ADN, etc.), han permitido obtener una visión más correcta de los factores que controlan las poblaciones bacterianas en el medio acuático, tales como la disponibilidad de sustratos, la predación por flagelados y ciliados, y la infestación por virus (Hobbie 1993).

### 12.1. VIRUS

Recientemente se ha establecido que los virus patógenos en el medio acuático, que pueden alcanzar abundancias de hasta  $10^4$  ml<sup>-1</sup>, ejercerían un control importante sobre las comunidad bacteriana y fitoplanctónica, por lo que la estimación de su abundancia podría explicar en muchos casos la dinámica estacional de estas poblaciones.

Es posible cuantificar mediante microscopía de epifluorescencia (Suttle 1993) partículas virales de DNA de doble cadena positivos al fluorocromo DAPI, pre-

concentrados sobre un filtro policarbonado. Las partículas pueden ser centrifugadas hasta una concentración de  $10^{10}$  ml<sup>-1</sup>. Otros métodos de enumeración (cultivo en placa, número más probable y microscopía electrónica de transmisión) son también revisados por Suttle (1993).

#### *Procedimiento*

- 1) Filtrar una muestra de agua fresca por un filtro de policarbonato de 0.2  $\mu$ m. Agregar 50  $\mu$ l de solución stock de DNasa a 2 ml de la muestra filtrada e incubar 30 min a temperatura ambiente. Fijar la muestra con glutaraldehído o formalina 1%.
- 2) Agregar 0.2 ml de solución stock de DAPI (1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de concentración final) e incubar 30 min. Filtrar (200 mm Hg) la muestra por un filtro de policarbonato de 0.03  $\mu$ m y 25 mm de diámetro teñido de Negro Irgalán, o un filtro tipo Anodisc sin teñir de 0.02  $\mu$ m. El filtro debe ser colocado sobre otro filtro húmedo de 0.45  $\mu$ m de nitrocelulosa. Evitar que el filtro se seque demasiado y no lavarlo con AD.
- 3) Colocar sobre un portaobjetos el filtro con una pequeña gota de aceite de inmersión. Colocar 3 pequeñas gotas de aceite en un cubreobjetos y colocarlo sobre el filtro con el aceite hacia abajo. A 1000 aumentos contar de 20 a 100 partículas marcadas con DAPI en 20 campos diferentes. Calcular la densidad de virus (V) en orgánismos ml<sup>-1</sup>, según:

$$V = P_f(A_s/A_f)(1/V_s)[(V_s + V_e + V_g + V_d)/V_s]$$

donde  $P_f$  es el promedio de partículas marcadas con DAPI por campo,  $A_s$  el área de filtrado ( $\mu$ m<sup>2</sup>),  $A_f$  el área de campo visual ( $\mu$ m<sup>2</sup>),  $V_s$  el volumen de muestra (ml),  $V_e$  el volumen de DNasa agregado ( $\mu$ l),  $V_g$  el volumen de glutaraldehído o formalina agregado ( $\mu$ l) y  $V_d$  el volumen de DAPI agregado ( $\mu$ l)

#### *Reactivos*

- ADLP: AD fresca filtrada por 0.2  $\mu$ m con glutaraldehído 2.5%, mantenida en oscuridad a 4 °C.
- DAPI (Sigma®): disolver 50  $\mu$ g de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en 50 ml de buffer de pH 4.4.
- Buffer pH 4.4: Disolver 3.561 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O en 100 ml de ADLP (solución A) y 2.101 g de ácido cítrico hidratado en 100 ml de ADLP (Solución B). Combinar 8.82 ml de la solución A con 11.18 ml de la solución B). Conservar en oscuridad a 4 °C.
- DNasa (DNasa 1 Sigma® D4527): disolver 10000 unidades Kunitz en 1.0 ml de NaCl 0.15 M frío (ca. 1 °C). Pipetear alícuotas de 50  $\mu$ l en tubos de microcentrifugación de 500  $\mu$ l y congelar a -80 °C. Se conservan por varios meses, pero su actividad debe ser controlada periódicamente.

## 12.2. BACTERIAS PLANCTÓNICAS

Las bacterias planctónicas muestran abundancias relativamente constantes a lo largo de un ciclo anual (ca.  $10^6$  ml<sup>-1</sup>). Representan junto con el fitoplancton la mayor biomasa de la columna de agua y pueden registrar tasas de producción mayores que las de esta comunidad algal.

### 12.2.1. IDENTIFICACIÓN

Una fracción importante de bacterias ha sido tradicionalmente clasificada en base a su sensibilidad a reacciones bioquímicas específicas de interés clínico. Ac-

tualmente se considera que para la caracterización de la diversidad bacteriana se deben incluir aspectos fenotípicos, genéticos e información acerca del hábitat y la comunidad, lo que permite distinguir nuevas categorías de microorganismos. En la dirección web <http://www.gbf-braunschweig.de/DSMZ/bactnom/bactname.htm> puede obtenerse una lista permanentemente actualizada de las especies bacterianas identificadas.

Recientemente se han desarrollado complejas técnicas para la identificación taxonómica individual de células bacterianas. Las más aceptadas son la observación de secuencias de ARN ribosómico mediante detectores específicos de oligonucleótidos (DeLong 1993), la identificación de anticuerpos mediante inmunofluorescencia (Campbell 1993) y el registro de secuencias genéticas mediante PCR (Atlas 1993).

### 12.2.2. CUANTIFICACIÓN

Mediante microscopía de epifluorescencia se observó que la abundancia bacterianas en el medio acuático es 2 a 3 órdenes de magnitud mayor que la obtenida con las técnicas de cultivo tradicional en placa o usando microscopía óptica de contraste de fase. La abundancia planctónica varía usualmente de 0.2 a  $3.0 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  independientemente del estado trófico y no presenta variaciones estacionales importantes, a diferencia de lo que sucede con el fitoplancton.

#### ABUNDANCIA TOTAL DE BACTERIAS

La técnica más utilizada, descrita por Porter & Feig (1980), consiste en teñir el ADN bacteriano de doble cadena con un fluorocromo específico (DAPI), complejo que excitado con luz de 365 nm fluoresce azul brillante, indicando la presencia de células vivas, aunque no necesariamente activas.

##### *Procedimiento*

- 1) Fijar un volumen de muestra con glutaraldehído (concentración final 2.5%), antes de las 3 h del muestreo.
- 2) Antes de las 12 h de fijada la muestra filtrar 1 a 5 ml (para obtener 20 a 50 bacterias por campo) por un filtro de policarbonato negro tipo Poretics® de 25 mm de diámetro y 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (o Nucleopore® teñido durante 2 h con Negro Irgalán). Filtrar a menos de 80 mm de Hg de presión hasta que resten 2 ml sin filtrar. Si el volumen de muestra era menor, agregar AD hasta 2 ml. Agregar DAPI para obtener una concentración final de 0.2% y esperar 5 min. Filtrar el resto de la muestra manteniendo el filtro levemente húmedo.
- 3) Colocar el filtro sobre un portaobjetos y agregar una pequeña gota de aceite de inmersión (Cargile® B). Colocar un cubreobjetos sobre el filtro y presionar levemente hasta que el aceite selle los bordes. Se puede congelar el preparado por varios días.
- 4) Contar al menos 600 bacterias teñidas con DAPI presentes en al menos 20 campos a 1250 aumentos, en un microscopio de epifluorescencia con fuente de Hg y un set de filtros tipo BP 365, FT 395 y LP 397. Calcular la densidad total de bacterias (DTB) en células  $\text{ml}^{-1}$ , según:

$$\text{DTB} = C \text{ AF F/V}$$

donde C es el promedio de células por campo, AF el cociente entre el área de filtrado y el área del campo, F el cociente entre el volumen de glutaraldehído y el volumen de muestra más 1 ml y V el volumen de muestra filtrada (ml).

#### *Reactivos*

- DAPI (Sigma®): 4',6-diamidino-2-fenilindol: ver 12.1.
- Negro Irgalán BGL (Ciba Geigy®): 2 g de Negro Irgalán en una mezcla de 955 ml de AD, 20 ml de ácido acético y 25 ml de glutaraldehído.

#### ABUNDANCIA DE BACTERIAS ACTIVAS

Solo una parte de la flora bacteriana acuática se encuentra activa en un cierto momento (Stevenson 1978). Se consideran bacterias con actividad respiratoria aquellas capaces de reducir el INT incoloro y depositarlo intracelularmente como formazán rojizo, lo que permite cuantificarlas por microscopía de epifluorescencia bajo luz visible (Zimmermann *et al.* 1978).

#### *Procedimiento*

- 1) Antes de 3 horas de transcurrida la colecta, incubar 10 ml de muestra con INT (cloruro de 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-feniltetrazolium; concentración final 0.02% peso/volumen) durante 45 min en la oscuridad y a la temperatura de muestreo. Incubar un control fijado con formalina (concentración final 2%).
- 2) Finalizar la incubación con formalina (concentración final 2% v/v) y filtrar ambas muestras por filtros Millipore® de 0.2 µm. Colocar el filtro en un portaobjeto y agregar una gota de glicerina.
- 3) En microscopio de epifluorescencia bajo luz visible, contar en al menos 20 campos a 1250 aumentos, 400 a 600 bacterias conteniendo gránulos intracelulares de formazán. Calcular la densidad total de bacterias activas en forma similar al número total de bacterias. Expresar la densidad de bacterias activas como porcentaje de la densidad total de bacterias.

Es posible combinar las técnicas de conteo de bacterias totales y bacterias activas en un solo procedimiento, incubando primero con INT y posteriormente con DAPI, luego de la fijación con formalina. Los conteos de células totales o activas pueden realizarse en un mismo campo de filtro, cambiando alternativamente la fuente de luz de ultravioleta a visible.

#### 12.2.3. BIOVOLUMEN

La mayoría de los métodos para estimar la biomasa bacteriana utilizan parámetros relativamente sencillos y correlacionados con ésta (abundancia total, lipopolisacáridos, ácido murámico, bacterioclorofila, etc.). Aunque la determinación del volumen celular es un procedimiento más directo, aún no se ha desarrollado un método estándar para la determinación del volumen celular (microscopía de epifluorescencia o electrónica, análisis digital o citometría de flujo). Las técnicas de microscopía no distinguen entre células vivas y muertas y requieren de equipos costosos, pero son específicas para bacterias y están basados en relaciones simples entre volumen y biomasa. Problemas concretos en la determinación del volumen celular, como una baja densidad de bacterias, la presencia de partículas detriticas o la precipitación de sales, pueden ser superados mediante la concentración de la muestra, el prefiltrado por membranas de 1 µm, o el lavado con ADLP, respectivamente. Va-

rios modelos de conversión (relación constante, biomasa constante y alométrico) son revisados por Norlan (1993). El contenido de carbono celular se calcula mediante el uso de un factor de conversión obtenido para la serie de muestras específica, o tomado de la literatura, cuyo valor promedio varía de 200 a 350 fg C  $\mu\text{m}^{-3}$ .

## MICROSCOPIA

Bratbak (1993) realiza una síntesis de las técnicas de microscopía más utilizadas. En el caso de la microscopía de epifluorescencia, las mismas preparaciones con DAPI que se usan para la determinación de la abundancia pueden ser utilizadas para medir los largos y anchos celulares. Esto puede realizarse mediante el uso de una gradilla ocular, tomando microfotografías o por medio de un equipo de análisis de imagen. La gradilla New Porton G12 (Graticules Ltd<sup>®</sup>) tiene una serie de círculos con los que se comparan las células bacterianas, previa calibración con esferas de látex de 0.25, 0.5 y 1.0  $\mu\text{m}$  de diámetro (Polysciences<sup>®</sup>) y filtros grises para reducir el brillo. En el uso de microfotografías el punto más crítico es la iluminación de la muestra, de forma de reducir el halo de células y esferas de latex. La proyección de las tomas permite magnificar la imagen hasta 20000 veces y facilita la decisión acerca del tamaño exacto de la célula y la forma de excluir el halo externo.

El tamaño de las bacterias se encuentra cerca del límite de resolución de la microscopía óptica, por lo que es más recomendable la microscopía electrónica. La microscopía electrónica de transmisión ofrece la misma resolución que la de barrido, pero la preparación es más simple y no requiere preparar las muestras con coberturas metálicas. En Bratbak (1993) se detallan los diversos pasos de ambas técnicas.

De 50 a 200 mediciones por muestra, dependiendo de la variación del tamaño encontrado, deben ser realizadas para obtener resultados correctos de biovolumen bacteriano (V), el que se obtiene en  $\mu\text{m}^3$ , según:

$$V = (\pi/4)W^2(L - W/3)$$

donde L y W son el largo y ancho celular. Esta fórmula asume que las células son bacilos, pero también es correcta para formas tipo coco.

### ANÁLISIS DE IMAGEN

Las técnicas digitales para determinar el tamaño y la forma de las bacterias son ampliamente usadas en combinación con la microscopía de epifluorescencia. Los procedimientos consisten en la obtención de una imagen mediante un microscopio, el mejoramiento digital y la medición propiamente dicha. El equipo más básico consiste en un microscopio de epifluorescencia, una cámara de video para transmitir la imagen al procesador, un digitalizador para convertir la imagen análoga, una computadora y un programa digital para almacenar y procesar la información digital, y dos monitores para observar la imagen y la operación con los datos. Verity & Sieracki (1993) reportan los principios de la técnica y los equipos más comunes, mientras Psenner (1993) describe los diferentes pasos a seguir.

#### 12.2.4. ACTIVIDAD HETEROTRÓFICA TOTAL

La hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA) es una medida de la actividad metabólica heterotrófica total en una muestra de agua (Obst 1985). Esta sustancia,

insoluble en agua, puede ser hidrolizada enzimáticamente por esterazas extracelulares, proteasas y lipasas, así como por bacterias, hongos protozoarios y algunas cianofíceas.

#### *Procedimiento*

- 1) Antes de las 3 horas de colectada, colocar 5 a 10 ml de muestra en tubo de vidrio con tapa rosca y agregar 40 a 60  $\mu\text{l}$  de solución stock de 20 mg de diacetato de fluoresceína ( $\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{O}_7$ ) en 10 ml de acetona.
- 2) Incubar de 30 min a 5 h en oscuridad y a la temperatura de colecta, hasta obtener un color amarillo fluorescente medible en espectrofotómetro.
- 3) Filtrar por un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro y medir la absorbancia a 490 nm contra un blanco de AD. Para el cálculo de la hidrólisis preparar un curva de calibración con FDA hidrolizado químicamente. Calcular la hidrólisis de FDA ( $\text{FDA}_H$ ) en  $\% \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  según:

$$\text{FDA}_H = (1000 A F 100) / (S t V)$$

donde A es la absorbancia de la muestra a 490 nm, F los coeficientes de la curva de calibración ( $\text{mol FDA l}^{-1}$ ), S la concentración del FDA ( $\text{mol l}^{-1}$ ), t el tiempo de incubación (h), 100 el factor para expresar el resultado en porcentaje y V el volumen de incubación (ml).

#### *Curva de calibración*

Agregar 60  $\mu\text{l}$  de solución stock de FDA a 7.5 ml de agua destilada y 2 gotas de NaOH 6M. A partir de esta solución de 38  $\mu\text{mol l}^{-1}$  hacer sucesivas diluciones para obtener concentraciones de 19, 9.5, 4.25 y 2.12  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Medir la absorbancia a 490 nm y construir una curva de calibración.

### 12.2.5. PRODUCCIÓN BACTERIANA

La incorporación de Timidina y Leucina durante la síntesis de ADN y de proteínas, respectivamente, son los métodos más comunes para estimar la producción bacteriana en el medio acuático. El principal problema radica en relacionar en forma precisa las tasas de incorporación de ambos marcadores con las tasas reales de producción bacteriana, lo que depende del conocimiento exacto de varios componentes celulares (concentración de ADN y proteína por célula, relación Timidina/ADN y dilución intracelular del marcador). Se describirá aquí la técnica de incorporación de  $^{14}\text{C}$ [Leucina], detallada en Sommaruga (1993). La metodología para el uso de Timidina puede ser consultada en Bell (1993).

#### *Procedimiento*

- 1) De una muestra fresca (colectada en botella de vidrio lavada con HCl y ADLP) tomar 3 réplicas de 10 ml y colocarlas en viales de polietileno. Agregar  $^{14}\text{C}$ [Leucina] (Amersham<sup>®</sup>) de 310 mCi  $\text{mmol}^{-1}$  de actividad específica (concentración final 20 nM).
- 2) Incubar los viales a la misma temperatura de colecta en la oscuridad durante una hora. Detener la incubación con 0.5 ml de formalina 40%. Estimar la absorción abiótica en otras 2 réplicas fijadas antes de la adición de Leucina con formalina (concentración final 2%).
- 3) Filtrar las muestras por filtros de nitrato de celulosa de 0.2  $\mu\text{m}$  (Sartorius<sup>®</sup>) y extraer las proteínas agregando ácido tricloroacético frío ( $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$ ; concentración final 5%).

- 4) Lavar los filtros 3 veces con etanol frío 80%. Realizar otro lavado con ácido tricloroacético, secar el filtro y colocarlo en un vial de centelleo con 10 ml de cocktail de centelleo (Filter Count PACKARD®) o 1 ml de etilacetato (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) y 10 ml de Scintiverse-E (Beckman®). Medir la actividad en un contador de centelleo líquido.
- 5) Calcular la Leucina incorporada (Leu) en mmol l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> según:

$$\text{Leu} = (U/S) \left[ \frac{4.5 \times 10^{-13}}{t} \right] (1/v)$$

donde U son las desintegraciones por minuto (dpm) medidos en el filtro menos las desintegraciones por minuto del control,  $4.5 \times 10^{-13}$  es el número de Ci por dpm, S la actividad específica (Ci mmol<sup>-1</sup>), t el tiempo de incubación (h) y v el volumen de muestra incubada (l).

- 6) Calcular la producción bacteriana de proteína (PBP) en g proteína l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> según:

$$\text{PBP} = \text{Leu}(0.073 \times 131.2 \times 2)$$

donde 0.073 es la fracción de Leucina en las proteínas, 131.2 el peso molecular de la Leucina y 2 la dilución intracelular del isótopo.

- 7) Calcular la producción bacteriana de carbono (PBC) multiplicando la producción bacteriana de proteína (PBP) por 0.86 (relación carbono celular:proteínas).
- 8) Para calcular la producción celular bacteriana (PB) en células l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, se divide la producción bacteriana de carbono (PBC) por un factor de conversión empírico (C) del contenido de carbono (pg célula<sup>-1</sup>), tomado de la literatura (Norlan 1993):

$$C = 0.12 \times V^{0.72}$$

donde V es el volumen celular (μm<sup>3</sup>).

- 9) El tiempo de renovación bacteriano (TRB) se calcula como la relación entre la abundancia y la producción bacteriana.

### 12.3. BACTERIAS DEL SEDIMENTO

Los sustratos a los cuales las bacterias pueden adherirse incluyen partículas fecales y detriticas en la columna de agua, plantas acuáticas, así como la matriz del sedimento, donde alcanzan abundancias varios órdenes de magnitud mayor que en el plancton (Jones 1980). Para la identificación taxonómica de bacterias sedimentarias, así como la determinación de su biovolumen y biomasa se pueden aplicar los mismos métodos descritos para bacterias planctónicas.

#### 12.3.1. CUANTIFICACIÓN

La determinación directa del número total de bacterias en el sedimento se realiza en base a modificaciones de la técnica para bacterias planctónicas.

##### *Procedimiento*

- 1) Pesar 2 réplicas de ca. 1 g de sedimento fresco (resolución 0.0001 g) y colocarlas en vasos Erlenmeyer de 50 ml. Agregar 2 ml de formol 40% y 47 ml de solución buffer de pirofosfato tetrasódico (Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>; concentración de 2.6606 g l<sup>-1</sup>). Para todas las diluciones utilizar ADLP. Homogeneizar en sonificador por 30 s a 35 kHz.

- 2) Inmediatamente colocar 0.5 ml de la suspensión en tubo de ensayo de 15 ml y agregar 8.5 ml de ADLP. Agitar manualmente y agregar 1 ml de solución DAPI (10 mg l<sup>-1</sup>). Incubar en la oscuridad a 4 °C durante 20 min.
- 3) Agitar nuevamente, extraer 1 ml de la suspensión y filtrar a baja presión para evitar la destrucción de las células, en filtro de membrana de 0.22 µm y 25 mm de diámetro tipo Poretics<sup>®</sup> de fondo negro. Lavar el filtro con 2 ml de ADLP y colocarlo en un portaobjetos húmedo. Cubrir con una gota de aceite de inmersión no fluorescente (Cargill<sup>®</sup> tipo A). Colocar un cubreobjetos evitando la formación de burbujas y por encima otra gota de aceite.
- 4) Enumerar inmediatamente a 1250 aumentos en un microscopio de epifluorescencia tipo Zeiss<sup>®</sup> Axioplan, equipado con objetivo Plan-Neofluar<sup>®</sup> 100/1.30 y una combinación de filtros 48 79 01/02 (excitador 365 nm, separador de haces 395 nm y filtro barrera 420 nm). Contar en campos al azar hasta completar 400 bacterias por muestra. Registrar el número de bacterias filamentosas.
- 5) Calcular la densidad de bacterias (DTB) por gramo de sedimento fresco según:

$$DTB_f = ABD/Na v/Pf$$

donde A es el área de filtración (227 mm<sup>2</sup>), N el número de campos contados por muestra, a el área del campo (0.01 mm<sup>2</sup>), B el número total de bacterias contadas, D el volumen total de dilución (1000 ml), v el volumen filtrado y Pf el peso del sedimento fresco. Convertir el resultado en DTB por gramo de peso seco (DTB<sub>s</sub>) dividiendo DTP<sub>f</sub> por la fracción de peso seco del sedimento, determinado en otra submuestra. Calcular el porcentaje de células filamentosas de acuerdo a los conteos realizados y a la densidad total de bacterias.

### 12.3.2. ACTIVIDAD HETEROTRÓFICA TOTAL

Se determina mediante una modificación del procedimiento para agua (12.2.4) en base al método de Obst (1985), sonicando 1 g de sedimento fresco en 9 ml de buffer fosfato 0.06 M (8.23 g de dihidrógeno fosfato de sodio y 16.08 g de dihidrógeno fosfato disódico por 1000 ml de AD, ajustado a pH 7.6) durante 30 s a 35 kHz. Se extrae 1 ml de la suspensión homogeneizada, se agrega 9 ml de buffer fosfato y 40 a 60 µl de FDA (20 mg de diacetato de fluoresceína en 10 ml de acetona). Se incuba a temperatura de colecta durante 1 h en oscuridad y con agitación constante. El resto del procedimiento es similar al descrito para muestras de agua. Para los cálculos de la hidrólisis se debe tener en cuenta la dilución del sedimento en el buffer. El resultado final debe ser expresado como hidrólisis de FDA en % g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

### 12.3.3. PRODUCCIÓN

El método más utilizado para la determinación de la producción bacteriana en sedimentos es la incorporación de timidina al ADN, cuyo principio es el mismo que para bacterias planctónicas. Las principales dificultades del método son la incertidumbre en la extracción del ADN de la matriz del sedimento, la dilución potencial del radioisótopo en la misma y la perturbación del sedimento original. El procedimiento es descrito en detalle por Findlay (1993).

### 12.4. PROTISTAS Y OTRAS DETERMINACIONES

Se presentan en esta sección referencias bibliográficas de otros métodos de importancia a nivel microbiano en agua y sedimentos: enumeración de coliformes totales y fecales (APHA 1995), picoplancton autotrófico (MacIsaac & Stockner 1993,

Booth 1993), protistas heterotróficos (Sherr & Sherr 1993), ciliados bénticos (Carey 1993); abundancia y biomasa de flagelados aplastídicos y ciliados planctónicos (Sommaruga 1993), predación bacteriana por protistas planctónicos (Sherr *et al.* 1993a) y ciliados bénticos (Kemp 1988). Otras estimaciones relevantes son la tasa de crecimiento de nanoplancton heterotrófico (McManus 1993) y de reciclaje microbiano de fósforo (Ammerman 1993). Para la preparación de bacterias fluorescentes necesarias en los experimentos de predación bacteriana puede consultarse el procedimiento de Sherr *et al.* (1993b). Por información relacionada con aspectos estadísticos del conteo de microorganismos puede recurrirse a Kirchman (1993).

## 12.5. RESULTADOS

La tabla 12.1 resume las características de la comunidad microbiana de la zona eufótica del Lago Rodó en Montevideo (Sommaruga & Conde 1997). La alta temperatura del agua y la alta concentración de nutrientes y biomasa algal del sistema, explican la alta proporción de bacterias activas en ciertas épocas del año. La temperatura explicó 81% de la variación temporal de la abundancia de las bacterias activas, pero solo 55% de la abundancia total. La máxima proporción de bacterias activas (marzo) coincidió una descenso brusco de la abundancia de flagelados heterotróficos (29500 a 7900 células ml<sup>-1</sup>), lo que sugiere que éstos pueden ser un factor importante para el control de la fracción activa de bacterias planctónicas.

Tabla 12.1. *Características de la comunidad microbiana de la zona eufótica del Lago Rodó. Los valores representan promedio y rango para el periodo febrero a octubre de 1991 (n=36) (Tomado de Sommaruga & Conde 1997).*

Parámetro	Promedio	Mínimo	Máximo
Clorofila <i>a</i> (µg l <sup>-1</sup> )	223	99	353
Temperatura (°C)	18.9	8.2	28.0
Abundancia total de bacterias (10 <sup>6</sup> cél ml <sup>-1</sup> )	6.96	1.51	20.4
Bacterias activas (10 <sup>6</sup> cél ml <sup>-1</sup> )	2.95	0.43	6.04
Porcentaje de bacterias activas (%)	46.8	16.5	100
Actividad bacteriana (nmol Leu l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	7.91	0.97	14.5
Actividad específica bacteriana (fmol Leu l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	0.0028	0.0009	0.0054
Actividad específica bacteriana (fmol Leu l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	0.0013	0.0007	0.0034
Nanoflagelados heterotróficos - HNAN (10 <sup>3</sup> cél ml <sup>-1</sup> )	11.9	1.1	29.5
Tasa de bacterivoria por HNAN (10 <sup>3</sup> cél ml <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	776	82	2145

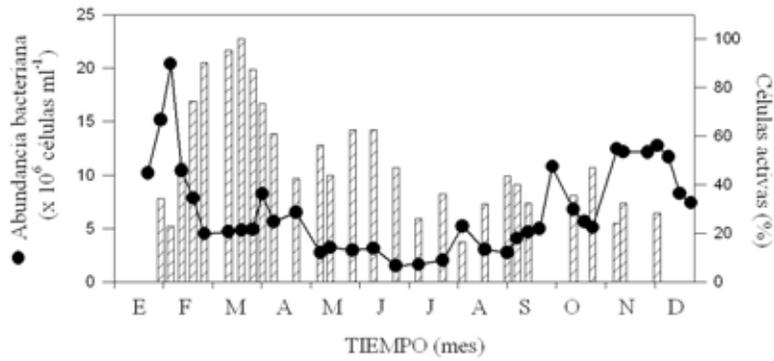
a. calculado usando la abundancia de bacterias activas

b. calculado usando la abundancia total de bacterias

En la figura 12.1 (pág. siguiente) se presenta la variación anual de la abundancia total de bacterias y la proporción de bacterias activas (reductoras del INT) en la zona eufótica del Lago Rodó (Sommaruga & Conde 1997). La abundancia total presentó los valores máximos en verano (20.4%10<sup>6</sup> ml<sup>-1</sup>) y los mínimos en invierno (1.51%10<sup>6</sup> ml<sup>-1</sup>). La proporción de bacterias activas varió entre 16.5 y 100% (media anual 46.8%), presentando el máximo registro al inicio del otoño (6.04%10<sup>6</sup> ml<sup>-1</sup>), coincidiendo con temperaturas altas (22 °C). La abundancia total y de células activas se correlacionó positivamente ( $r = 0.736$ ,  $p < 0.001$ ).

La baja correlación entre la abundancia de bacterias activas y la concentración de clorofila *a* en el Lago Rodó, indica que en sistema hipertróficos existen otras

fuentes de carbono orgánico disuelto aparte del originado en el fitoplancton. Comparado con datos de otros ambientes, estos resultados indican que aunque en el Lago Rodó la proporción media de bacterias activas es alta, su abundancia absoluta es menor que en ambientes menos eutróficos.



*Figura 12.1.* Variación anual de la abundancia total de bacterias y de la proporción de bacterias activas (reductoras del INT) en la zona eufótica del Lago Rodó (Montevideo) (Sommaruga & Conde 1997).

# FITOPLANCTON

Lizet De León, Sylvia Bonilla & Luis Aubriot



EL PLANCTON, TÉRMINO QUE SIGNIFICA ERRANTE, ES LA COMUNIDAD DE ORGANISMOS suspendidos en la columna de agua, con reducido o nulo poder de locomoción. Sus componentes son las bacterias (bacterioplancton), algas (fitoplancton) e invertebrados (zooplancton). Los hongos y los virus (femtoplancton) se incluyen comúnmente en el bacterioplancton. También se distinguen organismos euplanctónicos o presentes permanentemente en el plancton, meroplanctónicos o presentes durante parte del ciclo de vida, y pseudoplanctónicos o de presencia accidental.

Resulta práctico diferenciar por su tamaño el macroplancton ( $> 200 \mu\text{m}$ ), microplancton ( $200\text{-}20 \mu\text{m}$ ), nanoplancton ( $20\text{-}2.0 \mu\text{m}$ ), picoplancton ( $2.0\text{-}0.2 \mu\text{m}$ ) y femtoplancton ( $< 0.2 \mu\text{m}$ ). El fitoplancton constituye la comunidad de la columna de agua que utiliza la radiación solar como fuente de energía para la síntesis de materia orgánica, en el proceso denominado fotosíntesis. Las características ópticas, la disponibilidad de nutrientes y la temperatura, que actúa directamente sobre los organismos e indirectamente en la viscosidad del agua, son parámetros relevantes para esta comunidad (Wetzel 1983, Margalef 1983, Reynolds 1984, González 1988).

### 13.1. COMPOSICIÓN

*Lizet De León*

Se presentan en esta sección los aspectos más relevantes de los grupos taxonómicos que componen el fitoplancton, haciendo énfasis en los aspectos morfológicos, fisiológicos y ecológicos que permiten su caracterización.

#### 13.1.1. CYANOBACTERIA

Las cianobacterias, también llamadas cianofíceas o algas verdeazules, son los componentes procaríotas del fitoplancton. Realizan fotosíntesis mediante pigmentos como la clorofila  $a$ , ficobilinas (ficocianina y ficoeritrina) y carotenoides. Los niveles de organización que presentan son unicelular, colonial o filamentoso.

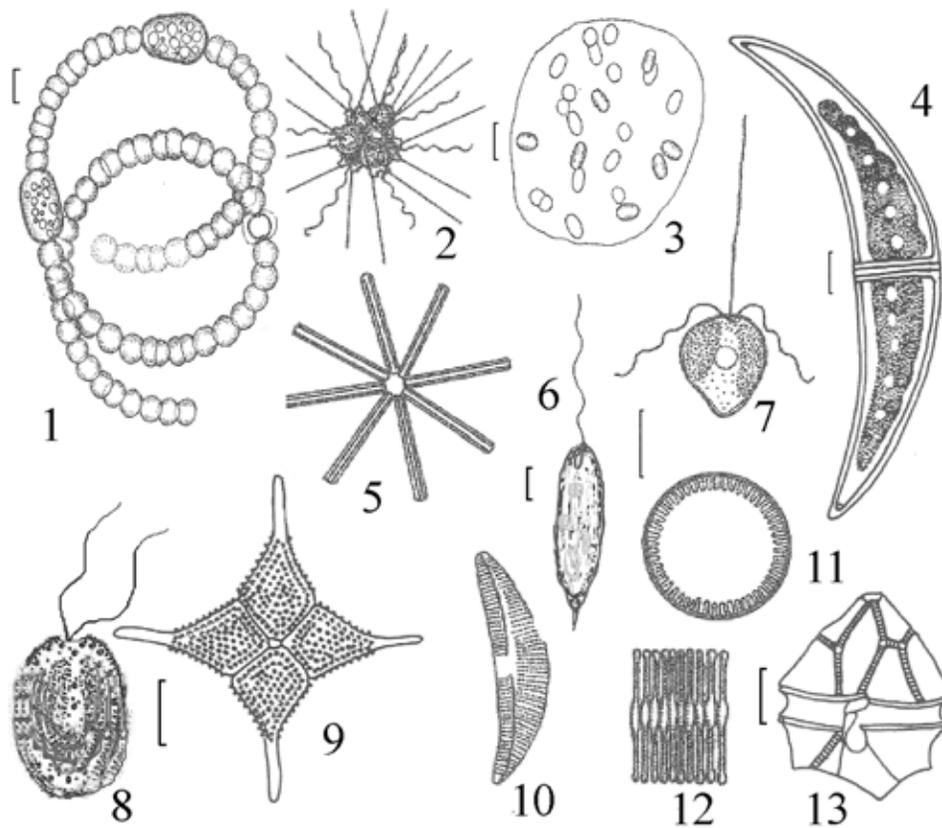


Figura 13.1. Ejemplos de organismos del fitoplancton típico de sistemas límnicos. Se indica la especie o el género y la División o Clase a la que pertenece. 1) *Anabaena circinalis*, Cyanobacteria; 2) *Chrysophaerella* sp., Chrysophyceae; 3) *Aphanothece microscopica*, Cyanobacteria; 4) *Closterium* sp., Chlorophyta; 5) *Asterionella* sp., Bacillariophyceae; 6) *Euglena* sp., Euglenophyceae; 7) *Chrysocromulina* sp., Chrysophyceae; 8) *Chlamydomonas*, Chlorophyta; 9) *Pediastrum* sp., Chlorophyta; 10) *Amphora* sp., Bacillariophyceae; 11) *Cyclotella* sp., Bacillariophyceae; 12) *Synedra* sp., Bacillariophyceae; 13) *Peridinium* sp., Dinophyceae. La escala representa 10  $\mu\text{m}$ . 1 y 3 tomado de Bonilla *et al.* (1995); 2, 4, 5, 7 y 9 a 13 tomado de González (1988); 6 y 8 no publicados.

Las formas filamentosas son las predominantes. Algunos filamentos presentan heterocistos y acinetes, células especiales cuya forma, número y posición son importantes caracteres taxonómicos (Parra & Bicudo 1995). Los heterocistos son células especializadas para la fijación del nitrógeno atmosférico, mientras que los acinetes son células de resistencia, de mayor tamaño que las vegetativas, que se forman cuando las condiciones ambientales no son favorables.

Algunas especies alcanzan altas densidades, en un fenómeno denominado floración (*bloom*), generalmente en verano y principios de otoño, cuando se presentan ciertas condiciones ambientales (Reynolds & Walsby 1975, Bourrelly 1985, Reynolds 1987). Debido a la presencia de vacuolas de gas, las células se acumulan en la superficie de la columna de agua formando densas manchas flotantes. Algunas producen toxinas altamente nocivas incluso para el hombre. Las más frecuentes son la microcistina, derivada de *Microcystis* y la nodularina, de *Nodularia*. En el hombre pueden causar desde ligeros malestares digestivos hasta deshidratación y asfixia (Codd *et al.* 1989, Falconer 1996, Falconer & Humpage 1996).

### 13.1.2. CHLOROPHYTA

Chlorophyta constituye un grupo de algas muy diverso, mejor representado en agua dulce que marina. Presenta niveles de organización individual, colonial y filamentosos. Algunas especies unicelulares y coloniales presentan flagelos que les permiten cierta movilidad. Poseen clorofila *a* y *b*, carotenos y xantofilas y la mayoría presentan una pared celular con celulosa. Su diversidad morfológica y funcional permite la ocurrencia de estos organismos en aguas de muy variadas características. Las formas planctónicas son mayoritariamente cocales (esféricas) y más abundantes en primavera y principio del verano, cuando hay disponibilidad de nutrientes, luz y alta temperatura (Bourrelly 1972, González 1988, Parra & Bicudo 1995).

### 13.1.3. BACILLARIOPHYCEAE

También conocidas como Diatomeas, constituyen una Clase muy frecuente y diversa en el plancton de agua dulce, aunque está más representado en agua marina. Se caracterizan por presentar una pared celular impregnada en sílice, con ornamentaciones muy particulares que son fuertes caracteres taxonómicos. La pared silicificada o valva consta de dos tecas, una superior o epiteca y una inferior o hipoteca, lo que en conjunto se denomina frústulo. Forman parte del grupo de algas pardas o doradas, que contienen clorofila *a* y *c*,  $\beta$ -caroteno, xantofilas y diatoxantina. Las células vegetativas carecen de flagelo, aunque presentan cierta movilidad gracias al flujo de agua que pasa a través de perforaciones en sus paredes celulares.

Son organismos principalmente unicelulares y algunas especies son coloniales. Pueden alcanzar densidades muy altas consideradas floraciones, pero no forman manchas flotantes como las cianofíceas, debido a su alta tasa de sedimentación. No se han registrado floraciones tóxicas de diatomeas en agua dulce, pero sí en el mar. Sus altas densidades pueden ocasionar inconvenientes como la colmatación de filtros de potabilización, o la mortandad de peces al obstruir las agallas impidiendo el intercambio gaseoso.

Este grupo comprende los órdenes Centrales y Pennales, con simetría radial y bilateral, respectivamente. Las centrales son típicamente planctónicas y las pennales generalmente bentónicas, aunque se encuentran con frecuencia en el plancton (Bourrelly 1981, Parra & Bicudo 1995).

### 13.1.4. CHRYSOPHYCEAE

Esta Clase, principalmente de agua dulce, forma parte de las algas pardas, poseedoras de clorofila *a* y *c*. Otros pigmentos presentes son  $\beta$ -caroteno, xantofilas, luteína y diadinoxantina. Son organismos unicelulares o coloniales, con número variable de flagelos. Algunos géneros presentan escamas silíceas y otros, cápsulas. Se relacionan con aguas pobres en nutrientes, ya que algunas especies tienen nutrición holozoica, es decir que su comportamiento trófico es similar al de los organismos heterotróficos. Tienen formas de resistencia o estatosporas, que se forman en el interior de la célula vegetativa y se rodean de una pared silícea con un poro, lo que las diferencia de los quistes de las xantofíceas (Bourrelly 1981, Parra & Bicudo 1995).

### 13.1.5. XANTOPHYCEAE

También se denominan heterocontas porque las células presentan dos flagelos de longitud y estructura diferente. Están representados por organismos unicelulares, coloniales o filamentosos, principalmente bentónicos o epifíticos. Presentan clorofila *a* (y también *c* en algunos casos), y un alto contenido de carotenoides ( $\beta$ -caroteno, violaxantina y neoxantina) y xantofilas (anteraxantina, luteína epoxida y trollixantina), que les dan un color verde-amarillento. La pared celular está compuesta principalmente de celulosa y glucosa. Forman quistes (estatosporas) silíceos dentro de la célula vegetativa, compuestos de dos valvas y opérculo (Bourrelly 1981, Parra & Bicudo 1995).

### 13.1.6. CRYPTOPHYCEAE

Son organismos principalmente flagelados, con distribución cosmopolita. Se presentan principalmente como células individuales móviles o en colonias inmóviles. Contienen clorofila *a* y *c*, en uno o dos cloroplastos, además de carotenos, ficocianina y ficoeritrina. Exhiben una coloración muy variada, desde verde-azul a roja. Las células son aplanadas dorso-ventralmente y poseen una citofaringe o fosa vestibular donde se insertan dos flagelos, o raramente uno, que le dan importante movilidad. En general carecen de estigma, pero cuando está presente es independiente de los flagelos. Incluyen los órdenes Cryptomonadales, de individuos flagelados y móviles, y Tetragonidiales, que pueden ser unicelulares o coloniales, pero en ambos casos inmóviles (Bourrelly 1985, Parra & Bicudo 1995).

### 13.1.7. DINOPHYCEAE

Los dinoflagelados, más diversos y abundantes en agua marina, presentan clorofila *a* y *c*,  $\beta$ -carotenos y fucoxantina. Son organismos unicelulares que pueden formar cadenas. Tienen dos flagelos dispuestos transversalmente en un surco longitudinal (*sulcus*) y otro transversal (*annulus*), que les permiten una importante movilidad. La mayoría de las especies tiene por debajo de la membrana celular placas de celulosa en número y disposición específicos, algunas de las cuales presentan espinas o prolongaciones. Pueden desplazarse entre la capa superficial iluminada y la profunda de la columna de agua, alcanzando mayor desarrollo poblacional al final del período de estratificación. Según las condiciones ambientales, pueden ser autótrofos, heterótrofos o mixótrofos (Bourrelly 1985, Parra & Bicudo 1995).

### 13.1.8. EUGLENOPHYCEAE

Este grupo, principalmente de agua dulce, incluye organismos pigmentados y no pigmentados, con metabolismo fotoautótrofo, heterótrofo e incluso fagotrófico, por lo que algunos autores los consideran protozoarios. La heterotrofia, aún de los organismos pigmentados, es favorecida por la disponibilidad de materia orgánica, condición en la que pueden desarrollar floraciones. Presentan clorofila *a* y *b*,  $\beta$ -carotenos y xantofilas. Los pigmentos se encuentran en cloroplastos discoidales, estratificados o en banda (Bourrelly 1985, Tell & Conforti 1986). Por debajo de la membrana celular presentan una película proteica.

La mayoría de las especies son unicelulares muy móviles, de tamaño y forma variable. Algunas poseen una cápsula o lórica. Presentan hasta siete flagelos, con más frecuencia dos, de los que solo uno es visible al microscopio óptico. Es fundamental

la observación de material fresco para su identificación.

## 13.2. ANÁLISIS CUALITATIVO

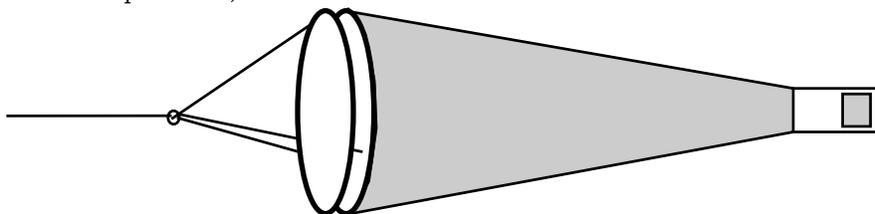
*Lizet De León*

El nivel de determinación taxonómico que se puede alcanzar depende de la calidad del material colectado, la disponibilidad de claves adecuadas y en gran medida de la experiencia del investigador. Si el objetivo del estudio es conocer la composición del fitoplancton, esto debe ser considerado desde el muestreo, pues de ello depende la calidad del material a obtener para la identificación de los taxa.

### 13.2.1. MUESTREO

Para determinar el número y distribución de las muestras debe considerarse la morfología del cuerpo de agua, la distribución del fitoplancton, que puede ser de tipo contagiosa (Venrick 1978, González 1988, Izaguirre 1995). El muestreo en verticalidad puede ser integrado, para lo cual se realizan arrastres verticales u oblicuos, o en estratos si se quiere conocer la composición en ciertas profundidades. Un muestreo horizontal considera sólo el estrato superior de la columna de agua. Las muestras para el análisis cualitativo del fitoplancton generalmente se obtienen concentrando material mediante la utilización de diferentes artes:

REDES DE PLANCTON. Constan de un cono de tela de nylon de tamaño de poro conocido -convenientemente menor a 35  $\mu\text{m}$ -, cuya boca se mantiene abierta con un aro generalmente metálico, del que salen 3 o 4 tirantes que se unen al cabo con el que se arrastra la red (Fig. 13.2). En el extremo del cono se coloca un recipiente (copo) donde se deposita el material concentrado durante el arrastre. La colecta se realiza arrastrando la red a muy baja velocidad sobre la superficie del agua (arrastre horizontal), ascendiéndola desde una determinada profundidad (arrastre vertical) o combinando ambas formas simultáneamente (arrastre oblicuo). Los cálculos del volumen filtrado con la red son muy imprecisos, por lo cual no es recomendable su uso para análisis cuantitativo. Además, los organismos menores al tamaño de malla no son capturados, subestimándose la densidad.



*Figura 13.2.* Red de fitoplancton. El copo colector en el extremo de la red está provisto de una ventana con un trozo de malla del mismo tamaño de poro que la red.

BOTELLAS MUESTREADORAS (ver 4.4). Permiten capturar organismos de todos los tamaños, pero debido a su escaso volumen, se requieren varias muestras para lograr una cantidad suficiente de material. Las botellas transparentes son más recomendables porque alteran menos las condiciones lumínicas del ambiente. La trampa de Schindler permite un mejor flujo de agua por su interior durante el descenso y se le puede instalar un cono de red en la salida del agua para concentrar la muestra, vaciando la botella una vez que ésta es subida a la superficie. El tamaño de los organismos capturados está determinado por la malla del cono. Las botellas permiten conocer con mayor precisión el volumen de muestra filtrado, por lo que pueden utilizarse para el muestreo cuantitativo.

**BOMBAS DE ASPIRACIÓN.** Permiten concentrar una gran cantidad de material rápidamente y con poco esfuerzo, a la profundidad deseada por medio de un tubo. Deben ser bombas peristálticas o centrífugas para evitar que los organismos se dañen.

El arte seleccionado debe considerar el rango de tamaño de los organismos a estudiar. En todas las artes utilizadas, se debe tener la precaución de eliminar restos de una muestra anterior antes de concentrar una nueva, lavando con agua limpia o con agua del lugar de colecta.

### 13.2.2. FIJACIÓN DE LAS MUESTRAS

La fijación y conservación del material para su análisis cualitativo debe preservar estructuras de importancia taxonómica muy delicadas.

**FRÍO Y OSCURIDAD.** Se recomienda observar el material sin ningún aditivo químico que pueda alterar su morfología y actividad. Un ambiente frío (4 °C) y oscuro reduce al mínimo el metabolismo de los organismos, incluso de las bacterias. Ello permite la observación de los caracteres taxonómicos en su estado natural, pero requiere de un análisis inmediato, preferentemente antes de 72 h de tomada la muestra.

**FORMALINA.** El formol comercial o formalina, es una solución de formaldehído 40%. Para que la concentración final en la muestra sea entre 2 y 4%, se agregan 5 a 10 ml de formalina por cada 90 ml de muestra. Cuanto más densa la muestra, mayor debe ser la concentración de formalina. Se recomienda neutralizarla con carbonato de calcio o acetato de sodio hasta llevar la solución a pH 6.8-7.0. La fijación con formalina destruye los flagelos pero preserva en buen estado los plastos, conservando el color por largo tiempo.

**LUGOL.** Se disuelven 10 g de yodo puro y 20 g de yoduro de potasio (KI) en 200 ml de AD y 20 ml de ácido acético glacial (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>). Se guarda en un frasco de vidrio color ámbar y en oscuridad. La concentración en la muestra no debe ser mayor a 1%, lo que se logra con aproximadamente 2 a 3 gotas por cada 100 ml de muestra, que adquiere un color té oscuro. El lugol es un fijador que preserva los flagelos y las formas blandas, pero al ser absorbido por las algas, las tiñe y modifica algunas estructuras.

**GLUTARALDEHÍDO.** Es un fijador utilizado para preservar organismos con estructuras delicadas, para las fracciones de menor tamaño del fitoplancton o para material a observar en microscopio electrónico. Se recomienda una concentración final de 1 a 5%. Si bien preserva las estructuras delicadas, sólo es eficiente para muestras de pequeño volumen y durante corto tiempo.

### 13.2.3. PREPARACIÓN Y MONTAJE

Cuando no se conoce la composición de la comunidad a analizar, conviene realizar una observación general de la misma a efectos de determinar el tratamiento y montaje más convenientes.

Si la muestra es muy concentrada o tiene muchas partículas suspendidas, es conveniente tomar una pequeña parte de la misma y diluirla, en lo posible con agua del lugar filtrada, o en su defecto con agua corriente, ya que el agua destilada interfiere con la presión osmótica de los organismos. Si por el contrario, la muestra es muy pobre, conviene concentrarla, centrifugando a baja velocidad (1200-1500 rpm), filtrando a baja presión o tomando el material sedimentado en el fondo del frasco sin agitar (Thronsdén 1978, Dodson & Thomas 1978, Fournier 1978). Si hay mucha heterogeneidad en el tamaño de los organismos, es conveniente analizar la muestra por fracciones de tamaño, pasándola por una o varias mallas de diferente tamaño.

#### *Procedimiento*

- 1) Homogeneizar suavemente la muestra.
- 2) Tomar una submuestra con una pipeta, que se utilizará solo para ese frasco.
- 3) Colocar una gota de la submuestra en un portaobjetos seco limpio con alcohol.
- 4) Tomar un cubreobjetos también limpio con alcohol, apoyarlo en el borde de la gota y bajarlo evitando que quede aire entre el porta y el cubreobjetos.
- 5) Colocar el preparado en la platina del microscopio y enfocar con el mínimo aumento antes de pasar a los aumentos mayores.

Los preparados permanentes y semipermanentes permiten repetir la observación del material. El estado de conservación de los organismos depende en gran medida del medio de montaje. Las características más importantes para seleccionarlo son un alto índice de refracción, su duración, la composición de la muestra y el tiempo que se la desee mantener. El agua destilada puede utilizarse como un medio semipermanente. El Hyrax<sup>®</sup>, Naphrax<sup>®</sup> y Pleurax<sup>®</sup> son resinas sintéticas de alta calidad y fácil manejo. El Bálsamo de Canadá es una resina natural, de menor calidad y bajo índice de refracción (1.53). También se utiliza la gelatina glicerizada, con una refracción similar al anterior (1.5) (Reid 1978, Boltovskoy 1995, Ferrario *et al.* 1995).

#### *Procedimiento*

- 1) Lavar porta y cubreobjetos con alcohol y secarlos, tomándolos por los bordes.
- 2) Colocarlos en una tela de amianto sobre un mechero durante unos minutos.
- 3) Colocar en cada uno, una gota de muestra concentrada y dejar secar.
- 4) Agregar con una varilla de vidrio delgada, 1 o 2 gotas de medio de montaje y esperar unos segundos para que la resina se ablande.
- 5) Invertir con unas pinzas el cubreobjetos sobre el portaobjetos, y dejar sobre la placa caliente hasta que la resina derretida alcance los bordes del cubreobjetos.
- 6) Eliminar las burbujas que pueden formarse presionando suavemente desde un vértice del cubreobjetos hacia el opuesto con un trozo de madera o un lápiz.
- 7) Retirar del calor y esperar que la resina se seque. Eliminar con un bisturí los restos que pudieran quedar por fuera del cubreobjetos.
- 8) Para preparados permanentes, sellar los bordes con esmalte de uñas.
- 9) Rotular el preparado y guardarlo verticalmente en lugar seco y oscuro. Rotular detallando si se ha eliminado la materia orgánica o teñido.

### 13.2.4. IDENTIFICACIÓN

Al observar por primera vez una muestra de fitoplancton de un ambiente determinado, conviene hacer un relevamiento general de los grupos presentes con base en los siguientes caracteres diagnósticos:

- 1) *Protoplasma*  
homogéneo o con pequeños gránulos dispersos: Procariotas  
con estructuras diferenciadas, especialmente cromatóforos: Eucariotas
- 2) *Coloración*  
verde: Chlorophyta o Euglenophyceae  
azul-verdoso: Cyanobacteria  
dorado-tostado: Diatomea, Dinophyceae o Chrisophyceae
- 3) *Pared celular*

silicificada: Diatomea

con placas y/o hendiduras transversales: Dinophyceae

La presencia de almidón o paramilon distingue a las Chlorophyta, Chryptophyceae y Euglenophyceae. La disposición de los flagelos permite la determinación de las clases, el aspecto morfológico los órdenes y niveles inferiores, mientras que el número, coloración, disposición, forma y tamaño de los cromatóforos, permiten separar géneros y especies.

Existen muchos sistemas de clasificación, por lo que es conveniente consultar a varios especialistas. Se recomienda el uso de las claves de Velez y Maidana (1995), González (1988) y Bourrelly (1972, 1981, 1985) para iniciarse en la utilización de esta herramienta. Coll (1979) y Bonilla *et al.* (1995) presentan material de Uruguay.

## TINCIONES

Las tinciones son útiles para distinguir ciertas estructuras celulares. El colorante debe agregarse desde el borde de la muestra montada, con o sin cubreobjetos. Para facilitar la dispersión puede colocarse un trozo de papel absorbente en el lado opuesto al que comenzó la tinción. Las tinciones más utilizadas son:

- a) Azul Evans o Rojo Neutro. Se agrega al material fresco para identificar las células vivas.
- b) Iodo. El almidón se tiñe de azul con iodo y de marrón oscuro con Lugol.
- c) Azul Cresyl brillante. Tiñe de rojo púrpura la crisolaminarina.
- d) Sudán negro o azul. Las grasas y aceites se tiñen de negro y azul, respectivamente. El ácido ósmico los tiñe de negro.
- e) Solución Lugol y ácido sulfúrico. El Lugol tiñe la pared celulósica y luego el ácido sulfúrico concentrado provoca un hinchamiento de la misma.
- f) Azul de metileno o tinta china. Permiten diferenciar las vainas mucilaginosas. El Azul de metileno las tiñe de azul y la tinta china, muy diluida, rodea al organismo sin teñir la vaina.
- g) Carmín acético. Para teñir núcleos, se lo agrega a una submuestra fijada con formol, se calienta suavemente y se lava con agua.

## TRATAMIENTOS

Según la composición de la muestra, puede ser conveniente aplicar algún tratamiento para facilitar la observación de ciertas estructuras. Los frústulos de diatomeas pueden limpiarse eliminando la materia orgánica, y así evidenciar la ornamentación de las valvas para su identificación específica. La eliminación de la materia orgánica se realiza de un modo rápido calentando un pequeño volumen de muestra concentrada, en el doble de agua oxigenada 600 volúmenes. La mezcla debe retirarse del calor antes de la ebullición. Ferrario *et al.* (1995) describen otros tratamientos más complejos y eficaces.

Luego de la observación de la célula completa de los dinoflagelados, conviene separar sus tecas para analizar el número y forma de las placas, para lo cual se agrega al preparado una gota de hipoclorito de sodio (Boltovskoy 1995).

## MEDIDAS E IMÁGENES

Las medidas celulares también facilitan la identificación de las especies. Se realizan con un ocular provisto de una reglilla o micrómetro, que debe calibrarse para cada aumento del microscopio. Para ello se hacen coincidir dos líneas del ocular con dos líneas de una reglilla micrometrada inserta en un portaobjetos. Luego se

calcula la distancia en entre dos líneas consecutivas del micrómetro. Se recomienda corroborar la medición al menos tres veces. Las medidas más usadas son:

- a) largo y ancho celular
- b) largo del filamento o número de células por unidad de distancia
- c) diámetro celular y/o colonial
- d) número y disposición de las células en la colonia
- e) ancho de las vainas mucilaginosas
- f) número de ornamentaciones por unidad de distancia
- g) largo y ancho de las hemicélulas (Diatomeas, Dinoflagelados, Desmidiaceas)

La representación gráfica es otra importante herramienta para la identificación. Las técnicas más utilizadas son el dibujo, generalmente con cámara clara, la microfotografía, la microfilmación y el *scanning* de imágenes por computadora.

### 13.3. ANÁLISIS CUANTITATIVO

*Lizet De León*

La cantidad de organismos fitoplanctónicos presentes en un sistema puede expresarse como densidad de individuos, biovolumen o biomasa. Trataremos aquí la estimación de la densidad o número de organismos por volumen de agua. Antes de iniciar los recuentos, debe definirse si la unidad de conteo es la célula, colonia o filamento, a fin de mantener un criterio uniforme. Es posible promediar la abundancia de células por filamento o colonia si éstas son muy densas (Smayda 1978, Venrick 1978, 1995, Booth 1993).

También se debe definir el nivel taxonómico del recuento. El conteo por especie aporta más información, pero requiere mucha experiencia y un conocimiento previo del material. También pueden emplearse criterios no taxonómicos como formas, rangos de tamaño o nivel de organización.

#### 13.3.1. MUESTREO

El diseño del muestreo cuantitativo debe considerar la diversidad horizontal y vertical. La muestra puede tomarse según diferentes criterios, como profundidad del lugar, penetración de la luz o estratificación. Debe ir acompañada de un intenso análisis cualitativo, a fin de reconocer los organismos a contar. Debe usarse botellas o muestreadores de volumen conocido, ya que es necesario conocer el volumen exacto colectado. Se recomienda tomar al menos tres réplicas.

Si bien pueden utilizarse los mismos fijadores mencionados para el estudio cualitativo, el Lugol es el más difundido y práctico. Los organismos absorben el Lugol, se vuelven más pesados y visibles, acelerando su sedimentación en la cámara de conteo y facilitando la identificación.

#### 13.3.2. RECUENTO

La muestra debe ser homogeneizada con movimientos suaves inmediatamente antes del análisis. La elección del método de conteo depende de la concentración del material y de la disponibilidad de medios.

UTERMÖHL. El método más utilizado y preciso para muestras de mediana a baja densidad, como las de ambientes naturales, es el descrito por Utermöhl en 1931 (Hasle 1978). Consiste en concentrar el material en cámaras de sedimentación ci-

lindricas de diferentes alturas, según la densidad de la muestra. Las cámaras se llenan lentamente para evitar la formación de burbujas y se dejan reposar unas 2 h por cada centímetro de altura de la cámara. El material se concentra en el fondo, por lo que su observación sólo es posible con un microscopio óptico invertido, o de Utermöhl. La abundancia de organismos (N) en org ml<sup>-1</sup> se obtiene según:

$$N = CA/aSV$$

donde C es el número de organismos contados, A el área del fondo de la cámara y a el área de la banda o campo contado (mm<sup>2</sup>), S el número de bandas o campos contados y V el volumen de muestra (ml).

**CÁMARA DE SEDWICK-RAFTER.** Para muestras más concentradas puede utilizarse otras cámaras en microscopio común. La cámara de Sedwick-Rafter, de 1 ml de capacidad, es rectangular y de tamaño poco mayor que un portaobjetos. Generalmente no admite objetivos de gran aumento debido a su altura. La cámara debe semi-cubrirse con un portaobjeto y llenarse desde un ángulo descubierto, evitando la formación de burbujas. Luego se cubre totalmente y se espera unos minutos a que sedimenten las algas, antes de observarlas en microscopio común.

**HEMATOCÍMETRO O HEMOCITÓMETRO.** Es una cámara para recuento de glóbulos rojos. Su aplicación en esta área se limita a muestras de alta densidad, ya que se utiliza un volumen muy reducido ( $\leq 0.1$  ml), aunque existen cámaras de diferente profundidad y volumen. Todas tienen una cuadrícula de área conocida. La abundancia de organismos (org ml<sup>-1</sup>) es:

$$N = 1000C/aHS$$

donde H es la altura de la cámara (mm) (González 1988).

**ALÍCUOTAS.** El conteo de alícuotas sobre portaobjetos común permite tener una idea de la densidad del fitoplancton, y se realiza cuando no se dispone de otros métodos. Luego de extraer un volumen conocido de muestra con una pipeta preferentemente automática, se lo coloca en un portaobjetos, se cubre y se cuantifica. La densidad se determina por simple regla de tres. Se recomienda contar varias alícuotas de la misma muestra.

Cuando se tiene el material sedimentado es necesario determinar la forma de contar: por campos aleatorios, campos ordenados, transectas diametrales o la superficie total. Todo método de recuento incluye un error en la estimación de la abundancia, cuyo porcentaje puede calcularse (Venrick 1978). El error disminuye aumentando los organismos contados. Se recomienda contar entre 100 y 400 organismos de la especie más abundante, o trabajar con un error inferior a 20% (Venrick 1978, 1995, González 1988, Izaguirre 1995).

### 13.3.3. BIOVOLUMEN

El biovolumen es una medida de la biomasa de los organismos determinada a partir de su abundancia y dimensiones. Con éstas se calcula el volumen de un cuerpo geométrico de igual forma que el organismo. Muchas formas complejas requieren la combinación de diferentes cuerpos geométricos. Se calcula el volumen en forma individual y luego se promedia entre un mínimo de 25 individuos de la misma especie. Las especies con variaciones importantes de tamaño deben calcularse

por clases de tamaño. El volumen calculado se multiplica por la abundancia estimada para cada especie. El volumen se puede transformar en unidad de peso, contenido de carbono o volumen neto de protoplasma utilizando diferentes coeficientes (Smayda 1978, González 1988, Booth 1995).

## 13.4. PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

*Sylvia Bonilla*

La clorofila *a* es el pigmento común a todos los organismos que realizan fotosíntesis con liberación de oxígeno. Su concentración se usa como indicador de la biomasa del fitoplancton (Lorenzen 1967, Rai 1980) y depende del estado fisiológico de la comunidad así como de su composición específica (Lee 1995).

Este pigmento puede ser cuantificado mediante métodos indirectos (extracción) o directos (fluorescencia). Para su separación de pigmentos específicos se utiliza la cromatografía. Los primeros han sido elaborados inicialmente por Lorenzen (1967) y son los más utilizados. Se basan en la transferencia del pigmento a un solvente orgánico sin provocar cambios químicos en la molécula. La concentración de la clorofila se cuantifica en un espectrofotómetro a la longitud de onda en que la absorción de la clorofila es máxima (665 nm). El pigmento es muy sensible a la degradación fotoquímica por lo que todas las manipulaciones deben hacerse en condiciones de luz tenue.

**MUESTREO Y CONSERVACIÓN.** Las muestras se toman a la profundidad deseada con botella muestreadora y se colocan en recipientes opacos, manteniéndose en oscuridad y a baja temperatura hasta su filtrado. Es recomendable realizar la filtración en forma inmediata al muestreo, evitando altas temperaturas y radiación solar directa.

**EXTRACCIÓN.** Entre los solventes más comunes, el metanol y el etanol tienen mayor poder de extracción que la acetona (Nusch 1980). Esta ha sido muy utilizada en muestras marinas donde las diatomeas son uno de los grupos principales, pero tiene bajo poder de extracción en algas verdes y cianobacterias (Tolstoy 1980). Con metanol, que es tóxico, la acidificación es compleja, por lo que el etanol es más recomendado para sistemas dulceacuícolas, donde abundan las clorofitas (Nusch 1980, Riemann 1980, ISO 1992). Algunos autores proponen usar una mezcla de solventes (acetona/metanol) para la extracción de clorofila (Pechar 1987).

**FILTRACIÓN.** Los filtros de fibra de vidrio (Whatman® GF/C y GF/F, de 0.18 a 0.25 µm de diámetro) son inertes, insolubles, resistentes, no producen turbiedad durante la extracción y retienen partículas mayores de 0.7 µm (GF/F) y 1.2 µm (GF/C), aproximadamente (Marker *et al.* 1980). El uso de filtros GF/F es recomendable para el análisis de muestras conteniendo pequeños organismos (Chavez *et al.* 1994).

Se debe filtrar suficiente agua hasta la colmatación del filtro. En aguas con gran cantidad de sólidos inorgánicos en suspensión es recomendable utilizar filtros de mayor área de filtración (47 mm de diámetro).

La presión utilizada en la filtración no debe exceder 0.75 atm o 570 mm de Hg, ya que presiones mayores pueden abrir la malla del filtro perdiendo algunos organismos fitoplanctónicos pequeños (Nusch 1980).

El filtro debe ser retirado del portafiltro manteniendo el sistema de vacío conectado para evitar la humedad excesiva.

**ACIDIFICACIÓN.** La molécula de clorofila se degrada naturalmente en diversas moléculas denominadas feopigmentos (feofitina, clorofilida, etc.), también presentes en la muestra. Estos presentan máximos de absorbancia a las mismas longitudes de onda que la clorofila activa, por lo que la lectura espectrofotométrica a 665 nm los

incluye. No es posible discriminar el aporte de la clorofila *a* y el de los productos de degradación, pero aquella es susceptible de ser transformada en feopigmentos acidificando con HCl (0.12 N). El proceso de degradación se completa entre 1 y 3 min.

RELACIÓN ACIDA. Para un extracto puro de clorofila *a*, la relación entre la absorbancia a 665 nm antes y después de la acidificación es 1.7. Por lo tanto en una

$$(A_{665} - A_{750}) / (Aa_{665} - Aa_{750}) < 1.7$$

muestra natural, esta relación no puede ser mayor a este valor. Si por el contrario en la muestra únicamente hay pigmentos de degradación, la relación ácida es 1. Es recomendable calcular la relación ácida cuando se procede a la lectura del extracto de clorofila, según:

La lectura a 750 nm se realiza para la corrección por turbidez. En aguas naturales de sistemas dulceacuícolas es corriente encontrar valores entre 1.3 y 1.6. Si la relación es más baja, se puede agregar más ácido o esperar más tiempo hasta que la acidificación se complete. Si la relación supera el valor de 1.7 se debe realizar la lectura nuevamente agregando menor cantidad de ácido.

*Procedimiento* (Modificado de Nusch 1980 e ISO 1992)

- 1) Filtrar entre 0.25 y 2 litros de muestra dependiendo de la concentración de algas a través de filtros de fibra de vidrio (GF/C o GF/F).
- 2) Doblar los filtros con las algas hacia adentro y guardarlos inmediatamente en papel de aluminio a -20 °C. Las muestras pueden permanecer congeladas hasta 4 semanas (Nusch 1980), aunque algunos autores sugieren no congelar los filtros y proceder a la extracción inmediatamente (ISO 1992).
- 3) Calentar el etanol 95° a 75 °C (±1 °C). Poner el filtro en un tubo de ensayo y agregar 5 ml de etanol caliente. Colocar el tubo tapado a baño maría a 75 ±1 °C durante 1 min. Si se deja más tiempo se puede degradar la clorofila. Enfriar con agua corriente.
- 4) Poner el tubo en un baño de ultrasonido por 15 min para desprender las algas del filtro y luego extraer durante una hora en oscuridad a temperatura ambiente.
- 5) Sacar de cada tubo los filtros escurriéndolos y conservar el extracto.
- 6) Filtrar el extracto por un filtro de 0.45 mm de poro.
- 7) Agregar 5 ml de etanol de modo que el volumen final sea de 10 ml.
- 8) Medir en el espectrofotómetro la absorbancia a 665 nm y 750 nm utilizando cubetas de 1 cm de largo.
- 9) Acidificar la muestra directamente en la cubeta con 100 µl de HCl 0.12 N. Esperar un minuto y repetir las lecturas a 665 y 750 nm.
- 10) Calcular la concentración de clorofila *a* (Clo *a*) en µg l<sup>-1</sup>:

$$\text{Clo } a = 29.6[(A_{665} - A_{750}) - (Aa_{665} - Aa_{750})](v/V)L$$

donde *v* es el volumen del extracto (10 ml), *V* el de la muestra filtrada (l), *A*<sub>665</sub> y *A*<sub>750</sub> las absorbancias sin acidificar, *Aa*<sub>665</sub> y *Aa*<sub>750</sub> las absorbancias luego de la acidificación, *L* el largo de la cubeta (cm). El factor 29.6 se obtiene de la relación [R/k (R-1)], donde R (1.7) es la relación ácida de un extracto de clorofila *a* pura y *k* su coeficiente de absorción en etanol (expresado en litro µg<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

La concentración de las feofitinas (Feof.) en µg l<sup>-1</sup> se puede calcular mediante:

$$\text{Feof.} = 20.8(Aa_{665} - Aa_{750})v/V.L - \text{Clo } a$$

La estimación de los feopigmentos es menos confiable que la de clorofila *a*. La variabilidad en las estimaciones de los feopigmentos puede alcanzar 45%, mientras para la clorofila suele de ser de hasta 10% (ISO 1992).

El mínimo de detección de la técnica es  $0.29 \mu\text{g l}^{-1}$  y está dado por el menor valor que puede ser leído espectrofotométricamente (0.001) y la siguiente relación:

$$(A_{665} - A_{750}) - (A_{a665} - A_{a750}) = 0.001$$

entonces,

$$29.6 \times 0.001 \times 10/1 \times 1 = 0.29 \mu\text{g/l}$$

### 13.4.1. OTROS MÉTODOS

**FLUORESCENCIA *IN VITRO*.** Este método se basa en la propiedad de la molécula de clorofila *a* de fluorecer rojo cuando es excitada con luz azul. La clorofila *a* se extrae de la forma antes mencionada y se realizan las lecturas con un fluorómetro. Aunque es un método más rápido y sensible que el espectrofotométrico, algunos pigmentos como la clorofila *c* pueden interferir en la lectura, por lo que es necesario utilizar filtros especiales, que disminuyen la sensibilidad de la determinación (Holm-Hansen *et al.* 1965). La banda de emisión de la fluorescencia de la feofitina *b* se superpone con la de la feofitina *a*, por lo que si hay gran cantidad de clorofila *b* en la muestra, los feopigmentos pueden resultar sobreestimados (Rai 1980).

**FLUORESCENCIA *IN VIVO*.** La lectura en el fluorómetro se realiza directamente con la muestra de fitoplancton fresca, previamente mantenida en oscuridad durante al menos 30 min. Es un método sencillo, rápido, sensible y muy útil cuando se realizan monitoreos. Tiene las mismas consideraciones que el tratamiento anterior. (Marker *et al.* 1980).

**TRICOMÁTICO.** Es un método espectrofotométrico con un procedimiento similar al desarrollado en este capítulo. Sin embargo, estima pigmentos totales sin la corrección por feopigmentos y considera las longitudes de onda de las clorofilas *a*, *b* y *c* (665, 647 y 630 nm, respectivamente) (APHA 1985). Debido a que la presencia de las clorofilas *b* y *c* está asociada a grupos algales filogenéticos, este método es útil para estimar indirectamente las grandes variaciones taxonómicas de la comunidad.

**CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA (HPLC).** Para completar la caracterización pigmentaria de una muestra es necesario separar mediante cromatografía los pigmentos y sus productos de degradación. Este método se ha comenzado a utilizar en los últimos años, siendo de especial relevancia en el tratamiento de muestras de epifiton o sedimento (epipelon y epipsammon) que pueden presentar alto contenido de productos de degradación (Mantoura & Llewellyn 1983, Geider & Osborne 1992).

## 13.5. ABSORCIÓN DE FOSFATO

*Luis Aubriot*

El fósforo es un elemento potencialmente limitante para el desarrollo del fitoplancton. El crecimiento algal requiere que la concentración ambiental de fosfato supere un determinado umbral (Rigler 1956), por debajo del cual la energía sería insuficiente para sustentar su incorporación (Falkner *et al.* 1984). Cuando la concentración de fosfato sobrepasa la concentración umbral, la molécula es rápidamente absorbido por las algas, convertido en ATP vía fotofosforilación y almacenado

como polifosfato. Este es el recurso para producir nueva biomasa y su concentración determina la tasa de crecimiento.

Existen cambios adaptativos a las fluctuaciones de fosfato debidos al tiempo de exposición de las algas a concentraciones superiores al umbral y a la velocidad con que el sustrato es retirado del medio (Wagner *et al.* 1995). Esta adaptación se manifiesta en un aumento de los umbrales y se caracteriza por una relación lineal entre la tasa de absorción y el logaritmo de la concentración externa, cuya extrapolación resulta en el valor umbral de fosfato (Falkner *et al.* 1995). Esta capacidad adaptativa refleja el estado fisiológico de las algas en relación a su deficiencia en fósforo, y permite obtener información sobre el procesamiento de nutrientes.

Falkner *et al.* (1989) presentan un modelo conceptual de absorción de fosfato para algas adaptadas a elevadas concentraciones, que muestra una relación pro-

$$J_p = L_p (\log[P_e] - \log[P_e]_A)$$

porcional entre la tasa de absorción ( $J_p$ ) expresada en  $\mu\text{mol P}_i (\text{mg Clo } a \text{ h})^{-1}$  y la denominada fuerza conductora de absorción. Esta dependencia proporcional puede ser expresada por la "relación flujo-fuerza":

donde  $L_p$  ( $\text{nM min}^{-1}$ ) es el coeficiente de conductividad del transportador de membrana para fosfato, que refleja la actividad del sistema de absorción,  $[P_e]$  la concentración externa de fosfato y  $[P_e]_A$  el valor umbral al cual la absorción cesa. En el rango de validez de la función, la relación entre  $J_p$  y el  $\log[P_e]$  es lineal, con pendiente  $L_p$  e intersección en el eje de las abscisas igual a  $\log[P_e]_A$ . Para algas no adaptadas a altas concentraciones de fosfato, puede ajustarse la función de cinética de primer orden  $J_p = -k ([P_e] - [P_e]_A)$ , siendo  $k$  la constante de la tasa de absorción.

A continuación se indican las condiciones generales para mantener un cultivo de la cianobacteria *Anacystis nidulans* y realizar los experimentos de absorción, y luego se describen los experimentos con poblaciones naturales. Finalmente se explican los cálculos necesarios para ambos tipos de experimento.

### 13.5.1. EXPERIMENTOS CON CULTIVOS

La cianobacteria *Anacystis nidulans* se cultiva en el medio D de Kratz & Myers (1955) modificado por la adición de  $\text{NaHCO}_3$  y Fe-EDTA hasta alcanzar concentraciones 5 mM y 1.24  $\mu\text{M}$  respectivamente. Un cultivo de 200 ml se burbujea continuamente con aire conteniendo 5% de anhídrido carbónico, y se lo mantiene a 37 °C y una PAR de 120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . La limitación por fosfato es lograda mediante la restricción de la concentración de fósforo total a  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.5  $\mu\text{M}$ .

El cultivo se realiza en modo discontinuo, reemplazando 100 ml cada 48 h con medio fresco marcado con  $\text{K}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$  2.5  $\mu\text{M}$ , lo que es suficiente para una sola división celular. Otro cultivo no marcado se mantiene en paralelo bajo condiciones idénticas para la determinación de clorofila *a* y número de células.

Durante los experimentos de absorción, la luz y la temperatura son las mismas que las utilizadas durante el crecimiento, pero el medio Kratz & Myers es preparado sin elementos traza ni Fe-EDTA y tamponado con Hepes-KOH 5 mM a pH 8.1. Para remover del medio los compuestos complejos de fósforo, el cultivo es centrifugado a 4000 rpm durante 5 min y luego es resuspendido en el nuevo medio, controlando así la concentración de clorofila *a* y de fosfato externo.

La reacción se inicia por la adición de una concentración de [ $^{32}\text{P}$ ]fosfato, elegida según el experimento a realizar. Luego se toman submuestras de 0.8 a 1.5 ml a distintos tiempos hasta obtener al menos dos o más valores mínimos y similares, correspondientes al umbral. Cada submuestra es filtrada a través de una membrana de policarbonato (Nucleopore®) de 0.6  $\mu\text{m}$  colocada sobre un filtro GF/F. Entre 500  $\mu\text{l}$  y 1 ml del filtrado se diluyen a 10 ml con agua destilada y se mide su radioactividad en un contador de centelleo. Simultáneamente se mide la actividad específica de la solución stock 100  $\mu\text{M}$  [ $^{32}\text{P}$ ]fosfato para el cálculo de la concentración del fosfato externo al respectivo intervalo de tiempo.

### 13.5.2. EXPERIMENTOS CON MUESTRAS NATURALES

La absorción neta de fosfato puede ser medida por métodos de espectrofotometría convencionales, pero su detección es incierta en los rangos de concentración usuales en sistemas limitados por fósforo ( $< 10 \mu\text{g l}^{-1}$ ).

La muestra se filtra a través de una malla de 50  $\mu\text{m}$  para eliminar el zooplancton de gran tamaño. Luego es premarcada mediante la adición, en varios pulsos de baja concentración para no alterar la cinética de incorporación, de [ $^{32}\text{P}$ ]fosfato hasta alcanzar una concentración equivalente a la del fósforo total particulado (F. Wagner & G. Falkner, com. pers.). Así se evitan los efectos del intercambio isotópico pudiéndose determinar la absorción neta de fosfato por el mismo procedimiento que en los experimentos con cultivos. Durante el experimento la muestra es agitada y mantenida en condiciones de temperatura y luz aproximadas a las del lugar de muestreo.

### 13.5.3. CÁLCULOS

Se parte de una solución stock 100  $\mu\text{M}^{32}\text{P-P}_i$  con una actividad específica inicial de 250 cpm  $\text{pmol}^{-1}$ . El volumen (*v*) de solución stock, en  $\mu\text{l}$ , a agregar será:

$$v = VC/100$$

donde V es el volumen de la muestra en ml, C la concentración deseada de  $^{32}\text{P}$  en nM y 100 corresponde a la concentración de la solución stock ( $\mu\text{M}$ ).

La concentración de  $^{32}\text{P-P}_i$  en nM para cada intervalo de tiempo ( $P_i$ ) será:

$$P_i = AS/B$$

donde A es la actividad (cpm) de la muestra, S el volumen de la submuestra filtrada (ml) que se diluyó a 10 ml con AD y B la actividad específica de la solución stock ( $250 \text{ cpm pmol}^{-1}$ ).

La actividad específica de la solución stock debe medirse conjuntamente con cada muestra debido al rápido decaimiento del  $^{32}\text{P-P}_i$  (vida media = 14.3 días).

## 13.6. PRODUCCIÓN PRIMARIA

*Sylvia Bonilla*

La producción primaria se define como la cantidad de materia orgánica nueva sintetizada por organismos autótrofos por unidad de tiempo. En los sistemas acuáticos de agua dulce, éstos son principalmente microalgas e hidrófitas, que obtienen la energía a partir de la radiación solar, y las bacterias fotosintéticas, que la obtienen de compuestos inorgánicos (organismos litotróficos). La producción bruta es la síntesis total de nuevo material orgánico, mientras la neta es la bruta menos las pérdidas por respiración, excreción y otros procesos metabólicos (Williams 1993). Es importante destacar que en la práctica la producción primaria en el medio acuático se evalúa a través de la fotosíntesis y se expresa normalmente como la cantidad de carbono fijado por la comunidad autotrófica en un volumen de agua o un área determinada, por unidad de tiempo (Platt & Sathyendranath 1993). La producción primaria (P) expresada por unidad de biomasa (B) es la tasa fotosintética y se denomina  $P^B$ , en donde  $P^B = P/B$ .

CURVAS P-I. La tasa fotosintética se relaciona con la irradiancia en forma no lineal (curva P-I) en donde pueden observarse tres fases (Fig. 13.3, pág. siguiente). Para obtener una curva P-I se toma una muestra de concentración conocida de clorofila *a* y se estima la tasa fotosintética en al menos 10 intensidades de radiación PAR (100, 75, 50, 25, 13, 6, 3, 2, 1 y 0.5% de la máxima intensidad disponible). La incubación puede realizarse usando luz artificial o radiación natural.

En el primer caso, la luz artificial puede obtenerse mediante un retroproyector, simulando las diferentes intensidades con sucesivas capas de papel de calco. Las muestras (3 réplicas de 5 ml por cada intensidad) se incuban directamente en viales de centelleo de vidrio cubiertos lateralmente con polietileno negro. Las muestras pueden incubarse por un periodo corto de tiempo (20 min) con ca.  $5 \mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$ , en una bandeja con agua circulante. En el segundo caso, las diferentes intensidades se obtienen cubriendo las botellas de incubación (3 réplicas de 60 a 120 ml por cada intensidad) con sucesivas capas de malla neutra (tejido tipo mosquitero negro) y colocadas en una bandeja por la que circula agua para evitar el aumento de la temperatura. La incubación se realiza por un periodo de 2 a 4 h, agregando ca.  $3 \mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$ . En ambos casos se incuban 3 réplicas en oscuridad y 3 réplicas conteniendo formol (control abiótico).

La curva P-I se construye graficando la tasa fotosintética instantánea normalizada a la concentración de clorofila ( $P^B$ ) vs. la intensidad correspondiente. En la fase inicial la tasa fotosintética aumenta linealmente con la radiación PAR. La pendiente de la curva ( $\alpha^B$ ) se denomina eficiencia fotosintética; representa la respuesta lineal de la fotosíntesis en condiciones de limitación lumínica y sus unidades son  $\text{mg C} (\text{mg Clo } a)^{-1} (\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1})^{-1}$ . Al aumentar la intensidad PAR se alcanza la saturación o máxima tasa fotosintética, que también se denomina capacidad fotosintética o número de asimilación ( $P_m^B$ ).  $I_k$  es la intensidad PAR a la cual la tasa fotosintética es máxima. A mayor irradiancia y dependiendo de la duración de la exposición, se puede registrar una disminución de la tasa fotosintética relativa, fenómeno denominado fotoinhibición (Geider & Osborne 1992, Sakshaug *et al.* 1997) y representado por el parámetro  $\beta^B$ .

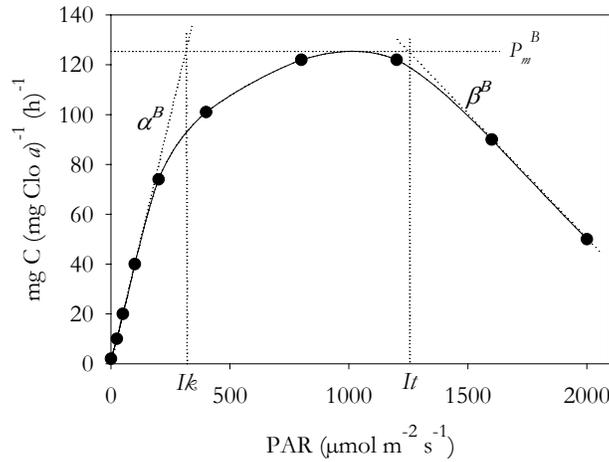


Figura 13.3. Relación teórica entre fotosíntesis y radiación fotosintéticamente activa (curva P-I) indicando las tres fases de la respuesta: 1) limitada, 2) saturada y 3) inhibida.

El modelo matemático más utilizado para describir las curvas P-I es la función hiperbólica tangencial de Jassby & Platt (1976):

$$P^B = P_m^B \tan(\alpha^B I / P_m^B)$$

Sin embargo, esta ecuación no considera la fotoinhibición, como sí lo hace el modelo de Platt *et al.* (1980):

$$P^B = P_s^B [1 - \exp(-\alpha^B I / P_s^B)] \exp(-\beta^B I / P_s^B)$$

donde  $P_s^B$  es la máxima tasa fotosintética alcanzable en ausencia de fotoinhibición.

En este modelo, la tasa fotosintética máxima real será:

$$P_m^B = P_s^B \left[ \alpha^B / (\alpha^B + \beta^B) \right] \left[ \beta^B / (\alpha^B + \beta^B) \right]^{\alpha^B / \beta^B}$$

Las curvas P-I permiten: a) evaluar la respuesta fisiológica de una especie o comunidad algal a un gradiente de radiación PAR, b) extrapolar espacial y temporalmente y c) predecir la tasa fotosintética *in situ* a partir de la irradiancia y clorofila.

INTEGRACIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE  $P^B$ . Con los parámetros de la curva P-I, el coeficiente de atenuación para la radiación PAR ( $k$ ), la variación de ésta en superficie y la concentración de clorofila  $a$ , se puede calcular el valor instantáneo de  $P^B$  a diferentes profundidades:

$$P^B(z) = P_s^B \left[ 1 - \exp(-\alpha^B I_z / P_s^B) \right]^{-\beta^B I_z / P_s^B}$$

donde  $I_z$  es la PAR a la profundidad  $z$ .

Con los valores de  $P^B$  calculados para varias profundidades de la zona eufótica (al menos 100, 75, 50, 25, 10 y 1% de  $I_0$ ) se puede estimar la tasa fotosintética instantánea por área  $P^B(h)$  en  $\text{mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , integrando  $P^B(z)$  en profundidad. En este cálculo se asume que la concentración de clorofila  $a$  y el coeficiente de atenuación son uniformes en toda la zona eufótica.

$$P^B(h) = \int_0^{z_{\text{euf}}} P^B(z) dz \quad (dz = 0.01 \text{ m})$$

Si se realizan curvas P-I y se conoce el coeficiente de atenuación PAR a varias horas del día (p.ej. 06:00, 12:00, 18:00 y 20:00) o se asume que éstos no varían en ese periodo, se puede calcular la tasa fotosintética diaria  $P^B(d)$  en  $\text{mg C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ , integrando  $P^B(h)$  en el tiempo:

$$P^B(d) = \int_{06:00}^{20:00} P^B(t) dt \quad (dt = 1 \text{ h})$$

TÉCNICAS DE ESTIMACIÓN DE LA PRODUCCIÓN PRIMARIA. Los dos métodos más comunes para estimar la producción primaria consisten en medir la incorporación de carbono inorgánico o la liberación de oxígeno, en un tiempo determinado (Dokulil 1984b). Ambos se realizan en muestras de agua contenidas en botellas de vidrio o cuarzo. Este último permite el pasaje de toda la radiación solar, incluida la ultravioleta, por lo que es recomendado para simular las condiciones reales de iluminación. La incubación se puede realizar *in situ* o en el laboratorio bajo radiación artificial.

En el primer caso, se debe realizar un perfil de la intensidad de luz (Cap. 3) al inicio del experimento, a efectos de ubicar las botellas a distintas profundidades en la zona eufótica (p. ej. en superficie, al 50, 10 y 1% de la luz superficial). Para esto existen diversos diseños de soportes (Holm-Hansen & Helbling 1995) tendientes a evitar el ensombrecimiento de las botellas.

En el segundo, pueden utilizarse mallas plásticas o metálicas neutras que filtran todo el espectro en forma similar para producir el gradiente de radiación deseado. Se detallan a continuación los dos métodos mencionados y se presentan referencias de métodos alternativos para la evaluación de la producción primaria acuática.

### 13.6.1. MÉTODO DEL OXÍGENO

Este método también ha sido denominado de las botellas claras y oscuras y fue propuesto inicialmente por Gaardner & Gran en 1927 (Dokulil 1984b). Se basa en estimar la tasa fotosintética mediante la cuantificación del oxígeno liberado durante la primer fase de la fotosíntesis. La determinación del oxígeno al inicio ( $O_i$ ) y al final de la incubación en el agua de cada botella clara ( $O_c$ ) y oscura ( $O_o$ ) permite diferenciar la producción bruta ( $O_c - O_o$ ) de la neta ( $O_c - O_i$ ) al conocer el consumo por respiración ( $O_i - O_o$ ) y el tiempo de incubación ( $t$ ).

La producción bruta será la suma de la producción neta y la respiración:

$$(O_c - O_o)/t = (O_c - O_i)/t + (O_i - O_o)/t$$

El método asume que las pérdidas de oxígeno en la botella oscura se deben a respiración fitoplanctónica, siendo despreciable el aporte de otros organismos (zooplancton y bacterias). Es un método sencillo, pero sensible sólo a concentraciones de clorofila superiores a  $5 \mu\text{g l}^{-1}$ . Otras desventajas consisten en la posible formación de burbujas durante la incubación, y a que la respiración en la botella oscura se deba a una acumulación de organismos no fitoplanctónicos. Una descripción detallada del método se encuentra en Strickland & Parsons (1972).

#### *Procedimiento*

- 1) Tomar una muestra de agua con botella muestreadora oscura a la profundidad deseada. Llenar cuidadosamente botellas tipo DBO de 120-300 ml (5 claras y 2 oscuras) evitando la formación de burbujas.
- 2) Evitando la radiación solar directa, fijar inmediatamente dos muestras claras con los reactivos 1 y 2 de Winkler (Cap. 7).
- 3) Incubar las 3 botellas claras y 2 oscuras restantes a la profundidad de muestreo durante 3 a 5 horas. Las incubaciones deben realizarse entre las 10:00 y 14:00 h, bajo radiación solar máxima. Controlar periódicamente las botellas, desechando muestra que presenten burbujas debido a una alta tasa fotosintética.
- 4) Al finalizar la incubación, fijar las muestras con los reactivos 1 y 2 de Winkler, evitando la exposición directa al sol. Determinar la concentración de oxígeno en cada botella de acuerdo al método de Winkler (cap. 7).
- 5) Calcular la producción bruta, la producción neta y la respiración de acuerdo a la fórmula detallada arriba.

### 13.6.2. MÉTODO DEL $^{14}\text{C}$

Este método fue desarrollado por Steemann-Nielsen (1952) y se basa en determinar el carbono inorgánico disuelto (CID) incorporado fotosintéticamente por el fitoplancton en un periodo de tiempo determinado. Mediante este método se estima la producción neta, desconociéndose la producción bruta y la respiración.

Una cantidad conocida de  $^{14}\text{C}$  es agregada a la muestra, en la que se conoce el  $^{12}\text{C}$  disponible. Se asume que la relación entre el  $^{12}\text{C}$  asimilado y el disponible es igual a la que existe entre el  $^{14}\text{C}$  asimilado y el disponible. Se incuban botellas claras y oscuras de 125 ml (aguas oligotróficas) o 60 ml (aguas eutróficas). En las botellas oscuras se estima la fijación de  $^{14}\text{C}$  realizada en oscuridad por algas, bacterias y otros heterótrofos (fijación no fotosintética). Su valor no está relacionado con la respiración y se resta a la incorporación de las botellas claras.

#### *Preparación de la solución de $^{14}\text{C}$*

Es recomendable preparar una solución de trabajo a partir de una solución stock concentrada de  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ . Con la solución de trabajo, que se puede conservar a temperatura ambiente en la oscuridad, se preparan las soluciones de campo antes de cada experimento. La solución de campo deberá tener una concentración de 300 a 500  $\mu\text{Ci}$  cada 500  $\mu\text{l}$ . Un  $\mu\text{Ci}$  equivale a  $2.2 \times 10^6$  desintegraciones por minuto (DPM). La vida media (tiempo de semidesintegración) del  $^{14}\text{C}$  es 5200 años, por lo que no hay decaimiento significativo del isótopo durante los experimentos.

Todas las soluciones de  $^{14}\text{C}$  deben tener un pH cercano a 8.3, para que domine el  $\text{HCO}_3^-$ , la forma disponible a las algas, y para evitar perder  $^{14}\text{C}$  debido a la volatilización que se da a pH menor a 6.3. El agua destilada para las soluciones debe ser fresca, filtrada por una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  y esterilizada 15 min en autoclave a

1 atm, que se deja enfriar y se toma una submuestra para controlar el pH. De lo contrario se puede utilizar agua tipo MilliQ®.

Las soluciones se deben preparar en una campana de gases en condiciones asepticas, y guardarse en recipientes con tapa hermética. Todo el material debe estar esterilizado (incluyendo las puntas de las pipetas automáticas) y etiquetado. Se deben utilizar guantes desechables de látex durante todos los procedimientos.

El material sucio se lava con HCl 25% y se deja burbujeando al menos 12 h. El material contaminado debe acumularse en un recipiente debidamente etiquetado, para luego ser trasladado al Centro de Investigaciones Nucleares (Facultad de Ciencias), organismo encargado del manejo de los desechos radiactivos.

Se han desarrollado dos variantes de la misma técnica que difieren en el tratamiento de las muestras luego de la incubación (Gätcher *et al.* 1984).

1) *Filtración*. La muestra se filtra por una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, y se cuantifica solamente el carbono orgánico particulado (COP) retenido en el filtro. Más detalles pueden consultarse en Holm-Hansen & Helbling (1995).

2) *Acidificación y burbujeo*. Se elimina el  $^{14}\text{C}$  inorgánico disuelto que quedó remanente en la muestra y se cuantifica el COP y el carbono orgánico disuelto (COD) en conjunto. A continuación se describen los pasos de esta técnica.

#### *Procedimiento*

- 1) Llenar con agua de la muestra tres cuartas partes de al menos tres botellas claras y dos botellas oscuras de 60 ml.
- 2) Inocular cada botella con 500  $\mu\text{l}$  de solución de campo de  $^{14}\text{C}$  con pipeta automática, cuidando que la punta no toque la muestra. Completar el llenado de las botellas con la muestra, evitando la formación de burbujas, ya que el carbono radioactivo podría liberarse como  $\text{CO}_2$ . Taparlas e instalarlas inmediatamente en los soportes de incubación a la profundidad deseada.
- 3) Incubar de 2 a 4 horas entre las 10:00 y las 14:00 h, dependiendo de la concentración fitoplanctónica.
- 4) Finalizar la incubación fijando las muestras con 1 ml de formol puro (formaldehído 40%) neutralizado. Algunos autores sugieren no utilizar fijadores, realizando el análisis inmediatamente, antes de la hora de finalizada la incubación (Holm-Hansen & Helbling 1995), manteniendo las muestras en oscuridad.
- 5) Una vez en el laboratorio, agitar suavemente cada botella hasta asegurar su homogeneización. Con pipeta automática tomar 2 o 3 submuestras de 5 ml, y colocarlas en viales de centelleo de 20 ml con tapa rosca.
- 6) Agregar 100  $\mu\text{l}$  de HCl para que el descenso del pH permita la transformación a  $\text{CO}_2$  del carbono radioactivo que no ha sido incorporado, el que pasará a la atmósfera. Burbujear 15 a 20 min para acelerar la remoción del  $\text{CO}_2$ . Se puede construir una caja de acrílico que conduzca una corriente de aire a presión hacia tips que burbujeen dentro de cada vial. Alternativamente se puede dejar los viales abiertos durante 24 h. Al finalizar el burbujeo, en la muestra quedarán solamente las dos fracciones de carbono orgánico (COP y COD). Es importante mantener la campana de gases encendida y cerrada durante este proceso.
- 7) Agregar 5 ml de cocktail de centelleo (tipo ReadyGel Beckman® o similar) para muestras acuosas. Cerrar y homogeneizar con agitación fuerte en un vortex hasta obtener una consistencia gelatinosa. No colocar marcas en las caras laterales de los viales, que deben etiquetarse en sus tapas.
- 8) Luego de 2 y antes de 48 h, medir la radiactividad en un contador de centelleo que incluya el rango completo de energía de las partículas beta emitidas por el

<sup>14</sup>C. Es conveniente utilizar un programa que exprese los resultados en DPM. El tiempo de conteo de cada muestra no debe ser menor a 5 min.

- 9) La producción primaria neta ( $\mu\text{g C l}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) será:

$$(\text{CID} \times 1.06 \times (\text{DPM}_c - \text{DPM}_o) / \text{DPM}) \times 200 / t$$

donde CID es la cantidad de carbono inorgánico disuelto ( $\mu\text{g}$ ) en 5 ml, calculado a partir del pH y la alcalinidad (Cap. 10), 1.06 la corrección isotópica (el <sup>14</sup>C es asimilado 6% menos que el <sup>12</sup>C), DPM<sub>c</sub>, DPM<sub>o</sub> y DPM, las desintegraciones por minuto en 5 ml de agua de la botella clara, oscura y disponibles, respectivamente, 200 el factor para expresar el resultado en l l y t el tiempo de incubación (h).

### 13.6.3. OTROS MÉTODOS

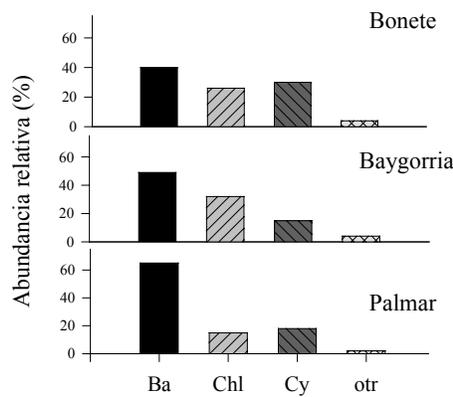
Los numerosos métodos descritos para estimar la producción primaria se pueden clasificar en tres grupos:

- 1) *In vitro*. Las estimaciones se realizan encerrando la muestra en botellas de vidrio o cuarzo. Incluye, además de los dos métodos descritos, la asimilación de <sup>15</sup>NO<sub>3</sub> (Peña & Harrison 1995) y de <sup>15</sup>NH<sub>4</sub> (Legendre & Gosselin 1996).
- 2) Basados en las propiedades del medio, por ejemplo los cambios químicos producidos por los organismos: flujo de NO<sub>3</sub>, acumulación neta de O<sub>2</sub> en la zona eufótica, relación <sup>238</sup>U/<sup>234</sup>Th, etc. (Platt & Sathyendranath 1993).
- 3) Ópticos. Estos métodos han comenzado a ser muy utilizados recientemente. Se basan en las relaciones fisiológicas existentes entre la absorción de la radiación, la fluorescencia y la fotosíntesis (fluorescencia doble-flash, fluorescencia pasiva, sensoramiento remoto). Estos métodos realizan estimaciones *in situ* y en forma instantánea. Los métodos de fluorescencia se basan en que la tasa fotosintética está dada por el número de centros de reacción en la membrana tilacoidea y la tasa de transporte de electrones. Estimando la fluorescencia se puede conocer la fracción de centros reactivos abiertos o cerrados. Estos métodos proporcionan la tasa instantánea de producción primaria bruta en ambientes naturales. Por más información, se puede consultar Platt & Sathyendranath (1993) y Falkowski & Raven (1997).

## 13.7. RESULTADOS

La elevada turbidez y la mezcla continua de la columna de agua en los embalses de río Negro favorecen el desarrollo de las diatomeas (Bonilla 1997), que es el grupo de microalgas planctónicas comúnmente dominante (Fig. 13.4, pág. siguiente). Entre éstas predominan *Aulacoseira granulata* y *A. italica*, características de los grandes sistemas lóticos de la región. En efecto, estos embalses se comportan como sistemas fluviales en cuanto a la estructura del fitoplancton.

En la figura 13.5 (pág. siguiente) se observa la variación de la abundancia y del biovolumen del fitoplancton en el lago Ton Ton (Canelones). La falta de correspondencia entre ambas variables refleja la diferencia de tamaños de las especies dominantes en los distintos meses. Mientras en abril ocurrió el máximo biovolumen de-



bido a pocos individuos de gran tamaño, en marzo se registró la mayor abundancia con organismos de menor tamaño.

Figura 13.4. Composición del fitoplancton en tres embalses en cadena del río Negro. Ba: Bacillariophyceae, Chl: Chlorophyta, Cy: Cyanobacteria, otr: otros grupos (Bonilla 1997).

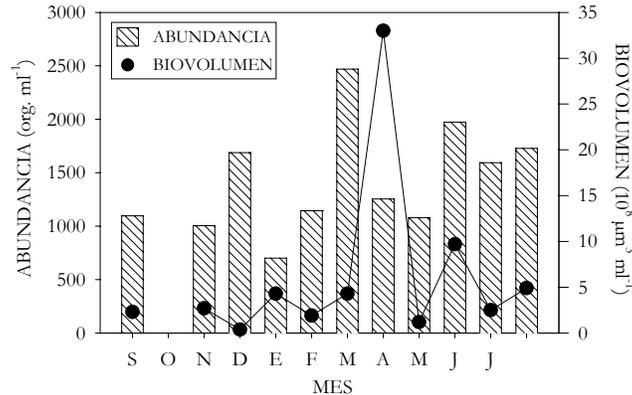


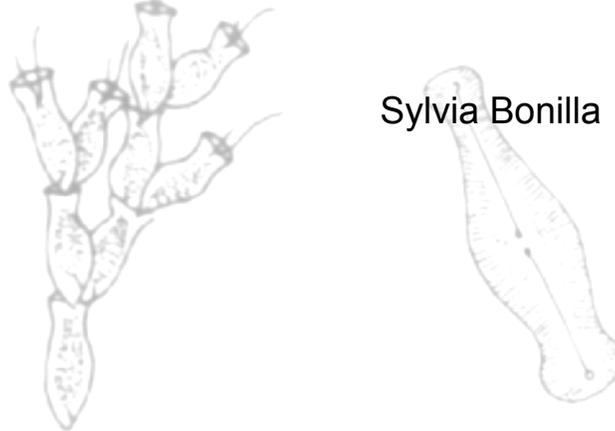
Figura 13.5. Variación anual de la abundancia y biomasa fitoplanctónicas en el lago Ton Ton entre setiembre de 1988 y agosto de 1989 (a partir de De León 1993).

En la tabla 13.1 se presentan valores de biomasa y producción algal de sistemas polimícticos de Uruguay, los que se caracterizan por una mayor profundidad en el caso de los embalses, y por la salinidad en el caso de las lagunas costeras. Los máximos de clorofila *a* y de producción primaria registrados para la laguna de Castillos corresponden a una floración de *Nodularia spumigena* (Cyanobacteria).

Tabla 13.1. Rangos de concentración de clorofila *a* (Clo *a* en μg l<sup>-1</sup>) y producción primaria (PP en mg C m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>) del fitoplancton del Embalse Rincón del Bonete y las lagunas costeras de Rocha y Castillos.

AMBIENTE	Clo <i>a</i>	PP	PERIODO	FUENTE
Rincón del Bonete	20 - 25 5.3 - 9.0	sin datos	3/95 - 12/95	Conde <i>et al.</i> 1995
Laguna de Rocha	1.5 - 22.6 1.8 - 11.7	2.3 - 45.7	rango 1996 rango 1997	Conde <i>et al.</i> 1999
Laguna de Castillos	1.2 - 74.4	3.3 - 93.3	10/96 - 2/97	Bonilla <i>et al.</i> 1997

### *EPIFITON ALGAL*



MIENTRAS QUE EL PERIFITON COMPRENDE LOS MICROORGANISMOS ASOCIADOS a un sustrato cualquiera (Wetzel 1983), el epifiton incluye solamente aquéllos que viven sobre macrófitas acuáticas (plantas o macroalgas). Este es un sustrato relativamente firme y con una alta actividad metabólica, pudiendo existir interacción entre ambos tipos de organismos como liberación de aleloquímicos, nutrientes, etc. (Round 1973, Stevenson 1996).

Los grupos algales más comunes en el epifiton son Bacillariophyceae, Chlorophyta y Cyanobacteria. También pueden encontrarse especies de Chrysophyceae y Rhodophyta, aunque generalmente con una baja abundancia relativa. Las especies que forman parte del epifiton pueden crecer en forma postrada o erecta sobre el sustrato (Haines *et al.* 1983), lo que determinará su mayor o menor resistencia a los movimientos del agua y al pastoreo por invertebrados.

#### 14.1. ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO

Diversas técnicas pueden ser utilizadas en el estudio de la comunidad epifítica, dependiendo de los objetivos de la investigación, el tipo de sustrato y la densidad de organismos presentes (Schwarzbold 1990). En general, el análisis cualitativo y cuantitativo de las muestras está basado en la modificación de técnicas utilizadas para el estudio del fitoplancton.

En el estudio del epifiton se pueden utilizar comunidades naturales o desarrolladas sobre un sustrato artificial. Los sustratos artificiales se utilizan para reducir la variabilidad de las muestras, conocer el tiempo de desarrollo del epifiton o estandarizar la comparación entre distintos hábitats. Son mayormente utilizados en estudios de sucesión y evaluación de respuestas frente a condiciones experimentales.

Los sustratos artificiales pueden ser de superficie rugosa (acrílico, cerámica, ladrillo, roca) o lisa (vidrio). Este último es el más utilizado, por ser inerte, económico y facilitar la extracción del epifiton. Sin embargo, los sustratos rugosos se aproximan más a las características físicas de la superficie de plantas o macroalgas.

La posición del sustrato artificial en la columna de agua puede ser horizontal o vertical, siendo esta última más recomendable ya que evita la sedimentación del material detrítico y favorece el desarrollo de algas con sistemas de adhesión. Los sistemas de colocación de los sustratos artificiales en el agua generalmente incluyen una boya, un soporte sumergido sobre el que se colocan varias unidades del sustrato y una pesa que fija el sistema al fondo. Algunos ejemplos se encuentran en Rieder (1993) y en las recopilaciones de Schwarzbald (1990) y Tell & Lopretto (1995).

#### 14.1.1. MUESTREO

La obtención del epifiton se realiza en dos etapas: 1) muestreo del sustrato con el epifiton asociado y 2) extracción de éste en el laboratorio. El muestreo se realiza colectando la parte sumergida de la planta, colocándola *in situ* en un recipiente con tapa conteniendo agua del lugar hasta su procesamiento en el laboratorio, cuidando de evitar el desprendimiento del epifiton (Aloi 1990, Kornijów & Kairesalo 1994).

A diferencia del fitoplancton, para el cual es posible asumir una distribución homogénea de los organismos, en el epifiton la distribución es agregada, por lo que el número mínimo de muestras requerido debe ser cuidadosamente considerado en cada caso en base a estudios piloto. En general se utiliza un tamaño de muestra de entre 3 y 10 réplicas de 5 a 15 cm<sup>2</sup> de área (Aloi 1990). Morin & Cattaneo (1992) realizan una revisión sobre el tamaño de muestra apropiado.

#### 14.1.2. EXTRACCIÓN Y PRESERVACIÓN

En ocasiones es necesario observar el epifiton intacto sobre el sustrato para registrar la estructura de la comunidad algal. Para ello, se utiliza principalmente microscopía electrónica de barrido.

La metodología de extracción depende de la resistencia mecánica del sustrato, y en general ninguna técnica es totalmente satisfactoria (Delbecque 1985, Aloi 1990, Rieder 1993). Existen métodos mecánicos como el raspado con pinceles o espátulas de borde romo. Este método, uno de los más utilizados, es apropiado para sustratos firmes y de superficie lisa, como *Scirpus*, *Phragmites* y *Typha*. El desprendimiento del epifiton mediante agitación manual se utiliza en caso de sustratos delicados como *Ulva*, *Salvinia*, *Ricciocarpus* y *Myriophyllum*. Los métodos químicos incluyen:

- a) Alcohol-Formol-Ácido acético (AFA): es un fijador que actúa hidrolizando las estructuras mucilaginosas de adhesión del epifiton, facilitando su desprendimiento del sustrato. Es útil para sustratos frágiles y se puede combinar con la agitación.
- b) Oxidación: si el estudio se restringe al análisis de diatomeas, la planta puede ser oxidada por completo, obteniendo los frústulos limpios (ver cap. 13).
- c) Película superficial: este método se basa en la solidificación de una sustancia sobre el epifiton, que luego es retirada desprendiendo la capa algal. Se utilizan diversas sustancias, incluidas máscaras faciales.

Las muestras se fijan con formol 5% neutralizado en un volumen conocido. Paralelamente se debe estimar el área de sustrato muestreado a los efectos de relacionar el área del sustrato con el volumen de la muestra fijada.

#### 14.1.3. IDENTIFICACIÓN Y CONTEO

El epifiton está formado por organismos cuyo tamaño difiere en varios órdenes de magnitud, por lo que se deben utilizar métodos de identificación y cuantificación apropiados para cada clase de tamaño. Los métodos de cuantificación dependen de la abundancia y tipo de algas dominantes. La unidad de conteo puede ser la célula, la colonia o el filamento.

La identificación de algas verdes (Chlorophyta) de gran talla requiere el análisis a bajo aumento (100 o 200%), a efectos de caracterizar la morfología general del talo. Entre otros, interesa conocer el tipo de ramificación y el desarrollo de la zona basal. La determinación específica de la mayoría de los taxa se realiza en base a los mismos criterios que para el fitoplancton (cap. 13). Sin embargo, la identificación específica de algunas Chlorophyta filamentosas se basa en estructuras de reproducción sexual, no siempre presentes. Las diatomeas se identifican por la estructura de los frústulos, aunque es importante la observación del material sin tratar para determinar la forma de las colonias (en empalizada, roseta o cordones), así como el tipo de adhesión. La cuantificación de la muestra se realiza partiendo del material algal fijado en un volumen conocido de muestra, mediante el método de Utermöhl desarrollado para fitoplancton (cap. 13), que por ser un método de concentración es útil cuando la abundancia epifítica es muy baja. Es posible utilizar cámaras de 1 ml (tipo Kolkwitz) cuando la abundancia es alta. En todos los casos es necesario la homogeneización previa de la muestra para dispersar los agregados algales (Biggs 1987). El número de campos aleatorios a cuantificar se determina igual que para el fitoplancton. El número de células por  $\text{cm}^{-2}$  será:

$$(N \text{ AF } V) / (AC \text{ na } v \text{ A})$$

donde N es el número de células, colonias o filamentos contados, AF el área de la cámara ( $\text{mm}^2$ ), V el volumen de muestra (ml), AC el área del campo aleatorio ( $\text{mm}^2$ ), na el número de campos contados, v el volumen de la cámara (ml) y A el área del sustrato ( $\text{cm}^2$ ).

## 14.2. BIOMASA

### 14.2.1. BIOVOLUMEN

Debido a las diferencias de talla existente entre los organismos del epifiton, su enumeración refleja en forma indirecta la contribución de cada especie a la biomasa total. Para resolver esto, un método utilizado es el cálculo del biovolumen a partir de los conteos y las dimensiones celulares (Stevenson 1996). Se debe medir el largo y ancho de 10-30 células por especie, y con el promedio se calcula el volumen de una forma geométrica aproximada y sencilla (Rott 1981).

### 14.2.2. CLOROFILA

La clorofila *a* se utiliza como un indicador indirecto de la biomasa algal y, al igual que para el fitoplancton, varios solventes han sido propuestos para su extracción. Partiendo de la metodología descrita en el capítulo 13, la fórmula de cálculo es modificada, siendo la concentración de clorofila *a* (Clo *a*) en  $\text{mg m}^{-2}$ :

$$\text{Clo } a = 29.6(A_{665} - A_{750}) - (Aa_{665} - Aa_{750})v10/A$$

donde 29.6 es el factor basado en el coeficiente de absorción específico de la clorofi-

la  $a$  en etanol,  $A_{665}$  y  $A_{750}$  las absorbancias a 665 y 750 nm antes de la acidificación,  $Aa_{665}$  y  $Aa_{750}$  las mismas luego de la acidificación,  $v$  el volumen del extracto (ml) y  $A$  el área de la muestra ( $\text{cm}^2$ )

### 14.3. PRODUCCIÓN PRIMARIA

La estimación de la producción primaria del epifiton se realiza en experimentos de corto plazo *in vitro* como se ha descrito para el fitoplancton (ver 13.5.2). Estos se pueden desarrollar con muestras de epifiton extraídas del sustrato, en donde se altera la estructura natural de la comunidad algal. Por el contrario, se puede utilizar el sustrato con el epifiton intacto, para lo cual puede utilizarse sustratos artificiales. En general se recomienda realizar de tres a cinco réplicas.

La técnica recomendada para evaluar la producción primaria de epifiton es la incorporación de  $^{14}\text{C}$  (Kairesalo 1983, Aloí 1990). Se utilizan botellas de 60 ml en donde se coloca agua filtrada del lugar y el sustrato con el epifiton. Se inoculan de 2 a 4  $\mu\text{Ci}$ , dependiendo de la concentración de la biomasa algal, y las botellas se disponen en soportes *in situ* manteniendo la posición original del sustrato con respecto a la superficie del agua y el ángulo solar. El tiempo de incubación depende de la concentración de biomasa, siendo similar a lo utilizado para fitoplancton (ca. 2 h). Luego de fijado con 500  $\mu\text{l}$  de formalina para finalizar el experimento, se debe extraer cuidadosamente el epifiton asociado mediante raspado mecánico. Se debe controlar que no se haya desprendido parte del epifiton durante la incubación, el que puede colectarse por filtración. El material obtenido se coloca en un vial de centelleo y se procesa como se ha descrito para el fitoplancton (ver 13.5.2 puntos 6 a 8). La producción primaria (P) del epifiton, estimada en  $\text{mg C m}^{-2} \text{h}^{-1}$  será:

$$P = \frac{{}^{14}\text{C}_i \text{ CT } 1.064}{{}^{14}\text{C}_a t A}$$

donde  $^{14}\text{C}_i$  es el carbono radioactivo incorporado (en DPM),  $^{14}\text{C}_a$  el carbono radioactivo añadido (en DPM), CT el carbono total disponible ( $^{12}\text{C}$ ) en la botella ( $\text{mg l}^{-1}$ ),  $t$  el tiempo (horas) y  $A$  el área del sustrato ( $\text{m}^2$ ) incubado. Los resultados se deben expresar por unidad de biomasa (clorofila  $a$ ). Las curvas P-I se construyen en base a los mismos puntos detallados para el fitoplancton.

### 14.4. RESULTADOS

En la zona litoral de las lagunas costeras del sureste de Uruguay existen poblaciones de macrófitas emergentes que actúan como sustrato para el desarrollo del epifiton. En la laguna de Rocha esta zona está restringida al norte, área de menor influencia oceánica. Las especies epifíticas más comunes presentes en el junco *Schoenoplectus californicus* en la laguna de Rocha son *Enteromorpha flexuosa*, *Spirogyra* sp., *Tabularia fasciculata*, *T. affinis*, *Gomphonema* spp., *Mastogloia* spp., *Navicula perminuta* y *Nitzschia palea*. En términos generales, la biomasa algal y su producción primaria (Tabla 14.1, pág. siguiente) es mayor en dicha zona que en la laguna de Castillos.

Tabla 14.1. Concentración de clorofila  $a$  (Clo  $a$  en  $\text{mg m}^{-2}$ ) y producción primaria (PP en  $\text{mg C m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) del epifiton algal sobre *Schoenoplectus californicus*, en la laguna de Castillos

y en el norte de la laguna de Rocha.

AMBIENTE	Clo $\alpha$	PP	PERIODO	FUENTE
Laguna de Rocha	28.6 - 178.4	4.2 - 5.8	4/96 - 9/96	Bonilla 1998
Laguna de Castillos			1996 - 1997	
norte	1.3 - 58.8	0.4 - 5.3		Conde <i>et al.</i> sin publ.
sur	0.7 - 61.4	1.8 - 88.6		Conde <i>et al.</i> sin publ.

# MICROFITOBENTOS

Daniel Conde



LOS SEDIMENTOS ACUÁTICOS SOMEROS SON UN HÁBITAT PROPICIO PARA una gran variedad de microorganismos autotróficos, fundamentalmente diatomeas pennadas, cianobacterias, bacterias fotosintéticas y algunos flagelados. Esta comunidad se denomina genéricamente microfítobentos. En los ambientes lénticos con sedimentos arenosos usualmente dominan diatomeas pequeñas inmóviles (*epipsa-mon*), mientras que grandes diatomeas móviles y cianobacterias lo hacen en sedimentos más finos (*epipelon*). La microflora que se desarrolla sobre sustratos rocosos (*epíliton*) es exclusiva de los primeros tramos de las aguas corrientes. Los valores de abundancia, biomasa y productividad por unidad de área del microfítobentos en los sistemas lénticos puede superar en varios órdenes de magnitud a los del fitoplanc-ton, especialmente en ambientes de alta transparencia a la radiación solar (Hargrave *et al.* 1983). En sedimentos arenosos, 1% de la luz disponible en superficie se encuentra a 3-5 mm de profundidad, mientras que en sedimentos con mayor contenido de limo y arcilla está a sólo 1 mm (Lassen *et al.* 1992). En el presente capítulo se describen los procedimientos de muestreo del microfítobentos, así como diversas técnicas para estimar su abundancia, biomasa y producción primaria. La identificación taxonómica se realiza con claves específicas por grupo (ver 13.2.4).

### 15.1. MUESTREO

Debido a que los parámetros que permiten explicar la dinámica del microfítobentos varían espacialmente en términos de micras, es crucial reducir los disturbios provocados por las técnicas de muestreo. Con este objetivo, el uso de tubos cilíndricos de acrílico (*corer*) es preferible al uso de dragas, debido a que las muestras obtenidas con estas últimas no preservan el perfil original del sedimento.

#### *Procedimiento*

- 1) Obtener en forma manual o desde la superficie con muestreador tipo Kajak o manualmente, al menos 3 réplicas de sedimento usando *corers* de acrílico de aproximadamente 6 cm de diámetro. Si se realiza un muestreo manual, cerrar el *corer* debajo del agua por ambos extremos con tapones de goma. Si el muestreo es con equipo tipo Kajak, cerrar el *corer* por el extremo inferior antes de retirarlo del equipo.
- 2) Mantener el *corer* tapado en posición vertical, con el agua sobrenadante y en oscuridad a 4 °C hasta su procesamiento. Si la muestra se destina al análisis de pigmentos y no va a ser procesada inmediatamente, congelarla a -20 °C. De esta forma puede ser almacenada durante algunos meses.
- 3) Lo antes posible, y en condiciones de baja luminosidad, eliminar el agua sobrenadante sifonando con un tubo de goma fino, evitando remover la superficie del sedimento. Retirar la última capa del agua sobrenadante con una pipeta.
- 4) Colocar nuevamente el tapón superior en el *corer*, retirar el tapón inferior y con la ayuda de un pistón empujar la columna de sedimento, previo retiro del tapón superior, hasta que la superficie del mismo asome 0.5 a 1 cm por encima del borde superior. Retirar la porción central de la capa superior con la ayuda de una espátula metálica. Con una lámina metálica retirar y descartar el resto de la capa. De ser necesario un estudio en profundidad, repetir el procedimiento cada 0.5 o 1 cm, hasta completar el perfil, cuya profundidad dependerá de los objetivos de la investigación.

## 15.2. ABUNDANCIA

La mayoría de los métodos para la estimación de la abundancia y la biomasa del microfitorobentos son modificaciones de técnicas originalmente desarrolladas para algas planctónicas. Se presentan técnicas para enumerar la abundancia de células totales (Snoejis *et al.* 1990) y de frústulos de diatomeas (Sündback & Snoejis 1991). Otras técnicas para trabajar con diatomeas en sedimentos fangosos pueden consultarse en Admiraal *et al.* (1982). Para separar algas de sedimentos fangosos mediante fototaxis puede seguirse el procedimiento descrito por Antoine & Benson-Evans (1985).

### 15.2.1. ABUNDANCIA DE CÉLULAS VIVAS

#### *Procedimiento*

- 1) Colectar 3 réplicas de sedimento como se describe en 18.1. Del centro retirar una muestra del sedimento superficial (5 mm si es arenoso o 2-3 mm si es fangoso) con la ayuda de una lámina metálica. Colocar en caja de Petri o vaso de bohemía pequeño y homogeneizar con espátula. En otras 3 réplicas estimar el contenido de agua del sedimento (ver 6.4.1).
- 2) Del homogeneizado tomar 3 submuestras de 0.5 a 2 g de acuerdo a la abundancia esperada, colocar en tubo de vidrio o plástico de 25 ml con tapa rosca, pesar y diluir con 3 a 6 ml de agua del lugar de muestreo filtrada por GF/C. Sonicar a *ca.* 35 kHz en un baño de ultrasonido durante algunos minutos (5 a 10) o a intensidad intermedia durante 1 min en sonicador provisto de tip. Se deberá calibrar el tiempo de sonicación de acuerdo a cada tipo de sedimento y abundancia algal, graficando el número de algas vivas presentes en el agua en función del tiempo.
- 3) Agitar manualmente en forma vigorosa durante 1 min. Colocar en un hemocitómetro un volumen conocido de 1 a 5  $\mu$ l, dependiendo de la abundancia. Contar todas las células con cloroplastos fluorescentes en un microscopio de epifluorescencia a 400 aumentos. Agrupar las células por clases de tamaño de acuerdo a

su largo mediante el uso de reglillas graduadas (menor a 4, de 4 a 10, 11 a 20, 21 a 30 y mayores a 30  $\mu\text{m}$ ) y registrar el número de diatomeas muertas (frústulos sin cloroplastos fluorescentes).

- 4) Calcular la abundancia de cada clase de tamaño de acuerdo al volumen contado, las diluciones realizadas, el peso del sedimento submuestreado y su contenido de agua.
- 5) Estimar en al menos 30 células de cada clase de tamaño (15 para los grupos menos frecuentes) el volumen celular promedio usando fórmulas geométricas (Edler 1979). El factor para convertir volumen celular a contenido de carbono varía entre 0.085 y 0.11 (0.085 a 0.089 para diatomeas).

### 15.2.2. ABUNDANCIA DE FRÚSTULOS DE DIATOMEAS

#### *Procedimiento*

- 1) Colectar y procesar 3 réplicas de sedimento como en el punto anterior. Del homogeneizado tomar 3 submuestras y pesar 0.1 a 0.5 g dependiendo de la abundancia celular. Colocar las submuestras en tubos de centrifuga de 15 ml.
- 2) Agregar 0.5 ml de peróxido de hidrógeno y aproximadamente 0.1 g de bicromato de potasio para destruir el material orgánico y desagregar las células de los granos de sedimento. Lavar las muestras, centrifugando 3 veces con 10 ml de AD, a 1500-2000 rpm durante 2 min. Agregar 3 ml de AD. Agitar en vortex y, tras decantar durante 5-10 s, coleccionar la suspensión con pipeta. Repetir el último paso 6 veces y mezclar las submuestras.
- 3) Colocar una gota de la mezcla sobre un cubreobjetos lavado con etanol 96% y dejar secar. Usar Hyrax<sup>®</sup> (índice de refracción 1.71) como medio de montaje. Utilizando contraste de fase y un objetivo de 100 aumentos de inmersión en aceite, identificar los frústulos de diatomeas utilizando claves específicas (ver 13.2.4).
- 4) Contar 500 valvas a lo largo de un transecto en el centro del preparado, agrupando por clases de tamaño. Calcular la abundancia de cada clase de tamaño de acuerdo al volumen contado, las diluciones realizadas, el peso del sedimento submuestreado y su contenido de agua.

### 15.3. BIOMASA

La concentración de pigmentos fotosintéticos en el sedimento ha sido comúnmente usada como indicador de la biomasa algal, a pesar de la baja correlación encontrada entre clorofila *a* y número de células, o la alta variabilidad de la relación carbono:clorofila *a* típica de las diatomeas. La cuantificación de clorofila *a* en sedimentos puede realizarse por espectrofotometría, fluorometría o cromatografía. Mientras los dos primeros métodos tienden a sobrestimar las concentraciones debido a la presencia de productos de degradación, la cromatografía, que brinda resultados más precisos, continúa siendo muy costosa para análisis de rutina (Riaux-Gobin & Klein 1993). Se presenta a continuación el procedimiento de extracción con acetona, una modificación para muestras con alta concentración de productos de degradación y referencias para procedimientos fluorométricos y cromatográficos.

#### 15.3.1. CLOROFILA *a*

El siguiente es el método de extracción original con acetona 90% descrito por Lorenzen (1967) para plancton, con leves modificaciones para muestras de sedimentos. El principio del método se explicita en el capítulo 13.

#### Procedimiento

- 1) Colectar 3 réplicas de sedimento y procesar como se describe en el punto 1 de la sección 18.2.1.
- 2) Del homogeneizado pesar 3 submuestras de *ca.* 1 g de sedimento fresco con precisión de décimas de mg y colocar en tubos de vidrio o plástico de 25-50 ml con tapa rosca. Evitar temperaturas altas y luz intensa directamente sobre la muestra.
- 3) Agregar 18 ml de acetona 90% (si el sedimento es muy acuoso, ajustar la cantidad de acetona para obtener una concentración final de 90%) y mezclar en vortex. En sonicador, tratar la muestra durante 2 min a una intensidad intermedia, colocando la muestra en un baño de hielo durante el procedimiento. Extraer durante 12 a 24 h en oscuridad a 4 °C. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 min y filtrar el sobrenadante por filtro GF/C.
- 4) Leer la absorbancia del filtrado a 665 y 750 nm en cuvetta de 1 a 5 cm, contra un blanco de acetona 90%. Acidificar el contenido de la cuvetta con *ca.* 120 µl de HCl 0.12 N, esperar 1 min. y medir nuevamente ambas absorbancias.
- 5) Calcular la concentración de clorofila *a* (Clo *a*) en µg g<sup>-1</sup> de peso fresco, usando la ecuación:

$$\text{Clo } a = 11.9 \times (A_{665} - A_{665a}) \times 2.43 \times v/L \times P$$

donde  $A_{665}$  y  $A_{665a}$  son las absorbancias antes y después de acidificar corregidas por el valor respectivo a 750 nm,  $v$  el volumen de acetona usado en la extracción (ml),  $L$  el trayecto óptico (cm) y  $P$  el peso (g) de sedimento fresco utilizado en la extracción.

### 15.3.2. CLOROFILA *a* EN MUESTRAS CON PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN

La presencia de diversos productos de degradación que absorben a la misma longitud de onda que la clorofila *a* (feofitinas, clorofilidas y feofórbidos), ha requerido el desarrollo de técnicas para corregir esta interferencia. A partir de un extracto en acetona, Whitney & Darley (1979) proponen una separación en fases de carotenos, clorofila *a* y *b* y feofitina *a* y *b*, clorofila *c*, algunos carotenoides y los productos de degradación de la clorofila sin cadena fitol (clorofilidas y feofórbidos *a* y *b*). La clorofila *a* puede ser determinada en una hiperfase de hexano (Parsons 1963) a partir de una leve modificación de la técnica de Lorenzen (1967).

#### Procedimiento

- 1) Colectar, procesar y realizar la extracción de clorofila *a* con acetona como en los puntos 1, 2 y 3 descritos en 18.3.1.
- 2) Tomar 10 ml del extracto y particionarlos en un embudo de separación con 3.5 ml de NaCl 0.05% y 13.5 ml de hexano puro. Agitar el embudo en forma semicircular (o en un agitador recíproco a 60 rpm) durante 5 min. Drenar la hipofase de acetona y recoger 2 alícuotas de 5 ml de la hiperfase de hexano en viales de 20 ml. Agregar una gota de HCl 50% a uno de los viales para convertir la clorofila en feofitina. Agregar 0.5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro a cada vial para secar el hexano.
- 3) Medir la absorbancia de ambas soluciones de hexano a 663 y 750 nm. Calcular las concentraciones de clorofila *a* (Clo *a*) y feofitina *a* (Feo *a*) en mg l<sup>-1</sup> de extracto según:

$$\begin{aligned}\text{Clo } a &= k \times A(A_{663} - A_{663a}) \times V/L \\ \text{Feo } a &= k \times A(R \times A_{663a} - A_{663}) \times V/L\end{aligned}$$

donde  $k$  es el factor de reducción de la absorbancia inicial de la clorofila (2.23/1.23 o 1.82),  $A$  el coeficiente de absorción de la clorofila  $a$  en la capa de hexano (11.05),  $R$  la relación de absorbancias a 663 nm antes y después de acidificar para la clorofila  $a$  pura (2.23),  $L$  el trayecto óptico (cm),  $A_{663}$  y  $A_{663a}$  las absorbancias antes y después de acidificar corregidas por el valor respectivo a 750 nm y  $V$  el factor de corrección del volumen entre las fases de hexano y acetona (1.6).

- 4) Expresar ambas concentraciones (Clo  $a$  y Feo  $a$ ) por g de sedimento fresco multiplicando por 0.018 l de acetona y dividiendo por el peso en g de sedimento utilizado en la extracción original con acetona.

### 15.3.3. CLOROFILA $a$ MEDIANTE OTROS MÉTODOS

Al igual que los métodos espectrofotométricos, los fluorométricos (Holm-Hansen *et al.* 1965, Lorenzen 1966) sobrestiman la concentración de clorofila  $a$ , aunque ofrecen rapidez, sensibilidad y facilidad para ser realizados *in situ*. A pesar del tiempo requerido para procesar una muestra mediante la cromatografía de alta performance (HPLC), ésta permite la separación simultánea de gran número de cloropigmentos y carotenoides, así como la obtención directa de sus concentraciones. La técnica original y modificaciones para la separación de pigmentos pueden encontrarse en Riaux-Gobin & Klein (1993) y Wright & Shearer (1984).

### 15.4. PRODUCCIÓN PRIMARIA

La productividad del microfitobentos, especialmente en ambientes acuáticos someros, puede representar entre 50 y 80% de la productividad primaria total (Sündback 1983). A diferencia del fitoplancton, cuya producción muestra una buena correlación con el estado trófico del medio, la productividad del microfitobentos se relaciona mejor con cambios en la radiación solar, y por lo tanto con la profundidad y turbidez del sistema. Los valores máximos se dan generalmente en primavera, asociados a un desarrollo masivo de diatomeas. La producción muestra un decrecimiento exponencial negativo en los primeros milímetros del sedimento, debido a la disminución de la radiación fotosintéticamente activa. Al igual que en el caso del fitoplancton, los dos métodos más usados para la determinación de la producción primaria del microfitobentos son la liberación de oxígeno y la fijación de  $^{14}\text{C}$  en tubos claros y oscuros. El primero presenta diversos problemas durante la titulación con tiosulfato, debido a la presencia de diversas sustancias provenientes del sedimento, por lo que se recomienda el uso del procedimiento con  $^{14}\text{C}$ . Se presenta la técnica descrita por Jönsson (1991), con leves modificaciones. Curvas P-I pueden construirse en base al mismo principio detallado en el capítulo 13 para muestras de fitoplancton. Sin embargo, en el diseño experimental debe tenerse en cuenta el problema del autosombreado que ejercen la comunidad superficial, en contacto directo con la radiación, sobre las algas ubicadas más abajo en el perfil.

#### INCORPORACIÓN DE $^{14}\text{C}$

##### *Procedimiento*

- 1) Colectar y procesar 4 réplicas de sedimento como se describe en 18.1. Simultáneamente a la colecta, tomar muestras de agua de fondo para determinar pH y alcalinidad, y registrar la temperatura y la radiación fotosintéticamente activa inmediatamente por encima del sedimento, usando un sensor  $\pi^2$  (ver 3.2).
- 2) De cada réplica retirar una submuestra intacta de los primeros 2-3 mm si el

sedimento es fangoso y hasta 5 mm si es arenoso, con la ayuda de tubos de vidrio o cuarzo de 2 cm de diámetro y 5 de alto y una delgada hoja metálica. Colocar el tubo con el sedimento sobre la base del sistema descrito en la figura 15.1a. Esta base posee una malla de 120  $\mu\text{m}$  que además de sostener la capa de sedimento, permite la circulación del agua intersticial a través de un sistema inferior de evacuación, el que debe estar cerrado durante este paso. Montar el sistema como se indica en la figura 15.1b. De cada réplica tomar además submuestras para analizar el contenido de agua, clorofila *a* y materia orgánica.

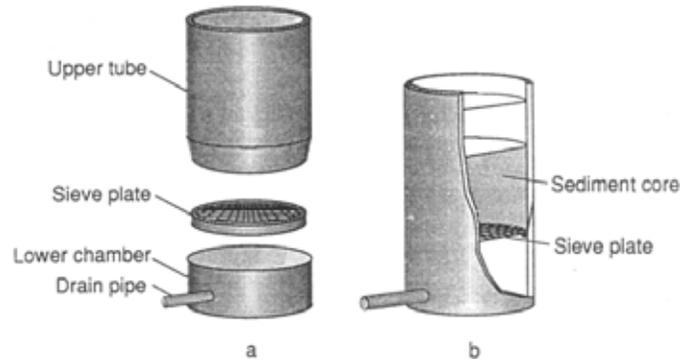


Figura 15.1. Sistema de incubación para la determinación de la tasa fotosintética del microfitobentos. a) dividido en componentes y b) sistema montado durante la incubación (tomado de Jönsson 1991).

- 3) A cada tubo agregar 5 ml agua del lugar de muestreo filtrada por GF/C, evitando resuspender el sedimento. Agregar solución de  $^{14}\text{C}$  (3 a 4  $\mu\text{Ci}$ ) y abrir la llave de evacuación de la base. Recoger hasta 1 ml de agua percolante en un vaso de bohemia de vidrio y descartar. Cerrar el sistema de evacuación, completar los tubos con el agua filtrada y cerrarlos con una tapa de vidrio o cuarzo (cubreobjetos circulares), sellando los bordes con silicona semilíquida. Cubrir una de las réplicas con 2 capas de papel aluminio. En un vial de centelleo colocar una cantidad de solución de  $^{14}\text{C}$  igual a la agregada a las muestras (o una fracción de volumen conocida), completar a 5 ml con AD y guardar para el análisis posterior. Durante los pasos descritos en este punto, se recomienda trabajar sobre una bandeja para recoger posibles pérdidas de agua con material radioactivo, el que se descartará convenientemente.
- 4) Incubar los tubos *in situ* (o sometidos a una radiación solar similar a la del momento de muestreo) durante 1 a 3 h, sosteniéndolos en una base de acrílico fijada al sedimento. Al final de la incubación, quitar las tapas de vidrio, retirar 5 ml de agua con pipeta automática y descartar. Fijar con 1 ml de formol 40% neutralizado. Abrir el sistema de evacuación, recoger el agua restante y descartar. Las muestras pueden mantenerse en estas condiciones por algunos días.
- 5) Retirar todo el sedimento con la ayuda de una espátula, pesar y homogeneizar. Colocar 2 a 3 submuestras de 0.2 a 0.4 g en viales de centelleo de 20 ml, preferentemente de vidrio. Agregar 5 ml de agua destilada (AD) y 100  $\mu\text{l}$  de HCl concentrado. Burbujear las muestras durante 20 a 30 minutos en sistema de burbujeo múltiple bajo campana de gases, para eliminar el  $^{14}\text{C}$  no asimilado. A cada muestra, así como al vial con  $^{14}\text{C}$  y AD preparado en el punto 3), agregar 5 ml de coctel de centelleo líquido (tipo Beckman ReadyGel<sup>®</sup>), mezclar en vortex y medir

el  $^{14}\text{C}$  asimilado en desintegraciones por minuto (DPM), en un contador de centelleo líquido durante 5 a 10 min.

- 6) Calcular la asimilación en cada tubo claro y oscuro ( $^{14}\text{C}_\text{C}$  y  $^{14}\text{C}_\text{O}$ ) en  $\text{mg C g}^{-1} \text{ pf h}^{-1}$  según:

$$^{14}\text{C} = (A^{14}\text{C}/P) \times ^{12}\text{C} \times 1.06 / A^{14}\text{C}_\text{D} \times t$$

donde  $A^{14}\text{C}$  es el  $^{14}\text{C}$  asimilado (en DPM) por el peso (P) de sedimento fresco (en g) contenido en cada tubo,  $^{12}\text{C}$  el carbono disponible (mg) en el volumen del tubo (calculado a partir de la alcalinidad y el pH), 1.06 el factor isotópico del  $^{14}\text{C}$ ,  $A^{14}\text{C}_\text{D}$  la actividad (en DPM) del  $^{14}\text{C}$  agregado y t el tiempo de incubación.

- 7) Estimar la producción primaria por unidad de peso fresco en  $\text{mg C g}^{-1} \text{ pf h}^{-1}$  en cada tubo claro, restándole la asimilación del tubo oscuro ( $\text{PP} = ^{14}\text{C}_\text{C} - ^{14}\text{C}_\text{O}$ ). Reportar siempre la profundidad de sedimento muestreado. Alternativamente, expresar el resultado por unidad de área en  $\text{mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , según:

$$\text{PP}_\text{a} = [(^{14}\text{C}_\text{C} \times P_\text{C}) - (^{14}\text{C}_\text{O} \times P_\text{O})] \times 10000 / A$$

donde  $P_\text{C}$  y  $P_\text{O}$  son el peso en g del sedimento de cada tubo claro y oscuro respectivamente, y A el área del tubo de incubación ( $\text{cm}^2$ ). El resultado puede ser también expresado por unidad de clorofila *a* en  $\text{mg C (mg Clo } a)^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Calcular el valor medio de producción primaria por peso, área o clorofila *a*, promediando los resultados de las 3 réplicas de los tubos claros a los que se resta el resultado del tubo oscuro.

#### Solución de $^{14}\text{C}$

Preparar una solución de campo conteniendo de 3 a 4  $\mu\text{Ci}$  en 500  $\mu\text{l}$ , a partir de un producto comercial concentrado de 2  $\text{mCi ml}^{-1}$ , usando AD llevada a pH entre 8 y 9 con una solución de NaOH diluido.

#### Precauciones

Etiquetar adecuadamente y en forma visible el material radioactivo stock y de campo, almacenándolo en lugar y condiciones seguras, según las instrucciones del laboratorio de origen y de acuerdo a las normas vigentes en el lugar de trabajo. Durante todo el procedimiento utilizar guantes descartables. En el laboratorio, y siempre que sea posible, usar túnica y trabajar en campana de gases. Al finalizar, limpiar el material utilizado colocándolo en un recipiente con HCl diluido y burbujearlo aire durante 12 h. Eliminar todos los materiales desechables (tips, viales, etc.) que se hayan utilizado (incluyendo las muestras analizadas y los descartes) de acuerdo a las normas de seguridad establecidas por la autoridad competente en materia de sustancias radioactivas. Limpiar la mesada y campana de trabajo con HCl diluido. Periódicamente medir la radioactividad del lugar de trabajo y del material y equipo utilizado con un contador Geiger, cuidando de no sobrepasar los límites máximos permitidos.

#### FLUORESCENCIA VARIABLE

La fluorescencia variable ( $F_v$ ) de la clorofila de microalgas bentónicas puede ser usada para determinar la eficiencia del PSII, la actividad fotosintética y la biomasa algal, según el principio explicitado en 16.4.2. Detalles de la técnica pueden obtenerse en Kromkamp *et al.* (1998), Hartig *et al.* (1998) y Serodio *et al.* (1997).

## 15.5. RESULTADOS

En la Laguna de Rocha la máxima biomasa autotrófica es alcanzada por las microalgas bentónicas, característica de ambientes acuáticos someros donde la luz no es un factor limitante. Debido a la escasa profundidad de este ambiente, la irradiancia promedio sobre el sedimento de la Laguna de Rocha es ca.  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en la zona Norte (influencia límnic) y  $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en la zona Sur (influencia marina). Entre agosto de 1996 y setiembre de 1997 la biomasa de las microalgas bentónicas varió entre 2.7 y  $162.7 \text{ mg m}^{-2}$  (Conde *et al.* 1999). La máxima biomasa se registró en la estación Norte (Fig. 15.2), siendo significativamente diferente ( $p < 0.001$ ) a la biomasa de la estación Sur. La biomasa algal estuvo correlacionada positivamente con la temperatura y negativamente con la conductividad ( $p < 0.05$ ). Entre los factores ambientales que determinan la distribución de la comunidad microfítobéntica se destaca el tipo de sustrato, el efecto de la resuspensión de sedimentos por el viento, y el contenido de nutrientes. Diferencias significativas en el sedimento de ambas zonas de estudio (arena limosa en el Norte y arena media en el Sur) contribuyen a explicar las diferencias encontradas. Por otra parte, el efecto de lavado producido por la descarga de la laguna al océano, constituye un disturbio importante para las comunidades de la zona Sur. De acuerdo al modelo desarrollado por Goldsborough & Robinson (1996), relacionado a la dominancia de diversas fracciones algales en ambientes llanos, la Laguna de Rocha presenta normalmente el estado tipo "seco", en el cual lo somero de la columna de agua, la alta concentración de nutrientes y la relativa transparencia del agua, favorece la dominancia de las comunidades autotróficas del sedimento.

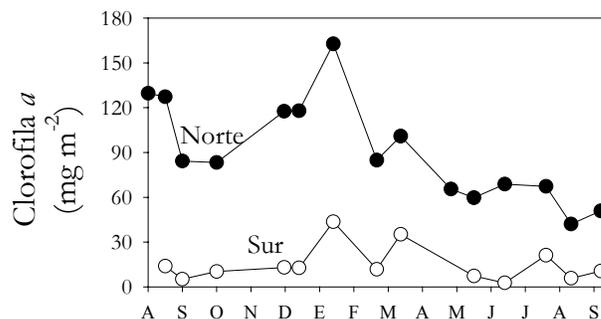


Figura 15.2. Variación anual de la biomasa del microfitobentos en dos estaciones (Norte y Sur) de la Laguna de Rocha en 1996-1997 (tomado de Conde *et al.* 1999).

Contrariamente a lo que sucede con la biomasa, en la Laguna de Rocha la comunidad más eficiente en la utilización de la radiación solar es el fitoplancton, seguido del microfitobentos y el epifiton (Tabla 15.1). En el caso del microfitobentos, la comunidad de la zona Sur presentó los mayores valores de eficiencia ( $0.145$  y  $0.527 \text{ mg C m}^{-2} \text{ E}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para las estaciones Norte y Sur, respectivamente). La baja eficiencia de la productividad del microfitobentos en relación a las algas libres se debe en parte al efecto de autoensombreamiento que se produce en comunidades adheridas que presentan una alta biomasa.

Tabla 15.1. Tasa fotosintética promedio anual de las microcomunidades algales del Sur y Norte de la Laguna de Rocha. El número de observaciones se indica entre paréntesis (Conde *et al.* datos no publicados).

Estación	Comunidad	Promedio (mg C m <sup>-2</sup> E <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Rango (mg C m <sup>-2</sup> E <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Coefficiente de variación (%)
Norte	Fitoplancton	2.580 (11)	0.704 - 6.970	83.2
	Microfitobentos	0.145 (11)	0.009 - 0.496	107.6
	Epifiton	0.123 (11)	0.007 - 0.413	102.9
Sur	Fitoplancton	2.529 (10)	0.392 - 10.478	125.2
	Microfitobentos	0.527 (9)	0.018 - 1.974	121.5

# HIDRÓFITAS

Néstor Mazzeo



LA MAYOR PARTE DE LOS LAGOS TIENEN ÁREAS RELATIVAMENTE PEQUEÑAS Y profundidades someras, por lo que la flora litoral es la principal comunidad productora de materia orgánica (Wetzel 1990). En algunas cuencas con bajas pendientes, la línea de costa es difusa y su ubicación puede variar desde unos pocos metros a cientos de kilómetros. Las áreas inundables, que pueden ser mayores que el agua abierta, conforman los humedales, sistemas transicionales o ecotonos entre los ambientes terrestre y acuático. Los humedales presentan un sustrato saturado o cubierto por una capa de agua somera durante algún periodo del año. Generalmente tienen un suelo sustancialmente diferente del de las tierras adyacentes más elevada, y presenta una vegetación compuesta por hidrófitas o macrófitas (Cowardin & Golet 1995).

En la literatura contemporánea se ha favorecido el uso del término macrófitas acuáticas, que comprende todas las formas macroscópicas de vegetales en contraposición al fitoplancton y al microfitorbentos. El término incluye a las briófitas, pteridófitas y angiospermas. Las plantas vasculares acuáticas se denominan hidrófitas. Raunkaier (1934) considera hidrófitas a las plantas cuyas partes vegetativas se encuentran sumergidas o flotantes (excluyendo las emergentes), y sobreviven la estación desfavorable con yemas sumergidas. Este esquema excluye varias especies de *Phragmites* y *Typha*. Iversen (1936) introdujo el término de limnófito, inapropiado ya que sugiere que las plantas de agua dulce son diferentes de las de agua salobre o marina. Posteriormente introdujo el término plantas anfibas para las especies con hojas aéreas y acuáticas y que pueden desarrollar formas totalmente acuáticas (Sculthorpe 1967).

Weaver & Clements (1938) consideran hidrófitas todas aquellas formas vegetales que crecen en agua, suelos cubiertos o generalmente saturados de agua. Esta definición es la más utilizada y ha sido adoptada por Sculthorpe (1967) y Cook (1990),

quien presenta una de las clasificaciones más claras de los hidrófitas según la forma de vida (Tabla 16.1, pág. siguiente).

*Tabla 16.1.* Formas de vida de las plantas acuáticas y de humedales. Clasificación modificada de Sculthorpe (1967) y Cook (1990).

---

1A HELÓFITAS: plantas esencialmente terrestres cuyas partes fotosintéticas son capaces de tolerar largos períodos sumergidas o flotando

1B HIDRÓFITAS: plantas fisiológicamente ligadas al agua; por lo menos una parte de su ciclo generativo tiene lugar dentro o en la superficie del agua

#### 2A HIDRÓFITAS ENRAIZADAS AL SUSTRATO

3A EMERGENTES: habitan sustratos saturados de agua o sumergidos, algunas partes fotosintéticas están en contacto con el aire y los órganos reproductivos son siempre aéreos

3B FLOTANTES: hojas y tallos flotantes, en poblaciones o comunidades muy densas producen hojas aéreas. Los órganos reproductivos flotan o son aéreos

3C SUMERGIDAS: todas las partes fotosintéticas se encuentran sumergidas. Los órganos reproductivos son aéreos, flotantes o sumergidos

2B HIDRÓFITAS FLOTANTES LIBRES: hojas y tallos flotantes, pero sin fijarse al sustrato. Organos reproductivos flotantes o aéreos, raramente sumergidos

---

## 16.1 DESCRIPCIÓN DE LA VEGETACIÓN

De acuerdo a Kent & Coker (1992), los métodos de descripción de la vegetación pueden ser incluidos en dos grandes categorías. Los fisonómicos o estructurales se basan en la morfología externa, forma de vida, estratificación y tamaño de las especies presentes. Los florísticos consisten en la identificación de las especies presentes en un área y en el registro de su distribución y/o abundancia.

### 16.1.1. APROXIMACIÓN FISONÓMICA

Uno de los métodos fisonómicos más comunes es el de las formas de vida de Raunkaier (1934, 1937), utilizado para describir tipos vegetacionales a escala mundial. Este sistema se basa en la altura de la yema que inicia el crecimiento en la estación favorable con respecto al sustrato, e implica categorizar todas las plantas de un área dada y representar sus porcentajes (Fig. 16.1, pág. siguiente).

El método de descripción de Dansereau (1951, 1957) se basa en seis criterios de las especies dominantes: a) forma de vida, b) tamaño, c) cobertura, d) función (perenne o caducifolia), e) forma y tamaño de la hoja y f) textura. Por sus características, puede ser aplicado por personas sin experiencia y en extensas áreas geográficas. La vegetación dominante de cada área se describe de acuerdo a símbolos (Fig. 16.2, pág. siguiente). Este método no ha sido muy utilizado a pesar de su lógica y simplicidad, tal vez por las modificaciones que en ocasiones requiere.



Program (IBP). La clasificación incluye las categorías abierta, cerrada y esparcida, con 31 clases donde la altura y continuidad de la vegetación son los principales criterios utilizados, además de la naturaleza perenne o caducifolia del follaje.

La descripción fisonómica o estructural es usualmente realizada en sitios que se consideran representativos del área de estudio. La elección de estos sitios requiere de una considerable experiencia, por lo que siempre está presente cierta subjetividad (Kent & Coker 1992).

### 16.1.2. APROXIMACIÓN FLORÍSTICA

En esta aproximación se consideran la identificación de las especies, la cuantificación de la abundancia y el tipo de muestreo.

#### HERBORIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN

La identificación de las especies generalmente se realiza en el laboratorio debido a la necesidad de analizar un conjunto de caracteres de los especímenes y consultar bibliografía. Aunque el trabajo no sea taxonómico es conveniente conservar el material herborizado y depositarlo en uno o varios herbarios. Esto permite que los especialistas corroboren la identificación, pueda ser utilizado en nuevas revisiones taxonómicas y la permanencia de un registro de la distribución de la especie.

Un buen ejemplar de herbario debe presentar todas las partes de la planta (flores, frutos, hojas y madera) y debe registrarse toda la información no visible en el espécimen (De Vogel 1987). En la mayoría de los casos un tallo con hojas y flores o frutos es suficiente para la identificación. Para las especies dioicas deben colectarse ejemplares femeninos y masculinos. De aquellas con heterofilia, muy común en las acuáticas, deben colectarse todas las formas de hoja. Si la planta es parásita conviene coleccionar también el hospedador. En un cuaderno se debe registrar la información más relevante a ser incluida en el ejemplar de herbario:

**LOCALIZACIÓN.** Indicar un lugar fácilmente ubicable en el mapa (evitar nombres de estancias, etc.), con latitud, longitud, fecha y número de colecta.

**HÁBITAT.** Características del cuerpo de agua o suelo, altitud y tipo de vegetación.

**HÁBITO.** Arbol, arbusto, hierba, epífita, liana y demás características que posteriormente no serán visibles en el ejemplar.

**EXUDADOS.** Látex, resinas u otros.

**COLOR.** De hojas, flores y frutos.

**OBSERVACIONES.** Biológicas/ecológicas (frecuencia, dominancia, tipo de polinización).

**NOMBRES Y USOS LOCALES.** Es útil incluirlo si se conocen.

El material se debe secar en papel de diario y desecador a 40 °C con extracción de aire. En caso de no contar con un desecador es necesario cambiar repetidamente el papel hasta culminar el secado. Para las familias más pequeñas como Azollaceae y Lemnaceae es aconsejable incluir el material en un pequeño sobre de papel. La prensas facilitan el secado y traslado de un número considerable de plantas. El cartón corrugado intercalado entre los papeles de diario aumenta la circulación de aire. Otro método de conservación es la preservación en alcohol al 70% o FDA, alternativa útil en pequeñas plantas, flores y frutos. En FDA (90 ml de alcohol 70%, 5 ml de ácido acético glacial y 5 ml de formalina) el material se conserva más tiempo.

Para la identificación de las especies acuáticas de Uruguay se puede recurrir a las floras de la región (Flora Montevidensis, Flora de Entre Ríos, Flora de la Provincia de Buenos Aires, Flora de los Alrededores de Buenos Aires, Flora de Santa Catarina (Brasil), Flora de Paraguay, Flora de Chile) o a las monografías especializadas de los diferentes géneros y familias. Los primeros manuales de plantas acuáticas platenses pertenecen a Cabrera & Fabris (1948) y Lombardo (1970). Alonso (1997) describe 103 especies de hidrófitas de Rocha con las correspondientes claves identificatorias. Probablemente esta obra incluya cerca de 70% de las especies acuáticas presentes en Uruguay. Otros trabajos muy útiles son Benl (1972), Cook (1990), Marta (1983) y Tur (1995). Para conocer las monografías de los géneros y familias es recomendable consultar Marticorena (1992, 1996) y la base de datos en línea de la Aquatic and Wetland Plant Information Retrieval System, University of Florida (<http://aquatic1.ifas.ufl.edu>), donde se pueden consultar más de 44000 artículos sobre taxonomía, ecología, fisiología, utilización y control.

#### ÁREA DE MUESTREO

Es imprescindible establecer un área estándar o cuadrante, que puede ser cuadrado, rectangular o circular, y cuyo tamaño varía de acuerdo al tipo de vegetación (Tabla 16.2). Para estimar el tamaño óptimo se comienza con el menor tamaño posible, el que se duplica sucesivamente y se contabiliza el número de especies en cada caso. La gráfica especie-área (Fig. 16.3) es asintótica y permite escoger el área de muestreo correspondiente a un determinado porcentaje de la asintota.

El patrón de vegetación es la forma cómo los individuos de una especie se distribuyen en una comunidad vegetal. Su determinación depende del tamaño de la especie en relación al tamaño del cuadrante. Las especies pueden exhibir una distribución agrupada, al azar o regular.

Tabla 16.2. Tamaños de cuadrantes sugeridos para diferentes comunidades de hidrófitas.

Tipo de vegetación	Tamaño del cuadrado
Comunidades de pequeñas flotantes libres	0.5 % 0.5 m
Comunidades de especies sumergidas, flotantes libres grandes, flotantes enraizadas y emergentes	1 % 1 m - 4 % 4 m
Comunidades arbóreas o arbustivas	10 % 10 m - 50 % 50 m

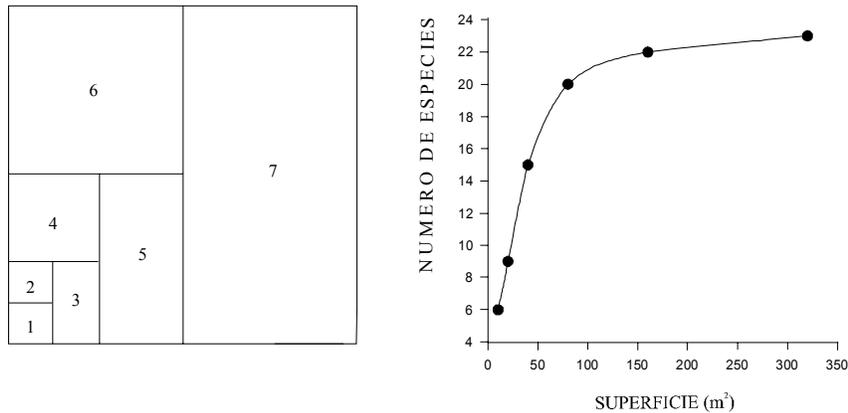


Figura 16.3. Relación entre el tamaño del cuadrante de muestreo y el número de especies registradas (curva especie-área).

## ABUNDANCIA

La cuantificación de la abundancia puede ser realizada por métodos subjetivos (Kent & Coker 1992), en los que las estimaciones son realizadas a simple vista, u objetivos, es decir independientes del observador.

El método más subjetivo y descriptivo es el de los símbolos de frecuencia. La escala más utilizada es la DAFOR: (d) dominante, (a) abundante, (f) frecuente, (o) ocasional y (r) rara.

La cobertura se define como el área ocupada por las partes aéreas de cada especie. En general se la estima visualmente como porcentaje. Los valores adjudicados dependen de la escala utilizada. Las más comunes son las de Domin y Braun-Blanquet (Tabla 16.3). Estos métodos en general sobrestiman las especies en flor, las más atractivas o las más conspicuas.

Tabla 16.3. *Escala de Braun-Blanquet y Domin para cobertura.*

Valor	Braun-Blanquet	Domin
+	Menos de 1%	Un solo ejemplar. Cobertura no cuantificable
1	1-5%	1-2 ejemplares. Cobertura no cuantificable
2	6-25%	Varios ejemplares, cobertura menor al 1%
3	26-50%	1-4%
4	51-75%	4-10%
5	76-100%	11-25%
6		26-33%
7		34-50%
8		51-75%
9		76-90%
10		91-100%

Entre los métodos objetivos, la densidad o número de individuos de una especie en un área determinada, es utilizada para ciertas especies y raramente para una comunidad completa, pues demanda mucho tiempo y esfuerzo al requerir que sean identificados cada individuo. En las anuales y bianuales los individuos son fácilmente distinguibles, mientras que en las herbáceas perennes la identificación es más difícil ya que presentan formas de crecimiento complejas y varios individuos permanecen conectados por rizomas o estolones, como en *Pistia stratiotes*, *Eichhornia crassipes* o *Schoenoplectus (Scirpus) californicus*. La subdivisión del cuadrado es útil para incrementar la precisión.

La frecuencia es la probabilidad de encontrar una especie en un cuadrado o área de muestreo. Su determinación implica registrar la presencia o ausencia de cada especie. El método más efectivo es dividir el cuadrado de muestreo en 10x10 unidades. Probablemente es la técnica más precisa pero requiere de un gran esfuerzo y al igual que en el caso anterior depende del tamaño del cuadrado, el tamaño de la planta y el patrón de crecimiento.

La biomasa (*standing crop*) es la cantidad de material vegetal (g) en un área dada (m<sup>2</sup>). Sólo es utilizada ocasionalmente como medida de abundancia por el tiempo y esfuerzo que requiere. Generalmente se expresa el peso de cada especie como un porcentaje de la biomasa total en el cuadrado.

El método de la intersección de línea es útil en ambientes donde la vegetación se encuentra esparcida (como algunos casos de vegetación sumergida o emergente) y

el cuadrado puede ser inadecuado. Usualmente se marca una línea de 10 m de largo y se registran todas las especies que la interceptan o tocan, mientras la cobertura corresponde al largo de la línea interceptado.

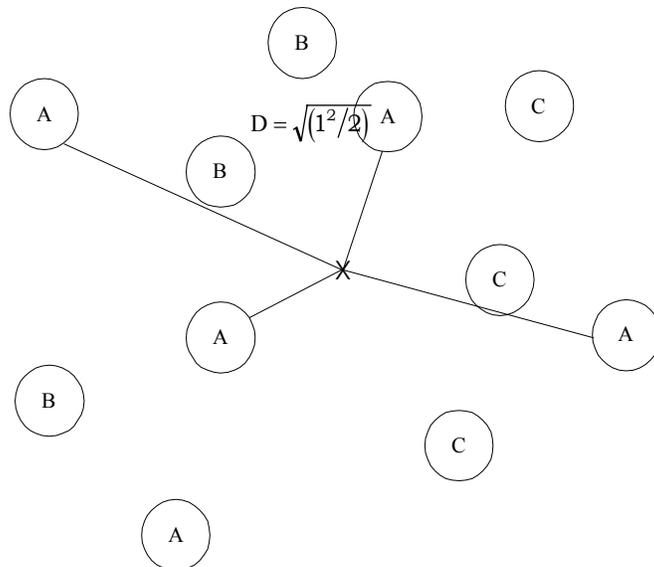
#### DISEÑO DE MUESTREO

La mayoría de los trabajos en ecología vegetal emplean muestreos estratificados en base a un reconocimiento previo del área realizado *in situ* o mediante fotografías aéreas. Generalmente los criterios de selección de los estratos son las formas de vida, la fisonomía o la estructura de la vegetación. Otros criterios de selección pueden ser el grado de perturbación, la carga de nutrientes y el sustrato. La ventaja de este método radica que algunas fuentes de variación de la vegetación pueden ser reconocidas previamente.

El muestreo al azar, necesario para la prueba de hipótesis y aplicación de estadística paramétrica, se utiliza por ejemplo en estudios de cambios vegetales asociados a factores ambientales.

El muestreo sistemático implica la observación a intervalos regulares, los que deben ser ubicados sin coincidir con ningún patrón estructural o funcional de la vegetación. La técnica más común es la de transectas, que consiste en trazar una línea sobre la que son registradas las muestras. Es muy adecuada donde existen marcados gradientes ambientales, como los ecotonos entre los ambientes terrestre, limnico y marino. El principal objetivo de esta técnica es describir la máxima variación en la menor distancia y tiempo posibles.

En lugares donde la vegetación es muy densa o muy esparcida el método tradicional del cuadrado presenta inconvenientes. Métodos alternativos son los muestreos sin parcela (*plotless sampling*), el más simple de los cuales es el del in-



dividuo más próximo. Luego de la ubicación de puntos al azar en una área determinada se calcula el promedio ( $\bar{l}$ ) de las distancias de los individuos más próximos de cada especie a tales puntos (Fig. 16.4). La densidad ( $D$ ) de cada especie es:

Figura 16.4. Esquema del método del individuo más próximo con un punto elegido al azar.

## 16.2. CRECIMIENTO

Generalmente se analiza el crecimiento en dos formas diferentes y complementarias (Chiariello *et al.* 1989). Una forma analiza la productividad mediante el registro de los cambios de biomasa en el tiempo. La segunda enfatiza los procesos demográficos y considera la producción de nuevas unidades de biomasa o módulos (hojas, tallos o raíces) y su pérdida o muerte.

La producción es la biomasa o peso de materia orgánica incorporada por una especie o comunidad por unidad de área y tiempo. Puede ser expresada como peso seco de materia orgánica, unidades de carbono o de energía. La producción primaria neta en esta comunidad de plantas generalmente se determina mediante el registro de las variaciones de biomasa en el tiempo.

Para el análisis del crecimiento vegetal son necesarias medidas de biomasa (peso seco, contenido de materia orgánica o energía) y medidas de tamaño del sistema de asimilación (área foliar, contenido de proteínas o de clorofila de las hojas).

### 16.2.1. MEDIDAS DE CRECIMIENTO

#### 16.2.1.1. BIOMASA AÉREA

##### MÉTODOS DESTRUCTIVOS

La biomasa aérea se estima removiendo las partes vegetales delimitadas en el área de muestreo. Un mapa del área de estudio es dividido en cuadrados de 1.0 ó 0.5 m<sup>2</sup>. Se debe realizar la selección de los cuadrados a muestrear antes de comenzar el muestreo. El número de cuadrados necesarios (n) puede ser estimado cosechando entre 10 y 20 cuadrados y aplicando la fórmula de Roberts *et al.* (1985):

$$n = (t s)^2 / (D x)$$

donde t es el valor de Student, s el desvío estándar de las muestras extraídas, D el intervalo de confianza requerido como proporción de la media (p. ej. para una precisión de 20% es 0.2) y x el promedio de biomasa de las muestras.

El área óptima del cuadrado depende del patrón espacial de la biomasa y del costo (tiempo + esfuerzo) requerido para la cosecha y registro de la información. El costo puede ser determinado por el método de Wiegert (1962) quien utiliza cuadrados encajados de cinco tamaños diferentes (Fig. 16.5, pág. siguiente). Se cosechan 30 réplicas de estos cuadrados y para cada tamaño se determina la biomasa promedio y su varianza (Vm). La varianza relativa (Vr) se obtiene dividiendo Vm por la varianza del cuadrado con área más pequeña. El costo relativo (Cr) es igual a:

$$Cr = Cf + (x Cv) / Cf + Cv$$

donde Cf son los costos fijos de cada cuadrado (p.ej. tiempo requerido para la cosecha, determinación del peso y registro de la información), Cv el costo con el área de menor tamaño y x el área del cuadrado. Al graficar el producto Vr%Cr en función del área se puede establecer el área óptima asociada al menor valor de Vr%Cr (Fig. 16.5, pág. siguiente).

El peso seco es la cantidad de tejido remanente luego del secado de las plantas hasta un peso constante, generalmente mediante la aplicación de calor. El procedimiento de secado determina la cantidad y composición del tejido. Durante el mismo pueden ocurrir pérdidas por respiración de carbohidratos no estructurales mientras

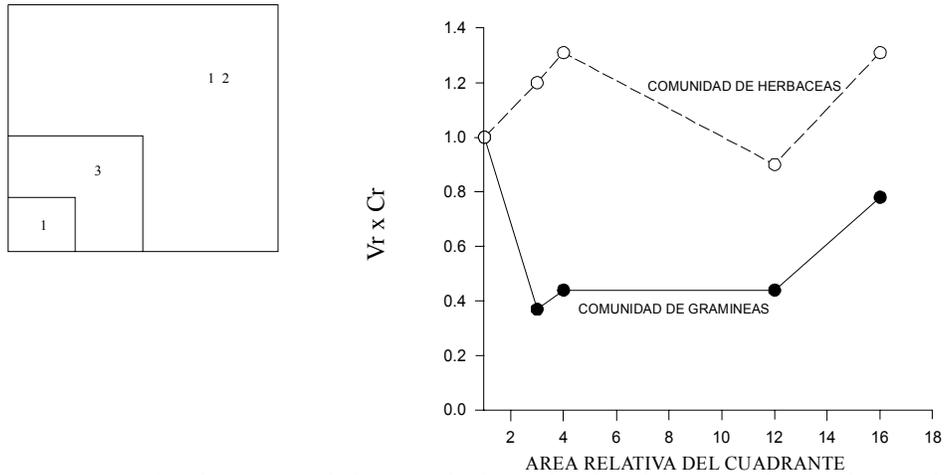


Figura 16.5. Cuadrantes encajados para la determinación del área óptima en la cuantificación de la biomasa. Gráfico del producto  $V_r \times C_r$  en función del cuadrante para dos comunidades diferentes. El producto menor determina el área mínima del cuadrante (ejemplo tomado de Roberts *et al.* 1985).

se alcanza la temperatura suficiente para desnaturalizar las enzimas (Chiariello *et al.* 1989). Las mismas temperaturas a su vez pueden volatilizar compuestos altamente energéticos. Por tal razón, es conveniente recurrir a dos fases de secado, la primera a 100 °C durante 60-90 min y la segunda a 70 °C hasta alcanzar peso constante. Existen métodos más simples pero más costosos que consisten en usar bombas de vacío a -60 °C, los que no presentan las dificultades mencionadas y consumen menos tiempo.

Una proporción variable del peso seco de la vegetación es material inorgánico, por lo que una forma de expresar la biomasa es el peso seco libre de cenizas. Se obtiene por diferencia de peso quemando la muestra seca a 500 °C durante 6 horas en mufla. En plantas pequeñas como *Azolla* y *Lemna*, 3 horas es suficiente. Temperatura por encima de 500 °C puede volatilizar algunos materiales inorgánicos.

#### MÉTODOS INDIRECTOS

Mediante correlaciones entre biomasa y largo de hojas o tallos se puede estimar la biomasa (Roberts *et al.* 1985). Se requiere de una fase previa de cosecha para establecer las ecuaciones de mejor ajuste entre los parámetros y la biomasa.

Otra forma de estimación indirecta de la biomasa es el sensoramiento remoto, basado en que la luz solar reflejada por las hojas tiene un espectro característico, diferente al reflejado por el suelo. La radiación infrarroja es reflejada por las hojas, por lo que existe una discontinuidad en la reflectancia de la vegetación a 700 nm, mientras que el suelo presenta un gradual incremento en la reflectividad a lo largo

del espectro. Las características espectrales cambian a medida que la vegetación se desarrolla sobre el suelo, relacionado con la biomasa y área foliar.

El cociente entre la reflectancia infrarroja y la roja ha sido utilizado para determinar biomasa en las comunidades naturales (Jensen 1980) mediante sensoramiento remoto. El registro de las longitudes de onda se centra en 660 nm para el rojo y 730 nm para el infrarrojo, lo cual coincide con los picos de máxima absorción y reflectancia, respectivamente.

Se producen errores en la estimación de la biomasa cuando existe gran cantidad de material muerto, el que debe ser menor al 75% del total. La reflectancia depende del contenido de clorofila, estructura interna de la hoja y estructura del dosel, por lo que las estimaciones de cobertura son más precisas que las de biomasa.

#### 16.2.1.2. BIOMASA SUBTERRÁNEA

La biomasa subterránea generalmente no es considerada, a pesar que puede representar más de 80% de la biomasa total (Wetzel 1983). Esto se explica por las dificultades de muestreo y por la complejidad de la separación del material vivo del muerto, particularmente en suelos inundados. Sin embargo, es fundamental para establecer si los cambios de la producción subterránea son resultado de una mayor actividad fotosintética o una simple redistribución de materia.

El método más efectivo es tomar muestras en el centro de los cuadrados utilizados para la cosecha de la biomasa área. La biomasa subterránea se puede extraer mediante palas de bordes cortantes o a través de corers. La primera presenta inconvenientes para controlar la profundidad y el área muestreada y es difícil de aplicar en suelos inundados, al contrario de los corers. Estos pueden construirse en metal, acrílico o plástico (ver 6.1.2), pero son adecuados sólo para suelos livianos.

Las muestras pueden ser lavadas bajo agua a presión y empleando tamices para separar el suelo de las raíces. En suelos inundados los depósitos de sulfuro de hierro pueden ser removidos colocando las raíces lavadas en agua continuamente aerada durante 24 h. En algunos casos es relativamente fácil distinguir entre la biomasa viva y la muerta por las diferencias de coloración. En caso contrario se recomiendan los procedimientos de flotación o tinción vital (Roberts *et al.* 1985). La flotación se aplica si el material radicular vivo flota y el muerto sedimenta, cuando se sumerge en solventes adecuados (p.ej. metanol). Algunos solventes provocan la muerte de las raíces, por lo que posteriormente no se puede aplicar la tinción vital.

En la tinción vital se utilizan sales de tetrazolium que actúan como aceptores de electrones en la respiración, por lo que se reducen cambiando de coloración en los tejidos vivos. Las raíces se sumergen en una solución 1% en agua destilada a 30 °C durante 3 h en oscuridad. Una dificultad se presenta cuando un número grande de bacterias en la superficie de la raíz reducen las sales de tetrazolium. En este caso, conviene observar un corte transversal de la raíz para determinar su estado. Una vez colectada la biomasa viva, para su cuantificación se sigue los mismos procedimientos que la biomasa aérea.

#### 16.2.1.3. ÁREA FOLIAR Y ESTRUCTURA DE DOSEL

La determinación del área foliar debe ser considerada en un sentido más amplio que es la estructura de dosel, el cual incluye el tamaño, forma, orientación, distribución y posición de varios órganos como las hojas, tallos, flores y frutos (Norman & Campbell 1989). Para las plantas acuáticas, se consideran el índice de área foliar y su distribución en la altura, la inclinación y la orientación de las hojas.

El índice de área foliar acumulativo (F) y su distribución en la altura pueden ser cuantificados por métodos destructivos y no destructivos (Nobel & Long 1985). Generalmente la precisión de los métodos no destructivos debe ser analizada con medidas destructivas simultáneas. A nivel del sustrato (suelo, sedimento o agua), F se designa como índice de área foliar (L) igual al área de la superficie foliar proyectable (sp) dividida por el área del sustrato (G).

El área de la superficie foliar proyectable puede ser determinado mediante la cosecha de todo el material por encima del cuadrante, ubicando la hoja sobre una superficie horizontal. El área de la superficie foliar generalmente se refiere al área de la cara adaxial de la hoja. En el caso de hojas suculentas o tallos fotosintéticos, el área de la superficie superior excede el área proyectable. Este parámetro debe ser cuantificado lo antes posible para evitar alteraciones de la morfología. El área es usualmente cuantificada con instrumental especial (*leaf area meter*), aunque existen métodos más económicos como los planímetros, las regresiones área-largo y los métodos fotogravimétricos. En éstos, las hojas son colocadas sobre papel fotográfico o se puede hacer fotocopias. La imagen se corta, pesa y se compara con la relación área-peso para el papel utilizado. Los instrumentos comerciales más utilizados como los *Leaf area meter* (LICOR®) analizan la interrupción de un haz de luz por los órganos fotosintéticos, o bien realizan un análisis de la imagen de una hoja sobre una superficie blanca (Delta-T®).

Para estudiar la distribución del área foliar en la altura de la planta, se remueven varios estratos en el dosel. En la vegetación con una amplia base del dosel es más simple comenzar con los cortes desde el sustrato hacia las partes más altas, mientras que en la mayoría de las comunidades de herbáceas es más fácil recorrer el sentido inverso.

Otra alternativa a este procedimiento es la técnica denominada cuadrantes puntuales inclinados. Esta técnica es ampliamente utilizada para determinar cobertura y consiste en contar el número de hojas que tienen contacto con una aguja en su traslado de arriba a abajo del dosel. Si 100 cuadrantes puntuales presentan 240 contactos, la cobertura es 2.4. Cuando todas las hojas son horizontales, la cobertura es igual al índice del área foliar. Sin embargo, en un dosel erectófilo, la cobertura determinada verticalmente es menor que L. Este problema puede ser solucionado si la aguja está inclinada. Para cualquier dosel:

$$L = K f_{\beta} \quad (1)$$

donde K es una constante para cada dosel particular y ángulo de la aguja, f la frecuencia media de contacto en la aguja y  $\beta$  el ángulo de inclinación. Warren-Wilson (1963) determinaron un K de 1.1 cuando la inclinación de la aguja es 32.5°. El error en L es 10% para hojas con ángulos de 0.36 y 90°. El error puede ser reducido a 2% si la aguja se utiliza en dos ángulos, 13 y 52°:

$$L \cong 0.23 f_{13} + 0.78 f_{52}$$

El error decrece al utilizar más ángulos. Este procedimiento puede ser una técnica no destructiva para el análisis de la estratificación del área foliar y del ángulo foliar en el dosel. La distancia ( $z_{\beta}$ ) que recorre la aguja con una inclinación  $\beta$

$$z_{\beta} = z / \sin \beta$$

puede ser relacionada con la altura vertical (z):

esto permite calcular  $\Delta F$  para cada estrato particular, para ello se dividen los contactos en un estrato determinado sobre el número total de contactos en la altura del dosel y se incorpora el cálculo en la ecuación (1).

La inclinación foliar es el ángulo entre el eje de la hoja y la horizontal. La inclinación puede ser representada mediante la gráfica de las frecuencias relativas de la inclinación a intervalos de  $10^\circ$ . La orientación foliar es el ángulo formado (en sentido horario) entre el Norte y la proyección horizontal del eje de la hoja. La orientación puede ser determinada por fotografías desde la base del dosel y por compás.

#### 16.2.1.4. PIGMENTOS

Para la determinación del contenido total de clorofila se realiza una extracción con acetona 80%, se filtra y centrifuga, todo lo cual deber ser realizado en oscuridad para evitar la destrucción de la clorofila. En el caso de las hojas, para asegurar la completa extracción, se puede congelar previamente la muestra (p.ej. con  $N_2$  líquido). Algunos tejidos y células intactas necesitan varias horas para completar la extracción (Coombs *et al.* 1985). También se utilizan homogeneizadores de vidrio y acetona 80%. Se usan también otros solventes, como el etanol y el metanol. Las fórmulas para determinar los pigmentos con acetona son:

$$\begin{aligned} \text{Clorofila } a &= 13.19 A_{664} - 2.57 A_{647} \\ \text{Clorofila } b &= 22.10 A_{647} - 5.26 A_{664} \\ \text{Clorofila total} &= 7.93 A_{664} + 19.53 A_{647} \end{aligned}$$

donde  $A_{664}$  y  $A_{647}$  son las lecturas de absorbancia a 664 y 667 nm, correspondientes a los picos de absorbancia en acetona 80% de la clorofila  $a$  y  $b$ , respectivamente. Estos picos de absorción deben ser verificados en cada caso.

#### 16.2.2. APROXIMACIÓN CLÁSICA

Existen tres enfoques en el análisis del crecimiento vegetal que se denominan clásico, integral y funcional. Todos ellos presentan un conjunto de parámetros en común pero difieren en los métodos de estimación.

La tasa de crecimiento relativo (RGR) o específico (SGR) (Blackman 1919) en  $d^{-1}$  es el incremento de material vegetal ( $W$ ) por unidad de peso en un periodo de tiempo, sin considerar el tamaño del sistema de asimilación. En un instante dado:

$$RGR = (1/W)(\Delta W/\Delta t)$$

En la aproximación clásica o de intervalos se estima el valor medio de este parámetro durante un intervalo de tiempo entre las sucesivas cosechas. En la práctica el promedio de RGR es un registro en un intervalo de tiempo discreto, mayor a un día. Asumiendo un crecimiento exponencial, el RGR es:

$$RGR = (\ln W_2 - \ln W_1)/(t_2 - t_1)$$

donde  $W_1$  y  $t_1$  son la biomasa y tiempo inicial respectivamente, y  $W_2$  y  $t_2$  sus valores finales.

La RGR es una medida fundamental de la producción de biomasa. Sin embargo, brinda escasa información sobre las causas que determinan cambios en el rendimiento, como modificaciones del área foliar u otros cambios en la arquitectura

vegetal (Chiariello *et al.* 1989), que se consideran en la tasa de asimilación neta y en el cociente área foliar.

La tasa de asimilación neta (NAR, ULR o E) es el incremento de biomasa vegetal por unidad de área asimiladora (A) y tiempo. Difiere de la tasa de fotosíntesis, que cuantifica el incremento neto de carbono durante el período de luz. En un período de tiempo prolongado y suponiendo una relación lineal entre A y W (Briggs *et al.* 1920 a y b, Williams 1946), el NAR promedio se estima ( $\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ) de acuerdo a:

$$\text{NAR} = (W_2 - W_1) - (\ln A_2 - \ln A_1) / (A_2 - A_1)(t_2 - t_1)$$

donde  $A_1$  y  $A_2$  son el área inicial y final, respectivamente.

La elección del tipo de relación entre W y A puede afectar significativamente la determinación del promedio de NAR y otros parámetros. Teniendo en cuenta que la respiración de tejidos no fotosintéticos afecta el crecimiento vegetal, la tasa de asimilación neta no incluye totalmente esta fracción no asimiladora del total de biomasa (Chiariello *et al.* 1989).

El cociente área foliar (LAR o F), se define como la fracción asimiladora por unidad de material vegetal presente, indicando el tamaño de la superficie fotosintética en relación a la masa respiratoria ( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ ). Este parámetro contempla dos términos: la fracción de la biomasa total localizada en las hojas (LWR) y el cociente entre el área y la masa foliar o área foliar específica (SLA). En un instante de tiempo determinado:

$$\text{LAR} = A/W = (W_L/W)(A/W_L) = \text{LWR} \times \text{SLA}$$

donde  $W_L$  es el peso foliar.

La expresión instantánea de LAR no puede ser integrada sin conocer las relaciones entre A/W y t, A y t, W y t. En un instante de tiempo LAR es el cociente entre RGR y NAR.

$$\text{LAR} = (A_2 - A_1)(\ln W_2 - \ln W_1) / (W_2 - W_1)(\ln A_2 - \ln A_1)$$

### 16.2.3. APROXIMACIÓN INTEGRAL

Esta aproximación agrega dos parámetros integrados a los instantáneos: la duración del área foliar (LAD o D) en  $\text{m}^2 \text{d}^{-1}$  y de la biomasa (BMD o Z) en  $\text{g d}^{-1}$ .

$$\text{LAD} = \text{Integral} (A dt)$$

La duración del área foliar tiene en cuenta la duración del período de crecimiento y la dinámica del área foliar. La tasa de crecimiento relativo (RA,  $\text{d}^{-1}$ ) del área foliar se puede estimar según:

$$\text{RA} = (\Delta A / \Delta t) \times (1/A)$$

LAD puede ser calculada en un período de tiempo de acuerdo a:

$$\text{LAD} = (A_2 - A_1)(t_2 - t_1) / (\ln A_2 - \ln A_1)$$

Un procedimiento análogo puede utilizarse para estimar BMD:

$$\text{BMD} = (W_2 - W_1)(t_2 - t_1) / (\ln W_2 - \ln W_1)$$

Los parámetros descritos se pueden relacionar de acuerdo a:

$$\text{RGR} = (W_2 - W_1)/\text{BMD}$$

$$\text{NAR} = (W_2 - W_1)/\text{LAD}$$

#### 16.2.4. APROXIMACIÓN FUNCIONAL

Considerando que en algunos casos el crecimiento no es exponencial, la necesidad de realizar registros más frecuentes de biomasa y con una menor extracción, así como las facilidades en computación para analizar ecuaciones complejas, algunos autores estiman más conveniente utilizar una aproximación funcional (Chiariello *et al.* 1989). Esta consiste en describir las relaciones entre A y t y entre W y t con ecuaciones más apropiadas (generalmente polinomiales) para el cálculo de los parámetros de crecimiento. La información para todo el período de estudio puede estar contenida en dos ecuaciones y pueden desarrollarse nuevas funciones para calcular valores instantáneos de RGR, NAR y LAR.

### 16.3. PÉRDIDAS DE BIOMASA

Para determinar la producción neta, las medidas de cambio de biomasa deben ser combinadas con el registro de pérdidas por muerte, herbivoría o excreción. Dos procedimientos son utilizados para estimar la tasa de descomposición o de desaparición en un período de tiempo. Las técnicas de puntos pareados y sus variantes sólo pueden ser instrumentadas en suelos saturados de agua, ya que para las hidrófitas flotantes o sumergidas es imposible su ejecución debido al traslado de material por el agua. La técnica de bolsas de broza puede ser aplicada a toda la biomasa de las plantas acuáticas.

#### 16.3.1 PUNTOS PAREADO

Varios pares de puntos con límites contiguos son seleccionados al azar (Wiegert & Evans 1964). La biomasa viva de cada punto es removida cuidadosamente. Un cuadrante de cada par es seleccionado al azar para retirar el material muerto y estimar su peso seco ( $D_i$ ). Al final del intervalo de cosecha ( $t_{i+1}$ ) se pesa el material muerto ( $D_{i+1}$ ) del segundo cuadrado. La tasa instantánea de desaparición (R) puede ser calculada en  $g\ g^{-1}\ d^{-1}$ :

$$R = \ln(D_i/D_{i+1})/(t_{i+1} - t_i)$$

Esta ecuación asume un modelo exponencial negativo, correcto en períodos de tiempo prolongados. En la mayoría de los estudios es necesario determinar R en intervalos similares a los utilizados en la cuantificación de la biomasa viva. Un modelo

$$RD = [2(D_i - D_{i+1})/(D_i + D_{i+1})]/(t_{i+1} - t_i)$$

alternativo para expresar la tasa de desaparición y que no considera la relación matemática entre D y t (Roberts *et al.* 1985) es:

donde RD es la proporción de material muerto en el intervalo ( $t_{i+1} - t_i$ ).

Este método asume que la remoción de material vivo al comienzo del intervalo de tiempo no afecta la tasa de descomposición. Sin embargo, su remoción puede alterar el microclima. También requiere de homogeneidad entre los puntos, lo que puede ocurrir en cultivos o comunidades monoespecíficas de algunas hidrófitas emergentes. La mayor objeción a este método es que  $D_{i+1}$  exceda al  $D_i$ . Esto puede

ocurrir si los puntos no son idénticos, y si el crecimiento y la senescencia de la biomasa tiene lugar en el segundo cuadrado en el período de tiempo considerado.

Lomnicki *et al.* (1968) modificaron el método para solucionar estos inconvenientes. En lugar de remover todo el material vivo de los pares de puntos, sólo el material muerto es removido del primer punto. Al final del intervalo todo el material muerto de los dos puntos es retirado y registrado. Al final del período de tiempo, la cantidad de material muerto en el primer punto es la cantidad de material muerto producido en el intervalo de tiempo ( $D'_{i+1}$ ), mientras que en el segundo punto se estima la desaparición de ese material muerto producido en el período de tiempo analizado ( $D_{i+1}$ ).

$$RL = [2(D_i + D'_{i+1} - D_{i+1}) / (D_i + D_{i+1})] / (t_{i+1} - t_i)$$

Esta modificación tiene dos ventajas sobre el método original, ya que el microambiente de los puntos no es alterado y se puede estimar la cantidad de material muerto formado en el intervalo. Esto es ventajoso en climas tropicales y subtropicales donde la tasa de recambio de la biomasa es considerable. El método original como sus modificaciones sólo son aplicables a las partes aéreas de la vegetación.

### 16.3.2. BOLSAS (DE BROZA) PERFORADAS

Se requieren submuestras de peso conocido (*ca.* 2 g de peso seco) de raíces, tallos u hojas, que se introducen en bolsas perforadas de polietileno u otro material no biodegradable. El tamaño de las perforaciones es crítico al condicionar el acceso de los invertebrados que descomponen el material; generalmente se recomienda 2 mm. Los tamices utilizados para el lavado del material muerto deben tener el mismo tamaño de malla. Las bolsas deben ubicarse en la misma posición de la columna de agua donde la descomposición tiene lugar. El secado de material antes de ser incluido en la bolsa debe realizarse con extremo cuidado ya que puede afectar la tasa de descomposición, por esta razón una alternativa es secar el material al aire en una habitación libre de humedad.

El método no presenta los problemas de homogeneidad de los puntos pareados, pero en el caso de las partes aéreas impide el movimiento de aire y la evaporación.

### 16.3.3 HERBIVORÍA Y EXCRECIÓN

Los estudios de pérdidas de biomasa debido al consumo por herbivoría generalmente se realizan mediante experimentos de exclusión. Se seleccionan parcelas de vegetación, en algunas de las cuales se evita el acceso de los herbívoros mediante cercas o mallas, evitando alteraciones del microclima. Las pérdidas se estiman a través de la biomasa o material muerto en las parcelas con exclusión en relación a las parcelas sin exclusión.

Se ha estimado que cerca de 10% del incremento de materia seca de las raíces puede ser excretado. Las únicas técnicas disponibles son fundamentalmente procedimientos de laboratorio con el uso de material marcado o radiactivo.

## 16.4. METABOLISMO

### 16.4.1. FOTOSÍNTESIS

La fotosíntesis puede ser estimada cuantificando el intercambio de anhídrido carbónico, oxígeno o el uso de isótopos estables (Long & Hallgren 1985, Field *et al.* 1989). Es posible cuantificar la fotosíntesis sin considerar la transpiración y viceversa, sin embargo es aconsejable evaluar estas dos variables porque ambos procesos son sinérgicos e interdependientes. La conductancia foliar al vapor de agua, calculado a partir de la cuantificación del intercambio de agua, es un parámetro crítico para determinar la concentración interna de anhídrido carbónico en la hoja ( $C_i$ ). Esta última puede ser cuantificada directamente pero su registro es técnicamente complicado. Dado que la difusión de anhídrido carbónico y agua es aproximadamente similar, se puede estimar la conductancia foliar al anhídrido carbónico a partir de la conductancia al vapor de agua.

Las hojas, tallos o toda la planta son ubicadas en cámaras cerradas, donde la concentración de anhídrido carbónico decrece y el vapor de agua en el aire aumenta. La tasa de disminución del gas es la tasa de fotosíntesis y la tasa de incremento de vapor de agua es la tasa de transpiración. Para determinar la tasa de fotosíntesis ( $A'n$ ) en  $\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1}$  es necesario registrar la concentración de anhídrido carbónico en la cámara al inicio ( $C_b$ ) y al final ( $C_f$ ):

$$A'n = (C_b - C_f)V/\Delta t$$

donde  $V$  es el volumen del sistema y  $\Delta t$  el tiempo entre ambas medidas. Para expresar la tasa de fotosíntesis por unidad de área foliar o por peso ( $A_n$ ) ( $\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  o  $\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) se divide  $A'n$  por el área o el peso del tejido fotosintético.

#### SISTEMAS ABIERTOS O EN EQUILIBRIO

En estos sistemas una corriente de aire pasa continuamente por la cámara. El aire de salida presenta una concentración inferior de anhídrido carbónico y superior de agua que el aire de entrada. Si las tasas de fotosíntesis y transpiración y el flujo de aire a través de la cámara son constantes, la tasa de fotosíntesis neta es:

$$A_n = (U_e C_e - U_o C_o)/L$$

donde  $U_e$ ,  $U_o$ ,  $C_e$  y  $C_o$  son el flujo de aire de entrada y salida, y sus concentraciones de anhídrido carbónico, respectivamente, que difieren por la remoción de anhídrido carbónico y la adición de agua.

Para los sistemas abiertos existen dos alternativas de operación: el modo diferencial y el compensado. En el último, la disminución de anhídrido carbónico por la fotosíntesis es compensada por la inyección adicional de este gas, de forma que la concentración en la salida es la misma que en la entrada. Los sistemas compensados son más adecuados en instrumentos con pequeñas cámaras de aire, en las que puede registrarse importantes disminuciones de anhídrido carbónico, así como en sistemas donde la transpiración es la única fuente de humedad de la cámara. En el modo compensado la tasa de fotosíntesis es igual a la tasa de inyección de anhídrido carbónico.

El anhídrido carbónico está presente en la atmósfera en muy pequeñas cantidades ( $350 \mu\text{mol}$  por mol de aire). En el intercambio de gases se necesita de una precisión cercana a  $1 \mu\text{mol mol}^{-1}$  (1 ppm) y mayor en los sistemas abiertos que en los cerrados. Los métodos modernos cuantifican su concentración con analizadores de gas infrarrojo (IRGA), que determinan la diferencia entre la energía aplicada y la absorbida por la muestra.

Los sistemas cerrados no mantienen un estado de equilibrio dinámico debido a que requieren un cambio de concentración, alterando las condiciones ambientales de los órganos fotosintéticos, por lo que son poco apropiados para analizar respuestas fotosintéticas en distintas condiciones ambientales. Por otra parte, no necesitan cuantificar el flujo de aire, por lo que son más pequeños y portátiles, y pueden analizar un gran número de muestras.

#### SISTEMAS DE RADIOISÓTOPOS

Cualquier tejido fotosintético expuesto a una atmósfera que contiene  $^{14}\text{CO}_2$  incorporará  $^{14}\text{C}$  en los productos de la fotosíntesis. El  $^{14}\text{C}$  es un radioisótopo poco costoso y relativamente seguro, y la tecnología para cuantificar su desintegración está generalmente disponible. Los sistemas basados en este principio también pueden ser abiertos o cerrados. La mayoría de los sistemas abiertos son instrumentos de laboratorio, mientras los sistemas de campo son fundamentalmente cerrados. Estos últimos cuantifican la radioactividad incorporada a los tejidos o registran la pérdida de radioactividad del gas en el sistema. En el primer modo el protocolo es el siguiente: se encierra el material vegetal en una cámara, se inyecta una cantidad conocida de  $^{14}\text{CO}_2$ , se deja transcurrir un tiempo específico ( $\Delta t$ ), se retira el material vegetal de la cámara y se cosecha para un análisis posterior (generalmente mediante conteo en líquido de centelleo). Por último se estima la tasa de fotosíntesis ( $A_i$ ) en  $\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  o  $\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-1}$  según:

$$A_i = B/(\Delta t L e S)$$

donde B es la actividad específica del material vegetal, L el área o la biomasa, e la eficiencia de conteo y S la actividad específica del gas que pasa a través de la hoja. Aunque el tiempo de exposición sea corto, una pequeña parte del  $^{14}\text{CO}_2$  fijado en la fotosíntesis es liberado por la respiración mitocondrial, por lo tanto  $A_i$  es la producción bruta y no neta (Long & Hallgren 1985).

Los métodos con radioisótopos requieren de muestreos destructivos y no brindan resultados inmediatos en el terreno. Requieren de un equipamiento importante de laboratorio y no permiten cuantificar simultáneamente el intercambio de agua y anhídrido carbónico.

#### 16.4.2. FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA

Cuando la energía luminosa es absorbida por una molécula de clorofila, la configuración electrónica de la molécula queda temporalmente alterada. Dos tipos de procesos compiten por absorber la energía disipada: a) los fotoquímicos, que dirigen la energía a las reacciones químicas de la fotosíntesis, b) los no-fotoquímicos, que disipan la energía en forma de radiación infrarroja (calor) y radiación roja/infrarroja, denominada fluorescencia. Los cambios de fluorescencia pueden ser utilizados para inferir la utilización de la energía suministrada por los procesos fotoquímicos (Krause & Weis 1991, Govindjee 1995). Cerca de 95% de la fluorescencia de la clorofila observada a temperaturas fisiológicas normales deriva de moléculas de clorofila asociadas con el fotosistema II (PSII).

#### PARÁMETROS QUE REQUIEREN ADAPTACIÓN A LA OSCURIDAD

La adaptación a la oscuridad inhibe todas las reacciones dependientes de la luz. Esto permite la completa reoxidación de las moléculas aceptoras de electrones del

PSII y maximiza la probabilidad que la energía absorbida pueda ser utilizada en procesos fotoquímicos.  $F_0$  es definida como la fluorescencia luego de la adaptación a la oscuridad durante 10 a 30 min. Este parámetro se determina al inicio del experimento cuando la muestra es iluminada con luz modulada. Una determinación precisa de la fluorescencia requiere de un sistema de detección sensible para distinguir la luz actínica de la señal de fluorescencia. Este problema es superado en los fluorómetros modulados, en que el tejido se expone a una fuente de luz ámbar en pulsos, provocando una excitación y una señal de fluorescencia en ausencia de luz actínica.

La fluorescencia máxima ( $F_m$ ) se registra cuando la muestra es expuesta a un pulso saturante de luz, reduciendo temporalmente todos los aceptores de electrones del PSII, y limitando así los procesos fotoquímicos del fotosistema. Esta ausencia temporal de competencia de los procesos fotoquímicos por absorber energía origina la máxima emisión de fluorescencia. La diferencia entre  $F_0$  y  $F_m$  determina la máxima capacidad de utilización fotoquímica de la luz y es definida como fluorescencia variable ( $F_v$ ). El cociente  $F_v / F_m$  (eficiencia máxima del PSII) es directamente proporcional a la eficiencia del PSII (Butler 1977, 1978). En la curva de fluorescencia incluida en resultados se puede consultar los parámetros mencionados.

#### PARÁMETROS QUE REQUIEREN ADAPTACIÓN A LA LUZ

En el caso de un tejido adaptado a la luz, una proporción de los aceptores de electrones se encuentran reducidos, cerrando algunos centros de reacción del PSII. Son necesarias varias medidas de la fluorescencia de la muestra en diferentes estados para estimar la eficiencia cuántica del PSII ( $\Phi_{PSII}$ ). Inicialmente se registra la fluorescencia de la muestra ( $F_s$ ) a luz ambiente, después de adaptada a un régimen particular de luz y en un estado estable. Luego se aplica un pulso de saturación para cerrar todos los centros de reacción del PSII. Esta inhibición temporal de los procesos fotoquímicos del PSII permite determinar la máxima fluorescencia ( $F_m'$ ). Los parámetros adimensionales que se determinan en esta rutina y en combinación con las antes mencionadas son:

Eficiencia cuántica del  $\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s) / F_m'$  (Genty *et al.* 1989)

Coefficiente de extinción fotoquímica  $qP = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_0)$

Coefficiente de extinción no fotoquímica  $qNP = (F_m - F_m') / (F_m - F_0)$

Definición alternativa de extinción no fotoquímica  $NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$

Tasa de transporte de electrones  $ETR = PAR \% 0.5 \% 0.84 \% \Phi_{PSII}$

#### 16.4.3. DINÁMICA DE NUTRIENTES

La asimilación de nutrientes puede ser cuantificada mediante sucesivas cosechas, procedimiento de gran interés en estudios ecosistémicos. Por el contrario, para determinar el potencial fisiológico de las especies para absorber nutrientes bajo condiciones específicas, es más adecuado utilizar radioisótopos o analizar la asimilación en cortos períodos de tiempo (Chapin & Van Cleve 1989).

#### ASIMILACIÓN POR COSECHA

La tasa de asimilación neta de nutrientes puede ser determinada por el incremento de la concentración en la biomasa en cierto tiempo. En uno de los procedimientos, un individuo puede ser cuantificado no destructivamente y esa medida convertida en cantidad de nutrientes mediante ecuaciones alométricas desarrolladas sobre individuos vecinos en los que se practica la cosecha destructiva. Alternativamente, los individuos o ramet pueden ser cosechados en un área en fechas sucesivas determinando directamente la concentración de nutrientes. En este caso, las unidades de muestreo deben ser establecidas previamente. La cantidad de nutrientes en la planta es el producto de la biomasa y la concentración. Generalmente, la biomasa es más variable que la concentración de nutrientes, por lo que el tamaño adecuado para estimar la biomasa es suficiente para los nutrientes. La asimilación anual de nutrientes requiere de cosechas al comienzo de la estación de crecimiento y en el período de máxima cantidad de nutrientes incorporados, que depende de la planta y el nutriente analizado, fundamentalmente de su movilidad.

#### RADIOISÓTOPOS

La asimilación puede ser estimada por la aparición en la biomasa de un isótopo previamente incorporado al medio. Las desventajas de este procedimiento son lograr uniformidad en el suministro del isótopo (principalmente en el sustrato) y predecir la cantidad disponible. En la disponibilidad se debe tener en cuenta los mecanismos de adsorción en el suelo y agua, y la inmovilización microbiana.

#### ASIMILACIÓN DE NUTRIENTES

Una aproximación más adecuada a estudios ecofisiológicos es la estimación de la asimilación en cortos períodos de tiempo y con soluciones donde se conoce la concentración y el balance de los nutrientes (Chapin & Van Cleve 1989). La estimación puede realizarse mediante la acumulación de los nutrientes en los tejidos vegetales (principalmente raíces) o su disminución en el medio. En el caso de las plantas flotantes libres este último procedimiento puede ser muy adecuado tanto para estudios de laboratorio como de campo. En los estudios de campo la concentración de nutrientes en el medio y sus variaciones en el tiempo pueden ser determinadas mediante las técnicas descritas en el capítulo 11.

#### ANÁLISIS DE NUTRIENTES EN PLANTAS

El primer paso en el análisis de nutrientes en la biomasa es la destrucción del componente orgánico por medio de la digestión húmeda o seca. En la primera se utiliza una combinación de varios ácidos ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HClO}_4$ ) y peróxido de hidrógeno. El tiempo de digestión depende del sustrato vegetal y la combinación de oxidantes utilizados. Las ventajas de la digestión ácida son la ausencia de volatilización de metales o fósforo, una relativa rapidez y que se puede adaptar a procedimientos de rutina. Además, se puede analizar un gran número de elementos en una sola digestión. Debe tomarse las precauciones necesarias debido a los efectos corrosivos de estos procedimientos y la posibilidad de explosiones. Los métodos secos requieren de muflas en las que se quema el sustrato vegetal a  $500^\circ\text{C}$  durante 2 a 8 h, dependiendo de la especie y de la cantidad de material. En este procedimiento el nitrógeno se pierde por volatilización, por lo que es comúnmente analizado por el método de Kjeldahl. El procedimiento normal determina nitrógeno orgánico más amonio, sin embargo nitrato y nitrito puede ser incluido en el análisis usando la modificación de permanganato de hierro reducido (Bremner & Mulvaney 1982).

Los métodos colorimétricos para determinar la concentración de amonio, al igual que en el caso de fósforo son los descritos en el capítulo 11. Otros elementos (K, Na, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn) contenidos en la digestión pueden ser determinados por espectrofotometría de absorción atómica (ver cap. 9).

## 16.5. RESULTADOS

En un experimento de 45 días de duración se analizaron los efectos de la radiación solar ultravioleta en una comunidad de hidrófitas flotantes libres de la Laguna de las Nutrias en Rocha (60°30' W, 38°53' S). Considerando una aproximación florística, uno de los efectos estudiados fue la incidencia de este tipo de radiación en el porcentaje de biomasa relativo de las diferentes especies de esta comunidad. Se consideraron tres tratamientos: a) control que recibe toda la radiación solar (PAR+UVA+UVB), b) PAR+UVA y c) sólo PAR. Como se observa en la figura 16.6 (pág. siguiente), los niveles naturales de UVA y UVB no tuvieron efectos en la estructura de la comunidad durante el período de estudio.

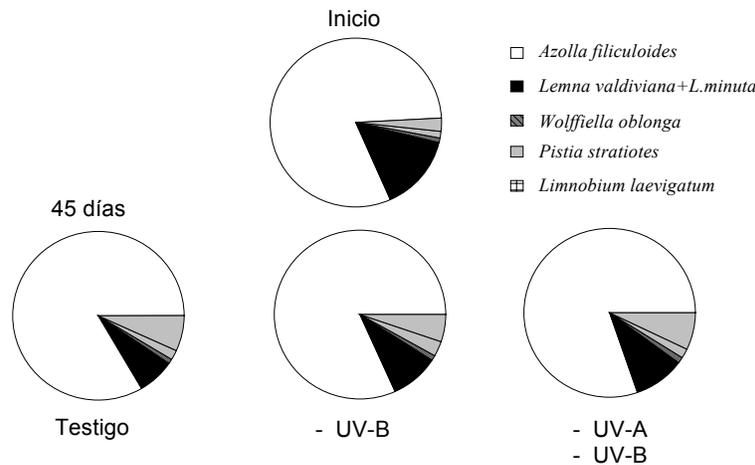


Figura 16.6. Porcentaje de biomasa de las seis especies más abundantes, al inicio y luego de 45 días de experimento. *Lemna valdiviana* y *L. minuta* se consideran juntas debido a la imposibilidad de identificar todos los ejemplares presentes en la muestra. (Mazzeo *et al.*, datos no publicados).

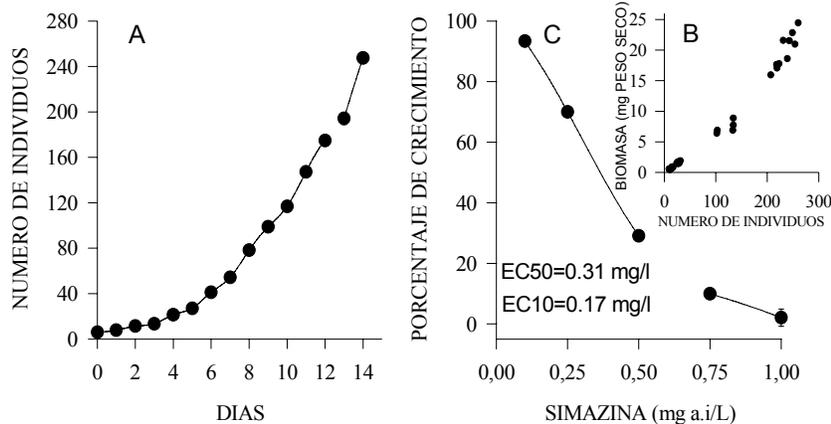
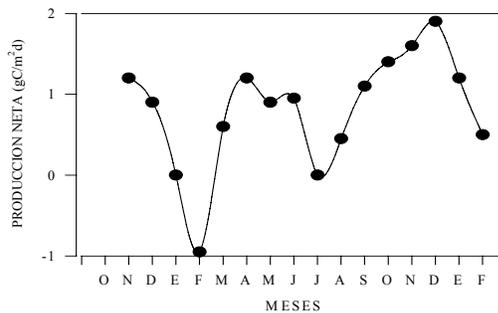


Figura 16.7. A) Crecimiento exponencial del clon Sudáfrica de *Lemna gibba*. B) Relación lineal entre el número de individuos y la biomasa. C) Variación del porcentaje de crecimiento relativo en función de la concentración de simazina, los EC50 y EC10 se estimaron de acuerdo a la ecuación  $\ln y = a + bx$  ( $r^2 = 0.97$ ) (tomado de Mazzeo *et al.* 1998).

El estudio del efecto de la simazina (herbicida de la familia de las triazinas) sobre el crecimiento de un clon de *Lemna gibba* (7218-Sudáfrica) es presentado en la figura 16.7. Una vez verificado el crecimiento exponencial (en términos de producción de individuos) en un cultivo sin herbicida y durante catorce días de cultivo (Fig. 16.7A), se analizó la relación entre la biomasa y el número de individuos (Fig. 16.7B). A partir de estos resultados se estimó la tasa de crecimiento relativo (RGR) de acuerdo a un enfoque clásico. Además, se determinó la concentración del herbicida que reduce el crecimiento en 50 y 10% en relación al control. La simazina tiene un efecto notorio sobre el crecimiento del clon analizado, en un rango de concentraciones registrado en algunos cuerpos de agua.

Los valores mensuales de la producción primaria neta de *Pistia stratiotes* (estimados como incremento de la biomasa por unidad de superficie y tiempo) de la Laguna del Cisne se muestran en la figura 16.8 (Mazzeo *et al.*, datos no publicados). Para su cálculo se estimó la biomasa por metro cuadrado y su cobertura en la laguna en el tiempo. El peso de las plantas también puede ser estimado en este caso de forma indirecta, a través del registro del diámetro de la roseta o el largo de la raíz (Fig. 16.9). Los valores más elevados de productividad en primavera y otoño comparados con el verano, se deberian a que en este último las tasas de respiración generalmente superan a las de fotosíntesis. Otro factor determinante podría ser la presencia del coleóptero *Neohydrornomus affinis*, un notable control biológico de *Pistia*. Los adultos de esta especie se alimentan de la superficie de la hoja y las larvas de los tejidos internos de la misma, provocando mayor daño en el verano. En invierno la productividad decrece debido a la sensibilidad de *Pistia* a las bajas temperaturas del aire y del agua.

Figura 16.8. Variación mensual de la producción neta de *Pistia stratiotes* en la Laguna del



Cisne, estimada como incremento de la biomasa por unidad de superficie y tiempo.

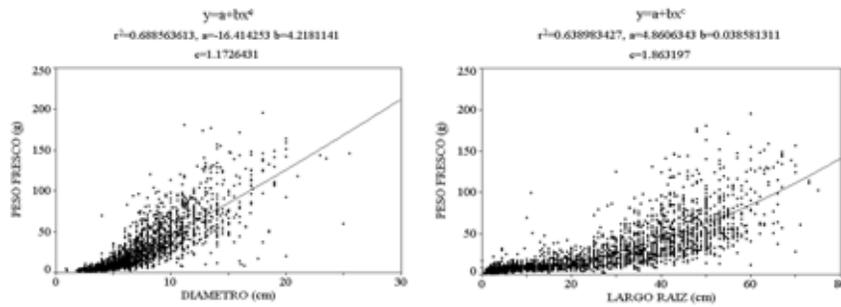


Figura 16.9. Relaciones entre los parámetros morfológicos y el peso fresco de los individuos de *P. stratiotes*; n = 2771 (tomado de Mazzeo *et al.* 1993).

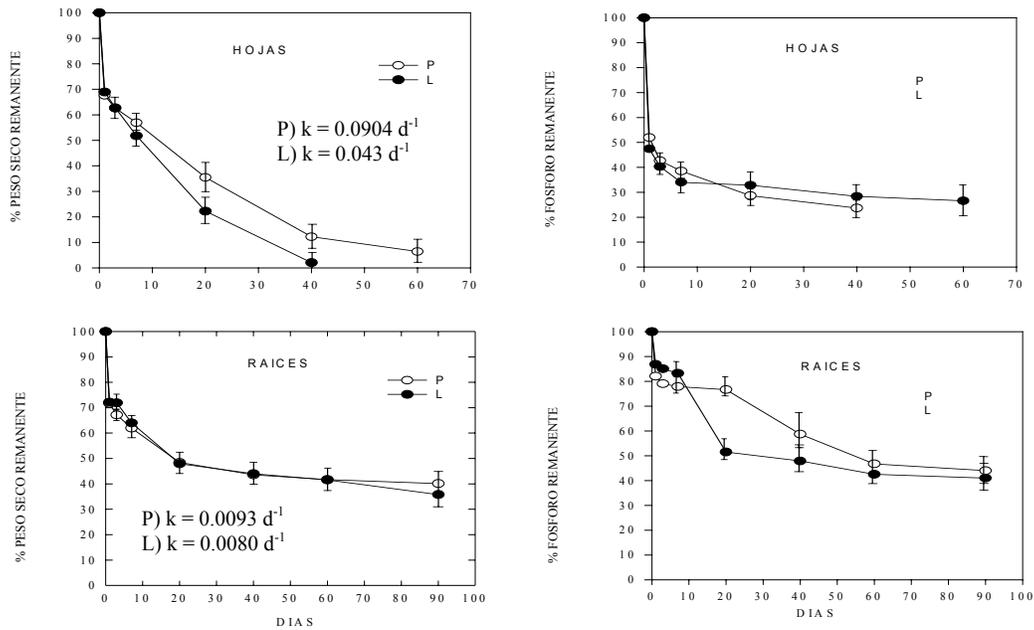


Figura 16.10. Tasas de descomposición (k) y porcentaje del peso seco y fósforo remanente en hojas y raíces de *P. stratiotes* en la zona litoral (L) y pelágica (P). Las barras verticales representan  $\pm 1$  desvío estándar (tomado de Sommaruga *et al.* 1993).

En la misma especie y lugar de estudio se analizó el proceso de descomposición de acuerdo a la técnica de bolsa de broza, realizando experimentos simultáneos en las zonas litoral (L) y pelágica (P). Las tasas de descomposición pueden ser catalogadas como rápidas para las hojas y lentas para las raíces, como consecuencia del menor contenido de fibra de las primeras (Fig. 16.10). Las tasas de descomposición menor en L que en P puede ser atribuido a diferencias significativas en la concentración de oxígeno. Se encontró el clásico patrón de pérdida inicial rápida de peso seco durante la primera semana, debido a la excreción de sustancias solubles

orgánicas e inorgánicas. El contenido de fósforo de la biomasa en descomposición disminuyó abruptamente durante las primeras etapas del proceso de descomposición y posteriormente de una forma más gradual (Fig. 16.10). De acuerdo a los valores de *Pistia* registrados en el otoño (Mazzeo *et al.* 1993) se estimó que la carga de fósforo al comienzo del experimento osciló entre 1.30 y 1.56 g m<sup>-2</sup>. De acuerdo a las tasas de liberación del fósforo se pudo estimar que en un período de 24 h se pueden liberar de la zona litoral entre 13.9 y 16.8 µg-at l<sup>-1</sup>. Según estos resultados es evidente que el crecimiento y descomposición de la biomasa tiene una gran influencia en la dinámica del fósforo en esta laguna somera.

La incidencia de la radiación solar ultravioleta sobre la eficiencia fotosintética fue estudiada en el mismo ejemplo considerado en la figura 16.6 (pág. 161), analizando los efectos sobre la eficiencia máxima, eficiencia cuántica del PSII y coeficiente de extinción fotoquímica en *Pistia stratiotes* el 27/12/1998 (luego de 24 días de experimento). Para ello, se elaboró la rutina indicada en la figura 16.11 (pág. siguiente), donde a una muestra adaptada a 45 min de oscuridad, se aplicó luz amar modulada, actínica e infrarroja y dos pulsos saturantes de luz. La aplicación de la luz infrarroja permite una mayor precisión en la estimación de la disipación fotoquímica y no fotoquímica de la energía. El Fo' determinado sustituye al Fo en las fórmulas indicadas en 16.4.2. Los estudios de laboratorio demuestran que la radiación ultravioleta afecta el PSII provocando una reducción de la eficiencia cuántica y del coeficiente de extinción fotoquímica; sin embargo los resultados presentados en la figura 16.12 sugieren que los niveles naturales no tiene influencia en los parámetros considerados. Las diferencias entre los resultados de laboratorio y de campo pueden deberse a dosis insuficientes de PAR y bajas e irreales proporciones de PAR:UVB de los primeros.

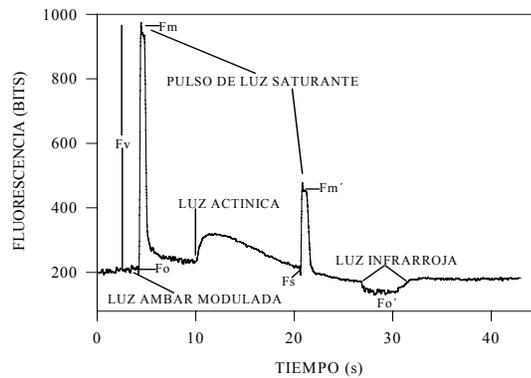


Figura 16.11. Curva de fluorescencia de una hoja de *P. stratiotes* adaptada a 45 minutos de oscuridad en horas del mediodía (Mazzeo *et al.*, datos no publicados).

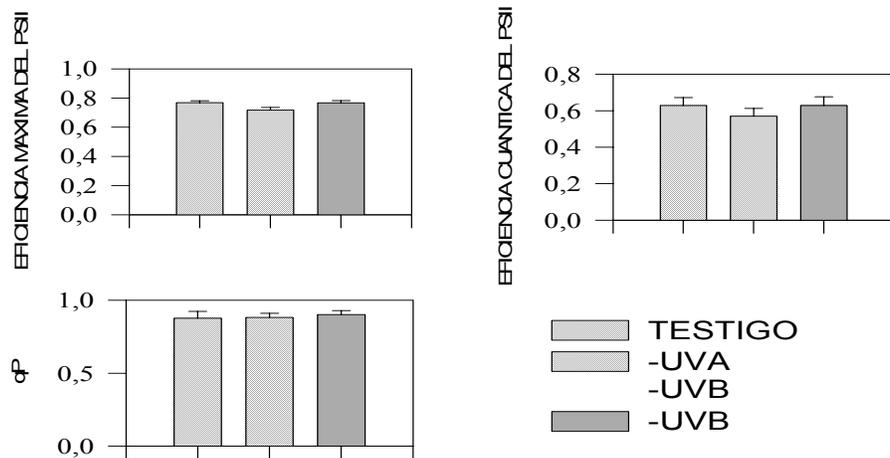


Figura 16.12. Eficiencia máxima y cuántica del PSII y coeficiente de extinción fotoquímica de *P. stratiotes* para el 27/12/98. Las barras indican  $\pm 1$  error estándar y no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos (Mazzeo *et al.*, datos no publicados).

# ZOOPLANCTON

Daniel Fabián



EL ZOOPLANCTON COMPRENDE UN GRUPO DE ANIMALES MICROSCÓPICOS que habitan la columna de agua, a cuyos movimientos están sujetos debido a su limitada capacidad de locomoción. Son importantes intermediarios en la transferencia de energía entre el fitoplancton del que se alimentan, y organismos mayores como los peces, que lo consumen. Por otra parte, participan en la regeneración de nutrientes disueltos, que se vuelven rápidamente disponibles para algas y bacterias.

### 17.1. COMPOSICIÓN

En la mayoría de los ambientes acuáticos continentales, el zooplancton está conformado principalmente por protozoos, rotíferos, cladóceros y copépodos.

#### 17.1.2. PROTOZOARIOS

Los protozoarios raras veces se incluyen en el estudio de las comunidades planctónicas, ya que presentan dificultades metodológicas en cuanto a la recolección e identificación. Son organismos unicelulares de unos pocos micrómetros hasta algunos milímetros que pueden formar colonias. Se reproducen por fisión binaria, o sexualmente por conjugación. Su máxima biomasa es observable durante el periodo de disminución del fitoplancton, a principios del verano. Los protozoarios pueden vivir en concentraciones bajas de oxígeno y aún en anaerobiosis, principalmente los ciliados que se desarrollan notablemente en aguas contaminadas y ricas en materia orgánica.

#### 17.1.3. ROTÍFEROS

Su cuerpo (Fig. 17.1) es generalmente elongado y cubierto de una cutícula que en algunas especies se ensancha denominándose lorica. El tamaño varía entre 30 y 2000  $\mu\text{m}$  y presenta tres regiones ligeramente diferenciadas: cabeza, tronco y pie. En la cabeza, la región oral está rodeada por una o dos coronas de cilios que sirven para la locomoción y la captura del alimento. La boca conduce, a través de un tubo ciliado, al mástax u órgano masticador en forma de bolsa. La estructura básica del mástax incluye el *trophi*, que es un conjunto de piezas esclerotizadas y translúcidas. El pie es la parte del cuerpo que se prolonga más allá del ano y presenta generalmente dos dedos cónicos y glándulas que segregan una sustancia adhesiva. Se clasifican según tengan uno o dos ovarios en las clases Monogononta, que constituye aproximadamente 90 % de las especies conocidas, y Digononta. Muchas especies de rotíferos planctónicos al igual que los cladóceros, exhiben cambios en su morfología a lo largo del año, fenómeno que se conoce como cicломorfosis. Se reproducen por partenogénesis alternada con reproducción sexual. Presentan dimorfismo sexual, siendo los machos de menor tamaño.

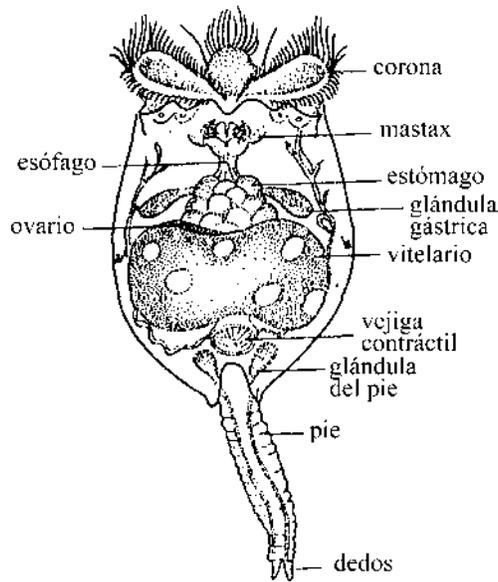


Figura 17.1. Esquema general de la estructura de un rotífero (modificado de José de Paggi 1995).

#### 17.1.4. CLADÓCEROS

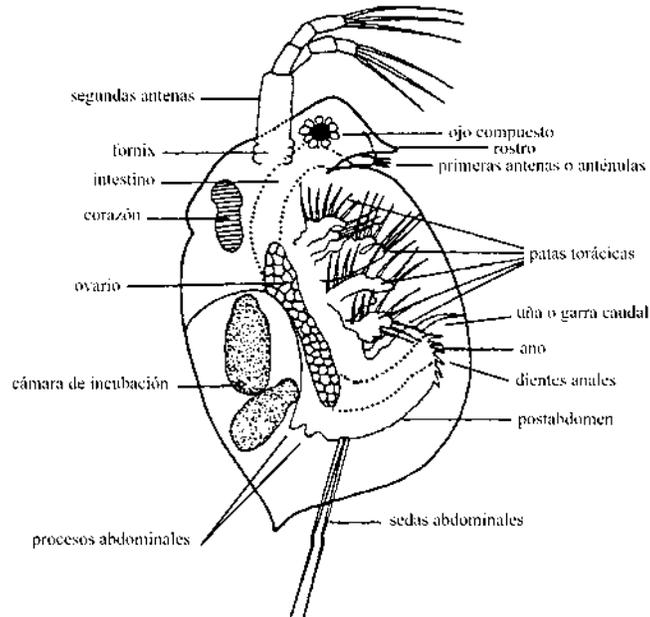
El orden Cladocera pertenece a la subclase Branchiopoda y comprende las pulgas de agua, así llamadas por su similitud con la forma y movimiento de estos insectos (Fig. 17.2, pág. siguiente).

La mayoría de las especies vive en la región litoral. Miden entre 200 y 3000  $\mu\text{m}$  y un caparazón quitinoso cubre la cabeza y cuerpo transparentes y sin segmentación evidente. El postabdomen posee dos garras terminales y a veces filas de dientes marginales. Entre la cabeza y el cuerpo puede existir una depresión llamada sinus cervical. En la cabeza tienen un ojo compuesto y un ocelo y las antenas segmentadas, más robustas y principalmente locomotoras, y en la región ventral las anténulas.

las no segmentadas de función sensorial. Las piezas bucales están constituidas por un par de mandíbulas quitinosas, fuertes y dentadas que sirven para moler, un par de maxílulas que empujan el alimento hacia las mandíbulas, un par de maxilas pequeñas y un labrum central que cubre las piezas bucales. Presentan 5 o 6 pares de patas torácicas aplanadas y con gran cantidad de sedas y pelos.

*Figura 17.2.* Esquema general de la estructura de un cladócero (González 1988).

La reproducción es partenogenética durante la mayor parte del año, y existe dimorfismo sexual. Los huevos son liberados en la cámara de cría en la porción dor-



sal del caparazón, donde se desarrollan hasta que emerge un juvenil semejante al adulto.

#### 17.1.5. COPÉPODOS

Tienen el cuerpo alargado, más o menos cilíndrico y con segmentación evidente. Los primeros cinco segmentos corresponden a la cabeza y se hallan fusionados con el primero o los dos primeros segmentos torácicos, formando el cefalotórax (Fig. 17.3, pág. siguiente).

Siguen cuatro o cinco segmentos torácicos cada uno con un par de patas natatorias, y el abdomen que tiene como máximo cinco segmentos más o menos fusionados. En su extremo tiene una estructura birramada, la furca, con sedas plumosas. La región cefálica presenta cinco pares de apéndices: primeras antenas largas, segundas cortas, mandíbulas, maxílulas y maxila. Los apéndices del primer segmento torácico, o maxilípedos, también intervienen en los procesos de alimentación.

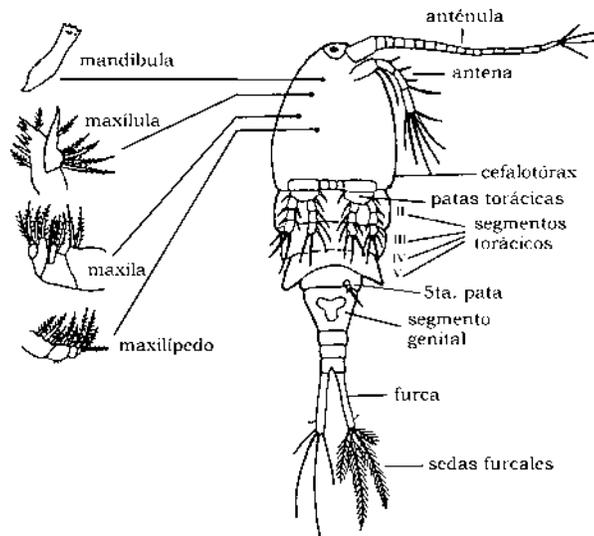


Figura 17.3. Esquema general de la estructura de un copépodo (González 1988).

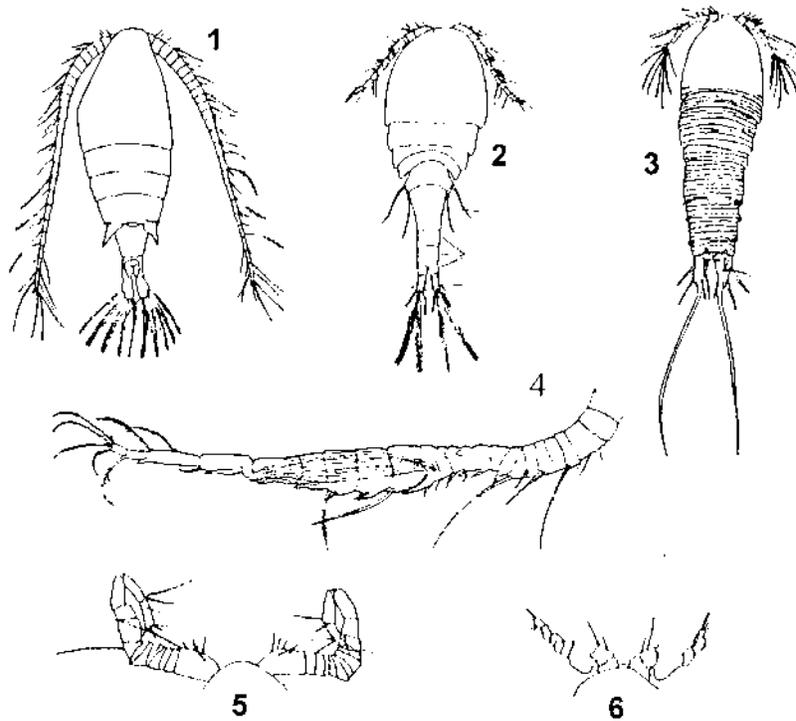


Figura 17.4. 1) Calanoida, 2) Cyclopoida, 3) Harpacticoida, 4) Anténula derecha geniculada del macho de Calanoida, 5) Anténulas geniculadas del macho de Cyclopoida y 6) *idem* de Harpacticoida (Basado en Reid 1985 y Rocha & Matsumura-Tundisi 1976).

Este orden incluye tres subórdenes: Calanoida, Ciclopoida y Harpacticoida (Fig. 17.4, pág. anterior). Las calanoides son típicamente planctónicas y raramente litorales. El cefalotórax es más largo que el abdomen. Las hembras tienen antenas muy largas, con 23 a 25 artejos, que llegan hasta la parte posterior del cuerpo y presentan un solo saco ovífero. Los machos presentan solamente una antena derecha acodada para abrazar a la hembra durante la cópula.

Los ciclopoides tienen el cefalotórax abultado en su parte media, robusto y algo más largo que el abdomen. Las hembras tienen las primeras antenas más cortas que el cefalotórax, con 6 a 17 artejos, y en el macho ambas están acodadas. La hembra posee dos sacos ovíferos.

Los harpacticoides tienen las primeras antenas muy cortas, de hasta 8 artejos. El cefalotórax y el abdomen son casi del mismo ancho y longitud. Generalmente presentan un saco ovífero.

La reproducción en los copépodos planctónicos es sexual. Los huevos eclosionan en una larva activa llamada nauplio, que posee tres pares de apéndices (primera y segunda antena y mandíbula). Esta larva muda y llega al estadio II, desarrollando la maxila. Le siguen cuatro estadios de nauplio y cinco de copepodito antes de la última muda, de la cual resulta el adulto sexualmente maduro.

## 17.2. MUESTREO

Los muestreadores más comunes son las redes y las trampas, ya descritas en el capítulo anterior. Las redes colectan y concentran simultáneamente la muestra. El volumen ( $V$ , en  $m^3$ ) de agua filtrado se obtiene de:

$$V = \pi r^2 d$$

donde  $r$  es el radio de la boca de la red (m) y  $d$  la distancia de arrastre (m). La red se colmata progresivamente durante el arrastre, por lo que el volumen realmente filtrado siempre es menor al teóricamente calculado. Conviene calcular el factor de eficiencia de filtración, que es el cociente entre ambos volúmenes. El uso de medidores de flujo debidamente calibrados permite conocer el volumen de agua que pasa por la red, aunque no es posible cuantificar exactamente el efecto de la colmatación.

Su fácil manejo, transporte y bajo costo, las hacen adecuada para un control cualitativo rápido y primario. Tienen la ventaja de coleccionar muestras grandes e integradas, especialmente la Clarke-Bumpus. Sin embargo, producen una subestimación del número de individuos presentes, debido a la colmatación de la malla, la turbulencia producida en la boca de la red, y el efecto de “espantamiento” que provoca en los organismos. La colmatación puede compensarse mediante un cono de reducción, que es un ensanchamiento detrás de la boca, de modo que al aumentar el diámetro del conducto la velocidad del agua disminuye, la resistencia es menor y entra más agua a la red que la correspondiente al diámetro de la boca.

Las botellas muestreadoras son recomendables para las formas más pequeñas del zooplancton como protozoos y rotíferos. Su mayor limitación es que obtienen muestras de volumen pequeño, poco representativas debido a la distribución heterogénea del zooplancton. Tienen una baja eficiencia de colecta cuando son utilizados para organismos zooplanctónicos grandes, escasos y con mayor movilidad. Cuando la población es poco abundante es necesario un número muy grande de réplicas para obtener datos representativos.

Las trampas son un tipo particular de botellas especialmente diseñadas para la recolección de plancton. Estos muestreadores tienen un rápido sistema de cierre,

bocas grandes y baja visibilidad, lo que reduce el escape de los organismos más activos, y son de fácil manejo por un solo operador aún desde un bote pequeño. Su eficiencia es mayor a la de otros métodos, comparable a la red Clarke-Bumpus (Langeland & Rognerud 1974). Las trampas de plancton más comunes son la Judday, que cierra mediante un mensajero, y la Patalas y la Schindler (Fig. 4.1, pág. 32), que cierran automáticamente.

Los tubos constituyen una variante de las botellas, que permite obtener muestras verticales integradas en aguas de poca profundidad. Su principal desventaja es el pequeño volumen de la muestra, ya que para ser manejables, no pueden ser muy largos ni anchos. Se recomienda su empleo en ambientes someros y áreas litorales ricas en vegetación (Pennak 1962).

Las bombas de succión pueden ser eléctricas o mecánicas. Comparadas con los otros muestreadores de volumen, las bombas permiten la extracción de una gran cantidad de agua. Además de muestras puntuales, se pueden obtener muestras verticales integradas de la columna de agua. Sin embargo, deterioran a los organismos, sobre todo a los de mayor tamaño y los problemas de evasión son mayores que en las redes y trampas.

Es recomendable la utilización de bombas peristálticas o centrífugas, a fin de evitar el daño de los organismos frágiles. Entre una muestra y la siguiente es indispensable expulsar toda el agua que quede en la manguera. Para más información sobre técnicas de muestreo del plancton pueden consultarse UNESCO (1968), Edmondson & Winberg (1971), Downing & Rigler (1984), Bottrell *et al.* (1976) y Boltovskoy (1981).

### 17.3. PRESERVACIÓN Y MONTAJE

El fijador más común es el formaldehído 40% neutralizado, en cantidad tal que se logre una concentración final de aproximadamente 4%. Sin embargo, este método tiene algunas desventajas para estudiar la estructura morfológica o la dinámica poblacional, especialmente en rotíferos y cladóceros, que tienden a contraerse o deformarse.

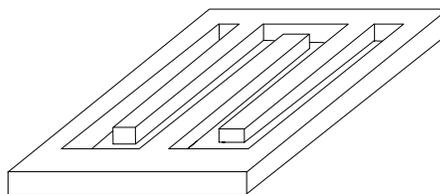
La adición de un narcótico como dióxido de carbono o una gota de hidrato de Cloral 10% anestesia a los organismos, con lo cual sus estructuras retráctiles se mantienen relajadas, agregándose luego el formaldehído. La adición del narcótico es imprescindible para estudios de contenido estomacal. Un método eficiente que evita la retracción es la inmersión de los organismos en etanol 95%.

Una solución de 40 g l<sup>-1</sup> de azúcar y 4% de formaldehído es eficaz para prevenir la deformación y pérdida de material de los organismos (Haney & Hall 1973). La modificación de Prepas (1978) consiste en una solución de 60 g l<sup>-1</sup> de azúcar y 2% de formaldehído neutralizado con borato de sodio mantenida a bajas temperaturas. Detalles sobre la fijación y preservación del zooplancton pueden encontrarse en las obras de Steedman (1976) y Boltovskoy (1981).

Una de las técnicas más sencillas para hacer montajes permanentes consiste en colocar los organismos en una gota de glicerina 5% sobre un portaobjetos. Una o dos veces al día se agrega una gota de la misma solución hasta que se haya evaporado toda el agua y el organismo se encuentre en glicerina pura. Se añade una gota de gelatina glicerinada derretida, se le coloca un cubreobjetos y se sella con esmalte de uñas transparente.

### 17.4. ABUNDANCIA

Si el número de individuos es grande, se debe tomar alícuotas para facilitar el conteo, para lo que existen varios dispositivos (Schwoerbel 1975, Boltovskoy 1981). La pipeta Hensen-Stempel permite obtener un volumen exacto y se construye con una pipeta graduada y una pera de goma, con una abertura no menor a 4 o 5 mm,



para capturar el zooplancton grande. El volumen recomendable para la submuestra oscila entre 1 ml para organismos pequeños como protozoos, rotíferos y nauplios, y 5 ml para aquellos más grandes. Las cámaras más utilizadas son las denominadas Sedgwick-Rafter de 1 ml (ver 13.3) y las cubetas Bogorov de 5 ml (Fig. 17.5), pero también se puede emplear cajas de Petri con fondo reticulado.

Figura 17.5. Cubeta abierta tipo Bogorov para el conteo de zooplancton.

#### Procedimiento

- 1) Dependiendo de la concentración de organismos, llevar la muestra a 50, 100 o 200 ml con agua destilada, en un recipiente graduado. Si la muestra presenta sedimentos inorgánicos conviene colorearla con Rosa de Bengala o Eritrosina, que permiten una mejor visualización de los organismos.
- 2) Homogeneizar la muestra evitando los movimientos giratorios que concentran el material en el centro. El burbujeo con una pipeta es práctico y efectivo.
- 3) Inmediatamente retirar una submuestra con pipeta para minimizar la decantación de los organismos, y volcarla en una cámara de conteo. Vaciar totalmente la pipeta enjuagándola con agua destilada.
- 4) Luego del conteo, regresar la submuestra al recipiente y verificar el volumen antes de sacar otra submuestra. El número de submuestras depende de la precisión buscada. Se obtienen mayor precisión contando varias submuestras pequeñas que su equivalente en una submuestra mayor.
- 5) Bottrell *et al.* (1976) encontraron que el coeficiente de variación por submuestra se estabiliza en 0.08 cuando la densidad de organismos excede 60 individuos. El volumen de la pipeta puede ser ajustado para dar densidades de 50 individuos o más por submuestra.
- 6) Calcular la concentración en el medio (C) en ind l<sup>-1</sup> según:

$$C = [(a_1 + a_2 + \dots + a_N)] / [(V_1 + V_2 + \dots + V_N) V_f]$$

donde  $a_1, a_2, a_N$  es el número de organismos contados en cada alícuota,  $V_M$  el volumen al que se llevó la muestra,  $V_1, V_2, V_N$  el volumen de las alícuotas y  $V_f$  el volumen de agua filtrada del medio.

## 17.5. BIOMASA

La biomasa es el peso de todo el zooplancton viviente por unidad de área o volumen en un momento dado. Es estimada como la suma de los productos del número de individuos de cada clase de tamaño, cohorte o especie y su masa promedio. Las técnicas más frecuentes para estimar la biomasa de los rotíferos son directamente como peso seco o indirectamente como biovolumen. La estimación en cladóceros y copépodos también se efectúa por pesado directo, o por estimación indirecta de la relación largo-peso. Otras propiedades utilizadas para caracterizar la biomasa del zooplancton son el contenido calórico, de carbono, nitrógeno, fósforo, proteínas, lípidos, carbohidratos y ATP.

### 17.5.1. PESO SECO

Para estimar el peso seco en rotíferos se deben pesar grupos de organismos de una misma especie e igual tamaño, ya que el peso individual suele ser menor al nivel de precisión de las microbalanzas (0.10 µg). Es recomendable pesar un número de individuos suficiente para lograr un peso mínimo de 5 µg dependiendo del tamaño (Dumont *et al.* 1975).

Los microcrustáceos se pesan individualmente o en pequeños grupos, dependiendo del tamaño. Cuando sea posible conviene trabajar con material fresco, sin fijadores, cuyo efecto es discutido (Dumont *et al.* 1975, Pace & Orcutt 1981).

#### *Procedimiento*

- 1) Separar y contar los organismos, colocándolos en agua destilada.
- 2) Ubicarlos en pequeñas cápsulas de papel aluminio, previamente pesadas.
- 3) Poner a secar en estufa a 60 °C durante 24 a 48 h.
- 4) Enfriar en desecador durante 1 o 2 h y pesar.
- 5) Calcular el peso promedio por individuo, y multiplicarlo por el total de individuos en la muestra.

Para obtener un nivel de precisión adecuado, se recomienda trabajar con réplicas cuyo coeficiente de variación resulte menor a 17%.

### 17.5.2. BIOVOLUMEN

Un método para estimar el volumen es asimilando la forma de las especies a una forma geométrica. Ruttner-Kolisko (1977) propuso una serie de fórmulas simples para calcular el volumen en 20 géneros de rotíferos. Las medidas deben ser tomadas en organismos adultos narcotizados y sin aplastar, lo que altera las dimensiones reales. Para las mediciones se usa un micrómetro ocular previamente calibrado. El volumen es convertido a peso fresco asumiendo un peso específico unitario, y a peso seco asumiendo una relación de 0.05 (Schindler & Noven 1971) a 0.1 (Pace & Orcutt 1981). Este método proporciona aproximaciones de biomasa.

### 17.5.3. RELACIÓN LARGO-PESO

La técnica más frecuente en microcrustáceos consiste en la determinación del peso mediante ecuaciones que lo relacionan con dimensiones lineales del organismo como la longitud total o del cefalotórax. Varias ecuaciones han sido publicadas (Dumont *et al.* 1975, Bottrell *et al.* 1976) y en general se las presenta como:

$$W = a L^b \quad \ln W = \ln a + b \ln L$$

donde W es el peso y L la dimensión lineal. El valor de cada constante a y b es característico de cada taxón. Para lograr un buen nivel de aproximación, es recomendable desarrollar las regresiones para el material propio.

### 17.6. PRODUCCIÓN SECUNDARIA

Parte del alimento ingerido por un organismo es asimilado y el resto es eliminado. Las moléculas asimiladas son utilizadas para el metabolismo y en la elaboración de nuevas sustancias orgánicas. Esta elaboración constituye la producción secundaria, que se distribuye en 1) estructuras que juegan un papel temporal para el individuo que lo sintetiza (exuvias), 2) crecimiento individual y 3) formación de productos sexuales que aseguran la permanencia de la población. Numéricamente, la producción secundaria es la biomasa elaborada por poblaciones heterotróficas por unidad de tiempo y área o volumen (Waters & Crawford 1973) y puede estimarse de diversas maneras (Edmondson & Winberg 1971, Downing & Rigler 1984). Pourriot *et al.* (1982) distingue métodos basados en el tiempo de reemplazo y los basados en cambios de biomasa. Estos últimos son el método de las cohortes y el del crecimiento acumulado.

### 17.6.1. MÉTODO DEL TIEMPO DE REEMPLAZO

Es aplicable a rotíferos y cladóceros que presentan un desarrollo juvenil breve y cuyos estadios de desarrollo son difíciles de diferenciar. El crecimiento numérico de una población ( $\Delta N$ ) en un intervalo de tiempo ( $t$ ) puede calcularse como:

$$\Delta N = b N$$

donde  $N$  es el número medio de individuos en el tiempo  $t$ , y  $b$  es la tasa de natalidad, que se puede calcular usando la fórmula de Edmondson:

$$b = \ln(1 + E/D)$$

donde  $E$  es el número de huevos por hembra y  $D$  el tiempo de desarrollo embrionario. Si el peso del nuevo individuo no es muy diferente al del adulto, la producción ( $P$ ) puede calcularse multiplicando por el peso medio individual ( $W$ ): donde  $NW$  representa la biomasa de la población.

$$P = b N W$$

### 17.6.2. MÉTODO DE LAS COHORTES

Es el más adecuado para estudiar poblaciones monocíclicas constituidas por una generación anual, como es el caso de los copépodos, en los que se pueden identificar fácilmente las cohortes. Conociendo el número de individuos de la cohorte al inicio ( $N_1$ ) y al final ( $N_2$ ) de cada intervalo de tiempo  $t$ , y el incremento del peso individual medio en ese tiempo ( $\Delta W_t$ ), la producción ( $P_t$ ) se expresa por la fórmula de Boysen-Jensen. Es la suma de la biomasa de los organismos vivos al final del período más la de los que murieron en ese período, asignándoles a éstos la mitad del incremento de peso:

$$P_t = N_2(W_2 - W_1) + (N_1 + N_2)(W_2 - W_1)/2$$

$$P_t = \Delta W_t(N_1 + N_2)/2$$

La producción total ( $P$ ) es la suma de las producciones de cada período:

$$P = \frac{1}{2} \sum_{t=1}^j (N_t + N_{t-1})(W_t - W_{t-1})$$

Una variante de este método es la curva de Allen, en que se sustituye la linealidad de cada intervalo por una curva, cuya integral es la producción:

$$P = \int_{w_1}^{w_2} N \, dW$$

### 17.6.3. MÉTODO DEL CRECIMIENTO ACUMULADO

Se aplica a copépodos de crecimiento lento y estadios de desarrollo bien diferenciados, y a cladóceros, cuya estructura poblacional se halla en función de tallas. El método asume un crecimiento lineal entre estadios. La producción ( $P$ ) será:

$$P = N_1 \Delta W_1 / D_1 + N_2 \Delta W_2 / D_2 + \dots + N_n \Delta W_n / D_n$$

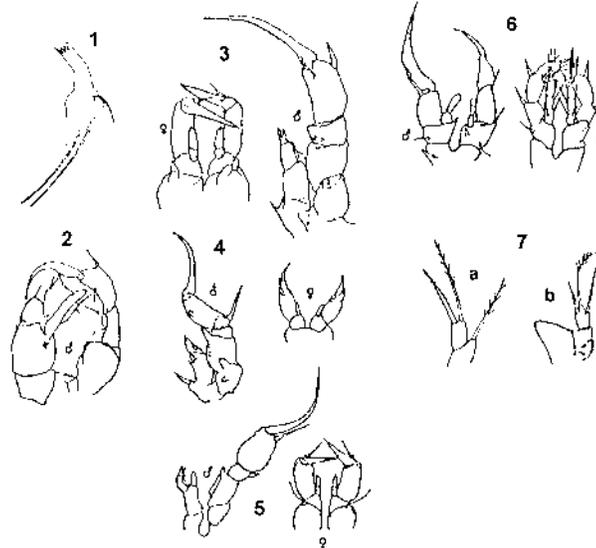
$$P = \sum_{i=1}^j (N_i \Delta W_i / D_i)$$

donde  $N_1 \dots N_n$  es el número de individuos de los diferentes estadios,  $D_1 \dots D_n$  la duración del estadio y  $\Delta W$  el aumento de peso entre diferentes estadios.

### 17.7. CLAVES PARA FAMILIAS REGISTRADAS EN URUGUAY

Las siguientes claves se confeccionaron sobre la base de Brook (1959), Ringuelet (1958), Olivier (1962), Ruttner-Kolisko (1974), Koste (1978), Pennak (1989), González (1988), Reid (1985), Battistoni (1995), José de Paggi (1995) y Paggi (1995). No se incluyen claves para protozoos. las que se pueden consultar en Edmondson (1959), Pennak (1989), Lopretto (1995), Page & Siemensma (1995), Vucetich & Lopretto (1995) y Foggetta (1995).

Figura 17.6. 1) Palpo mandibular de Cyclopoidae; 2) Pseudodiaptomidae (Pseudodiaptomus



richardi inequalis); 3) Diaptomidae (Notodiaptomus sp.); 4) Diaptomidae (Odontodiaptomus michaelsoni); 5) Diaptomidae (Diaptomus sp.); 6) Boeckellidae (Boeckella sp.); 7 a) Cyclopinae (Thermocyclops sp.) y 7 b) Eucyclopinae (Macrocyclus sp.) (basado en Reid 1985 y Battistoni 1995).

#### 17.7.1. COPEPODA (Fig. 17.6)

- 1 a. Cefalotórax y abdomen de diferente ancho y longitud 2
- b. Cefalotórax y abdomen casi iguales Orden HARPACTICOIDA
- 2 a. Anténulas de las hembras usualmente tan o más largas que el cuerpo, y compuestas de 18 a 25 artejos. En los machos la derecha es acodada. Hembra con un saco ovígero Orden CALANOIDA
- 3
- b. Anténulas de las hembras usualmente más cortas que el cefalotórax y compuestas de 6 a 17 artejos. En los machos, ambas son acodadas. Hembra con dos sacos ovígeros Orden
- CYCLOPOIDA Palpo mandibular reducido a una protuberancia, armada con 2 o 3 cerdas o ausente CYCLOPIDAE 5

- 3 a. Anténulas de 20 a 22 artejos. Primero al cuarto par de patas torácicas con endópodos triarticulados. Quinta pata de la hembra sin endópodos. Machos con endópodos de un artejo. Furca de ramas largas. *PSEUDODIAPTOMIDAE*
- b. Anténulas de 25 artejos. Primer par de patas con endópodos biarticulados, del segundo al cuarto triarticulados. Quinta pata de macho y hembra con endópodos 4
- 4 a. Quinta pata del macho con exópodos asimétricos, sólo el derecho termina en gancho, endópodos rudimentarios. Quinta pata de la hembra con el 3<sup>er</sup> artejo exopodial rudimentario o ausente  
*DIAPTOMIDAE*
- b. Quinta pata del macho con exópodos simétricos de tres artejos, el último transformado en gancho. Endópodo derecho más desarrollado. Quinta pata de la hembra con el 3<sup>er</sup> artejo exopodial sin proceso espiniforme desarrollado  
*BOECKELLIDAE*
- 5 a. Artejo terminal de la quinta pata de la hembra con 3 cerdas o espinas. Primero al cuarto par de patas triarticuladas Subfamilia *EUCYCLOPINAE*
- b. Artejo terminal de la quinta pata de la hembra con 1-2 cerdas o espinas. Primero al cuarto par de patas bi o triarticuladas Subfamilia *CYCLOPINAE*

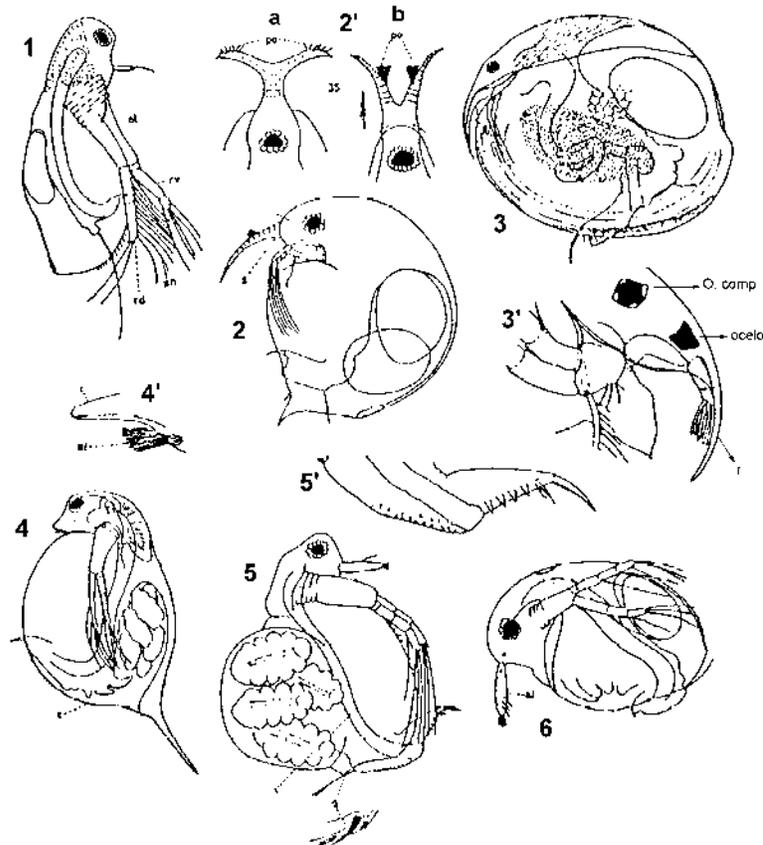


Figura 17.7. 1) Sididae (*Diaphanosoma fluviatile*) rv rama ventral, rd rama dorsal; 2) Bosminidae (*Bosmina hagmani*); 2') parte de la cabeza y anténulas, vista dorsal (a *Bosminopsis*, y b *Bosmina*); 3) Chydoridae (*Pseudochidorus globosus*); 3') detalle de la cabeza, anténulas y rostro, ojo compuesto; 4) Daphnidae (*Daphnia spinulata*); 4') rostro y anténula; 5) Moinidae (*Moina minuta*) i intestino, gancho valvar; 5') postabdómen y 6) Macrothricidae (*Guernella raphaelis*) (Paggi 1995).

#### CLADOCERA (Fig. 17. 7)

- 1 a. Cinco o seis pares de patas, las primera y segunda prensiles y las restantes foliáceas. Antenas con cerdas cortas y menos plumosas. Con o sin rostro  
Orden ANOMOPODA 2
- b. Seis pares de patas, cinco iguales y foliáceas. Antenas birramadas con cerdas plumosas. Con o sin rostro  
Orden CTENOPODA  
Antenas muy robustas, con 2 artejos en la rama dorsal con cerdas insertas en la cara anterior, y 3 artejos en la ventral  
*SIDIDAE*
- 2 a. Anténulas fusionadas con el extremo del rostro, relativamente largas y aguzadas, con papilas olfatorias en su cara interna, reunidas en su parte media o distribuidas a lo largo de su parte distal  
*BOSMINIDAE*
- b. Anténulas no fusionadas con el extremo del rostro, relativamente cortas y truncadas, con papilas olfatorias en su extremo 3
- 3 a. Rostro en forma de pico, en general más largo que el diámetro del ojo. Intestino con circunvoluciones  
*CHYDORIDAE*
- b. Rostro, cuando presente, corto. Intestino sin circunvoluciones (excepto un género de Macrotrícidos muy poco frecuente)  
4
- 4 a. Anténulas cortas, en general menores que el diámetro del ojo, debajo del rostro  
*DAPHNIDAE*
- b. Anténulas largas, mayores que el diámetro del ojo, insertas en la cara ventral o en el extremo anteroventral de la cabeza 5
- 5 a. Postabdómen con una porción postanal subcónica, con una hilera de espinas triangulares chatas, culminando distalmente con una espina generalmente bifida. Anténulas insertas en la cara ventral de la cabeza. Parte interna del ángulo posterodorsal de las valvas con un gancho valvar a cada lado  
*MOINIDAE*
- b. Postabdómen de forma variada, sin ninguna de las características antes citadas. Anténulas insertas en el extremo anteroventral o cara ventral de la cabeza  
*ACROTHRICIDAE*

#### ROTIFERA (Fig. 17.8 y 17.9)

- 1 a. Con dos ovarios, trophi ramado, siempre con pie, con o sin dedos  
Clase DIGONONTA Orden BDELLOIDEA
- b. Con un ovario, trophi de otro tipo nunca ramado (maleoramado, maleado, incudado, forcipado, uncinado, virgado o cardado) con o sin pie  
Clase MONOGONONTA 2

- 2 a. Trophi maleoramado Orden FLOSCULARIACEA  
4
- b. Trophi de otro tipo  
3
- 3 a. Trophi uncinado Orden COLLOTHECACEA  
Corona sin la típica estructura, muy grande y que se abre en un embudo,  
con largas sedas en el borde COLLOTHECIDAE
- b. Trophi no uncinado Orden PLOIMA 7
- 4 a. Sin apéndices sobre el cuerpo 5  
b. Con apéndices sobre el cuerpo 6
- 5 a. Cuerpo oval o semicircular, aplanado dorso-ventralmente. Corona como una  
rueda o en espiral ciliado TESTUDINELLIDAE
- b. Cuerpo largo, generalmente en forma de copa. Corona de bandas de ciliadas, en  
forma de herradura, con una brecha o porción sin ciliadas CONOCHILIDAE
- 6 a. Cuerpo cónico sin pie, con 6 apéndices como brazos, con anchas bandas  
musculares HEXARTHRIDAE
- b. Cuerpo más bien cilíndrico y corto, con 2 espinas anteriores que nacen por  
debajo de la corona, generalmente más largas que el cuerpo y una o dos es-  
pinas caudales FILINIIDAE
- 7 a. Trophi maleado 8  
b. Trophi no maleado 11
- 8 a. Pie y dedos muy cortos. Pie anillado y retráctil o con 3 segmentos. General-  
mente con 6 espinas en el margen anterior dorsal de la loriga. O bien sin pie,  
terminando la loriga en forma redondeada o con una espina caudal central o  
2 laterales BRACHIONIDAE
- b. Siempre con pie corto y dedos mucho más largos que aquél. 9
- 9 a. Cuerpo oval, loriga formada por una placa dorsal y una ventral. La dorsal en  
sección transversal es curvada, con una quilla central, o álulas laterales  
EUCHLANIDAE
- b. Cuerpo en general aplanado dorsoventralmente, con surcos laterales sepa-  
rando la placa dorsal de la ventral o un surco ventral 10
- 10 a. Pie con 2 segmentos, 2 dedos más largos que el pie. Surcos laterales sepa-  
rando la placa dorsal de la ventral, extremos del margen anterior de las pla-  
cas terminados en espinitas más o menos desarrolladas. Cuerpo fuertemente  
comprimido dorsoventralmente LECANIDAE
- b. Pie con 3 segmentos. Surco ventral a lo largo del todo el cuerpo o con una  
profunda incisión por lo cual sale el pie, o bien con un escudo semicircular,  
transparente, que cubre la corona COLURELLIDAE
- 11 a. Trophi incudado. Cuerpo sacciformes, transparentes, sin loriga, con o sin pie  
SPLANCHNIDAE
- b. Trophi no incudado (virgado o virgado-forcipado) 12
- 12 a. Cuerpo corto 13

- b. Cuerpo alargado 14
- 13 a. Sin apéndices, loriga delgada, sin pie o con pie cilíndrico, y con dedos cortos, que se ubican ventralmente *GASTROPODIDAE*
- b. Con apéndices, 4 estiletes en la corona y extensiones laterales a modo de aurículas con ciliias, o con 12 apéndices foleáceos a modo de remos en el tercio anterior del cuerpo. O bien sin apéndices, pero característicos por su loriga muy gruesa y ornamentada, un pie ventral largo y fuerte, anillado y con 2 dedos cortos *SYNCHAETIDAE*
- 14 a. Cuerpo cilíndrico, loriga de una sola pieza. Dedos filiformes, cortos y de igual longitud, o sólo uno bien desarrollado y el otro atrofiado. Corona ubicada apicalmente *TRICHOCERCIDAE*
- b. Cuerpo ahusado, sin loriga. Campo bucal de la corona ubicado ventralmente. En algunas especies, grupos de ciliias sobre aurículas laterales. Pie con dedos cortos *NOTOMMATIDAE*

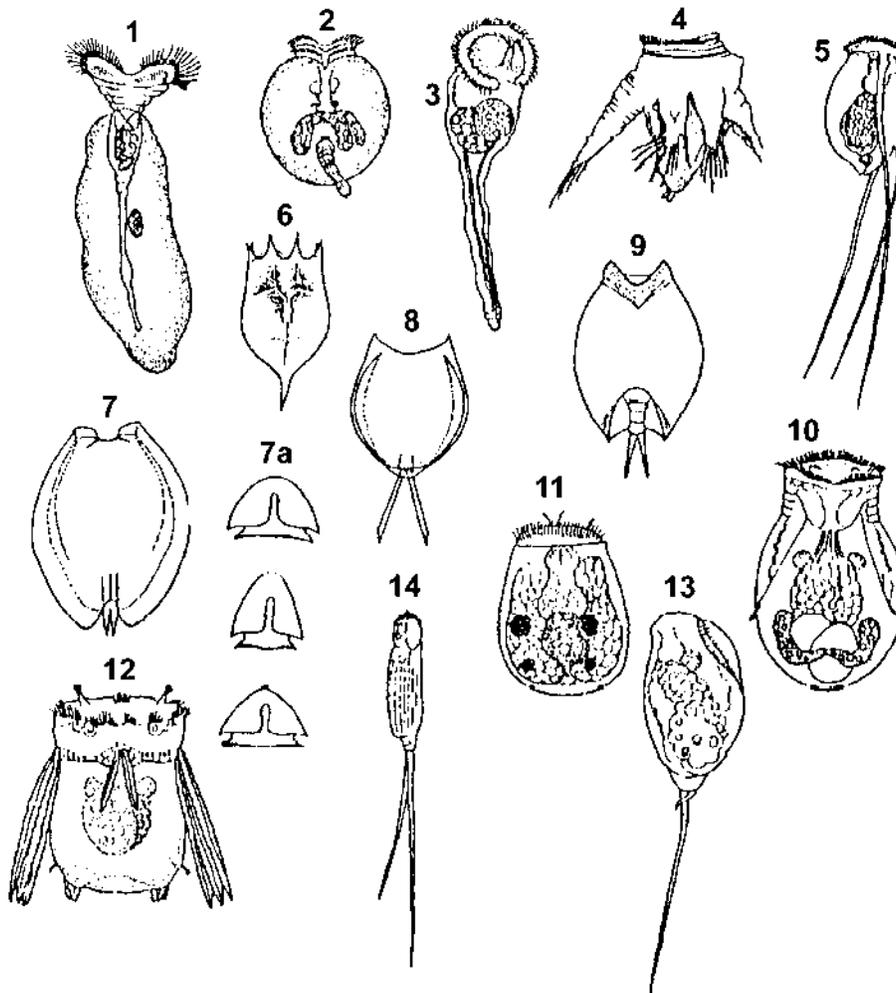


Figura 17.8. 1) Collotheceidae (*Collotheca mutabilis*); 2) Testudinellidae (*Testudinella patina*); 3) Conochilidae (*Conochilus unicornis*); 4) Hexarthridae (*Hexarthra intermedia*); 5) Filiniidae (*Filinia longiseta*); 6) Brachionidae (*Keratella cochlearis*); 7) Euchlanidae (*Euchlanis dilatata*); 7 a) secciones transversales de la lorica; 8) Lecanidae (*Lecane curvicornis*); 9) Collurellidae (*Lepadella latusinus*); 10) Asplachnidae (*Asplachna brightwelli*); 11) Gastropodidae (*Ascomorpha ecaudis*); 12) Synchaetidae (*Polyarthra vulgaris*); 13) Trichocercidae (*Trichocerca braziliensis*) y 14) Notommatidae (*Monommata longiseta*).

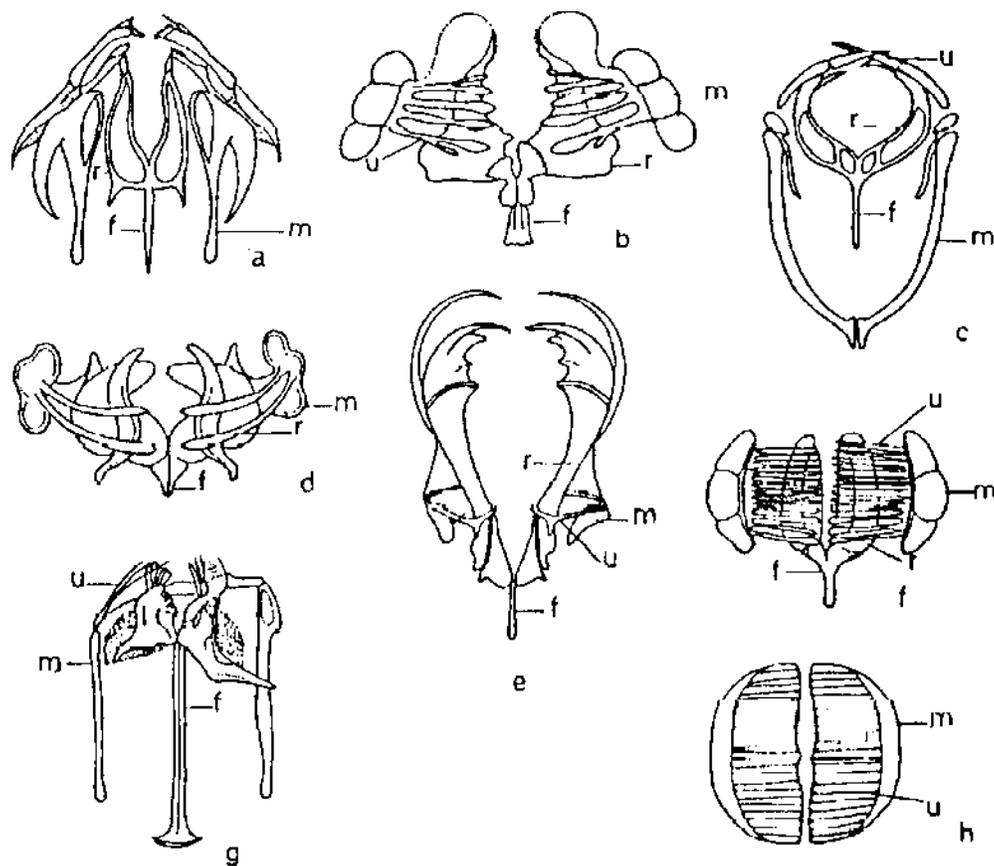


Figura 17.9. Tipos de trophi: a) cardado, b) maleado, c) forcipado, d) uncinado, e) incudado, f) maleoramado, g) virgado, h) ramado. Estructuras: f) fulcrum, m) manubrio, r) rami, u) unci.

## 17.8. RESULTADOS

El comportamiento estacional de la abundancia del zooplancton en el lago Ton Ton (Fabián 1995) es típicamente bimodal con pulsos en primavera y otoño (Fig. 17.10, pág. siguiente). Esta comunidad fue dominada por los copépodos calanoides (*Notodiaptomus incompositus*) y rotíferos. El sistema presenta características propias de ambientes eutróficos: fluctuaciones extremas de la abundancia total, presencia de *Acanthocyclops robustus*, *Daphnia* y *D. parvula* y dominancia de formas medianas y pequeñas de herbívoros planctónicos.

En la tabla 17.1 (pág. siguiente) se comparan algunas características del lago Ton Ton con el reservorio del Cisne. En ambos ambientes la diversidad del zooplancton presenta valores normales en comparación con otros ambientes de la región (Paggi 1980).

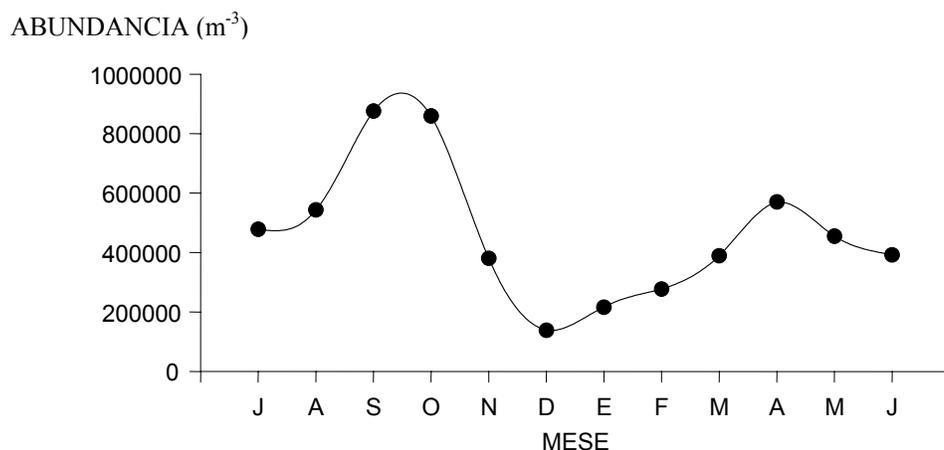


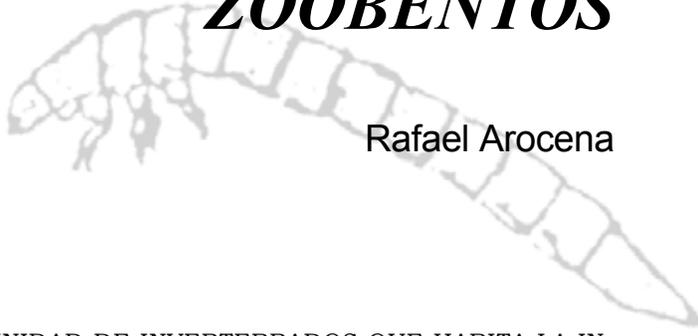
Figura 17.10. Variación de la abundancia total del zooplancton en el lago Ton-Ton entre julio de 1988 y junio de 1999 (Fabián 1995).

Tabla 17.1. Algunos parámetros de la comunidad zooplanctónica de dos ambientes lénticos artificiales del departamento de Canelones. Se incluyen características de ambos sistemas (Tomado de Fabián 1993 y 1995). La abundancia relativa entre paréntesis corresponde al porcentaje del total de grupos incluyendo rotíferos. s/d: sin datos.

CARACTERISTICAS	LAGO TON TON	EMBALSE DEL CISNE
Superficie (Há)	13.6	48.5
Estado trófico	Eutrófico	Mesotrófico
Régimen térmico	Monomictico cálido	Polimictico tibiocóntinuo
Taxa de microcrustáceos	10	14
Taxa de rotíferos	13	s/d
Abundancia relativa (%)		
Copépodos	79 (49)	83
Cladóceros	21 (13)	17
Rotíferos	-- (38)	s/d
Diversidad H' (bits)	0.53 - 2.62	0.94 - 2.50
Copépodos	<i>Notodiatomus incompositus</i> <i>Acanthocyclops robustus</i> <i>Tropocyclops prasinus meridionalis</i>	<i>N. incompositus</i> <i>A. robustus</i> <i>Tropocyclops</i> sp. <i>Metacyclops</i> sp.
Cladóceros	<i>Daphnia parvula</i> <i>Ceriodaphnia dubia</i> <i>C. cornuta</i> <i>Bosmina huaronensis</i> <i>Diaphanosoma birgei</i> <i>Chydorus sphaericus</i> <i>Daphnia ambigua</i>	<i>D. parvula</i> <i>C. dubia</i> <i>C. cornuta</i> <i>B. huaronensis</i> <i>D. birgei</i> <i>Chydorus</i> sp. <i>Diaphanosoma fluviatile</i> <i>Moina micrura</i> <i>Simosa</i> sp. <i>Pleuroxus</i> sp.

# ZOOBENTOS

Rafael Arocena



EL ZOOBENTOS ES LA COMUNIDAD DE INVERTEBRADOS QUE HABITA LA INTERFASE SÓLIDO-LÍQUIDO DE LOS SISTEMAS ACUÁTICOS. La fase sólida es fundamentalmente el sedimento, pero también se incluyen otros sustratos, como las hidrófitas, aunque la comunidad que se desarrolla en este último es preferentemente denominada macrofitobentos. Es metodológicamente útil una clasificación por tamaños en a) microbentos, organismos menores a 100 o 200  $\mu\text{m}$  como los protozoos, b) meiobentos, hasta 0.5 o 1 mm como los rotíferos, nemátodos, copépodos y ostrácodos, y c) macrobentos, principalmente oligoquetos, moluscos e insectos.

Estos organismos pueden habitar sobre el fondo e incluso en el agua sobrenadante, aunque en estrecha relación con el sedimento, o bien dentro del mismo. En el primer caso se trata del epibentos, y en el segundo, de la infauna o endobentos. Según el sustrato sea roca, arena o lodo, se distingue un epilíton, epi/endopsammon y epi/endopelon, respectivamente.

### 18.1. COMPOSICIÓN

En las figuras 18.1 y 18.2 se presentan ejemplos de varios grupos de invertebrados bentónicos, de los cuales se realiza a continuación un revisión de las características morfológicas y ecológicas más importantes.

#### 18.1.1. PROTOZOARIOS

Ciliados, flagelados y amebas ocurren en todo tipo de hábitats y en un amplio rango de condiciones abióticas. La mayoría de las especies son cosmopolitas.

#### 18.1.2. PORÍFEROS

Las esponjas de la clase Demospongea, caracterizada por sus fibras de espongina y espículas de sílice, incluye al orden Haplosclerina y éste, a la familia Spongillidae con ca. 150 especies dulceacuícolas. Sus larvas planctónicas se fijan en cualquier sustrato estable en aguas someras, pero son raras en fondos lodosos, aguas turbias y charcos pequeños por su sensibilidad a los cambios ambientales. Para Uruguay, Larrañaga (1989) comunicó 10 especies dulceacuícolas, a las que hay que agregar otras

5 citadas por Ezcurra y Bonetto (1969) para el río Uruguay.

### 18.1.3. CELENTERADOS

Las inconspicuas hidras (clase Hydrozoa) son típicas de estanques, cursos limpios y el litoral lacustre. Se adhieren a objetos, generalmente a menos de 1.5 m de profundidad, pero faltan en fondos blandos y aguas pobres en oxígeno. Zamponi (1995) menciona 4 especies para Uruguay por Cordero (1941) y Dioni (1974).

### 18.1.4. PLATELMINTOS

Cinco órdenes de la clase Turbellaria incluyen especies dulceacuícolas. Las planarias (orden Tricladida) están en diversos ambientes someros bien oxigenados, usualmente bajo las piedras. Kawakatsu & Ponce de León (1989) dan una lista de turbelarios citados para Uruguay, que incluye un tricladido, *Dugesia tigrina* (= *D. maculata*). Esta especie, de amplia distribución en América, típica de aguas estancadas y tramos inferiores de ríos, tolera una moderada polución orgánica.

### 18.1.5. BRIOZOARIOS

Los ectoproctos comprenden unas 50 especies dulceacuícolas. Se encuentran en aguas limpias, oxigenadas, con poca carga inorgánica suspendida y someras, de estanques, lagos y arroyos lentos, debajo de ramas y piedras. Mañé-Garzón (1964) registró la presencia de *Hislopia corderoi* y del endoprocto *Urnatella gracilis* sobre bivalvos, y hace mención a una colección de briozoarios reunida por Cordero.

### 18.1.6. ROTÍFEROS

De mayor importancia en el plancton, todos los grandes grupos, especialmente los más primitivos con el pie bien desarrollado, se adhieren mediante secreciones a hojas y arena de variados hábitats semiacuáticos y acuáticos litorales.

### 18.1.7. NEMERTINOS

Los gusanos proboscídeos, abundantes entre la vegetación y los detritus litorales de los estanques, son difíciles de encontrar por su agregación extrema. Se conocen unas seis especies en el mundo.

### 18.1.8. GASTROTRICOS

El orden Chaetonotoidea es predominantemente dulceacuícola. Habitan el sedimento fino, la vegetación y el detritus de las aguas estancadas, asociados a nemátodos, rotíferos y pequeños oligoquetos. Soportan bajas tensiones de oxígeno y probablemente anaerobiosis temporaria.

### 18.1.9. NEMATOMORFOS

Los juveniles de la clase Gordioidea son parásitos internos de insectos acuáticos. Los adultos forman madejas en las orillas de estanques, lagos y arroyos, donde habitan sus huéspedes.

### 18.1.10. TARDÍGRADOS

Hay unas 350 especies, ocasionales e inconspicuas entre la vegetación litoral de

cuerpos lénticos.

#### 18.1.11. NEMÁTODOS

Hay unas 2000 especies dulceacuícolas de la clase Aphasmidia, muchas de ellas cosmopolitas. Casi siempre están presentes, a veces muy abundantes, en el sedimento fino y rico en restos vegetales de una gran variedad de hábitats. Son característicos del sedimento pobre en oxígeno, pero es alrededor de las raíces de las plantas acuáticas donde ocurre una gran variedad de especies.

#### 18.1.12. OLIGOQUETOS

Constituyen entre 80 y 100% de la fauna de sustratos arenosos y lodosos, pero están presentes en todos los ambientes, con una distribución fuertemente agregada. Los Tubificidae son dominantes a mayores profundidades, donde hay mucha materia orgánica y el sedimento es pobre en oxígeno. En arroyos rocosos y márgenes de lagos, los Naididae tienden a reemplazarlos. Según revisión de Gavrilov (1977) se conocían en Uruguay 33 especies, citadas en su mayoría por Cordero. Luego Arocena & Chalar (1989) comunican la presencia de 3 tubificidos y 3 naididos más, llevando a 39 el número de especies conocidas.

#### 18.1.13. POLIQUETOS

Aunque son casi exclusivamente marinos, algunas especies ocurren en estuarios y aguas salobres, y se conocen unas 50 exclusivas de aguas dulces, aunque mayoritariamente colectadas a menos de 20 millas de la costa.

#### 18.1.14. HIRUDÍNEOS

Las sanguijuelas son predominantemente dulceacuícolas, de estanques, litorales lacustres y arroyos lentos. Se fijan con sus ventosas al sustrato, que debe ser duro, y son frecuentes bajo las piedras. La mayoría soporta condiciones anaeróbicas por largos períodos, pudiendo alcanzar grandes densidades donde hay enriquecimiento orgánico. Ringuelet (1981) publicó la clave para Uruguay, con 20 especies libres o ectoparásitas y 2 parásitas permanentes de peces.

#### 18.1.15. GASTERÓPODOS

Aunque presentes en casi cualquier tipo de aguas dulces, excepto las muy contaminadas, y sobre cualquier superficie a menos de 2 m de profundidad, son raros en aguas blandas y a pH menor a 6.2. Los operculados (subclase Prosobranchia) respiran por branquias, y los pulmonados (Basomatophora) principalmente a través de la superficie corporal, por lo que pueden dispersarse en cuerpos efímeros y sobrevivir en aguas anaeróbicas. Figueiras (1964, 1965) describió las 42 especies de operculados y 21 de pulmonados conocidas en Uruguay.

#### 18.1.16. BIVALVOS

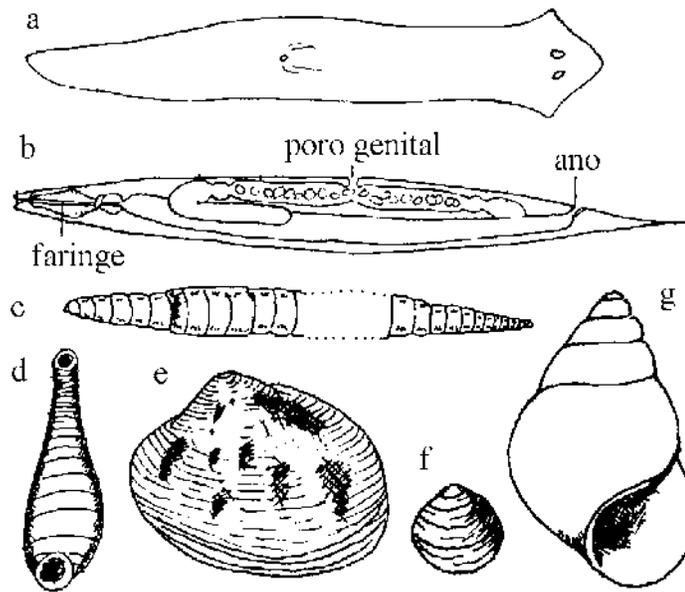
Aunque ocurren en todo tipo de hábitat no contaminado, son más abundantes y variados en grandes ríos y a menos de 2 m de profundidad. Prefieren un sustrato estable de grava y arena y aguas alcalinas ricas en carbonato de calcio. Los pequeños

cursos de agua contienen Sphaeriidae, que presentan poca especificidad para el sustrato, aunque faltan en rocas y lodo.

Los miembros de la superfamilia Unionacea son más grandes y vulnerables, pero su alta mortalidad es contrarrestada por el gran número de gloiquidios. Estos se adhieren a los peces hasta que ya maduros, si caen en un sustrato estable, continúan su ciclo.

Los Sphaeriidae (superfamilia Sphaeriacea) son hermafroditas y autofértiles, por lo que alcanza un solo individuo para su dispersión. Además, resisten la desecación y pueden enterrarse hasta 25 cm en el sedimento blando.

Figueiras (1965) hace la revisión de las especies de Uruguay y Olazarri (1966) las del departamento de Colonia con 20 Unionacea, 3 Sphaeriidae, 2 especies de *Neocorbicula*, y *Erodona mactroides*. Vertenheimer-Mendes & Olazarri (1983) reportaron la invasión de *Corbicula* en el río Uruguay.



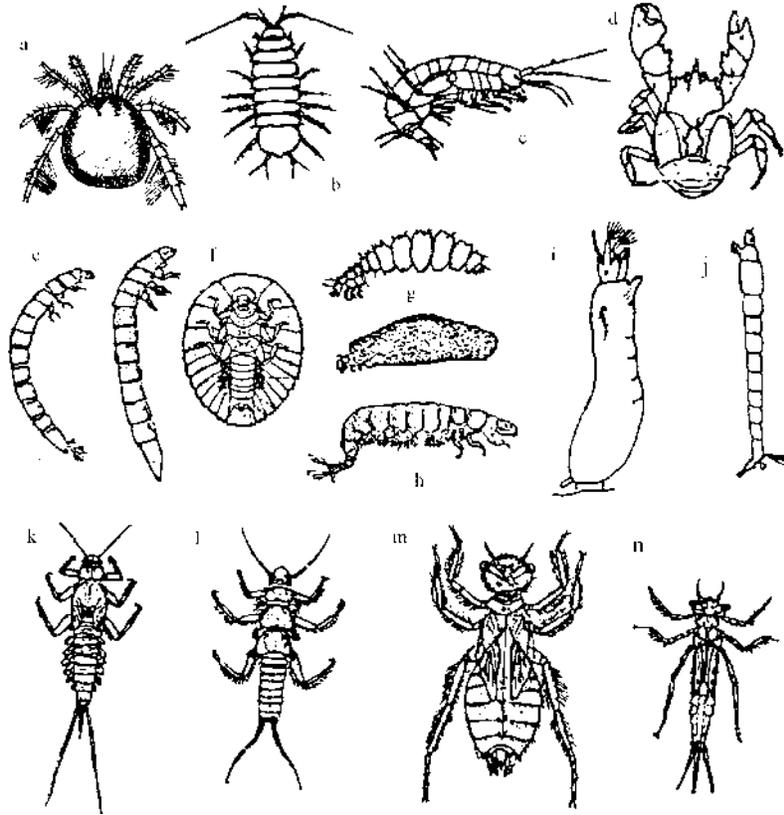
**Figura 18.1.** Esquemas de algunos representantes del zoobentos: a) planaria, b) nematodo, c) oligoqueto, d) hirudineo, e) y f) bivalvos Sphaeriidae, g) gasterópodo.

#### 18.1.17. CRUSTÁCEOS

En el grupo artificial Entomostraca, los Eubranchiopoda son microscópicos habitantes de aguas temporales. Los Cladocera están en casi cualquier tipo de hábitat, principalmente en la vegetación litoral. Los Ostracoda abundan en casi todos los ambientes no muy contaminados y en cualquier sustrato, aunque la mayoría prefiere fondos blandos y sin corriente a menos de 1 m de profundidad. Los Copepoda incluyen ciclopoideos y calanoides litorales, pero los harpacticoides son los más adaptados a la vida bentónica.

La subclase Malacostraca incluye los crustáceos superiores, principalmente marinos. Una minoría de Isopoda habita los estanques y orillas de lagos y ríos lentos, ocultos bajo diversos sustratos a menos de 1 m de profundidad. Los Anfipoda ocupan una gran variedad de aguas no contaminadas, más o menos confinados al sustrato somero con abundante oxígeno. Los Decapoda también ocurren en una gran variedad de

ambientes principalmente someros, e incluyen a los macruros Natantia o camarones de agua dulce, Reptantia o cangrejos de río, Anomura (*Aegla*) y Brachiura (cangrejos).



**FIGURA 18.2.** Esquemas de algunos artrópodos del zoobentos: a) hidracárido, b) isópodo, c) anfípodo, d) decápodo *Aegla*, e) coleóptero Elmidae, f) coleóptero Psephenidae adulto y larva, g) tricóptero Hydropsychidae con su habitáculo, h) tricóptero Hydropsychidae, i) díptero Simuliidae, j) díptero Chironomidae, k) efemeróptero, l) plecóptero, m) odonato Anisoptera y n) odonato Zygoptera.

#### 18.1.18. HIDRACÁRIDOS

Este grupo artificial reúne las familias de ácaros adaptadas a agua dulce. Ocupan muchos tipos de hábitat, pero prefieren fondos someros de arroyos y estanques y los litorales con vegetación.

#### 18.1.19. INSECTOS

Los hemimetábolos acuáticos tienen ninfas caminadoras que respiran por branquias abdominales (Efemeroptera), torácicas (Plecoptera) o caudales (Odonata). Los paurometábolos (Hemiptera) son acuáticos todo el ciclo de vida. En los holometábolos sólo la larva es acuática (Neuroptera, Himenoptera, Lepidoptera, Diptera), o también la pupa (Tricoptera y Diptera), o la larva y el adulto (Coleoptera). La mayoría prefiere

aguas someras y oxigenadas.

Los efemerópteros se mueven sobre piedras enfrentando la corriente. Los plecópodos viven bajo las piedras y entre detritos vegetales, en aguas corrientes bien oxigenadas y frías. Los odonatos son comunes en la vegetación sumersa.

Los coleópteros exhiben diversidad de hábitos en aguas someras, con mucha vegetación y oxígeno. Los adultos pueden respirar en aire, o de una burbuja atrapada en el vientre, bajo los élitros o en la ampolla rectal. Algunas larvas de Trichoptera construyen redes de seda (Hydropsichidae) y otras fabrican habitáculos de arena y detritos (Hydroptilidae), en aguas someras oxigenadas, sobre varios sustratos. Unas 2000 especies de dípteros habitan varios hábitat, a veces en grandes cantidades. La familia Chironomidae suele ser la más frecuente y abundante, y domina junto con tubificidos en sedimentos orgánicos, pobres en oxígeno.

## 18.2. MUESTREO

El muestreo cuantitativo requiere de técnicas que permitan una estimación de la abundancia lo más exacta y precisa posible con el menor esfuerzo, es decir que se debe procurar eficiencia en la técnica de muestreo seleccionada. Se considera más exacta aquella técnica que resulta en una mayor abundancia, ya que no es de esperar que se produzca una sobreestimación de la población. La distribución en general agregada de estos organismos hace que sea necesario tomar un gran número de réplicas, por lo que la repetición de los resultados (naturalmente variables) debe estar asegurada por la precisión del instrumento.

El esfuerzo depende del número y tamaño de las muestras, y generalmente es mayor para la separación de los organismos que para el muestreo. Para lograr una precisión determinada con igual abundancia de organismos, el total de sedimento a procesar aumenta con el tamaño de las muestras, aunque disminuya su número, por lo que la eficiencia es mayor cuanto más numerosas y de menor tamaño sean las mismas (Downing 1984).

Los métodos de muestreo del zoobentos pueden diferenciarse entre aquellos que involucran el muestreo del sedimento con la posterior separación de los organismos, y los que consisten en atrapar exclusivamente a éstos.

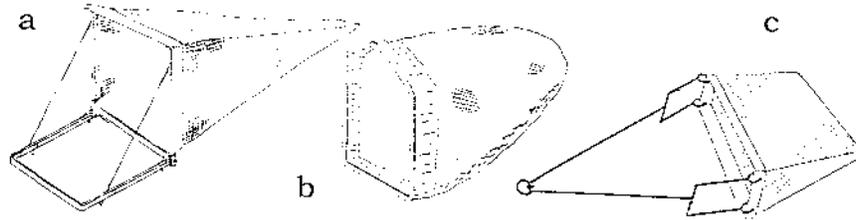
Los primeros, ya descritos en el capítulo 6, son los que permiten capturar la endofauna e incluso estudiar su distribución vertical. Los muestreadores más utilizados son la draga Ekman y los *corers* para sedimentos blandos y las dragas Petersen y Ponar para arcilla, arena gruesa y grava. La exactitud de cada aparato depende del tipo de sedimento, y no existe ninguno que sea adecuado para sedimentos duros y blandos. Cuando se debe muestrear en ambos sustratos es entonces conveniente usar distintos muestreadores. Aunque la mayoría de los organismos se concentran en los primeros 10 cm, algunos llegan a los 50 o más, por lo que una penetración insuficiente en el sedimento puede conducir a subestimar su densidad.

Entre los muestreadores destinados a atrapar sólo los organismos (Fig. 18.3), el *Surber* es particularmente apto para grava y piedras en aguas rápidas. Consiste en dos marcos unidos perpendicularmente, uno horizontal de superficie conocida (e.g. 900 cm<sup>2</sup>) que se afirma en el fondo, y el otro vertical provisto de una red que se enfrenta a la corriente. Al remover con el pie (*kick-sampling*) o cepillar los guijarros comprendidos en el marco horizontal, los organismos desprendidos son atrapados en la red.

Las dragas de arrastre consisten en una red instalada sobre unos patines relativamente pesados, sobre todo en su parte anterior, de modo que al ser arrastrada sobre el sedimento ésta no se levante.

La red de mano consiste en un marco triangular provisto de una red y un mango largo. Es especialmente apta para estudios cualitativos del zoobentos asociado a las macrofitas o macrofitobentos. Sin embargo se la emplea de manera cuantitativa

cuando se logra estandarizar el tiempo y/o distancia durante los cuales es arrastrada, incluso sobre sedimentos sin vegetación. En éstos también es empleada a modo de *Surber*, apoyándola en el fondo.



**Figura. 18.3.** Muestreadores del zoobentos: a) surber, b) red de mano y c) draga de arrastre.

Un método cuantitativo de colecta del macrofitobentos es el aislamiento de un área conocida, donde se cortan al ras todas las macrofitas. Estas son luego lavadas en un recipiente grande o con un chorro de agua sobre un tamiz. Como la variabilidad del zoobentos en este caso está compuesta de la suya propia sobre las plantas, más la de éstas sobre toda el área, es conveniente hacer ambas estimaciones por separado.

Otros métodos incluyen las bombas de succión, los núcleos congelados, las trampas de emergencia y los sustratos artificiales. Las bombas de succión o aspiradoras producen un vacío dentro de un cilindro enterrado en el sedimento, el cual es resuspendido y aspirado, pudiendo además conocerse el volumen aspirado (Downing 1984). Los núcleos congelados han sido desarrollados para evitar la subestimación debida al espantamiento. Un núcleo metálico es enterrado el día previo al muestreo para permitir la recolonización del lugar, y luego es llenado con nitrógeno líquido. Al retirarlo mediante un guinche se retira un bloque de sedimento congelado, el que además puede ser cortado a distintas profundidades permitiendo un estudio de la distribución vertical de los organismos. Las trampas de emergencia de insectos son estructuras piramidales cubiertas de una red, apoyadas en el fondo pero con el vértice fuera del agua y provisto de un receptáculo donde queda atrapado el imago al emerger. Los sustratos artificiales pueden ser de muy diversos tipos, aunque comúnmente se usa una canasta de metal o plástico con piedras. Se los coloca en el fondo, donde permanecen el tiempo suficiente para ser colonizados, desde algunos días a pocas semanas.

Los fondos duros, de rocas y grandes piedras deben ser muestreados retirando manualmente los organismos de sus superficies. Esto puede hacerse en un área conocida, encerrada por un tubo de aproximadamente 1 m de diámetro. También pueden emplearse aspiradoras hidráulicas en estos sustratos.

### 18.3. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Es conveniente observar la muestra fresca en una bandeja blanca y de paredes altas, a efectos de apreciar el movimiento y el color natural de los organismos. Sin embargo, la gran cantidad de muestras que se suelen tomar, generalmente hace necesario fijarlas hasta su procesamiento. El fijador más usado y recomendado es el formaldehído 4% (formol 10%), salvo para determinaciones de biomasa, pues produce una subestimación de ésta. En tal caso es preferible el uso de alcohol 70%. Los organismos de cuerpo blando (efemerópteros, tricópteros) pueden desintegrarse si se mantienen mucho tiempo en estos fijadores (Downing 1984).

Las muestras deben lavarse sobre un tamiz de tamaño de malla conocido. Para el

estudio de ciclos de vida y dinámica poblacional se usa uno menor a 0.1 mm. Para relevamientos, monitoreos y estudios de impacto ambiental puede ser de 0.5 a 1 mm. Se debe considerar que cuanto menor es el tamaño de malla, mayor el tiempo de separación. El tamizado elimina el sedimento más fino, reduce el volumen de la muestra a tratar, y elimina el formol, permitiendo la separación de los organismos sin riesgo para el investigador.

La tinción de la muestra con Rosa de Bengala ayuda a localizar los organismos para separarlos del sustrato. La separación puede realizarse individualmente bajo lupa, o por el método de flotación siempre que el sedimento no sea excesivamente orgánico. Este se hace con una solución de azúcar de 1.12 de densidad (aproximadamente 300 g l<sup>-1</sup>, Anderson 1959) o una solución saturada de cloruro de sodio. La muestra sin agua se extiende sobre una bandeja, se agrega la solución y se remueve cuidadosamente el sedimento. Los organismos, menos densos que el medio, ascienden y pueden ser entonces retirados con una pequeña malla. Esta operación debe ser rápida, ya que el soluto penetra por ósmosis en los organismos, que adquieren mayor peso específico y vuelven a decantar.

Las muestras para meiobentos deben tratarse cuidadosamente, ya que estos organismos son muy delicados. Se lavan sobre un tamiz de 100 o 200 µm, con agua a igual temperatura que la de su medio si se los quiere vivos, lo que es preferible para observar sus movimientos. Otra forma de extraerlos del sedimento es colocando éste sobre una malla en contacto con agua por debajo y aplicando calor por encima. Los organismos escapan del calor a través de la malla hacia un medio más favorable. En caso de fijarlos, conviene teñirlos con Rosa de Bengala u otros colorantes. Si la densidad es muy alta, conviene tomar submuestras luego de homogeneizar la muestra.

Para el microbentos se toman muestras o submuestras con pequeños corers de 0.6 cm<sup>2</sup>, de las que se observan gotas directamente al microscopio común o de epifluorescencia. Con las amebas puede ser necesario hacer cultivos.

En muchos casos la fijación provoca una retracción de los organismos o sus apéndices que imposibilita una correcta identificación, por lo que es necesario proceder a narcotizarlos antes de fijarlos. En otros casos se deben transparentar los ejemplares a efectos de poder observar sus estructuras. Diferentes sustancias como anestésicos, diafanizantes, tinciones, etc. se recomiendan para cada grupo, por lo que se debe recurrir a la bibliografía específica

Los organismos separados se guardan en pequeños frascos (10-30 ml) completos de alcohol 90%. Para mantener las estructuras blandas y flexibles se le agregan 3 a 4 gotas de glicerina. Los métodos de preservación conducen a una subestimación de la biomasa, por lo que se debe controlar el error pesando los organismos inmediatamente de colectados, o al menos una submuestra de los mismos.

La determinación específica de los insectos suele requerir del adulto, para lo cual se pueden coleccionar éstos en el lugar, usar trampas de emergencia o transportar las larvas vivas a efectos de criarlas en el laboratorio. El transporte debe ser rápido, con sustrato y agua del lugar preferentemente enfriada. El cultivo puede hacerse en acuarios de 40x20x20 cm, con sedimento y agua del lugar, provistos de aireador y cubiertos por una malla que impida el vuelo del adulto cuando emerja (Roldán 1988).

#### 18.4. DETERMINACIÓN TAXONÓMICA

La variedad de grupos biológicos que componen el zoobentos hace imposible brindar aquí las particularidades metodológicas para su colecta, preservación, tratamiento e identificación. Se recomienda consultar los diversos volúmenes de la colección Fauna de agua dulce de la República Argentina dirigida primero por Ringuelet y posteriormente por Castellanos, así como la obra de Tell & Lopretto (1995), que reúne métodos y claves de prácticamente todos los grupos. Otras obras generales que también

pueden consultarse son las de Macan (1959), Ward & Whipple (1959), Merritt & Cummins (1984) y Pennak (1989). Para el estudio de los oligoquetos de la región puede consultarse Brinkhurst & Marchese (1992).

Se brindan a continuación dos claves elementales y generales, una para la identificación de los grandes grupos de macroinvertebrados hasta las principales clases, y otra para los órdenes de insectos.

#### 18.4.1. CLAVE DE MACROINVERTEBRADOS (a Phylum y Clase)

##### I. A PHYLUM

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. a. Simetría bilateral, no reticulados, individuos independientes, alargados o lobulares | 4            |
| b. Simetría radial, sésiles  | 2            |
| 2. a. Reticulados, con agujeros de distinto tamaño   | PORIFERA     |
| b. Tubulares, con abertura terminal rodeada de tentáculos                                  | 3            |
| 3. a. Coloniales, tentáculos ciliados  | BRYOZOA      |
| b. 5 a 6 (3-12) tentáculos cilíndricos   | COELENTERATA |
| 4. a. Tegumento quitinoso, articulado  | ARTHROPODA 9 |
| b. Cuerpo blando, no articulados   | 5            |
| 5. a. No segmentado, con caparazón calcárea  | MOLLUSCA 8   |
| b. Segmentado, sin caparazón   | ANNELIDA 6   |

##### II. A CLASE

- |  |                |
|--|----------------|
| 6. a. Ventosas en extremos, fusiformes, sin quetas   | HIRUDINEA      |
| b. Sin ventosas, alargados, con quetas   | 7              |
| 7. a. Proyecciones laterales o parapodia   | POLICHAETA     |
| b. Sin parapodios, pocas quetas  | OLIGOCHAETA    |
| 8. a. Concha espiralada o cónica, tentáculos   | GASTROPODA     |
| b. Dos valvas, sin tentáculos, sifones   | BIVALVIA       |
| 9. a. Fusiformes, sin apéndices articulados, cuerpo poco diferenciado                                | LARVAS INSECTA |
| b. Cuerpo diferenciado, 3 o más pares de patas   | 10             |
| 10. a. Cefalotórax, 4 o más pares de patas   | 11             |
| b. Cabeza, tórax y abdomen, 3 pares de patas, 1 antenas, con o sin alas o sus esbozo                 | INSECTA        |
| 11. a. Opistosoma globoso, 4 pares de patas (3 en juveniles), palpos y quelíceros, acetábulo genital | HYDRACARIDOS   |
| b. Más de 6 pares de patas, 2 pares de antenas   | CRUSTACEA      |

#### 18.4.2. CLAVE DE INSECTOS ACUÁTICOS (a Orden)

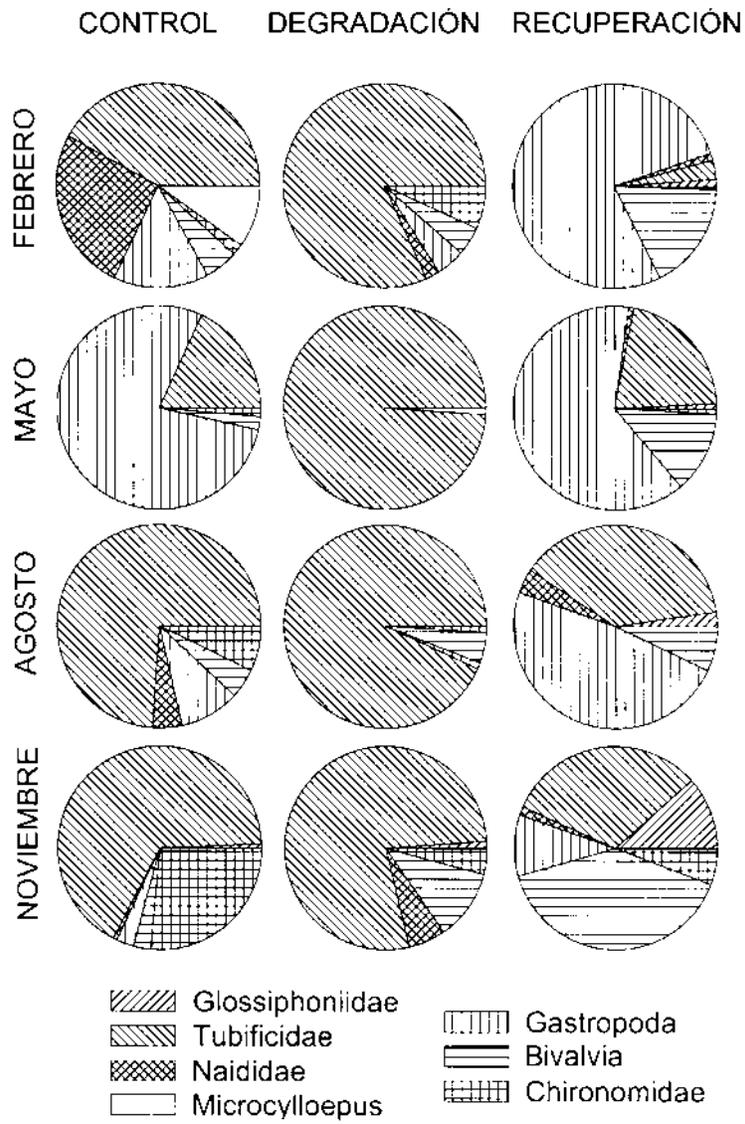
(Modificado de Pennak 1989)

- |   |
|---|
| 1. a. Usualmente inactivos. Encapsulados o no, con apéndices (alas, patas) plega- |
|---|

	dos al cuerpo	PUPAS 2
	b. Activos. Con alas (adultos) o patas articuladas (ninfas) oseudopatas o nada (larvas)	4
2.	a. Como crisálida, con el cuerpo corto, duro y oscuro	PUPA de DIPTERO
	b. Como momia, con apéndices plegados al cuerpo dentro de un estuche translúcido	3
3.	a. Dentro de una cápsula vegetal o mineral	PUPA TRICOPTERO
	b. Sin cápsula, pero a veces en un tubo sedoso o capullo fibroso	PUPA DIPTERO
4.	a. Sin patas torácicas articuladas. Como crisálida	LARVA DIPTERO
	b. Con patas torácicas articuladas	5
5.	a. Con apéndices caudales largos, segmentados y filamentosos (cercos)	6
	b. Sin apéndices caudales o no son largos y segmentados	7
6.	a. Con 2 cercos caudales, 2 uñas y usualmente branquias digitiformes en el vientre del tórax	NINFA PLECOPTERO
	b. Usualmente 3, a veces 2, cercos caudales, 1 uña y branquias abdominales	NINFA EFEMEROPTERO
7.	a. Alas anteriores duras o correosas cubriendo el abdomen, boca masticadora	ADULTO COLEOPTERO
	b. Sin élitros	8
8.	a. Pequeños (menor de 3 mm), sin alas, con largo apéndice bifurcado debajo del abdomen (furca), en la superficie de aguas calmas	COLEMBOLOS
	b. Grandes (mayores de 2 mm), con o sin alas, sin apéndice abdominal	9
9.	a. Con alas funcionales (adultos) o rudimentarias (ninfas)	10
	b. Sin alas (larvas)	11
10.	a. Boca chupadora como un largo pico	NINFA Y ADULTO HEMIPTERO
	b. Boca masticadora. Labium, cuando extendido, largo y como cuchara, y cuando plegado una máscara que cubre el resto de la boca; con o sin branquias caudales laminares	NINFA ODONATO
11.	a. Boca chupadora larga y curva, casi la mitad del largo del cuerpo. Pequeñas larvas en esponjas	LARVA NEUROPTERO
	b. Boca masticadora	12
12.	a. 5 paresseudopatas abdominales	LARVA LEPIDOPTERO
	b. Sinseudopatas o solo en el último segmento abdominal	13
13.	a. Procesos laterales robustos en cada segmento abdominal	LARVA MEGALOPTERO
	b. Sin tales procesos o son largos y finos, o 4 procesos robustos corniformes en cada segmento corporal	14
14.	a. Un par deseudopatas terminales, generalmente con branquias abdominales pequeñas y digitiformes. Individuos en cápsulas	LARVA TRICOPTERO
	b. Sinseudopatas terminales ni cápsulas	LARVA COLEOPTERO

## 18.5. RESULTADOS

El zoobentos suele ser empleado como indicador de la calidad del agua en los sistemas fluviales. A efectos de evaluar el efecto de la contaminación orgánica en el arroyo Toledo, límite entre los departamentos de Montevideo y Canelones, se comparó la estructura de la comunidad entre una estación de control, ubicada aguas arriba de los efluentes contaminantes, otra de degradación inmediatamente aguas abajo de los mismos, y una tercera de recuperación, más alejada (Arocena 1996). Los resultados (Fig. 18.4) muestran el predominio de los tubificidos en la estación más contaminada en todos los muestreos, mientras que sólo en agosto y noviembre dominaron en la de control, aunque en menor proporción. La estación de recuperación por su parte estuvo dominada por gasterópodos y bivalvos.



**Figura 18.4.** Composición del macrozoobentos en tres estaciones del arroyo Toledo con diferente calidad de agua (Arocena 1996).



# PECES

Flavio Scasso

EL NECTON ESTÁ COMPUESTO POR ORGANISMOS QUE SE DESPLAZAN ACTIVAMENTE en el agua, lo que les permite moverse independientemente de las corrientes. En aguas continentales el necton está representado por los peces, de los que se han descrito unas 8.300 especies (Berra 1981), a los que se suman otras cien de peces diadromos, que migran entre el mar y el agua dulce (Margalef 1983).

En ambientes lénticos, la zona litoral presenta la mayor diversidad de especies nectónicas, fundamentalmente de pequeño tamaño, y es utilizada como área de reproducción, cría, refugio y alimentación. La zona pelágica también es un área de cría de muchas especies que desovan en aguas abiertas. Los peces más abundantes en esta zona son planctívoros. Los de la zona profunda son generalmente bentónicos y presentan el cuerpo y especialmente la cabeza en forma deprimida. Esta zona es también visitada por otros peces con fines alimenticios y reproductivos.

En sistemas lóticos, los peces de los tramos altos están adaptados a aguas frías y fuertes corrientes. La diversidad y abundancia aumentan en el curso medio, y en la parte baja se encuentran especies más tolerantes, adaptadas a aguas lentas y cálidas. En este tramo aparecen especies propias de humedales, provenientes de zonas inundadas por el cauce principal.

Los peces de agua dulce son un recurso económico y recreacional de importancia, por lo que el hombre puede ser su principal predador y jugar un rol muy importante en la regulación de las poblaciones naturales. Por otra parte, los peces son organismos útiles para evaluar la calidad del ambiente, ya que sus comunidades reflejan las condiciones del medio que habitan y las del área de drenaje (Karr *et al.* 1986, Fausch *et al.* 1990).

### 19.1. METODOLOGÍA DE MUESTREO

Los diversos métodos de captura y muestreo de peces pueden ser clasificados en métodos pasivos o activos, de observación, tóxicos y técnicas de inspección.

### 19.1.1. MÉTODOS DE CAPTURA PASIVA

Las artes de pesca pasivas son aquellas que se calan en un lugar determinado, y el pez con su actividad y desplazamiento, provoca la captura (Padín & Iriart 1995). La mayoría de los métodos de captura pasiva son selectivos con respecto al tamaño y tipo de peces (Baker *et al.* 1993).

**ESPINEL O PALANGRE.** Consiste en un cabo fondeado horizontalmente del que se desprenden a espacios regulares cordeles más finos con anzuelos encarnados en sus extremos. Son muy utilizados en pesquerías artesanales de ríos, principalmente para peces de fondo, aunque pueden ser calados a distintas profundidades.

**TRAMPAS.** Son generalmente unidades portátiles que permiten la entrada de los peces, a veces facilitada con cebos, pero impiden o dificultan su escape. La mayoría de los peces capturados no son dañados, por lo que pueden ser devueltos al agua con vida.

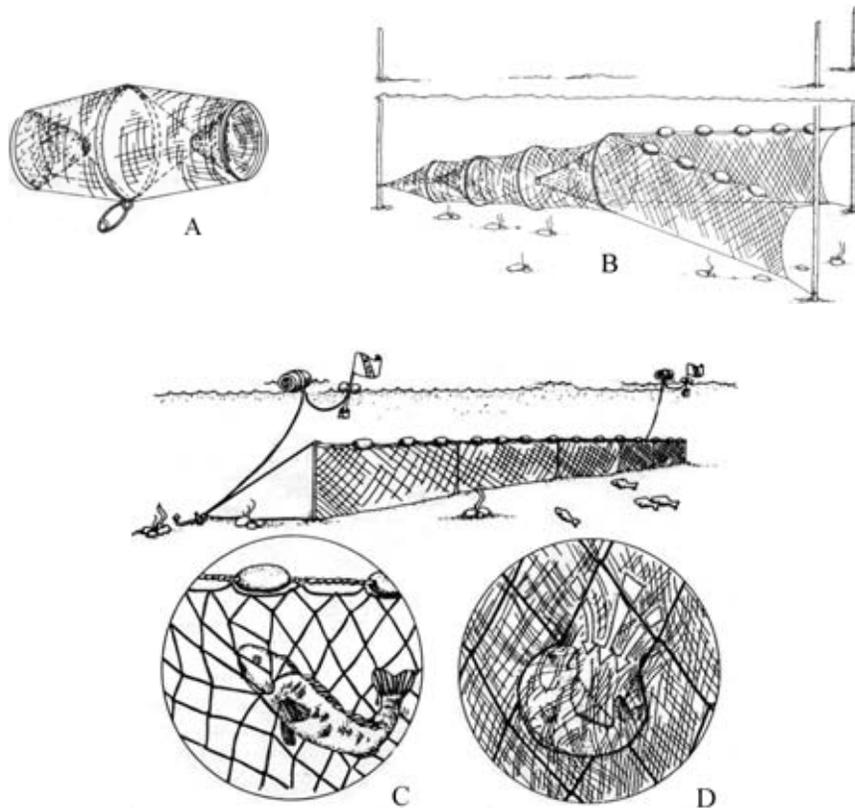


Figura 19.1. Ejemplos de artes de pesca pasivos: A) trampa nasa, B) red nasa, C) red de enmalle y D) trasmallo (modificado de Hubert 1983).

**TRAMPAS NASA.** Consisten en cilindros horizontales de mimbre o de red con dos bocas en forma de embudo (Fig. 19.1). También pueden utilizarse cebos para reforzar la captura. Son útiles para determinar la presencia de pequeños peces en embalses, remansos de ríos y arroyos y sitios muy vegetados (Baker *et al.* 1993).

**REDES NASA.** Están compuestas de aros circulares unidos por mallas de red formando un largo cilindro. El primer aro, que forma la boca de la red, presenta dos alas que sirven para encauzar a los peces hacia el interior de la trampa, y una estructura en forma de embudo que impide su escape (Baker *et al.* 1993). Generalmente, el interior de la red incluye uno o más embudos adicionales para concentrar los peces en el extremo posterior de la trampa (Fig. 19.1). Se anclan al fondo, normalmente en aguas poco profundas de lagos y ríos, incluso con fuertes corrientes, y en la desembocadura de pequeños arroyos. Según el sentido en que sean caladas, pueden capturar peces que migran aguas arriba o aguas abajo.

**CORRALES.** Consisten básicamente en una empalizada en forma de embudo, construida con diseños y materiales muy variados. Se utilizan en cursos de agua estrechos y poco profundos, en general para peces migradores en las partes altas de los ríos.

**REDES DE ENMALLE O AGALLERAS.** Están formadas por un paño de red con una relinga superior con flotadores y otra inferior con lastres. Los extremos están equipados con anclas, cuerdas y boyas (Fig. 19.1). Puede estar compuesta de paneles de igual o distinto tamaño de malla (Mattson & Mutale 1992). Se pueden calar en zonas litorales o pelágicas, en superficie, a media agua o en profundidad (Baker *et al.* 1993). Son comúnmente utilizadas en lagos y embalses con poca corriente y fondos libres de obstáculos. Los peces quedan atrapados por detrás de los opérculos, mientras intentan pasar por la red. El tamaño de malla debe ser apropiada para el tamaño del pez que se desee capturar. Teóricamente, los peces más rápidos tienen mayor probabilidad de encontrarse con la malla que los más lentos. Además, los peces grandes se desplazan más rápido que los pequeños de la misma especie (Sparre & Venema 1992). Por lo tanto, independientemente del tamaño de malla utilizado, las redes agalleras son menos efectivas para colectar peces pequeños, que no tienen energía suficiente para nadar a través de la red.

**TRASMALLOS.** Presentan tres paneles de red superpuestos y unidos por sus bordes. Los dos externos son de malla más grande que el central. Los peces quedan atrapados al pasar a través de la red de malla más ancha y no poder sortear la malla central. Estas redes son menos selectivas del tamaño que las redes agalleras.

### **19.1.2. MÉTODOS DE CAPTURA ACTIVA**

**PESCA CON CAÑA.** Es uno de los métodos más simples y antiguos, pero depende en gran medida de la habilidad y destreza del pescador. Puede ser uno de los mejores métodos para colectar algunos tamaños y especies de peces menos vulnerables a otras técnicas de muestreo. Sin embargo, para que la información obtenida sea comparable, las técnicas (arte y esfuerzo de pesca, frecuencia) deben ser estandarizadas (Baker *et al.* 1993).

**REDES DE ARRASTRE.** Están constituidas por una bolsa profunda con alas muy reducidas o sin ellas, y son arrastradas por una o dos embarcaciones. Pueden funcionar en superficie, a media agua o sobre el fondo, según los dispositivos de flotación y las pesas. Las de fondo tienen una relinga inferior más larga, con rodillos que facilitan su desplazamiento, y cadenas como protección para los objetos sumergidos que podrían dañarla (Fig. 19.2). El volumen de agua filtrada varía con la distancia recorrida. Capturan los peces presentes en el área barrida, independientemente de su actividad (Padín & Iriart 1995). Pueden ser usadas en grandes lagos, embalses o ríos caudalosos, para peces adultos, larvas y juveniles.

**REDES DE ARRASTRE LITORAL.** Consisten en un panel de red y eventualmente una bolsa central, generalmente de tamaño de malla más pequeña que las porciones laterales. La relinga superior está equipada con flotadores y la inferior con pesas. En cada extremo se coloca verticalmente una vara rígida para mantener el ancho de la

red extendido, o dos cuerdas como prolongación de la relinga superior e inferior (Fig. 19.2). Es una técnica muy utilizada en zonas costeras de lagos y ríos con fondos relativamente libres de obstáculos, donde la profundidad del agua sea menor que la altura de la red (Baker *et al.* 1993). Es un dispositivo efectivo para capturar pequeños peces o individuos mayores que desovan o se alimentan cerca de la costa. Para su calado se necesitan dos o más personas: uno de los extremos se fija en la costa, mientras el otro se introduce en el agua siguiendo una trayectoria en forma de arco, para lo cual se puede utilizar un bote a remo. En ocasiones, el extremo que permanece en tierra se mueve a lo largo de la costa para aumentar el área barrida. Para extraer la red se juntan ambos extremos en forma lenta y continua.

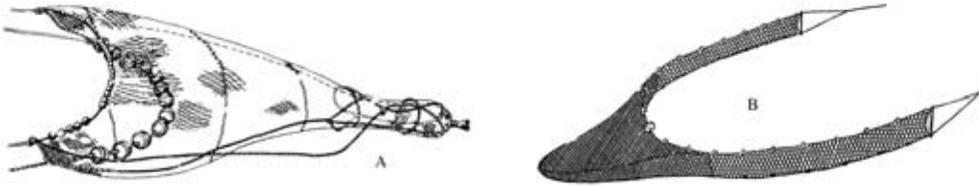


Figura 19.2. Ejemplos de artes de pesca activos: A) red de arrastre y B) red de arrastre litoral (modificado de Hayes 1983 y Padín & Iriart 1995).

**PESCA ELÉCTRICA.** Consiste en generar un campo eléctrico en el agua al pasar una corriente alterna o continua entre dos electrodos sumergidos. Los peces expuestos a la corriente continua son atraídos hacia el ánodo (galvanotaxia), donde inmovilizados (electronarcosis) son fácilmente capturados con redes de mano. Los peces se recuperan rápidamente, pudiendo ser liberados con vida. Esta corriente es particularmente efectiva en aguas turbias o con numerosos obstáculos. La corriente alterna hace que los peces se orienten perpendiculares al campo eléctrico sin ser atraídos hacia el ánodo, y les causa mayor daño, pudiendo producir su muerte.

Los equipos de pesca eléctrica oscilan entre grandes motores montados en un barco, hasta pequeñas unidades portátiles alimentadas por un motor o una batería. El método no es selectivo para el tamaño y tipo de pez, y es efectivo únicamente en ambientes poco profundos. Es particularmente útil en áreas con fondos no uniformes y corrientes rápidas o con obstáculos que dificultan otras técnicas de captura. Generalmente se utiliza para la colecta de peces en aguas corrientes (Sternin *et al.* 1976, Bohlin *et al.* 1989). En cursos poco caudalosos se puede cerrar una sección con redes y remover la totalidad de los peces en la misma (Persat 1991).

### 19.1.3. MÉTODOS DE OBSERVACIÓN

**MÉTODOS HIDROACÚSTICOS.** Los equipos más utilizados son la ecosonda (ver 2.2) con haz acústico vertical y el sonar o ecosonda de campo horizontal (Saville 1978, Thorne 1989, MacLennan & Simmonds 1992).

Cuando los ecos recibidos corresponden a peces individuales, se puede aplicar técnicas de conteo de ecos. Para procesar señales provenientes de cardúmenes es necesario aplicar técnicas de eco-integración (Thorne 1989). Los sistemas acústicos pueden ser montados en un barco, lo que permite cubrir grandes áreas de muestreo en tiempos cortos, o pueden ser fijados dentro del agua. Estas técnicas permiten determinar rápidamente la abundancia y distribución espacio-temporal de las poblaciones de peces en lagos, embalses y ríos caudalosos y profundos.

**BUCEO.** Los peces pueden ser observados directamente mediante buceo en apnea o buceo autónomo. Esto permite identificar las especies presentes, determinar sus patrones de comportamiento y su distribución. Se puede estimar la abundancia recorriendo transectas preestablecidas y registrando los datos bajo el agua en pizarras especiales. Este método puede ser aplicado en una gran variedad de ambientes, siendo la turbidez su principal limitante.

#### **19.1.4. OTROS MÉTODOS**

**ICTIÓXIDOS.** El tóxico más usado para peces es la rotenona, que actúa a nivel celular impidiendo el intercambio gaseoso. Por lo general produce el ascenso de los peces a la superficie, los que son fácilmente capturados con una red de mano. Es el método de colecta menos selectivo, aunque la sensibilidad varía entre las diferentes especies (Sousa *et al.* 1991). Este tóxico causa también la muerte del zooplancton, insectos acuáticos y juveniles de algunas especies de anfibios. Ha sido muy utilizado para estudios poblacionales, relevamientos ícticos (Menni *et al.* 1984) o para la remoción de especies indeseables (Baker *et al.* 1993). El efecto de la rotenona puede ser revertido eficazmente tratando el área afectada con permanganato potásico. Cuando se expone a la luz o altas temperaturas se descompone rápidamente, por lo que el mejor periodo para su aplicación es a fines del verano. Es un método muy útil en ambientes reducidos, de escasa corriente y vegetados, aunque las macrófitas pueden dificultar la extracción de los peces.

**INSPECCIÓN DE CAPTURAS.** Las capturas de los pescadores deportivos pueden ser inspeccionadas durante su actividad en el área, o por medio de cuestionarios completados por los mismos (Malvestuto *et al.* 1978, Battaglione 1985, Quinn 1992). En términos generales se consulta el número total de horas de pesca, el método de captura y el número, longitud y peso de los individuos de cada especie capturados. Se debe obtener información de todos los pescadores o alternativamente de una muestra representativa. Los torneos de pesca permiten recopilar información a través de las planillas de captura. También pueden ser inspeccionadas las capturas comerciales a través de la información de los desembarques, la que generalmente incluye datos de biomasa total y de las especies capturadas, número de individuos y esfuerzo de pesca desplegado.

### **19.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

Cuando los datos de los peces capturados son rápidamente obtenidos, pueden ser devueltos con vida a su ambiente. De lo contrario, deben ser conservados para su posterior análisis en laboratorio, congelados o fijados con formol y luego mantenidos en alcohol etílico 70%.

#### **19.2.1. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA**

La descripción de la comunidad íctica de un ambiente determinado consiste básicamente en enumerar las especies que la conforman. Debido a que no existen obras de consulta general para la identificación taxonómica de los peces de agua dulce de Uruguay, se emplean claves incluidas en trabajos de autores regionales como Ringuet *et al.* (1967) o Menni *et al.* (1995). Sin embargo, la sistemática de peces es una disciplina muy dinámica, por lo que se deben tener en cuenta las modificaciones introducidas posteriormente, producto de un gran número de revisiones sistemáticas.

**CARACTERES BIOMÉTRICOS.** Son caracteres externos que pueden ser medidos (mor-

fométricos) o contados (merísticos), y definen en gran medida las características fenotípicas de las especies, por lo que son muy utilizados en las claves de identificación taxonómica. Existe un gran número de variables morfométricas (Fig. 19.3), pero las más utilizadas son la longitud total, la longitud estándar y la longitud de la cabeza.

RELACIÓN LONGITUD-PESO. La relación entre la longitud (L) y el peso (W) de los peces se calcula a través de la ecuación de Le Cren (1951):

$$W = a L^b$$

donde las constantes a y b se determinan por análisis de regresión simple, usando la transformación logarítmica

FACTOR DE CONDICIÓN. Es usado para determinar y comparar el estado de los peces de una misma especie en diferentes ambientes. Se basa en la hipótesis según la cual los peces más pesados de un determinado largo tienen mejor condición y por lo tanto refleja las características del medio donde se desarrollan las poblaciones estudiadas. El factor de condición (K) puede ser calculado según (Hile 1936):

$$K = W + 100/L^3$$

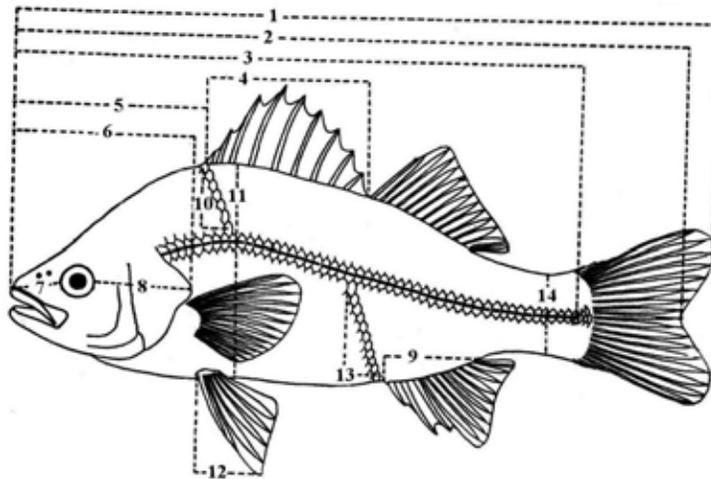


Figura 19.3. Principales caracteres morfométricos y merísticos de los peces: 1) longitud total, 2) longitud de la horquilla, 3) longitud estándar, 4) longitud de la base de la primera aleta dorsal, 5) longitud predorsal, 6) longitud de la cabeza, 7) longitud del hocico, 8) longitud post-orbital de la cabeza, 9) longitud de la base de la aleta anal, 10) escamas sobre la línea lateral, 11) altura del cuerpo, 12) altura de la aleta pélvica, 13) escamas debajo de la línea lateral y 14) altura mínima del pedúnculo caudal (modificado de Lagler *et al.* 1962).

### 19.2.2. ABUNDANCIA

CAPTURA POR UNIDAD DE ESFUERZO (CPUE). Este parámetro puede asumirse proporcional a la abundancia presente en el ambiente (Sparre & Venema 1992). Es el número o peso de peces capturado por unidad de esfuerzo de pesca. Se expresa de diferente forma dependiendo del arte de pesca utilizado. La medida del esfuerzo de pesca depende en parte de la información disponible, y el objetivo es obtener un va-

lor proporcional a la tasa de pesca, como número de embarcaciones o de pescadores. En el caso de las redes de enmalle la CPUE se expresa por unidad de área y tiempo de muestreo o calado de las redes ( $\text{kg m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ).

DENSIDAD Y BIOMASA. Una de las formas más sencillas y rápidas de determinar la densidad es por métodos hidroacústicos (Oldani 1984, Rudstam & Johnson 1992). Sin embargo, la mayoría de los ecosondas no permiten distinguir las especies. Para obtener una estimación por especie, se deben simultáneamente coleccionar los organismos de los que proceden los ecos. Luego se subdividen los valores obtenidos por los métodos hidroacústicos según los porcentajes capturados de cada especie. Si la densidad específica es multiplicada por el peso promedio de los individuos capturados, se obtiene una estimación de la biomasa de las diferentes especies en  $\text{kg ha}^{-1}$ .

PRODUCCIÓN Y RENDIMIENTO (*YIELD*). Producción es la elaboración de nueva biomasa en un período definido de tiempo como consecuencia del crecimiento y la reproducción. Los métodos para calcular la producción de peces en aguas continentales son abundantes y variados (Chapman 1968, Rigler & Downing 1984), desde simples estimadores empíricos hasta complejos modelos de simulación de ecosistemas (Leach *et al.* 1987). Algunos modelos, que permiten estimar la producción íctica indirectamente, se originan de la relación entre datos de pesquerías y factores bióticos y abióticos de los ambientes donde se desarrollan las poblaciones explotadas, como en el modelo de Downing *et al.* (1990):

$$\text{Log}_{10} P = -0.42 + 1.084 \text{Log}_{10} B$$

$$\text{Log}_{10} P = -0.25 + 0.901 \text{Log}_{10} B - 0.151 \text{Log}_{10} W + 0.291 \text{Log}_{10} TP$$

o el modelo de Downing & Plante (1993):

donde P es la producción de peces ( $\text{kg ha}^{-1} \text{año}^{-1}$ ), B la biomasa ( $\text{kg ha}^{-1}$ ), W el peso de la clase de tamaño más grande y TP la concentración de fósforo ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ).

El rendimiento se refiere específicamente a la porción de la población (número o peso) disponible para el hombre que puede ser cosechada por acción de pesquerías recreacionales o comerciales, en un período de tiempo y una unidad de área o volumen. El rendimiento (Y) de un sistema en  $\text{g C m}^{-2} \text{año}^{-1}$  puede ser estimado a partir de modelos como el de Oglesby (1977):

$$\text{Log}_{10} Y = -6.00 + 2.00 \text{Log}_{10} PP$$

donde PP es la producción fitoplanctónica en las mismas unidades.

Un concepto importante para el manejo de pesquerías es el de máximo rendimiento sostenible ( $Y_s$ ) o máxima biomasa de una población que puede ser cosechada cada año ( $\text{kg ha}^{-1} \text{año}^{-1}$ ) sin causar un descenso de la densidad o biomasa a largo plazo. Una forma de calcularlo es a través del método de Graham (Ricker 1981):

$$Y_s = k B_{\infty} / 4$$

donde  $B_{\infty}$  es el tamaño máximo del stock (biomasa en  $\text{kg ha}^{-1}$ ), k la tasa de crecimiento instantáneo del stock:

$$k = e^{-K}$$

y K la tasa de crecimiento de von Bertalanffy (1938).

### 19.3 RESULTADOS

Los resultados que se presentan a continuación corresponden a un estudio realizado durante los años 1997 y 1998 en el Lago Rodó, un sistema artificial de la ciudad de Montevideo. Los peces fueron capturados en 4 estaciones de muestreo (Fig. 4), con una red de arrastre litoral de 20%2 m de largo y ancho, respectivamente, y una abertura de malla de 1 mm.

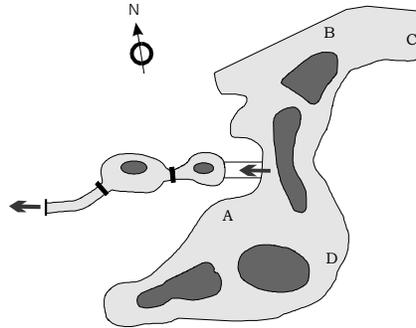


Figura 19.4. Esquema del Lago Rodó y ubicación de las estaciones de muestreo de peces (A,B,C y D) (Scasso, datos no publicados).

A continuación se presenta la lista de especies encontradas en el lago (Tabla 19.1). La biomasa íctica estimada se presenta en forma de abundancia relativa a través de los porcentaje de biomasa de cada especie capturada (Fig. 19.5), y a través de sus valores absolutos expresados en  $\text{kg ha}^{-1}$  (Fig. 19.6).

Tabla 19.1. Lista de especie ícticas capturados en el Lago Rodó en 1997 y 1998.

ESPECIE	FAMILIA
<i>Cnesterodon decemmaculatus</i> (madrecita de agua)	Poeciliidae
<i>Jenynsia lineata</i> (overito)	Jenynsiidae
<i>Gymnogeophagus rabdotus</i> (castañeta)	Cichlidae
<i>Cichlasoma facetum</i> (castañeta)	Cichlidae
<i>Crenicichla lacustris</i> (cabeza amarga)	Cichlidae
<i>Rhamdia</i> sp. (bagre negro)	Pimelodidae
<i>Cheirodon interruptus</i> (mojarra)	Characidae

En diciembre de 1996 el lago fue vaciado y se removieron los sedimentos como parte de un programa de recuperación para el mejoramiento de la calidad de sus aguas. Algunos peces fueron introducidos durante el proceso de llenado en enero de 1997. La composición específica y abundancia de peces introducidos se desconoce, pero la comunidad alcanzó rápidamente una alta biomasa y se caracterizó por la dominancia de pequeños peces omnívoros (*C. decemmaculatus* y *J. lineata*).

*C. decemmaculatus* fue la especie claramente dominante de la comunidad. Junto con *J. lineata* representaron entre 71% y 98% de la biomasa total de peces, cuyo promedio anual fue  $307 \text{ kg ha}^{-1}$  en 1997 y  $172 \text{ kg ha}^{-1}$  en 1998. Las otras dos especies registradas en todos los muestreos fueron *C. facetum* y *G. rabdotus*.

*C. decemmaculatus* es un pez vivíparo, por lo tanto presenta un alto porcentaje

de sobrevivencia de sus crías. Esta característica, ligada a un corto periodo generacional y a una baja presión de predación dada la ausencia de peces piscívoros, han favorecido la pronta recolonización del lago en base a los individuos introducidos. Esto también explicaría la alta biomasa de peces alcanzada en un corto periodo, luego del llenado del lago.

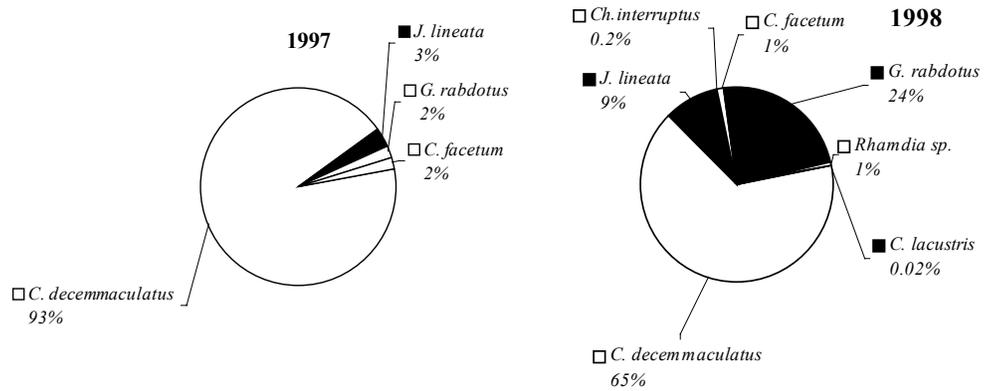


Figura 19.5. Abundancia ictica relativa (% de biomasa) de la captura de peces en el Lago Rodó (Scasso, datos no publicados).

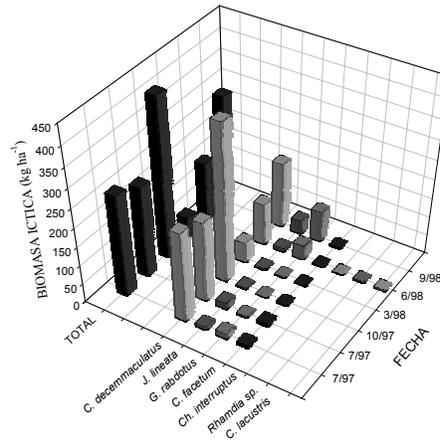


Figura 19.6. Biomasa ictica total y de las especies presentes en el Lago Rodó (Scasso, datos no publicados).

# PALEOLIMNOLOGÍA

Gloria Daners



LA MAYORÍA DE LOS LAGOS TIENEN UNA VIDA DE SÓLO DECENAS DE MILES de años. Por encontrarse en el punto más bajo de su cuenca de drenaje, la sedimentación de material proveniente de la erosión del suelo y de aquel producido dentro del mismo lago determinan su colmatación al cabo de cierto período de tiempo (Moss 1980). Debido a esto, sus sedimentos guardan un registro estático de las alteraciones temporales en la química, la fauna y la flora de la columna de agua (Wetzel & Likens 1991).

La paleolimnología estudia el pasado de los ambientes lacustres, incluyendo la biología, química y física del agua y sedimento, y sus relaciones con la cuenca (Birks & Birks 1980). Las condiciones históricas de un ecosistema acuático y sus niveles de productividad pueden ser interpretados a partir del análisis de las estructuras físicas y la mineralogía de los sedimentos, sus constituyentes orgánicos e inorgánicos y los organismos preservados (Wetzel & Likens 1991).

### 20.1. MUESTREO

Los sedimentos lacustres se muestrean por medio de tubos (*corers*), ya sea de forma manual o mediante diversos equipos diseñados para obtener una columna intacta desde el tope al fondo del depósito, de acuerdo a los objetivos y al tipo de sedimento. Los sedimentos cuaternarios suelen ser accesibles para muestreos manuales en donde el cilindro es empujado dentro del sedimento y luego retirado con la ayuda de un pistón. Equipos más sofisticados pueden requerirse cuando, de acuerdo al objetivo del estudio, es aconsejable la obtención de tubos que alcancen grandes profundidades.

Los muestreadores más simples consisten en un cilindro de acrílico de unos 5 a 8 cm de diámetro, dividido longitudinalmente en dos partes unidas de forma hermética con un mecanismo que permita separar fácilmente las dos mitades. Dependiendo de la granulometría y consistencia del sedimento, éste queda retenido en el tubo mientras es extraído. Para sedimentos más profundos y consolidados se re-

quieren muestreadores operados con guinche manual o eléctrico. Existe una gran variedad de muestreadores apropiados para tipos particulares de sedimento, entre los cuales los más usados son los descritos en Livingston (1955), Fries & Hafsten (1965), Jowsey (1966), Smith *et al.* (1968), Mackereth (1969), Swain (1973) y Saarnisto (1986).

Si se pretende realizar datación absoluta con radioisótopos, análisis cuantitativo de microfósiles y química de sedimentos, para los cuales la muestra debe ser relativamente grande, son necesarios muestreadores de unos 10 cm de diámetro (Cushing & Wright 1965, Smith *et al.* 1968), u otros especialmente diseñados para este propósito (Digerfeldt 1965, Digerfeldt & Lettevall 1969). En todos los casos, es conveniente tomar la muestra en el lugar de mayor profundidad.

## 20.2. DESCRIPCIÓN Y SUBMUESTREO DE SEDIMENTOS

Aunque los restos biológicos son la principal fuente de información sobre el pasado de un lago, la composición y estructura de los sedimentos también brindan información acerca de su origen, el ambiente de depositación y los eventos ocurridos en la cuenca. Una descripción precisa de la muestra intacta debe realizarse previamente a la extracción de submuestras, a fin de optimizar las inferencias posibles.

### 20.2.1. DESCRIPCIÓN INICIAL

Previo a la descripción y por medio de un sifón se elimina el agua que se encuentra por encima del sedimento muestreado, separándose luego las dos mitades del tubo para exponer la muestra. La primer descripción se realiza generalmente en el campo, complementándose en el laboratorio con análisis más detallados. Los sedimentos inorgánicos como areniscas y gravas son relativamente fáciles de describir, mientras que los orgánicos son más complejos. Para su descripción en el campo resulta muy útil el sistema presentado por Troels-Smith (1955, en Birks & Birks 1980) basado en tres tipos de propiedades principales: físicas (color, estratificación, contenido de agua), humificación o grado de descomposición de la materia orgánica, y composición (fango, limo, turba de *Sphagnum*).

### 20.2.2. LAMINACIONES

Las laminaciones anuales, de entre 25  $\mu\text{m}$  y 3 mm de espesor, son las estructuras lacustres más notorias (Margalef 1983). Las láminas pueden observarse como variaciones de color o de la disposición de las partículas sedimentarias, que generalmente reflejan condiciones paleoambientales o paleoclimáticas particulares. Simola (1977) describió laminaciones debidas a la depositación cíclica de frústulos de diatomeas. Muchos lagos en ambientes glaciares presentan sedimentos laminados típicos denominados varves, que se deben a la diferencia entre la granulometría más gruesa de los sedimentos depositados en primavera y verano, respecto a los de otoño e invierno cuando el lago está cubierto de hielo. Con el fin de optimizar la interpretación de los resultados de los análisis químicos y biológicos, es muy importante realizar una descripción minuciosa de este tipo de estructuras.

### 20.2.3. SUBMUESTREO

Los tubos de sedimento recogidos deben ser analizados detalladamente en el laboratorio para determinar el intervalo necesario entre las submuestras y su tamaño, lo que depende de la variabilidad del sedimento a lo largo del tubo y del tipo de análisis que se quiera realizar. Las principales características a tener en cuenta son los cambios en color, granulometría y estructuras. Estos suelen responder a variaciones en las condiciones ambientales o de depositación que influyeran sobre las comunidades bióticas y los factores abióticos del pasado. Como regla general, se debe tomar como mínimo una submuestra por cada unidad litológica diferenciada. En el caso de que estas unidades tengan espesores considerables, es conveniente tomar más cantidad de submuestras en cada una de ellas, definiendo criterios con anterioridad, que pueden ser: tomar submuestras en la base, porción media y tope de cada unidad, o bien a intervalos regulares a lo largo de toda la columna. Para el análisis de fósiles pequeños y abundantes como polen o diatomeas, será suficiente una submuestra de 1 a 2 cm<sup>3</sup>, mientras que para microfósiles y datación absoluta, se necesitan muestras de 100 a 400 cm<sup>3</sup> (Birks & Birks 1980).

### 20.3. DATACIÓN ABSOLUTA

Los sedimentos pueden ser datados de modo absoluto, es decir, determinando la edad en años de su formación, mediante varios métodos. Uno de ellos es el de las relaciones isotópicas, basado en que los isótopos radioactivos se transforman en uno o varios elementos derivados a tasas constantes y específicas. Estas tasas suelen expresarse como vida media, o tiempo necesario para que la mitad de una cantidad determinada del elemento original se transforme en otro u otros. El par <sup>14</sup>C/<sup>12</sup>C es uno de los más utilizados en paleolimnología, siendo útil para datar sedimentos de entre 200 y 40000 años ya que la vida media del <sup>14</sup>C es de 5730 años. Para edades menores, de entre 100 y 150 años, se utiliza el <sup>210</sup>Pb con una vida media de 22 años, o el <sup>137</sup>Cs con 37 años, entre otros (Margalef 1983).

La datación con <sup>14</sup>C mediante centelleo líquido puede aplicarse a gran variedad de materiales constituidos por átomos de carbono, como madera, carbón vegetal, huesos, suelos, carbonatos, valvas de moluscos, sedimentos, etc. (Figini 1993), que deben ser transformados en benceno, la forma datable. Por tratarse de una metodología compleja en la que se utiliza material radioactivo, se efectúa generalmente en laboratorios especializados. Detalles pueden consultarse en la página web: [www.utexas.edu/research/vprl/rc\\_lab/sampprep.html](http://www.utexas.edu/research/vprl/rc_lab/sampprep.html)

Otra forma de datar los sedimentos de forma absoluta es a través del paleomagnetismo, que se basa en la sensibilidad de ciertos minerales, como la hematite, a las inversiones periódicas de los polos magnéticos de la tierra, pero esto sólo es posible en sedimentos con un registro de muchos cientos de años (Margalef 1983).

Históricamente, el componente horizontal del campo magnético de la Tierra ha oscilado en su dirección principal con una amplitud de aproximadamente 20° y una frecuencia de 2700 años. Estas variaciones quedan reflejadas como magnetismo remanente, debido a cambios químicos producidos en ciertos minerales en el momento de la depositación de los sedimentos. Su registro y la utilidad para la datación de sedimentos fue demostrada en los trabajos de Creer *et al.* (1972), donde las variaciones registradas del Polo Norte Geomagnético coinciden con las evidencias en Londres desde 1580. Estos resultados fueron corroborados por Thompson (1973) y Tolonen *et al.* (1975), correlacionándolos con los registros en otras localidades geográficas. Estos autores encontraron a su vez que las dataciones paleomagnéticas se correlacionan bien con los resultados obtenidos a partir de análisis palinoló-

gicos y arqueológicos, reafirmando su utilidad como herramienta. Una de las técnicas utilizadas para la medición del paleomagnetismo es la desmagnetización por medio de campos magnéticos alternos decrecientes, que puede consultarse en Valencio (1980).

#### 20.4. ANÁLISIS QUÍMICOS

La composición química de los sedimentos lacustres es reflejo de las sustancias acumuladas, los procesos químicos o biológicos en su superficie y el intercambio con el agua. En algunos casos, los sedimentos señalan los cambios que el hombre ha introducido en el ambiente, los que pueden inferirse mediante la determinación de la materia orgánica, nutrientes, metales pesados o compuestos orgánicos sintéticos, entre otros.

La cantidad de materia orgánica contenida en el sedimento es un índice del estado trófico y la productividad del sistema. Habitualmente representa entre el 1 y 30% del peso fresco, aunque puede llegar al 100% como en el caso de la turba (Margalef 1983). La fracción orgánica remanente en el sedimento depende de su tasa de descomposición, que a su vez es función de la disponibilidad de oxígeno. Los sedimentos con grandes cantidades de materia orgánica son asociados a sistemas lacustres eutróficos, de alta disponibilidad de nutrientes, alta productividad y tasa de acumulación rápida, mientras que aquellos con bajas concentraciones se asocian a lagos oligotróficos (Moore *et al.* 1991).

Debido a que el fósforo es relativamente insoluble, su contenido en el sedimento puede reflejar la carga en el lago, particularmente cuando se tiene en cuenta la tasa de sedimentación (Moss 1980). A partir de la deforestación producida tras el establecimiento del hombre, se produjo un aumento en la tasa de sedimentación en los lagos y en la concentración de carbonato y fósforo, conjuntamente con una disminución en la materia orgánica, nitrógeno y pigmentos (Manny *et al.* 1978).

La metodología para la determinación del contenido de materia orgánica y de fósforo en sedimentos puede consultarse en el capítulo 6.

#### 20.5. ANÁLISIS BIOLÓGICOS

Gran cantidad de organismos, o restos de ellos, pueden quedar preservados en los sedimentos lacustres. Los restos vegetales más comunes incluyen pigmentos, granos de polen, frutos, semillas, silicofitolitos y otros microfósiles de plantas superiores, esporas y microfósiles de pteridofitas y briofitas, oosporas de algas, esporas e hifas de hongos y frústulos de diatomeas. Entre los restos animales encontramos rizópodos y otros protozoarios, microforaminíferos, turbelarios, briozoos, crustáceos (particularmente cladóceros y ostrácodos), insectos (especialmente cápsulas cefálicas de quironómidos y coleópteros), ácaros, moluscos, peces y en ocasiones mamíferos y pájaros (Birks & Birks 1980). En el presente capítulo se mencionarán las generalidades y procedimientos de laboratorio de algunos de ellos desde un punto de vista exclusivamente paleolimnológico. La escasez de estudios paleolimnológicos en Uruguay determina la carencia de claves locales para identificación de fósiles en muchos de estos grupos.

### 20.5.1. PIGMENTOS

Las principales moléculas orgánicas estudiadas en los sedimentos lacustres son los pigmentos vegetales y sus derivados. Los pigmentos pueden permanecer en el sedimento durante mucho más tiempo que cualquier resto de organismo morfológicamente reconocible, y en algunos casos son la única evidencia de la existencia previa de organismos que no se han conservado, como bacterias y algas. Pueden reflejar cambios ocurridos en la abundancia de algas y macrófitas, asumiendo que éstos son proporcionales a la cantidad de pigmentos preservados. Gran número de pigmentos son específicos, siendo útiles para testimoniar cambios florísticos en los lagos, lo que ha servido para demostrar procesos de eutrofización o enriquecimiento por aguas residuales. El análisis de los pigmentos vegetales también puede indicar modificaciones en las condiciones abióticas del ambiente que resultaron en variaciones de las poblaciones de algas y en la proporción de los aportes autóctono y alóctono al sedimento.

La metodología para el análisis de pigmentos y productos de degradación se puede consultar en los capítulos 13 y 15, o en Sanger & Gorham (1972).

### 20.5.2. DIATOMEAS

La taxonomía de las diatomeas, algas unicelulares solitarias o coloniales, se basa en las características morfológicas de los frústulos silíceos que forman su esqueleto, por lo que una buena conservación de los mismos permite identificarlas de forma tan precisa como a las especies vivientes. Los frústulos suelen ser abundantes y estar preservados en buenas condiciones, aunque pueden presentar signos de erosión física y/o química que deben ser tenidos en cuenta en la interpretación. Por su baja resistencia a factores físicos, los frústulos más largos y delicados difícilmente permanecen intactos. La erosión química ocurre bajo ciertas condiciones del agua que determinan la disolución de la sílice, fenómeno raramente importante en ambientes límnicos (Round 1964).

Las diatomeas son útiles indicadores paleoecológicos debido a que las especies presentan diferentes rangos de tolerancia a los parámetros ambientales (Rawson 1956, Alhonen 1971), e indican la ocurrencia en diferentes hábitos: pelágico, epifítico, epipélico, epilítico. La heterogeneidad en la composición específica puede delimitar regiones incluso en un mismo lago, determinadas por la distribución de corrientes, la profundidad de las aguas, la vegetación y las características del área de drenaje (Grimes & Rushforth 1983). También pueden ser indicadores de anoxia, condición que promueve su preservación masiva. Los restos de diatomeas han sido especialmente utilizados como marcadores biológicos de pH, proporcionando un registro de los procesos de acidificación de los sistemas lacustres (Renberg & Hellberg 1982, Stevenson *et al.* 1989), de la concentración total de fósforo (Hall & Smol 1996) y de la salinidad (Tuchman *et al.* 1984). La relación de abundancia entre diatomeas arrafideas y centrales se ha propuesto como índice de eutrofización: 0-1 oligotrofia, 1-2 mesotrofia, y valores superiores eutrofia (Margalef 1983).

Debido a su gran abundancia, es posible realizar análisis cuantitativos de las diatomeas fósiles, para lo cual Battarabee (1973) propuso un método absoluto de conteo que permite, conociendo la tasa de sedimentación, calcular el aporte anual de diatomeas en una cuenca, al igual que para el polen (Birks & Birks 1980).

La metodología para el análisis de diatomeas se puede consultar en el capítulo 13 o en Battarabee (1986).

### 20.5.3. POLEN Y ESPORAS

Las esporas y los granos de polen son órganos reproductores de los vegetales superiores, cuyo análisis es una de las principales herramientas utilizadas en la reconstrucción de los ambientes del período Cuaternario. Esto se explica por su gran abundancia y resistencia a la descomposición en medios anóxicos, y a que su taxonomía es relativamente bien conocida. La terminología que se utiliza en estos grupos es muy específica y compleja, para la cual se sugiere consultar un excelente glosario electrónico ilustrado en la página web [www.bio.uu.nl/~palaeo/glossary/index.htm](http://www.bio.uu.nl/~palaeo/glossary/index.htm).

Las plantas producen granos de polen y esporas que varían en cuanto a su forma, tamaño y ornamentación, y el análisis de estas características nos permitirá dilucidar la especie que los produjo. Dado que las distintas especies vegetales están adaptadas a condiciones ambientales particulares, a partir de los granos de polen y las esporas extraídos de sedimentos es posible reconstruir los ecosistemas del pasado y analizar la sucesión de la vegetación en una determinada región. Gracias a su facilidad para dispersarse por medio de diferentes agentes de transporte, en particular agua y viento, estos fósiles brindan información tanto de la vegetación circundante, como de la vegetación a nivel regional. El polen o las esporas que producen las plantas que crecen cerca del cuerpo de agua puede incorporarse directamente en los sedimentos del mismo y reflejará la vegetación que crecía en las proximidades, mientras que los granos de polen de otras plantas, especialmente árboles, son transportados por agua o viento a mayores distancias, reflejando en mayor o menor medida la vegetación regional (Janssen 1984).

Los granos de polen preservados en sedimentos de turba y lagos han sido la clave para reconocer que el clima ha cambiado enormemente en pocos miles de años, alternando entre períodos glaciales e interglaciales que han caracterizado el período Cuaternario. Sin embargo, en algunos casos y dependiendo del tipo de polen y el estado de preservación, su utilidad puede verse restringida. En un ambiente de depositación determinado, los distintos tipos de granos de polen y esporas presentan potencial de preservación variable, que depende en gran medida de la morfología específica y la cantidad de esporopolenina de la pared, llevando a reconstrucciones erróneas cuando este parámetro no es considerado.

Para el estudio de los granos de polen y las esporas es suficiente con muestras pequeñas (1 a 3 cm<sup>3</sup> para sedimentos ricos en materia orgánica), las que deben ser procesadas a fin de concentrarlos para su análisis, eliminando los elementos de composición mineral. La matriz de sedimento es removida por procesos físicos y químicos, los cuales deben afectar lo menos posible a los granos de polen y las esporas. La metodología más frecuentemente utilizada está detallada en Faegri & Iversen (1975).

#### **Procedimiento**

- 1) Llevar a ebullición con NaOH o KOH 10% y en vaso de Bohemia una muestra de sedimento para disgregarlo y remover ácidos húmicos solubles. Lavar varias veces con agua destilada dejando decantar y eliminando el sobrenadante cada vez.
- 2) Tamizar para remover las partículas gruesas y agregar HCl 10% para remover los carbonatos. Repetir esta operación hasta que no se observe reacción efervescente.
- 3) Tratar con HF 60% en caliente durante una hora o en frío durante 24 h para remover los silicatos, utilizando material de plástico o polipropileno. Lavar varias veces con agua destilada dejando decantar y eliminando el sobrenadante.
- 4) Pasar el residuo a un tubo de centrifuga, centrifugar por 12 minutos a 3200 rpm, eliminar el sobrenadante y cubrir con ácido acético glacial puro.
- 5) Agregar mezcla acetolítica (anhídrido acético y ácido sulfúrico puros 9:1) y calentar a baño maría durante 5 min para hidrolizar la celulosa.

- 6) Montar el residuo sobre un portaobjetos en un medio con índice de refracción menor a 1.55. El más comúnmente utilizado es la gelatina-glicerina (ver Moore *et al.* 1991 para su preparación), aunque también puede utilizarse Bálsamo de Canadá o aceite de silicona.
- 7) Los preparados son analizados bajo el microscopio para determinar los tipos de polen por medio de preparados de referencia o de claves, y para el conteo.

Para determinar los granos de polen y esporas en sedimentos del Cuaternario conviene confeccionar una palinoteca de referencia del material actual, con énfasis en la vegetación presente en los alrededores del área de estudio. No existen claves para polen de plantas de Uruguay, pero puede utilizarse, con ciertas precauciones, las de Heusser (1971), McAndrews *et al.* (1973), Markgraf & D'Antoni (1978), Roubik & Moreno (1991) y Moore *et al.* (1991).

#### 20.5.4. SILICOFITOLITOS

Los silicofitolitos son cuerpos microscópicos (20 a 50  $\mu\text{m}$ ) que ocurren dentro o entre las células, principalmente epidérmicas, de tallos, hojas, raíces e inflorescencias de gran variedad de vegetales. Están compuestos de sílice bajo forma de opalina, lo que permite que se depositen y preserven en el suelo luego de la descomposición de los tejidos orgánicos. Registran, por lo tanto, la vegetación y la dinámica de las condiciones ambientales pasadas. La identificación de los silicofitolitos se basa en su morfología, la que en general no es diagnóstico de géneros o especies, aunque Carbone (1977) ha demostrado una morfología consistente a nivel de Subfamilia en Poaceae, utilizándolos para indicar el progresivo desarrollo de pastizales durante el Holoceno. Su recuperación a partir de muestras de sedimentos ha mostrado utilidad desde el punto de vista paleoecológico y estratigráfico. Presentan especial interés en estudios arqueológicos y paleoetnobotánicos, ya que brindan información acerca de la manipulación de plantas, domesticación o alteración del medio natural por antiguas comunidades humanas (Pearsall 1988). Del Puerto (1998) y Campos & del Puerto (1998) analizaron silicofitolitos de muestras de sitios arqueológicos situados en el Este de Uruguay, donde se han registrado asentamientos de antiguas civilizaciones.

Síntesis actualizadas sobre este el grupo, tanto a nivel general como taxonómico o aplicado, son las de Piperno (1988), Pearsall (1989) y Rapp & Mulholland (1992). La clasificación parataxonómica tempranamente propuesta por Bertoldi do Pomar (1971) continúa siendo de gran utilidad en la sistemática del grupo, así como la revisión de clasificaciones parataxonómicas y ortotaxonómicas realizada por Zucol (1995). Actualmente las clasificaciones más utilizadas son aquellas morfométrico-anatómicas, como la propuesta por Pearsall & Dinan (1992).

Se resume a continuación un procedimiento para el análisis cuantitativo y cualitativo de silicofitolitos en sedimentos.

*Procedimiento* (resumido de Rovner 1990)

- 1) Colocar 15 ml de muestra en un vaso de Bohemia y agregar 30 ml de agua destilada, mezclar, dejar decantar y eliminar el sobrenadante.
- 2) Agregar 30 ml de HCl 10 % y mezclar hasta que no haya reacción efervescente, para eliminar los carbonatos. Dejar decantar y eliminar el sobrenadante. Lavar con agua destilada.
- 3) Agregar 30 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 volúmenes y mezclar hasta que no haya reacción, para eliminar la materia orgánica. Volver a lavar con agua destilada.
- 4) Agregar 30 ml de agua destilada y 1 o 2 g de pirofosfato de sodio para deflocular. Descartar el sobrenadante, que se enturbiará por partículas de aluvión.

Agregar 30 ml de agua destilada, decantar y lavar. Repetir esta operación hasta que el sobrenadante no se enturbie.

- 5) Secar la muestra durante toda la noche en estufa a 90°C.
- 6) Observar, contar e identificar luego de montar en bálsamo de Canadá.

Algunos investigadores, previo al montaje, realizan separación por densidades utilizando líquidos pesados como bromuro de zinc (Rovner 1990), mientras que otros dividen la muestra en fracciones de tamaño para facilitar la observación en microscopio óptico (Pinilla com. pers., en del Puerto 1998).

### 20.5.5. MACROFÓSILES VEGETALES

Los macrofósiles vegetales más frecuentes son los frutos, semillas y megasporas, que pueden encontrarse bien preservados y ser fácilmente identificables a nivel de especie, permitiendo realizar inferencias ecológicas extremadamente precisas a partir de los sedimentos. Otros, como los fragmentos de hojas, rizomas, flores y madera también pueden ser útiles e identificables mediante un análisis detallado (Dilcher 1974). Por otra parte, mientras los granos de polen y las esporas son fácilmente dispersados por diversos agentes, los macrofósiles vegetales son considerados autóctonos de la cuenca debido a que se depositan cerca del sitio donde vivía la planta que les dio origen dado su gran tamaño o a su baja resistencia al transporte. De este modo, la asociación fósil de éstos deriva directamente de la vegetación local, permitiendo deducciones paleoclimáticas muy confiables. A partir de su análisis es posible reconstruir la evolución de los paleoambientes lacustres, y los cambios en la productividad primaria y en la vegetación asociada al sistema (Wetzel 1983). Generalmente la cantidad de macrofósiles vegetales por volumen de sedimento es muy baja, por lo que debe examinarse muestras grandes.

*Procedimiento* (Birks & Birks 1980)

- 1) Dejar un volumen conocido de sedimento durante varias horas en HNO<sub>3</sub> o KOH 10% para desintegrarlo. Si es calcáreo, se debe tener cuidado con la reacción efervescente frente al ácido. Una vez ablandado, verter pequeñas cantidades en un tamiz y lavarlo con agua para eliminar las partículas más finas. Para sedimentos gruesos es conveniente tamizar primero a través de una malla gruesa (500-1000 µm) y luego a través de una más fina (250 µm).
- 2) Almacenar en agua el material retenido por el tamiz. Examinar pequeñas porciones bajo lupa, aislando los macrofósiles con un pincel fino o una aguja, y clasificarlos. Para la identificación de taxa muy similares puede ser necesario recurrir a la microscopía óptica o electrónica.
- 3) Cuando todos los macrofósiles han sido identificados, proceder a su recuento. En el caso de partes vegetativas suele ser imposible el conteo debido a la fragmentación de los restos, por lo que se registran en una escala de frecuencia relativa tal como abundante, frecuente, ocasional, raro y presente.
- 4) Tabular los datos y representarlos gráficamente para la construcción de un diagrama de macrofósiles que ayudará en la interpretación del perfil. Para la representación gráfica se puede tomar la presencia y ausencia, la abundancia relativa o la absoluta por unidad de volumen.

### 20.5.6. DÍPTEROS

Los quironómidos, pertenecientes a la orden Diptera, son macroinvertebrados muy abundantes en los sistemas acuáticos, cuyas larvas viven en o sobre los sedi-

mentos del fondo de los cuerpos de agua. De éstas suelen preservarse las cápsulas cefálicas que son eficientes herramientas para determinar la calidad de las aguas, y en reconstrucciones ambientales y paleoclimáticas. Por su sensibilidad específica a la disponibilidad de oxígeno, resultan útiles indicadores del nivel de éste en el hipolimnion. La sucesión de especies puede sugerir el cambio entre condiciones eutróficas y oligotróficas (Alhonen & Haavisto 1969) y las asociaciones pueden resultar buenas indicadoras de la paleosalinidad (Walker *et al.* 1995). Puede encontrarse una amplia revisión de este grupo y su paleoecología en Frey (1964) y Stahl (1959, 1969). En cuanto a otros dípteros, los restos de larvas de *Chaoborus* permiten realizar inferencias acerca de las poblaciones de peces que habitaron el lago (Uutala 1990).

**Procedimiento** (Brooks 1997)

- 1) Deflocular los sedimentos en KOH 10% a 75 °C durante 10-15 min. Evitar que hierva pues las burbujas podrían desintegrar las cápsulas cefálicas.
- 2) Tamizar por mallas de aproximadamente 200 y 100  $\mu\text{m}$  y lavar con agua. Mantener las dos fracciones separadas para facilitar la selección.
- 3) Vaciar los tamices dentro de cajas de Petri y pipetear en una cámara tipo Bogorov de 5 mm de profundidad y 5 mm de ancho.
- 4) Separar las cápsulas cefálicas bajo lupa usando pinzas finas.
- 5) Si las cápsulas son montadas en Euparal, deshidratarlas progresivamente pasándolas por alcohol 80 y 100% y esencia Euparal (5 min. en cada una). Para ahorrar tiempo, las cápsulas cefálicas pueden ser directamente transferidas desde la bandeja de selección al cubreobjetos, donde se dejan secar al aire y se invierten dentro de una gota de Euparal directamente en el portaobjetos.
- 6) Colocar pequeñas gotas de Euparal a lo largo del portaobjetos.
- 7) Montar dos cápsulas cefálicas por cubreobjetos, con el lado ventral hacia arriba, extendiendo cuidadosamente las mandíbulas. Una forma alternativa es colocar 25-50 cápsulas cefálicas directamente en un cubreobjetos donde se dejan secar al aire. Luego se invierte el cubreobjetos en una gota de goma montante a base de agua. Esto permite colocar toda la muestra en el mismo preparado, pero si las cápsulas cefálicas quedan mal posicionadas para su identificación, no pueden ser manipuladas una vez que fueron montadas.

Algunas claves que pueden ayudar en la determinación de quironómidos son mencionadas en el capítulo 19, y otras en Cranston (1982) y Wiederholm (1983).

### 20.5.7. CLADÓCEROS

Los cladóceros, cuyo tamaño varía entre 50 y 3000  $\mu\text{m}$ , son los crustáceos que se preservan en mayor abundancia en sedimentos lacustres, en particular los de las familias Bosminidae y Chydoridae. Luego de la depositación y la descomposición de partes blandas, se conservan separadamente los escudos cefálicos, las valvas y los extremos de los abdómenes. Los miembros de la familia Daphniidae, más susceptibles a la degradación, sólo están representados en general por sus grandes y resistentes huevos (efípios), los que difícilmente pueden ser identificados a nivel específico, o por sus diminutas mandíbulas (Briks & Briks 1980). *Bosmina* y *Daphnia* son planctónicos, mientras que los chidóridos son litorales.

El análisis de la abundancia relativa de las especies de cladóceros puede reflejar el estado trófico de un lago (Boucherle & Züllig 1983), resultando en una excelente herramienta paleolimnológica (Frey 1979).

**Procedimiento**

- 1) Secar las muestras de sedimento a 80 °C durante 2 hs.

- 2) Calentar cada muestra en KOH 10% durante 15 minutos para deflocular el material orgánico y lavarlas con agua destilada.
- 3) Tamizar a través de una malla de 37  $\mu\text{m}$  y almacenar la muestra retenida por el tamiz en etanol 95% (Boucherle & Züllig 1983).
- 4) Montar un volumen conocido de sedimento en medio tipo Karo (Taft 1978) y examinar al microscopio. A pesar de que los cladóceros suelen preservarse desarticulados y raramente aparecen intactos, pueden ser fácilmente identificados a nivel de género o especie. Contar todos los fragmentos identificables, pero considerar la pieza más abundante en cada muestra para las estimaciones poblacionales, para evitar sobreestimaciones (Frey 1979).

### 20.5.8. OSTRÁCODOS

Los ostrácodos son pequeños crustáceos (200 a 2000  $\mu\text{m}$  de largo) que viven en todos los ambientes acuáticos. En contraste con los cladóceros, sus esqueletos están impregnados de carbonato de calcio y constituidos por dos valvas redondas o elípticas que pueden fosilizar, presentándose juntas o separadas. Su potencial de preservación es mayor en condiciones calcáreas o salinas donde la acción del ácido carbónico es mínima, siendo raros en los sedimentos orgánicos y ácidos, pero muy abundantes en margas, conformando eventualmente la casi totalidad del sedimento (Birks & Birks 1980).

Este grupo fue poco estudiado hasta que Delorme (1969) demostró su utilidad como indicadores ecológicos mediante el análisis de las condiciones ambientales de asociaciones actuales. Su distribución en los sedimentos varía vertical y horizontalmente, lo que debe ser considerado en el muestreo. Son particularmente sensibles a cambios de salinidad, teniendo cada especie un rango de tolerancia específico, desde aguas blandas hasta muy salinas, pudiéndose encontrar en casi cualquier tipo de roca sedimentaria (Sohn *et al.* 1965). Por tal razón, las asociaciones de ostrácodos fósiles permiten la reconstrucción de condiciones paleoecológicas y paleoclimáticas (Delorme *et al.* 1977).

Existen varios métodos de disgregación y lavado de sedimentos para el aislamiento de los ostrácodos, dependiendo del tipo de sedimento y modo de preservación. La mayor parte de los mismos se hallan descritos en forma detallada en Sohn *et al.* (1965). El primer paso es analizar la naturaleza de la matriz para decidir la técnica más conveniente.

#### *Procedimiento* (Sohn 1961)

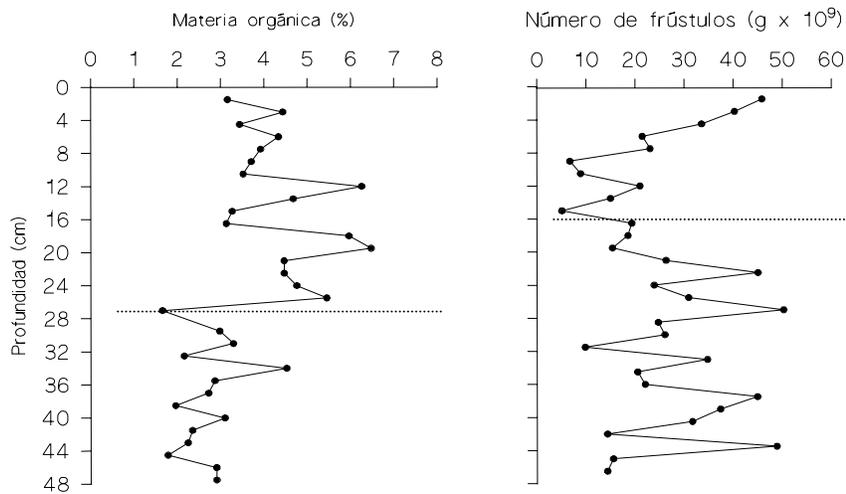
- 1) Colocar los sedimentos en agua hirviendo con 1 a 2 cucharadas de soda en polvo hasta su total disgregación, agitando ocasionalmente. Es recomendable secarlos previamente al aire para que se disgreguen más fácilmente. Una forma para saber si una muestra se disgrega por ebullición es llevándose una pequeña porción a la boca y verificar si se desintegra. En caso contrario, pueden ser sometidos al peróxido de hidrógeno y gasolina, acetato de sodio, congelamiento y descongelamiento, o trituración mecánica.
- 2) Lavar la muestra disgregada a través de una serie de tamices. Las piezas y fósiles más grandes se separan de la fracción microfosilífera, mientras el material más fino es desechado. Es conveniente utilizar tamices de 75 y 1000  $\mu\text{m}$ . Repetir el lavado hasta que el agua salga limpia de los tamices.
- 3) Secar el sedimento en el mismo tamiz o en una hoja de diario. La fracción mayor puede ser descartada o también secada para someterla a otros métodos de disgregación.
- 4) Concentrar los fósiles mediante: a) tamizado, dividiendo la muestra en varias fracciones de tamaño o b) separación manual bajo lupa, esparciendo la muestra

sobre un fondo oscuro cuadrículado. Retirar los fósiles con un cepillo húmedo y colocarlos sobre un portaobjetos.

- 5) Montar los ostrácodos en una solución diluida de goma tragacanto con unas pocas gotas de fenol, aceite de canela o cola plástica. Si fuera necesario quitar restos de goma de un ejemplar, sumergir en alcohol y remover con una aguja. Contar e identificar los ejemplares con la ayuda de claves como las mencionadas en el capítulo 20.

## 20.6. RESULTADOS

En agosto de 1998 se realizó un muestreo paleolimnológico en la zona oeste de la Laguna de Rocha, para lo cual se tomó una muestra de sedimento de 48 cm de profundidad. La columna de sedimento se cortó en capas de 1.5 cm, y se estimó el porcentaje de materia orgánica y la abundancia total de frústulos de diatomeas (Fig. 20.1).



**Figura 20.1.** Porcentaje de materia orgánica y número de frústulos de diatomeas en una columna de sedimento de la Laguna de Rocha. Las líneas punteadas marcan el límite de las dos capas que se describen en el texto (García Rodríguez, del Puerto & Castiñeira, datos no publicados).

La distribución vertical de la materia orgánica permitió separar dos capas de sedimento. Una desde la superficie hasta 27 cm de profundidad, en la cual todos los valores fueron mayores a 3%, con una moda de 4%. Otra capa claramente diferenciada puede observarse desde 28 a 48 cm, donde, con excepción de la muestra correspondiente a 33 cm, todos los valores fueron menores a 3%, con una moda de 2%. La abundancia absoluta de frústulos mostró una alta variabilidad en la columna de sedimento y una baja correlación con la materia orgánica ( $r^2 = 0.29$ ). Sin embargo el incremento marcado de número de frústulos por gramo de sedimento registrado desde los 16 cm hasta la superficie, sugieren, junto con el mayor contenido orgánico, que este sistema sufre un proceso de eutrofización reciente.

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Acosta Hoyos LE (1972) *Guía práctica para la investigación y redacción de informes*. Paidós Educador. Bs. As.: 172 p.
- Admiraal W, H Peletier & H Zomer (1982) *Observations and experiments on the population dynamics of epipellic diatoms from an estuarine mudflat*. Estuarine, Coastal and Shelf Science 14: 471-487
- Alhonen P (1971) *The stages of the Baltic Sea as indicated by the diatom stratigraphy*. Acta Bot. Fennica 92: 18 p.
- Alhonen P & ML Haavisto (1969) *The biostratigraphical history of Lake Otalampi in southern Finland, with special reference to the remains of subfossil midge fauna*. Bull. Geol. Soc. Finland 41: 157-164
- Allan JD (1995) *Stream Ecology. Structure and function of running waters*. Chapman & Hall. London: 388 p.
- Aloi JE (1990) A critical review of recent freshwater periphyton field methods. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47: 656-670
- Alonso E (1997) *Plantas acuáticas de los Humedales del Este*. PROBIDES. Montevideo.
- Ammerman JW (1993) *Microbial cycling of inorganic and organic phosphorus in the water column*. En Kemp P et al. (eds.) Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis Publ. London: 649-660
- Andersen JM (1976) *An ignition method for the determination of total phosphorus in lake sediments*. Water Res. 10: 329-331
- Anderson RO (1959) *A modified flotation technique for sorting bottom fauna samples*. Limnol. Oceanogr. 4: 223-225
- Antoine SE & K Benson Evans (1985) *The epipellic algal flora of the River Wye System, Wales, UK. 1. Productivity and total biomass Dynamics*. Int. Revue ges. Hydrobiol. 71(2): 179-185

- APHA (1995) *Standard methods for the examination of water and wastewater*. APHA/AWWA/WPCF. Washington: 1268 p.
- Arocena R & G Chalar (1989) *Aportes al conocimiento del macrozoobentos del arroyo Toledo (Montevideo - Canelones)*. Bol. Soc. Zool. Uruguay 5: 9-10
- Arocena R & W Pintos (1988) *Antecedentes para un estudio limnológico del arroyo Carrasco*. Serie Avances de Investigación. Facultad de Humanidades y Ciencias. Montevideo: 26 p.
- Arocena R (1991) *El macrozoobentos del arroyo Toledo y su relación con los procesos de contaminación y autodepuración*. Tesis de maestría. PEDECIBA - Facultad de Ciencias. Montevideo: 95 p.
- Arocena R (1996) *La comunidad bentónica como indicadora de zonas de degradación y recuperación en el arroyo Toledo (Uruguay)*. Rev. Biol. Trop. 44 (2): 659-671
- Arocena R, D Conde, D Fabián, J Gorga & J Clemente (1996) *Calidad de agua en la Laguna de Rocha: Rol de sus principales afluentes*. PROBIDES - Facultad de Ciencias. PROBIDES/GEF. Serie Documentos de Trabajo N° 13. Rocha: 53 p.
- Atlas RM (1993) *Detecting gene sequences using the polymerase chain reaction*. En: Kemp P *et al.* (eds.) Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis Publ. London: 267-271
- Baker JP, H Olem, CS Creager, MD Marcus & BR Parkhurst BR (1993) *Fish and fisheries management in lakes and reservoirs*. EPA 841-R-93-002. Terrene Institute and U.S. Environmental Protection Agency. Washington: 321 p.
- Battaglione SC (1985) *A creel survey of the Lake Keepit recreational fishery*. The Australian Zoologist 21: 565-578
- Battarabee RW (1973) *A new method for the estimation of absolute numbers, with reference specially to diatoms*. Limnol. Oceanogr. 18: 647-653
- Battarabee RW (1986) *Diatom analysis*. En: Berglund BE (ed.) Handbook of Holocene Paleocology and Paleohydrology. Wiley. N.Y.: 527-531
- Battistoni PA (1995) *Crustácea Copépoda*. En Lopretto EC & G Tell (eds.) Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio. Sur. La Plata: 953-971
- Baumgärtl H & DW Lübbers (1983) *Platinum needle electrodes for polarographic measurements of oxygen and hydrogen*. En Kessler M *et al.* (eds.) Oxygen supply. Urban and Schwarzenberg: 130-136
- Beaumont P (1975) *Hydrology*. En Whitton BA (ed.) River Ecology. Blackwell Sci. Oxford: 674
- Beckett M & A Wilson (1974) *The manual determination of ammonia in fresh waters using an ammonia-sensitive membrane-electrode*. Water Res. 8: 333-340
- Bell RT (1993) *Estimating production of heterotrophic bacterioplankton via incorporation of tritiated Thymidine*. En Kemp P *et al.* (eds.) Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis Publ. London: 495-505
- Benl G (1972) *A key to the genera of aquarium plant based on vegetative characters*. Bailey 18 (4): 121-132
- Berra TM (1981) *An Atlas of distribution of the freshwaters fish families of the world*. Univ. Nebraska Press: 197 p.
- Bertalanffy L von (1938) *A quantitative theory of organic growth inquires on growth laws*. II Human Biology 10 (2): 181-213
- Bertoldi do Pomar H (1971) *Ensayo de clasificación morfológica de los silicofitolitos*. Ameghiniana 8: 317-328
- Biggs B (1987) *Effects of sample storage and mechanical blending on the quantitative analysis of river periphyton*. Freshwater Biology 18: 197-203

- Birge EA (1915) *The heat budgets of American and European lakes*. Trans. Wis. Acad. Sci. Arts Lett. 18: 341-391
- Birks HJB & HH Birks (1980) *Quaternary Palaeoecology*. Arnold. London: 289 p.
- Blackman V (1919) *The compound interest law and plant growth*. Ann. Bot. 33: 353-60.
- Bohlin T, S Hamrin, TG Heggberget, G Rasmussen & SJ Saltveit (1989) *Electrofishing - Theory and practice with special emphasis on salmonids*. Hydrobiologia 173: 9-43
- Boltovskoy A (1995) *Taxonomía y morfología de los dinoflagelados: Métodos de trabajo*. En Alvear K, M Ferrario, E Oliveira & E Sar (eds.) Manual de métodos ficológicos. Univ. Concepción: 55-82
- Boltovskoy D (ed.) (1981) *Atlas del zooplancton del Atlántico Sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino*. Publ. Esp. Inst. Nac. Inv. Desarrollo Pesq. Mar del Plata.
- Bonilla S (1997) *Composición y abundancia fitoplanctónica de tres embalses en cadena sobre el río Negro, Uruguay*. Iheringia Sér. Bot. 49: 47-61
- Bonilla S (1998) *Estructura y dinámica de la comunidad epifítica algal en un sistema somero mixohalino*. Tesis de Maestría. PEDECIBA - Facultad de Ciencias. Montevideo: 106 p.
- Bonilla S, D Conde, L Aubriot & R de León (1997) *Floración de Nodularia cf. spumigena Mert. (Cyanobacteria) en una laguna costera salobre: factores ecológicos relacionados*. Congreso Argentino de Limnología-Ficología. Santa Fè 18-24/09/97
- Bonilla S, M Pérez & L De León (1995) *Cyanophyceae planctónicas del Lago Ton-Ton, Canelones, Uruguay*. Hoehnea 21 (1/2): 185-192
- Booth BC (1993) *Estimating cell concentration and biomass of autotrophic plankton using microscopy*. En Kemp P et al. (eds.) Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis Publ. London: 199-205
- Bottrell HH, A Duncan, ZM Gliwicz, E Grygierek, A Herzig, A Hillbricht Ilkowska, H Kurasawa, P Larsson & T Weglenska (1976) *A Review Of Some Problems En Zooplankton Production Studies*. Norw. J. Zool. 24: 419-456
- Boucherle MM & H Zülig (1983) *Cladoceran remain as evidence of change in trophic state in three Swiss lakes*. Hydrobiologia 103: 141-146
- Bourrelly P (1972) *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique. Tome I: Les algues vertes*. N. Boubee & Cie. Paris. 572 p.
- Bourrelly P (1981) *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique. Tome II: Les algues jaunes et brunes*. N. Boubee & Cie. Paris: 517 p.
- Bourrelly P (1985) *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique. Tome III: Les algues bleues et rouges*. N. Boubee & Cie. Paris: 606 p.
- Bratbak G (1993) *Microscope methods for measuring bacterial biovolume: epifluorescence microscopy, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy*. En Kemp P et al. (eds.) Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis Publ. London: 309-315
- Bremmer JM & CS Mulvaney (1982) *Nitrogen total*. En Page AL (ed.) Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. American Society of Agronomy. Madison: 59-624
- Briggs G, R Kidd & C West (1920) *Quantitative analysis of plant growth*. Ann. Appl. Biol. 7: 103-23
- Brinkhurst RO & MR Marchese (1992) *Guía para la identificación de oligoquetos acuáticos continentales de Sud y Centroamérica*. Colección Climax 6. Santa Fè: 207
- Brook JL (1959) *Cladocera*. En Edmondson WT (ed.) Freshwater Biology. Wiley. N.Y.: 587-656

- Brooks SJ (1997) *The response of Chironomidae (Insecta: Diptera) assemblages to Late-glacial climatic change in Krakenes Lake, western Norway*. Quaternary Proceedings 5: 49-58
- Butler W (1977) *Chlorophyll fluorescence: a probe for electron transfer and energy transfer*. En Trebst A & M Avron (eds.) Encyclopedia of Plant Physiology 5: 149-167
- Butler W (1978) *Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis*. Annual Review of Plant Physiology 29: 345-378
- Cabrera A & H Fabris (1948) *Plantas acuáticas de la Provincia de Buenos Aires*. Publicaciones Técnicas. Dirección Agropecuaria. La Plata 5 (2): 1-131
- Campbell L (1993) *Immunofluorescence method for the detection and characterization of marine microbes*. En Kemp P et al. (eds.) Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis Publ. London: 295-302
- Campos S & L del Puerto (en prensa) *Opal phytolith: its applications to the archaeobotanical record in the East region of Uruguay*. Actes Deuxième Congrès International de Recherche sur les Phytolithes. Aix en Provence.
- Carbone VA (1977) *Phytoliths as paleoecological indicators*. Annals N.Y. Acad. Sci. 288: 194-205.
- Carey P (1993) *Long-term culture of marine benthic protists*. En Kemp P et al. (eds.) Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis Publ. London: 505-508
- Carpenter JH (1964) *The accuracy of the Winkler method for dissolved oxygen analysis*. Limnol. Oceanogr. 10: 135-140
- Chalar G (1994) *Composición y abundancia del zoobentos del Arroyo Toledo (Uruguay) y su relación con la calidad del agua*. Revista Chilena de Historia Natural 67: 129-141
- Chalar G, L De León, R de León, D Fabián & J Gorga (1993) *Evaluación de la eutrofización del embalse de Salto Grande*. Informe final CTM Salto Grande - Facultad de Ciencias: 30 p.
- Chapin F & K van Cleve (1989) *Approaches to studying nutrient uptake, use and loss in plants*. En Pearcy RW, J Ehleringer, H Mooney & PW Rundel (eds.) Plant Physiological Ecology: Field methods and instrumentation. Chapman & Hall. London: 185-207
- Chapman DW (1968) *Production*. En WE Ricker (ed.) *Methods for assessment of fish production in freshwaters*. IBP Handbook 3. Blackwell Sci. Oxford: 182-196
- Chavez FP, KR Buck, RR Bidigare, DM Karl, D Hebel, M Latasa & L Campbell (1994) *On the chlorophyll a retention properties of glass-fiber GF/F filters*. Limnol. Oceanogr. 40: 428-433
- Chiariello N, H Mooney & K Williams (1989) *Growth, carbon allocation and cost of plant tissues*. En Pearcy R, J Ehleringer, H Mooney & P Rundel (eds.) Plant Physiological Ecology. Field methods and instrumentation. Chapman & Hall. London: 327-365
- Coche AG (1974) *Limnological study of a tropical reservoir*. En Balon EK & AG Coche (eds.) Lake Kariba: A man-made tropical ecosystem in Central Africa. Junk Publ. The Hague: 1-247
- Codd G, S Bell & W Brooks (1989) *Cyanobacterial toxins in water*. Water Science and Technology 21: 1-13
- Cole GA (1983) *Manual de Limnología*. Hemisferio Sur. Bs. As: 405 p.
- Coll J (1979) *Catálogo de algas citadas para Uruguay*. SOHMA. Montevideo: 133 p.
- Conde D, S Bonilla, L Aubriot, R de León, & W Pintos (in press) *Comparison of the areal amount of chlorophyll a of planktonic and attached microalgae in a shallow coastal lagoon*. Hydrobiologia.

- Conde D, J Gorga, M Paradiso, J Clemente, S Bonilla & D Fabián (1998) *Informe del XII muestreo limnológico en el Embalse Rincón del Bonete*. Sección Limnología, Facultad de Ciencias. Montevideo: 22 p.
- Conde D, W Pintos, J Gorga, R de León, G Chalar & R Sommaruga (1996) *The main forces inducing chemical spatial heterogeneity in the Salto Grande, a reservoir on the Uruguay River*. Arch. Hydrobiol. Suppl. 113. Large rivers 10 (1-4): 571-578
- Cook C (1990) *Aquatic Plant Book*. SPB Academic Publ. The Hague
- Coombs J, G Hind, R Leegood, L Tieszen & A Vonshak (1985) *Analytical techniques*. En Coombs J, D Hall, S Long & M Scurlock (eds.) *Techniques in bioproductivity and photosynthesis*. Pergamon. Oxford: 219-226
- Cordero EH (1941) *Observaciones sobre algunas especies sudamericanas del género Hydra. II Hydra y Cordylophora en Uruguay*. An. Acad. Brasil. Cienc. 13 (3): 173-183
- Cowardin L & F Golet (1995) *US Fish and Wildlife Service 1979 wetland classification: A review*. Vegetation 118: 139-152
- Cranston PS (1982) *A key to the larvae of the British Orthocladinae (Chironomidae)*. Scientific Publication N°45. Freshwater Biological Association.
- Creer KM, R Thompson, L Molyneux & FJH Mackereth (1972) *Geomagnetic secular variation recorded in the stable magnetic remanence of recent sediments*. Earth Planet Sci. Letters 14: 115-127
- Cushing EJ & HE Wright (1965) *Hand operated piston corer for lake sediments*. Ecology 46: 380-384
- Daenen Louwerse H, L Lijklema & M Coentraats (1993) *Iron content of sediment and phosphate adsorption properties*. Hydrobiologia 253: 311-317
- Dangavs NV (1995) *Cartografía de cuerpos lénticos*. En Lopretto EC & G Tell (eds.) *Ecosistemas de aguas continentales*. Sur. La Plata: 1-19
- Dansereau P (1951) *Description and recording of vegetation upon a structural basis*. Ecology 32: 172-229
- Dansereau P (1957) *Biogeography: an ecological perspective*. Ronald Press. N.Y.
- De León L (1993) *Fitoplancton de un sistema eutrófico. Composición y variación anual de su biomasa*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Montevideo: 83 p.
- del Puerto L (1998) *Silicofitolitos: su aplicación para la reconstrucción de los sistemas prehistóricos de subsistencia. - Cráneo Marcado, Laguna de Castillos: un caso de estudio*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Humanidades y Ciencias. Montevideo.
- Delbecque EJP (1985) *Periphyton on nymphaeids: An evaluation of methods and separation techniques*. Hydrobiologia 124: 85-93
- DeLong EF (1993) *Single cell identification using fluorescently labeled, ribosomal RNA-specific probes*. En Kemp P et al. (eds.) *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publ. London: 285-294
- Delorme LD (1967) *Field key and methods of collecting freshwater ostracodes in Canada*. Can. J. Zool.: 45: 1275-1281
- Delorme LD (1969) *Ostracodes as Quaternary paleoecological indicators*. Can. J. Earth Sci. 6: 1471-1476
- Delorme LD, SC Zoltai & LL Kalas (1977) *Freshwater shelled invertebrate indicators of paleoclimate in northwestern Canada during late glacial times*. Can. J. Earth Sci. 14: 2029-2046
- DeVogel EF (1987) *Manual of herbarium taxonomy. Theory and practice*. UNESCO Regional Office for Science and Technology for Southeast Asia. Indonesia.
- Digerfeldt G & U Lettevall (1969) *A new type of sediment sampler*. Geol. Fören. Förhandl. Stock. 91: 399-406

- Digerfeldt G (1965) *A new type of large-capacity sampler*. Geol. Fören. Förhandl. Stock. 87: 425-430
- Dilcher DL (1974) Approaches to the identification of angiosperm leaf remains. Bot. Gaz. 40: 1-157
- Dioni W (1974) *Noiticia sobre un raro hidroide de agua dulce de la Argentina y Uruguay*, Calpasoma dactyloptera. Physis B 33 (86): 147-150
- Dodson A & W Thomas (1978) *Filtration*. En Sournia A (ed.) Phytoplankton manual. UNESCO. Paris: 104-107
- Dokulil M (1984a) *Physical limnology of lakes*. Lecture notes for the Limnology Postgraduate Course. Austria: 68 p.
- Dokulil M (1984b) *Metodología de medición de fotosíntesis en fitoplancton*. En: Bahamonde N & S Cabrera (eds.) Embalses, fotosíntesis y productividad primaria. MaB-UNESCO. Chile: 73-84
- Downing JA & C Plante (1993) *Production of fish populations in lakes*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 50: 110-120
- Downing JA & F Rigler (eds.) (1984) *A manual on methods for the assessment of secondary productivity in fresh waters*. IBP Handbook 17. Blackwell Sci. Oxford.
- Downing JA (1984) *Sampling the benthos of standing waters*. En Downing JA & FH Rigler: *A manual on methods of the assessment of secondary productivity in fresh waters*. IBP Handbook 17. Blackwell Sci. Oxford: 87-130
- Downing JA, C Plante & S Lalonde (1990) *Fish production correlated with primary productivity, not the morphoedaphic index*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 47: 1929-1936
- Dumont HJ, I van de Velde & S Dumont (1975) *The dry weight estimate of biomass in a selection of Cladocera, Copepoda and Rotifera from the plankton, periphyton and benthos of continental waters*. Oecologia 19: 75-97
- Edler L (1979) *Recommendations for marine biological studies in the baltic sea, phytoplankton and chlorophyll*. Baltic. Mar. Biolog. 5: 38 p.
- Edmondson WT & GG Winberg (eds.) (1971) *A manual on methods for the assessment of secondary productivity in fresh waters*. IBP Handbook 17. Blackwell Sci. Oxford: 358 p.
- Edmondson WT (1959) *Freshwater biology*. Wiley. N.Y.
- Elliott JM (1977) *Some methods for the statistical analysis of samples of benthic invertebrates*. Sci. Publ. 25 Freshwater Biological Association. Ferry House: 156 p.
- Ezcurra I & A Bonetto (1969) *Algunas características del bentos en los saltos del río Uruguay, con especial referencia a la ecología de los poríferos*. Physis 28 (77): 359-369
- Fabián D & A Schinca (1990) *Distribución vertical de los cladóceros en el Lago Ton Ton: diferencias entre los periodos de estratificación y mezcla*. Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral 21 (2): 1-11
- Fabián D (1993) *Composición, distribución horizontal y variación estacional de los crustáceos planctónicos en el reservorio del Cisne, Uruguay*. Rev. Brasil. Biol. 53 (3): 355-363
- Fabián D (1995) *Variaciones espacio-temporales del zooplancton en un sistema monomítico eutrófico, lago Ton Ton (Canelones, Uruguay)*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Montevideo: 79 p.
- Faegri K & J Iversen (1975) *Textbook of pollen analysis* (3rd Edition). Blackwell Sci. Oxford.
- Falconer I & A Humpage (1996) *Tumour promotion by cyanobacterial toxins*. Phycologia 35 (6-Suppl.): 74-79

- Falconer I (1996) *Potential impact on human health of toxic cyanobacteria*. Phycologia 35 (6 Suppl.): 6-11
- Falkner G, R Falkner, A Schwab (1989) *Bioenergetic characterization of transient state phosphate uptake by the cyanobacterium Anacystis nidulans*. Arch. Microbiol. 152: 353-361
- Falkner G, P Strasser, D Graffius (1984). *Phosphate uptake by blue-green algae in vitro and in a lake during an algal bloom: Useful application of a force-flow relationship*. Verh. intern. Verein. Limnol. 22: 195-199
- Falkner G, F Wagner, JV Small & R Falkner (1995) *Influence of fluctuating phosphate supply on the regulation of phosphate uptake by the blue-green alga Anacystis nidulans*. J. Phycol. 31: 745-753
- Falkowski PG & JA Raven (1997) *Aquatic Photosynthesis*. Blackwell Sci. Malden: 375 p.
- Fausch KD, J Lyons, JR Karr & PL Angermeier (1990) *Fish communities as indicators of environmental degradation*. En Adams SM (ed.) *Biological indicators of streams*. Am. Fish. Soc. Symposium 8: 123-144
- Ferrario M, E Sar & S Salas (1995) *Metodología básica para el estudio del fitoplancton con especial referencia a las diatomeas*. En Alveal K, M Ferrario, EC Oliveira & E Sar (eds.) *Manual de métodos ficológicos*. Universidad de Concepción: 1-24
- Field C, JT Ball & J Berry (1989) *Photosynthesis: Principles and field techniques*. En Pearcy RW, J Ehleringer, HA Mooney & PW Rundel (eds.) *Plant Physiological Ecology. Field methods and instrumentation*. Chapman & Hall. London: 209-253
- Figini AJ (1993) *Geocronología: Métodos de datación en el Cuaternario*. LATYR Publicaciones, CONICET - UNLP. La Plata: 19 p.
- Figueiras A (1964) *La malacofauna dulceacuícola del Uruguay. Parte I, Gastropoda*. Com. Soc. Malac. Urug. 1 (7): 161-202
- Figueiras A (1965) *La malacofauna dulceacuícola del Uruguay. Parte II, Pelecypoda*. Com. Soc. Malac. Urug. 1 (8): 223-270
- Findlay S (1993) *Thymidine incorporation into DNA as an estimate of sediment bacterial production*. En Kemp P et al. (eds.) *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publ. London: 505-508
- Foggetta M (1995) *Ciliophora*. En Lopretto EC & G Tell (eds.) *Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio*. Sur. La Plata: 557-581
- Folk RL & WC Ward (1957) *Brazos River Bar: A study in the significance of grain size parameters*. Jour. Sed. Petr. 27: 3-26
- Fosberg F (1961) *A classification of vegetation for general purposes*. Tropical Ecology 2: 1-28
- Fournier R (1978) *Membrane filtering*. En Sournia A (ed.) *Phytoplankton manual*. UNESCO. Paris: 108-112
- Frey DG (1964) *Remains of animals in Quaternary lake and bog sediments and their interpretation*. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 2: 1-114
- Frey DG (1979) *Cladocera analysis*. En Berglund BE (ed.). *Project guide to paleohydrological changes in the Temperate Zone in the last 15000 years, Subproject B. Lake and mire environments*. IGCP Project 158 vol. II chapter 10.10. Univ. Lund: 227-257
- Fries M & U Hafsten (1965) *Asbjornsen's peat sampler to prototype of the Hiller sampler*. Geol. Foren. Stockh. Forh. 87: 307-313
- Gätcher R, A Mares & MM Tilzer (1984) *Determination of phytoplankton production by the radiocarbon method: a comparison between the acidification and bubbling method (ABM) and the filtration technique*. J. Plankton Res. 6: 359-364
- Gavrilov K (1977) *Oligochaeta*. En Hurlbert SH (ed.) *Biota acuática de Sudamérica austral*. State Univ. San Diego: 99-121

- Geider RJ & BA Osborne (1992) *Algal photosynthesis*. Chapman & Hall. N.Y.: 256 p.
- Genty B, JM Briantais & N Baker (1989) *The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence*. *Biochimica et Biophysica Acta* 990: 87-92
- Goldsborough LG & GGC Robinson (1996) *Pattern in wetlands*. En Stevenson RJ, ML Bothwell & RL Lowe (eds.) *Algal ecology. Freshwater benthic ecosystems*. Academic Press. San Diego: 78 -120.
- Golterman HL, RA Clymo & MAM Onstad (1978) *Methods for physical & chemical analysis of fresh waters*. IBP Handbook 8. Blackwell Sci. Oxford: 214
- González de Infante A (1988) *El plancton de las aguas continentales*. Monografías de OEA. Serie Biología No. 33
- Govindjee (1995) *Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence*. *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 131-160
- Gran G (1952) *Determination of the equivalence point in photometric titrations*. Part II. *Analyst*. 77: 661-671
- Green RH (1979) *Sampling design and statistical methods for environmental biologists*. Wiley. N.Y.: 257 p.
- Grimes JA & SR Rushforth (1983) *Diatoms of surface sediments in Utah Lake, Utah, U.S.A.* *Hydrobiologia* 99: 161-174
- Guilcher A (1979) *Précis d'hydrologie marine et continentale*. Masson. Paris: 344
- Haines DW, KH Rogers & FEJ Rogers (1987) *Loose and firmly attached epiphyton: their relative contributions to algal and bacterial carbon productivity in a Phragmites marsh*. *Aquat. Bot.*: 169-176
- Häkanson L & M Jansson (1983) *Principles of lake sedimentology*. Springer-Verlag. Berlin: 316 p.
- Häkanson L (1981) *A Manual of lake morphometry*. Springer-Verlag. N.Y.: 78 p.
- Hall RI & JP Smol (1996) *Paleolimnological assessment of long-term water-quality changes in south-central Ontario lakes affected by cottage development and acidification*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53: 1-17
- Haney JF & DJ Hall (1973) *Sugard-coated Daphnia: a preservation technique for Cladocera*. *Limnol. Oceanogr.* 18: 331-333
- Hargrave BT, NJ Prouse, GA Philipps & PA Neame (1983) *Primary production and respiration in pelagic and benthic communities in two intertidal sites in the upper Bay of Fundy*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40: 1331-1342
- Hasle G (1978) *The inverted-microscope method*. En Sournia A (ed.) *Phytoplankton manual*. UNESCO. Paris: 88-96
- Hayes ML (1983) *Active fish capture methods*. En Nielsen & Johnsos (eds.). *Fisheries techniques*. Am. Fish. Soc. Bethesda: 123-145
- Henry R & FAR Barbosa (1989) *Thermal structure, heat content and stability of two lakes in The National Park of Rio Doce Valley (Minas Gerais, Brazil)*. *Hydrobiologia* 171: 189-199
- Heusser C (1971) *Pollen and Spores of Chile*. Univ. Arizona Press. Tucson: 117 p.
- Hile R (1936) *Age and growth of the Lencichthys artedi (Le Cren) in the lake of the North Eastern Highlands, Wisconsin*. *Bull. Bur. Fish. US.* 48 (19): 211-237
- Hobbie J (1993) *Introduction*. En Kemp P et al. (eds.) *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publ. London: 1-5
- Holm-Hansen O & EW Helbling (1995) *Técnicas para la medición de la productividad primaria en el fitoplancton*. En Alveal K, M Ferrario, EC Oliveira & E Sar (eds.) *Manual de Métodos Ficológicos*. Univ. Concepción: 387-396
- Holm-Hansen O, C Lorenzen, R Holmes & J Strickland (1965) *Fluorometric determination of chlorophyll*. *J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer.* 30: 3

- Hosper H & M Meyer (1986) *Control of phosphorous loading and flushing as restoration methods for Lake Veluwe, The Netherlands*. Hydrobiologia 20:183-194
- Hubert WA (1983) *Passive capture techniques*. En Nielsen & Johnsos (eds.). Fisheries techniques. Am. Fish. Soc. Bethesda: 95-111.
- Hutchinson GE & H Löffler (1956) *The thermal classification of lakes*. Proc. Nat. Acad. Sci. 42: 84-86
- Hutchinson GE (1957) *A Treatise on Limnology. I. Geography, Physics and Chemistry*. Wiley. N.Y.: 1015 p.
- ISO (1992) *Water quality - Measurement of biochemical parameters. Spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration*. ISO 10260: 8 p.
- Iversen J (1936) *Biologische Pflanzentypen als hilfsmittel in der vegetationsforschung*. Thesis. Univ. Copenhagen.
- Izaguirre I (1995) *Sucesión estacional del fitoplancton*. En Lopretto EC & G Tell (eds.) Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio. Sur. La Plata: 121-128
- Janssen CR (1984) *Modern pollen assemblages and vegetation in the Myrtle Lake peatland, Minnesota*. Ecological Monographs 54: 213-252
- Jassby AD & T Platt (1976) *Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton*. Limnol. Oceanogr. 21: 540-547
- Jensen A (1980) *Seasonal changes in near IR reflectance ratio and standing crop biomass in a salt marsh dominated by Halimione portulacoide*. New Phytol. 86: 57-68
- Jones JG (1980) *Some differences in the microbiology of profundal and littoral lake sediments*. J. Gen. Microbiol. 315: 3-17
- Jönsson B (1991) *A <sup>14</sup>C-incubation technique for measuring microphytobenthic primary productivity in intact sediment cores*. Limnol. Oceanogr. 36 (7): 1485-1492
- Jose de Paggi S (1995) *Rotifera*. En Lopretto EC & G Tell (eds.) Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio. Sur. La Plata: 643-655
- Jowsey PC (1966) *An improved peat sampler*. New Phytol. 65: 245-248
- Kairesalo T (1983) *Dynamics of epiphytic communities on Equisetum fluviatile L.: response to short term variation in environmental conditions*. En: Wetzel RG (ed.). Periphyton of Freshwater Ecosystems. Developments in Hydrobiology. Junk Publ. Boston: 153-160
- Karr JR, KD Fausch, PL Angermeier, PR Yant & IJ Schlosser (1986) *Assessing biological integrity in running waters: a method and its rationale*. Illinois Natural History Survey, Special Publication 5, Champaign.
- Kawakatsu M & R Ponce de León (1989) *El hallazgo de Dugesia tigrina (Girard, 1850) (Turbellaria, Tricladida, Paludicola) en el sur de Uruguay*. Bol. Soc. Zool. Uruguay 5: 35
- Kemp P (1988) *Bacterivory by benthic ciliates: significance as a carbon source and impact on sediment bacteria*. Mar. Ecol. Progr. Ser. 9:163-169
- Kent M & P Coker (1992) *Vegetation description and analysis - A practical approach*. Belhaven Press. London.
- Kirchman DL (1993) *Statistical analysis of direct counts of microbial abundance*. En Kemp P et al. (eds.) Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis Publ. London: 117-120 p.
- Kornijów R & T Kairesalo (1994) *A simple apparatus for sampling epiphytic communities associated with emergent macrophytes*. Hydrobiologia 294: 141-143
- Koroleff F (1970) *Revised version of direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue*. Int. Con. Explor. Sea C.M. 1969/C9. ICES, Information on techniques and methods for sea water analysis. Interlab. Rep. 3: 19-22

- Koste W (1978) *Rotatoria*. Die Rädertiere Mitteleuropas, Überordnung Monogononta. Borntraeger. Stuttgart: 673 p.
- Kratz W & J Myers (1955) *Nutrition and growth of several blue-green algae*. Am. J. Bot. 42: 282-287
- Krause GH & E Weis (1991) *Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 42: 313-349
- Küchler A (1967) *Vegetation Mapping*. Ronald Press. N.Y.
- Lagler K, J Bardach, R Miller & D May (1962) *Ichthyology*. Wiley. N.Y.: 506 p.
- Langeland A & S Rognerud (1974) *Statistical analyses used in the comparison of three methods of freshwater zooplankton sampling*. Arch. Hydrobiol. 73: 403-410
- Larrañaga R (1989) *Listado específico de las esponjas (Porifera) actuales y fósiles del Uruguay y nueva propuesta sistemática*. Bol. Soc. Zool. Uruguay (2a.) 5: 51
- Lassen C, H Plough & B Jorgensen (1992) *Microalgal photosynthesis and spectral scalar irradiance in coastal marine sediments of Limfjorden, Denmark*. Limnol. Oceanogr. 37: 760-772
- Le Cren ED (1951) *The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch, Perca fluviatilis*. J. Anim. Ecol. 20: 201-219
- Leach JH, LM Dickie, BJ Shuter, U Borgmann, J Hyman & W Lysack (1987) *A review of methods for prediction of potential fish production with application to the Great Lakes and Lake Winnipeg*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 44 (suppl. 2): 471-485
- Lee RE (1995) *Phycology*. Cambridge Univ. Press. Cambridge: 645 p.
- Legendre L & M Gosselin (1996) *Estimation of N or C uptake rates by phytoplankton using <sup>15</sup>N or <sup>13</sup>C: revising the usual computation formulae*. J. Plankton Res. 19: 263-271
- Leopold LB, MG Wolman & JP Miller (1964) *Fluvial processes in Geomorphology*. Freeman. San Francisco: 522 p.
- Lewis W (1983) *A revised classification of lakes based on mixing*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 40: 1779-1787
- Livingston DA (1955) *A lightweight piston sampler for lake deposits*. Ecology 36: 137-139
- Lombardo A (1970) *Las plantas acuáticas y las plantas florales*. Intendencia Municipal de Montevideo. Montevideo.
- Lomnicki A, E Bundola & K Jankowska (1968) *Modification of the Wiegert-Evans method for estimation of net primary production*. Ecology 49: 147-49
- Long S & J Hallgren (1985) *Measurements of CO<sub>2</sub> assimilation by plants in the field and the laboratory*. En Coombs J, DO Hall, SP Long & JM Scurlock (eds.) Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis. Pergamon. Oxford: 62-94
- Lopretto EC (1995) *Mastigozoa*. En Lopretto EC & G Tell (eds.) Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio. Sur. La Plata: 511-517
- Lopretto EC & G Tell (1995) *Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio*. Tomos I, II, III. Sur. La Plata: 1401 p.
- Lorenzen CJ (1966) *A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll and pheophytines*. Arch. Hydrobiol. 109: 567
- Lorenzen CJ (1967) *Determination of chlorophyll and pheopigments. Spectrophotometric equations*. Limnol. Oceanogr. 12: 343-346
- Ludwig JA & JF Reynolds (1988) *Statistical ecology*. Wiley. N.Y.: 337 p.
- Macan TT (1959) *Invertebrados de agua dulce. Guía de animales*. EUNSA
- MacIsaac EA & JG Stockner (1993) *Enumeration of phototrophic picoplankton by autofluorescence microscopy*. En Kemp P et al. (eds.) Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis Publ. London: 187-197

- Mackereth FJH, J Heron & JF Talling (1989) *Water analysis*. Sci. Publ. 36 Freshwater Biological Association. Ferry House: 121 p.
- Mackereth FJH (1969) *A short core for sub-aqueous deposits*. *Limnol. Oceanogr.* 14: 145-151
- MacLennan DN & EJ Simmonds (1992) *Fisheries acoustics*. Chapman & Hall. 325 p.
- Malvestuto SP, WT Kendall, WD Davies & WL Shelton (1978) *An evaluation of the roving creel survey with nonuniform probability sampling*. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 107: 255-262
- Manny BA, RG Wetzel & RE Bailey (1978) *Paleolimnological sedimentation of organic carbon, nitrogen, phosphorous, fossil pigments, pollen and diatoms in a hypereutrophic, hardwater lake: A case history of eutrophication*. *Polskie Arch. Hydrobiol.* 25: 243-267
- Mantoura RFC & CA Llewellyn (1983) *The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography*. *Analytica Chimica Acta* 151: 297-314
- Mañé Garzón F (1964) *Urnatella gracilis Leidy, 1851 (Bryozoa Endoprocta) en el Uruguay*. *Anais do II Congresso Latinoamericano de Zoologia*: 275-281
- Margalef R (1983) *Limnología*. Omega. Barcelona: 1010 p.
- Marker AFH, E Nush, H Rai & B Riemann (1980) *The measurements of photosynthetic pigments in freshwaters and standarization of methods: conclusions and recommendations*. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 14: 91-106
- Markgraf V & HL D'Antoni (1978) *Pollen Flora of Argentina*. Univ. Arizona Press. Tucson: 208 p.
- Marta MC (1983) *Plantas acuáticas del litoral. Guía para su reconocimiento a campo y otros temas*. Asoc. Cienc. Nat. Litoral, Santo Tomé, Sta. Fé: 44 p.
- Martcorena C (1992) *Bibliografía botánica taxonómica de Chile*. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 41: 1-587
- Martcorena C (1996) *Bibliografía botánica taxonómica de Chile*. Suplemento 1. *Gayana Bot.* 53(1): 1-263
- Mattson NS & JC Mutale (1992) *Multi-mesh gillnets to estimate species composition and catch per unit of effort of fish in a small water body in Zambia*. *Journal of Fish Biology* 41: 897-908.
- Mazzeo N, D Crosa & R Sommaruga (1993) *Productividad y variación estacional de la biomasa de Pistia stratiotes L. en el reservorio del cisne, Uruguay*. *Acta Limnol. Brasil.* VI: 186-195
- Mazzeo N, B Dardano & A Martcorena (1998) *Interclonal variation in response to simazine stress in Lemna gibba (Lemnaceae)*. *Ecotoxicology* 7: 151-160
- Mazzeo N, J Gorga, D Crosa, J Ferrando & W Pintos (1995) *Spatial and temporal variation of physicochemical parameters in a shallow reservoir seasonally covered by Pistia stratiotes L. in Uruguay*. *J. Freshwater Ecology* 10 (2): 141-149
- McAndrews JH, AA Berti & G Norris (1973) *Key to the Quaternary Pollen and Spores of the Great Lakes Region*. Life Sciences Miscellaneous Publications. Royal Ontario Museum: 61 p.
- McManus GB (1993) *Growth rates of natural populations of heterotrophic nanoplankton*. En Kemp P et al. (eds.) *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publ. London: 557-562 p.
- Menni RC, HL López, JR Casciotta & AM Miquelarena (1984) *Ictiología de áreas serranas de Córdoba y San Luis (Argentina)*. *Biología Acuática* 5: 1-63
- Menni RC, AM Miquelarena & HL López (1995) *Pisces*. En Lopretto EC & G Tell (eds.). *Ecosistemas de aguas continentales*. Sur. La Plata: 1327-1367

- Merritt RW & KW Cummins (1984) *An Introduction to the Aquatic Insects of North America*. Kendall Hunt. Iowa: 722
- Mertens J, P Van den Winkel & D Massart (1975) *Determination of nitrate in water with an ammonia probe*. Analytical Chemistry. 47(3): 522-526
- Moore EW (1939) *Graphic determination of carbon dioxide and the three forms of alkalinity*. J. Amer. Water Works Ass. 31: 51
- Moore PD, JA Webb & ME Collinson (1991) *Pollen Analysis*. Blackwell Sci. Oxford: 216 p.
- Morin A & A Cattaneo (1992) *Factors affecting sampling variability of freshwater periphyton and the power of periphyton studies*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49: 1695-1703
- Mortimer CH (1961) *Motion in thermoclines*. Verh. intern. Verein. Limnol. 14: 79-83
- Moss B (1980) *Ecology of fresh waters*. Blackwell Sci. Oxford: 332
- Müller R & O Widemann (1955) *Die Bestimmung des Nitrat-Ions in Wasser*. Von Wasser 22: 247 p.
- Mullin JB & JP Riley (1955) *The spectrophotometric determination of silicate-silicon in natural waters with special reference to sea water*. Anal. Chim. Acta. 12: 162-170
- Murphy J & JP Riley (1962) *A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters*. Anal. Chim. Acta 27: 31-36
- Naumann E (1931) *Limnologische Terminologie*. Urban & Schwarzenberg. Berlin: 776
- Nobel PS & SP Long (1985) *Canopy structure and light interception*. En Coombs J, D Hall, S Long & M Scurlock (eds.) *Techniques in bioproductivity and photosynthesis*. Pergamon. Oxford: 41-49
- Norlan S (1993) *The relationship between biomass and volume of bacteria*. En Kemp P *et al.* (eds.) *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publ. London: 303-307
- Norman MJ & GS Campbell (1989) *Canopy structure*. En Pearcy RW, J Ehleringer, H Mooney & PW Rundel *et al.* (eds.). *Plant Physiological Ecology. Field methods and instrumentation*. Chapman & Hall. London: 301-325
- Nusch EA (1980) *Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination*. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 14: 14-36
- Obst U (1985) *Test instructions for measuring the microbial activity in water samples*. Fresenius Z. Anal. Chem. 321: 166-168
- Oglesby RT (1977) *Relationship of fish yield to lake phytoplankton standing crop, production and morphoedaphic factors*. J. Fish. Res. Board Can. 34: 2271-2279
- Olazarri J (1966) *Los moluscos de agua dulce del Depto. de Colonia, Uruguay. Parte I: Pelecypoda*. Com. Soc. Malac. Urug. II (11): 15-27
- Oldani NO (1984) *Evaluación acústica de peces por recuento de ecos*. En Vila I & E Fagetti (eds.) *Taller internacional sobre ecología y manejo de peces en lagos y embalses*. COPESCAL Doc. Tec. (4): 115-120
- Olila OG & K Reddy (1993) *Phosphorus sorption characteristics of sediments in shallow eutrophic lakes of Florida*. Arch. Hydrobiol. 129 (1): 45-65
- Olivier SR (1962) *Los Cladóceros Argentinos*. R. Mus. La Plata (N.L) Zool. 7(56): 173-269
- Pace ML & JD Orcutt (1981) *The relative importance of protozoans, rotifers and crustacean in a freshwater zooplankton community*. Limnol. Oceanogr. 26: 822-830
- Padín OH & NR Iriart (1995) *Artes y métodos de muestreo en biología pesquera*. En Lopretto EC & G Tell (eds.) *Ecosistemas de aguas continentales*. Sur. La Plata: 329-350
- Page FC & FJ Siemensma (1995) *Sarcodina (excepto Testáceos)* En Lopretto EC & G

- Tell (eds.) Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio. Sur. La Plata: 519-539
- Paggi JC (1980) *Campaña limnológica "Keratella I" en el río Paraná medio, zooplankton de ambientes lentíticos*. Ecología 4: 77-88
- Paggi JC (1995) *Crustácea Cladóceras*. En Lopretto EC & G Tell (eds.) Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio. Sur. La Plata: 909-951
- Parra O & C Bicudo (1995) *Introducción a la biología y sistemática de las algas de aguas continentales*. Univ. Concepción: 268 p.
- Parsons TR (1963) *A new method for the microdetermination of chlorophyll c in sea water*. J. Mar. Res. 21: 164-171
- Pearsall DM & EH Dinan (1992) *Developing a phytolith classification system*. En Rapp G & SC Mulhollan (eds.) Phytolith Systematics: Emerging Issues. Plenum. N.Y.
- Pearsall DM (1988) *La producción de alimentos en Real Alto: la aplicación de las técnicas etnobotánicas al problema de la subsistencia en el período formativo ecuatoriano*. Corporación Editora Nacional. Guayaquil.
- Pearsall DM (1989) *Phytolith Analysis*. En Pearsall DM (ed.) Paleoehtnobotany: a Handbook of Procedures. Academic Press. San Diego: 311-438
- Pechar L (1987) *Use of acetone:methanol mixture for the extraction and spectrophotometric determination of chlorophyll a in phytoplankton*. Arch. Hydrobiol. Suppl. 78 (1): 99-117
- Pedrozo FL, CA Boneto, A Ramos & F Minzoni (1986) *Fijación de fósforo en sedimentos de fondo de los ríos Paraná, Paraguay y Bermejo*. Ecosur 12 (13): 59-68
- Pennak RW (1962) *Quantitative zooplankton sampling in littoral vegetation areas*. Limnol. Oceanogr. 7: 487-489
- Pennak RW (1989) *Fresh-Water Invertebrates of the United States*. Wiley. N.Y.: 613 p.
- Peña MA & WG Harrison (1995) *Determinación de la producción primaria mediante el método de nitrógeno-15*. En Alveal K, M Ferrario, EC Oliveira & E Sar (eds.) Manual de Métodos Ficológicos. Univ. Concepción: 329-350
- Persat H (1991) *The efficiency of electric fishing in fish population studies: An experiment on grayling (Thymallus thymallus)*. Verh. intern. Verein. Limnol. 24: 2432-2436
- Pintos W & R Arocena (1988) *Manual de prácticos de Limnología*. SPDI/Facultad de Humanidades y Ciencias. Montevideo: 60 p
- Piperno DR (1988) *Phytolith Analysis: An Archeological and Geological Perspective*. Academic Press. San Diego: 280 p.
- Platt T & S Sathyendranath (1993) *Fundamentals issues in measurement of primary production*. IECS Mar. Sci. Symp. 197: 3-9
- Platt T, CL Gallegos & WG Harrison (1980) *Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton*. J. Mar Res. 36: 687-701
- Pomeroy L (1974) *The ocean's food web, a changing paradigm*. Bioscience 24: 499-504
- Porter K & S Feig (1980) *The use of DAPI for identifying and counting aquatic microbionta*. Limnol. Oceanogr. 25: 943-948
- Potterton S & W Shults (1967) *An evaluation of the performance of the nitrate-selective electrode*. Analyt. Lett. 1: 2-11
- Pourriot R, J Capblancq, J Champ & A Meyer (1982) *Écologie du plancton des eaux continentales*. Collection d'écologie 16. Masson. Paris: 198 p.

- Prepas EE (1978) *Sugar-frosted Daphnia: an improved fixation technique for Cladocera*. Limnol. Oceanogr. 23: 557-559
- Prepas EE (1984) *Some statistical methods for the design of experiments and analysis of samples*. En Downing JA & FH Rigler (eds.) A manual on methods for the assessment of secondary productivity in fresh waters. IBP Handbook 17. Blackwell Sci. Oxford: 266-335
- Psenner R (1993) *Determination of size and morphology of aquatic bacteria by automated image analysis*. En Kemp P et al. (eds.) Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis Publ. London: 339-345
- Psenner R, B Boström, M Dinka, K Pettersson, R Puckso & M Sanger (1988) *Fractionation of phosphorus in suspended matter and sediment*. En Sediment Phosphorus group: Working group summaries and proposals for future research. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 30: 83-112
- Quinn SP (1992) *Angler perspective on walleye management*. North American Journal of Fisheries Management 12: 367-378
- Rai H (1980) *Some problems in determination of photosynthetic planktonic pigments and their decomposition products*. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 14: 3-13
- Rapp G & SC Mulholland (eds.) (1992) *Phytolith Systematics: Emerging Issues*. Plenum. N.Y.
- Raunkaier C (1934) *The life forms of plants and statistical plant geography*. Clarendon Press. Oxford.
- Raunkaier C (1937) *Plant life forms*. Clarendon Press. Oxford.
- Rawson DS (1956) *Algal indicators of trophic lake types*. Limnol. Oceanogr. 1: 18-25
- Reid F (1978) *Permanent records*. En Sournia A (ed.) Phytoplankton manual. UNESCO. Paris: 113-118
- Reid JW (1985) *Chave de identificação e lista de referências bibliográficas para as espécies continentais sulamericanas de vida livre de ordem Cyclopoida (Crustacea, Copepoda)*. Bol. Zool. Univ. Sao Paulo 9: 17-143
- Renberg I & T Hellberg (1982) *The pH History of Lakes in the Southwestern Sweden, as Calculated from the Subfossil Diatom Flora of the Sediments*. Ambio 11(1): 30-33
- Rey L (1987) *Planejar e Redigir Trabalhos Científicos*. Edgard Blücher. Sao Paulo: 240 p.
- Reynolds CS & AE Walsby (1975) *Water blooms*. Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. 50: 437-481
- Reynolds CS (1984) *The ecology of phytoplankton*. Cambridge Univ. Press: 384 p.
- Reynolds CS (1987) *Cyanobacterial water blooms*. Adv. Bot. Research V.13.
- Riaux Gobin C & B Klein (1993) *Microphytobenthic measurement using HPLC and conventional pigment analysis*. En Kemp P et al. (eds.) Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis Publ. London: 369-376
- Ricker WE (1981) *Computation and interpretation of biological statistics of fish populations*. Fish. Res. Bd. Can. Bull. 191: 382 p.
- Rieder J (1993) *Improved techniques for exploring aufwuchs communities*. Limnologia 23: 153-167
- Riemann B (1980) *A note on the use of methanol as an extraction solvent for chlorophyll a determination*. 70-78
- Rigler FH & JA Downing (1984) *The calculation of secondary productivity*. En Downing JA & FH Rigler (eds.) A manual on methods for the assessment of secondary productivity in freshwaters. IBP Handbook 17 Blackwell Sci. Oxford: 19-58
- Rigler FH (1956) *A tracer study of the phosphorus cycle in lake water*. Ecology 37:

550-562

- Rijkeboer M, F de Bles & J Gons (1991) *Role of sestonic detritus as a P-buffer*. Mem. Ist. Ital. Idrobiol. 48: 251-260
- Ringuelet R (1958) *Los crustáceos copépodos de las aguas continentales de la República Argentina. Sinopsis sistemática*. Contribuciones Científicas Fac. Cienc. Ex. y Nat. Zool. 1 (2): 1-125
- Ringuelet R (1981) *Los hirudíneos del Museo de Historia Natural de Montevideo*. Comunic. Zool. Museo Hist. Nat. Montevideo XI (146): 1-39
- Ringuelet RA, RH Aramburu & AA de Aramburu (1967) *Los peces argentinos de agua dulce*. Comisión de Investigación Científica, Provincia de Buenos Aires. La Plata: 600 p.
- Roberts M, S Long, L Tieszen & C Beadle (1985) *Measurements of plant biomass and net primary production*. En Coombs J, D Hall, S Long & M Scurlock (eds.) *Techniques in bioproductivity and photosynthesis*. Pergamon. Oxford: 1-19
- Rocha O & T Matsumura Tundisi (1976) *Atlas do Zooplankton (Represa do Broa, Sao Carlos)*. Vol I. *Copepoda*. Centro De Ciencias e Tecnologia, Univ. Sao Carlos: 68 p.
- Roldán G (1988) *Guía para el estudio de los macroinvertebrados acuáticos del Departamento de Antioquía*. Univ. Antioquía. Medellín: 217 p.
- Roldán Pérez G (1992) *Fundamentos de Limnología Neotropical*. Editorial Univ. Antioquía. Medellín: 529 p.
- Rott E (1981) *Some results from phytoplankton counting intercalibrations*. Schweiz. Z. Hydrol. 43 (1): 34-61
- Roubik DW & JE Moreno (1991) *Pollen and Spores of Barro Colorado Island*. Monograph in Systematic Botany, Vol. 36. Missouri Botanical Garden. St. Louis: 268 p.
- Round FE (1964) *The diatom sequence in lake deposits: some problems of interpretation*. Verh. intern. Verein. Limnol. 15: 1012-1020
- Rovner I (1990) *Notas técnicas. Análisis de fitolitos. Extracción de fitolitos de muestras de suelos*. Antropológicas 4: 49-53
- Rudstam LG & BM Johnson (1992) *Development, evaluation and transfer of new technology*. En Kitchell JF (ed.) *Food web management, A case study of lake Mendota*. Springer. Berlin: 507-523
- Ruttner F (1963) *Fundamentals of Limnology*. Univ. Toronto Press: 307 p.
- Ruttner Kolisko A (1974) *Plankton Rotifers. Biology and taxonomy*. Die Binnengewässer 26 (1): Stuttgart: 246 p.
- Ruttner Kolisko A (1977) *Suggestions for biomass calculations of plankton rotifers*. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 8: 71-76
- Ryder RA, SR Kerr, KH Loftus & HA Regier (1974) *The morphoedaphic index, a fish yield estimator - review and evaluation*. J. Fish. Res. Board. Can. 31: 663-688
- Saarnisto M (1986) *Annually laminated lake sediments*. En Berglund, BE (ed.) *Handbook of Holocene Palaeoecology and Palaeohydrology*. Wiley. Chichester: 343-370
- Sakshaug E, A Bricaud, Y Dandonneau, PG Falkowski, DA Kiefer, L Legendre, A Morel, J Parslow & M Takahashi (1997) *Parameters of photosynthesis: definitions, theory and interpretation of results*. J. Plankton Res. 19: 1637-1670
- Sanger JE & E Gorham (1972) *Stratigraphy of fossil pigments as a guide to the postglacial history of Kirchner marsh, Minnesota*. Limnol. Oceanogr. 15: 491-503
- Saville A (1978) *Métodos de reconocimiento para la evaluación de los recursos pesqueros*. FAO Doc. Tec. Pesca 171: 78 p.

- Schindler DW & B Noven (1971) *Vertical distributions and seasonal abundance of zooplankton in two shallow lakes of the Experimental Lakes Area, Northwestern Ontario*. J. Fish. Res. Board Can. 28: 245-256
- Schwarzbold A (1990) *Métodos ecológicos aplicados ao estudo do perifiton*. Acta Limnol. Brasil. 3: 545-592
- Schwoerbel J (1975) *Métodos de hidrobiología*. Blume. Madrid: 262 p.
- Sculthorpe C (1967) *The biology of aquatic vascular plants*. Arnold. London.
- Shechter H & N Gruener (1976) *An evaluation of the ion selective electrode method for determination of nitrate in highly mineralized drinking water*. Journal AWWA: 543-546
- Sherr EB & BF Sherr (1993) *Preservation and storage of samples for enumeration of heterotrophic protists*. En Kemp P et al. (eds.) Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis Publ. London: 207-212
- Sherr EB, AD Caron & BF Sherr (1993a) *Staining of heterotrophic protists for visualization via epifluorescence microscopy*. En Kemp P et al. (eds.) Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis Publ. London: 213-227
- Sherr EB, AD Caron & BF Sherr (1993b). *Protistan grazing rates via uptake of fluorescently labeled prey*. En Kemp P et al. (eds.) Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis Publ. London: 695-701
- Shibata N (1976) *Improvements in the determination of trace levels of ammonia with an ammonia electrode*. Anal. Chim. Acta. 83: 371-373
- Simola H (1977) *Diatom succession in the formation of annually laminated sediment in Lovojärvi, a small eutrophicated lake*. Ann. Bot. Fenn. 14: 143-148
- Smayda T (1978) *From phytoplankters to biomass*. En Sournia A (ed.) Phytoplankton manual. UNESCO. Paris: 273-279
- Smith AG, JR Pilcher & G Singh (1968) *A large capacity hand-operated peat sampler*. New Phytol. 67: 119-124
- Snoejis P, E Leskinen, K Sündback, M Kuylenstierna, A Witkowsky & G Hällfors (1990) *Microphytobenthic cell density and species composition in the surface sediment in a shallow brackish-water bay (Gulf of Finland)*. Aqua Fennica 20(1): 103-114
- Sohn IG (1961) *Techniques for preparation and study of fossil ostracods*. En R.C. Moore (ed.) Treatise on Invertebrate Paleontology, Part Q, Arthropoda 3. Geol. Soc. America and Univ. Kansas Press: 64-70
- Sohn IG, JM Berdan & RE Peck (1965) *Ostracods*. En Kummel B & D Raup (eds.), Handbook of Paleontological Techniques, Part I. W.H. Freeman and Com. San Francisco: 75-89
- Sommaruga R (1991) *Sediment oxygen demand in man-made Lake Ton-Ton (Uruguay)*. Hydrobiologia 215: 215-221
- Sommaruga R & D Conde (1990) *Distribución de materia orgánica en los sedimentos recientes de la Laguna de Rocha (Rocha, Uruguay)*. Atlántica 12 (1): 35-44
- Sommaruga R & D Conde (1997) *Seasonal variability of metabolically active bacterioplankton in the euphotic zone of a hypertrophic lake*. Aquat. Microb. Ecol. 13: 241-248
- Sommaruga R (1993) *The microbial food-web structure and dynamic in two lakes of different trophic state: Piburger See (Austria) and Lago Rodó (Uruguay)*. Thesis. Univ. Innsbruck: 110 p.
- Sommaruga R, D Conde & JA Casal (1995) *The role of fertilizers and detergents for eutrophication in Uruguay*. Fresenius Envir. Bull. 4: 111-116.
- Sommaruga R, D Crosa & N Mazzeo (1993) *Study of the decomposition of Pistia stratiotes L. (Araceae) in Cisne Reservoir, Uruguay*. Int. Revue ges. Hydrobiol. 78(2): 263-272

- Sousa RJ, FP Meyer & RA Schnick (1991) *Better fishing through management: How rotenone is used to help manage our fishery resources more effectively*. US Fish. Wild. Serv. Washington D.C.
- Sparre P & SC Venema (1992) *Introduction to tropical fish stock assessment*. FAO Fish. Tech. Paper 306.1 (1): 376 p.
- Stahl JB (1959) *The developmental history of the chironomid and Chaoborus fauna of Myers Lake*. Invest. Ind. Lakes Streams 5: 47-102
- Stahl JB (1969) *The uses of chironomids and other midges in interpreting lake histories*. Mitt. Int. Verein. Limnol. 17: 111-125
- Steedman HF (ed.) (1976) *Zooplankton Fixation and Preservation*. Monographs on Oceanographic Methodology 4. UNESCO. Paris: 341 p.
- Stemann-Nielsen E (1952) *The use of radioactive carbon (<sup>14</sup>C) for measuring organic production in the sea*. J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer. 18: 117-140
- Stefan H & DE Ford (1975) *Mixed layer depth and temperature dynamics in temperate lakes*. Verh. intern. Verein. Limnol. 19: 149-157
- Sternin VG, IV Nikonorov & YK Bumeister (1976) *Electrical fishing, theory and practice*. Halsted Press. N.Y.: 316 p.
- Stevenson AC, HJB Birks, RJ Flower & RW Battarabee (1989) *Diatom-based reconstruction of Lake Acidification Using Canonical Correspondance Analysis*. Ambio 18(4): 228-233
- Stevenson LH (1978). *A case for bacterial dormancy in aquatic systems*. Microb. Ecol. 4: 127-133
- Stevenson RJ (1996) *An introduction to algal ecology in freshwater benthic habitats*. En Stevenson RJ, ML Bothwell & RL Lowe (eds.). *Algal Ecology. Freshwater benthic ecosystems*. Academic Press. San Diego: 3-30
- Strickland J & TR Parsons (1972) *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Fish. Res. Bd. Can. Bull. 167: 310
- Sündback K & P Snoejis (1991) *Effects of nutrient enrichment on microalgal community composition in a coastal shallow-water sediment system: an experimental study*. Botanica Marina 34: 341-358
- Sündback K (1983) *Microphytobenthos on sand in shallow brackish water. Primary production. Chlorophyll a content and species composition (diatoms) in relation to some ecological factors*. Öresund, Sweden. PhD Thesis/Department of Marine Botany/Systematic Botany. Univ. Lund: 209 p.
- Suttle C (1993) *Enumeration and isolation of virus*. En Kemp P et al. (eds.) *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publ. London: 121-134
- Swain AM (1973) *A history of fire and vegetation in nirthwestern Minnesota as recorded in lake sediments*. Quat. Res. 3: 383-396
- Taft CE (1978) *A mounting medium for fresh-water plankton*. Trans. Am. Micros. Soc. 97: 263
- Tell G & V Conforti (1986) *Euglenophyta pigmentadas de la Argentina*. J.Cramer. Berlin-Stuttgart: 301 p.
- Thompson R (1973) *Palaeolimnology and palaeomagnetism*. Nature 242: 182-184
- Thorne RE (1989) *Hydroacoustics*. En Nielsen LA & DL Johnson (eds.) *Fisheries Techniques*. American Fish. Soc.: 468 p.
- Thronsen J (1978) *Centrifugation*. En Sournia A (ed.) *Phytoplankton manual*. UNESCO. Paris: 98-103
- Thurman EM (1985) *Organic geochemistry of natural waters*. Dordrecht. Nijhoff/Junk Publ. The Hague: 497 p.
- Tolonen K, A Siiriäinen & R Thompson (1975) *Prehistoric field erosion sediment in Lake Lojärvi, S. Finland and its palaeomagnetic dating*. Ann. Bot. Fenn. 12: 161-164

- Tolstoy A (1980) *Information on the standarization of pigment methodology in Nordic countries*. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 14: 81-87
- Troels Smith J (1955) *Karakterisering af løse jordater*. Danm. geol. Unders. Ser. IV 3(10): 73 p.
- Tuchman ML, EF Stoermer & HJ Carney (1984) *Effects of increased salinity on the diatom assemblage in Fonda Lake, Michigan*. Hydriobiologia 109: 179-188
- Tur N (1995) *Hydrophyta*. En Lopretto EC & G Tell (eds.) *Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio*. Sur. La Plata: 443-477
- Twenhofel WH & SA Tyler (1941) *Methods of study of sediments*. McGraw-Hill. N.Y.: 183 p.
- UNESCO (1968) *Zooplankton sampling*. Monographs on Oceanographic Methodology 2. UNESCO. Paris: 173 p.
- Uutala AJ (1990) *Chaoborus (Diptera: Chaoboridae) mandibles - paleolimnological indicators of the historical status of the fish populations in acid-sensitive lakes*. Journal of Paleolimnology 4: 139-151
- Valderrama JC (1981) *The simultaneous analysis of total Nitrogen and Total Phosphorus in natural waters*. Mar. Chem. 10: 109-122
- Valencio DA (1980) *El magnetismo de las rocas*. EUDEBA. Bs. As.: 351 p.
- Vélez C & N Maidana (1995) *Algae*. En Lopretto EC & G Tell (eds.) *Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio*. Sur. La Plata: 379-442
- Venrick E (1978) *Sampling desing*. En Sournia A (ed.) *Phytoplankton manual*. UNESCO. Paris: 7-16
- Venrick E (1995) *Muestreo y submuestreo del fitoplancton marino y dulceacuicola*. En Alveal K, M Ferrario, EC Oliveira & E Sar (eds.) *Manual de métodos ficológicos*. Univ. Concepción: 199-218
- Verity PG & M Sieracky (1993) *Use of color image analysis and epifluorescence microscopy to measure plankton biomass*. En Kemp P et al. (eds.) *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publ. London: 327-338
- Vertenheimer Mendes IL & J Olazarri (1983) *Primeros registros de Corbicula Megerle, 1811 (Bivalvia Corbiculidae) para el río Uruguay*. Bol. Soc. Zool. Uruguay 1: 50-53
- Vucetich MC & EC Lopretto (1995) *Rizópoda (Testáceos)*. En Lopretto EC & G Tell (eds.) *Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio*. Sur. La Plata: 541-555
- Wagner F, R Falkner & G Falkner (1995) *Information about previous phosphate fluctuations is stored via an adaptive response of the high-affinity phosphate uptake system of the cyanobacterium Anacystis nidulans*. Planta 197: 147-155
- Walker IR, SE Wilson & JP Smol (1995) *Chironomidae (Diptera) quantitative palaeosalinity indicators for lakes of western Canada*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 52: 950-960
- Ward HB & GC Whipple (1959) *Freshwater Biology*. Wiley. N.Y.: 1248
- Warren Wilson J (1963) *Estimation of foliage denseness and foliage angle by inclined point quadrats*. Aust. J. Bot. 11: 95-105
- Waters TF & GW Crawford (1973) *Annual production and drift of a stream mayfly population: a comparison of methods*. Limnol. Oceanogr. 18: 286-296
- Weaver JE & FE Clements (1938) *Plant Ecology*. McGraw-Hill. N.Y.
- Welch PS (1948) *Limnological Methods*. Blakiston. Philadelphia: 381 p.
- Wetzel R (1990) *Land-water interfaces: metabolic and limnological regulators*. Verh. intern. Verein. Limnol. 24: 6-24

- Wetzel RG (1983) *Limnology*. Saunders. N.Y.: 767 p.
- Wetzel R & GE Likens (1991) *Limnological analysis*. Springer-Verlag. N.Y.: 357 p.
- Whitney D & W Darley (1979) *A method for the determination of chlorophyll a in samples containing degradation products*. *Limnol. Oceanogr.* 24(1): 183-186
- Wiederholm T (ed.) (1983) *Chironomidae of the Holarctic Region. Keys and diagnoses. Part 1. Larvae*. *Ent. scand. Suppl.* 19: 1-457
- Wiegert R & F Evans (1964) *Primary production and the disappearance of dead vegetation in an old field in South-eastern Michigan*. *Ecology* 45: 49-63
- Wiegert R (1962) *The selection of an optimal quadrat size for sampling the standing crop of grasses and forbs*. *Ecology* 43: 125-129
- Williams PJ (1993) *On the definition of plankton production terms*. *IECS Mar. Sci. Symp.* 197: 9-19
- Williams R (1946) *The physiology of plant growth with special reference to the concept of net assimilation rate*. *Ann. Bot.* 10: 41-62
- Wright S & J Shearer (1984) *Rapid extraction and high performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton*. *J. Chromatogr.* 294: 281
- Yu K & P Berthouex (1977) *Evaluations of a nitrate-specific ion electrode*. *Journal WPCF*: 1896-1901
- Zamponi MO (1995) *Cnidaria*. En Lopretto EC & G Tell (1995) *Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio*. Sur. La Plata: 603-617
- Zimmermann RR, R Iturriaga & J Becker-Birck (1978) *Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration*. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 926-935
- ZoBell CE (1946) *Studies on redox potential of marine sediments*. *Bull. Am. Assoc. Petrol. Geologists.* 30: 477-513
- Zucol A (1995) *Microfitolitos: II. Análisis de las clasificaciones*. *Ameghiniana* 32 (3): 243-248

**Si bien en Uruguay los recursos de agua dulce son relativamente abundantes y están bien distribuidos, el aumento de su consumo y deterioro a nivel mundial ha alertado a investigadores y autoridades acerca de la necesidad de su conservación. Para este objetivo resulta indispensable comprender el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos naturales sobre bases científicas ciertas, tarea objeto de la Limnología.**

**La diversidad de enfoques que admite la Ecología, y en particular la acuática, hace que estudiantes e investigadores con diferente formación e intereses precisen de una guía de métodos frecuentes en la disciplina. Responsables del manejo y control de los cuerpos de agua, organizaciones no gubernamentales y grupos sociales interesados en conocer y preservar el medio acuático, encontrarán en este libro la información necesaria para abordar el tema. De manera sistemática se explican y detallan técnicas de campo y laboratorio que permiten conocer los aspectos físicos y químicos de lagos y ríos, analizar las diversas comunidades de organismos y su relación con el medio.**

**Los autores son investigadores de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, y exponen aquí sus métodos de investigación, aportando además resultados de trabajos efectuados en ambientes acuáticos de Uruguay. RAFAEL AROCENA y DANIEL CONDE, autores de varios capítulos además de editores de este libro, son biólogos formados en la Facultad de Ciencias y en la actualidad están a cargo de la dirección de la Sección Limnología de dicha institución.**