

**Curso LIMNOLOGÍA Y OCEANOGRAFÍA 2018**  
**Licenciatura en Gestión Ambiental**

**MÓDULO 4- EUTROFIZACIÓN**  
Actividad práctica

Docentes: Carolina Lescano, Gissell Lacerot

**Objetivo:** Evaluar el estado trófico del Arroyo de Rocha (Departamento de Rocha) mediante el uso de diversos indicadores ambientales, y discutirlo en el contexto del Decreto 253/079 sobre contaminación de aguas.

**Práctico 1. Salida de campo**

**Viernes 19 de octubre** . Punto de reunión y horario a coordinar con los estudiantes. Se visitarán tres sitios de muestreo (Figura 1):

Sitio 1. Paso de la Cruz (Toma de OSE) (PC)

Sitio 2. Parque La Estiva (Zona de Baño dentro de la ciudad) (PE)

Sitio 3. Paso Real (Puente el Hipódromo, Zona de baño) (PR)

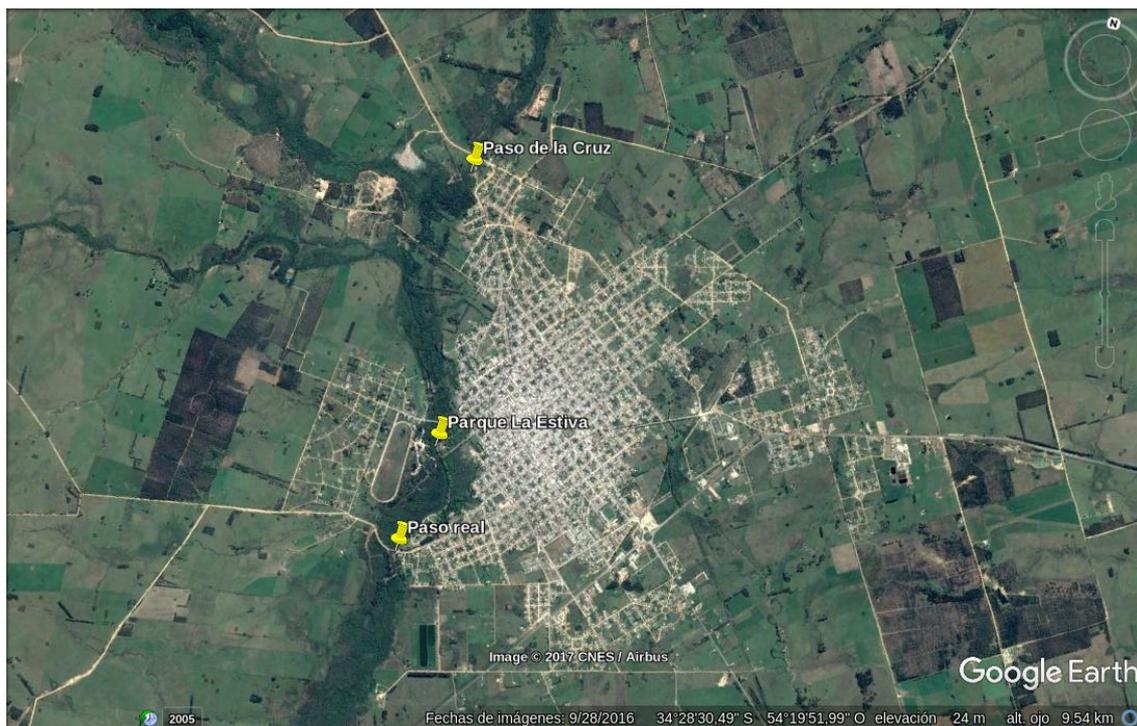


Figura 1. Mapa de la ciudad de Rocha, indicando los sitios de muestreo a lo largo del Arroyo Rocha.

Cada sitio contará con una planilla de muestreo que será preparada por los estudiantes en el teórico previo a la salida. A cada estación de muestreo se le asignará un código.

## Actividades

1. Registrar las coordenadas del sitio con un GPS, así como la hora y datos del tiempo.
2. Identificar posibles entradas puntuales y difusas de nutrientes u otros contaminantes durante el muestreo.
3. Medir en el agua las variables físico-químicas con multiparámetro HORIBA: Oxígeno disuelto (mg/l), saturación oxígeno (%), Temperatura (°C), pH, Conductividad (mS cm<sup>-1</sup>). Medir turbidez/transparencia (m) con un Disco de Secchi. Registrar valores en la planilla.
4. Colectar muestras superficiales de agua para la estimación en el laboratorio de clorofila-a y fosfato (ver Práctico 2 abajo). Mantener en frío.
5. En el laboratorio, filtrar agua para posterior análisis de clorofila-a y fosfato (ver Práctico 2 abajo).

## Materiales

**Importante: utilizar calzado y ropa adecuado para el muestreo (ej: calzado impermeable o muda, campera impermeable, dependiendo del día de muestreo sombrero, bloqueador solar, abrigo)**

### Equipos

Sensor multiparámetro Horiba

GPS

Disco Secchi

### Materiales

Planillas y lápices

Botellas rotuladas para colecta agua

Heladera (con gel frío)

## **Práctico 2. Laboratorio. Estimación de la clorofila-a, fosfato y cálculo del índice de estado trófico**

**Martes 23 de octubre 11 hrs. Laboratorio 1, fase 2.**

### **Estimación de clorofila-a**

La clorofila es un pigmento fotosintético presente en organismos vegetales cuya función principal es la de captar la radiación solar y realizar el proceso de fotosíntesis con liberación de oxígeno. Existen 3 tipos de clorofilas, a, b y c siendo la más común y abundante la clorofila-a. La concentración de clorofila-a se utiliza en ambientes acuáticos como un indicador de la biomasa de fitoplancton y puede ser cuantificado mediante métodos directos: fluorimetría de células vivas (fluorimetría *in vivo*) o mediante métodos indirectos como la extracción del pigmento en algún solvente y su posterior lectura mediante espectrofotometría o fluorimetría. Durante la extracción el pigmento no sufre cambios químicos. En este práctico se utilizará el método indirecto por espectrofotometría, y como solvente el etanol 96°.

Colecta de muestras (durante Práctico 1, el viernes 19 de octubre): se colectarán muestras de agua en botellas de un litro, una por cada estación de muestreo (normalmente se toman al menos 3 réplicas por estación). Cada bidón deberá estar limpio y bien enjuagado, con

su código correspondiente y una vez se colecte el agua, los recipientes deberán ser mantenidos a la sombra y preferentemente en frío, hasta su llegada al laboratorio.

Su análisis en laboratorio cuenta de dos etapas:

Etapa 1 Filtración (durante Práctico 1, el Viernes 19 de octubre). Reducir la luz al mínimo, ya que la clorofila se degrada fácilmente por exposición a la misma. Homogeneizar la muestra, y filtrar el agua a través de un sistema de filtración con un filtro de fibra de vidrio GF/F (retiene partículas mayores a  $0.7 \mu\text{m}$ ), hasta que se colmate el filtro (300-1000 ml, dependiendo del origen de la muestra). Registrar el volumen filtrado. Una vez finalizada la filtración se retira el filtro con cuidado, se dobla a la mitad (el material retenido queda hacia adentro) y se lo envuelve en un sobre de papel aluminio el cual será identificado con la fecha y el código de la estación. Los filtros se almacenan en freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Estas muestras pueden almacenarse por un período no mayor a dos meses.

Para la extracción se coloca cada filtro en un tubo con tapa conteniendo 7 ml de etanol  $96^{\circ}$ . Asegurarse que el filtro quede sumergido por completo en el etanol y el tubo bien cerrado. Los tubos se conservan en oscuridad y en heladera durante 24 horas, hasta la lectura del extracto en espectrofotómetro.

Etapa 2 Medición de clorofila-a por espectrofotometría (Práctico 2 el Martes 23 de octubre). (técnica de Jaspersen & Christoffersen, 1987).

Paso 1. Usar una cubeta con etanol  $96^{\circ}$ , como blanco para el espectrofotómetro, de manera de ajustar el equipo a un valor de lectura “cero”.

Paso 2. Filtrar por filtro GF/C el contenido del tubo guardado en el práctico anterior (el que contenía el filtro con el pigmento fotosintético y 7 ml de etanol  $96^{\circ}$ ). Colocar en la cubeta y medir. Para cada muestra se realizarán 2 medidas en el espectrofotómetro a 665 y 750 nm, antes y después del agregado de HCl (ver paso 3). Las medidas a 750 nm se usan para quitar el efecto que pueda estar agregando la turbidez de la muestra a la señal medida. Registrar las medidas en la planilla.

Paso 3. Lectura de feopigmentos. La clorofila se degrada y sus productos de degradación denominados feopigmentos pueden representar una fracción importante del total de pigmentos de la muestra. Estos feopigmentos presentan máximos de absorbancia de luz a las mismas longitudes de onda de la clorofila activa, por lo que no es posible discriminar el aporte de clorofila-a y de sus productos de degradación. Una alternativa es transformar la clorofila-a en feopigmentos mediante acidificación con ácido clorhídrico y luego establecer cuánto de la muestra original contenía clorofila viva y cuánto correspondía a feopigmentos. Para ello una vez realizada la lectura inicial (lectura antes acidificación) se le agrega a la misma muestra 50 -100  $\mu\text{l}$  de HCl 0.12 N, se agita y luego de 3 minutos se vuelve a leer a 665 y 750nm (lectura después de acidificación). Se registran los nuevos valores.

Relación ácida: 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 muestra natural esta relación debe ser menor o igual a 1.7. Este índice se utiliza además como indicador de que la extracción ha sido llevada a cabo correctamente.

Relación ácida:  $(\text{Abs}_{665} - \text{Abs}_{750}) / (\text{Abs}_{665\text{ácida}} - \text{Abs}_{750\text{ácida}})$

$$[\text{Clo } a] = 29,1 [(Abs_{665} - Abs_{750}) - (Abs_{665\acute{a}c} - Abs_{750\acute{a}c})] (v/V) d$$

Clo a en unidades de  $\mu\text{g/l}$

v= volumen del extracto (ml)

V= volumen filtrado (l)

d= largo de la cubeta (cm)

el factor 29,1 incluye el coeficiente de absorción específico de la clorofila a en etanol 96

### Estimación de fósforo reactivo soluble (PRS)

Colecta de muestras (durante Práctico 1, viernes 19 de octubre): se coleccionarán muestras de agua en botellas de 250 ml, una por cada estación de muestreo. Cada frasco deberá estar limpio, bien enjuagado y rotulado con su código correspondiente. Los recipientes deberán ser almacenados en frío hasta su llegada al laboratorio.

Procesamiento de las muestras (durante Práctico 1, viernes 19 de octubre): Filtrar la muestra de agua utilizando filtros GF/C que retiene partículas mayores a 1.2  $\mu\text{m}$ . Almacenar la muestra en freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

Procesamiento de las muestras (durante Práctico 2, Martes 23 de octubre). La determinación de fósforo reactivo soluble se realizará mediante el Método de Murphy & Riley (1962). Aclaración: se mide como fósforo reactivo soluble y esta medida se corresponde con la de fosfato.

Paso 1. Preparar reactivo mixto. Para preparar 10 ml de reactivo mixto colocar en un matraz los reactivos en el siguiente orden:

Reactivos	Volumen (ml)
Molibdato de amonio	2.0
Ácido sulfúrico	5.0
Ácido ascórbico	2.0
Tartrato de antimonio y potasio	1.0

Paso 2. Colocar 10 ml de agua mQ en 1 tubo de vidrio y rotular como blanco

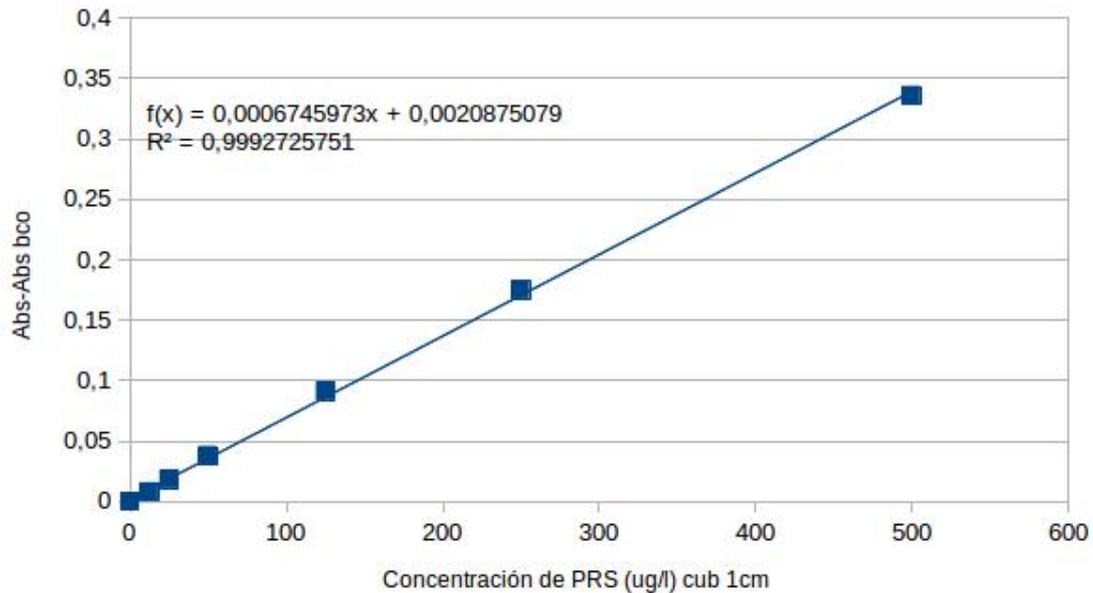
Paso 3. Colocar 10 ml de la muestra filtrada con filtro GF/C en un tubo de vidrio rotulado

Paso 4. Agregar 1 ml de reactivo mixto a todos los tubos y agitar. Dejar reaccionar durante 30 minutos.

Paso 5. Medir la absorbancia en espectrofotómetro a 885 nm de longitud de onda. Registrar en la planilla

Paso 6. Calcular la concentración de fosfato usando la curva de calibración.

Para la construcción de la curva de calibración se preparan soluciones de concentración conocida de PRS a las que se les mide la absorbancia. A cada valor de concentración le corresponde un valor de absorbancia, con los que se construye una recta. Posteriormente la función que describe a esa recta se utiliza para calcular la concentración de PRS en muestras de agua de concentración desconocida.



La función es  $y_{(x)}=ax+b$ , siendo  $y_{(x)}$  la absorbancia, x la concentración de PRS  
 Cuando tenemos un valor de absorbancia (en una muestra nueva) y queremos hallar la concentración:

$$x = (y_{(x)} - b) / a = [(abs - abs\ bco) - b] / a = \text{concentración PRS}$$

## Materiales

### Equipos

Bomba de vacío  
 Set de filtración  
 Pipetas automáticas  
 Espectrofotómetro

Filtros GF/F y GF/C

Papel aluminio  
 Tubos de extracción  
 Tubos de ensayo

Gradilla

Pinza plana

Rotuladores

Etanol 96%

Ácido Clorhídrico 0,12 N

Tips para pipetas de 10 ml y 1 ml

Agua mQ

Toallas de papel

Planillas y lápices

Soluciones para el reactivo mixto: ácido sulfúrico, ácido ascórbico, molibdato de amonio y tartrato de antimonio y potasio.

## Índice de Estado Trófico de Carlson, TSI (1977)

Es un indicador de la productividad biológica del sistema, permite clasificar a los sistemas según su estado trófico. Puede variar entre 0 (ambiente oligotrófico) y 100 (ambiente hipereutrófico). Se obtiene a partir de una transformación de la transparencia del disco de Secchi (DS), tal que un valor de índice TSI= 0 corresponda a una profundidad del disco de DS=64 m (la máx. observada). Carlson, 1977 observó que cuando se duplicaba la cantidad de clorofila-*a* el DS se reducía a la mitad (Tabla 1). Este índice puede determinarse también a partir de otros parámetros, tales como la concentración de clorofila y fósforo total en superficie, cuya relación con la transparencia se ha calculado previamente. Las fórmulas que figuran a continuación resultan de una modificación realizada por Aizaki et al (1981) a la propuesta por Carlson (1977).

$$TSI_{DS}(\text{basado en Disco de Secchi}) = 10 * (2,46 + 3,76 - 1,57 \ln DS) / \ln 2,5$$

$$TSI_{Clo}(\text{basado en Clorofila-a}) = 10 * (2,46 + \ln Clo) / \ln 2,5$$

Nota: las unidades del DS están dadas en metros, las de clorofila-*a* y feopigmentos en mg m<sup>-3</sup>

**Tabla 1:** Ejemplos de valores medidos de transparencia, fósforo y clorofila correspondientes a un valor puntual de TSI obtenido.

TSI	Disco de Secchi (m)	Fósforo en superficie (mg/m <sup>3</sup> )	Clorofila en superficie (mg/m <sup>3</sup> )
0	64	0.75	0.04
10	32	1.5	0.12
20	16	3	0.34
30	8	6	0.94
40	4	12	2.6
50	2	24	6.4
60	1	48	20
70	0.5	96	56
80	0.25	192	154
90	0.12	384	427
100	0.062	768	1183

De acuerdo a los valores que alcanzan el TSI podemos diferenciar cuatro categorías: Oligotrófico (TSI < 30), Mesotrófico (TSI > 30 - < 60), Eutrófico (TSI > 60 - < 90) e Hipereutrófico (TSI > 90)

### Práctico 3. Análisis y discusión de datos.

**Viernes 26 de octubre. Sala pc**

**Atención!. Los estudiantes deberán traer los cálculos necesarios para obtener las variables que serán discutidas (detalladas en el Práctico 2), y haber leído el Decreto 253/079 sobre contaminación de aguas.**

Decreto 253/79. Decreto reglamentario del Código de aguas de 1978. Disponible en: <http://www.impo.com.uy/bases/decretos/253-1979>

Durante el práctico realizaremos una tabla resumen de todos los resultados y las gráficas correspondientes.

#### **Variables que serán discutidas:**

**Oxígeno Disuelto:** El oxígeno disuelto es un indicador de la carga orgánica al sistema, siendo utilizado en las determinaciones de producción primaria. Su concentración depende de variables físicas (presión, temperatura y concentración salina) y de factores biológicos (producción primaria, respiración, 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 (mayor al 100%). Altas cargas de materia orgánica resultan en valores bajos de oxígeno, hipoxia (0.5-2 mg/l) o incluso anoxia (ausencia de oxígeno). En su determinación se utilizan sensores selectivos (este práctico) o métodos químicos (ej. método Winkler, demanda biológica de oxígeno).

**Transparencia/Turbidez:** La transparencia se puede estimar mediante sensores que detectan la atenuación de la luz (turbidímetro, Unidades Nefelométricas de turbidez, NTU por sus siglas en inglés) o mediante un estimador manual como el disco de Secchi (DS). En esta salida emplearemos el DS, para el cálculo del TSI y la medida de la turbidez en NTU así como pH y OD (empleando el multiparámetro) para comparar con los límites permitidos según el decreto 253/79 (adjunto) que clasifica las aguas en Uruguay según su uso. En este caso, clase 1 y 2, para abastecimiento de agua potable y recreación, respectivamente. El Disco de Secchi es un dispositivo muy simple largamente empleado para evaluar el ambiente lumínico mediante la estimación de la transparencia del agua. Este dispositivo consta de un disco normalmente de 20 cm de diámetro dividido en cuatro cuadrantes pintados en forma alternada de blanco y negro. Este disco se adosa en su centro a una cuerda graduada (marcas que permiten estimar la profundidad, generalmente cada 20 cm). El disco se sumerge preferentemente al mediodía y desde una embarcación del lado sombreado de la misma y hasta que deja de ser visible, registrando la profundidad a la que esto ocurre. 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 según el tipo de ambiente entre 0.1 m y 40 m.

**Clorofila-a:** la clorofila-a es el pigmento común a todos los organismos que realizan fotosíntesis con liberación de oxígeno, desde las cianobacterias a las plantas superiores. La medida de clorofila-a en agua se considera un indicador global de biomasa de fitoplancton presente en la muestra. En general, valores de clorofila-a menores a 4 ó 5

$\mu\text{g/l}$  son característicos de sistemas oligotróficos, mientras que ecosistemas hipereutróficos se encuentran en valores mayores a  $100 \mu\text{g/l}$  (Bonilla et al, 2016).

**Fósforo:** el fósforo está presente en aguas naturales principalmente en forma particulada, aunque una fracción menor se encuentra en forma disuelta. Juega un rol fundamental desde el punto de vista estructural (membrana fosfolipídica y ácidos nucleicos) y metabólico (acumulación de energía, por ej. ATP). La forma de fósforo utilizable por los productores primarios es la disuelta, como fosfato. La baja disponibilidad de fosfato en relación a la demanda de los productores primarios hace que este sea el nutriente limitante en muchos sistemas.

El aumento de fósforo en los sistemas acuáticos se relaciona principalmente con el uso de fertilizantes, así como la llegada de efluentes domésticos, industriales y pecuarios al sistema. Otra fuente de fósforo es la proveniente de los sedimentos. Esta reserva puede ser liberada a la columna de agua como fosfato cuando los niveles de oxígeno del hipolimnion disminuyen. Este aumento de los niveles de fósforo se puede traducir en el crecimiento rápido y masivo de algas y cianobacterias potencialmente tóxicas (Aubriot et al, 2016; Conde, 2009).

### **Índice de estado trófico (ver Práctico 2)**

**Nota: accesoriamente se utilizará una base de datos histórica del arroyo de Rocha, para complementar la discusión.**

### **Bibliografía**

Aizaki, M. Otsuki, O. Fukushima, M. Hosomi, M. & Muraoka. (1981) Application of Carlson's trophic state index to Japanese lakes and relationships between the index and other parameters. *Verh. Internat. Verein Limnol.* 21:675-681.

Aubriot, L., Conde, D., Chalar, G. & Gorga, J. (2016) Nutrientes. En: Principios y métodos de Limnología. Ejemplos de Uruguay. Rafael Arocena (Editor). DIRAC Facultad de Ciencias

Bonilla, S., De León, L. & Fabre, A. (2016) Fitoplancton. En: Principios y métodos de Limnología. Ejemplos de Uruguay. Rafael Arocena (Editor). DIRAC Facultad de Ciencias

Carlson, R.E. (1977) A trophic state index for lakes. *Limnol. Oceanogr.* 22: 361-369.

Conde (2009) Eutrofización, cambio climático y cianobacterias. En: UNESCO. Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión. Sylvia Bonilla (editora). Documento Técnico PHI-LAC, N° 16

Jespersen, A.M. & Christoffersen, K. (1987) Measurements of chlorophyll-a from phytoplankton using ethanol as extraction solvent. *Archiv für Hydrobiologie*, 109, 445-454.

Murphy, J. & Riley, J.P. (1962) A modified single method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27: 31-36.