

PRINCIPIOS Y MÉTODOS DE LIMNOLOGÍA

ejemplos de **URUGUAY**

Editor
Rafael Arocena



PRINCIPIOS Y MÉTODOS DE LIMNOLOGÍA

EJEMPLOS DE URUGUAY



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

PRINCIPIOS Y MÉTODOS DE LIMNOLOGÍA

EJEMPLOS DE URUGUAY

EDITADO POR
RAFAEL AROCENA

SECCIÓN LIMNOLOGÍA
INSTITUTO DE ECOLOGÍA Y CIENCIAS AMBIENTALES
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

DIRAC
MONTEVIDEO – URUGUAY
2016

Principios y métodos de limnología: ejemplos de Uruguay / Rafael Arocena, editor – Montevideo : DIRAC, 2016.

328 p. : il., cuadros, fotos.
ISBN: 978-9974-0-1351-3

1. LIMNOLOGÍA 2. AGUAS CONTINENTALES 3. CALIDAD DEL AGUA 4. ECOLOGÍA 5. PALEOLIMNOLOGÍA 6. FITOPLANCTON 7. ZOOPLANCTON 8. PROTECCIÓN DEL MEDIO AMBIENTE

I. Arocena, Rafael, editor

CDU 504.4(899)

Este libro es una segunda edición corregida, aumentada y actualizada de *Métodos en ecología de aguas continentales: con ejemplos de limnología en Uruguay*, por R. Arocena y D. Conde (eds.), DIRAC, Facultad de Ciencias, Udelar, Montevideo, 1999.

Los conceptos vertidos en los libros editados por la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República son de responsabilidad de sus autores. Su publicación no implica que sean compartidos por las mencionadas instituciones.

Edición y puesta en página: Gabriel Santoro

Diseño de tapa: Alejandro Crosa

Foto de tapa: arroyo Canelón Grande a la altura de ruta 6, Paso de los Difuntos, Canelones, Uruguay.

Publicado por DIRAC – Facultad de Ciencias – Universidad de la República

Iguá 4225 – Montevideo 11400 – Uruguay

Tel.: (+598) 2525.1711 – Fax (+598) 2525.8617

E-mail: dirac@fcien.edu.uy

© 1a ed.: DIRAC, Facultad de Ciencias, Udelar, 1999.

© 2a ed. corregida, aumentada y actualizada: DIRAC, Facultad de Ciencias, Udelar, 2016.



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

CONTENIDO

	<i>Prólogo a la 1ª edición</i>	7
	<i>Introducción a la 1ª edición</i>	9
	<i>Breve introducción histórica</i>	11
Capítulo 1	<i>Investigación en limnología</i> por Rafael Arocena	15
Capítulo 2	<i>Forma y tamaño</i> por Rafael Arocena	31
Capítulo 3	<i>Luz y calor</i> por Rafael Arocena	41
Capítulo 4	<i>Movimiento</i> por Rafael Arocena	51
Capítulo 5	<i>Sedimentos</i> por Rafael Arocena	59
Capítulo 6	<i>Macroconstituyentes</i> por Daniel Conde y Javier Gorga	73
Capítulo 7	<i>Nutrientes</i> por Luis Aubriot, Daniel Conde, Guillermo Chalar y Javier Gorga	95
Capítulo 8	<i>Comunidad microbiana</i> por Claudia Piccini y Daniel Conde	117
Capítulo 9	<i>Fitoplancton</i> por Sylvia Bonilla, Lizet de León y Amelia Fabre	129
Capítulo 10	<i>Algas y cianobacterias del perifiton</i> por Sylvia Bonilla y Daniel Conde	169
Capítulo 11	<i>Hidrófitas</i> por Néstor Mazzeo	185
Capítulo 12	<i>Zooplancton</i> por Daniel Fabián	219
Capítulo 13	<i>Zoobentos</i> por Rafael Arocena	239
Capítulo 14	<i>Peces</i> por Flavio Scasso y Federico Quintans	259
Capítulo 15	<i>Paleolimnología</i> por Dermot Antoniades y Gloria Daners	271
	<i>Referencias bibliográficas</i>	287
	<i>Los autores</i>	323

PRÓLOGO A LA 1ª EDICIÓN

LA LIMNOLOGÍA ES UNA DISCIPLINA CIENTÍFICA DE RECIENTE DESARROLLO en Uruguay. Sin embargo, sus raíces pueden encontrarse ya a comienzo del siglo. Las investigaciones sobre organismos de agua dulce realizadas por el Dr. Ricardo Thomsen, ocupan un papel destacado. Este científico establece en 1924 colaboración con zoólogos y limnólogos europeos, principalmente de Austria y Alemania. Como resultado de esa colaboración, Brehm publica en 1929 el primer trabajo sobre investigaciones hidrobiológicas realizadas en Uruguay, en la revista de más larga trayectoria en limnología: *Archiv für Hydrobiologie*.

A pesar de la importancia que los ecosistemas acuáticos de agua dulce y salobre tienen en Uruguay, el establecimiento de la limnología como rama de la ecología que estudia las características físicas y químicas del agua, la biota, así como las interacciones entre estos componentes, es más reciente. En 1984 se crea en la Facultad de Humanidades y Ciencias el Departamento de Limnología, dirigido desde sus comienzos por el recientemente fallecido Lic. Wilson Pintos, quien introduce un enfoque ecológico a las investigaciones. En sus pocos años de formación, este centro académico ha logrado ocupar un importante rol en la investigación, enseñanza y difusión de la limnología en Uruguay.

Tengo el agrado de introducir esta primera edición del libro *Métodos en ecología de aguas continentales*, el cual, con sus 233 páginas, presenta no solo detallados protocolos experimentales y de laboratorio, sino también ejemplos con datos obtenidos en estudios realizados en ecosistemas acuáticos de Uruguay. En particular quisiera destacar la profesionalidad con la cual los editores así como los diversos autores organizaron los respectivos capítulos, logrando una visión global que incluye no solo métodos tradicionales utilizados en limnología sino también actuales.

Es mi deseo que este manual de métodos ayude a futuras generaciones de limnólogos a obtener un mejor entendimiento del funcionamiento de los ecosistemas acuáticos de agua dulce, y de esta forma ayudar a su preservación.

A. Univ. Prof. Dr. Ruben Sommaruga
Innsbruck, junio 1999

INTRODUCCIÓN A LA 1ª EDICIÓN

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 térmica, radiactiva, 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 del impacto antrópico, el mantenimiento de los usos múltiples y la restauración de 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 Prácticos 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 solo 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.

Todos los capítulos se inician con una breve introducción que incluye la definición, explicación e importancia del tema. Sigue una organización jerárquica, en la que en general los subcapítulos corresponden a diferentes parámetros o grupos de parámetros similares. Cada 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
1999

* (se refiere a la numeración de los capítulos de la primera edición de 1999)

BREVE INTRODUCCIÓN HISTÓRICA

LA REVOLUCIÓN CIENTÍFICA DEL SIGLO XVII, LIDERADA POR LA FÍSICA Y DE carácter mecanicista, tomó el camino de la experimentación cuantitativa que enseñara Galileo (1564-1642) y el análisis de las partes como sugería Descartes (1596-1650). En cambio, la historia natural del siglo XVIII, liderada por Linneo (1707-1778), Buffon (1707-1788), Lamarck (1744-1829) y Humboldt (1769-1859), tenía un enfoque más descriptivo, cualitativo e integral (McIntosh 1987).

El término “biología” –del griego βίος (*bíos*: vida) y λόγος (*lógos*: estudio o tratado)– fue propuesto y definido en 1802 por Lamarck, considerado por ello el padre fundador de esta ciencia por algunos. Botánico y zoólogo, fue el primero en postular ideas sobre la evolución. Por su parte, el zoólogo alemán Haeckel (1834-1919) fue el primero en publicar en 1866 el término “ecología” –del griego οἶκος (*oíkos*: casa o habitación) y λόγος (*lógos*: estudio o tratado)–. Si bien Haeckel la consideraba una rama de la fisiología, otros a principios del siglo XX la consideraron como la nueva historia natural (McIntosh 1987).

La ecología nace de la confluencia a fines del siglo XIX de la historia natural, renovada por la teoría de la evolución de Darwin (1809-1882), y de la fisiología impulsada por Pasteur (1822-1895). Un poco esquemáticamente, habría dos visiones extremas de la ecología herederas de sus dos orígenes: 1) analítica, basada en estudios de laboratorio, de partes y procesos de los organismos, buscando datos con precisión y 2) holística, que estudia todo el organismo en su medio natural, buscando amplias regularidades a través de modelos apropiados para abordar sistemas complejos. En el primer caso se tiende al reduccionismo (separación de sistemas complejos en otros más simples). En el segundo, a las grandes descripciones y pocas leyes.

Esta dicotomía se plantea en forma explícita en la historia de la ecología, pero está presente en toda la biología así como en sus instituciones. En ecología, la observación desempeña un rol más importante que la experimentación. El estudio de las relaciones de los seres vivos entre sí y con el medio no puede realizarse plenamente en el laboratorio debido a la dificultad de reproducir las condiciones ambientales, una de las razones que explican el lento y tardío desarrollo de la disciplina. La ecología como disciplina se enfrenta a la dificultad de generalizar y extrapolar sus resultados en escalas espaciales y temporales amplias y dificultad de hacer predicciones a largo plazo. Los criterios convencionales de la ciencia, delineados por filósofos y físicos, han sido difíciles de aplicar a los fenómenos ecológicos (McIntosh 1987).

La limnología –del griego λίμνη (*limnē*: laguna) y λόγος (*lógos*: estudio o tratado)– habría nacido en 1892, cuando el biólogo suizo François Alphonse Forel (1841-1912) publica “*Le Léman: Monographie Limnologique*”. Es una época influenciada por el evolucionismo y la ecología, en la que se sintetiza el conocimiento previo de los cuerpos de agua aportado por la hidrobiología. Forel, en el primer manual de limnología de 1901, la define como la ciencia hermana de la oceanografía que describe observaciones y teorías de los lagos en general. Además de acuñar el nombre, Forel cambió el enfoque de hidrobiología a ecología, pasando a considerar el lago como un todo (Esteves 2011). Él veía los lagos como sistemas cerrados, los micro-

cosmos que nombraba Forbes en 1887. Con ello implicaban la necesidad de conocer el todo para poder entender cualquiera de sus partes, 60 años antes que lo dijera von Bertalanffy (1901-1972) en su Teoría general de sistemas.

Durante la primera mitad del siglo XX la limnología tuvo un carácter predominantemente descriptivo, dominada por la clasificación de los lagos según su estado trófico (Margalef 1983). Naumann en Suecia y Thienemann en Alemania lideraron estos estudios. Ambos fundaron la Sociedad Internacional de Limnología (SIL), que en su primer congreso en 1922 definió a la disciplina como el estudio de todas las aguas dulces (*freshwaters*), interiores (*binnengewasser*) o epicontinentales. Aunque incluía a las aguas corrientes (potamología), recién en la década del 70 los ríos adquirieron importancia en los congresos de la SIL y se realizaron las primeras reuniones y publicaciones sobre ríos (Hynes 1970; Oglesby *et al.* 1972; Whitton 1975).

A mediados del siglo pasado sobresale la figura de Hutchinson (1903-1991), tanto en limnología como en ecología general. Hutchinson sostenía que la competencia por recursos para la investigación favorecería el aislacionismo de pequeños grupos endogámicos, y que el todo es mucho más fuerte y fecundo que las pequeñas piezas aisladas. También fue de los primeros en resaltar la importancia de las contribuciones interdisciplinarias, las que deben sustentarse tanto en una formación amplia como mediante el trabajo conjunto de distintos especialistas.

En la segunda mitad del siglo pasado la limnología adquiere un carácter más experimental y universal (Esteves 2011), atendiendo al funcionamiento de todo el ecosistema y de las interacciones entre las distintas comunidades. Ante la necesidad de estandarizar la diversidad de métodos que dificultaba la comparación de resultados, surge el Programa Internacional de Biología (IBP, por su sigla en inglés) que publica varios manuales de métodos de investigación (entre otros Edmondson & Winberg 1971; Golterman *et al.* 1978; Downing & Rigler 1984). Esta especialización a su vez requiere del trabajo interdisciplinario para sintetizar los aportes de las diversas ciencias.

La limnología tuvo un rápido desarrollo en las últimas décadas del siglo pasado. Según Margalef (1994), fue debido más a las demandas sociales para resolver los problemas con el agua, y gracias a los fondos disponibles para ello, que por los avances científicos obtenidos. Como el resto de la ecología, la limnología cobró notoriedad con la crisis ambiental de los 60, pero también generó confusión al pretender resolver los problemas de la ecología global. Se le exigió que incluyera al hombre en sus problemas sin tener bases para ello, y también se la confundió con ecologismo.

Aunque el enfoque actual incorpora más experimentación, la observación y registro de datos de campo es aún importante para generar y probar hipótesis y monitorear el ambiente. Pero ya no se trata de reunir tantos datos de campo como sea posible, sino de hacerlo de modo sistemático, riguroso y eficiente, con objetivos e hipótesis claramente definidos que guíen la forma de tomar los datos.

La limnología en Sudamérica, donde hay menos lagos que en el hemisferio norte pero muchos ríos, embalses y lagunas costeras, comenzó con los expedicionarios europeos de la época colonial. Tanto en Brasil (Esteves 2011) como en Argentina (López & Mariazzi 1994) la limnología se desarrolló de la mano de la piscicultura en las primeras décadas del siglo XX. En 1982 se crea la Sociedad Brasileira de Limnología y en 1984 la Asociación Argentina de Limnología, cuyos congresos recibieron varias comunicaciones de limnólogos uruguayos.

En Uruguay los precursores de la limnología fueron Ergasto Cordero (1890-1951) y Ricardo Thomsen (1878-1963), miembro de la Sociedad Internacional de Limnología desde sus inicios, ambos estudiosos de los protistas a partir de los años 20. Fernando de Buen (1895-1962), exiliado de la guerra civil española, trabajó en los ríos Uruguay y Negro y destacó en 1949 la importancia de la limnología y la oceanografía en el país (Conde & Sommaruga 1999).

En los años 70 se crea el Departamento de Ecología y en 1984 el de Limnología, ambos en la ex Facultad de Humanidades y Ciencias de la Universidad de la República. Las primeras investigaciones refieren a temas de calidad de agua en los ríos Uruguay (Pintos *et al.* 1993) y Santa Lucía (Méndez *et al.* 1988) y el arroyo Toledo-Carrasco (Arocena & Chalar 1989). Otras refieren a eutrofización en distintos sistemas lénticos como las represas del río Negro y Salto Grande (Chalar & Conde 2000), las lagunas costeras del este (Sommaruga & Conde 1990; Pintos *et al.* 1991), los lagos Ton-Ton (Fabián & Schinca 1990) y Rodó (Sommaruga & Conde 1997), vinculando en general aspectos básicos y aplicados.

A partir de la reinstalación de la democracia en 1985, se recuperaron y crearon en Uruguay varias instituciones que alentaron el regreso de numerosos científicos. Muchos de ellos, emparentados con disciplinas experimentales, vinieron a actualizar y enriquecer la visión más descriptiva, predominante entonces en la biología nacional. Sin embargo, junto con sus valiosos aportes –impulsando la búsqueda de financiación de proyectos y la publicación internacional de resultados–, impusieron conceptos tan discutibles y elitistas como el de la “excelencia”, término con alta carga de individualismo y competencia. Relacionado con esto vino el criterio del número de “*papers*” como valor casi absoluto y excluyente para evaluar la actividad de los investigadores. Si bien esa era una carencia a corregir, nunca debió implicar la desatención de muchas otras actividades académicas, tan necesarias como las publicaciones y muchas veces imprescindibles para que éstas tuviesen lugar, como la formación de los investigadores y la instalación e implementación de nuevos laboratorios y métodos.

INVESTIGACIÓN EN LIMNOLOGÍA

RAFAEL AROCENA

SI BIEN ESTE ES UN LIBRO PRINCIPALMENTE SOBRE MÉTODOS DE CAMPO Y laboratorio, es conveniente señalar que la colecta y el análisis de las muestras son solo dos de las fases de todo trabajo de investigación. Éste 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 para 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 en su contexto, así como su importancia y el modo en que se obtuvieron.

La inclusión de este capítulo está motivada por el objetivo también docente de este libro. La enseñanza de la ciencia debe incluir a la investigación, para formar individuos de pensamiento independiente a la vez que responsables de su propia educación y no simples receptores de la misma. La investigación se aprende investigando y reflexionando sobre lo que se investiga.

1.1. CONOCIMIENTO Y MÉTODO CIENTÍFICOS

La ciencia es una forma de conocimiento particular, diferente al sentido común, la magia, la religión o el arte. El conocimiento científico va más allá de lo evidente, no es natural o espontáneo. La ciencia es un cuerpo de conocimientos de la realidad, objetivo, generalmente cuantitativo, no dogmático, provisorio, sometido a ensayo, revisión y crítica. No se trata de una colección sino de una selección organizada de hechos relacionados (Tamayo y Tamayo 2003).

Tanto en ciencias naturales como sociales se parte de la observación controlada, sistematizada y crítica, la formulación de un problema y una hipótesis que sea su

explicación más probable, y en la comprobación de la misma con el fin de establecer un ley explicativa (Tamayo y Tamayo 2003).

Sin embargo, la investigación científica no es una serie estricta y lineal de pasos, sino el desarrollo con habilidad y creatividad de procedimientos adecuados para el análisis e interpretación de datos en el marco de un cuerpo teórico. El método científico es iterativo y variable. Así, por ejemplo, la contrastación de hipótesis varía según las disciplinas entre la documentación, la observación, la experimentación o las encuestas (Dieterich 1996).

La ciencia es una actividad a la vez:

- *social*, que demanda la interacción de mucha gente;
- *política*, que determina la asignación de recursos para atender problemas;
- *educacional*, que depende del ingreso continuo de nuevos practicantes;
- *cultural*, que influye en las creencias del público (Rabinowitz & Vogel 2009).

La ciencia es una actividad colectiva que se nutre de una multitud de pequeños aportes, que luego se sintetizan y hacen posibles los descubrimientos y las teorías. Por otra parte, se construye colectivamente mediante la discusión y por el aporte de cada investigador al cuerpo común del conocimiento. En todas estas dimensiones depende de tener una comunicación efectiva de los científicos entre sí y con la sociedad.

El investigador debe convencer a sus pares, que han de evaluar sus aportes, lo que requiere dominar las técnicas y convenciones de la comunicación científica. Además, la adopción de metodologías estandarizadas facilita la verificación de los resultados y su aceptación por el mundo científico. La evaluación por pares minimiza la subjetividad individual y obliga a los investigadores a ser críticos de sus propias conclusiones (The National Academy of Sciences 1995).

1.2. ÉTICA CIENTÍFICA

El científico con su comportamiento puede afectar a sus colegas y a la sociedad. La ética se refiere a este comportamiento y varía entre individuos y grupos con distintos valores culturales y profesionales. Aunque la falta de ética no siempre tiene consecuencias legales, puede repercutir en la reputación y el trabajo del científico. Los investigadores deben confiar en los resultados de sus colegas para poder avanzar. Cada científico es responsable de proteger la integridad de la ciencia, pero no está exento de cometer errores, los que se deben combatir extremando cuidados, como la exactitud y la objetividad. El desvío de las valoraciones debido a prejuicios puede ser difícil de reconocer, lo que se mitiga con el estudio de otras disciplinas fuera de la ciencia (The National Academy of Sciences 1995).

Son faltas graves a la ética el distorsionar los datos y el plagiar el trabajo de otros. La distorsión de datos puede consistir en la eliminación de algunos de ellos por ser sospechosos o para hacer más claros los resultados, o más elegante una gráfica. Su fabricación, falsificación o maquillaje pueden producir problemas en futuras investigaciones. Aunque los errores se harán finalmente evidentes, se pueden desperdiciar meses o años de trabajo antes que esto suceda, y la confianza del público en la ciencia puede resultar seriamente dañada (The National Academy of Sciences 1995).

Plagio es usar las ideas y palabras de otro autor sin darle el crédito correspondiente mediante una cita. De tomarse exactamente las mismas palabras se deben poner entre comillas, y en todo caso hacerlo solo con pasajes breves, incluso para trabajos anteriores del mismo autor. En ocasiones debe solicitarse la autorización correspondiente para usar tales expresiones. Existen zonas grises, donde se emplean ideas y palabras que no son exactamente las originales pero significan lo

mismo, por lo que igualmente deben llevar cita. Es inconveniente usar mucha información de una misma fuente y los conceptos generales bien conocidos no requieren ser citados.

Algunas instituciones presionan a sus investigadores para que reúnan una larga lista de publicaciones científicas. Esto puede inducir a que se publiquen trabajos que no fueron sometidos a la necesaria evaluación crítica, incompletos, de mala calidad, o el mismo trabajo en distintos sitios o subdividido en varias publicaciones (The National Academy of Sciences 1995). La publicación de los mismos datos más de una vez solo se justifica para medios y públicos diferentes, y siempre que sea debidamente informada (Davis 2005).

Cualquier trabajo científico puede tener un fuerte impacto en la sociedad, incluso incidiendo en decisiones políticas. En tal caso el investigador tiene la responsabilidad de llamar la atención sobre ello. Los científicos juegan un importante rol en la educación del público para que éste pueda tomar decisiones informadas. Para ello los escritos científicos deben ser precisos, claros y lógicos, así como estar conectados a la realidad y a la ciencia (Rabinowitz & Vogel 2009). Sin embargo, no se debe abusar del prestigio académico propio o de la institución a la que se pertenece para emitir opiniones personales como si fueran veredictos científicos.

Cualquier testigo de estas inconductas tiene la obligación de denunciarla, pero debe ser consciente de la gravedad de la acusación y sus consecuencias. La National Academy of Sciences (1995) recomienda que antes de hacer una acusación por escrito, se discuta la misma con colegas y supervisores de confianza.

1.3. TEMA DE TRABAJO

Generalmente el tema de investigación ya está determinado en las instituciones donde el científico trabaja, o hay cierta orientación por parte de las agencias financiadoras. En ocasiones los países más poderosos o sus empresas imponen los temas de su interés mediante diversos apoyos económicos, desatendiéndose así las necesidades del país del investigador. Sin embargo, aun en esos casos suele ser posible seleccionar temas de interés local pasibles de financiación.

De no estar establecido el tema de trabajo, se pueden considerar los siguientes criterios para su selección (Acosta Hoyos 1972; Rey 1987):

- a) Necesidad de investigar el tema por la existencia de un problema no resuelto o pregunta relevante para el avance del conocimiento. Los problemas suelen señalarse en las conclusiones de congresos, las revisiones y en la introducción de trabajos originales. En otros casos surge de la observación directa o de los reclamos de los directamente afectados.
- b) Conocimiento de la materia, preferiblemente sistematizado en notas. El abordaje de cualquier temática requiere de un conocimiento previo, al menos de sus principales textos, autores y publicaciones, así como de su lenguaje específico.
- c) Capacidad para afrontar el problema por la formación y experiencia propias. En temas ligados a otras disciplinas, se debe solicitar la colaboración de otros profesionales respetando su especialización.
- 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.
- e) Interés personal en el tema, única garantía de que el trabajo se realice con la persistencia y continuidad necesarias.
- f) Utilidad, aplicabilidad o relevancia práctica o teórica que justifiquen el emprendimiento de una actividad costosa y demandante.

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.

Se debe distinguir entre *tema* de trabajo, que se refiere al mundo de las ideas, y *objeto* de trabajo, que es la realidad material sobre la que se investigará (Dieterich 1996). Esta distinción es fundamental al momento de buscar la bibliografía y formular el objetivo, los que deben estar orientados al tema, primero en sus aspectos más generales y luego en los más particulares. El objeto de trabajo suele constituir un modelo, a partir del cual se pretende realizar generalizaciones de validez universal.

1.4. PLAN DE TRABAJO Y PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Una vez decidido el tema conviene planear las actividades con pasos concretos que guíen la acción hacia un objetivo determinado. En caso de solicitar financiamiento se debe elaborar un proyecto de investigación de acuerdo a las pautas establecidas por la agencia financiadora, las que constituyen un plan de trabajo.

El plan de trabajo o proyecto debe responder con precisión al qué, por qué, cómo, cuándo, dónde y quién de la investigación. Además de establecer el trabajo a realizar, identifica sus partes principales y subordinadas, selecciona los métodos y los programas en el tiempo. Es una guía para buscar la información necesaria y un adelanto del trabajo final. Aunque meticuloso, el plan debe ser flexible, conciso y estructurado, generalmente con las siguientes partes:

- a) *Título* provisorio breve y exacto, que refleje fielmente el contenido del trabajo. Posteriormente se lo podrá modificar de ser necesario.
- b) *Marco teórico*, conteniendo una presentación concisa del tema. Se debe escribir el estado actual del conocimiento revisando la bibliografía principal y reciente, pero con un enfoque crítico y limitándose al tema concreto pero sin descuidar la perspectiva general. Debe conducir a un problema.
- c) *El problema* a resolver debe plantearse con claridad y exactitud, como pregunta concisa, y su respuesta como hipótesis.
- d) *La hipótesis* es un prerrequisito para aplicar pruebas estadísticas sobre la significación de los resultados. La hipótesis es una suposición “razonada objetivamente, con fundamento en el conocimiento científico existente, sobre la propiedad de algún fenómeno (hipótesis de 1^{er} grado) o sobre alguna relación causal (2^o grado) o de dependencia estadística entre variables (3^{er} grado)” (Dieterich 1996). Las hipótesis no deben tener términos ambiguos, no definidos, no medibles o incontrastables.
- e) *Objetivo*. La introducción concluye con la formulación de uno o más objetivos concretos, consistentes en la validación de la(s) hipótesis.
- f) *Área de estudio*, en caso de corresponder. Los métodos de muestreo dependen del objetivo, pero también del área de estudio. El área debe describirse por medio de mapas detallados.
- g) *Métodos* de muestreo, de análisis y de procesamiento de datos. Incluye los métodos conocidos y aquellos a investigar, implementar y ajustar, los aparatos e instrumentos, tanto disponibles como necesarios de procurar.
- h) *Resultados* esperados o información a reunir. Consiste en la generalización y anticipación posible de los resultados a obtener, sus implicaciones, la comparación con la literatura y sus relaciones con la teoría, así como las conclusiones y recomendaciones posibles.
- i) *Bibliografía*. Lista inicial de fuentes consultadas o para consultar. Conviene anotar la ubicación de cada una, sobre todo en caso de manejarse varios servicios de documentación o sitios de almacenamiento.

- j) *Cronograma*. Agenda de actividades programadas en el tiempo. En general es un diagrama de Gantt, consistente en una gráfica de barras horizontales que corresponden a las distintas actividades, cuya ubicación y largo representan los tiempos de inicio, finalización y duración. Puede sustituirse por una tabla cuyas filas son las actividades –ordenadas por objetivos– y las columnas son períodos de tiempo (meses, trimestres, años). Siempre se debe tener en cuenta la aparición de dificultades o imprevistos que pueden demorar un poco la conclusión del proyecto, por lo que conviene no ser demasiado exigente al marcar los tiempos.

1.5. MARCO TEÓRICO, ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Para poder llevar a cabo una investigación exitosamente, es preciso tener un conocimiento profundo y actualizado del tema mediante una vasta revisión bibliográfica. Para cada tema suele haber varias disciplinas y teorías científicas, por lo que se debe hacer una selección del marco teórico (Dieterich 1996) y establecer cuál será el enfoque del trabajo.

Conviene leer primero 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 (físicas o virtuales) organizadas por tema. Las fichas sirven para guiar el trabajo y además facilitan las futuras redacción y citas. Dado el gran número de publicaciones disponibles, imposibles de abordar totalmente, es preciso recurrir a servicios bibliográficos como centros de documentación, bancos y bases de datos, *index* y *abstracts*.

Del análisis de estos antecedentes bibliográficos puede surgir la existencia de un problema no resuelto y que es preciso abordar. Aun en caso de que el problema surja de la observación propia o ajena, deberán revisarse los antecedentes para confirmar que el problema exista aún y que no haya sido ya resuelto o abordado. El problema debe conducir a la pregunta, ésta a la hipótesis y ésta al objetivo.

Aunque las hipótesis no se pueden probar si son verdaderas, pueden rechazarse o no con determinada probabilidad conocida de error. La hipótesis nula es la respuesta más simple. Si es rechazada, se acepta la hipótesis alternativa como la explicación inmediata consistente con la evidencia. En las ciencias empíricas se contrastan con datos obtenidos de la observación y la experimentación.

El objetivo debe establecer claramente cuál es el sistema objeto de estudio, que en limnología puede ser desde una población o una especie hasta un ecosistema, pasando por varios niveles intermedios de organización, así como diversos procesos, factores y efectos. 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, conocer su variabilidad espacial o temporal o su correlación con factores ambientales (Ludwig & Reynolds 1988). Los objetivos deben ser realistas, es decir abordables con posibilidades de éxito (Dieterich 1996).

1.6. METODOLOGÍA

Los materiales y métodos a emplear, además de ser adecuados a los objetivos y al objeto de estudio, deben ser eficientes. Deben generar la mayor información con el menor esfuerzo y tiempo posibles. Los organismos que financian las investigaciones directamente con dinero (agencias), o indirectamente con apoyo logístico (universidades, órganos de gobierno), suelen verse obligados a priorizar aquellas postulaciones que les reporten mayores resultados al menor costo. Sin embargo, si el problema, la

pregunta o hipótesis a contrastar necesariamente deben ser contestadas mediante métodos costosos, éstos no deberían ser un obstáculo para realizar la investigación.

Generalmente los primeros estudios en un área nueva, desconocida, son de tipo descriptivo. Aunque devaluados en algunos ambientes científicos, los estudios descriptivos pueden ser de suma importancia y utilidad. Suelen proveer los primeros datos y la información básica sobre las características abióticas y bióticas de determinados ambientes. Por su valor local estos trabajos no suelen ser bien vistos en agencias y revistas internacionales, por lo cual tampoco se los apoya en las instituciones locales.

Los estudios descriptivos carecen de hipótesis previa, aunque no de objetivo y método científico. Se basan en relevamientos extensivos de a) muestras obtenidas al mismo tiempo en diferentes sitios, y/o b) muestras del mismo lugar tomadas en distintos tiempos, en busca de patrones ecológicos espaciales o temporales respectivamente. Estas descripciones pueden conducir a la formulación de hipótesis causales, que podrán ser probadas en estudios subsecuentes.

Los estudios que buscan comprobar hipótesis pueden desarrollarse tanto en el laboratorio como en la naturaleza, y en este caso pueden basarse en la observación o la experimentación. Si las variables involucradas no son manejables, se recurre a su observación programada, sobre hechos relevantes, precisa, metódica y exenta de prejuicios. La misma 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 naturales, pero bajo condiciones controladas y basada en la manipulación de variables. En ambos casos se compara el efecto de dos o más condiciones o tratamientos sobre uno o algunos pocos atributos. Dado que al experimentar se realiza una simplificación de la naturaleza, las conclusiones obtenidas deben ser tomadas con cautela a la hora de extrapolarlas a todo el ecosistema.

1.6.1. DISEÑO DE MUESTREO

El muestreo es la observación de un grupo de elementos (población) representativos de un universo mayor, ya que sería imposible e incluso inconveniente acceder a absolutamente todos los elementos de dicho universo. Para ser representativo un muestreo debe ser aleatorio, lo que significa que cada elemento tiene igual probabilidad de ser escogido. Esto se logra por medio de un método de muestreo objetivo, o sea independiente del investigador.

Una muestra es una colección de unidades de muestreo que contienen uno o varios elementos o datos de la población. Usualmente se llama incorrectamente muestra a cada unidad de muestreo, que si es escogida aleatoriamente debe llamarse réplica. Sin embargo, en el resto de este libro se empleará la palabra muestra en su significado usual, que no diferencia entre réplica, seudorréplica o cualquier unidad obtenida por métodos no aleatorios.

El valor de los datos depende de un correcto procedimiento de muestreo. El diseño debe reflejar la hipótesis nula, manteniendo constantes la mayor cantidad posible de variables ambientales (Green 1979; Ludwig & Reynolds 1988). El número de réplicas, su distribución, el método y la frecuencia de muestreo, requieren de datos previos sobre la distribución y la abundancia de los organismos (Prepas 1984; Elliott 1977) o de los parámetros a estudiar. Cuando no se cuenta con los mismos, es conveniente realizar muestreos piloto, que también sirven para probar y ajustar todos los aspectos del muestreo.

DISTRIBUCIÓN: La distribución de las unidades de muestreo en el espacio debe basarse en un conocimiento previo del área de estudio, al menos su morfología (Cap. 2). El muestreo puede ser determinístico (regular) o estocástico (aleatorio). El pri-

mero se basa normalmente en transectas o grillas que cubren homogéneamente todos los sectores del área de estudio. En cambio, en un muestreo estocástico se sorteán las unidades de muestreo por medios aleatorios (dados, bolillas, tablas de números aleatorios o incluso los últimos dígitos de los números de la guía telefónica).

El muestreo aleatorio puede ser simple, sobre toda el área, o estratificado. Cuando en el área 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 previo más detallado.

Si los elementos no se pueden individualizar, se sorteán sus agrupaciones naturales haciendo un muestreo por conglomerados, como sucede con los organismos reunidos en poblaciones y comunidades. Éstos pueden estar en varios niveles jerárquicos, siendo entonces el muestreo por niveles múltiples. Es el caso de tomar varias muestras dentro de cada uno de varios lagos agrupados a su vez en distintos distritos lacustres.

LOCALIZACIÓN: 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*, Cap. 2).

FRECUENCIA Y DURACIÓN: Dependen del objetivo y de los tiempos de renovación del agua, la comunidad u otro objeto de estudio. Puede variar desde los ciclos diarios empleados para estimar la producción/respiración mediante curvas de oxígeno medido cada pocas horas, 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 de muestra, 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. Green (1979) sugiere que la relación entre las dimensiones de los organismos y de la unidad de muestreo sea ≤ 0.05 .

APARATO MUESTREADOR: Existen numerosos tipos de aparatos para obtener muestras de agua, sedimentos y organismos de las diferentes comunidades, así como medidas de diferentes parámetros, todo lo cual se verá en los respectivos capítulos. Para su selección se debe considerar su exactitud, precisión, resolución 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, o entre el valor real y el medido para el caso de la medición de parámetros. La precisión se refiere a la repetitividad del resultado, la resolución a la mínima magnitud detectable, mientras que la eficiencia se refiere a la relación entre el esfuerzo realizado y la precisión y exactitud obtenidas. El aparato debe muestrear la población deseada con igual eficiencia bajo diferentes condiciones de muestro.

NÚMERO DE RÉPLICAS: Las hipótesis son generalmente rechazadas o no, determinando si la razón entre la variación causada por el efecto hipotético (entre estaciones o fechas) y la causada por el error (dentro de cada estación o fecha) es mayor a la esperada para la hipótesis nula. 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 de (Elliott 1977; Prepas 1984):

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

donde t es el valor de Student obtenido de tablas 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 (0.2 para un 20% de error admisible):

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

1.6.2. 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 del material necesario 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, y luego durante el mismo con abundante agua del lugar. Los envases deben etiquetarse de forma clara y duradera con marcador indeleble.

La planilla de muestreo cumple una doble función. Por un lado es una guía de trabajo para recordar todas las actividades que se habían planeado y hacerlas en el orden previsto. Por otra parte, es un formulario para anotar claramente los datos del muestreo: fecha, hora, medidas, muestras, observaciones y participantes.

Es conveniente realizar una breve descripción de características evidentes a partir de la observación de la muestra fresca. Los cambios posteriores de temperatura o el uso de conservantes o simple manipulación, pueden perder o 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 conviene tabular en matrices. Una matriz de datos es una tabla donde cada columna corresponde a una unidad de muestreo u objeto a describir, y cada fila a una variable o descriptor, o viceversa si son muchas más las muestras que las variables. Además de ser la herramienta básica para los análisis posteriores, la matriz de datos y los 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), de modo de evitar las pruebas no paramétricas que son menos exactas.

En el caso de las medidas continuas, como las variables químicas, y en especial para aquellas que derivan de cálculos intermedios, como las concentraciones obtenidas a partir de lecturas de absorbancia, 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. En consecuencia, todos los valores de un mismo parámetro deben tener igual número de decimales.

1.8. COMUNICACIÓN

La imagen tradicional de los científicos trabajando aislados, deja de ser real cuando en el siglo XVII son alentados a compartir sus hallazgos, impulsándose así el desarrollo de la ciencia. Antes de ello, muchos científicos mantenían su trabajo en secreto por temor a que otros se lo apropiaran. Pero ya a partir de 1660 la *Royal Society of London* garantizaba una rápida publicación en sus *Philosophical Transactions*, así como el sometimiento de los manuscritos ante expertos que juzgaran su calidad (*peer review* o evaluación por pares).

El estilo plano y directo de la comunicación científica surge en el siglo XVI, cuando Francis Bacon (1561-1626) establece el método científico y luego la *Royal Society* estandariza el estilo científico de comunicar. Bacon desaprobaba las muestras de erudición, autoridad, retórica, narcisismo y emoción. Por “estilo” científico se entienden las reglas de redacción, así como los métodos de producir escritos científicos más efectivos y útiles, y no su significado común como forma personal de escribir.

El primero en publicar un descubrimiento es quien se lleva los créditos del mismo. Pero una vez publicado puede ser usado por otros investigadores para ampliar el conocimiento, siempre que se reconozca la autoría original por medio de citas. El investigador no está obligado a difundir sus datos antes de publicarlos, lo que le permite avanzar en su trabajo hasta convencerse de su exactitud y significado. Por otra parte, con su publicación se disminuye el riesgo de cometer errores ya que se somete a una revisión. Sin embargo, la revisión no garantiza que no se publiquen errores los que una vez descubiertos deben ser reconocidos preferentemente en la misma revista en que se publicaron (The National Academy of Sciences 1995).

1.8.1. PAUTAS PARA ENFRENTAR UNA COMUNICACIÓN

La comunicación de los resultados y de las conclusiones obtenidas es el fin último y la culminación de todo trabajo científico. Muchos científicos famosos han sido reconocidos tanto por sus hallazgos como por la efectividad de su prosa (Rabinowitz & Vogel 2009). Sin embargo, esta etapa suele resultar adversa a muchos científicos. Tal vez sea debido a la exposición del investigador y su trabajo ante sus colegas, o al temor de no hacerlo correctamente.

A fin de superar estas dificultades es conveniente establecer un plan de trabajo con fechas para comenzar y terminar la comunicación, y reservarse tiempo para escribir. Conviene escribir constantemente, como parte de la investigación, sin esperar a finalizar la misma, en un proceso iterativo entre el hacer y el escribir sobre lo que se hace. Esto ayuda a mantener el orden en el trabajo y mantiene conectadas las ideas con las tareas manuales (Katz 2006).

La claridad y convicción del investigador respecto a su sujeto de investigación y su importancia, son indispensables para poder transmitirlos convincentemente a la audiencia. La comunicación debe hacerse a la vez con humildad, honestidad y claridad. La humildad implica reconocer los conocimientos de la audiencia, a la que no debemos abrumar con información innecesaria, respetando su tiempo.

La actitud tiene que ver con la personalidad de cada individuo y puede obstaculizar el esfuerzo de comunicación, pero conociéndola es posible controlarla por medio de la razón. Una actitud que considera a la comunicación como un mal necesario o una pérdida de tiempo, impide dedicarle nuestros mejores esfuerzos. Para

combatir el bloqueo que nos impide comenzar la tarea, Davis (2005) recomienda:

- a) reunir datos suficientes, pero preestablecidos en un programa de investigación con plazos claros, a fin de no prolongarlos indefinidamente;
- b) comenzar a escribir apenas se complete tal programa o en simultáneo;
- c) definir la tarea de comunicar específicamente: para quién, a qué nivel;
- d) organizar el material destacando los puntos principales en un esquema;
- e) discutir el trabajo con colegas;
- f) crear un ambiente apropiado, con todos los materiales necesarios, y dedicarle tiempo suficiente;
- g) no pretender que el primer borrador sea perfecto;
- h) darlo siempre a corregir a un colega.

Para realizar comunicaciones científicas no se requiere de un talento especial, sino de entrenamiento en el uso de una técnica y conocimiento de las normas que la rigen (Davis 2005). Antes de profundizar en estos aspectos, cabe resaltar que el elemento principal de una comunicación científica es su contenido, y que si éste no es valioso no hay forma correcta y atractiva de comunicarlo.

Una observación es científica cuando se la acompaña de definiciones y calificativos, es decir, cuando se describe cómo fue realizada (Katz 2006). Básicamente se trata de comunicar qué se hizo y por qué (introducción), cómo y con qué medios (métodos), qué datos se obtuvieron (resultados) y qué significan (discusión). Para que una comunicación sea lo más simple y exacta posible, han de seguirse formatos convencionales y usarse palabras precisas, sin dos significados. El formato estándar asegura que el lector recibirá lo que espera o conoce y sabe dónde encontrarlo sin distracciones, con lo que estará más cómodo y atento al contenido (Davis 2005; Katz 2006).

Hay diversas formas de comunicación científica: reportes o informes, artículos originales o revisiones, proyectos de graduación, de tesis o de investigación, tesis, resúmenes, presentaciones orales, pósteres, libros, capítulos. Cada una tiene su audiencia, sus reglas y formato. Además del contenido y la estructura, de conocer bien nuestro sujeto y propósito, nuestras habilidades y convicciones, debemos considerar la audiencia a la que nos dirigimos. Ésta, en los artículos y presentaciones, consiste en otros científicos interesados en el tema. Pero pueden ser científicos de otros campos (tesis), directivos de empresas o agencias (proyectos), editores (libros), gobernantes (informes), público general o niños (divulgación).

1.8.2. CRITERIOS DE REDACCIÓN

Los criterios de redacción no son reglas rígidas sino pautas generales. Su violación creativa puede resultar en una prosa científica más clara y efectiva (Rabinowitz & Vogel 2009). La redacción científica requiere además de las reglas particulares del lenguaje científico, el dominio del lenguaje escrito general. Esto implica escribir oraciones completas y coherentes construyendo párrafos fluidos y sucediéndose de manera conectada y lógica. Es aconsejable comenzar con el punto principal y luego añadir la información sobre el mismo, o bien comenzar con tal información y desarrollarse de modo que conduzca hacia el punto principal. Algunas otras pautas básicas serían (Gopen & Swan 1990):

- a) poner el sujeto de la oración o párrafo al principio;
- b) poner el verbo lo más cerca posible del sujeto;
- c) poner la menor cantidad posible de cosas entre ambos;
- d) poner la nueva información o el punto al final de la oración o párrafo;
- e) poner la vieja información, o contexto para la nueva, antes que ésta;
- f) articular la acción de la frase en su verbo de modo claro y manifiesto;
- g) ajustar el énfasis relativo de la sustancia de la oración, párrafo o capítulo a la expectativa creada por la estructura gramatical.

La aptitud para ubicar los elementos de un escrito es una destreza que puede requerir una práctica prolongada. El lenguaje debe carecer de ambigüedades, vaguedades y emociones. Así puede ser comprendido y compartido en diferentes tiempos, lugares, lenguas, sociedades y culturas. Todo el trabajo debe apuntar hacia la conclusión, manteniendo solo un tema al frente. La escritura debe dirigirse siempre a convencer al lector de la corrección e importancia de la pieza. Para ello el texto debe ser (Rabinowitz & Vogel 2009):

- 1) Claro:
 - a) simple: preferir palabras cortas y familiares y oraciones cortas;
 - b) inequívoco: evitar palabras o frases ambiguas (inciertas o con varios significados).
- 2) Preciso:
 - a) repetitivo: evitar sinónimos porque pueden significar cosas diferentes; es preferible repetir la misma palabra cuando se quiere decir lo mismo;
 - b) sin connotaciones de valor, jergas o antropomorfismo (“humanización” de objetos, animales, etc.);
 - c) con un nivel de detalle:
 - i) balanceado entre lo específico y lo general;
 - ii) ilustrado con ejemplos de los conceptos abstractos;
 - iii) con analogías;
 - iv) comparativo para poner la información en perspectiva;
 - v) libre de toda complejidad innecesaria y terminología oscura;
 - vi) que transporte el punto principal desde el autor hacia el lector; a veces puede ser necesaria una frase inicial anunciando la intención, o una final resumiendo las conclusiones, para lograrlo.
- 3) Directo:
 - a) no pretencioso (palabras largas e inusuales), arrogante (frases insultantes o que muestren menosprecio) ni coloquial;
 - b) con nombres fuertes y verbos simples y activos en general;
 - c) más concreto (mantiene mejor la atención del lector) que abstracto;
 - d) personal (el autor es parte del trabajo científico, usar la primera persona).
- 4) Comprensible: hacer accesible al público objetivo la terminología técnica específica mediante definiciones, explicaciones, ejemplos, analogías, etc.
- 5) Conciso: hacer una revisión solo para eliminar términos innecesarios.
- 6) Fluido: para mantener la atención del lector a medida que va leyendo puede ser necesario contradecir alguna de las pautas previas:
 - a) variar el ritmo, estructura y largo de las oraciones;
 - b) variar el estilo;
 - c) usar la sorpresa y lo inesperado.
- 7) Uso del lenguaje correcto y adecuado a la audiencia esperada.

Las palabras deben ser precisas, preferentemente números, y las frases, directas (Katz 2006). El texto debe consistir en varios párrafos, cada uno con una idea desarrollada a través de varias oraciones relacionadas entre sí. Todas las oraciones deben estar completas (sujeto, verbo y predicado concordantes en número y género), incluyendo palabras completas y bien escritas. Oraciones con otra estructura pueden ser ocasionalmente válidas solo para llamar la atención del lector, que normalmente espera una estructura convencional (Davis 2005).

1.8.3. REDACCIÓN

Una vez determinadas la forma de comunicación, el sujeto, el propósito y la audiencia, puede requerirse de auto-disciplina para superar las muchas razones que suelen invocarse para retrasar la redacción del texto. Es aconsejable comenzar es-

cribiendo lo que sea y como sea, ya que la escritura –y posterior revisión– ayuda a pensar, aclarar y organizar las ideas. Siempre hay tiempo para revisar y corregir, pero solo se puede revisar lo que ya se escribió (Davis 2005).

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. Este bosquejo inicial contiene el razonamiento central, objetivos, métodos, principales resultados y conclusión.

Conviene escribir la primera versión de una sola vez para darle unidad y fluidez, con un estilo conciso pero claro. Un borrador no requiere estar correctamente escrito, por lo que la (in)capacidad para hacerlo no puede ser un impedimento. Luego se debe desarrollar cada una de las partes, revisar y corregir, economizando palabras, evitando repeticiones y frases superfluas y cuidando la coherencia verbal.

Hay diversas formas de empezar a escribir: esquemas, listas de palabras o ideas, frases en tarjetas que podemos reordenar, etc. Las computadoras pueden ayudar a ser más rápidos y prolijos siempre y cuando no dejemos que las herramientas de la aplicación usada nos distraigan de las ideas y sus conexiones.

Según Katz (2006) la forma más eficiente de escribir un trabajo científico es comenzando con los Métodos, luego juntar los datos en Resultados y delinear la Discusión y Conclusiones. Después se retrocede al contexto histórico, la Introducción y finalmente el Título y Resumen.

1.8.4. PRESENTACIONES EN CONGRESOS

Las presentaciones en congresos pueden ser orales o pósteres. Suelen usarse para presentar resultados preliminares antes de someterlos a una revisión completa. Permiten realizar cierta evaluación del trabajo al propiciar el diálogo e intercambio de opiniones y datos con otros colegas.

En una presentación oral, lo primero que percibe el público es la apariencia y la voz. Una apariencia correcta evita distraer la atención del público, además de mostrar respeto por el mismo. De la voz deben cuidarse el volumen, de modo que toda la audiencia pueda escuchar, la pausa y velocidad para dar tiempo a pensar lo que se escucha y así entenderlo y asimilarlo (Davis 2005). Es importante que la presentación se haga de frente al público para que ambos interlocutores se vean y así puedan establecer una verdadera comunicación entre ellos.

En los congresos las presentaciones suelen estar limitadas a 10-15 minutos, por lo que el trabajo debe estar sumamente resumido. Sin embargo nunca deben faltar a) título y autores, b) marco teórico y objetivos, c) métodos, d) principales resultados y e) conclusiones. Estos contenidos se deben distribuir esquemáticamente en varias diapositivas, con figuras, poco texto y letras grandes.

Los mismos contenidos e igualmente resumidos figuran en los pósteres. Éstos suelen presentarse de a muchos juntos en salones atiborrados y ruidosos, donde el público apenas puede apreciarlos. Por ello es importante que sean atractivos, también con poco texto, buenos gráficos y letra grande.

1.8.5. PUBLICACIONES

Para que una investigación pase a formar parte del conocimiento científico debe ser publicada. Solo así podrá ser evaluada por pares, localizada y leída. La revisión por pares asegura que el trabajo será comprendido por la comunidad científica. Solo las publicaciones son permanentes y se pueden coleccionar, reproducir, clasificar y catalogar, para lo cual la redacción debe facilitar su indexación, resumen y revisión.

Debe ser breve por razones de costo, tiempo y ética. Solo se debe comunicar lo que el autor tiene de nuevo para transmitir, sin mostrar erudición y evitando expli-

caciones inútiles. El autor debe cuidar también algunos aspectos de formato, como el largo de los párrafos, oraciones y palabras, las ilustraciones y tablas y los subtítulos.

El texto debe ser original, escrito en su totalidad por los autores del trabajo. Solo como excepción podrán transcribirse literalmente textos breves entrecomillados, tomados de otros trabajos debidamente citados. También las ideas que se incluyen con otras palabras deben ser citadas. Las citas se incluyen para reconocer a sus autores, poder ser consultadas por quien desee profundizar, y como prueba de conocimiento del “estado del arte”. Las citas vinculan el trabajo con el contexto del conocimiento científico actual.

Por último, el texto se debe adaptar a las instrucciones de la publicación seleccionada y darlo a revisar a otros colegas. Hay distintos tipos de publicación científica: revisiones, artículo original, notas. Todo artículo original debe seguir la estructura clásica, por ser la más simple, metódica y completa. El formato IMRAD (Introducción, Métodos, Resultados y Discusión) es el más frecuente y, aunque no es una estructura rígida, asegura que no se omitan elementos críticos. Generalmente la introducción y la discusión se escriben en tiempo presente (son conceptos generales), mientras que la metodología y los resultados, en tiempo pasado (se refieren al trabajo específico realizado). A continuación se describen todas las partes de una publicación científica.

TÍTULO: Debe ser fiel al contenido, explicativo, corto y específico. Conviene componerlo con palabras clave, evitando las superfluas que no aportan nada (como “estudio de” o similares), las redundancias y los detalles excesivos. El título y el resumen deben ser adecuados para su indexación por lectores y documentalistas. Hay títulos descriptivos que solo presentan el tema y otros informativos que ya expresan el resultado principal.

AUTORES: Solo deben figurar quienes participaron significativamente en al menos algunas fases del trabajo como planeamiento, obtención e interpretación de los resultados y redacción, y sean capaces de asumir públicamente la responsabilidad por todo el trabajo (CBE 1983). Otras contribuciones pueden ser reconocidas en la sección Agradecimientos. 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.

El primer autor es quien lidera el trabajo del grupo, redacta los primeros borradores, corrige y ensambla las partes, somete el manuscrito para su publicación, mantiene la correspondencia con los editores y hace las modificaciones indicadas por éstos. Es común la inclusión en último lugar del autor *Senior* (investigador responsable o tutor de la investigación) cuando el mismo no realizó el trabajo directamente. El orden de los demás autores debe ser acordado entre todos, ya sea según la importancia de sus contribuciones, en orden alfabético o al azar.

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

Consiste de un solo párrafo en tiempo pasado, generalmente de menos de 200 palabras. No tiene citas bibliográficas, referencias a tablas o figuras, ni siglas o abreviaturas que no sean muy conocidas.

PALABRAS CLAVE: Son 4-8 términos descriptivos del trabajo que permiten su clasificación por temas. En general se pide que no se repitan palabras ya usadas en el título, ya que éste también es empleado para dicha clasificación.

INTRODUCCIÓN: Informa del tópico específico, su propósito e importancia, ubicando en él la existencia de un problema no resuelto. Si bien comienza con los conceptos más generales y avanza hacia los más particulares, se deben evitar aquellos demasiado generales y obvios para una audiencia especializada. Resume el estado actual del conocimiento sobre el problema concreto. Éste es la justificación del trabajo a la vez que lleva a la formulación del objetivo, que debe ser explicitado separadamente en el último párrafo. El objetivo debe ser redactado en forma concisa y sin ambigüedades, y debe referirse a qué pretendemos lograr con la integridad del trabajo y no ser una simple suma de actividades a realizar.

La introducción describe dónde encaja el trabajo en la ciencia actual y señala su naturaleza: si se usan datos publicados u originales, se confirman observaciones o se dan elementos nuevos. Se deben evitar extensas revisiones de literatura, haciendo referencias a revisiones recientes, que para eso están, y no demostrar que se conoce toda la literatura, lo cual es imposible. Por el contrario, hay que limitarse al tema específico del trabajo y solo citar las contribuciones más relevantes. Además del objetivo se pueden plantear preguntas e hipótesis. Según Dieterich (1996) la introducción carece de subtítulos y tiene entre 3 y 7 cuartillas.

MÉTODOS (MATERIAL Y MÉTODOS, METODOLOGÍA): Es un capítulo breve pero con suficiente información para que otro experto pueda repetir el trabajo. Describe ordenadamente las técnicas empleadas para perseguir cada objetivo. Cuando corresponde, incluye la descripción del área de estudio, el diseño y los sitios y métodos de muestreo. Se debe informar sobre los objetos de estudio (ambientes, comunidades), los parámetros medidos y las técnicas empleadas, finalizando por los métodos estadísticos.

Las técnicas que ya están publicadas deben simplemente citarse, pero las nuevas o las modificaciones introducidas se deben detallar. Es conveniente justificar la selección de los métodos, especialmente aquellos poco usuales y las pruebas estadísticas. Solo se deben incluir los métodos que produjeron los resultados reportados y discutidos en las secciones correspondientes.

RESULTADOS: Comunica la información obtenida, pero no toda sino solo la principal y sin interpretarla, aunque analizada estadísticamente. Los datos se presentan en a) el texto, b) tablas y c) figuras. El texto es la forma más breve y eficiente de presentar pocos datos, en particular aquellos que se desea resaltar por ser los más importantes o diferentes. En él debe resumirse toda la información, haciendo referencia a las tablas y figuras en que se apoya.

Cuando hay muchos resultados numéricos o éstos deben compararse, conviene recurrir a tablas y gráficas autoexplicativas, con un título o pie explícito y sintético. Deben ser solo las necesarias y ocupar en general menos espacio que el texto. En las tablas se deben evitar muchos datos individuales similares, sustituyéndolos por sus estadísticos (medias, desvíos, rangos). Tampoco deben incluirse datos fácilmente calculables a partir de otros datos de la misma tabla, ni series de datos iguales o no significativos.

Las tablas se componen de filas y columnas con su encabezamiento donde se describe su contenido: variables y muestras, y las unidades de aquéllas. No deben usarse más decimales que los correspondientes a la precisión de las medidas tomadas. Se deben incluir también los ceros con sus decimales cuando este es el resultado obtenido, e informar dónde no se obtuvieron datos y por qué razón. Esto puede

hacerse con un símbolo explicado en una nota al pie de la tabla. Otras notas pueden ayudar a explicar los contenidos de la tabla.

Para separar secciones de una tabla y mejorar su apariencia se emplean líneas de definición, pero en general solo horizontales. En caso de tablas excesivamente grandes, es preferible que sean largas y anchas, por lo que en caso necesario conviene intercambiar filas y columnas (transponer).

Las figuras son apropiadas para presentar tendencias o patrones, presentar procesos complejos o imágenes difíciles de describir con palabras. Las figuras deben ser pocas y de muy buena calidad y no repetir la información de las tablas. Se deben presentar los datos honestamente, sin manipular las escalas a fin de evidenciar u ocultar un resultado particular. No es válido extender las curvas más allá de los datos que las generaron, ni trazar curvas que no se ajusten significativamente a los datos. Siempre que sea posible se deben incluir barras de variación (desvíos o errores estándar o rangos).

DISCUSIÓN: Es el examen de los resultados para:

- a) explicar los resultados significativos obtenidos pero sin repetirlos en detalle;
- b) relacionarlos con principios científicos y resultados anteriores de otros trabajos comparables, debidamente citados, explicando su concordancia o no;
- c) presentar claramente las conclusiones, destacando si se cumplieron los objetivos, respondieron las preguntas o probaron las hipótesis planteadas en la introducción;
- d) analizar y resaltar su importancia y aplicaciones teóricas o prácticas.

CONCLUSIONES: Breve reiteración de los puntos específicos relativos al cumplimiento de los objetivos; cómo pueden los resultados usarse en futuros trabajos o aplicaciones.

AGRADECIMIENTOS: En este apartado se debe reconocer y agradecer el apoyo recibido para realizar el trabajo. En primer lugar las agencias financiadoras, luego aquellas personas que colaboraron aportando bibliografía, datos o trabajo (muestreo, análisis, corrección, traducción). Ocasionalmente se agradece a los revisores anónimos por sus críticas y recomendaciones.

BIBLIOGRAFÍA: Contiene solo las referencias citadas en el texto y todas ellas, que deben ser trabajos publicados o en prensa. Hay diversos formatos para la bibliografía dependiendo de la revista. De no ser así, una vez escogido uno se lo debe mantener en todas las referencias. Las citas en el texto incluyen los apellidos de los autores si son uno o dos, si no, el del primero seguido de “*et al.*” (y otros) y el año de publicación. En el caso de libros colectivos, se cita el capítulo consultado. Las citas de citas son excepcionales y llevan la referencia del autor consultado o bien ambas.

Para los trabajos de instituciones donde no se identifican a los autores, se considera a la institución como autor. En el cuerpo del artículo se la cita por su sigla oficial, y en la Bibliografía por la sigla seguida por el nombre completo. Cuando es imposible determinar al autor o institución se usa Anónimo. Cuando no figura el año de publicación, esto se indica en el lugar donde va el mismo.

FORMA Y TAMAÑO

RAFAEL AROCENA

EN LIMNOLOGÍA, 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 (Håkanson 1981), lo que permite comparar sistemas y expresar ciertos valores (concentración, temperatura) en términos extensivos (carga, contenido calórico). Determina el grado de 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. La hidromorfología o hidrogeomorfología se refiere a las formas de los cursos de agua y su relación con la corriente que las modela. La geomorfología estudia las formas y dimensiones de los sistemas terrestres, y por lo tanto también de las cuencas hidrográficas.

Tanto los lagos como los ríos están conectados al sistema terrestre que los rodea. Las características de cada sistema obedecen en gran medida a las de su cuenca de drenaje, de la cual recibe sus aguas y materiales. Por ello, la unidad tanto de estudio como de gestión, debe ser el área de captura o cuenca. A todo cuerpo de agua, de pequeño o gran tamaño, le corresponde una cuenca. Al igual que los ríos, las cuencas pequeñas se juntan formando otras más grandes en un sistema jerárquico.

Con un criterio principalmente morfológico se distinguen dos grandes series de aguas continentales con varias categorías sin límites precisos: 1) lénticas o leníticas –del latín *lentus*: lento– como los lagos, estanques y charcos, y 2) lólicas –del latín *lotus*, participio pasado de *lavāre*: lavar– 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.

En este capítulo veremos los métodos de estudio de las formas y dimensiones de a) las cuencas de drenaje, b) los sistemas lénticos y c) los lóticos. En muchos de los parámetros que se describen a continuación se menciona además su importancia y utilidad.

2.1. CUENCA DE DRENAJE

El estudio de un cuerpo límnic comienza con la descripción de su cuenca por medio de parámetros calculados sobre un mapa con curvas de nivel (planialtimétrico). Todo mapa debe incluir una escala, coordenadas geográficas y orientación. La escala puede ser numérica o gráfica. La escala numérica se representa como un cociente 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 válido aunque el mapa se reduzca o amplíe.

También se aprecia el relieve trabajando con estereoscopio y pares de fotografías aéreas o conortofotografías, en las que se corrige la deformación de los bordes. Actualmente se dispone gratuitamente de imágenes de todo el mundo con el *software Google Earth*.

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 debido a la curvatura de la Tierra. En la práctica se puede asimilar al norte geográfico.

2.1.1. PARÁMETROS DE LA CUENCA

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. Muchas veces por esos puntos transcurren caminos, los que a su vez hacen de divisoria de aguas aun cuando no sigan los puntos más altos, lo que facilita la delimitación de la cuenca.

ÁREA (A): 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. En el mismo se superpone un 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. Pero actualmente existen programas de computación accesibles que realizan análisis de imágenes que facilitan estos cálculos.

PENDIENTE MEDIA: El área planimétrica puede diferir del área real si el terreno tiene mucha pendiente (Pozo & Elozegi 2009). Puede obtenerse mediante la distribución aleatoria de varios puntos en el mapa de la cuenca. Para cada punto se calcula la pendiente, dividiendo la menor distancia entre las dos isolinéas vecinas que pase por el punto, sobre la diferencia de altitud entre las mismas. El número de puntos puede definirse cuando se estabiliza el valor del promedio.

RANGO ALTITUDINAL: Otra información que proporciona el mapa topográfico es la altitud. La máxima y mínima de la cuenca se acostumbra indicar al describir el área de estudio. Su diferencia es el relieve. También puede interesar la distribución de las altitudes (H), representada mediante un histograma o por la curva hipsométrica (H vs. A_H).

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.

ANCHO MEDIO (W): Es el cociente entre el área y el largo máximo.

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.

FACTOR DE FORMA DE HORTON (R_f): Es el cociente entre el área de la cuenca y el área de un cuadrado de lado L.

INFORMACIÓN DE LA CUENCA: Además de la morfología, es conveniente describir la cuenca en términos de su clima (precipitación y evapotranspiración), geología, suelos, vegetación (% de cobertura), uso de la tierra y densidad de población. Todos estos aspectos inciden en las características de las aguas receptoras. En particular su nivel de alteración dependerá del tipo e intensidad de las actividades humanas en la cuenca. Los Sistemas de Información Geográfica (SIG) permiten analizar y superponer mapas digitalizados de cada uno de estos aspectos.

2.2. LAGOS

2.2.1. MORFOLOGÍA

Los parámetros morfométricos se obtienen de un mapa batimétrico, así llamado porque incluye isobatas (isolíneas de profundidad). Los mapas disponibles pueden 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 requiere un análisis más detallado.

El relevamiento de las profundidades o batimetría se realiza con ecosonda o manualmente con sondalesa, y debe estar referida a cierto nivel del agua. Una sondalesa es una cuerda graduada con un peso en el extremo que se sumerge. La ecosonda proporciona un registro continuo pero suele ser inexacta a poca profundidad.

De emplearse sondalesa, el posicionamiento de cada estación solía hacerse midiendo ángulos con teodolito o con goniómetro al menos con dos objetos representados en el mapa. Un goniómetro es una brújula con un círculo graduado o limbo y

un sistema de puntería o pínulas. En caso de usar ecosonda, se registra el perfil del fondo a lo largo de transectos entre puntos conocidos de la orilla.

Actualmente puede hacerse fácilmente por medio del GPS (*Global Positioning System*). El GPS es un sistema de satélites que transmiten datos sumamente precisos de tiempo y localización al receptor GPS. Éste colecta y procesa las señales de tres o más satélites simultáneamente, determinando la posición del usuario.

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, que sean paralelas entre sí, perpendiculares a la costa, y cruzadas por otras transectas preferiblemente en ángulo recto. 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.

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.

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 del ecograma 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.

2.2.2. PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS

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 relevante 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 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, y en ésta, que puede corresponder al largo efectivo, la del viento dominante o 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 una 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 solía medir con un rotómetro o bien con un hilo fino e indeformable ubicado sobre el contorno con ayuda de alfileres por fuera de la línea de costa cuando ésta es entrante, y por dentro cuando es saliente. Actualmente se puede hacer por medio de un programa de computación.

DESARROLLO DE LA LÍNEA COSTERA (DL): Es la relación entre L_0 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 sea. 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 o computación, 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):

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

PROFUNDIDAD MEDIA (\bar{z}): Es el cociente entre el volumen y el área. Se relaciona inversamente con la productividad del lago. Ryder *et al.* (1974) propusieron 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 porcentual 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%.

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

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, si es un pozo profundo es menor, y en rocas erosionables donde adopta forma de olla, es mayor a la unidad.

$$(\bar{z}/z_m = 0.467)$$

2.2.3. ZONAS

Los lagos presentan internamente variaciones físicas (de luz y temperatura), químicas (oxígeno, nutrientes) y biológicas (comunidades) tanto horizontales como verticales.

Horizontalmente podemos distinguir una zona litoral de otra pelágica. La primera está en contacto y relación con el ecosistema terrestre adyacente del que recibe materiales de todo tipo, incluidos algunos organismos. En ocasiones puede formarse un sistema de transición o ecotono, como un humedal. La poca profundidad de esta zona permite que la luz llegue hasta el fondo y puedan crecer diferentes macrófitas acuáticas. Éstas crean diversidad de hábitats y brindan refugio a diversos animales, los que también disponen de abundante alimento. En consecuencia la zona litoral es altamente diversa y productiva. Además de los variados grupos de invertebrados y peces, esta zona es comúnmente habitada o visitada por anfibios, aves y mamíferos.

Lejos de la costa, donde la profundidad del agua supera a la de penetración de la luz, podemos distinguir una zona pelágica o limnética, superior, de aguas abiertas, iluminada y a mayor temperatura, y otra bentónica o profunda, inferior, oscura y a menor temperatura. En la primera, una comunidad de algas y bacterias errantes (fito- y bacterioplancton) sostiene a otra de invertebrados también errantes (zooplankton) y ambas a los peces (necton). La zona bentónica no tiene producción primaria autóctona, pero recibe la materia orgánica que sedimenta de la pelágica. Parte de esa materia, junto con la inorgánica, quedan atrapadas en los sedimentos constituyendo un registro histórico del lago y su cuenca.

Los sedimentos son en general finos y homogéneos, a diferencia de los litorales, pero presentan fuertes gradientes verticales, eventualmente alterados por bioturbación. La diversidad, biomasa y producción de los animales que allí habitan son muy bajas.

Además de la interfase agua-sedimento donde habita el bentos, hay una interfase agua-aire donde la alta tensión superficial del agua soporta dos comunidades: el neuston lo constituyen bacterias, hongos y algas microscópicas; el pleuston está formado por plantas flotantes y pequeños invertebrados ubicados tanto debajo (hiponeuston) como encima (epineuston) de la superficie.

Las zonas mencionadas no están aisladas ni son independientes entre sí. Por el contrario, mantienen un fuerte intercambio de materia y energía, y se influyen recíprocamente. La mayoría de los lagos tienen poca profundidad, por lo que muchas veces falta la región profunda o incluso la limnética. Es el caso de las lagunas, a menudo cubiertas en su totalidad por macrófitas.

2.3. GEOMORFOLOGÍA FLUVIAL

2.3.1. LA RED FLUVIAL

Los conceptos fundamentales de geomorfología fluvial se deben principalmente a Leopold *et al.* (1964). El carácter geomórfico de un río depende del sustrato geológico, el clima y la vegetación de su cuenca, con la cual conforma un mismo sistema. Los ríos están formados por las sucesivas confluencias de diversos tributarios, conformando una red arborescente. Diferentes parámetros suelen emplearse para describir una red fluvial:

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

$$L = jA^m$$

Puede medirse con rotómetro, hilo o programa de computación, al igual que la línea de costa (ver 2.2.2).

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⁻², siendo frecuentemente 2. Existe una relación universal entre ambos parámetros:

$$\sum L = 1.4A^{0.6}$$

Este parámetro depende del régimen de precipitación y evaporación, y de la permeabilidad del suelo. Cuanto mayor disponibilidad de agua de lluvia y menor permeabilidad, mayor número de cursos de agua se formarán y viceversa (Pozo & Elozegi 2009).

SINUOSIDAD DEL CAUCE (S): Es la relación entre la longitud de un canal y el segmento de recta que une sus extremos. Los meandros son un caso extremo de sinuosidad (>1.5) que se desarrolla con poca pendiente y descargas poco variables. Se disponen a una distancia a lo largo del canal de 11 a 16 veces el ancho del curso entre dos meandros de curvatura en igual sentido. La amplitud es más variable y depende 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): Es la máxima diferencia de altitud (h) dividida por el largo del canal. Influye en la velocidad del agua. Puede calcularse a partir del perfil longitudinal y expresarse en porcentaje:

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

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. Algunas limitaciones a este 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).

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:

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

2.3.2. EL CAUCE FLUVIAL

Las formas y dimensiones de los cauces a nivel de tramo o segmento son factores de gran importancia para los componentes del ecosistema y su metabolismo. Estas relaciones se presentan a diferentes escalas, desde el tamaño de las partículas de sedimento, el biofilm que las cubre y los organismos individuales que aloja, hasta las unidades del tramo y del canal. En un tramo de arroyo, Montgomery & Buffington (1997) distinguen seis tipos de unidades específicas con distintas pendientes:

- tramos de cascada (4-25%);
- escalón-hoya (2-8%);
- lechos rocosos planos (1-4%);
- sucesión de rápidos y remansos (1-2%);
- dunas-rizos de sedimento arenoso (<1%);
- cauces anastomosados o trenzados (<3%).

A su vez, Hawkins *et al.* (1993) distinguen las siguientes unidades de canal que difieren en profundidad, velocidad y sustrato cuando el caudal es pequeño:

- rápidos:
 - revueltos (cataratas, cascadas, rápidos),
 - tranquilos (láminas, correderas);
- remansos:
 - remolinos,
 - embalses.

Los tramos pueden caracterizarse por su profundidad máxima y media, anchos húmedo y del cauce lleno, altura y pendiente de las orillas. Las profundidades máximas suelen alinearse al centro en un tramo recto y contra la orilla cóncava, erosiva en una curva. La profundidad puede ser muy variable y su distribución muy irregular, especialmente en arroyos pedregosos y cuencas de fuerte relieve. En ese caso, la estimación de una profundidad media requiere de muchas medidas. Lo mismo sucede con el ancho húmedo o del espejo de agua.

El ancho del cauce lleno corresponde al caudal que llena el cauce sin alcanzar la llanura de inundación. Puede reconocerse por un cambio en la pendiente y/o en la vegetación de la orilla. Es difícil de definir si el cauce no es encajonado o las orillas tienen distinta altura. Es una zona de depósitos recientes más altos (albardón o dique lateral) y con sedimentos más finos. También puede presentar raíces expuestas por la erosión, o mostrar el límite inferior de los líquenes y mohos de la orilla.

2.4. RESULTADOS

2.4.1. MORFOLOGÍA DE TRES CUENCAS COSTERAS

La morfometría de tres cuencas de los principales afluentes de la Laguna de Rocha (Tabla 2.1) 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 ²)	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

2.4.2. HIDROMORFOLOGÍA DEL ARROYO CARRASCO

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 2.9 (Arocena & Pintos 1988). Esto significa que en promedio cada curso está conformado por la confluencia de tres afluentes.

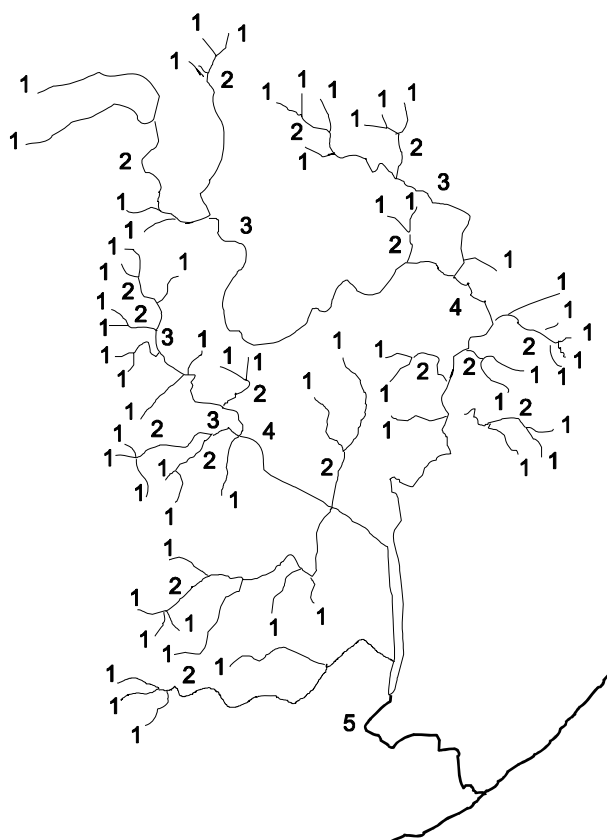


Figura 2.1. Orden de los cursos del sistema arroyo Toledo-Carrasco (Arocena & Pintos 1988).

2.4.3. HIDROMORFOLOGÍA DE LA CUENCA DEL SANTA LUCÍA

Los tramos de 29 arroyos (de orden 2 y 3) muestreados en 7 zonas de tres ecorregiones (penillanura cristalina, planicie sedimentaria y sierras metamórficas) de la cuenca del río Santa Lucía (Arocena *et al.* 2008) presentaron una gran variedad de anchos húmedos (1-20 m), aunque el 90% tuvo menos de 5 m (Arocena *et al.* 2008). Lo mismo sucedió con la profundidad, que varió entre 10 cm y más de 2 m, pero el 90% presentó profundidades menores al metro.

El factor forma y la elongación de sus cuencas no mostraron diferencias entre ecorregiones. Solo en una cuenca muy alargada el factor forma fue 0.06. En el resto varió entre 0.17 y 0.62. La tasa de bifurcación (2.8-6.8) y la sinuosidad (1.2-1.8) de los cursos tampoco mostraron diferencias entre ecorregiones.

Encontramos correlaciones positivas ($p < 0.05$) entre altitud, pendiente y longitud geográfica, ya que las mayores alturas, pendientes y relieves se encuentran hacia el este de la cuenca. Similares densidad de tramos y sinuosidad en toda el área, indican que se trata de una red fluvial muy homogénea. El primer eje de un ACP (Análisis de Componentes Principales) representó el tamaño de las cuencas, el segundo la topografía y el tercero la sinuosidad. El segundo eje distinguió claramente las 3 ecorregiones.

LUZ Y CALOR

RAFAEL AROCENA

LA MAYOR PARTE DE LA ENERGÍA EN LA SUPERFICIE DE LA TIERRA PROVIENE del Sol. Esta radiación solar global no es una variable única, sino un conjunto continuo de radiaciones de diferente longitud de onda (λ). A la superficie terrestre llegan radiaciones de 300 a 3000 nm, siendo el rango visible de 400-700 nm (o 380 a 750 nm, según el observador). Por debajo (300-380 nm) está la radiación ultravioleta (UV), dañina para los organismos, y por encima (750-3000 nm) la infrarroja (IR) que produce calor.

La luz y demás ondas electromagnéticas solares, son formas de energía radiante que al ser absorbidas por el agua se transforman en calor o, mediante la fotosíntesis, en la energía química que sostiene prácticamente toda la vida en el ecosistema. Su incidencia y distribución vertical en el agua son pues factores determinantes de la estructura térmica, la producción primaria y el funcionamiento todo del ecosistema acuático.

3.1. LUZ

La radiación solar global es la suma de las radiaciones directa, difusa (dispersada en la atmósfera) y reflejada (por superficies adyacentes). Su medida implica la integración en un rango particular del espectro, normalmente la radiación fotosintéticamente activa (PAR) entre 400 y 700 nm, aunque las algas pueden fotosintetizar por fuera de este rango.

Todas las ondas electromagnéticas se desplazan en el vacío a la velocidad de la luz, constante (c) que vale 3×10^8 m.s⁻¹ y equivale al producto de la longitud de onda por la frecuencia (ν), que por lo tanto son inversamente proporcionales:

$$c = \lambda \cdot \nu = 3 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$$

La energía de un cuanto de luz (E) es directamente proporcional a su frecuencia y la constante de proporcionalidad es la de Planck ($h = 6.6 \times 10^{-27}$ erg.s⁻¹). Por ello el UV produce efectos moleculares dañinos y el IR apenas vibración térmica:

$$E = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda$$

La energía radiante (joules J) recibida por unidad de tiempo es la potencia de radiación (watts W), y ésta por unidad de superficie es la densidad de flujo irradiante o irradiancia (W m⁻²). 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.

$$1 \text{ J} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} = 1 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$$

La radiación PAR se mide en μmol (fotones) m⁻² s⁻¹ o $\mu\text{Einstein}$ m⁻² s⁻¹, ya que un Einstein es un mol de fotones, o cantidad de fotones igual al número de Avogadro (6.023×10^{23}). La energía de un Einstein varía con la longitud de onda y por cada nanómetro de ésta equivale a 119.610,083 J nm⁻¹. Para 500 nm es:

$$1 \text{ E}_{500} = 239220 \text{ J}_{500}$$

$$1 \mu\text{E}_{500} = 0.24 \text{ J}_{500}$$

$$1 \text{ J}_{500} = 4.18 \mu\text{E}_{500}$$

3.1.1. IRRADIANCIA

La irradiancia es una medida necesaria para realizar balances de energía calórica o en estudios de calidad ambiental; asimismo, en el rango de la radiación PAR, en estudios de ecología y fisiología algal, así como de producción, ya que las transferencias a niveles tróficos superiores suelen expresarse en unidades de energía.

En los solarímetros o piranómetros, una superficie blanca y negra (termopila) recibe la radiación y se calienta de forma diferente según el color. Las diferencias de temperatura son una función lineal de la irradiancia. Una cúpula de cristal limita el rango de longitudes de onda entre 300 y 2800 nm. Estos aparatos miden la densidad del flujo de radiación solar (kilovatios por metro cuadrado) en un campo de 180 grados. 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, basadas en las propiedades fotoeléctricas de este elemento, eran las más usadas antes de que se difundieran las de silicio.

En los piranómetros fotovoltaicos el principio de funcionamiento no es térmico sino fotoeléctrico. Un fotodiodo capaz de detectar las ondas electromagnéticas visibles e infrarrojas, genera un voltaje con el que se pueden conocer los datos de radiación. En este tipo de piranómetros es posible adosar filtros de ciertas bandas del espectro solar, y así conocer también la composición espectral de la luz. Son más sensibles a pequeñas irregularidades y cambios debido a que no tienen inercia térmica como los térmicos.

Hay tres tipos de fotodiodo (Geider & Osborne 1992): plano (πr^2), semiesférico (2π) y esférico (4π). Los sensores planos son más apropiados para estudios con algunas macrofitas emergentes o con estructuras fotosintetizadoras flotantes o sobre un sustrato; los 2π si la luz proviene solo de arriba (o de abajo) y los 4π si la luz vie-

ne en todas las direcciones. El primero se llama coseno-corregido 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 2π y 4π , cuya respuesta es igual para todos los fotones independientemente del ángulo.

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.

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 del medio acuático. 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 y al reflejo de una superficie desde debajo del sensor. La combinación de ambas radiaciones provee una medida global de la PAR disponible.

Para realizar medidas de luz de todas las direcciones en el laboratorio, existen aparatos miniaturizados con sensores sumergibles hasta 1 m de profundidad por 30 s, especialmente convenientes para cámaras de cultivo e incluso para viales.

3.1.2. TRANSMISIÓN

Al pasar por el agua, la luz es absorbida (calor) y dispersada (luz difusa), lo que sumado constituye la extinción o atenuación de la luz. La extinción es la disminución de la luz monocromática en soluciones puras, mientras que la debida a la absorción y refracción es la atenuación. Ésta depende del espesor de la columna de agua (profundidad) y de su turbidez. Las burbujas de aire o espuma, el hielo y la nieve aumentan fuertemente la atenuación de la luz (Lampert & Sommer 2007).

La turbidez es una medida de la dispersión de la radiación, la que se debe principalmente a las partículas suspendidas. Suele expresarse en unidades nefelométricas de turbidez (NTU en inglés) y medirse con un nefelómetro –del griego νέφος (*néfos*: nube) y μέτρον (*métron*: medida)– o turbidímetro. Estos aparatos registran la luz que llega a una fotocelda dispuesta en un ángulo de 90° respecto a una fuente de luz, es decir, la luz reflejada por las partículas suspendidas.

La medida de la PAR a diferentes profundidades es una estimación de la luz disponible para la fotosíntesis en las mismas. Esto se logra descendiendo el sensor hasta cada profundidad en la que se realiza la medida. Una forma más exacta y eficaz para grandes profundidades son las series de sensores múltiples (6-10) ubicados simultáneamente a las distintas profundidades.

La atenuación difiere para cada longitud de onda, por lo que el color varía en profundidad. En agua pura el rojo se absorbe primero y el azul tiene la mayor transmisión. En la naturaleza, los sólidos disueltos y particulados cambian la composición espectral de la luz según su propia composición. Las aguas ricas en CaCO_3 suspendido dispersan más la luz verde-azulada. La materia orgánica dispersa el amarillo-marrón y las algas el verde, confiriéndole tales colores al cuerpo de agua.

El resto de la luz que no es atenuada se transmite en un porcentaje (T%) 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 conocida como de Lambert, Bouguer, Beer o sus posibles combinaciones:

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

donde I_0 e I_z son la irradiancia en superficie ($z = 0$) y a la profundidad z , respectivamente, y η 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 2π) entre 0.1 m^{-1} en aguas muy claras a 4.0 m^{-1} en sistemas muy turbios.

El coeficiente de extinción puede obtenerse para cada metro y promediarse para toda la columna, o bien a partir de la correlación entre $\text{Ln}(I_z)$ y la profundidad (z). Las curvas de penetración de la luz son rectas cuando éstas se grafican en un eje logarítmico.

La distribución de la luz en profundidad se representa mediante perfiles (Fig. 3.1). Los perfiles son gráficos muy usados en limnología y oceanografía, en los que la profundidad, a pesar de ser la variable independiente, se ubica en el eje vertical y su escala invertida 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 dependiente, cuya distribución vertical se desea graficar, y se ubica en la parte superior de la figura.

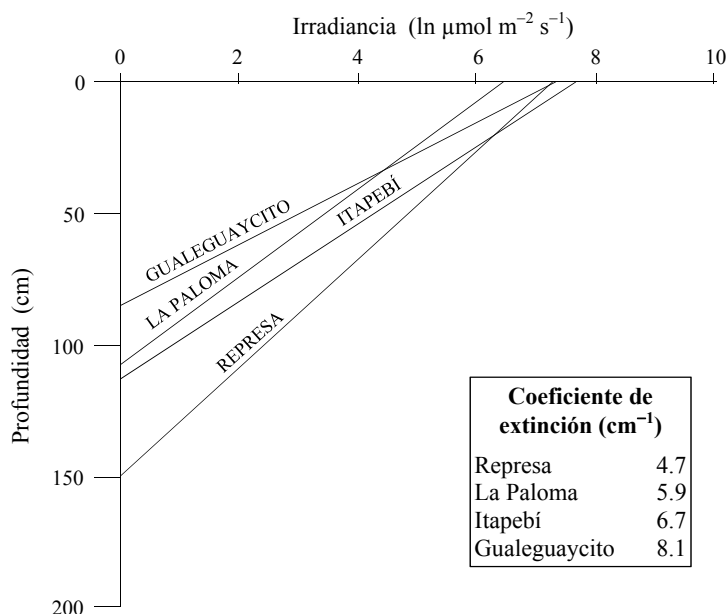


Figura 3.1. Penetración de la radiación fotosintéticamente activa (PAR) y coeficientes de extinción en cuatro estaciones del embalse de Salto Grande en julio de 1993. Las mediciones de radiación PAR fueron realizadas con un irradiómetro equipado con un sensor 4π (Chalar *et al.* 1993).

3.1.3. TRANSPARENCIA

Un método simple, largamente empleado para evaluar el ambiente lumínico, consiste en medir la transparencia del agua mediante el Disco de Secchi. Este es un disco normalmente de 20 cm de diámetro dividido en cuatro cuadrantes alternadamente 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 entre 1.4 y 3, dependiendo de condiciones locales y del observador.

3.1.4. ZONA EUFÓTICA

La zona superior, iluminada, de un cuerpo de agua se denomina zona eufótica, mientras la profunda y oscura 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, y puede obtenerse de la gráfica de penetración de la luz (Fig. 3.1). 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. Sin embargo, el valor empírico del 1% fue determinado en regiones templadas. Estudios realizados en Brasil en los 80s, muestran que en lagos tropicales el punto de compensación puede estar mucho más profundo que al 1% debido a la alta intensidad de la radiación incidente (Esteves 2011). Esto se debe a que los productores primarios fotosintetizan en base a valores absolutos y no relativos.

3.2. CALOR

La radiación solar que incide en la superficie de un ecosistema acuático es absorbida en las primeras capas de agua, transformándose en calor. Más de un 50% 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 me-

dianate el transporte de agua o advección. De no ser así, la curva de temperatura sería similar a la de la luz. La mezcla puede alcanzar toda la columna de agua si no hay diferencias de densidad que se le opongan, 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⁻¹) y mínima para el hielo (0.9168 g ml⁻¹). 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⁻¹, 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.

3.2.1. 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 estratifica, 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 (Lampert & Sommer 2007). En los cálidos es suficiente 0.1 °C por metro (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, por lo cual estos lagos son tan estables como los templados aunque tengan 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 con suficiente profundidad y/o protección del viento. La mezcla del epilimnion puede disminuir en períodos cálidos y calmos, formándose varias termoclinas secundarias, debido a que la original es poco estable, los vientos no son muy fuertes y/o a la pérdida de calor por la noche (Esteves 2011). 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. Puede ocurrir diariamente en lagos tropicales someros, que se estratifican durante el día y mezclan durante la noche. Las variaciones del ciclo anual condujeron a sucesivas clasificaciones. Entre

las numerosas categorías de Hutchinson & Löffler (1956) (Wetzel 2001), 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 poli-mícticos, 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.

3.2.2. 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 (1984b) 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 ρ_m es la densidad del agua durante la mezcla total, que sustituye el valor unitario solo aplicable a lagos templados dimícticos ($T_m = 4$ °C). A_0 es el área superficial, A_z el área y ρ_z la densidad correspondientes a cada profundidad z , y z_g la profundidad del centro de gravedad para el volumen V , según:

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

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 ρ_s y ρ_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 Térmica Relativa:

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

donde ρ_t es la densidad en la parte superior y ρ_b en la inferior de la capa de agua, ρ_4 y ρ_5 la densidad a 4 y 5 °C respectivamente.

3.2.3. 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 im-

portar en sistemas someros, pero el factor principal del balance es el intercambio de calor con el aire. Éste 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 2001) 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).

3.2.4. 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 prevaletes 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 (Fig. 3.2).

Las botellas deben ser de un material inerte como vidrio, acrílico o plástico de buena calidad. La botella Ruttner 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.

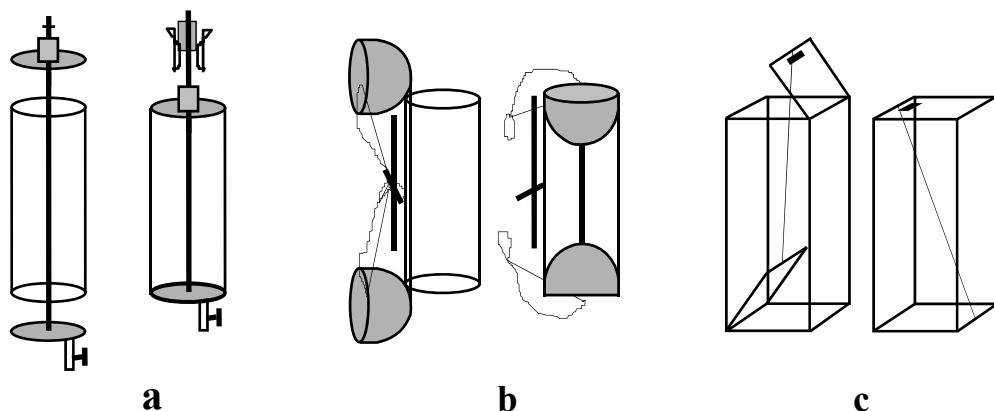


Figura 3.2. Botellas muestreadoras de agua: a) Ruttner, b) Van Dorn y c) Schindler, abiertas y cerradas.

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

3.3. RESULTADOS

3.3.1. PENETRACIÓN DE LA LUZ EN UN GRAN EMBALSE

La penetración de la luz en el embalse de Salto Grande sobre el río Uruguay (Fig. 3.1) 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 los sedimentos, presentó un coeficiente de extinción algo mayor. Las estaciones Gualeguaycito e Itapebí corresponden a dos

brazos laterales, y presentan los mayores coeficientes de extinción debido a la alta concentración de material en suspensión proveniente de las cuencas de drenaje y transportado por los arroyos respectivos.

3.3.2. CICLO TÉRMICO DE UN LAGO DE ARENERA

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 3.3 se presenta un ciclo térmico anual para el lago Ton-Ton (Canelones).

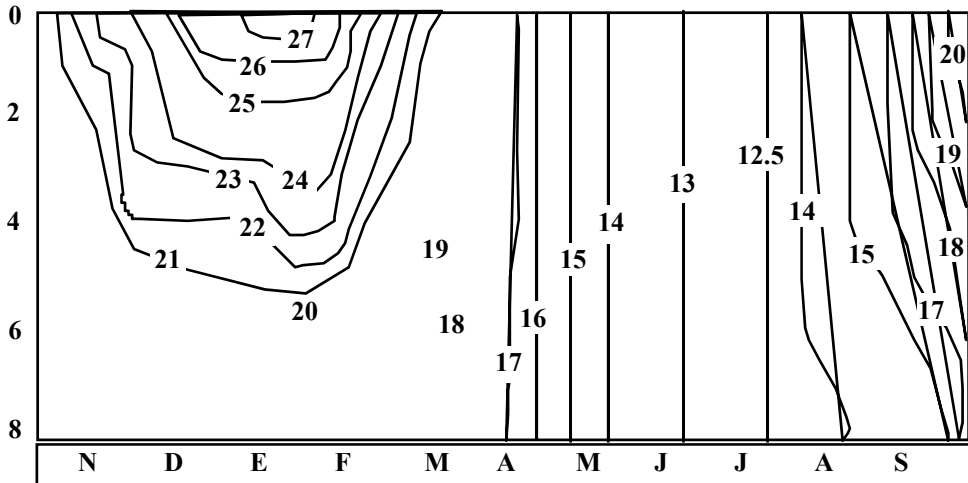


Figura 3.3. Ciclo térmico del lago Ton-Ton durante 1986. El lago es monomítico cálido y presenta una estratificación estable desde fines de octubre hasta marzo (tomado de Sommaruga 1991).

MOVIMIENTO

RAFAEL AROCENA

EL MOVIMIENTO DEL AGUA AFECTA LA DISTRIBUCIÓN DEL CALOR Y DE LAS demás propiedades y componentes de los ecosistemas acuáticos. El movimiento es generado principalmente por el viento y comprende diversas oscilaciones rítmicas y no rítmicas en la superficie y zonas profundas de los cuerpos de agua. La forma de la cubeta, la estratificación térmica del agua y la exposición al viento del lago, son los factores más importantes que determinan y condicionan dichos movimientos (Wetzel 2001).

Cuando el agua en contacto con una interfase (aire, fondo u otra capa de agua de distinta densidad) supera cierta velocidad crítica de pocos mm s^{-1} , su movimiento se desordena, aparecen remolinos (*eddies*) y el flujo laminar (de corrientes iguales y paralelas) se convierte en turbulento, que 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.

4.1. TURBULENCIA

La turbulencia depende de la relación entre el cambio de velocidad y la viscosidad del líquido, relación que puede ser definida por el número adimensional de Reynolds:

$$\text{Re} = \rho UL / \eta = UL / \nu$$

donde U es la velocidad media, L la distancia sobre la cual la velocidad varía, η la viscosidad y ν la viscosidad cinemática ($1.004 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ en agua dulce a 20 °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 de la velocidad media del agua. Para profundidades mayores a 10 cm, es suficiente una velocidad de 10 cm s^{-1} para que el flujo sea turbulento.

Otro descriptor fácilmente calculable para corrientes, es el número 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 existe 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 & Castillo 2007).

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

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

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 $8 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

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

4.3. OLAS

La importancia de las olas en los lagos 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 (λ), frecuencia (ν) 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*, 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):

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

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.

4.4. 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. Las corrientes horizontales resultantes bajo el nodo son los mayores movimientos de agua profunda en los lagos.

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 se produce así un movimiento oscilatorio (seca interna), de amplitud y período 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.

La estabilidad vertical de la columna de agua puede estimarse mediante la frecuencia de Brunt-Vaisala (N) de la seca interna, basada en la diferencia de densidades en un determinado rango de profundidad:

4.5. 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 (ca. 6 m s^{-1}), 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 entra con determinado caudal (Q) a una mayor sección (S), por lo que reduce su velocidad ($v = Q/S$) mientras aumenta la profundidad (z) hasta cierta sección crítica caracterizada por el número densimétrico de Froude (Bruner de Miranda 2002):

$$F = (Q/S) / \sqrt{g(\Delta\rho/\rho)z}$$

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^{-1} 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 líneas de convergencia se acumulan materiales y espuma (Fig. 4.1).

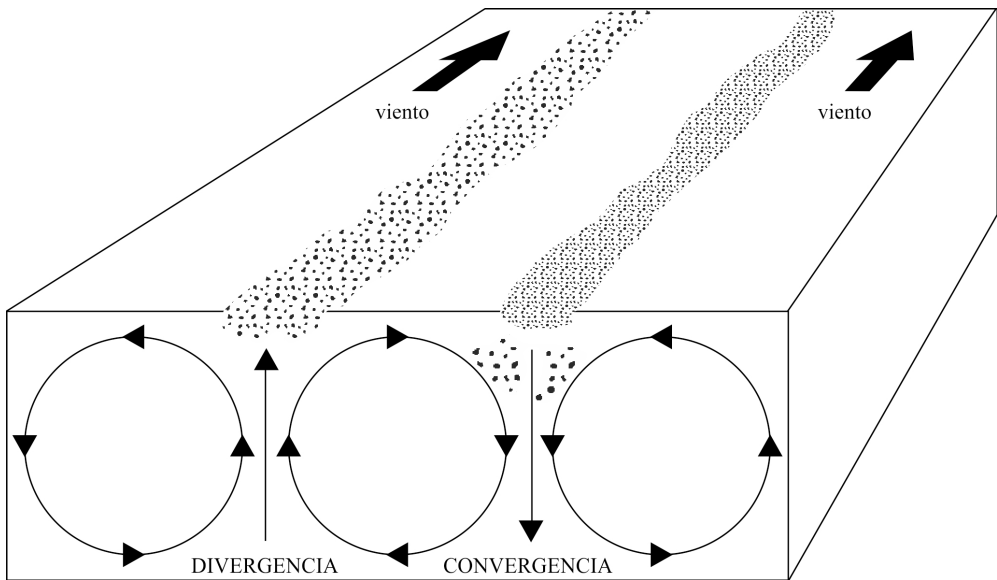


Figura 4.1. Esquema de las celdas de Langmuir y las líneas de convergencia y divergencia.

4.6. CORRIENTE FLUVIAL

La corriente fluvial es el movimiento del agua de un río o arroyo canal abajo. 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 debido a la resistencia de estas interfases. Decece logarítmicamente con la profundidad según:

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

La velocidad media del perfil vertical coincide aproximadamente con la velocidad al 60% de la profundidad y con un 80% de la velocidad de superficie. Su medición puede hacerse entonces con un correntómetro a una profundidad equivalente al 60% de la profundidad total, o con un flotador cuya velocidad, medida a lo largo de cierto trecho, es multiplicada por 0.8 (Allan & Castillo 2007).

Los sitios de mayor velocidad de corriente y erosión son los llamados rápidos (*riffles*), y donde aquélla es más lenta y domina la acumulación, se forman los remansos (*pools*).

4.6.1. CAUDAL

El caudal, flujo o descarga es la cantidad de agua que lleva un río en cierto tiempo, la 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 (L) 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 (U):

$$V = SL = ZWL$$

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

La medición debe realizarse en un sitio (estación de aforo) ubicado en un tramo recto y sin obstáculos, a efectos de que la corriente sea lo más homogénea posible. Una vez medido el ancho, éste se divide en tramos iguales, convenientemente en 6 o más 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 (Guilcher 1979).

4.6.2. 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 descende. 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 se van haciendo 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:

$$P = 1/T$$

4.7. 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 algunas 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 primera aproximación a la dinámica del sistema.

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

4.8. RESULTADOS

4.8.1. HIDRODINÁMICA DE SALTO GRANDE

En la figura 4.2 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).

4.8.2. CURVA DE AFORO DE UN ARROYO PAMPÁSICO

Los arroyos de Uruguay son de muy variado tipo. Muchos son encajonados, con un canal profundo (>2 m) y orillas altas (>1 m). Pero muchos otros, o los mismos en algunos tramos, son someros y de orillas anegadizas y generalmente cubiertos de macrófitas. En éstos la relación entre el caudal y la profundidad es muy variable, como lo muestra la figura 4.3 para el arroyo Manantiales. Sin embargo, el ajuste del modelo logarítmico a los datos es igualmente muy significativo ($p < 0.001$).

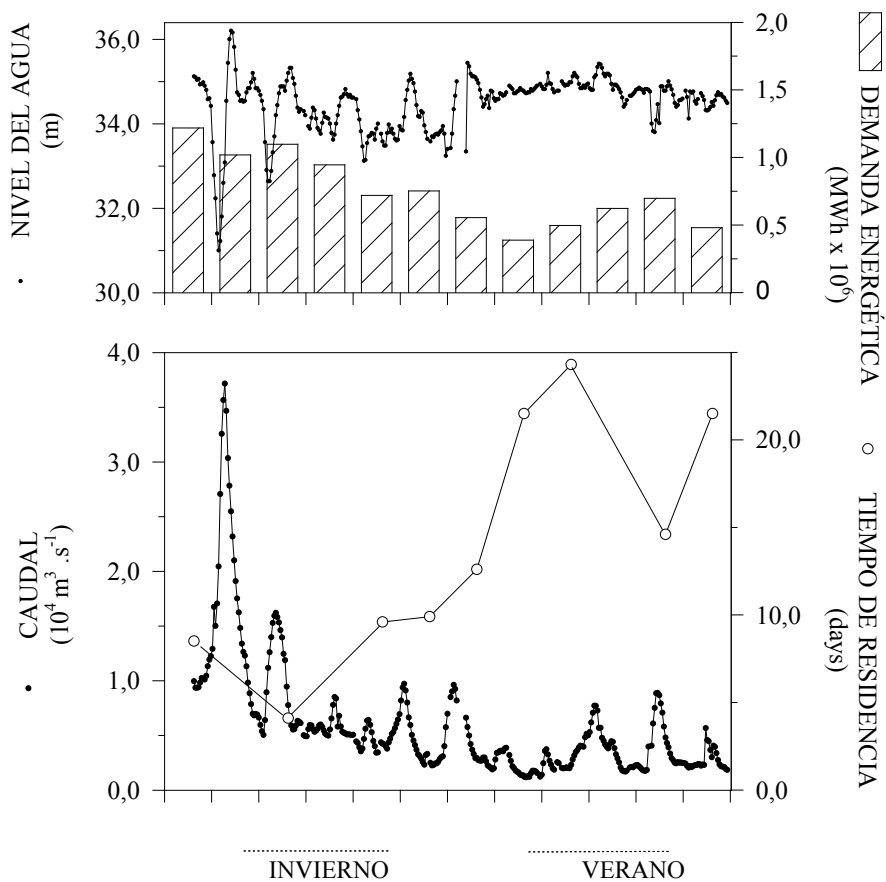


Figura 4.2. Aspectos hidrológicos del embalse de Salto Grande durante 1992 y 1993.

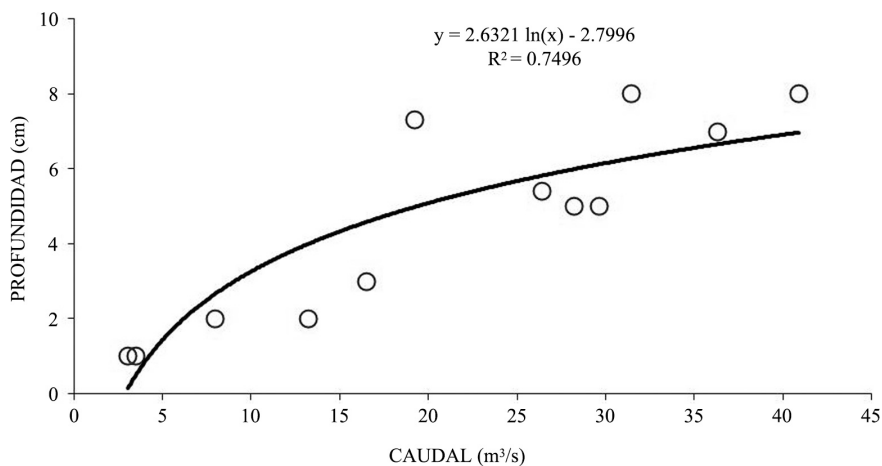


Figura 4.3. Curva de aforo del arroyo Manantiales, Florida.

SEDIMENTOS

RAFAEL AROCENA

EL SEDIMENTO ACUMULADO SOBRE EL FONDO DE LOS ECOSISTEMAS ACUÁTICOS comprende una fase sólida y otra líquida. Esta última constituye entre 20 y 80% del peso del sedimento, dependiendo del tamaño y compactación de las partículas sedimentarias. Éstas pueden ser por su origen alóctonas, autóctonas o autigénicas (formadas en el sedimento mismo). También podemos distinguir dentro de la fase sólida una fracción orgánica de otra inorgánica.

En la interfase agua-sedimento existe un intercambio de materia y energía, proceso que incide en las propiedades físicas y químicas tanto de la columna de agua como del sedimento. En los lagos, las partículas menores a 1 mm se resuspenden fácilmente, formando con frecuencia una capa difusa llamada nefeloide. Los sólidos disueltos, como ser los nutrientes, en general tienen concentraciones mayores en el agua intersticial del sedimento que en la columna de agua, por lo cual difunden hacia ésta.

El tipo de sedimento determina la composición y abundancia de la comunidad bentónica (ver Caps. 10 y 13) y brinda un registro histórico del cuerpo de agua y su cuenca, como se describe en el capítulo 15. Su contenido de materia orgánica y de nutrientes disueltos pueden ser indicadores del estado trófico del sistema lacustre. Sin embargo, en sistemas con altas temperaturas o en caso de resuspensión del sedimento, la mayor descomposición de la materia orgánica ocurre en la columna de agua, por lo cual su concentración en el sedimento es baja a pesar de una alta producción primaria (Esteves 2011).

En los sedimentos suelen acumularse contaminantes orgánicos (*e.g.*, plaguicidas) e inorgánicos (*e.g.*, metales pesados) cuyas concentración en el agua puede ser indetectable o su vertido intermitente.

Las propiedades del sedimento varían horizontalmente según la morfometría del sistema, pero sobre todo varían verticalmente, dependiendo de su estructura, su biota, y de la energía y características del agua de fondo. El perfil vertical de indicadores de contaminación en el sedimento puede mostrar la evolución de la misma en el tiempo. En general se distingue una capa superior de sedimentos recientes con fuerte actividad biológica, en especial de macroinvertebrados, y otra profunda, antigua y sin los mismos, pero con actividad bacteriana, generalmente anaeróbica.

En los sistemas fluviales los sedimentos forman parte de la llamada zona hiporreica, junto al agua del subsuelo bajo el cauce y la zona riparia. Es un ecotono entre las aguas superficiales y subsuperficiales con fronteras espacial y temporalmente cambiantes. Es una zona de activo intercambio y retención de materia orgánica, nutrientes y agua. Ésta, en algunos tramos –generalmente de perfil longitudinal convexo–, fluye del río al subsuelo y en otros –de perfil cóncavo–, en sentido contrario. Las últimas son las zonas de recarga fluvial (Dahm *et al.* 2006).

5.1. MUESTREO

5.1.1. 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 incluida en el lago.

5.1.2. 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 y la llegada al fondo, para lo cual debe dejar pasar libremente el agua hacia arriba.
- 2) Minimizar la deformación y compactación del sedimento, 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 al introducirse en el fondo, 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 los extremos superior e inferior.
- 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 (Fig. 5.1) es muy utilizada en estudios de sedimentos y bentos. Consiste básicamente en una caja de bronce o acero inoxidable abierta arriba y abajo. Dos medias tapas superiores y dos mandíbulas inferiores permanecen abiertas durante el descenso. Las últimas se cierran por fuertes resortes, cortando el sedimento cuando son liberadas por un mensajero. Esta draga no es apropiada para sedimentos arenosos o de mayor tamaño de grano, porque los mismos limitan su profundidad de penetración y obstruyen su mecanismo de cierre.

La draga Petersen (Fig. 5.1) 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 (Fig. 5.1) 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.

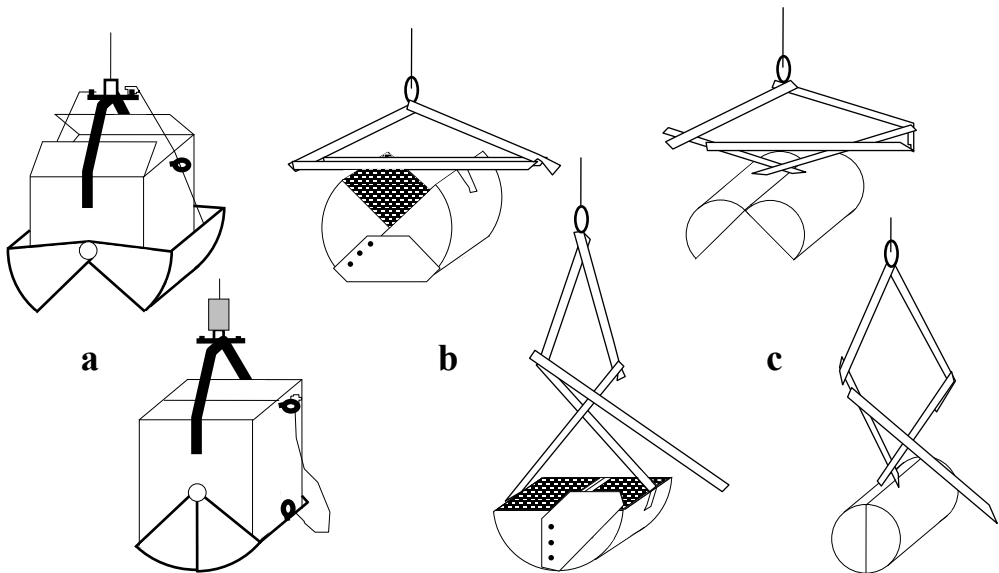


Figura 5.1. Dragas Ekman (a), Petersen (b) y Ponar (c), abiertas (arriba) y cerradas (abajo).

Son tubos largos y abiertos en sus extremos, normalmente de plástico o acrílico transparente. Penetran el sedimento por gravedad y luego se cierran herméticamente por arriba para evitar la presión hidrostática sobre la muestra. Ésta 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.

Entre sus muchas variantes, el Kajak y el Kajak-Brinkhurst son los más comunes (Fig. 5.2). 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 (Fig. 5.2). 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 triangulares y 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.

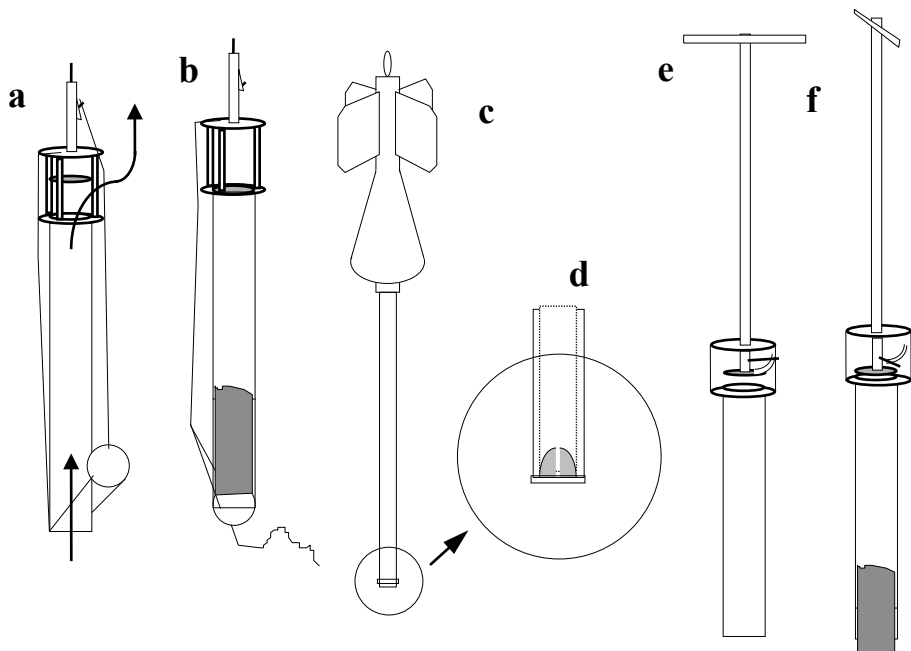


Figura 5.2. Corers tipo Kajak en descenso (a) y en ascenso con la muestra (b), Phleger (c) con detalle del extremo inferior conteniendo el tubo y la piel de naranja (d), y Gilson en posición de descenso (e) y de ascenso con la muestra (f).

El muestreador Gilson está provisto de un largo mango, para su uso en aguas someras (Fig. 5.2). 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.

5.1.3. 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 convenientemente. Esto permite una clasificación directa, como la basada en Naumann (1931) (Esteves 2011):

- 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.
- 3) Fracción mineral dominante (>90%), propio de lagos oligotróficos, color claro.

5.2. 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, tomando como réplicas dos o más sectores 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 deformar 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 (Häkanson & 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. Esta agua puede extraerse 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 μm si se hace en una atmósfera con nitrógeno gaseoso puede evitar la oxidación. Las cámaras o bolsas de diálisis conteniendo agua destilada permiten un muestreo *in situ* y a varias profundidades simultáneas. Deben permanecer en el sedimento hasta que alcancen 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.

5.3. 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 al menos 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 5.1). Las unidades Φ equivalen al $-\log_{(2)}$ del diámetro expresado en mm.

Tabla 5.1. Escala de tamaño y denominación de los sedimentos basada en la escala de Krumbein y la nomenclatura de Wentworth.

mm	Φ	Wentworth
> 256	< -8	canto rodado
128 - 256	-7	guijarro
64 - 128	-6	guijarro
32 - 64	-5	pedras
16 - 32	-4	grava gruesa
8 - 16	-3	grava media
4 - 8	-2	grava fina
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

5.3.1. ANÁLISIS

Una vez obtenida una cantidad suficiente de muestra, que depende del tamaño de grano (Tabla 5.2), se puede determinar su distribución de frecuencias por diversos métodos. Para tamaños menores a 64 o 32 μm se recurre a la velocidad de sedimentación como en el pipeteado, mientras que para los mayores, al tamizado.

Tabla 5.2. 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 eliminar la cohesión de las partículas que impide su separación.

Procedimiento

- 1) Calentar 150-250 g de muestra acuosa en un vaso de precipitado Pyrex de 1 l.
- 2) Antes de alcanzar la ebullición, agregar con suma precaución 100-120 ml de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada, H₂O₂) de 30 volúmenes.
- 3) Mezclar y repetir la operación hasta que cese el ataque del peróxido.
- 4) Lavar las paredes del recipiente y llevar a ebullición hasta eliminar todo el peróxido.

TAMIZADO

Puede hacerse con 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 μm (-1 a 5 Φ), 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 solo de limo y arcilla, separando el material más grueso mediante lavado por un tamiz de 63 o 32 μm .

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 C₂O₄Na₂ por litro) o 0.04 N de carbonato de sodio (2.12 g de Na₂CO₃ por litro).

Tras la dispersión se completan 1000 ml con agua destilada y se lee la temperatura. Ésta probablemente no varíe significativamente en el lapso de aproximadamente una hora, durante el que se hacen las extracciones para las fracciones de hasta 8 Φ . Para tamaños menores (4-68 h), 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 5.3 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 primera fracción en 1000 ml. Por lo tanto, este peso se debe restar del peso del sedimento total agregado (T), para obtener la primera 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 5.3. Tiempos y profundidades (cm) de extracción para el análisis granulométrico de limo y arcilla a diferentes temperaturas (°C).

Φ	μm	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 01 s	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

5.3.2. CÁLCULOS

La coexistencia de varios tamaños de grano en un mismo sedimento obliga a su tratamiento estadístico. Los pesos obtenidos para cada fracción se transforman en porcentajes, y con éstos se construye un histograma (% vs. Φ) en el que los tamaños mayores aparecen a la izquierda, disminuyendo (aumentando Φ) 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 el tamaño límite entre la mitad de tamaño más grande y la de más pequeño. 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 Φ 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 ajustada a una recta, graficando sobre una escala probabilística. De allí pueden obtenerse la media (\bar{x}), mediana (m), desvío estándar (σ) 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 (Sk) 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:

$$Sk = (Q16 + Q84 - 2Q50) / [2(Q84 - Q16)] + (Q95 + Q5 - 2Q50) / [2(Q95 - Q5)]$$

$$K = (Q95 - Q5) / [2.44(Q75 - Q25)]$$

En las tablas 5.4, 5.5 y 5.6 se presentan las diferentes clases de selección, asimetría y curtosis, respectivamente, con las que puede clasificarse una muestra de sedimento.

Tabla 5.4. Clases de selección según el desvío estándar (σ).

σ	Clase
< 0.35	muy bien seleccionada
0.35 - 0.50	bien seleccionada
0.50 - 1.00	moderadamente seleccionada
1.00 - 2.00	pobrementemente seleccionada
2.00 - 4.00	muy pobrementemente seleccionada
> 4.00	muy mal seleccionada

Tabla 5.5. Clases de asimetría (Sk).

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 5.6. Clases de curtosis (K).

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 forma más simple de clasificación 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. 5.3).

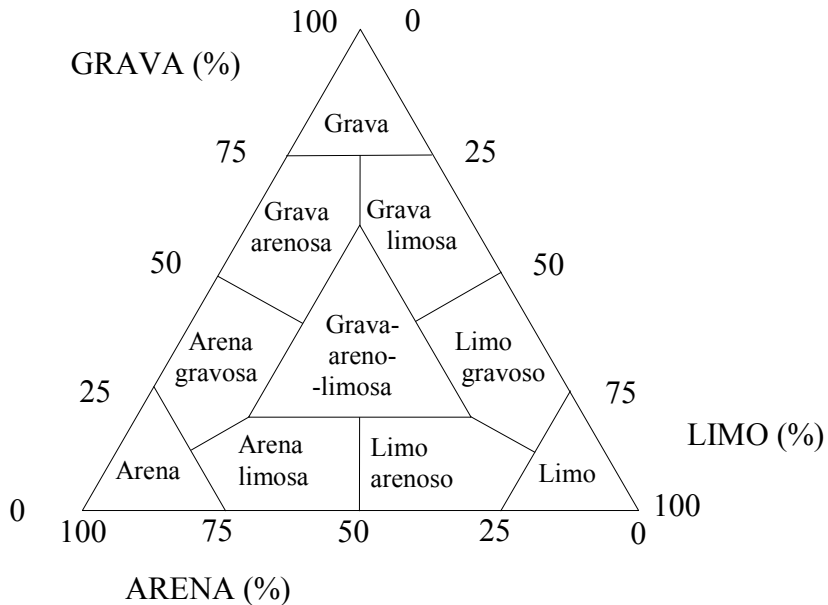


Figura 5.3. Diagrama triangular de Shepard para determinar la clase de sedimento según el porcentaje presente de cada fracción. Eventualmente puede cambiarse grava por arcilla.

5.4. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

5.4.1. PESO SECO Y POROSIDAD

La muestra de sedimento, 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, como 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.

5.4.2. 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. Ésta equivale aproximadamente al doble del contenido de carbono cuando las pérdidas son mayores al 10%. Como solo se trata de una aproximación gruesa del contenido orgánico, siempre debe referirse como “pérdida de peso por ignición”.

Procedimiento

- 1) 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.
- 2) Entre 1 y 2 g de muestra seca llevada a temperatura ambiente en un desecador.
- 3) Pesar a 0.1 mg y quemar en una mufla a 450 °C durante dos horas.
- 4) Luego de enfriada en desecador se vuelve a pesar en la misma balanza analítica.
- 5) La diferencia de pesos se expresa como porcentaje de materia orgánica en el total.

5.4.3. POTENCIAL DE ÓXIDO-REDUCCIÓN

La intensidad de óxido-reducción (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 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 condiciones de 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 punto de máximo gradiente vertical de este parámetro. 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 solo 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 (Hg₂Cl₂) saturado con KCl, cuyo potencial referido al electrodo de hidrógeno (+240 mV) debe sumarse al potencial medido en un potenciómetro (*e.g.*, un pH-metro con escala en mV) para hallar el Eh.

Procedimiento

- 1) Preparar una solución estándar según ZoBell (1946): 109.72 mg de K₃Fe(CN)₆ y 122.75 mg de K₄Fe(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 H₂SO₄ 4% y enjuagar con agua destilada desionizada.
- 4) Sumergir el electrodo de calomel en el agua sobrenadante de la muestra y cerrar el circuito introduciendo el electrodo de platino en el sedimento.
- 5) Permitir la estabilización de las mismas durante algunos minutos y tomar la lectura.
- 6) Repetir el lavado entre lecturas.
- 7) A los valores obtenidos sumar 240 mV para obtener el valor final de Eh.

5.4.4. DEMANDA DE OXÍGENO

La demanda de oxígeno del sedimento (DOS) es una medida del metabolismo en la interfase agua-sedimento. Mide tanto el consumo por del gas por respiración de

los organismos como por 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 no perturbado 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. 5.4).

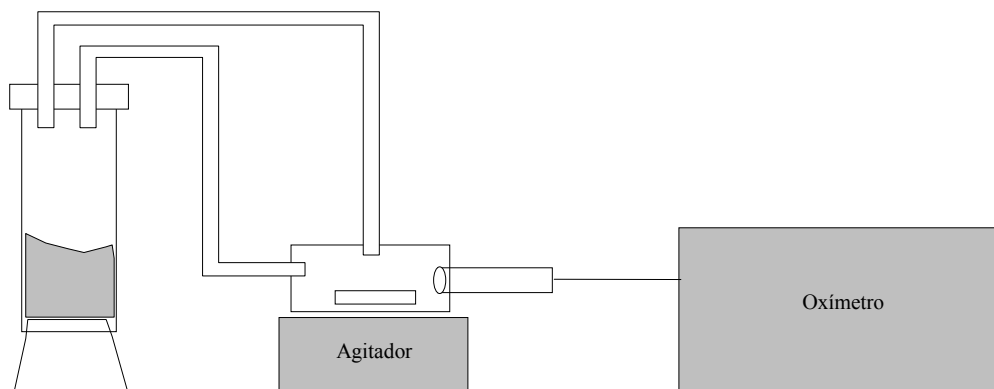


Figura 5.4. Dispositivo para la medición de la demanda de oxígeno del sedimento.

Procedimiento

- 1) Acondicionar la muestra a la temperatura del medio donde se colectó.
- 2) Extraer cuidadosamente el agua sobrenadante con una manguera, filtrarla (0.45 μm), airearla y regresarla al *corer* cuidando de no perturbar la superficie del sedimento.
- 3) Luego de 1 a 2 h 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 30-60 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 (mg l^{-1}), V el volumen de agua del sistema (l), t el tiempo (h) y A el área de la superficie del sedimento (m^2).

5.4.5. 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 de los zoobentos aumenta la aireación del sedimento favoreciendo la captura de los iones en el mismo.

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

Procedimiento

- 1) A efectos de mantener inalterada la distribución vertical de los nutrientes en el sedimento, es conveniente tomar la muestra con un *corer*, aspirar cuidadosamente el agua sobrenadante, empujar el sedimento hacia arriba con un émbolo, y cortar una pequeña capa como se describió en la sección 5.2.
- 2) Homogeneizar la muestra sobre una malla de 200-300 μm 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 7.3.6 y 7.4.2) y 1 g de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ para aumentar su capacidad oxidante.
- 5) Autoclavar durante 1 hr. 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 7.
- 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 7.3.5)

5.5. RESULTADOS

5.5.1. CONTENIDO ORGÁNICO DEL SEDIMENTO DE UNA LAGUNA COSTERA

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 sus principales afluentes (Fig. 5.5). La profundidad resulta un factor sin importancia debido a su poca variación en toda la laguna. Sin embargo, existe una zona central donde se encuentran las máximas concentraciones, tal vez relacionadas con la hidrodinámica del sistema. 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).

5.5.2. GRADIENTES QUÍMICOS EN EL FONDO DE UN LAGO ARTIFICIAL

El perfil vertical del sedimento del eutrófico lago Ton-Ton (Tabla 5.7) muestra una disminución en profundidad del contenido de materia orgánica, carbono orgánico y nitrógeno orgánico, así como del potencial redox.

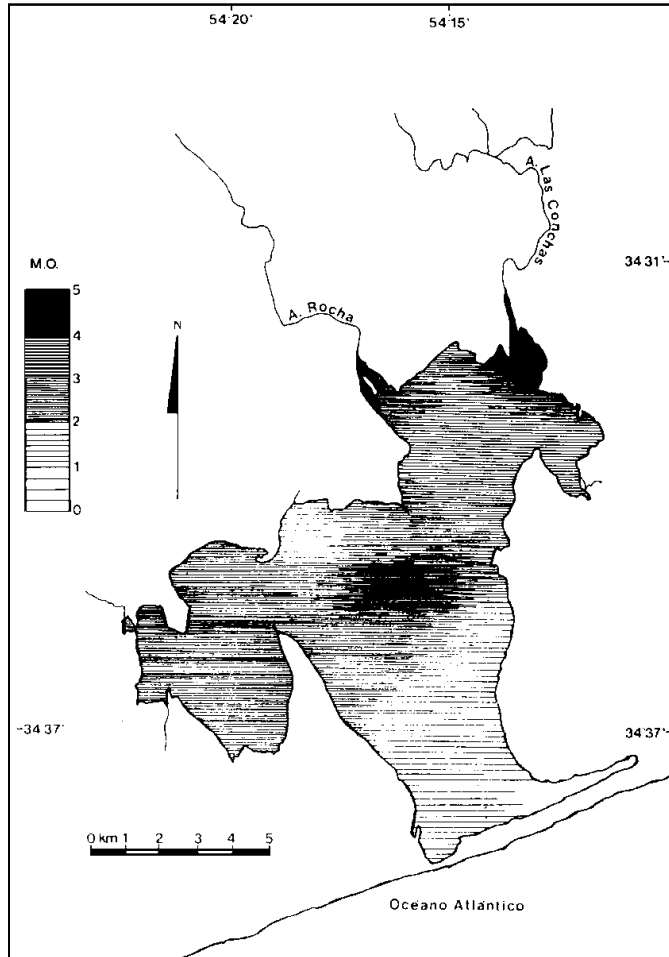


Figura 5.5. Distribución del contenido de materia orgánica (M.O. en %) en los sedimentos de la Laguna de Rocha (tomado de Sommaruga & Conde 1990).

Tabla 5.7. 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 (cm)	Materia orgánica (%)	Carbono orgánico (mg g^{-1} peso seco)	Nitrógeno orgánico	Eh (mV)
1	16.40 \pm 3.03	71.48 \pm 12.55	8.48 \pm 1.71	90 \pm 42
2	13.37 \pm 2.91	61.18 \pm 10.54	5.36 \pm 1.12	70 \pm 61
3	9.50 \pm 2.19	51.50 \pm 9.98	4.59 \pm 1.98	44 \pm 73
4	6.98 \pm 1.11	44.09 \pm 6.41	4.13 \pm 1.16	16 \pm 82
5	5.48 \pm 1.06	40.25 \pm 4.21	3.79 \pm 0.83	-22 \pm 92

MACROCONSTITUYENTES

DANIEL CONDE Y JAVIER GORGA

LAS AGUAS CONTINENTALES CONTIENEN TANTO PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN (seston) como moléculas disueltas (menores a 0.45 μm). Las primeras incluyen seres vivos (plancton) y una fracción detritica orgánica e inorgánica (tripton). Las segundas pueden ser gases o sólidos disueltos. Entre éstos se distinguen a su vez: a) los macroconstituyentes o iones principales, cuya concentración es suficiente como para no limitar el desarrollo de los seres vivos; b) los nutrientes que sí lo hacen debido a su escasa concentración natural, y c) los microelementos o elementos traza. Éstos son metales –incluyendo los metales pesados– en concentraciones aun menores, pero más que suficientes para los requerimientos bióticos.

La composición química de las aguas continentales es muy variable y depende de las vías que recorre el agua antes de llegar a las mismas, así como de la biota, forma y tamaño de los cuerpos de agua. La biota a su vez también está influenciada por tal composición, al punto que algunas especies solo se encuentran o prosperan en determinado tipo de agua.

En el presente capítulo se abordarán los gases y los sólidos particulados y disueltos, excepto los nutrientes que son objeto del capítulo siguiente. Los elementos traza no son tratados en este libro.

6.1. GASES DISUELTOS

El oxígeno, el dióxido de carbono y el nitrógeno son los gases disueltos de mayor importancia biológica en los ecosistemas límnicos. Otros gases, como el metano, el sulfuro de hidrógeno y el monóxido de carbono, son importantes exclusivamente en condiciones subóxicas o anóxicas.

El nitrógeno gaseoso (N_2) es una molécula de dos átomos unidos por un triple enlace muy fuerte que le impide reaccionar con otras sustancias, por lo que ingresa a los ciclos biogeoquímicos luego de ser fijado por células especiales presentes solo en algunos microorganismos. A continuación se presentan los métodos más usuales para la determinación de diferentes parámetros del oxígeno y del dióxido de carbono.

6.1.1. OXÍGENO

El oxígeno disuelto en el agua brinda información sobre las reacciones bioquímicas que tienen lugar en el medio, es un indicador del balance entre fotosíntesis y respiración y por lo tanto 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⁻¹ de oxígeno disuelto, en equilibrio con la atmósfera o 100% saturación de acuerdo a la temperatura, 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 directamente en anoxia. Para su determinación se utilizan sensores *in situ* o bien métodos químicos en el laboratorio.

SENSORES

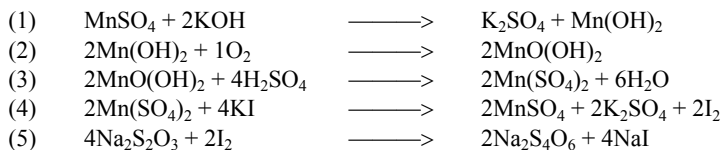
El uso de sensores brinda rapidez en las mediciones y posibilita un registro continuo de las mismas. El sensor polarográfico tipo Clark consiste en un ánodo de platino y un cátodo de oro sumergidos en un electrolito, y separados del agua por una membrana permeable al oxígeno. Éste difunde hacia los electrodos 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 concentraciones menores a 1 mg l⁻¹ de oxígeno, rango de ocurrencia de muchas reacciones químicas y microbianas ecológicamente relevantes. 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⁻¹. Para ello se recomienda calibrar el electrodo en aire o con una solución de concentración conocida de oxígeno, siguiendo las instrucciones específicas de cada 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.

MÉTODOS QUÍMICOS

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 (reacción 1), o marrón cuando el oxígeno reacciona con el hidróxido manganoso, formando óxido mangánico básico (reacción 2). El ácido sulfúrico disuelve el precipitado formando sulfato mangánico (reacción 3). La reacción entre el sulfato mangánico y el yoduro de potasio agregado previamente libera yodo produciendo un color marrón claro (reacción 4). El yodo, equivalente al oxígeno presente en la muestra, se determina por titulación con tiosulfato de sodio (reacción 5).

Reacciones:



El método es válido para un rango de 0.04 a 62 mg l⁻¹ de oxígeno disuelto y en análisis de rutina se puede obtener una precisión de 2 µg O₂ l⁻¹.

Procedimiento

- 1) Llenar con la muestra de agua una botella de vidrio para DBO (tipo Pyrex de volumen conocido y tapón esmerilado) evitando el burbujeo. Para ello se deja correr el agua por el cuello de la botella y desbordar 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 mg l⁻¹ según:

$$OD = (g \ N \ 8 \ f \ 1000) / [V_a(V_f - 2) / V_f]$$

donde g es el gasto de tiosulfato de sodio (ml), N su normalidad (0.01) y f el factor del mismo (1), V_a el volumen de la alícuota (100 ml) y V_f el volumen de la botella de DBO (ml). La concentración también puede expresarse en ml l⁻¹ dividiendo el peso en mg por 1.429.

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 con tiosulfato. Calcular el factor dividiendo 20 ml entre el gasto de tiosulfato de sodio en ml.

Reactivos

- Reactivo I: sulfato manganoso: 400 g de MnSO₄·2H₂O en AD y llevar a 1 l.
- Reactivo II: ioduro de potasio-hidróxido de sodio: 150 g de KI y 500 g de NaOH en AD y llevar a 1 l.
- Ácido 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 KIO_3 seco en AD y llevar a 1 l.

6.1.2. SATURACIÓN DE OXÍGENO

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 6.1 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 disueltos 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.

Tabla 6.1. Solubilidad del oxígeno (mg l^{-1}) en agua a nivel del mar a distintas temperaturas.

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

6.1.3. 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 trofógena 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.

Procedimiento

- 1) Determinar la concentración de oxígeno a varias profundidades luego de establecida la estratificación estival, y realizar perfiles de temperatura cada 3 a 4 semanas a lo largo del período de estratificación.
- 2) Determinar los volúmenes (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 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 en mg para cada fecha (O_i y O_f).
- 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:

$$D = 30(O_i - O_f)/(A_h t)$$

6.1.4. 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). Es el oxígeno consumido por la descomposición de la materia orgánica y por lo tanto es proporcional a la misma. 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°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, se debe 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 inhibido 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, MgSO_4 , CaCl_2 y 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°C previo a su introducción en las botellas.
- 2) Llenar una botella de volumen conocido con agua de dilución, usando una pipeta y cuidando de no tocar las paredes, hasta el borde 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 se mide el oxígeno inicial y la otra se incuba. Si se utiliza electrodo, solo 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.
- 4) Incubar durante 5 días a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad.
- 5) Además de las diluciones se debe preparar un blanco, para lo cual se llena con agua de dilución una botella similar a las utilizadas para las muestras, se mide el oxígeno inicial y se incuba con el resto de las muestras.
- 6) Luego de 5 días se mide el oxígeno final en cada botella y se resta del inicial. A esta diferencia se resta la diferencia del blanco de dilución para obtener la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) en mg l^{-1} según:

$$DBO = [(OD_i - OD_f) - (B_i - B_f)]/F$$

donde OD_i es el oxígeno inicial y OD_f el final de las muestras, B_i y B_f los del blanco (mg l^{-1}) y F la fracción volumétrica decimal de muestra usada en la dilución.

Reactivos

- *Buffer* de fosfato: Disolver 8.5 g de K_2HPO_4 , 21.75 g de KH_2PO_4 , 33.4 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 1.7 g de NH_4Cl 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 CaCl_2 en AD y llevar a 1 l.

6.1.5. 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 deben utilizar botellas de vidrio. Si el análisis no se realiza de inmediato, preservar a $\text{pH} < 2$ con H_2SO_4 conc. En las muestras con valores de DQO muy altos, se deben llevar a cabo diluciones.

Procedimiento

- 1) Poner para los siguientes volúmenes de muestra los siguientes reactivos (ml) en tubos Pyrex con tapa autoclavable:

Muestra	Sol. digestora	H_2SO_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 los tubos con muestras, blancos y estándar en un *block* de digestión y llevar a 150°C durante 2 h.
- 3) Si hay nitritos en las muestras se debe agregar 10 mg de ácido sulfámico por cada mg de NO_2 presente en la muestra.
- 4) Dejar enfriar y medir la absorbancia a 600 nm.
- 5) Preparar una curva de calibración (ver 7.2) con no menos de 5 diluciones de ftalato ácido de potasio, con valores de DQO entre 20 y $900 \mu\text{g O}_2 \text{l}^{-1}$.
- 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 en ml) según:

$$DQO = 1000 C/V$$

Reactivos

- Solución digestora: Disolver 10.216 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (secado a 103°C por 2 h), 167 ml de H_2SO_4 conc. y 33.3 g de HgSO_4 en AD y llevar a 1 l.
- Ácido sulfúrico: Agregar Ag_2SO_4 al H_2SO_4 conc. en una proporción de 5.5 g de Ag_2SO_4 por kg de H_2SO_4 . Esperar 1 a 2 días para completar la disolución.

- Ácido sulfámico conc.
- Estándar de ftalato ácido de potasio: Disolver 425 mg de $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ (secado a $120\text{ }^\circ\text{C}$) en AD y llevarlo a 1 l. Esta solución tiene una DQO de $500\ \mu\text{g O}_2\ \text{ml}^{-1}$. La solución es estable por 3 meses.

6.2. 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.

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 7.1.2). 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_2) en mg l^{-1} según:

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

donde g es el gasto (ml), N la normalidad del NaOH (0.1), 44 el peso molecular del CO_2 y V el volumen de la muestra (ml).

Reactivos

- 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:

$$N = \text{A B} / 204.2\ \text{C}$$

donde A es el peso (g) de ftalato disuelto en AD (10 g), B el volumen (ml) de ftalato titulado, C el volumen (ml) de NaOH usados en la titulación y 204.2 el peso molecular del ftalato.

- Ftalato ácido de potasio 0.05 N: Disolver 10.0 ± 0.5 g de $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ (secado a $120\text{ }^\circ\text{C}$) en AD y llevar a 1 l.

6.2.1. ACUMULACIÓN HIPOLIMNÉTICA DE CO_2

Durante el día la concentración de CO_2 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 1983a).

La ventaja frente al cálculo del déficit hipolimnético de oxígeno (ver 6.1.3) es que puede ser aplicada en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. A pesar de que generalmente se subestima 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) 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 CaCO_3 . Si la suma de estos aportes de 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 CO_2 incorporado fotosintéticamente en el epilimnion durante el período de observación (Wetzel & Likens 1991).

Procedimiento

- 1) Proceder como en 6.1.3 (puntos 1 y 2) y determinar además las concentraciones de NH_4^+ (ver 7.3.3), CO_2 y HCO_3^- (ver 7.1.2) para cada capa del hipolimnion.
- 2) A partir de estas concentraciones (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 CO_2 proveniente del bicarbonato del NH_4HCO_3 (b) es $0.721 \times B$.
 - c) $x = [\text{HCO}_3^-] - B$, para eliminar el bicarbonato del NH_4HCO_3 .
 - d) $a = (x) 0.721/2$ para convertir el HCO_3^- a CO_2 , la mitad del cual está como 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 CO_2 liberadas en la descomposición y las de 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 CO_2 formado (y) será $0.85 (d\text{CO}_2)$.
 - h) el cambio total de CO_2 (CO_2 total menos 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 CO_2 equivalente en condiciones aeróbicas (z).
 - j) la acumulación hipolimnética total de 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 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 $\text{mg CO}_2 \text{ l}^{-1} \text{ mes}^{-1}$.

6.3. SÓLIDOS Y MATERIA ORGÁNICA EN SUSPENSIÓN

El material en suspensión se obtiene por diferencia de pesos de un filtro seco antes y después de filtrar un volumen conocido de muestra, mientras que el material orgánico suspendido se calcula por diferencia de peso tras quemar el material en suspensión retenido en el filtro (APHA 1995).

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 µm o GF/F) previamente quemado a 500 °C, con 0.1 mg (f, en g) de resolución.
- 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) Para determinar la materia orgánica, 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⁻¹ y el porcentaje de materia orgánica en los sólidos suspendidos totales (% MOS), según:

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

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

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

6.4. SÓLIDOS DISUELTOS

Además de oxhidrilos (OH⁻) e hidrogeniones (H⁺), cuya concentración determina el pH del agua (ver 6.4.2), los iones presentes en los ambientes límnicos pueden agruparse en: a) de origen marino (Na⁺, Cl⁻, Mg⁺⁺); b) provenientes de la atmósfera, suelos y/o rocas de la cuenca (Si_xO_y^{z-}, CO₃⁻, HCO₃, Ca, Mg, K), y c) dependientes del potencial de óxido-reducción (SO₄⁼, PO₄³⁻, Fe³⁺, Mn⁺⁺, etc.). En la práctica, la concentración iónica se expresa numéricamente como la suma de la concentración de los 8 iones principales o macroconstituyentes, parámetro similar a sólidos disueltos totales (ver 6.4.1).

Las aguas continentales están dominadas generalmente por bicarbonatos y carbonatos, cuyo orden de importancia es Ca⁺⁺ > Mg⁺⁺ > Na⁺ > K⁺, y (HCO₃⁻ + CO₃⁼) > SO₄⁼ > 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 HCO₃⁻ y Ca⁺⁺ están más influenciadas por la actividad biológica, por lo que se conocen como componentes de proporcionalidad variable junto con los microconstituyentes (NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺, PO₄³⁻, SiO₂⁴⁻, Fe³⁺, etc.). El silice 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 fuerte relación mutua, y cada uno, así como el conjunto, está altamente correlacionado con la conductividad del agua.

6.4.1. SÓLIDOS TOTALES DISUELTOS

Los sólidos totales disueltos se pueden determinar por diferencia de peso, evaporando un volumen conocido de una muestra filtrada.

Procedimiento

- 1) Filtrar la muestra de agua por filtro GF/F.
- 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, una vez frío, pesar el disco con el residuo (r, en g).
- 4) Calcular los sólidos disueltos totales (SDT) en mg l⁻¹ según:

$$SDT = 10^6(r - d)/v$$

6.4.2. pH

El pH es el logaritmo decimal negativo 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 7.1.2).

Además de los métodos colorimétricos y los papeles sensibles a ciertos rangos, el pH se determina normalmente con electrodos (pH-metro), con los que se puede obtener una precisión de 0.05 unidades de pH, aunque 0.1 es 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. 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 6.2) 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 horizontal y suavemente el electrodo.

Tabla 6.2. Preparación de soluciones estándar a 25 °C (llevar a 1000 ml con AD).

Solución estándar (M)	pH	Peso (g)
ftalato de potasio (0.05)	4.004	10.12 $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$
fosfato de potasio (0.008) + fosfato bisódico (0.030)	7.415	1.179 KH_2PO_4 + 4.303 Na_2HPO_4
bicarbonato de sodio + carbonato de sodio (0.025)	10.014	2.092 NaHCO_3 + 2.640 Na_2CO_3

6.4.3. CATIONES

Todos los cationes pueden ser determinados por espectrofotometría de absorción atómica, en que la muestra es aspirada y atomizada dentro de una llama. En esta metodología, a diferencia de la espectrometría de llama en la cual solo 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 ion puede consultarse en APHA (1995).

6.4.3.1. CALCIO

El calcio es un nutriente esencial para el crecimiento de la flora y fauna acuáticas. 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 ($10\text{-}50 \text{ mg l}^{-1}$), aunque puede haber una acumulación hipolimnética por descomposición en lagos muy productivos (80 mg l^{-1}). En aguas mineralizadas puede 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 o con 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 cuándo 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 1 N 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 $mg\ l^{-1}$ según:

$$(400.8A.B)/V$$

donde A es el volumen (ml) de EDTA utilizado en la muestra, B el peso de $CaCO_3$ (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.
- 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 $CaCO_3$ en un Erlenmayer de 500 ml. Agregar HCl 50% hasta disolver el $CaCO_3$. Agregar 200 ml de AD y hervir para eliminar el CO_2 . Enfriar y agregar unas gotas de rojo de metilo y ajustar hasta obtener un color naranja mediante la adición de NH_4OH 3N o HCl 50%. Llevar a 1 l con AD. Esta solución contiene 1 mg $CaCO_3\ ml^{-1}$.

6.4.3.2. 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 $mg\ l^{-1}$). 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). El procedimiento puede realizarse mediante remoción de sales de oxalato y amonio seguido de la precipitación del fosfato de amonio-magnésico o, alternativamente, mediante 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_3 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 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Enfriar y agregar NH_4OH conc. gota a gota agitando hasta que la solución vire al amarillo.
- 4) Agitar durante 5 min, agregar 5 ml de NH_4OH conc. y agitar enérgicamente por 10 min. Dejar toda la noche y luego filtrar. Lavar con NH_4OH 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 precipitación

- 1) Transferir una muestra con no más de 60 mg de Mg^{++} a un recipiente de 600 ml. Agregar 2-3 gotas rojo de metilo y si es necesario ajustar el volumen a 150 ml.
- 2) Acidificar la solución con HCl 6 M y agregar 10 ml de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 30% peso/volumen. Enfriar y agitar en forma constante y agregar NH_4OH gota a gota hasta que el indicador vire a amarillo (pH >6.3). Agitar por 5 min, agregar 5 ml NH_4OH concentrado y agitar 10 min más.
- 3) Dejar la solución y el precipitado toda la noche. Separar el precipitado mediante filtrado y lavar con NH_4OH 5%.
- 4) Disolver el precipitado en 50 ml de HCL 10% y precipitar por segunda vez mediante el mismo procedimiento.
- 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.
- 6) Calcular la concentración de magnesio (Mg) en mg l^{-1} según:

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

donde P es el peso (mg) del precipitado obtenido ($\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$) 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 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ y llevar a 100 ml con AD.

MÉTODO POR DIFERENCIA

El magnesio puede ser estimado también como la diferencia entre dureza total (D) (ver 6.4.3.4) y dureza del calcio (DCa) expresados como mg l^{-1} de CaCO_3 (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^{-1} es:

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

6.4.3.3. 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^{-1} . Ambos elementos son altamente solubles, por lo que no son comunes las variaciones espacio-temporales de sus concentraciones (4-6 mg l^{-1}).

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).

6.4.3.4. 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, a partir del Ca^{++} y Mg^{++} , o por titulación con EDTA.

A PARTIR DEL 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 mg l^{-1} (APHA 1995). La dureza (D) en $\text{mg l}^{-1} \text{CaCO}_3$ es:

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

TITULACIÓN CON EDTA

El ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y sus sales de sodio 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 pH 10.0 ± 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, éste no debe incrementarse en exceso debido al riesgo que se formen precipitados de CaCO_3 y 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 CaCO_3 .
- 6) Calcular la dureza (D) en $\text{mg l}^{-1} \text{CaCO}_3$ según:

$$D = 1000(\text{A B})/\text{V}$$

donde A es el volumen de EDTA (ml), B los mg de CaCO_3 equivalentes a 1 ml de EDTA y V el volumen de la muestra.

Reactivos

- Solución *buffer*: Disolver 16.9 g de NH_4Cl en 143 ml de NH_4OH 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-hidroxí-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 CaCO_3 en un Erlenmayer de 500 ml. Agregar HCl 50% hasta disolver el CaCO_3 . Agregar 200 ml de AD y hervir para eliminar el CO_2 . Enfriar y agregar unas gotas de rojo de metilo y ajustar hasta obtener un color naranja mediante la adición de NH_4OH 3N o HCl 50%. Llevar a 1 l con AD. Esta solución contiene 1 mg CaCO_3 ml^{-1} .

6.4.4. ANIONES

6.4.4.1. BICARBONATO Y CARBONATO

El bicarbonato es la principal forma de carbono inorgánico (30-80 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 carbonato. Las concentraciones de bicarbonato y carbonato pueden calcularse de acuerdo a la metodología descrita en 7.1.2.

6.4.4.2. SULFATO

En general en sistemas de agua dulce el 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 nm o con turbidímetro, aunque este último es menos sensible. El método es aplicable por su rapidez en análisis de rutina de aguas superficiales y subterráneas, efluentes industriales y domésticos con concentraciones entre 3 y 40 mg l^{-1} .

Procedimiento

- 1) Poner 100 ml de muestra o de una dilución de la misma en un matraz Erlenmayer de 250 ml.
- 2) Agregar 20 ml de la solución A si la concentración esperada es mayor a 10 mg l^{-1} , o 20 ml de la solución B si es menor.
- 3) Agregar cristales de BaCl_2 con una espátula y agitar en forma constante durante 60 ± 2 s. Medir la absorbancia inmediatamente a 420 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

- Solución A: Disolver 30 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 5 g de $CH_3COONa \cdot 3H_2O$, 1.0 g de KNO_3 y 20 ml de CH_3COOH (99%), en 500 ml de AD y luego llevar a 1 l.
- Solución B: Agregar a la solución A, 0.111 g de Na_2SO_4 antes de llevar a 1 l.
- Cloruro de bario: Cristales de $BaCl_2$ de 63 a 120 μm .
- Solución estándar de sulfato: Disolver 0.1479 g de Na_2SO_4 en AD y llevar a 1 l. Esta solución contiene 100 mg SO_4 l^{-1} .

6.4.4.3. CLORURO

El cloruro no es un elemento dominante en sistemas de agua dulce (8 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 si se usan 100 ml de 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 0.01 N hasta obtener un color amarillo-rosado. Titular un blanco de AD en las mismas condiciones.
- 4) Calcular la concentración de cloruro (Cl) en mg l^{-1} según:

$$Cl = (A - B)35450 N/V$$

donde A y B son los volúmenes (ml) de $AgNO_3$ usados en la titulación de la muestra y el blanco, respectivamente, N su normalidad y V el volumen de la muestra (ml).

Reactivos

- Suspensión de hidróxido de aluminio: Disolver 125 g de sulfato de aluminio y potasio dodeca-hidratado ($AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$), o sulfato de aluminio y amonio dodeca-hidratado ($AlNH_4(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) en 1 l de AD. Calentar a 60 °C y agregar 55 ml de hidróxido de amonio (NH_4OH) 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.

- Solución indicadora de cromato de potasio: Disolver 50 g de K_2CrO_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.
- Nitrato de plata 0.014 N: Disolver 2.395 g de $AgNO_3$ 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 °C) en AD y llevar a 1 l. Esta solución contiene 500 μg Cl ml^{-1} .

6.4.5. DIAGRAMAS DE MAUCHA

Los diagramas de Maucha (Fig. 6.1) 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 $meq\ l^{-1}$ 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 HCO_3^- , SO_4^{--} , Cl^- y NO_3^- (ver 6.4.3 y 6.4.4) en $meq\ l^{-1}$ usando la tabla 6.3 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 1.5 cm de diámetro.
- 4) Graficar 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.

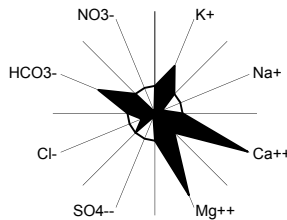


Figura 6.1. Diagrama de Maucha mostrando la composición iónica porcentual del agua.

6.5. CONDUCTIVIDAD

La conductividad eléctrica es el recíproco de la resistencia, medida entre dos electrodos de 1 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 $\mu mhos\ cm^{-1}$ ($\mu ohms^{-1}\ cm^{-1}$) o $\mu Siemens\ cm^{-1}$ ($\mu S\ cm^{-1}$ referida a 20 o 25 °C, ya que la temperatura afecta la velocidad iónica, aumentando la conductividad en ca. 2% por cada °C. La conductividad de una muestra es la suma de la conductividad

específica de cada ion (Tabla 6.3) multiplicada por su concentración 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 mg l^{-1} . Asimismo, expresada en 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 a que la medida se estabilice. Al medir, se debe agitar horizontal y suavemente el electrodo.

6.6. BALANCE IÓNICO

Teóricamente, la suma de los aniones debe igualar a la suma de los cationes presentes en una muestra de agua si las cantidades son expresadas en 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 meq l^{-1} (Tabla 6.3).
- 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 de cada ion a la conductividad total (Tabla 6.3) y sumarlos.
- 5) 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 6.3. 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

6.7. RESULTADOS

6.7.1. PERFIL DE OXÍGENO EN UN LAGO DE ARENERA

En el primer perfil de la figura 6.2 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 periodo de mezcla en otoño, fase durante la cual la energía es insuficiente para generar diferencias de densidad que induzcan la formación de una discontinuidad.

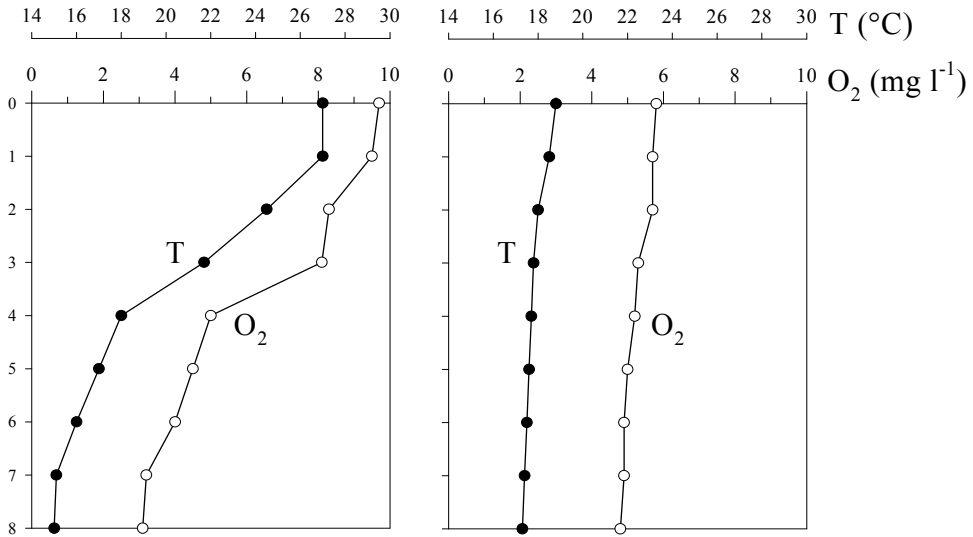


Figura 6.2. Perfiles de oxígeno disuelto y temperatura en verano y otoño en el lago Ton-Ton (Canelones) (tomado de Fabián & Schinca 1990).

6.7.2. LIMITACIÓN DEL FITOPLANCTON POR TURBIDEZ EN UN EMBALSE

La abundancia fitoplanctónica en el embalse Rincón del Bonete (32°50' S, 56°25' W) presentó en marzo de 1998 una correlación inversa significativa ($r^2 = 0.77$) con la concentración de sólidos en suspensión, sugiriendo una limitación lumínica para el crecimiento algal (Fig. 6.3). 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.

6.7.3. GRADIENTE SALINO DE UNA LAGUNA COSTERA

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. 6.4). Comúnmente, la menor

evapotranspiración durante el invierno resulta en mayores caudales de agua dulce que reducen significativamente los valores de conductividad.

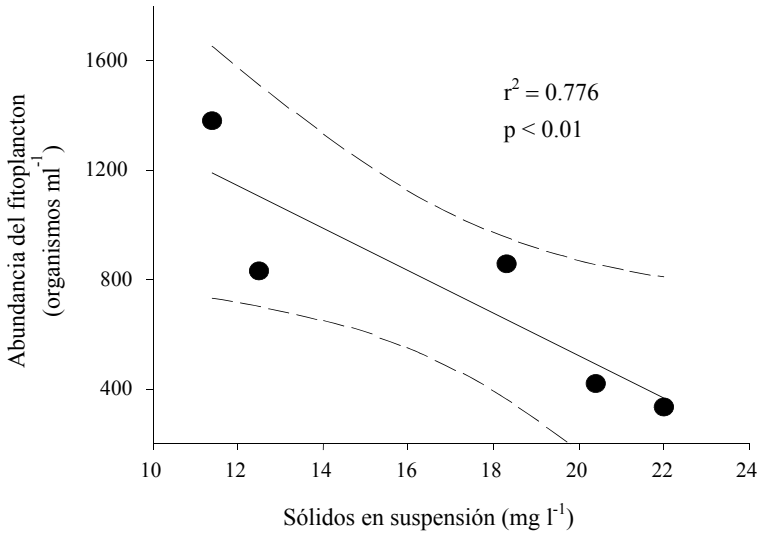


Figura 6.3. Sólidos en suspensión y sus efectos en la distribución del fitoplancton en el Embalse Rincón del Bonete en marzo de 1998 (tomado de Conde *et al.* 1998a).

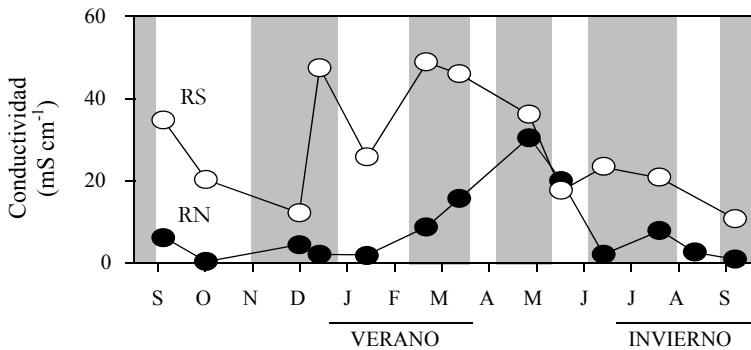


Figura 6.4. Variación mensual de la conductividad en dos estaciones de la Laguna de Rocha: norte (RN) y sur (RS). Las zonas sombreadas corresponden a períodos de barra abierta (tomado de Conde *et al.* 1998b).

6.7.4. BALANCE IÓNICO DE UN ARROYO URBANO

En la tabla 6.4 se presentan los balances iónicos y de conductividad de un tramo del arroyo Toledo (Canelones). El promedio anual de sales disueltas fue de 577 mg l⁻¹. De acuerdo a la concentración de los diferentes iones se pueden clasificar estas aguas como carbonato-sódicas.

Tabla 6.4. Balance iónico y de conductividad en el arroyo Toledo en su tramo medio (tomado de Arocena 1991).

Ion	Balance iónico $\mu\text{eq l}^{-1}$	Balance de conductividad K ($\mu\text{S cm}^{-1}$)
NO_3^-	22.1	
HCO_3^-	6000	246
Cl^-	2980	206
SO_4^{--}	1320	94
<i>Suma de aniones</i>	<i>10322</i>	
K^+	370	25
Na^+	6570	302
Ca^{++}	2400	127
Mg^{++}	1170	56
<i>Suma de cationes</i>	<i>10510</i>	
Diferencia Cat. - An.	188	
K teórica (Kt)		1056
K medida (Km)		970
Kt - Km		86
Error (%)	1.8	8.18

En la figura 6.5 se representa la composición iónica relativa del mismo tramo del arroyo Toledo mediante un diagrama de Maucha, en donde se aprecia la composición carbonato-sódica de las aguas.

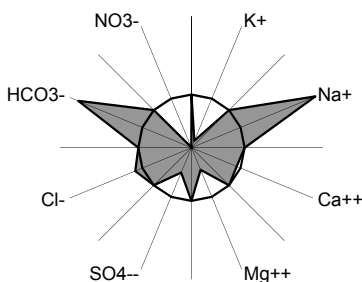


Figura 6.5. Diagrama de Maucha mostrando la composición iónica del arroyo Toledo en su tramo medio (modificado de Arocena 1991).

6.7.5. EL FITOPLANCTON DETERMINA EL pH EN UN EMBALSE

En la figura 6.6 se presenta la variación horizontal de los valores de pH y abundancia total de fitoplancton en el 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. El pH fue superior en esas estaciones como consecuencia de la utilización fotosintética del CO_2 por parte de las algas. La disminución en la concentración de este gas desplaza

el equilibrio de las formas inorgánicas de carbono, formando ácido carbónico a partir de bicarbonato, para lo cual se consumen iones hidrógeno del medio con el consiguiente aumento de pH.

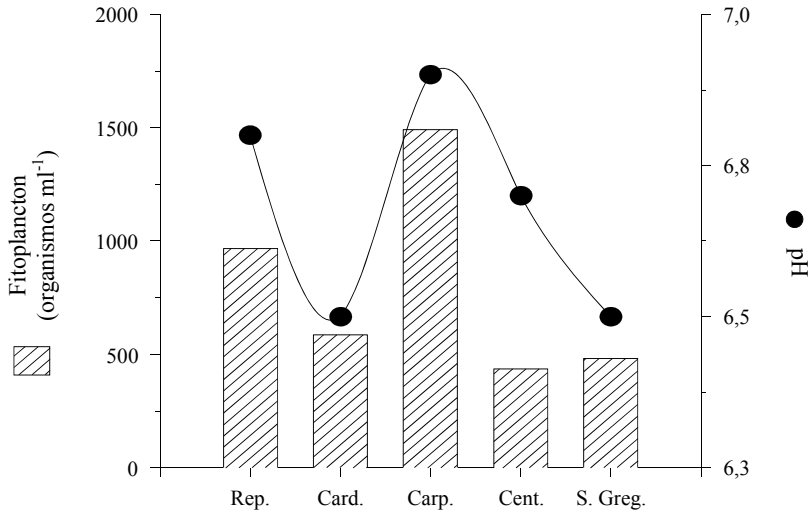


Figura 6.6. Variación espacial de los valores de pH y de la abundancia del fitoplancton en el embalse Rincón del Bonete en marzo de 1998 (tomado de Conde *et al.* 1998a).

NUTRIENTES

LUIS AUBRIOT, DANIEL CONDE,
GUILLERMO CHALAR Y JAVIER GORGA

LOS NUTRIENTES SON LOS ELEMENTOS CONSTITUYENTES DE LOS ORGANISMOS y la materia orgánica. Se encuentran presentes en todos los compartimentos de la Tierra (biósfera, atmósfera, litósfera e hidrósfera). Los elementos que se encuentran más disponibles en el agua son oxígeno, hidrógeno y carbono, mientras que otros elementos como nitrógeno y fósforo se encuentran en menor concentración.

Existe un compromiso entre la disponibilidad de los nutrientes y la demanda de éstos por los organismos. La demanda de nutrientes de los organismos está influida por su actividad fisiológica y por su composición elemental relativa. En general, dicha composición se aproxima a las relaciones atómicas establecidas por Redfield para el plancton marino (106C:16N:1P). Sin embargo, en agua dulce estas relaciones son sustancialmente mayores y están influidas por la fisiología y el tipo de organismo (Quigg *et al.* 2003; Arrigo 2005). 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.

El aumento significativo del nutriente limitante de la producción primaria provocará un incremento de la biomasa y, por lo tanto, un cambio del estado trófico del ecosistema. Este incremento del aporte de nutrientes se conoce como *eutrofización* (Vollenweider 1968) y está principalmente ocasionado por el aumento de la concentración de fósforo en el ambiente (Schindler *et al.* 2008).

Los nutrientes constituyen moléculas inorgánicas disueltas en distintos estados de óxido-reducción, o forman parte de partículas suspendidas en el agua. La distinción entre ambas formas es metodológica mediante la filtración de la muestra de agua por un tamaño de poro de 0.45 μm . La obtención de una muestra filtrada a partir de una sin filtrar, permite cuantificar los elementos en ambos compartimentos. En la muestra filtrada se puede determinar la concentración de las formas inorgánicas disueltas, mientras que la muestra total es hidrolizada con un ácido y oxidada, para cuantificar finalmente la concentración de N total y P total con los mismos métodos utilizados para las formas inorgánicas.

La cuantificación se realiza por métodos estándar como la titulación con un ácido (carbono) o el empleo de métodos colorimétricos (N, P y Si), y sus variantes automatizadas por inyección de flujo, o la utilización de métodos más costosos como la Cromatografía de Intercambio Iónico y la Espectrometría de Masas (ICP-MS). La ventaja de los métodos analíticos “húmedos” por titulación (potenciométrico) y colorimetría (espectrofotométrico), se basa en su bajo costo en equipamiento y su estandarización mundial a través de ejercicios de calibración inter-laboratorio y su aplicación en investigación, así como en instituciones de control ambiental (*e.g.*, DINAMA en Uruguay, EPA en EE.UU.).

7.1. CARBONO

El carbono cumple un papel fundamental en los ecosistemas acuáticos continentales: es un nutriente esencial para la fotosíntesis; su emisión a la atmósfera potencia el calentamiento global; tiene capacidad de combinarse con cationes y coprecipitar metales, y constituye la mayor reserva de aniones en el agua, los que amortiguan los cambios de pH (capacidad *buffer*).

En el agua la mayor concentración de carbono se encuentra en forma inorgánica disuelta (CID), mientras que una menor proporción está presente en forma orgánica, disuelta y particulada. El CID se presenta en forma libre (CO_2 y H_2CO_3) o disociada (HCO_3^- y CO_3^{2-}). Su principal origen es atmosférico y a través de la meteorización de rocas y suelos. La fracción orgánica está conformada por una variedad de compuestos en diferentes estados de oxidación. El carbono orgánico disuelto (COD) forma parte de biomoléculas como las proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, los cuales son fuente de energía para el bacterioplancton.

Otras formas como los ácidos húmicos, fúlvicos y huminas son resistentes a la biodegradación, brindan una coloración amarillenta al agua y son sensibles a la fotooxidación (Piccini *et al.* 2009). El COD absorbe la radiación fotosintéticamente activa y la ultravioleta, influye en la productividad primaria (Thurman 1985), y determina la movilidad y toxicidad de ciertos elementos.

7.1.1. ALCALINIDAD

La alcalinidad expresa numéricamente la cantidad de bases (Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ y K^+) en equilibrio (formando sales) con los aniones principales (HCO_3^- , CO_3^{2-} , Cl^- y SO_4^{2-}). 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 ($\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$). 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^{-1} se consideran poco mineralizadas) y, junto con el pH, calcular las fracciones de carbono inorgánico (ver 7.1.2).

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 para la transformación de carbonatos y oxhidrilos en bicarbonatos, indica la alcalinidad total. Si el pH original de la muestra es 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 CO₂ libre, APHA 1998). El rango de validez del método es de 10 a 500 mg CaCO₃ l⁻¹. La precisión del método potenciométrico es ±5 mg CaCO₃ l⁻¹.

Procedimiento

- 1) A 100 ml de muestra (V) agregar ácido sulfúrico 0.02 N (N) hasta pH 8.3 (si el pH original es mayor), 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 7.1). Medir el volumen de ácido usado (H). Calcular la alcalinidad no carbonatada y carbonatada (Alc) en meq l⁻¹ según:

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

donde f es el factor del ácido (1 si su normalidad es exactamente 0.02). 1 meq l⁻¹ corresponde a 50 mg CaCO₃ l⁻¹ = 20 mg Ca⁺⁺ l⁻¹. Expresar el resultado de la alcalinidad indicando el pH final de la titulación. La alcalinidad total es la suma de la alcalinidad carbonatada y la alcalinidad no carbonatada.

Tabla 7.1. Punto final (pH) de la titulación para determinar la alcalinidad no carbonatada (APHA 1995). Para la alcalinidad carbonatada el pH es siempre 8.3.

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

Reactivos

- Ácido sulfúrico 0.02 N: Llevar 28 ml de H₂SO₄ puro a 1 l con AD (solución 1 N). Tomar 5 ml de esta solución y diluir a 250 ml.

Factor del ácido (f)

Secar 5 g de carbonato de sodio (Na₂CO₃) a 250 °C por 4 h y enfriar en desecador. Pesar 2.5 ±0.2 g de Na₂CO₃ seco y disolver en 1 l de AD. La solución es estable durante una semana. Titular potenciométricamente con H₂SO₄ 0.02 N, una solución de 15 ml de Na₂CO₃ 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 Na₂CO₃, B el volumen (ml) de solución de Na₂CO₃ y C el gasto (ml) de ácido. Si la normalidad del ácido es 0.02, 1 ml equivale a 1 mg CaCO₃.

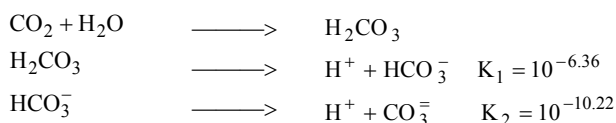
MÉTODO DE GRAN

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, graficando

la variación de pH contra pequeños incrementos de ácido (Gran 1952). El volumen final de titulación se retro-extrapolaba para el punto de equivalencia deseado. Los cálculos son iguales a los del método de Wattenberg, si los demás factores se mantienen iguales.

7.1.2. FRACCIONES DE CARBONO INORGÁNICO

A un cierto valor de pH, las especies inorgánicas de carbono se encuentran en una proporción fija entre ellas de acuerdo a las constantes de equilibrio K_1 y K_2 :



por lo que el pH al que se igualan las concentraciones de HCO_3^- y H_2CO_3 es 6.36, y al que se igualan las de CO_3^{2-} y HCO_3^- es 10.22:

$$\text{pH} = \text{p}K_1 + \log([\text{HCO}_3^-]/[\text{H}_2\text{CO}_3])$$

$$\text{pH} = \text{p}K_2 + \log([\text{CO}_3^{2-}]/[\text{HCO}_3^-])$$

A pH mayor a 10.22 predomina el CO_3^{2-} , entre 10.22 y 6.36 el HCO_3^- , y a pH menor a 6.36 el CO_2 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^{-1}) y el pH de la muestra, para un contenido mineral menor a 500 mg l^{-1} , según:

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

$$[\text{CO}_3^{2-}] = 0.94 \times A \times 10^{(\text{pH}-10)} = B \text{ (mg CaCO}_3 \text{ l}^{-1})$$

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

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

7.1.3. CARBONO ORGÁNICO TOTAL

Las formas orgánicas de carbono pueden ser oxidadas mediante acción biológica o procesos químicos. La determinación de DBO y DQO (ver 6.1) brinda una 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 COT 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 COT, las moléculas orgánicas deben oxidarse hasta obtener CO_2 , el cual puede detectarse y cuantificarse. Esto puede lograrse de diferentes maneras (combustión, fotooxidación con UV, oxidantes químicos o una combinación de los mismos) mediante la aplicación de diversos procedimientos (APHA 1995). También existen técnicas espectrofotométricas de baja precisión para determinar la fracción particulada de carbono orgánico mediante oxidación húmeda con dicromato de potasio y ácido sulfúrico (Wetzel &

Likens 1991). Actualmente se utilizan analizadores de COT/NT de alta precisión y costo elevado.

7.1.4. CARBONO ORGÁNICO DISUELTO

Debido a la variabilidad espacio-temporal de la fracción disuelta del carbono orgánico, se requieren numerosos análisis con equipos específicos de alta precisión (analizador de carbono) para obtener resultados representativos. Debido al alto costo de estos análisis, una alternativa es relacionar la concentración de carbono orgánico disuelto obtenida por estos métodos con la absorbancia a determinada longitud de onda, específica para cada ambiente. Sin embargo, estos procedimientos deben ser calibrados frecuentemente para cada tipo de agua de diferente contenido orgánico. Para ello debe separar la fracción orgánica disuelta de carbono para su posterior análisis mediante transformación a anhídrido carbónico, el que es finalmente estimado con analizador infrarrojo (analizadores de C).

7.2. ESPECTROFOTOMETRÍA

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 diferentes 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 de la muestra problema a partir de su absorbancia.

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 igual 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 de la sustancia problema (Fig. 7.1), construida a partir de diluciones de concentración conocida, las que son tratadas en forma idéntica a las muestras. Mediante una regresión lineal simple entre las concentraciones y las absorbancias de las diluciones, o interpolando gráficamente, se obtiene la concentración de los nutrientes en las muestras. En general la unidad de medida es gramos del átomo contenidos en la molécula por litro, por ejemplo, $\mu\text{g PO}_4\text{-P l}^{-1}$ (microgramos de fósforo como fosfato por litro). Dividiendo su peso por su masa atómica se obtienen los moles l^{-1} . Las diluciones para las curvas de calibración se realizan en base a los detalles de la tabla 7.2.

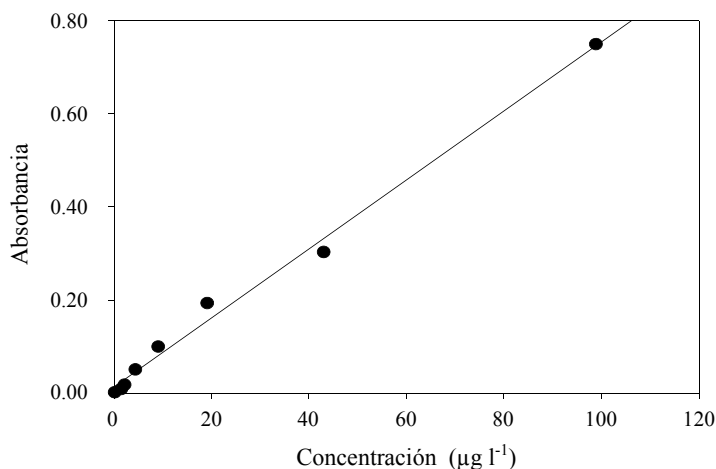


Figura 7.1. Curva de calibración para el cálculo de la concentración de nutrientes en muestras de agua, construida con datos de absorbancia y concentración de varias diluciones.

7.3. NITRÓGENO

La mayor reserva de nitrógeno es atmosférica e inerte. El N_2 equivale al 78% de los gases atmosféricos. Su conversión en formas químicamente activas y biodisponibles se produce a través de su oxidación con altas temperaturas (rayos atmosféricos) y de su fijación biológica (enzimática).

Las formas inorgánicas más frecuentes del nitrógeno disuelto son: amoníaco/amonio ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$), óxido nitroso (N_2O), óxido nítrico (NO), nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-). Si bien el nitrógeno en el agua no forma compuestos insolubles, puede encontrarse adsorbido a partículas, integrando organismos o sus productos, 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 mg l^{-1} en aguas de drenaje. En sistemas naturales suele encontrarse una proporción similar entre las formas disueltas orgánicas e inorgánicas.

Tabla 7.2. Volumen (ml) de solución estándar a la concentración indicada (mg ml^{-1}), de solución de trabajo y de agua destilada, para obtener diversas concentraciones ($\mu\text{g l}^{-1}$) de la solución de trabajo y de las diluciones 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
Solución de trabajo						
Solución estándar (ml)	1	1	10	5	10	5
Concentración (mg ml^{-1})	0.028	0.25	0.1	0.05	0.1405	0.1
Agua destilada (ml)	99	499	90	95	40	995
Concentración ($\mu\text{g l}^{-1}$)	280	500	10000	2500	28100	500
Dilución 1						
Solución de trabajo (ml)	0.5	0.5	0.4	0.5	1.0	1.0
Agua destilada (ml)	49.5	99.5	199.6	99.5	199.0	99.0
Concentración ($\mu\text{g l}^{-1}$)	2.8	2.5	20	12.5	140.5	5.0
Dilución 2						
Solución de trabajo (ml)	2.5	5	1	1	2.5	4
Agua destilada (ml)	47.5	195	99	49	97.5	96
Concentración ($\mu\text{g l}^{-1}$)	14.0	12.5	100	50	702.5	20
Dilución 3						
Solución de trabajo (ml)	12.5	20	5	5	10	6
Agua destilada (ml)	37.5	80	95	45	90	94
Concentración ($\mu\text{g l}^{-1}$)	70	100	500	250	2810	30
Dilución 4						
Solución de trabajo (ml)	25	50	10	15	15	7
Agua destilada (ml)	25	50	90	35	85	93
Concentración ($\mu\text{g l}^{-1}$)	140	250	1000	750	4215	35

En ambientes lénticos eutrofizados y con hipolimnion anóxico, el nitrógeno tiende a perderse del sistema por procesos de desnitrificación. Sin embargo, las actividades antrópicas aportan formas orgánicas e inorgánicas a los cuerpos de agua (efluentes industriales y urbanos, fertilización de cultivos), así como elevan la concentración de óxidos de nitrógeno en la atmósfera, aumentando el aporte difuso a los ecosistemas acuáticos mediante su solubilización en agua de lluvia (Elser *et al.* 2009). Los análisis de rutina se centran en la determinación del N total, total disuelto, NO_3^- , NO_2^- y NH_4^+ .

7.3.1. 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 & Weidemann 1955). El rango del método va de 0.1 a 2 mg l^{-1} N- NO_3 y la precisión es ± 0.1 mg l^{-1} N- NO_3 . Este método no sirve para aguas salobres y marinas, ya que los cloruros interfieren en la reacción, por lo cual se debe recurrir al método de reducción de nitrato por cadmio.

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 80 °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 $\text{NaHOC}_6\text{H}_4\text{COO}$ y llevar a 100 ml con AD. Esta solución debe ser preparada cada vez.
- Ácido sulfúrico concentrado ppa (gravedad específica 1.82).
- Solución oxidante: Disolver 400 g NaOH ppa en menos de 1 l de AD. Luego de que se enfríe, agregar y disolver 50 g 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_3 en AD y llevar a 1 l. La solución contiene 0.1 mg ml^{-1} N- NO_3 .
- Usar agua ultrapurificada (*e.g.*, Milli-Q) para la preparación de las diluciones de la curva de calibración, el blanco de reactivos y el lavado del material.

MÉTODO DE REDUCCIÓN POR CADMIO

El método se basa en la reducción del NO_3^- a NO_2^- en presencia de cadmio tratado con sulfato de cobre (APHA 1995). El NO_3^- reducido se determina luego como nitrito, por lo que deben restarse los nitritos presentes en la muestra. El método es aplicable a concentraciones de entre 0.01 y 1.0 mg N- $\text{NO}_3^- \text{ l}^{-1}$. La precisión del método es la del método de nitritos (± 0.4 N- $\text{NO}_2^- \text{ l}^{-1}$).

Procedimiento

- 1) Preparación de la columna de cadmio: Insertar fibra de vidrio en la parte inferior de la columna de reducción formando un tapón que evite la pérdida de cadmio. Introducir en la columna suficiente Cd (de 18.5 cm de largo).
- 2) Lavar la columna pasando 200 ml de NH_4Cl -EDTA diluido. Activarla pasando 100 ml de una solución conteniendo 1.0 mg l^{-1} NO_3^- -N en 25 ml de AD y 75 ml de NH_4Cl -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.
- 3) Para probar la eficiencia de la columna, es conveniente pasar patrones de NO_3^- de concentración conocida y blancos. Puede prepararse una curva para determinar la eficiencia con más precisión.
- 4) Remover el material en suspensión filtrando la muestra con GF/C.
- 5) Ajustar el pH entre 7 y 9 con HCl o NaOH.
- 6) A 25 ml de muestra filtrada (GF/C) agregar 75 ml de NH_4Cl -EDTA.
- 7) Tras verificar que la velocidad del pasaje no sobrepase los 7 a 10 ml min^{-1} , descartar los primeros 50 ml y recoger los siguientes 25 ml. Entre cada muestra deben descartarse 75 ml, a fin de evitar contaminación.

- 8) En los 25 ml recogidos determinar el contenido de nitritos (ver 7.3.2) 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.
- 9) Restar a la concentración de nitritos obtenida luego de la reducción, la concentración original de nitritos de la muestra.
- 10) Verificar la eficiencia de la reducción comparando un estándar de NO_2^- con un estándar de NO_3^- reducido. Reactivar el Cd en caso que la eficiencia esté por debajo de 75%.

Reactivos

- Gránulos de Cobre - Cadmio: Lavar 25 g de gránulos de Cd con HCl 6N y enjuagar con AD. Agitar el Cd en 100 ml de CuSO_4 2% durante 5 min hasta que tome color azul acerado. Repetir con CuSO_4 fresco hasta que se desarrolle un color marrón coloidal. Lavar con AD al menos 10 veces para eliminar el precipitado.
- Cloruro de amonio - EDTA: Disolver 13 g de NH_4Cl y 1.7 g de tetracetato de etilendiamina disódico ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en 900 ml de AD. Ajustar a pH 8.5 con NH_4OH y llevar a 1 l.
- Cloruro de amonio - EDTA diluido: Llevar 300 ml de NH_4Cl -EDTA a 500 ml con AD.
- Sulfato de cobre 2%: Disolver 20 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en AD y llevar a 1 l.
- Solución estándar: ver método del salicilato de sodio.
- Usar agua ultrapurificada.

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 7 ml de la muestra tratada y determinar el contenido de nitritos agregando 1 ml de cada reactivo, esperando entre 4 y 6 min para la adición del segundo y agitar cada vez (ver 7.3.2). 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

- Las láminas de Cd a utilizar deben tener menos de 2 mm de espesor.
- Lavar cuidadosamente 25 a 40 g de Cd con HCl (1%).
- Amalgamar el Cd adicionando una solución de cloruro de mercurio (HgCl_2 1%) hasta cubrirlo.
- Lavar el Cd con una solución de cloruro de amonio (solución diluida 40 veces a partir de una solución *stock* de 200 g NH_4Cl l^{-1}) hasta cubrirlo.
- Guardar el Cd en solución de NH_4Cl diluido y en oscuridad (envuelto en papel de aluminio).
- Cloruro de mercurio 1%. Disolver 1 g de HgCl_2 en 100 ml de AD.

- Cloruro de amonio 2.6%. Disolver 2.6 g de NH_4Cl en 100 ml de AD.
- Borax 2.1%. Disolver 2.1 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ en 100 ml de AD.
- Usar agua ultrapurificada.

OTROS MÉTODOS

Se han desarrollado electrodos selectivos para la determinación directa de nitrato 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^{-1} 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).

Otro método para determinar nitrato es por espectrometría en el rango UV (220 nm), en donde el NO_3^- tiene su máximo de absorción. La muestra debe contener baja o nula materia orgánica disuelta, ya que ésta absorbe en la misma longitud de onda. Esta interferencia se corrige restando la absorbancia de la materia orgánica disuelta medida a 275 nm, donde no absorbe el nitrato. Ambas mediciones se realizan con una curva de calibración para determinar la concentración final.

7.3.2. NITRITO

Existen varios métodos 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 de 1 a 180 $\mu\text{g l}^{-1}$ y su precisión es de $\pm 0.4 \text{ NO}_2^- \text{ N l}^{-1}$.

Procedimiento

- 1) A 25 ml de muestra filtrada (GF/C) agregar 0.5 ml de sulfanilamida y agitar.
- 2) Esperar de 2 a 10 min 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 cubeta 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 llevar 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. Volver a preparar cada vez que tome color pardo.
- Solución estándar: Disolver 1.232 g de NaNO_2 previamente secado a 110 °C y llevar a 1 l con AD. La solución contiene 250 $\mu\text{g NO}_2^- \text{ N ml}^{-1}$.
- Se recomienda el uso de agua ultrapurificada (*e.g.*, Milli-Q) para la preparación de las diluciones de la curva de calibración, el blanco de reactivos y el lavado del material.

7.3.3. AMONIO

MÉTODO DE AZUL DE INDOFENOL

Consiste en tratar la muestra con hipoclorito de sodio en medio alcalino tampoadado con citrato, usando nitroprusiato de sodio como catalizador (Koroleff 1970). El rango del método es de 10 a 500 $\mu\text{g NH}_4^+ \text{ N l}^{-1}$ y su precisión es de $\pm 5 \mu\text{g l}^{-1}$.

Procedimiento

- 1) Colocar 10 ml de muestra filtrada (GF/C) en un tubo de vidrio de 25 ml.
- 2) Agregar 0.6 ml de reactivo A y mezclar en vórtex. Luego de 2 min agregar 0.6 ml de reactivo B, mezclar y almacenar una 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 (C_6H_6O) y 200 mg de nitroprusiato de sodio ($Na_2Fe(CN)_5NO$) deshidratado en AD libre de amonio y enrasar a 500 ml. Guardar en heladera y en oscuridad.
- Reactivo B: Disolver 140 g de citrato de sodio ($C_6H_6Na_3O_7$) y 7.5 g de NaOH en 400 ml de AD. Agregar 17.5 ml de hipoclorito de sodio concentrado (NaClO) y enrasar a 500 ml. Filtrar por GF/C. Guardar en heladera y en oscuridad.
- Solución estándar: Disolver 0.1070 g de NH_4Cl secado a $100\text{ }^\circ C$ en AD y llevar a 1 l. La solución contiene $28\text{ mg l}^{-1} NH_4-N$.
- Agua libre de amonio: es necesario el uso de agua ultrapurificada y tomar precauciones para evitar la contaminación de la misma por vía aérea.

MÉTODO DE NESSLER

Este método es aplicable para mayores concentraciones de amonio (0.02 a 5 mg l^{-1} y un error aceptable de 1 a 2 mg l^{-1}), como ocurren en algunas aguas naturales, aguas tratadas para potabilización y efluentes altamente purificados, pero con poco color. 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. Por otra parte, sólo brinda una aproximación y a altas concentraciones, ya que el rango de aplicación de esta técnica es de 1 a 1000 mg l^{-1} y la precisión 0.1 mg l^{-1} . Detalles sobre la construcción y uso del electrodo pueden encontrarse en Beckett & Wilson (1974) y Shibata (1976).

7.3.4. NITRÓGENO KJELDAHL

Esta técnica permite la determinación de nitrógeno orgánico. El “nitrógeno Kjeldahl” es la suma del N orgánico y el amonio. 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 orgánico contenido en compuestos de 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 Kjeldahl. Si ambas formas son determinadas por separado, el nitrógeno orgánico se obtiene por diferencia.

Procedimiento

- 1) Preservación de las muestras. Los mejores resultados se obtienen con muestras frescas. Si el análisis inmediato no es posible, acidificar las muestras a pH 1.5 a 2.0 con H_2SO_4 concentrado y guardar a 4 °C.
- 2) Interferencias. Nitrato: por encima de 10 mg l⁻¹ se puede oxidar el amonio liberado del N orgánico digerido. Sales inorgánicas y sólidos: pueden elevar la temperatura de digestión a 400 °C, ocurriendo pérdida de N. Aumentar el agregado de H_2SO_4 para mantener el balance ácido-salino (1 ml H_2SO_4 /g sales). Materia orgánica: altas concentraciones de materia orgánica aumentan la cantidad de ácido que será consumido.
- 3) Colocar un volumen de muestra filtrada (GF/C) según su concentración de nitrógeno orgánico (mg l⁻¹) en un matraz Kjeldahl de 800 ml:

Nitrógeno orgánico (mg l ⁻¹)	Volumen de muestra (ml)
0 - 1	500
1 - 10	250
10 - 20	100
20 - 50	50
50 - 100	25

- 4) 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.
- 5) Digestión: verter 10 ml de H_2SO_4 , 6.7 g de K_2SO_4 y 1.25 ml de HgSO_4 en el matraz. Mezclar, agregar cuentas de vidrio y calentar en campana de gases hasta que el volumen se reduzca en 25-50 ml y se formen vapores de color blanco. Continuar la digestión por 30 min.
- 6) 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.
- 7) 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 por el método de idofenol, Nessler y electrodo selectivo, será H_2SO_4 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 1 a 2 min más para limpiar el condensador.
- 8) 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 Kjeldahl o como nitrógeno orgánico si se le resta el amonio de la muestra original.

Reactivos

- Las soluciones y reactivos deben prepararse con agua libre de amonio.
- Sulfato de mercurio: 8 g de óxido de mercurio rojo (HgO) en 100 ml de H_2SO_2 6 N.
- Tiosulfato de sodio-hidróxido de sodio: Disolver 500 g de NaOH y 25 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.

- 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 0.025 M (9.5 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ en 1 l de AD) y llevar a 1 l.

7.3.5. 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 (NT) o filtrada (NTD) en botella autoclavable con tapa rosca, y agregar 8 ml de solución oxidante. Autoclavar durante 30 min a 121 °C.
- 2) Analizar nitratos por alguno de los procedimientos descritos en 7.3.1. Para los cálculos de concentración, utilizar curvas de calibración realizadas con diluciones tratadas igual que las muestras.

Reactivos

- Solución oxidante: Disolver 50 g de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ y 30 g de ácido bórico en 350 ml de NaOH 1M. Completar hasta 1 l con AD o agua ultrapurificada. Almacenar en frasco de vidrio oscuro a temperatura ambiente protegido de la luz directa, hasta 6 a 8 meses.
- Soluciones estándar: *idem* 7.3.1.

7.4. FÓSFORO

El fósforo ocurre en aguas naturales y principalmente en forma particulada, inorgánica u orgánica. Una parte generalmente menor se encuentra en forma disuelta orgánica (nucleótidos, sustancias húmicas, poli, meta y ultrafosfatos) o inorgánica (PO_4^{3-} , HPO_4^- , H_2PO_4^-). La demanda de fósforo por bacterias y algas es muy alta en relación a su oferta. Su principal función es la acumulación de energía química para su utilización en procesos metabólicos, además de su función estructural.

La baja disponibilidad en aguas continentales de las formas inorgánicas asimilables (Hudson *et al.* 2000) en relación a su demanda, resulta en que el fosfato sea el nutriente limitante de la producción primaria en muchos sistemas y, por lo tanto, el que determina el estado trófico de los mismos (Schindler *et al.* 2008; Smith & Schindler 2009). El aumento de este elemento en el medio acuático está relacionado a diversas actividades humanas, principalmente el uso de fertilizantes, vertidos domésticos, industriales y pecuarios, por lo cual el fósforo total es muy utilizado como indicador de calidad de agua. Este aumento generalmente resulta en el crecimiento rápido y masivo de algas y cianobacterias potencialmente nocivas (floración) (Aubriot & Bonilla 2012), ya que algunos grupos fijan el N atmosférico y pueden crecer a expensas del fosfato disponible y las reservas de polifosfato intracelular.

A diferencia del nitrógeno, la forma gaseosa del fósforo no es significativa. En cambio, existe una reserva importante de fósforo en los sedimentos que se libera hacia la columna de agua cuando se produce anoxia en el hipolimnion. El PO_4^{3-} se libera de los

sedimentos en condiciones reductoras por la pérdida de adsorción a los óxidos (*e.g.*, férrico). Este proceso se conoce como liberación de la carga interna, y generalmente desafía los esfuerzos de mitigación de la eutrofización de los ecosistemas acuáticos.

7.4.1. FÓSFORO REACTIVO SOLUBLE

La verdadera concentración de PO_4^{3-} en ambientes limitados por P es desconocida, ya que los métodos para detectarlo sobreestiman en mayor o menor medida su concentración real (Fisher & Lean 1992; Hudson *et al.* 2000). 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, la que corresponde aproximadamente al ortofosfato. Este método químico sobreestima la concentración de PO_4^{3-} debido a la reacción con color de formas adsorbidas a óxidos y materia orgánica, por la hidrólisis parcial de la misma en medio ácido y por la lisis celular que pueda ocurrir durante la filtración de la muestra con liberación de PO_4^{3-} citoplasmático.

El método radioquímico (^{32}P) (Rigler 1956; Aubriot *et al.* 2000) sobreestima en menor medida la concentración de PO_4^{3-} debido a la posible lisis celular durante la filtración (límite de detección $0.01 \mu\text{g PO}_4^{3-}\text{-P l}^{-1}$). Otros métodos infieren la concentración de fosfato mediante cálculos y estimaciones a partir del método radioquímico (Hudson *et al.* 2000).

MÉTODO DEL 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 (Murphy & Riley 1962). El rango del método es de 10 a $300 \mu\text{g P l}^{-1}$ y el límite de detección $10 \mu\text{g P l}^{-1}$.

Procedimiento

- 1) Colocar 50 ml de muestra filtrada (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

- Reactivo mixto (para 10 muestras): Mezclar 10 ml de molibdato de amonio $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 25 ml de H_2SO_4 , 10 ml de ácido ascórbico $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ y 5 ml de tartrato de antimonio y potasio $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4$. No almacenar más de 6 h.
- Molibdato de amonio: Disolver 15 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en AD y llevar a 500 ml. Guardar en botella plástica oscura.
- Ácido sulfúrico: Agregar 140 ml de H_2SO_4 a 900 ml de AD.
- Ácido ascórbico: Disolver 27 g de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ en AD y llevar a 500 ml.
- Tartrato de antimonio y potasio: 0.34 g de $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4$ en 250 ml de AD.
- Solución estándar: Disolver 219.5 mg de KH_2PO_4 anhidro en AD y llevar a 1 l. La solución contiene $50 \mu\text{g ml}^{-1} \text{PO}_4^{3-}\text{-P}$.

7.4.2. FÓSFORO TOTAL Y TOTAL DISUELTO

La digestión a alta temperatura y en 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 (PNR) puede establecerse sustrayendo la concentración de PRS al valor del PTD.

Para su determinación se describe una digestión fuerte en un medio ácido. También puede usarse el método de Valderrama (1981) que se describe a continuación, 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 7.3.5), y comparando los resultados obtenidos mediante la digestión. El método consiste en una digestión con ácido sulfúrico y persulfato de potasio a alta temperatura.

Procedimiento

- 1) Colocar 40 ml de muestra homogeneizada filtrada (PTD) o sin filtrar (PT) en botella autoclavable con tapa rosca
- 2) Agregar 8 ml de reactivo oxidante. La muestra puede conservarse 70 días en oscuridad.
- 3) Autoclavar por 30 min a una atmósfera y dejar enfriar.
- 4) Determinar PRS como en 7.4.1.
- 5) Calcular la concentración a partir de una curva de calibración confeccionada con estándares tratados según los pasos anteriores. Expresar los resultados como PT o PTD.

Reactivos

- Reactivo oxidante: Disolver 50 g de persulfato de potasio (libre de N) y 30 g de ácido bórico en 350 ml de hidróxido de sodio 1M. Completar hasta 1 l con AD. Almacenar en frasco de vidrio oscuro y a temperatura ambiente de 6 a 8 meses.

7.4.3. FRACCIONAMIENTO DE FÓSFORO

La extracción secuencial de fósforo del material en suspensión o de los 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 su correlación con propiedades del material suspendido o de los sedimentos.

El análisis debe llevarse a cabo en muestras frescas, inmediatamente a la colecta. En caso contrario, las mismas 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 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 correspondan al fósforo total de la muestra ($\pm 10\%$ de error). Se detallan a continuación las principales fracciones y los solventes utilizados (Psenner *et al.* 1988).

- 1) Extracción con NH_4Cl a pH neutro (PL): Esta fracción se denomina lábil y constituye el P inmediatamente disponible. Incluye el liberado por aumento de la salinidad, el cual puede variar con la dureza del agua. El NH_4Cl 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 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_2O_3) 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 (ver 7.4.2) 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 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_4Cl 1 M	2	filtrar	PRS
$NaHCO_3$ 0.1 M	1	filtrar	PRS
+ $Na_2S_2O_4$ 0.1 M		oxidar	
$NaOH$ 1 M	18	filtrar	PRS
		neutralizar oxidar	
$NaOH$ 1 M	1	filtrar	PRS
		neutralizar oxidar	
HCl 0.5 M	18	filtrar	PRS
		neutralizar	
HCl 0.5 M	1	filtrar	PRS
		neutralizar	

7.4.4. FLUJO DE FÓSFORO EN LOS SEDIMENTOS

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

Existen diversos procedimientos para 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 en el sedimento ($\mu\text{g g}^{-1}$), 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 K_2HPO_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 los 1, 5, 15, 30 y 60 min y 2, 3, 4, 24 y 48 h.
- 3) El PRS se analiza por el método del azul de molibdeno (ver 7.4.1) y el PT por digestión ácida con persulfato de potasio (ver 7.4.2). 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 del fósforo liberado PL.

7.5. SÍLICE

Se encuentra fundamentalmente como ácido silícico ($\text{H}_x\text{Si}_y\text{O}_z$) disuelto y sílice (SiO_2) 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 mg l^{-1} (media mundial de ca. 13 mg l^{-1} SiO_2). Es de gran importancia para las diatomeas, algas que lo utilizan en la formación de sus frústulos, siendo las principales reguladoras del sílice en los sistemas acuáticos.

7.5.1. SÍLICE TOTAL

El método gravimétrico brinda la concentración de sílice total en muestras con más de 10 mg l^{-1} SiO_2 , con una precisión de 0.2 mg l^{-1} SiO_2 (APHA 1995). Consiste en descomponer con ácido clorhídrico los silicatos y el sílice disuelto 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.

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 un total de 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 y reservar el filtro con el residuo. Lavar el residuo de la cápsula

con HCl 2% caliente y luego con un volumen mínimo de AD. Reunir todo el volumen del lavado con el filtrado.

- 4) Evaporar el filtrado y el lavado reunidos en el mismo recipiente a 110 °C y repetir el paso 3. Usar un nuevo 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 silíce. Pesar el crisol con su contenido.
- 6) Humedecer minuciosamente el residuo ya pesado con AD, agregar 4 gotas de H₂SO₄ 50% y 10 ml de HF concentrado.
- 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 de ésta. La diferencia (A) en mg es la pérdida por volatilización y representa al silíce (SiO₂) en mg l⁻¹ SiO₂, y V el volumen de la muestra en ml:

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

7.5.2. 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⁻¹ y la precisión de 7 µg l⁻¹.

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

- Heptamolibdato de amonio: Disolver 4 g de (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O en 300 ml de AD. Agregar 12 ml de HCl 12 N y llevar a 500 ml. Mantener en un frasco de plástico en heladera y en oscuridad.
- Solución reductora: Mezclar 50 ml de metol-sulfito con 30 ml de ácido oxálico. Agregar lentamente y agitando 30 ml de H₂SO₄ diluido y llevar a 150 ml con AD. Preparar cada vez.
- Metol-Sulfito: Disolver 3 g de Na₂SO₃ en AD, agregar 5 g de sulfato de p-metilaminofenol (metol) (C₇H₉NO·1/2H₂SO₄) y llevar a 250 ml. Filtrar con papel Whatman N° 1 y almacenar en botella de vidrio. Preparar una vez al mes.
- Ácido oxálico: Disolver 50 g de (COOH)₂·2H₂O en AD. Enrasar a 500 ml.
- Ácido sulfúrico diluido: Agregar 250 ml de H₂SO₄ concentrado a 250 ml de AD, dejar enfriar a temperatura ambiente y llevar a 500 ml.
- Solución estándar: Disolver 0.960 g de Hexafluosilicato de sodio (Na₂SiF₆) en AD y llevar a 1 l. La solución contiene 140.45 µg Si ml⁻¹. Almacenar en botella de polietileno. La solución es estable por tiempo indefinido.

7.6. RESULTADOS

7.6.1. LA ALCALINIDAD EN UN ARROYO CONTAMINADO

En la figura 7.2 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 de recuperación requirió un menor volumen de ácido para alcanzar dicho valor, determinando una menor capacidad de amortiguación.

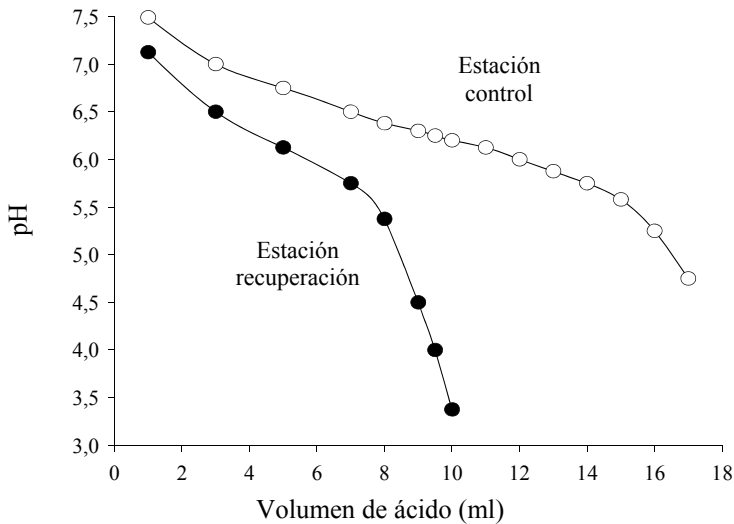


Figura 7.2. Curvas de titulación del agua de dos estaciones del arroyo Toledo para determinación de la alcalinidad (Arocena 1991).

7.6.2. VARIACIÓN DEL COD EN UNA LAGUNA COSTERA

En la figura 7.3 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^{-1} en la zona sur a 11 mg l^{-1} en la zona norte, asociado a conductividades de 0.1 a 40 mS cm^{-1} . La alta variabilidad de las características climáticas de la región produce pulsos de materia orgánica disuelta de origen terrestre que llega 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 ($p < 0.01$).

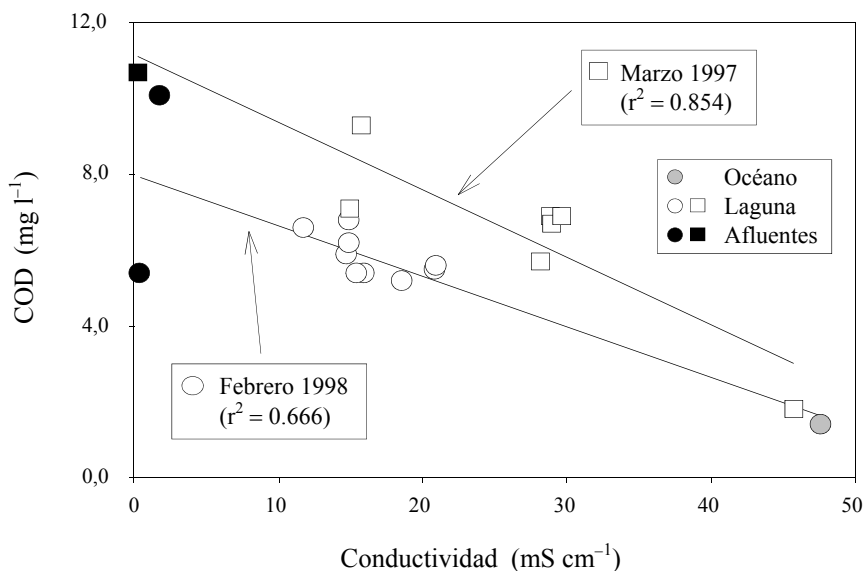


Figura. 7.3. Relación entre la conductividad y la concentración de carbono orgánico disuelto (COD) en 13 estaciones de la Laguna de Rocha, durante transectos realizados en 1997 y 1998 (Conde *et al.* 1998b).

7.6.3. ORIGEN DE LOS NUTRIENTES EN SALTO GRANDE

En la figura 7.2 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 período mayo 1992 - abril 1993. El sílice reactivo y el nitrógeno total presentaron una variación inversa respecto del fósforo total, similar a la precipitación en la cuenca local. Las fracciones de fósforo mostraron, en cambio, 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 sílice reactivo y el nitrógeno total asociados a la precipitación, indicarían un aporte local de estos nutrientes al sistema (Conde *et al.* 1996).

7.6.4. EFECTO DE LA CARGA INTERNA EN LA DINÁMICA DE NUTRIENTES DE UN LAGO HIPEREUTRÓFICO MONOMÍCTICO

Los lagos suburbanos de la Ciudad de la Costa (Canelones) son antiguas arenaras inundadas por las napas freáticas superficiales. Debido a su profundidad (de 6 a 10 m) dichos lagos son típicamente monomícticos con hipolimnion anóxico. La falta de saneamiento durante décadas (actualmente en vías de regularización) y las actividades industriales (frigoríficos y cartoneras), han provocado un rápido proceso de eutrofización. Dicho proceso, sumado a su régimen de estratificación y anoxia, provoca una heterogeneidad vertical muy marcada y la liberación de los nutrientes del sedimento debido a las condiciones reductoras del hipolimnion. Esta dinámica temporal y espacial propicia el crecimiento de cianobacterias durante todo el año, con su máximo en verano.

Se investigó el efecto de la estratificación en la dinámica de los nutrientes como indicador de la liberación de la carga interna de un lago (34°52' S, 56°02' O, Jover, cantera Martínez) en muestreos mensuales (junio 2010 a junio 2011), en el marco de un proyecto estudiantil (CSIC-PAIE: L. Delbene, M. Gerhard, A. Marrero, V. Samsa y L. Aubriot). La figura 7.4 muestra la variación del oxígeno disuelto y la formación del hipolimnion anóxico (OD, A) durante la estratificación de la columna de agua (líneas punteadas verticales).

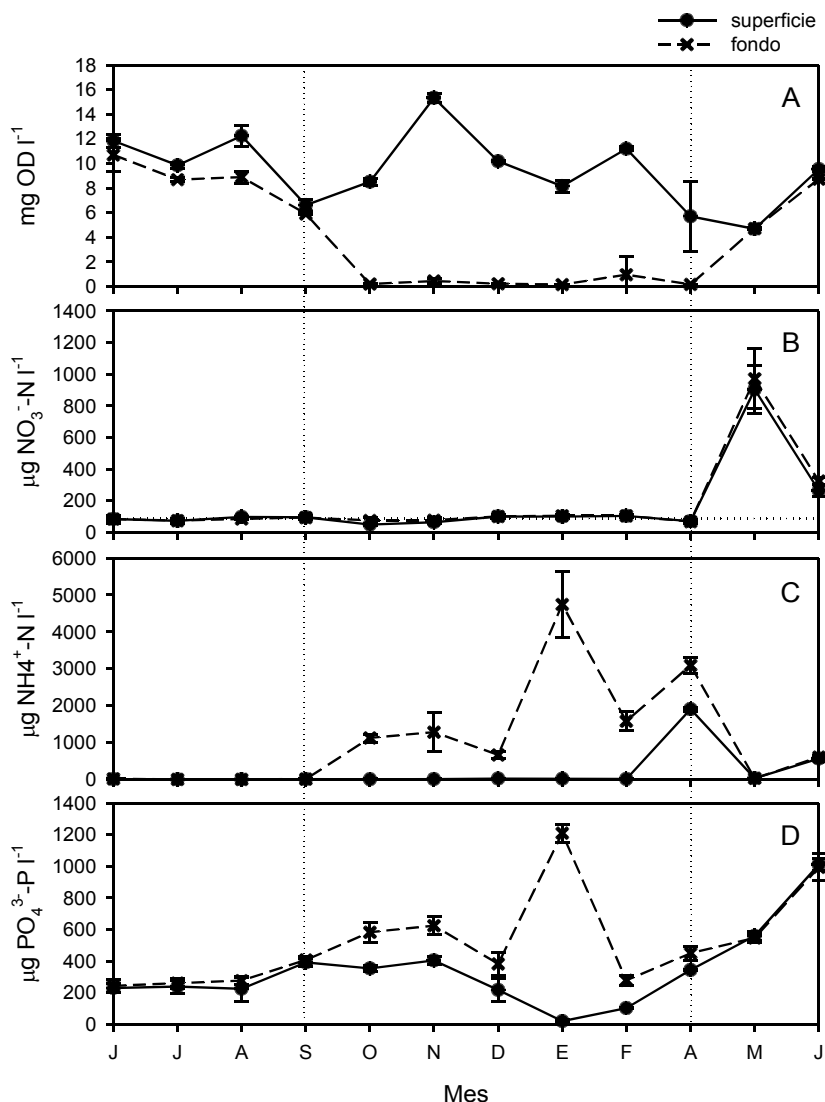


Figura 7.4. Variación anual de la concentración de oxígeno disuelto (OD, A), nitrato (B), amonio (C) y fosfato (D) en la superficie y fondo del lago Jover durante el periodo de mezcla y estratificación (delimitado por la línea punteada vertical). La línea punteada horizontal en B indica el límite de detección para nitrato.

El nitrato (B) fue indetectable (línea punteada horizontal) previo y durante la estratificación, alcanzando valores altos luego de la mezcla (nitrificación). La estratificación provocó el aumento del amonio (C) hipolimnético por procesos de descomposición de materia orgánica (amonificación), mientras que en la superficie fue prácticamente indetectable por el consumo fitoplanctónico. El fosfato (D) fue muy alto durante todo el período, con valores máximos próximo a la mitad del período de estratificación, de forma similar al amonio. Sin embargo, el fosfato en la superficie tendió a disminuir con un valor mínimo durante el máximo de biomasa (482 μg clorofila $a\ l^{-1}$), próximo al límite de detección.

Una vez comenzada la mezcla, las concentraciones del fondo tienden a igualarse con las de la superficie, lo que provoca un pulso de concentración elevada en toda la comuna de agua. A pesar de ser un lago hipereutrófico, la concentración de algunas formas disueltas pueden alcanzar valores indetectables debido a la intensa actividad biológica (limitación temporal de nutrientes).

7.6.5. FORMAS DE NITRÓGENO INORGÁNICO EN UN EMBALSE

En la tabla 7.3 se muestran las concentraciones de las formas inorgánicas de nitrógeno en el embalse del Cisne (33°44' S, 55°49' W, Canelones). Los bajos valores de las tres formas de nitrógeno registradas en este sistema durante el período 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 7.3. Concentración de las formas nitrogenadas inorgánicas en el embalse del Cisne (tomado de Mazzeo *et al.* 1995).

Estación	$\mu\text{g}\ l^{-1}$	NO_2^-	NO_3^-	NH_4^+
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

COMUNIDAD MICROBIANA

CLAUDIA PICCINI Y DANIEL CONDE

LOS MICROORGANISMOS ACUÁTICOS INCLUYEN A LOS PROCARIOTAS PERTENECIENTES tanto al Dominio Bacteria como Archaea, a los protozoarios unicelulares (tanto heterótrofos como autótrofos y mixótrofos) y a los virus. Sin embargo, entre ellos, las más estudiadas han sido las bacterias.

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 más pequeños como micro y nanoflagelados heterotróficos, y ciliados. Este concepto de anillo (*loop*) microbiano explica el traspaso de la materia orgánica disuelta a la cadena trófica clásica (Pomeroy 1974).

Si bien la bacterivoría es considerada uno de los factores más importantes de control de las poblaciones bacterianas en los ambientes acuáticos (Pernthaler 2005), en los últimos años se encontró que las infecciones virales (bacteriófagos) también son, en determinadas ocasiones, una causa importante de mortandad bacteriana (Fuhrman & Noble 1995). Más aún, se ha descrito que en ciertos casos, la mortandad causada por virus puede ser de mayor importancia que la bacterivoría en el control de la abundancia bacteriana (Fuhrman & Suttle 1993; Wommack & Colwell 2000). Se ha descrito que en sistemas marinos, entre el 6 y el 26% del carbono fijado mediante la fotosíntesis es derivado a los niveles tróficos superiores en forma de materia orgánica disuelta, a través de la lisis viral, contribuyendo así a la productividad de los ecosistemas (Wilhelm & Suttle 1999).

A pesar de los avances en el estudio de los microorganismos acuáticos en las últimas décadas, la limitación principal continúa siendo de índole metodológico. Por ejemplo, el porcentaje de bacterias acuáticas que pueden ser cultivadas en medios

microbiológicos puede ser menor al 0.1% del total determinado por conteo directo (Kogure *et al.* 1978; Ferguson *et al.* 1984; Amann *et al.* 1995; Sorokin 1999). Por tanto, las técnicas tradicionales de cultivo no permiten evaluar adecuadamente la abundancia y actividad de los microorganismos en el ambiente, especialmente en donde virus, bacterias y protozoarios viven en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes. En estos casos, 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, 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. Los hallazgos de altas abundancias y frecuencias de infección viral en bacterias acuáticas, han promovido la idea de que los virus influyen en la diversidad bacteriana (Fuhrman & Suttle 1993; Thingstad *et al.* 1993). Esta teoría se ha plasmado en el concepto de “matar al ganador” (*killing the winner*; Thingstad & Lignell 1997), el cual postula que los virus líticos mantienen ciertas poblaciones –que de otra forma serían dominantes– a bajos niveles, y de esta forma permiten la coexistencia de poblaciones menos competitivas y, por lo tanto, mantienen la diversidad bacteriana.

8.1. CUANTIFICACIÓN DE VIRUS

Es posible cuantificar partículas virales en muestras de agua, mediante el empleo de tinciones fluorescentes y cuantificación en microscopio de epifluorescencia (Chen *et al.* 2001; Patel *et al.* 2007).

Procedimiento

- 1) Fijar 15 a 50 ml de la muestra de agua con una solución tamponada de paraformaldehído a pH 7.2 (PFA) prefiltrado (0.02 μm), llegando a una concentración final de 1%.
- 2) Incubar 10 min a temperatura ambiente.
- 3) Colocar las muestras en nitrógeno líquido por al menos 30 min. Una vez congeladas se pueden almacenar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Alternativamente, si las muestras van a ser preparadas inmediatamente, colocarlas en hielo y comenzar a prepararlas antes de 4 h de la colecta y fijación.
- 4) Colocar una gota de 100 μl de SYBR Gold 2 \times en una placa de Petri. Montar un filtro de 0.02 μm de tamaño de poro sobre un filtro soporte pre-humedecido de 0.45-0.8 μm de tamaño de poro. Lavar la torre de filtración antes de agregar la muestra con agua ultrapura autoclavada y filtrada (0.02 μm). Secar cuidadosamente las gotas que hayan quedado en la torre con papel secante limpio.
- 5) Filtrar 2 ml (o lo que sea necesario de acuerdo a la densidad viral del sistema) de la muestra de agua usando una presión menor a 150 mm Hg. Remover el filtro evitando que se rompa y escurrirlo en papel para eliminar exceso de agua.
- 6) Colocar el filtro sobre la gota de SYBR Gold 2 \times (la cara que tiene la muestra hacia abajo, en contacto directo con la gota) durante 15 min en la oscuridad. Luego de teñido, secar el filtro sobre papel en la oscuridad. El filtro está listo para montar (ver montaje para bacterias más adelante). Las muestras teñidas pueden almacenarse a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la oscuridad hasta 3 meses.
- 7) Contar al menos 300 partículas virales (VLP, del inglés *Virus Like Particles*) en 10-20 campos elegidos al azar. El número final en la muestra se calcula:

$$\text{NVLP (ml}^{-1}\text{)} = (\text{N} \times \text{FG} \times \text{DF}) / (\text{FA} \times \text{V})$$

donde NVLP es la abundancia de VLP/ml, N el número de VLP contadas, FG el área efectiva de filtración (μm^2) que depende del sistema de filtración usado, DF el factor de dilución (debido a la fijación), FA el área del campo contado (μm^2) y V el volumen filtrado (ml).

Reactivos

- PFA: Paraformaldehído. Preparar una solución al 10% en PBS 1 \times , pH 7.2.
- SYBR Gold: Preparar una solución 2 \times de SYBR Gold inmediatamente antes de comenzar a filtrar las muestras. Diluir la solución original de SYBR Gold (10000 \times) para obtener una solución 100 \times con *buffer* TE filtrado por 0.02 μm (10 mM Tris-Cl; 1 mM EDTA, pH 7.4-7.6). Esta solución 100 \times puede almacenarse a -20°C por 2 semanas y a partir de ella se prepara la solución de trabajo 2 \times .
- Solución tampón TE: 10 mM Tris-Cl, pH 7.5 y 1 mM EDTA.

8.2. BACTERIAS PLANCTÓNICAS

Las bacterias planctónicas 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.

Mediante microscopía de epifluorescencia, se observó que la abundancia bacteriana 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 $3.0 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$, pudiendo alcanzar 10^7 en sistemas eutróficos. La actividad bacteriana, medida por ejemplo como la incorporación de sustratos marcados radiactivamente, puede presentar variaciones estacionales.

8.2.1. IDENTIFICACIÓN

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

Los avances metodológicos en las últimas décadas, tales como la amplificación *in vitro* del ADN y la secuenciación, han provisto nuevas herramientas para detectar microorganismos en ambientes acuáticos y estudiar la biodiversidad y abundancia relativa de los principales grupos *in situ*. La principal ventaja de los métodos de detección basados en ácidos nucleicos, es que permiten monitorear poblaciones de bacterias en su matriz ambiental y detectar la presencia de otros organismos e interacciones que comprenden la comunidad microbiana (Holben *et al.* 1993). Estas técnicas pueden emplearse tanto para identificar grupos bacterianos como para detectar la presencia de determinadas funciones en el ambiente, lo que dependerá de los genes elegidos para el análisis. Incluso para ciertos grupos se pueden hacer inferencias acerca de su fisiología, en el caso que se conozca la afiliación filogenética de alguno de sus parientes más cercanos (Neufeld *et al.* 2004).

Las tecnologías de secuenciación de nueva generación, permiten obtener miles de secuencias pertenecientes al gen para el ARNr 16S de una muestra (Huse *et al.* 2008). Esto posibilita un estudio detallado de los cambios que sufren las comunidades bacterianas debidos a las variaciones ambientales.

8.2.2. 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 emite fluorescencia color azul brillante, indicando la presencia de células vivas, aunque no necesariamente activas.

Procedimiento

- 1) Fijar un volumen de muestra con PFA (concentración final 1-2%), antes de las 3 h del muestreo.
- 2) Antes de las 8 h de fijada la muestra, filtrar (a <80 mm de Hg) 1 a 5 ml (para obtener 50 a 100 bacterias por campo) por un filtro de policarbonato de 25 mm de diámetro y 0.2 µm de tamaño de poro. Si el volumen de muestra es menor, agregar AD hasta 2 ml.
- 3) Agregar DAPI para obtener una concentración final de 1 µg/ml e incubar durante 5 min en oscuridad. Filtrar el resto de la muestra manteniendo el filtro levemente húmedo. Alternativamente, se puede filtrar la muestra fijada y teñir luego el filtro en una solución de DAPI, evitándose así la contaminación del equipo de filtración con dicho compuesto que es altamente tóxico.
- 4) Colocar el filtro sobre un portaobjetos y agregar una pequeña gota de aceite de inmersión o de medio de montaje (*e.g.*, Citifluor™). Colocar un cubreobjetos sobre el filtro y presionar levemente hasta que se sellen los bordes. Se puede congelar el preparado por varios días.
- 5) Contar al menos 1000 bacterias teñidas con DAPI presentes en al menos 20 campos a 1250 aumentos, en un microscopio de epifluorescencia o confocal que contenga un set de filtros adecuados para la visualización del fluoróforo.
- 6) Calcular la densidad total de bacterias (DTB) en células ml⁻¹, según:

$$DTB = C \cdot AF \cdot F/V$$

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

Reactivos

- DAPI: 4', 6-diamidino-2-fenilindol. Se prepara una solución 1 mg ml⁻¹ de DAPI en agua destilada estéril. Almacenar a -20 °C. La concentración recomendada de trabajo es 1 µg ml⁻¹.

8.2.3. 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 ésta (microscopía de epifluorescencia o electrónica, análisis digital o citometría de flujo).

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 filtros de membrana de 1 µm, o el lavado con ADLP, respectivamente.

Varios modelos de conversión (relación constante, biomasa constante y alométrico) son revisados por Norlan (1993) y Posch *et al.* (2001). 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 (ver más adelante).

MICROSCOPIA Y ANÁLISIS DE IMAGEN

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 o por medio de un equipo de análisis de imagen, siendo este último método el más aceptado.

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 imágenes digitales de microscopía de epifluorescencia, para su posterior análisis empleando *software* de análisis de imágenes. Algunos de estos *software* son de acceso gratuito, como el *ImageJ* (disponible en <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>>). Para el análisis de imágenes y medición de las dimensiones celulares se emplean diversos algoritmos, dependiendo de la forma de las células (cocos o bacilos cortos o filamentos) y de su tamaño, como se describe en Massana *et al.* (1997) y en Nedoma *et al.* (2001).

A modo de ejemplo, se deben realizar de 50 a 200 mediciones por muestra, dependiendo de la variación del tamaño encontrado, para obtener resultados aceptables de biovolumen bacteriano (V), el que se puede calcular de acuerdo a la siguiente fórmula (en μm^3):

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

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 (Bratbak 1985).

Sin embargo, existen otras fórmulas que se pueden aplicar para calcular el biovolumen (Massana *et al.* 1997). Una vez obtenido el biovolumen bacteriano, existen diversos factores de conversión a biomasa en unidades de carbono. El cálculo del contenido de carbono (CC) por célula, se obtiene generalmente aplicando factores de conversión lineales o alométricos. Sin embargo, existen discrepancias entre el contenido de carbono que dependen de la tinción fluorescente empleada (*e.g.*, DAPI o naranja de acridina) (ver detalles de distintos factores de conversión empleados en Posch *et al.* 2001) y del sistema en estudio (oligotrófico, mesotrófico, etc.). Como resultado de un estudio comparativo, Posch *et al.* (2001) sugieren que para el caso de la tinción con DAPI, el uso de la fórmula de conversión alométrica $CC = 218 \times V^{0.86}$ (Loferer-Krößbacher *et al.* 1998) sería el más adecuado.

8.2.4. ACTIVIDAD HETEROTRÓFICA

Solo una parte de la flora bacteriana acuática se encuentra activa en un cierto momento (Stevenson 1978). Existen distintos métodos para determinar la producción de biomasa y actividad bacteriana, tanto a nivel de la comunidad como a nivel individual. Entre los primeros se encuentra la incorporación de precursores de macromoléculas marcados con radioactividad (aminoácidos, nucleótidos), cuya incorporación a la biomasa microbiana se detecta mediante centelleo líquido (Riemann & Bell 1990). Por otro lado, las técnicas de actividad a nivel individual combinan la incorporación de sustratos radiactivos y su posterior revelado por microautorradiografía con técnicas de hibridación *in situ* (MAR-FISH) (Cottrell & Kirchman 2000), o

el empleo de colorantes fluorescentes que se incorporan a las células solo si éstas se encuentran activas (*e.g.*, el CTC-formazán), y su posterior cuantificación por citometría de flujo (Sherr *et al.* 1999) o microscopía de epifluorescencia (Sondergaard & Danielsen 2001). Esta última permite cuantificar el número de microorganismos de una población o comunidad que se encuentran activos en determinado momento.

La incorporación de Timidina y Leucina durante la síntesis de ADN y 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. Esto depende del conocimiento exacto de varios componentes celulares (concentración de ADN o proteína por célula, relación Timidina/ADN y dilución intracelular del marcador). Se describirá aquí la técnica de incorporación de ^{14}C [Leucina], detallada en Sommaruga (1993). La metodología para el uso de Timidina puede ser consultada en Bell (1993). A continuación se describirán dos métodos, uno para determinar la actividad heterotrófica total y otro que permite cuantificar la abundancia relativa de bacterias activas.

8.2.5. PRODUCCIÓN BACTERIANA

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.
- 2) Agregar ^{14}C [Leucina] de 310 mCi mmol^{-1} de actividad específica (concentración final 20 nM).
- 3) Incubar los viales a la misma temperatura de colecta en la oscuridad durante 1 h. Detener la incubación con 0.5 ml de formalina 40%.
- 4) Estimar la absorción abiótica en otras 2 réplicas fijadas antes de la adición de Leucina con formalina (concentración final 2%).
- 5) Filtrar las muestras por filtros de nitrato de celulosa de 0.2 μm (Sartorius[®]) y extraer las proteínas agregando ácido tricloroacético frío ($\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$; concentración final 5%).
- 6) 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 cóctel de centelleo (Filter Count PACKARD[®]) o 1 ml de etilacetato ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$) y 10 ml de Scintiverse-E (Beckman[®]). Medir la actividad en un contador de centelleo líquido.
- 7) Calcular la Leucina incorporada (Leu) en $\text{mmol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ según:

$$\text{Leu} = (\text{U/S})(4.5 \times 10^{-13})/t v$$

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

- 8) Calcular la producción bacteriana de proteína (PBP) en g proteína $\text{l}^{-1} \text{h}^{-1}$ 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.

- 9) Calcular la producción bacteriana de carbono (PBC) multiplicando la producción bacteriana de proteína (PBP) por 0.86 (relación carbono celular:proteínas).

- 10) Para calcular la producción celular bacteriana (PB) en células $l^{-1} h^{-1}$, se divide la producción bacteriana de carbono (PBC) por un factor de conversión empírico (C) del contenido de carbono ($pg\ célula^{-1}$), tomado de la literatura (Norlan 1993):

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

donde V es el volumen celular (μm^3).

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

8.2.6. ABUNDANCIA DE BACTERIAS ACTIVAS

Una de las funciones celulares que se emplea para determinar si un microorganismo se encuentra activo metabólicamente es la respiración. Esta función depende de una cadena de transporte de electrones funcional, que es el principal proceso para mantener el potencial de membrana. Por tanto, la presencia de actividad respiratoria es un indicador de viabilidad de las células. En bacterias, dicha actividad se puede detectar empleando aceptores de electrones artificiales, como por ejemplo sales de tetrazolio, que son reducidas a productos de formazán insolubles. La reducción de las sales de tetrazolio está asociada a enzimas que forman parte de la cadena de transporte de electrones (NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, citocromo c reductasa y oxidasas terminales). Entre las sales de tetrazolio más empleadas se encuentra el CTC (5-cyano-2,3-ditolil cloruro de tetrazolio), que es reducido a 3-cyano-1,5-ditolil formazán (CTF), compuesto insoluble y con fluorescencia roja.

Procedimiento

- 1) Tomar una submuestra de 0.5 ml de agua y agregarle CTC (Sigma) para lograr una concentración final 5 mM.
- 2) Incubar 1 h en la oscuridad a la temperatura *in situ*.
- 3) Detener la incubación agregando PFA 2% (1 h a temperatura ambiente).
- 4) Filtrar en filtros de policarbonato de 0.2 μm de poro y teñir con DAPI empleando el protocolo descrito anteriormente.
- 5) Montar con citifluor y contar en microscopio de epifluorescencia la proporción de células teñidas de rojo en el total de las teñidas con DAPI.

8.3. 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.

8.3.1. ABUNDANCIA

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.

- 2) Agregar 2 ml de formol 40% y 47 ml de solución *buffer* de pirofosfato tetrasódico. Homogeneizar en sonicador por 30 s a 35 kHz.
- 3) 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⁻¹). Incubar en la oscuridad a 4 °C durante 20 min.
- 4) 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® de fondo negro. Lavar el filtro con 2 ml de ADLP y colocarlo en un portaobjetos húmedo.
- 5) Cubrir con una gota de aceite de inmersión o de montante no fluorescentes. Colocar un cubreobjetos evitando la formación de burbujas y por encima otra gota de aceite.
- 6) Enumerar inmediatamente a 1250 aumentos en un microscopio de epifluorescencia. Contar en campos al azar hasta completar 400 bacterias por muestra. Registrar el número de bacterias filamentosas.
- 7) Calcular la densidad de bacterias (DTB) por gramo de sedimento fresco según:

$$DTB_f = ABD/Nav/P_f$$

donde A es el área de filtración (227 mm²), B el número total de bacterias contadas, D el volumen total de dilución (1000 ml), N el número de campos contados por muestra, a el área del campo (0.01 mm²), v el volumen filtrado y P_f el peso del sedimento fresco. Convertir el resultado en DTB por gramo de peso seco (DTB_s), dividiendo DTP_f 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.

Reactivos

- *Buffer* de pirofosfato tetrasódico (Na₄P₂O₇) 0.01 M. Disolver 2.6606 g en ADLP y llevar a 1 l. Para todas las diluciones utilizar ADLP.
- ADLP: Ver 8.1.
- DAPI (10 mg l⁻¹): Ver 8.2.

8.3.2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA HETEROTRÓFICA

Uno de los métodos empleados para estimar la actividad bacteriana en sedimentos, es a través de la cuantificación de la actividad exhibida por algunas enzimas hidrolíticas que las bacterias usan para degradar compuestos orgánicos tales como fosfatasa, esterasa, lipasa, etc. La hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA) es un método rápido, preciso y simple para medir actividad microbiana total en diversos ambientes incluyendo agua (Obst 1985), sedimento y suelo (Schnürer & Rosswall 1982). EL FDA incoloro es hidrolizado, ya sea por esterasa no específicas libres o asociadas a la membrana, liberando un producto fluorescente que puede medirse espectrofotométricamente.

Procedimiento

- 1) Sonicar 1 g de sedimento fresco en 9 ml de *buffer* de fosfato 0.06 M durante 30 s a 35 kHz.
- 2) Extraer 1 ml de la suspensión homogeneizada y agregar 9 ml de *buffer* de fosfato 59 mM pH 7.6 y 40 a 60 µl de FDA 2 mg ml⁻¹.
- 3) Incubar 1 h a temperatura *in situ* en oscuridad y con agitación constante.
- 4) Filtrar por un filtro de 0.45 µm de poro y medir la absorbancia a 490 nm contra un blanco de AD. Para el cálculo de la hidrólisis preparar una curva de calibra-

ción con FDA hidrolizado químicamente. Calcular la hidrólisis de FDA (FDA_H) en $\% l^{-1} h^{-1}$ según:

$$FDA_H = (1000 A F 100)/(S t V)$$

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

Curva de calibración

Agregar 60 μl 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 $\mu mol\ l^{-1}$ hacer sucesivas diluciones para obtener concentraciones de 19, 9.5, 4.25 y 2.12 $\mu mol\ l^{-1}$. Medir la absorbancia a 490 nm y hacer una curva de calibración.

Reactivos

- *Buffer* de fosfato 0.06 M: 8.23 g de dihidrógeno fosfato de sodio (NaH_2PO_4) y 16.08 g de dihidrógeno fosfato disódico ($Na_2H_2PO_4$) por 1000 ml de AD, ajustado a pH 7.6.
- FDA: 20 mg de diacetato de fluoresceína en 10 ml de acetona.

8.3.3. PRODUCCIÓN

Los métodos más utilizados para la determinación de la producción bacteriana en sedimentos también se basan en la incorporación de monómeros (aminoácidos o precursores de bases del ADN) a macromoléculas, cuyo principio es el mismo que para bacterias planctónicas. Entre las dificultades del método aplicado a muestras de sedimentos se encuentran la incertidumbre en la extracción del ADN de la matriz del sedimento (en el caso que se evalúe la incorporación de timidina al ADN), la dilución potencial del radioisótopo en la misma y la perturbación del sedimento original. El procedimiento para analizar la incorporación de timidina es descrito en detalle por Findlay (1993), y el método empleado para determinar la incorporación de leucina se describe en Buesing & Gessner (2003).

8.4. PROTISTAS Y OTRAS DETERMINACIONES

Se presentan en esta sección referencias bibliográficas para 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.* 1993b) 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.* (1993a). Por información relacionada con aspectos estadísticos del conteo de microorganismos, puede recurrirse a Kirchman (1993).

8.5. RESULTADOS

8.5.1. BACTERIOPLANCTON DE UN LAGO URBANO HIPERTRÓFICO

La tabla 8.1 resume las características de la comunidad microbiana de la zona eufótica del hipertrófico 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 el 81% de la variación temporal de la abundancia de las bacterias activas, pero solo el 55% de la abundancia total. La máxima proporción de bacterias activas (marzo) coincidió con un descenso brusco de la abundancia de flagelados heterotróficos (29500 a 7900 células ml⁻¹), lo que sugiere que éstos pueden ser un factor importante para el control de la fracción activa de bacterias planctónicas.

Tabla 8.1. Características de la comunidad microbiana de la zona eufótica del lago Rodó para el período febrero a octubre de 1991 (n = 36) (tomado de Sommaruga & Conde 1997).

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

a. calculado usando la abundancia de bacterias activas

b. calculado usando la abundancia total de bacterias

La abundancia total de bacterias en la zona eufótica del lago Rodó presentó los valores máximos en verano (20.4 × 10⁶ ml⁻¹) y los mínimos en invierno (1.51 × 10⁶ ml⁻¹). La proporción de bacterias activas (reductoras del INT) varió entre 16.5 y 100% (media anual 46.8%) presentando el máximo registro al inicio del otoño (6.04 × 10⁶ ml⁻¹), coincidiendo con temperaturas altas (22 °C). La abundancia total y de células activas se correlacionaron positivamente ($r = 0.736$, $p < 0.001$) (Fig. 8.1).

La baja correlación entre la abundancia de bacterias activas y la concentración de clorofila *a* en el lago Rodó, indica que en sistemas 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.

8.5.2. ESTACIONALIDAD BACTERIANA EN UNA LAGUNA COSTERA

En la figura 8.2 se muestra la abundancia y producción bacterianas de la Laguna de Rocha a lo largo de un año (2003-2004) en dos zonas fisicoquímicamente diferentes: una con características de agua dulce y otra con características de agua

salobre (estuarina). En este estudio, la abundancia bacteriana se determinó mediante tinción con DAPI y cuantificación en microscopio de fluorescencia, y la producción o actividad general de la comunidad a través de la incorporación de leucina marcada con tritio (Piccini *et al.* 2006). Además, en el mismo estudio se analizó la composición de la comunidad bacteriana mediante hibridación *in situ* con sondas específicas para diferentes grupos bacterianos, así como a través de la generación de bibliotecas de clones del gen para el ARNr 16S para conocer la identidad de las poblaciones bacterianas dominantes.

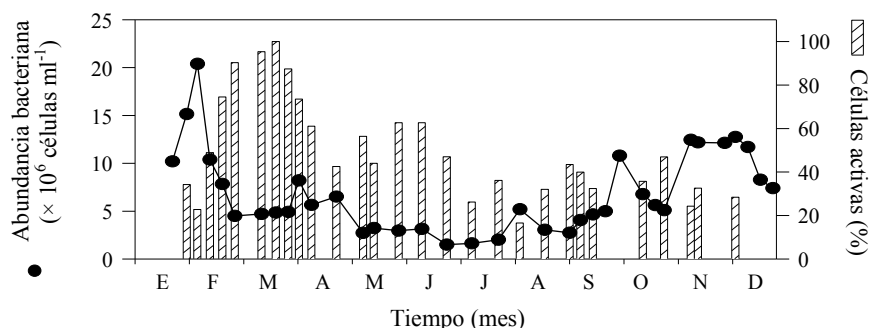


Figura 8.1. Variación anual de la abundancia total de bacterias y de la proporción de bacterias activas (reductoras del INT) en la zona eufótica del lago Rodó (Montevideo) (Sommaruga & Conde 1997).

Tanto la abundancia como la producción total bacteriana presentaron un patrón similar de variación estacional (Fig. 8.2). Particularmente, se observa un aumento significativo de la abundancia en los meses estivales (diciembre y febrero), que es más notorio en la zona estuarina de la laguna, especialmente en el caso de la abundancia bacteriana en diciembre. En el mes de febrero la producción bacteriana de la zona de agua dulce se incrementó en casi un orden de magnitud, hecho que coincidió con un pico en la concentración de clorofila *a* (Piccini *et al.* 2009). Estos aumentos a su vez se dieron luego de la intrusión de agua salobre proveniente de la zona estuarina. En este sistema abundan las fuentes de carbono de origen terrestre, sin embargo, debido a su naturaleza química compleja son de difícil degradación. Por este motivo se hipotetiza que el crecimiento y actividad de la comunidad bacteriana planctónica de la Laguna de Rocha, estarían limitados por carbono y dependen en gran medida del carbono lábil proveniente del fitoplancton (Alonso *et al.* 2013).

En relación a la composición taxonómica del ensamblaje bacteriano, se encontró que el incremento de actividad observado en diciembre coincidió con la dominancia de una Proteobacteria de la clase Gamma, que se identificó a partir de la secuenciación de clones del gen ARNr 16S como *Stenotrophomonas maltophilia*. La abundancia de *S. maltophilia* en diciembre se determinó mediante hibridación *in situ* empleando una sonda específica, registrándose valores $>10^7$ cel. ml^{-1} , inusualmente altos para un sistema acuático natural (Fig. 8.3). Esta “floración” de una especie heterotrófica ha sido reportada con poca frecuencia y sugiere una respuesta muy rápida a los cambios ambientales por parte de algunas poblaciones bacterianas, lo cual probablemente ocurra con cierta frecuencia en este ecosistema y tenga relevancia en el funcionamiento del mismo.

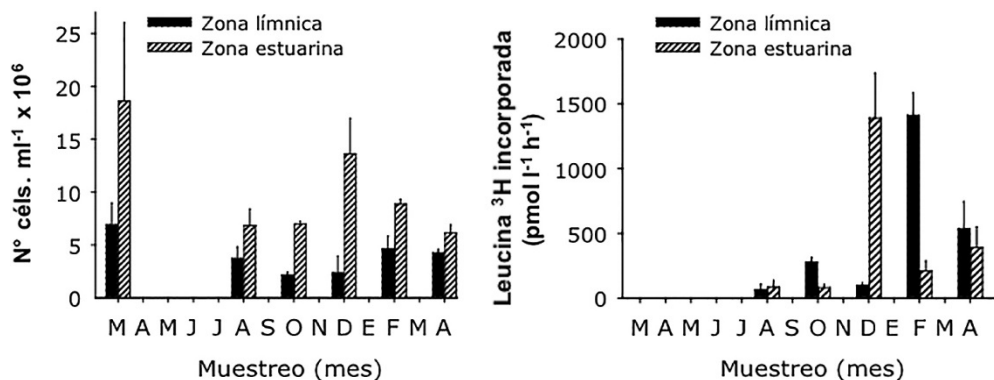


Figura 8.2. Variación anual de la abundancia (izquierda) y producción (derecha) bacterianas totales en la Laguna de Rocha (Piccini *et al.* 2006).

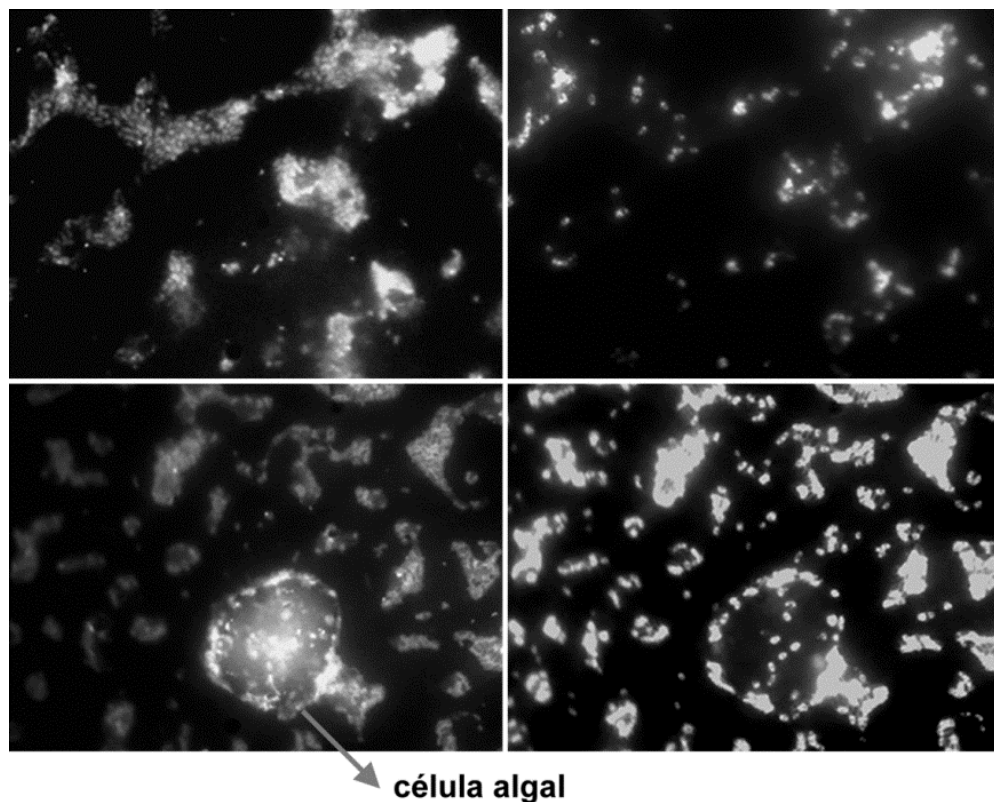


Figura 8.3. Muestra de agua de la Laguna de Rocha en diciembre de 2003 mostrando células de *S. maltophilia* (en paneles de la izquierda: tinción con DAPI; en paneles de la derecha: hibridadas con sonda especie-específica). Se observan las bacterias adheridas a una célula algal (Piccini *et al.* 2006).

FITOPLANCTON

SYLVIA BONILLA, LIZET DE LEÓN Y AMELIA FABRE

EL PLANCTON, TÉRMINO QUE DERIVA DEL GRIEGO Y SIGNIFICA “ERRANTE”, ES la comunidad de organismos suspendidos en la columna de agua con reducido o nulo poder de locomoción. En aguas continentales son mayoritariamente de tamaño microscópico (<1 mm). Sus componentes son las bacterias (bacterioplancton), algas y cianobacterias (fitoplancton), protozoarios e invertebrados (zooplancton) y los virus (femtoplancton). Los estadios larvales de los peces, de mayor tamaño que los antes mencionados, también forman parte del plancton (ictioplancton). También se distinguen organismos euplanctónicos o presentes permanentemente en el plancton, meroplanctónicos o presentes durante parte de su ciclo de vida y pseudoplanctónicos o de presencia accidental.

Comúnmente se diferencian por su tamaño en megaplancton (>20 cm), macroplancton (0.2-20 cm), mesoplancton (0.2-2.0 mm), microplancton (20-200 μm), nanoplancton (2-20 μm), picoplancton (0.2-2.0 μm) y femtoplancton (<0.2 μm). El fitoplancton de los ecosistemas límnicos abarca rangos de tamaño principalmente entre 0.2 y 200 μm , pero también se encuentran algunos representantes en el mesoplancton. El tamaño de los organismos tiene consecuencias en su capacidad de traslación en las masas de agua. Los componentes del femto a nanoplancton viven sujetos al movimiento laminar del agua (número de Reynolds <1). Los organismos de mayor tamaño tienen mayor capacidad de traslación.

El fitoplancton se define como el conjunto de organismos planctónicos fotoautótrofos, que contienen clorofila *a* y realizan fotosíntesis con liberación de oxígeno. Utiliza la radiación solar como fuente de energía en el proceso denominado producción primaria. Son un componente fundamental en los ecosistemas acuáticos ya que se encuentran en los niveles iniciales de las tramas tróficas, determinando la complejidad y contenido energético de las mismas, además de contribuir a la oxigenación de los cuerpos de agua al producir oxígeno como producto residual de la fotosíntesis.

Existen tres niveles de organización en el fitoplancton: unicelular, colonial y filamentosos. Dentro de las especies unicelulares, es posible encontrar desde orga-

nismos picoplanctónicos (*e.g.*, cianobacteria *Cyanobium*) hasta algunos que pueden exceder el milímetro de largo (*e.g.*, clorofita desmidiacea *Closterium aciculare*). Los organismos coloniales son los que pueden alcanzar los mayores tamaños (3 o 4 mm), llegando a ser visibles a simple vista (*e.g.*, colonias de cianobacterias *Microcystis aeruginosa* y de clorofitas *Volvox aureus*).

Las características físicas (ópticas, térmicas, hidrodinámicas) y químicas del agua (disponibilidad de nutrientes, concentración de iones) son los factores más relevantes para esta comunidad (Wetzel 1983a; Margalef 1983; Reynolds 2006). La temperatura actúa directamente sobre los organismos e indirectamente en la viscosidad del agua. Es posible establecer las condiciones ambientales de un ecosistema acuático a través del conocimiento de la composición y dinámica de su comunidad fitoplanctónica, ya que las condiciones del ambiente seleccionan a las especies y estrategias de vida que permanecen en dicho ambiente. Por lo tanto, el fitoplancton puede ser utilizado como bioindicador del estado trófico de un ecosistema acuático.

9.1. COMPOSICIÓN

El fitoplancton de aguas continentales está compuesto por grupos filogenéticamente distantes. Las cianobacterias (procariotas) son uno de los grupos que han alcanzado mayor diversidad. También se encuentran ampliamente distribuidos grupos de algas (eucariotas) como las clorofitas, diatomeas, criptofitas, crisofitas, euglenofitas y dinoflagelados. Las algas presentan dos grandes linajes evolutivos denominados línea roja y línea verde, según las señales pigmentarias y los eventos de endosimbiosis (primaria, secundaria y terciaria) que dieron origen a los cloroplastos (Falkowski *et al.* 2004). El nivel de organización biológica más exitoso es el unicelular. Por convergencia evolutiva todos los grupos filogenéticos tienen especies unicelulares. Las cianobacterias tienen representantes exitosos también en los niveles colonial y filamentoso. Excepcionalmente las clorofitas tienen representantes coloniales y filamentosos de gran tamaño, y se encuentran algunas especies coloniales de crisofitas y diatomeas (Fig. 9.1).

Algunas especies alcanzan eventualmente altas densidades, en un fenómeno denominado floración (*bloom*), generalmente promovida por ciertas condiciones ambientales (Reynolds & Walsby 1975; Reynolds 1984) asociadas a la eutrofización. En un evento de floración, el fitoplancton está dominado por una o pocas especies alcanzando altas biomásas. Comúnmente, en los ecosistemas límnicos pueden ocurrir floraciones de especies de clorofitas, diatomeas, euglenofitas, dinoflagelados o cianobacterias, siendo estas últimas las más frecuentes y perjudiciales. El crecimiento es rápido y la floración puede permanecer desde pocos días hasta meses, o incluso ser permanente (Smayda 1997). En las tablas 9.1 a 9.3 se resume la ubicación filogenética y las características generales de los principales grupos con representantes en el fitoplancton.

El estudio de la comunidad de fitoplancton implica la clasificación de los organismos. La clasificación a seleccionar va a depender de los objetivos del estudio. Por ejemplo, la clasificación en tallas de tamaño se puede utilizar para saber en qué fracción se acumula la biomasa del fitoplancton y la disponibilidad de alimento para los distintos grupos de zooplancton. La clasificación más utilizada es la taxonómica a nivel de especies o de Clases que representan grupos filogenéticos, basada en caracteres morfológicos que se observan en microscopio óptico o electrónico. Las Clases reflejan grandes diferencias evolutivas como en el tipo de pared celular, raíces flagelares, crestas mitocondriales, alvéolos corticales, reservas y pigmentos (Tablas 9.1 y 9.2). Por lo tanto, las Clases también reflejan el papel que cumplen los or-

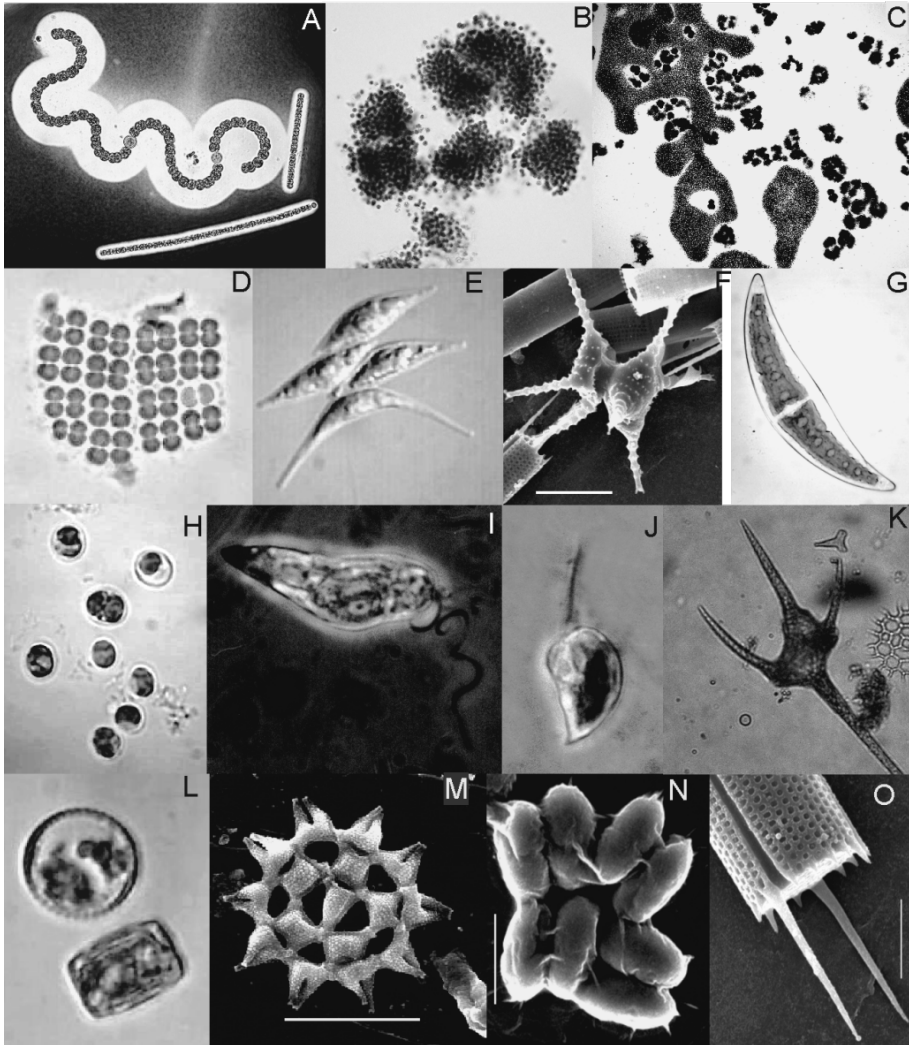


Figura 9.1. Ejemplares de fitoplancton de Uruguay. **1) Cianobacterias:** A: *Dolichospermum spiroides* (filamento curvo) y *D. viguieri* (filamento recto) de Bella Unión; se evidencia mucilago en tinta china (400×). B: *Microcystis novacekii*, Lago Jardín, Miramar, Canelones (200×). C: *M. aeruginosa* y *Microcystis* spp., Lago Ton-Ton, Miramar, Canelones (40×). D: *Merismopedia tenuissima*, lago de arenera, Canelones (400×). **2) Clorofitas:** E: *Scenedesmus* sp. (400×). F: *Staurostrum* sp. y *Aulacoseira granulata*, río Negro (escala: 20 μm). G: *Closterium moniliferum*, lago de arenera, Miramar, Canelones (400×). H: *Chlorella* sp. (1000×). **3) Euglenofitas:** I: *Eutreptiella* sp., Laguna de Rocha (1000×). **4) Criptofitas:** J: *Rhodomonas minuta*, Laguna de Rocha. **5) Dinoflagelados:** K: *Ceratium hirundinella*, Laguna Grande, Miramar, Canelones (200×). **6) Diatomeas:** L: *Cyclotella* sp., Laguna Grande (400×). **7) Clorofitas:** M: *Pediastrum mustersii*, río Negro (escala: 20 μm). N: *Tetrachlorella* cf. *alternans*, Laguna Merín (escala: 10 μm). **8) Diatomeas:** O: *Aulacoseira granulata*, río Negro (escala: 10 μm). Fotos: Amelia Fabre, Andrea Somma, María del Carmen Pérez y Sylvia Bonilla (A-L: microscopía óptica; M-O: microscopía electrónica).

ganismos en el ambiente. En este capítulo se presenta más adelante una clave para identificar los grandes grupos filogenéticos del fitoplancton de agua dulce. También es posible considerar otras formas de ordenar y clasificar a la comunidad fitoplanctónica desde un punto de vista funcional, en base a rasgos que no respondan solamente al origen evolutivo. Estas clasificaciones agrupan los organismos en base a rasgos morfológicos y/o fisiológicos, buscando identificar convergencias funcionales (estrategias de vida y grupos funcionales) (Margalef 1978; Reynolds 1991; Reynolds *et al.* 2002; Salmasso & Padisák 2007; Kruk *et al.* 2010). Al final del capítulo se brindan algunos ejemplos de la aplicación de las clasificaciones funcionales.

Tabla 9.1. Rasgos distintivos de las divisiones del fitoplancton dulceacuícola que los diferencia y agrupa en los clados filogenéticos. Chromista incluye algas con cloroplastos con 4 membranas y algún tipo de clorofila *c* (ver Tabla 9.3).

Divisiones	Clases o Grupos	Filogenia	Rasgos distintivos de los grupos filogenéticos
Euglenophyta (incluye heterótrofos)	Euglenophyceae	En: Discicristata	Crestas mitocondriales discoideas. Cloroplastos con 3 membranas.
Ochrophyta o Heterokonta	Bacillariophyceae (diatomeas) Chrysophyceae (incluye Silicoflagelida) Raphidophyceae Eustigmatophyceae Tribophyceae Otros: heterótrofos	En: Estramenopilos o Heterocontas	Carácter primitivo, Heterocontas = flagelos diferentes. Un flagelo largo con pelos tripartitos huecos (stramenopilo) y otro flagelo corto generalmente liso. Crestas mitocondriales tubulares. Cloroplastos con 4 membranas. Grupo muy diverso; incluye Phaeophyceae: macroalgas. CHROMISTA
Haptophyta	Haptophyceae (= Prymnesiophyceae)	Incierta	En algunos, haptonema. Crestas mitocondriales tubulares. CHROMISTA
Cryptophyta ≈ Cryptomonadales	Cryptophyceae	Incierta	Crestas mitocondriales aplanadas. Cloroplastos con 4 membranas. CHROMISTA
Dinophyta o Dinoflagellata (incluye heterótrofos)	Dinophyceae (Dinoflagelados)	En: Alveolatas	Grupo antiguo. Sistemas de alvéolos corticales directamente ubicados por debajo de membrana celular. Crestas mitocondriales tubulares. Cloroplastos con 3 o 4 membranas.
Chlorophyta	Chlorophyceae Prasinophyceae Trebouxiophyceae	Viridiplantae	Incluye algas y plantas terrestres. Precursor: dos flagelos apicales, iguales, lisos, simétricos. Crestas mitocondriales aplanadas.
Streptophyta	Klebsormidiophyceae Conjugatophyceae Chlorokybophyceae Mesostigmatophyceae	Viridiplantae Grupos relacionados con plantas	Cloroplasto con 2 membranas: <i>grana</i> en algunos grupos.
Glaucophyta	Glaucophyta		Primitivo. Relación con algas rojas y Viridiplantae. Crestas mitocondriales aplanadas.

Tabla 9.2. Características diacríticas de los principales grupos de fitoplancton dulceacuicola, niveles de organización biológica y principales tallas dominantes.

Clases o Grupos	Pared	Reservas	Flagelos	Niveles de organización	Tallas más comunes
Cyanobacteria	Mureína (tipo Gram -)	Gránulos polifosfato, almidón cianofíceo	no	Unicelular, colonial, filamentosos (células diferenciadas)	Pico a mesoplancton
Euglenophyceae	Película proteica	Paramilon	Dos; solo uno emergente	Unicelular	Nanoplancton hasta ~ 50 µm
Bacillariophyceae (diatomeas)	Frústulos de sílice	Crisolaminarina, lípidos	Solamente en gametos masculinos de centrales	Unicelular, colonial	Pico a microplancton
Chrysophyceae	Desnudos. En algunos, escamas o lórica	Crisolaminarina	Dos desiguales	Unicelular, colonial	Nano a microplancton
Cryptophyceae	Periplasto	Tipo almidón	Dos desiguales y subapicales	Unicelular	Nanoplancton
Dinophyceae	Tecas de celulosa o desnudos	Almidón	Dos desiguales; uno transversal	Unicelular, colonial	Nano a microplancton
Chlorophyceae Prasinophyceae Trebouxiophyceae	Celulosa	Almidón	Dos iguales o sin flagelos	Unicelular, colonial y filamentosos	Nano a mesoplancton

Los grupos del fitoplancton tienen muy pocas características en común. Se destaca la presencia de la clorofila *a* como el pigmento responsable de la fotosíntesis. Los cloroplastos, a diferencia de lo que ocurre en las plantas, difieren en número (uno a muchos) y forma (discoide, en forma de copa, estrellada, espiralada, etc.), siendo un carácter de valor taxonómico. En el resto de las características celulares, e incluso en los pigmentos fotosintéticos accesorios y protectores (Tabla 9.3), los grupos filogenéticos que forman parte del fitoplancton también son altamente diversos. En los grupos que tienen representantes flagelados, aparecen glóbulos osmiofílicos repletos de carotenoides (mancha ocular o estigma) que permiten orientar el desplazamiento de la célula con respecto a la luz, existiendo diversos tipos según los grupos filogenéticos (South & Whittick 1987). El pirenoide es un corpúsculo proteico discoide asociado al cloroplasto (dentro del cloroplasto solo en clorofitas) (van Den Hoek *et al.* 1995). La ubicación y número de pirenoides visibles en microscopio óptico tiene valor taxonómico. El desplazamiento, en la mayoría de los flagelados, es anterior, o sea en dirección del flagelo. La mayoría de los grupos tienen paredes celulares externas de diversa composición, desde típicamente bacterianas (tipo Gram negativa, cianobacterias) a paredes de celulosa como en las plantas (clorofitas). Las paredes de sílice de las diatomeas se destacan por su ornamentación de alto valor taxonómico. Algunos grupos tienen especies desnudas (sin pared celular) y otros presentan estructuras por debajo de la membrana plasmática, como películas proteicas (euglenofitas) o placas de celulosa (dinoflagelados tecados).

Tabla 9.3. Principales pigmentos del fitoplancton dulceacuícola. Cl: clorofila; b-Car: β - β -caroteno; a-Car: α - β -caroteno; HFU: 19'-Hexanoyloxyfucoxantina; BFU: 19'-Butanoyloxyfucoxantina; MgDVP: magnesio 2,4-divinilfeofirina.

Grupos	Clorofilas	Principales carotenoides y ficobilinas
Cyanobacteria	Cl <i>a</i> , (Cl <i>b</i> , Cl <i>d</i>) Divinil-clorofilas <i>a</i> y <i>b</i>	zeaxantina , echinenone, carotenoides, glicosídicos (myxoxantofila y afines), oscillaxantina, cantaxantina, b-Car, a-Car, ficobilinas
Euglenophyta	Cl <i>a</i> , (Cl <i>b</i>)	diadinoxantina , heteroxantina, neoxantina, diatoxantina, b-Car
Bacillariophyceae	Cl <i>a</i> , Cl <i>c</i> ₁ , <i>c</i> ₂ , <i>c</i> ₃ (MgDVP)	fucoxantina , diadinoxantina , diatoxantina, b-Car
Chrysophyceae	Cl <i>a</i> , Cl <i>c</i> ₁ , <i>c</i> ₂	fucoxantina , diadinoxantina , violaxantina, anteraxantina, b-Car
Cryptophyceae	Cl <i>a</i> , Cl <i>c</i> ₂ (MgDVP)	aloxantina , crocoxantina, ficobilinas, a-Car
Dinophyceae	Cl <i>a</i> , Cl <i>c</i> ₁ , <i>c</i> ₂ , <i>c</i> ₃ (MgDVP), <i>c</i> ₂ -MGDG) Grupo <i>c</i> /Chl <i>b</i>	peridinina , diadinoxantina , fucoxantina, HFU, BFU, geroxantina, zeaxantina, b-Car
Chlorophyta:	<u>Chlo</u> : Cl <i>a</i> , Cl <i>b</i>	<u>Chlo</u> : luteína , violaxantina , neoxantina, zeaxantina, anteraxantina, b-Car, a-Car
Chlorophyceae (Chlo)	<u>Pras</u> : Cl <i>a</i> , Chl <i>b</i> ,	<u>Pras</u> : prasincoxantina , violaxantina , micromonol, micromonal, uriolide, luteína, zeaxantina, b-Car, a-Car
Prasinophyceae (Pras)	MgDVP	
Grupo III		

9.1.1. CYANOBACTERIA

Las cianobacterias o algas verde-azules, antiguamente llamadas cianofíceas, son los componentes procariotas del fitoplancton. Este grupo debe su nombre popular a la presencia de pigmentos hidrosolubles (ficobilinas) que les dan un color azulado (particularmente la ficocianina). Tienen tilacoides sueltos en el estroma celular, pared celular tipo bacterias Gram negativas y no poseen flagelos. En el plancton y perifiton de los ecosistemas límnicos se encuentra la mayor diversidad de especies de cianobacterias. Existen especies de cianobacterias de diferente tamaño, abarcando el rango más amplio desde el picoplancton hasta algunas especies coloniales que se encuentran entre los mayores tamaños registrados en el fitoplancton límnic (ca. 3 mm). Los organismos filamentosos del orden Nostocales poseen células especializadas llamadas heterocitos y acinetes cuya forma, número y posición son importantes caracteres taxonómicos (Komárek *et al.* 2003). Los heterocitos son células especializadas para la fijación del nitrógeno atmosférico, mientras que los acinetes son células de resistencia, generalmente de mayor tamaño que las vegetativas, que se forman cuando las condiciones ambientales no son favorables.

Debido a la presencia de vacuolas de gas (ausentes en eucariotas), las células varían su posición en la columna de agua formando densas manchas en superficie. Se sabe que un gran número de especies planctónicas de cianobacterias producen toxinas (cianotoxinas), sustancias altamente nocivas para los animales y el ser humano. Las cianotoxinas son de dos tipos: péptidos cíclicos (microcistinas y nodularinas) y alcaloides (anatoxinas, saxitoxinas, cylindrospermopsina) (van Apeldoorn *et al.* 2007). Las floraciones de cianobacterias tóxicas constituyen uno de los problemas más frecuentes en los ecosistemas límnicos que impiden o restringen el uso del agua (Sukenik *et al.* 2012; Vidal & Britos 2012; Paerl & Otten 2013).

9.1.2. CHLOROPHYCEAE

Las Chlorophyceae, clorofitas o algas verdes, constituyen un grupo de algas muy diverso, con mayor número de especies en los ecosistemas límnicos que en los marinos. Es además el grupo de algas con mayor número de especies del fitoplancton límnico. Las clorofitas generalmente presentan un color “verde pasto” típico. Pertenecen a la línea evolutiva “verde” del fitoplancton (Falkowski *et al.* 2004). Poseen pared celular de celulosa, almidón como reserva, cloroplastos con dos membranas, y cuando tienen flagelos éstos son simples (lisos) y múltiplos de dos. Presentan niveles de organización unicelular, colonial y filamentoso, si bien este último solamente en pocos casos (algunas especies del Orden Ulothricales). Al igual que las cianobacterias, tienen representantes en todo el rango de tamaños del fitoplancton, desde el picoplancton a grandes colonias visibles a simple vista (*e.g.*, *Volvox* sp., ca 3 mm). Existen dos grandes grupos de clorofitas planctónicas, aquellas inmóviles (Chlorococcales y Zygnematales, en particular Desmidiaceae) y las que poseen flagelos (Volvocales). La mayor diversidad de formas y número de cloroplastos se encuentra en este grupo (van Den Hoek *et al.* 1995). Al igual que las plantas, y a diferencia de los otros grupos de algas, las clorofitas sintetizan y almacenan almidón en el estroma del cloroplasto (Graham *et al.* 2009). Aunque no pueden flotar como las cianobacterias, algunas especies acumulan grandes cantidades de aceite, lo que reduce su densidad hasta que la sedimentación es cercana a cero, siendo el caso más notable el de la clorofita colonial *Botryococcus braunii* (Canter-Lund & Lund 1995). Tienen una amplia distribución tanto en ambientes oligotróficos como eutróficos, de alta o baja irradiancia, en períodos de estratificación o mezcla (Haphey-Wood 1991; Reynolds 2006).

9.1.3. BACILLARIOPHYCEAE

También conocidas como diatomeas, constituyen una Clase muy frecuente y diversa en el plancton de agua dulce, en particular pueden dominar el fitoplancton de lagos someros turbios y ecosistemas lóticos (Reynolds 2006). Las diatomeas son un grupo importante en períodos de mezcla en sistemas lénticos profundos, ya que toleran muy bien la baja disponibilidad lumínica y la turbulencia. Se presentan en ambientes desde oligotróficos a eutróficos donde pueden formar floraciones. Sin embargo, el grupo está mejor representado en los océanos.

Se caracterizan por presentar una pared celular de sílice (frústulo), con ornamentaciones muy particulares que son fuertes caracteres taxonómicos. El frústulo consta de dos tecas, una superior o epiteca y una inferior o hipoteca unidas por elementos del cíngulo (bandas de sílice) (van Den Hoek *et al.* 1995). Las diatomeas se caracterizan por poseer un gran número de especies que se identifican según la ornamentación de la pared celular y algunos caracteres ecológicos. Para la identificación de muchas especies es necesaria la microscopía electrónica de las estructuras valvares (Round *et al.* 1992). Las células vegetativas carecen de flagelo, y solo presentan flagelo los gametos masculinos de las diatomeas céntricas (South & Whittick 1987). El nivel de organización más importante del grupo es unicelular, aunque hay especies coloniales típicas del plancton límnico (*e.g.*, *Aulacoseira granulata*). Tienen cloroplastos con cuatro membranas y grandes vacuolas intracelulares con agua y sales disueltas. Pertenecen a la línea evolutiva “roja” del fitoplancton (Falkowski *et al.* 2004). Las diatomeas son excelentes bioindicadores de condiciones ambientales, por lo que se utilizan índices biológicos basados en agrupaciones de especies de diatomeas, aunque particularmente en el perifiton (Stoermer & Smol 1999).

Existen dos grandes morfotipos de diatomeas, las centrales y las pennadas, con simetría radial y bilateral, respectivamente. Las centrales son típicamente planctó-

nicas (e.g., *A. granulata*, *Cyclotella meneghiniana*) y las pennadas generalmente bentónicas, aunque se encuentran con frecuencia en el plancton (e.g., *Synedra*, *Fragilaria*) (Round *et al.* 1992). Estos dos morfotipos se ubican de distinta forma en dos grandes líneas evolutivas de las diatomeas, Coscinodiscophytina (diatomeas céntricas, excepto Thalassiosirales) y Bacillariophytina (algunas diatomeas céntricas, Thalassiosirales y pennadas) (Sims *et al.* 2006). Las diatomeas pennadas pueden tener una fisura (central o lateral) en la cara valvar del frústulo que se denomina rafe. El rafe puede estar presente en ambas valvas, en una o en ninguna, y ubicarse en el centro o hacia un lado, y puede estar localizado en un canal silíceo (el canal rafidiano), típico por ejemplo en *Nitzschia* spp. y *Surirella* spp. (Round *et al.* 1992). En la identificación taxonómica convencional de las diatomeas, la posición y forma del rafe, la forma de la valva y de sus extremos, el cíngulo, así como el tipo de ornamentación valvar y el número de estrias cada 10 μm , son de alto valor (Round *et al.* 1992).

9.1.4. CHRYSOPHYCEAE

Esta Clase es principalmente de agua dulce. Son organismos unicelulares o coloniales, con número variable de flagelos. Algunos géneros presentan escamas silíceas como cubierta y otros, lóricas, que pueden ser rojizas por el depósito de manganeso o hierro (van Den Hoek *et al.* 1995). Forman quistes de resistencia frente a condiciones ambientales adversas, denominados estomatocistos o estatosporas, con valor taxonómico. En general son frecuentes en ecosistemas pobres en nutrientes y transparentes, y aguas blandas. Muchas especies tienen sus mayores tasas de crecimiento a temperaturas bajas y pH ligeramente ácidos. *Dynobryon* es un género colonial que puede florecer en verano y producir olor desagradable en el agua. Muchas crisofitas (e.g., *Ochromonas* y *Chromulina*) tienen la capacidad de realizar mixotrofia (fagotrofia) depredando sobre bacterias (Klaveness 1991; Nicholls & Wujek 2003). Floraciones de la especie colonial *Synura petersenii* pueden dar sabor y olor desagradables al agua (Nicholls & Wujek 2003).

9.1.5. CRYPTOPHYCEAE

Son organismos flagelados unicelulares. Pertenecen a la línea evolutiva “roja” del fitoplancton (Falkowski *et al.* 2004). Las células son aplanadas dorso-ventralmente y poseen una citofaringe o fosa vestibular donde se insertan dos flagelos desiguales, o raramente uno, lo que les da una importante movilidad. La mancha ocular con carotenoides ejerce sombra sobre el fotorreceptor permitiendo su orientación con respecto a la luz (Graham *et al.* 2009). Poseen una vacuola contráctil con función de osmorregulación. Muchas veces la identificación taxonómica a nivel de especie es difícil mediante microscopía óptica y se debe asistir con microscopía electrónica de barrido.

Son importantes componentes del fitoplancton dulceacuicícola y marino. Pueden formar densas poblaciones en ecosistemas lénticos y lóticos, generalmente de climas templados fríos, aunque esto puede estar influido por las dificultades de identificación del grupo (Klaveness 1991; Kugrens & Clay 2003). Se reportan altas biomásas en ecosistemas oligotróficos a meso-eutróficos, siendo desplazadas por otros grupos en condiciones de eutrofia avanzada. Son tolerantes a bajas intensidades lumínicas y algunas especies pueden sobrevivir semanas en oscuridad total, y se ha sugerido que prefieren pH >7 (Kugrens & Clay 2003). En general, el número y abundancia de especies de criptofitas es subestimado en estudios de rutina, por limitaciones en la identificación y la fragilidad de las células que se rompen con fijadores convencionales.

En las criptofitas se encuentran especies autótrofas, mixótrofas y heterótrofas (osmotróficas o fagotróficas). Los géneros con especies mixotróficas (*Cryptomonas*, *Chroomonas*) se alimentan de bacterias, siendo importantes depredadores de éstas. Pueden utilizar amonio y también algunas formas de nitrógeno orgánico; necesitan vitamina B12 y tiamina. Las criptofitas son alimento de excelente calidad para el zooplancton ya que poseen altas cantidades de ácidos grasos necesarios para el crecimiento y desarrollo de los animales (Klaveness 1991; Reynolds 2006). Además, la forma (redondeada, sin protuberancias) y el tamaño (principalmente nanoplanc-tónicas) las hace altamente palatables para el zooplancton. Es posible remarcar que los cloroplastos de las criptofitas pueden ser “robados” por otros organismos (*e.g.*, ciliados, dinoflagelados) y permanecen activos realizando fotosíntesis en el hospede-dante por varios días, proceso conocido como kleptoplastidiosis (Graham *et al.* 2009).

9.1.6. DINOPHYCEAE

Los dinoflagelados, más diversos y abundantes en el océano, son un grupo de organismos principalmente unicelulares que en algunos casos pueden agruparse en colonias filamentosas. Pertenecen a la línea evolutiva “roja” del fitoplancton (Falkowski *et al.* 2004). Abarcan un amplio rango de tamaños celulares, desde nano-planc-tónicos (*Peridinium* sp., 10 μm) hasta mesoplanctónicos (*Ceratium hirundi-nella*, 400 μm). Las células tienen dos flagelos dispuestos transversalmente en un surco longitudinal (*sulcus*) y otro transversal (*annulus*), que les permiten una im-portante movilidad (van Den Hoek *et al.* 1995; Reynolds 2006). La mayoría de las especies tiene por debajo de la membrana celular placas de celulosa en número y disposición específicos en las vesículas alveolares, algunas de las cuales presentan espinas o prolongaciones. Otro grupo minoritario de especies son desnudas, care-cen de estas placas de celulosa (Graham *et al.* 2009). Dentro de los principales ca-racteres taxonómicos para identificar géneros y especies, se destaca la disposición, número y forma de las placas de celulosa.

Se distribuyen en una amplia variedad de ambientes, pero es frecuente que desarrollen floraciones en ambientes eutróficos (Pollinger 1991; Carty 2003). Pueden desplazarse entre la capa superficial iluminada de la columna de agua y la pro-funda, oscura y rica en nutrientes. Pueden dominar la biomasa del fitoplancton dulceacuícola al final del período de estratificación estival, tiñendo el agua de color rojizo o amarronado. Si bien las especies marinas pueden ser altamente tóxicas, no se conocen especies dulceacuícolas tóxicas. Existen dinoflagelados de diferentes ni-veles tróficos: autótrofos, auxótrofos (dependen de vitaminas), mixótrofos y organó-trofos. El comportamiento alimenticio puede ser complejo, detectan químicamente a la presa y extienden un tubo de alimentación (pedúnculo) para atraparla. Algunos dinoflagelados son ectoparásitos de peces. Los de gran tamaño tienen pocos preda-dores directos y mayormente pasan a los siguientes niveles tróficos a través de la cadena detritívora (Graham *et al.* 2009).

9.1.7. EUGLENOPHYCEAE

Este grupo, principalmente de agua dulce, se compone de organismos unicelula-res flagelados. Pertenecen a la línea evolutiva “verde” del fitoplancton (Falkowski *et al.* 2004). Los flagelos son dos desiguales y usualmente solo uno emerge en direc-ción anterior. Por debajo de la membrana celular presentan una película proteica en placas imbricadas (South & Whittick 1987; Graham *et al.* 2009). Esta película es flexible en el género típico del grupo (*Euglena*), por lo que los organismos son elásti-cos (llamados “metabólicos”) y se mueven arrollándose y estirándose a medida que

se desplazan. Otros géneros no son flexibles y se denominan “rígidos” (*e.g.*, *Phacus*). También hay géneros tecados (*Trachelomonas* y *Strombomonas*) que presentan lóricas o tecas externas más o menos ornamentadas, de alto valor taxonómico (Rosowski 2003). En general, los fijadores hacen que las euglenofitas metabólicas se arrollen y luego sea muy difícil la identificación taxonómica. Por lo tanto, es particularmente relevante para la identificación de este grupo observar material fresco.

Solamente un tercio de las especies conocidas en el grupo es autótrofa (Graham *et al.* 2009), existiendo también especies fagotróficas. Dependen de la presencia de vitaminas y materia orgánica disuelta, por lo que crecen bien en ambientes contaminados. La mixotrofia, aun de los organismos pigmentados, es favorecida por la disponibilidad de materia orgánica, condición en la que pueden desarrollar floraciones que colorean el agua (*e.g.*, *Euglena sanguinea*). Recientemente se ha descubierto una toxina de tipo alcaloide con ictiotoxicidad, actividad anticancerígena y herbicida producida por *E. sanguinea* (Zimba *et al.* 2010).

9.2. MUESTREO

El muestreo se debe diseñar según los objetivos del trabajo. Se debe considerar también la morfología del cuerpo de agua, su hidrodinámica y la distribución del fitoplancton. Ésta puede variar en profundidad si el ecosistema está estratificado (Venrick 1978; Izaguirre 1995; Rodríguez-Ramos *et al.* 2014) o entre las zonas pelágica y litoral.

9.2.1. CUALITATIVO

El muestreo puede ser integrado en la columna de agua, para lo cual se realizan arrastres verticales u oblicuos, o estratificados si se quiere conocer la composición en ciertas profundidades con redes de plancton (ver a continuación). Un muestreo horizontal considera solo el estrato superior eufótico 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 -20 a $25 \mu\text{m}$ -, cuya boca se mantiene abierta con un aro generalmente metálico del que salen 3 o 4 cuerdas que se unen al cabo con el que se arrastra la red (Fig. 9.2). En el vértice del cono se coloca un recipiente (copo) donde se deposita el material concentrado durante el arrastre. El copo debe estar provisto de una ventana con un trozo de malla de tamaño de poro menor que la red. La colecta se realiza arrastrando la red a muy baja velocidad bajo la capa superficial 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, por lo que la muestra cualitativa solo será útil para organismos de mayor tamaño.

BOTELLAS MUESTREADORAS (ver 3.2.4). Permiten capturar organismos de todos los tamaños, pero requieren varias muestras para lograr una cantidad suficiente de material. En el laboratorio este material se puede fijar y dejar sedimentar a razón de 24 h cada 10 cm de altura del recipiente. Se retira el sobrenadante con un tubo de vidrio en U y se concentra el material sedimentado en un volumen menor. De este modo puede estimarse la cantidad de organismos por volumen de muestra y se

puede realizar la observación cualitativa de organismos menores a 20 μm . Si se realiza el procedimiento con cuidado, puede utilizarse la muestra también para análisis cuantitativo.

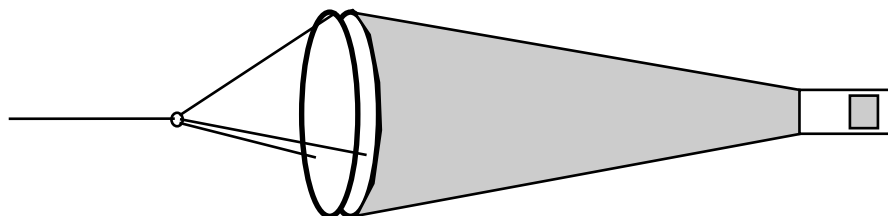


Figura 9.2. Red de fitoplancton. Se muestra el copo con la ventana de malla de la red.

BOMBAS DE ASPIRACIÓN. Deben ser bombas peristálticas o centrífugas para evitar que los organismos se dañen. Se obtiene muestra a la profundidad deseada por medio de un tubo que extrae un volumen de agua conocido y se hace pasar por un copo de malla de poro pequeño (10 a 20 μm). Permiten concentrar una gran cantidad de material rápidamente y con poco esfuerzo.

Los frascos donde guardar las muestras se deben enjuagar dos veces con agua del lugar antes de llenarlos. Se deben llenar solamente hasta tres cuartos de su capacidad, dejando una cámara de aire para la respiración de los organismos. Se recomienda usar frascos plásticos de tapa de rosca y boca ancha, ya que son de fácil llenado y tienen una buena superficie de intercambio gaseoso.

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. Es importante lavar muy bien las redes una vez llegados al laboratorio. En ambientes con alta biomasa de fitoplancton, es recomendable sumergir la red en agua con hipoclorito diluido por una hora y luego enjuagar abundantemente con agua corriente y secar bien. Se pueden usar jabones líquidos neutros para eliminar el material que haya quedado adherido.

9.2.2. CUANTITATIVO

El muestreo cuantitativo tiene el objetivo de estimar la abundancia o la biomasa de la comunidad fitoplanctónica. Existen dos tipos de muestras: aquellas para cuantificación en microscopio y aquellas para determinación de la clorofila *a* u otros pigmentos. También existen actualmente equipos que permiten realizar perfiles *in situ* de la señal de fluorescencia de la clorofila *a* y otros pigmentos, lo que brinda datos semicuantitativos si el equipo está debidamente calibrado. El análisis cuantitativo debe ir precedido de un intenso análisis cualitativo, a fin de reconocer los organismos a contar. Debe realizarse con aparatos de muestreo que permitan conocer con precisión el volumen de muestra filtrado. Se recomienda tomar al menos tres réplicas con botella muestreadora.

Las muestras para la determinación de la clorofila *a* se toman a la profundidad deseada, o integrando la columna de agua con botella, evitando su exposición a la luz en todo momento, 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.

9.2.3. PRESERVACIÓN DE MUESTRAS

La fijación y conservación del material cualitativo debe preservar estructuras de importancia taxonómica muy delicadas mediante:

FRÍO Y OSCURIDAD. Se recomienda observar el material cualitativo sin ningún aditivo químico que pueda alterar su morfología y actividad. La conservación de muestras en 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, preferentemente antes de las 72 h.

LUGOL. Es el fijador más utilizado en estudios de rutina. Se disuelven 10 g de yodo puro (I) y 20 g de yoduro de potasio (KI) en 200 ml de AD y 20 ml de ácido acético glacial (C₂H₄O₂). Se guarda en un frasco de vidrio color ámbar y en oscuridad. La concentración final en la muestra no debe ser mayor a 1%, lo que se logra con aproximadamente 4 a 5 gotas por cada 100 ml de muestra, la 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. Para las muestras cuantitativas, el lugol es el fijador más difundido y práctico. Los organismos que lo absorben se vuelven más pesados y visibles, acelerando su sedimentación en la cámara de conteo y facilitando su diferenciación de otras partículas de la muestra. Hay que tener en consideración que el lugol también puede reducir el tamaño celular, lo que interfiere con el cálculo del biovolumen (Hawkins *et al.* 2005). En muestras que se desean conservar por largo tiempo, es recomendable mantenerlas con lugol y en heladera.

FORMALINA O FORMOL. El formol es altamente cancerígeno, por lo que no se recomienda su uso en estudios de rutina. Si fuera necesario utilizarlo por alguna particularidad, se recomienda preparar soluciones neutralizadas en campana de gases, utilizando guantes. Guardar las soluciones en frascos goteros pequeños y las botellas comerciales en depósitos especiales para sustancias peligrosas.

El formol comercial o formalina, es una solución de formaldehído al 40%. La concentración final en la muestra debe ser de entre 2 y 4% de formalina neutralizada con carbonato de calcio o acetato de sodio hasta pH 6.8-7.0, aunque cuanto más densa la muestra, mayor debe ser la concentración. La fijación con formalina destruye los flagelos pero preserva en buen estado los plastos, conservando el color por largo tiempo.

GLUTARALDEHÍDO. El glutaraldehído es altamente tóxico y cancerígeno, por lo que se debe utilizar en campana de gases y descartar el material contaminado en recipientes especiales. Es un fijador utilizado para preservar organismos con estructuras delicadas, y que preserva por algunas semanas la fluorescencia natural de los pigmentos. Por lo tanto se puede usar para la identificación y conteo de las fracciones de menor tamaño del fitoplancton (picoplancton) o para material a observar en microscopio electrónico o de epifluorescencia, o para realizar conteos en citometría de flujo.

El análisis debe ser hecho lo antes posible ya que la fluorescencia de los pigmentos decae en semanas. Se recomienda una concentración final de 1%. Si bien preserva las estructuras delicadas, solo es eficiente para muestras de pequeño volumen y durante corto tiempo.

9.3. DETERMINACIÓN TAXONÓMICA

La taxonomía clásica se basa en la identificación de caracteres morfológicos, cualitativos (*e.g.*, presencia de determinado pigmento o células especializadas) y cuantitativos (tamaño celular, número de flagelos, etc.), que usualmente se visualizan en microscopio óptico (Wehr & Sheath 2003). El nivel taxonómico que se puede alcanzar en la determinación depende de la calidad del material colectado, la disponibilidad de claves adecuadas, el equipamiento del laboratorio y la experiencia del investigador.

En las últimas décadas, la biología molecular ha sido una herramienta poderosa para clarificar la posición filogenética de diversos grupos y se ha comenzado a utilizar para la identificación a distintos niveles, incluyendo especies y ecotipos dentro de especies (Graham *et al.* 2009; Piccini *et al.* 2011). Las clasificaciones taxonómicas más modernas son de tipo polifásico, es decir que utilizan diversos tipos de caracteres simultáneamente (morfológicos, de hábitat, fisiológicos, genéticos) para catalogar los organismos (*e.g.*, Komárek & Mares 2012).

Clave dicotómica para la identificación de los principales grupos de algas y cianobacterias límnicas (basado en van Den Hoek *et al.* 1995; modificado de Vidal & Pérez 2009)

- 1 a. Procariotas: ausencia de cloroplastos, flagelos y núcleo. Contenido homogéneamente coloreado u oscuro por la presencia de aerotopos..... CIANOBACTERIAS
- b. Eucariotas: presencia de uno o varios cloroplastos y núcleo. Algunos organismos pueden presentar flagelos 2
- 2 a. Cloroplastos verdes; sustancia de reserva almidón (reacción positiva con lugol) o paramilon 3
- b. Cloroplastos verde-amarillos o de otro color; sustancia de reserva, aceites..... 4
- 3 a. Organismos unicelulares, coloniales o filamentosos (simples o ramificados); sustancia de reserva almidón. En la fase vegetativa sin flagelos o con dos flagelos iguales apicales CHLOROPHYCEAE
- b. Organismos unicelulares, generalmente con numerosos cloroplastos discoides; sustancia de reserva paramilon. En la fase vegetativa siempre con un flagelo apical visibleEUGLENOPHYCEAE
- 4 a. Cloroplastos verde-amarillos o dorados. Organismos unicelulares o coloniales, desnudos o con pared celular con escamas o valvas silíceas 5
- b. Cloroplastos dorados o marrones. Organismos generalmente unicelulares o formando cadenas, con dos flagelos desiguales..... 6
- 5 a. Organismos con dos flagelos apicales y desiguales en la fase vegetativa, algunos con cubierta celular de escamas silíceas. Cloroplasto dorado CHRYSTOPHYCEAE
- b. Organismos sin flagelos en la fase vegetativa; pared celular de sílice formada de dos partes (tecas) BACILLARIOPHYCEAE
- 6 a. Organismos unicelulares, ligeramente aplanados dorso-ventralmente, con dos flagelos desiguales en posición sub-apical CRYPTOPHYCEAE
- b. Organismos unicelulares o en cadenas, con dos flagelos desiguales y de diferente orientación (uno transversal y otro longitudinal). Célula con dos surcos (transversal y longitudinal) donde se ubican los flagelos. Pared celular con cubierta de placas de celulosa (tecados) o sin ella (desnudos) DINOPHYCEAE

9.3.1. PREPARACIÓN

Es recomendable realizar una primera observación de material fresco para determinar el tratamiento posterior. 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 altera la morfología de los organismos debido a su menor presión osmótica. Si por el contrario la muestra es muy pobre, conviene concentrarla centrifugando a baja velocidad (1200-1500 rpm), filtrando a baja presión o sacando el sobrenadante del material sedimentado en el fondo de un cilindro mediante un tubo de vidrio con extremo en U (Thronsen 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 diferentes.

Procedimiento

- 1) Homogeneizar suavemente la muestra.
- 2) Tomar una submuestra con una pipeta Pasteur diferente para cada muestra.
- 3) Colocar una gota de la submuestra en un portaobjetos seco y limpio.
- 4) Tomar un cubreobjetos, apoyarlo en el borde de la gota y bajarlo evitando que quede aire entre el portaobjetos 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.

9.3.2. MONTAJE

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, duración, composición de la muestra y el tiempo por el que se la desee mantener. El agua destilada puede utilizarse como un medio semipermanente. El Hyrax[®], Naphrax[®] y Pleurax[®] son resinas sintéticas de alta calidad y fácil manejo que se usan en preparados de diatomeas. 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 1995b; Ferrario *et al.* 1995).

Procedimiento

- 1) Lavar porta y cubreobjetos con alcohol y secarlos tomándolos por los bordes.
- 2) Colocar el cubreobjetos en una tela de amianto sobre un mechero encendido durante unos minutos.
- 3) Colocar 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 a 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 puedan formarse presionando suavemente desde un vértice del cubreobjetos hacia el opuesto (utilizar una varilla de madera o lápiz).
- 7) Retirar del calor y esperar a 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.

9.3.3. IDENTIFICACIÓN

La identificación convencional bajo microscopio se basa en determinar caracteres morfológicos y bioquímicos diacríticos, que permitan clasificar al organismo observado a diferentes niveles (desde Clase a especie). La observación de estos caracteres muchas veces no es posible en la fracción más pequeña del fitoplancton, por lo que es necesario complementar el análisis con otras metodologías (pigmentos, citometría de flujo, epifluorescencia). La identificación taxonómica de las diatomeas a nivel de géneros y especies se basa en las ornamentaciones de las paredes celulares, que muchas veces son visibles solamente en microscopía electrónica. En particular, la microscopía electrónica de barrido es una herramienta muy utilizada en la identificación de diatomeas (Round *et al.* 1992; Boltovskoy 1995b). La microscopía electrónica de transmisión se puede utilizar para determinar ultraestructura de los organismos (Cáceres 1995).

Es recomendable observar siempre una muestra de fitoplancton fresca bajo microscopio óptico, considerando en primer lugar el nivel de organización biológico de los organismos y los caracteres diacríticos que se señalan en la clave dicotómica: protoplasma, coloración, presencia, número y ubicación de flagelos, pared celular, etc. También la presencia de vaina mucilaginosas es un carácter de valor taxonómico. Muchas veces es difícil ver los flagelos directamente o los organismos los pierden por estrés, pero el estigma puede ayudar a advertir que se trata de un flagelado. La forma del movimiento también es útil. Los dinoflagelados se desplazan hacia adelante girando sobre sí mismos (por el flagelo transversal). En las euglenofitas es crítica la observación de material fresco ya que el movimiento y la flexibilidad o rigidez tienen valor taxonómico, además de que pierden su forma natural luego de la fijación.

Para la identificación taxonómica se recomienda el uso de claves de diversos autores que permiten llegar a géneros o especies, según los grupos. Entre las claves y fichas taxonómicas de material de Uruguay figuran Santibañez (1939), Vaz-Ferreira (1943), Coll (1979), Bonilla *et al.* (1995), Conforti & Pérez (2000), Comas & Pérez (2002), Pérez (2005), Vidal & Pérez (2009) y Vidal *et al.* (2009).

Los organismos del picofitoplancton (menores a 2 μm) son muy difíciles de identificar incluso a nivel de grandes grupos y en general los caracteres morfológicos convencionales no brindan información suficiente, por lo que es necesario la utilización de otras herramientas como el análisis fino de pigmentos por HPLC o el uso de citometría de flujo con *sorting* asociado (Li & Dickie 2001; Crosbie *et al.* 2003). La citometría de flujo permite identificar grupos taxonómicos y clasificar a los organismos según la autofluorescencia de los pigmentos: clorofila *a* (todos los grupos), ficoeritrina (criptofitas y escasamente en cianobacterias de agua dulce) y ficocianina (cianobacterias), así como por el tamaño y la forma de las partículas (Gasol & del Giorgio 2000). Por último, diversas técnicas de biología molecular se han tornado en una herramienta poderosa para contribuir a la identificación taxonómica de organismos de fitoplancton de pequeño tamaño o para diferenciar cepas de una misma especie (Parker *et al.* 1998; Piccini *et al.* 2011).

TINCIONES

Las tinciones son útiles para distinguir ciertas estructuras celulares, en particular del nano y microplankton. 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 borde del cubreobjeto del lado opuesto de donde se 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 negro (o marrón muy oscuro) con lugol, lo que permite confirmar clorofitas.
- 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 las 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 (ver Cap. 15).

En el caso de los dinoflagelados, luego de la observación de la célula completa se debe 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 1995a).

MEDIDAS E IMÁGENES

Las medidas de las dimensiones celulares permiten la identificación de géneros y especies, estrategias de vida y grupos funcionales y son necesarias para el cálculo de biovolumen. Las medidas se pueden realizar directamente con reglilla calibrada en el ocular o con programas de análisis de imágenes asociados a cámara fotográficas digitales para microscopio. Las mediciones en microscopio se realizan con un ocular provisto de una reglilla o micrómetro, que debe calibrarse para cada aumento del microscopio. Se recomienda corroborar cada medición al menos tres veces. Las medidas más usadas son:

- a) Largo y ancho celular.
- b) Largo del organismo o número de células por unidad de distancia.
- c) Diámetro celular y/o colonial.
- d) Número y disposición de las células en colonias.
- e) Ancho de las vainas mucilaginosas.
- f) Número de ornamentaciones por unidad de distancia.
- g) Largo y ancho de las hemicélulas (en diatomeas, dinoflagelados y desmidiaceas).

Las imágenes de los ejemplares es otra importante herramienta para la identificación, ya que permiten comparar formas, prolongaciones, espinas, organización de colonias, color, etc., para lo cual se utilizan fotografías digitales tomadas en microscopio óptico o electrónico.

9.4. ANÁLISIS CUANTITATIVO

La cuantificación de los organismos que componen el fitoplancton permite determinar la densidad de los mismos, a partir de la cual se puede también calcular el biovolumen como el mejor estimador de la biomasa. La concentración del pigmento universal de los organismos autótrofos con liberación de oxígeno, la clorofila *a*, se utiliza como un indicador indirecto de la biomasa y del estado trófico del ecosiste-

ma. La clorofila *a* representa entre 0.7 y 1.6% de peso seco libre de cenizas del organismo, y tiene una relación general de 0.013-0.031 pg Cl*a*/pg C celular (Reynolds 2006). La cuantificación de los organismos del nano al mesoplankton se puede realizar en cámaras de conteo y microscopio óptico directo o invertido, con campo claro o con epifluorescencia asociada. Los organismos del picofitoplankton usualmente no se ven en microscopio óptico con campo claro, por lo que se deben cuantificar con microscopios que cuenten con epifluorescencia o por medio de la citometría de flujo. La epifluorescencia se basa en la propiedad natural de la clorofila *a* y otros pigmentos, de emitir luz al ser excitadas a una longitud de onda de menor energía (*e.g.*, luz ultravioleta).

9.4.1. ABUNDANCIA

Los conteos se realizan en cámaras de conteo con submuestras de las que se toma una alícuota, que a su vez se contará en parte: cierto número de campos o bandas; muy raramente se contará toda la cámara. Por lo tanto, es muy importante mezclar suavemente la muestra para que el material quede homogéneamente distribuido en la cámara. Dentro de las fuentes de error, Rott (1981) destaca la homogeneización incompleta de la muestra, el mal llenado de la cámara y el uso de cámaras de diferentes volúmenes (Fig. 9.3).

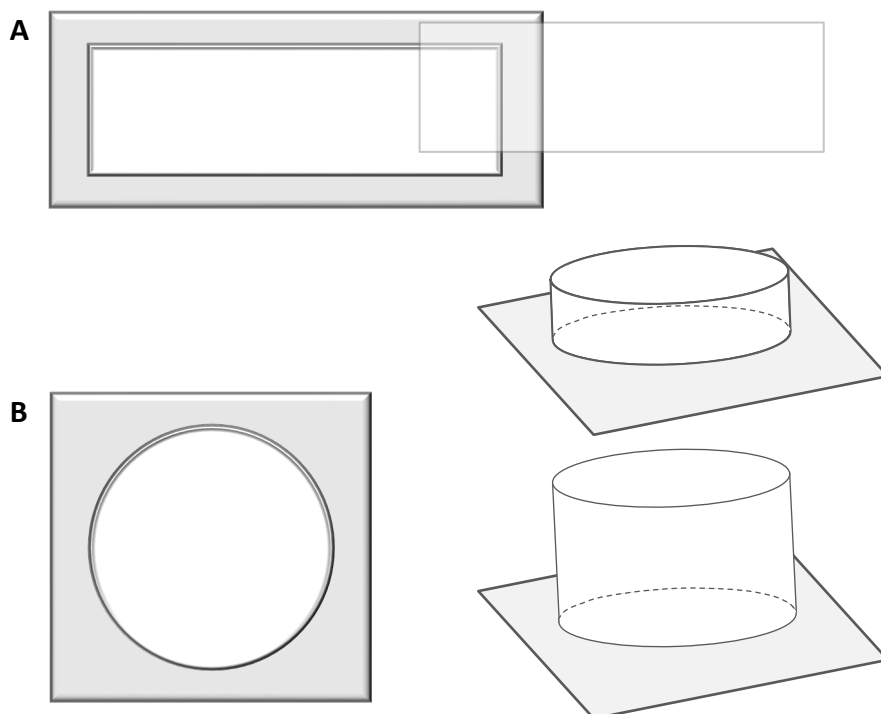


Figura 9.3. Cámaras de conteo para fitoplancton: A) tipo Sedwick-Rafter cubierta con un cubreobjetos que se desliza al llenar la cámara; B) cámaras de sedimentación para uso en microscopio invertido; se ilustra la base de la cámara (izq.) y dos opciones de torres desmontables con diferente volumen (der.).

Antes de iniciar los recuentos, debe definirse si la unidad de conteo es la célula o el individuo en su nivel de organización (célula, colonia o filamento), a fin de mantener un criterio uniforme. Esto depende del objetivo del estudio. En los monitoreos de cianobacterias es necesario contar el número de células, ya que la célula es la unidad funcional potencialmente productora de toxinas, y los niveles guía internacionales para la gestión de estos organismos se basan en número de células (Chorus & Bartram 1999). El conteo permite calcular la densidad o abundancia por unidad de volumen del cuerpo de agua (individuos o células/ml). Para estudios de la comunidad se calcula generalmente el biovolumen, para lo cual se cuentan los individuos en su nivel de organización (células, colonias o filamentos) calculando la densidad que luego se multiplica por el volumen específico (en μm^3). En el caso de las colonias con un alto número de células (como ocurre en cianobacterias) es posible realizar una aproximación al número de células por área de la colonia, o disgregar la colonia para contar células (Smayda 1978; Venrick 1978, 1995; Booth 1993).

También se debe definir el nivel taxonómico del recuento (especie, género, etc.). El paso previo al conteo es siempre el análisis cualitativo del material a analizar. El conteo por especie aporta más información y es necesario para calcular la riqueza específica o los índices de diversidad, pero requiere mucha experiencia y un conocimiento previo del material. No se deben incluir en el conteo las células rotas o vacías (e.g., valvas de diatomeas vacías). También pueden emplearse criterios no taxonómicos como formas, rangos de tamaño o nivel de organización como unidad de conteo y clasificación, si se aplican clasificaciones funcionales (Reynolds 1991; Kruk *et al.* 2010). Si se desea un análisis de la riqueza de especies (e.g., Kruk *et al.* 2009), es necesario realizar una curva de rarefacción entre el número de unidades de conteo (campos) y el número de nuevas taxa encontrados en cada campo, hasta obtener al menos 3 campos en donde no se encuentren taxa nuevos.

Antes del llenado de la cámara de conteo, la muestra debe estar a temperatura ambiente. La elección del método de conteo depende de la concentración del material y de la disponibilidad de medios. Para ambientes hipereutróficos o cultivos de laboratorio se recomienda usar cámaras de 1 ml; para ecosistemas meso a eutróficos cámaras de 5 a 10 ml, y para oligotróficos cámaras de 25 a 100 ml. Si la concentración de organismos es muy alta (cultivos o floraciones) por arriba de 3 millones de células/ml, se pueden usar cámaras de conteo de glóbulos rojos (hematocitómetros), de 10 μl de capacidad.

El aumento a utilizar en el conteo también depende del tamaño del organismo a contar. Cuando se trata de fitoplancton de gran tamaño (e.g., *Ceratium hirundinella*, largo máximo ca 400 μm), se utilizan objetivos de bajo aumento (e.g., 20 \times). Si el fitoplancton a contar es principalmente nanoplanctónico, se utiliza el objetivo de 40 \times y para organismos de menor tamaño (e.g., *Synechococcus*, largo ca. 1.5 μm) es necesario usar 100 \times . En una misma cámara es posible realizar varios conteos si fuera necesario: uno a bajo aumento para organismos de gran tamaño y otro a mayor aumento para organismos de menor tamaño. Cuando la densidad es muy baja, es posible que sea necesario contar toda la cámara.

MICROSCOPIO INVERTIDO. MÉTODO DE 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 cilíndricas de diferentes alturas, según la densidad de la muestra. Se recomienda llenar las cámaras lentamente para evitar la formación de burbujas y dejar reposar de 1 a 4 h por cada centímetro de altura de la cámara (48 h para cámaras de 50 ml) (Rott 1981; Rott *et al.* 2007). Sin embargo, para organismos muy delicados o con vacuolas de gas (cianobacterias) puede no ser suficiente este tiempo. Las colonias de estas últimas se pueden disgregar mediante calentamiento

suave a baño María (Humphries & Widjaja 1979; Box 1981). El material se concentra en el fondo, por lo que su observación solo es posible con un microscopio óptico invertido, o de Utermöhl. La abundancia de organismos o de células (N) en org. o cél. ml⁻¹ se obtiene según:

$$N = CA/aSV$$

donde C es el número de organismos o células contados, A el área del fondo de la cámara (mm²), a el área de cada banda o campo contado (mm²), S el número de bandas o campos contados y V el volumen de muestra sedimentada (ml). Si el material ha sido concentrado o diluido para el conteo, V corresponde al volumen real de muestra sedimentado y el valor obtenido N se debe multiplicar por un factor (D) de dilución o concentración. Por ejemplo, si se diluyó al 50% el factor será 2, y si se concentró al 50% el factor será 0.5.

MICROSCOPIO DIRECTO. CÁMARA DE SEDWICK-RAFTER. Para muestras más concentradas se puede utilizar la cámara de Sedwick-Rafter, de 1 ml de capacidad y pocos mm de altura, en microscopio común. Esta cámara es rectangular y de tamaño poco mayor que un portaobjetos. Generalmente no admite objetivos de gran aumento (100×) debido a su altura, pero se puede contar muy bien usando 40×. Muchas de estas cámaras vienen divididas por una grilla en cuadrados de área conocida, lo que facilita el conteo. Para llenar la cámara debe cubrirse parcialmente con un cubreobjetos de igual tamaño y verter la muestra desde el ángulo descubierto, evitando la formación de burbujas. Luego se cubre totalmente y se espera desde algunos minutos hasta horas a que el fitoplancton sedimente, antes de observarlas en microscopio común. La abundancia N de organismos por ml es:

$$N = 1000C/aHS D$$

donde C es la cantidad de individuos contados, a el área del campo cuantificado (mm²), H es la altura de la cámara (mm), S la cantidad de campos contados y D el factor de dilución o concentración de la muestra (González de Infante 1988). El factor 1000 convierte el volumen de µl a ml.

Cuando se tiene el material sedimentado es necesario determinar la forma de contar: por campos aleatorios, campos ordenados, transectas (bandas) 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 puede disminuirse aumentando la cantidad de los organismos contados y/o el número de réplicas (Cap. 1). 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 de Infante 1988; Izaguirre 1995). El nivel de error (E) del conteo (Rott *et al.* 2007; Vuorio *et al.* 2007) se puede calcular como:

$$E = 1/x \sqrt{(C^2/S)}$$

donde S es la cantidad de campos contados, x el promedio de organismos contados por campo y C el número total de organismos contados.

9.4.2. BIOVOLUMEN

El biovolumen es la mejor aproximación a la biomasa de los organismos determinada a partir de su abundancia y dimensiones morfométricas (Rott 1981). Con dichas medidas se calcula el volumen de un cuerpo geométrico de forma similar al

organismo. Muchas formas complejas requieren la combinación de diferentes formas de cuerpos geométricos. Se calcula el volumen en forma individual de al menos 25 individuos de la misma especie, y luego se promedia (Rott 1981; Hillebrand *et al.* 1999; Konoplya & Soares 2011). Las especies con variaciones importantes de tamaño deben analizarse por clases de tamaño (*e.g.*, diatomeas). Dependiendo del objetivo del estudio, también puede ser relevante estimar la superficie del organismo (μm^2) para luego calcular la relación superficie/volumen (μm^{-1}) (Reynolds 2006). El volumen específico (μm^3) se multiplica por la abundancia estimada (org./ml) para determinar el biovolumen ($\mu\text{m}^3/\text{ml}$) por cada taxa, lo que permitirá calcular por sumatoria el biovolumen total del fitoplancton. Luego se puede aproximar el biovolumen a mg/litro, asumiendo que la densidad del organismo es igual a la del agua ($\rho = 1$). También el biovolumen se puede transformar en unidad de peso, contenido de carbono o volumen neto de protoplasma utilizando diferentes coeficientes (*e.g.*, Montagnes *et al.* 1994; Gosselain *et al.* 2000).

9.5. PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

Los pigmentos de las algas y cianobacterias tienen un alto valor en estudios de ecología y fisiología, ya que permiten inferir la composición, la cantidad y el estado fisiológico de los organismos (Jeffrey *et al.* 1997; Roy *et al.* 2011). Los pigmentos de los organismos del fitoplancton se dividen en dos grandes grupos: los lipídicos, que están empotrados en la membrana de los tilacoides (clorofilas y carotenoides), y los hidrofílicos, que forman complejos proteicos asociados al tilacoide (ficobilinas). Ambos grupos de pigmentos implican técnicas de cuantificación diferentes. Existe otro tipo de pigmento lipídico, la scitonemina, que se acumula exclusivamente en la vaina mucilaginosa de las cianobacterias bentónicas. Los pigmentos con valor taxonómico son aquellos que permiten inferir la presencia o cuantificar a un grupo algal en particular. Por ejemplo, la luteína es una xantofila marcadora de las algas verdes ya que la poseen en alta concentración, y la zeaxantina lo es de las cianobacterias. Todos los pigmentos son muy sensibles a la degradación fotoquímica, por lo que las manipulaciones deben hacerse en condiciones de luz muy tenue.

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. Su concentración se ha utilizado como indicador indirecto de la biomasa fitoplanctónica desde la década del 50 (Lorenzen 1967; Rai 1980), aunque la relación entre ambas depende del estado fisiológico de la comunidad, así como de su composición específica (Lee 1995; Jeffrey *et al.* 1997; Bonilla *et al.* 2009). Existen varias clasificaciones, pero en general, valores de clorofila *a* menores a 4 o 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ son característicos de ecosistemas oligotróficos, mientras que por el otro lado, en ecosistemas hipereutróficos es frecuente encontrar valores mayores a 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Conde 2009; Aubriot *et al.* 2011).

Comúnmente este pigmento puede ser cuantificado mediante métodos que se basan en la capacidad de la molécula de absorber luz a determinada longitud de onda, o en su capacidad de ser excitada y emitir luz también a longitudes de onda específicas. Existen dos grandes grupos de métodos, los directos y los indirectos. Los directos pueden ser masivos (extracción), en los que los pigmentos se disuelven en un solvente y se cuantifica por espectrofotometría o por fluorometría *in vitro*, o indirectos en donde se mide la fluorescencia *in vivo* del pigmento (sin extracción). Los métodos masivos tienen interferencia, más o menos cuantificable, de otros pigmentos que pueden absorber o fluorescer en las longitudes de onda del pigmento de interés (*e.g.*, clorofila *a*). Dentro de los métodos directos, la separación, identificación y cuantificación de pigmentos específicos se realiza por cromatografía líquida de alta definición (HPLC), una

poderosa herramienta para estudios de ecología, fisiología y quimiotaxonomía (Jeffrey *et al.* 1997). En los métodos indirectos se utiliza la fluorescencia *in vivo* como aproximación a la cantidad de pigmentos en una muestra (Jeffrey *et al.* 1997; Huot & Babin 2011).

9.5.1. ESPECTROFOTOMETRÍA

Los métodos analíticos por espectrofotometría han sido desarrollados inicialmente por Lorenzen (1967) y son los más utilizados en estudios de ecología de rutina. Se basan en la transferencia de los pigmentos lipídicos (clorofilas y carotenoides) a un solvente orgánico sin provocar cambios químicos en las moléculas, para luego detectar y cuantificar la clorofila *a* según sus propiedades específicas de absorción de luz. La concentración de la clorofila se cuantifica en un espectrofotómetro a la longitud de onda en que la absorción de la molécula es máxima, lo que depende fuertemente del solvente utilizado (*e.g.*, 665 nm en etanol 90%). La cuantificación no se refiere a curvas de calibración, sino que es absoluta. Se utiliza como referencia el coeficiente de absorción específico del pigmento en el solvente utilizado. En general los métodos espectrofotométricos utilizan el segundo máximo de absorción cercano al naranja (663-665 nm), ya que el primer máximo, más alto, en la región de los azules (430 nm), tiene gran interferencia con los máximos de absorción de los carotenoides.

Entre los solventes orgánicos más comunes, el metanol y el etanol tienen mayor poder de extracción que la acetona (Nusch 1980; Ritchie 2006, 2008). Ésta 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). El metanol es altamente tóxico, por lo que el etanol es el más recomendado para estudios de rutina en sistemas dulceacuícolas, donde abundan las clorofitas y las cianobacterias (Nusch 1980; Riemann 1980; ISO 1992; Jeffrey *et al.* 1997; Ritchie 2006). Algunos autores proponen usar una mezcla de solventes (acetona/metanol) para la extracción de clorofila (Pechar 1987).

La técnica que se describe es una modificación de la de Nusch (1980) con etanol caliente (75 °C) durante 5 min, ya que a esa temperatura se inactivan las clorofilas y se estimula la liberación de los pigmentos (ISO 1992). Existen otras técnicas que utilizan el etanol en frío, lo que lleva un proceso de extracción más largo y puede tener menor poder de extracción cuando hay clorofitas presentes en la muestra (Jespersen & Christoffersen 1987).

FILTRACIÓN. Los filtros de fibra de vidrio (tipo Whatman®) son inertes, insolubles, resistentes, no producen turbiedad durante la extracción y retienen partículas mayores de aproximadamente 0.7 µm (GF/F) y 1.2 µm (GF/C) (Marker *et al.* 1980). El uso de filtros GF/F es recomendable para el análisis de muestras con alto contenido de picoplancton (Chavez *et al.* 1994; Vidal *et al.* 2007).

Se debe filtrar suficiente agua pero evitando la colmatación total del filtro, lo que varía ampliamente según el tipo de muestra. En un ambiente eutrófico con una floración de cianobacterias (*e.g.*, lago Rodó), solo 10 ml pueden colmatar el filtro, mientras que en muestras de lagos oligotróficos de canteras rocosas, es posible filtrar 500 ml. En aguas con gran cantidad de sólidos inorgánicos en suspensión, como sucede en los grandes ríos, o en aguas oligotróficas, es recomendable utilizar filtros de mayor área (47 mm de diámetro) para poder retener mayor cantidad de material. Si hay muy poca cantidad de fitoplancton, es posible filtrar dos submuestras (cada una en un filtro) y luego analizarlas juntas.

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 perdiéndose algunos organismos fitoplanctónicos pequeños (Nusch 1980). El filtro debe ser retirado del

portafiltro con pinzas lisas, plegándolo por la mitad hacia adentro, de manera de evitar la pérdida del material.

EXTRACCIÓN. Se recomienda extraer los pigmentos inmediatamente luego del filtrado (ver punto 3 de *Procedimiento*). Según el método seleccionado se agregará un volumen conocido de solvente, generalmente 10 ml. El volumen del solvente puede disminuirse de manera de aumentar la concentración de pigmentos disueltos si la muestra tiene poco fitoplancton. Es importante asegurar que el filtro se encuentre totalmente sumergido en el solvente. También se puede concentrar el extracto, liofilizándolo y resuspendiéndolo en un volumen menor (*e.g.*, 3 ml). Los extractos son estables en oscuridad y baja temperatura (4 °C) durante varias semanas. Si es posible, se recomienda agregar un gas inerte (*e.g.*, argón) a los tubos con los extractos para disminuir el contacto de los pigmentos con el aire y evitar la oxidación de los mismos.

ACIDIFICACIÓN. La molécula de clorofila se degrada naturalmente en diversas moléculas denominadas feopigmentos (feofitina, clorofilida, etc.), también presentes naturalmente en muestras del ambiente. Estos pigmentos de degradación presentan máximos de absorbancia a las mismas longitudes de onda que la clorofila *a* activa, por lo que la lectura espectrofotométrica a 665 nm los incluye (A_{665}). No es posible discriminar el aporte de la clorofila *a* activa y el de los productos de degradación en los métodos espectrofotométricos, por lo tanto se agrega un paso metodológico en donde se acidifica la muestra con HCl (0.12 N), para degradar a feopigmentos toda la clorofila activa existente. El proceso de degradación se completa entre 3 y 5 minutos (ISO 1992).

RELACIÓN ÁCIDA (RA). Para un extracto puro de clorofila *a*, la relación entre la absorbancia a 665 nm antes y después de la acidificación (A_{a665}) es 1.7 en etanol 90%. Por lo tanto, en una 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 (RA) inmediatamente a la lectura del extracto de clorofila, para verificar que se ha logrado correctamente. La RA se calcula como:

$$RA = (A_{665} - A_{750}) / (A_{a665} - A_{a750}) < 1.7$$

Donde A_{665} y A_{a665} son la absorbancia de la clorofila en etanol 90% antes y después de la acidificación respectivamente. La lectura a 750 nm (A_{750} y A_{a750}) se realiza para la corrección por turbidez. Es deseable que el valor de turbidez sea igual o cercano a cero. Valores muy altos de turbidez indican que el extracto no está bien clarificado y puede dar interferencias en la lectura. En aguas naturales de sistemas dulceacuicolas es común encontrar valores de relación ácida entre 1.33 y 1.60. Si la relación es más baja (*e.g.*, 1.0) se puede agregar más ácido y volver a esperar 5 minutos o más hasta que la acidificación se complete. Ambientes con alta carga de materia orgánica particulada de origen vegetal (*e.g.*, arroyos turbios) tienen naturalmente alta concentración de clorofila degradada, por lo que la RA puede ser cercana a 1.0. Si la relación supera el valor de 1.7, se debe descartar la muestra.

Equipamiento necesario

- 1) Espectrofotómetro con rango de longitud de onda visible hasta 750 nm, resolución de 1 nm, ancho de banda de 2 nm o menos, definición igual o mayor a 0.001 unidades de absorbancia y capacidad para celdas con un trayecto óptico de 1 cm.
- 2) Sistema de filtración por vacío con portafiltro (para filtros de 25 mm o 47 mm de diámetro).

- 3) Baño térmico de agua con termostato apropiado para 75 ± 1 °C con gradilla porta tubos.

Procedimiento (modificado de Nusch 1980 e ISO 1992)

- 1) Filtrar entre 0.25 y 2 l de muestra, dependiendo de la concentración de algas a través de filtros de fibra de vidrio (GF/C).
- 2) Doblar los filtros con las algas hacia adentro y guardarlos inmediatamente en los tubos de centrifuga recubiertos con papel de aluminio.
- 3) Realizar el resto del procedimiento inmediatamente. Si no es posible, los filtros con el tubo se deben congelar de inmediato (a -20 °C por algunos días o en ultrafreezers por semanas a meses).
- 4) Agregar 8 a 10 ml de etanol 90% según la concentración de organismos y tapar.
- 5) Colocar el tubo tapado a baño María y calentar a 75 ± 1 °C durante 5 min. Si se deja más tiempo se puede degradar la clorofila. Enfriar con agua corriente inmediatamente al finalizar el tiempo de calentamiento.
- 6) Dejar las muestras durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
- 7) Clarificar el extracto mediante centrifugación (en general a 4000 rpm durante 5 min es suficiente). Otra opción puede ser filtrar el extracto por un filtro GF/C mediante una jeringa. En este caso se debe filtrar la muestra a otro tubo. Luego, el extracto puede ser mantenido en refrigerador y oscuridad hasta un máximo de 3 días o en freezer a -25 °C hasta 30 días, pero se recomienda que el tiempo entre la extracción y la medición en el espectrofotómetro sea mínimo.
- 8) Calcular la concentración de clorofila *a* (Clo *a*, $\mu\text{g l}^{-1}$):

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

donde *v* es el volumen del extracto (ml), *V* el de la muestra filtrada (litros), A_{665} y A_{750} las absorbancias sin acidificar, Aa_{665} y Aa_{750} las absorbancias luego de la acidificación, *L* el largo de la cubeta (generalmente 1 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 90% ($1/82 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 1000$).

La concentración de las feofitinas (Feof.) en $\mu\text{g l}^{-1}$ es menos precisa que la de la clorofila, pero se puede calcular mediante:

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

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

El mínimo de detección de la técnica es $0.30 \mu\text{g l}^{-1}$ y está dado por el menor valor que puede ser leído espectrofotométricamente (0.001) y la siguiente relación:

$$(A_{665} - A_{750}) - (Aa_{665} - Aa_{750}) = 0.001$$

Entonces, aplicando la fórmula de cálculo de la clorofila *a*:

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

9.5.2. OTROS MÉTODOS

FLUORESCENCIA *IN VITRO*. En general los métodos de fluorescencia son dos o tres órdenes de magnitud más sensibles que los de espectrofotometría, y pueden detectar concentraciones muy bajas de clorofila *a* ($<1 \mu\text{g l}^{-1}$). Por el contrario, estos métodos

se alejan del ajuste lineal fluorescencia-concentración de clorofila *a* a altos valores, donde los métodos espectrofotométricos son más confiables.

El método de fluorescencia se basa en la propiedad de la molécula de clorofila *a* de emitir luz en longitudes de onda de baja energía (sobre el rojo), cuando es excitada con luz de mayor energía (azul). La clorofila *a* se extrae de la forma antes mencionada y se realizan las lecturas con un fluorómetro. Para poder cuantificar la señal de fluorescencia, es necesario realizar una curva de calibración con un estándar de clorofila *a* de concentración conocida. Los estándares son altamente sensibles a la degradación, por lo que hay que trabajar en penumbra y utilizando lámparas con luz verde, y deben conservarse en atmósfera inerte (*e.g.*, con gas argón) a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se recomienda que la curva tenga al menos 5 concentraciones que abarquen el rango de la muestra.

La respuesta de fluorescencia y el cociente ácido máximo son altamente dependientes de la configuración y óptica de cada equipo, por lo que es necesario hacer las curvas de calibración para cada equipo. 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).

La concentración de clorofila *a* se calcula, según Jeffrey *et al.* (1997), como:

$$\text{Clo } a = \text{KFm } v(\text{F} - \text{Fa})/\text{V}(\text{Fm} - 1)$$

donde K es el coeficiente de sensibilidad en el solvente ($\mu\text{g Clo } a/\text{ml solvente}/\text{unidades de fluorescencia del instrumento}$), Fm es el cociente máximo F/Fa en ausencia de feopigmentos y clorofila *b*, F es la fluorescencia antes de la acidificación y Fa es la fluorescencia luego de la acidificación, v es el volumen del extracto (ml) y V es el volumen filtrado de la muestra (litros). Los coeficientes K y Fm se determinan en forma empírica a partir de un extracto de estándar de clorofila *a* y utilizando el coeficiente de extinción de la molécula según el solvente utilizado.

FLUORESCENCIA *IN VIVO*. Es un método sencillo, rápido, poco preciso pero muy útil cuando se realizan monitoreos ambientales o para seguir el crecimiento de cultivos (Johnsen *et al.* 2011). La fluorescencia puede variar según el grupo taxonómico, el estado fisiológico de las células y el empaquetamiento de las células en el organismo (*e.g.*, en colonias con miles de células). Los resultados se expresan en unidades de fluorescencia relativa. Si bien el método es muy sensible, tiene limitaciones en ambientes altamente turbios como ríos o frente a sustancias húmicas que pueden fluorescer dando interferencia con la lectura de la clorofila (Gregor & Maršálek 2004). Si se desea calcular la concentración absoluta de la clorofila en la muestra, se debe realizar una curva de calibración frecuentemente con un cultivo de concentración conocida de clorofila. A pesar de sus limitaciones este método permite obtener resultados en forma instantánea, comparar tendencias temporales o espaciales e identificar máximos de clorofila en perfiles verticales. Estos métodos también se utilizan para la detección de otros pigmentos como las ficobilinas (ficocianinas o ficoeritrinas) como indicadores de grupos algales en particular (*e.g.*, ficobilinas para cianobacterias) (Izydorczyk *et al.* 2005).

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA DEFINICIÓN (HPLC). Este método permite identificar, caracterizar, cuantificar, separar y purificar los pigmentos lipídicos existentes en una muestra compleja (comunidad natural o cultivo unialgal) (Jeffrey *et al.* 1997). Es posible identificar los pigmentos activos y los que están en degradación (*e.g.*,

feopigmentos), así como alómeros. La información obtenida puede servir para caracterizar la contribución relativa de los principales grupos filogenéticos (quimiotaxonomía), discriminar los pigmentos activos de los degradados con alta capacidad de definición, identificar cambios en pigmentos específicos debido a procesos biológicos diversos (*e.g.*, aclimatación a alta irradiancia) (Bonilla *et al.* 2009).

En comparación con los anteriores es el método más preciso pero también el más costoso. Este método comenzó a ser utilizado en la década del 70 principalmente en oceanografía (Jeffrey *et al.* 1997). Un equipo de HPLC aplicado a la detección y cuantificación de pigmentos idealmente tiene dos detectores: un arreglo de diodos que mide la absorbancia en el tiempo y permite simultáneamente realizar un barrido en un rango de longitudes de onda deseados en escalas de tiempo cortas (milisegundos) y un fluorómetro.

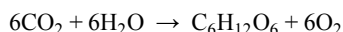
El HPLC se basa en las propiedades químicas de las moléculas de pigmentos disueltas en un solvente orgánico (usualmente metanol, acetona o etanol) y de su polaridad. En la cromatografía se inyecta un pequeño volumen de muestra (*e.g.*, 100 μ l) la cual llega a la fase inmóvil (columna de partículas de sílice, con poros de 3.5 μ m o similar, tipo C18 o C8) que es luego lavada por una mezcla de solventes orgánicos (fase móvil) en forma isocrática (siempre la misma combinación de solventes) o heterocrática (variable en el tiempo) a alta presión. Si se desea obtener el perfil pigmentario completo (desde los polares a los apolares) deben usarse métodos heterocráticos más complejos (Zapata *et al.* 2000). Como resultado, se desprenden (eluyen) los pigmentos a lo largo del análisis desde los más polares (*e.g.*, clorofila *c2*) a los apolares (*e.g.*, β - β -caroteno). El pico de absorbancia o de fluorescencia de cada pigmento está en relación con la concentración del mismo, por lo que se puede calcular su concentración basados en curvas de calibración con estándares. El espectro de absorción de cada pigmento es como una "huella digital", por lo que se utiliza para confirmar la identidad de los mismos, junto con el tiempo de elución. Además, muchos equipos tienen un colector asociado, por lo que se puede recoger cada pigmento a la salida de los detectores, lo que puede permitir su purificación posterior.

Más recientemente los equipos de HPLC se utilizan acoplados a un espectro de masas para optimizar la caracterización de los pigmentos desconocidos. Para poder calcular la concentración de cada pigmento es necesario realizar curvas de calibración frecuentemente con estándares de cada pigmento (ver más atrás consideraciones para trabajar con estándares). Todos los reactivos a utilizar deben ser ultrapuros y de calidad cromatográfica. Las muestras se preparan siguiendo los mismos protocolos de extracción que para las otras técnicas descritas, pero deben ser clarificados por filtración utilizando filtros especiales de 0.2 μ m de poro.

9.6. PRODUCCIÓN PRIMARIA

La producción primaria es un proceso que se define como la cantidad de materia orgánica nueva sintetizada por organismos autótrofos por unidad de área o volumen y tiempo, a través de la fotosíntesis o la quimiosíntesis (por bacterias anaeróbicas). En los sistemas de agua dulce la producción primaria fotosintética, mediada por la clorofila *a*, es el proceso dominante y lo realizan cianobacterias, microalgas y macrófitas, que obtienen la energía a partir de la radiación solar. La producción bruta es la síntesis total de nuevo material orgánico, mientras la producción neta es la bruta menos las pérdidas por respiración, excreción y otros procesos metabólicos (Williams 1993; Lampert & Sommer 2007). La producción primaria para el fitoplancton varía en un amplio rango, desde <50 hasta *ca.* 300 mg C m⁻² d⁻¹ en lagos oligotróficos, >1000 mg C m² d⁻¹ en lagos eutróficos, llegando a valores cercanos a 5 g C m² d⁻¹ en lagos hipereutróficos (Kalff 2002).

La fotosíntesis utiliza la energía solar para reducir el anhídrido carbónico (CO₂) a materia orgánica. Partiendo de la fórmula general de la fotosíntesis, que es inversa a la respiración:



Es posible estimar esta función midiendo la remoción de anhídrido carbónico (CO₂) o la liberación de oxígeno, en donde por cada 192 gramos de oxígeno producidos se remueven o fijan 264 gramos de anhídrido carbónico. La estimación corresponde a la cantidad de carbono fijado u oxígeno liberado por la comunidad autotrófica en un volumen de agua o un área determinada, por unidad de tiempo (Platt & Sathyendranath 1993). La productividad es un término que se refiere usualmente a la producción en un periodo de tiempo largo como día o año (Kalf 2002). La tasa fotosintética –se expresa por unidad de biomasa (B)– es un indicador de la tasa de recambio de la biomasa y se denomina P^B, en donde P^B = P/B (Kirk 1996). La tasa fotosintética máxima (en mg C mg Clo⁻¹ h⁻¹) es el número de asimilación donde P_m^B = P_m/B (Kirk 1996). La productividad relativa se puede calcular como el cociente de las dos tasas P^B/P_m^B, la cual es adimensional, permitiendo comparar curvas de respuesta frente a un gradiente lumínico de comunidades diferentes o en condiciones ambientales diferentes.

CURVAS TASA FOTOSINTÉTICA-IRRADIANCIA (CURVAS P-I). La tasa fotosintética se relaciona con la irradiancia (luz fotosintéticamente activa, PAR) en forma no lineal. Esto se formaliza gráficamente en una curva llamada P-I (del inglés *photosynthesis-irradiance*) de la tasa fotosintética instantánea normalizada por la concentración de clorofila (P^B), con tres fases (limitación, saturación e inhibición, Fig. 9.4) (Kirk 1996). En la fase inicial, la tasa fotosintética aumenta linealmente ya que está limitada por la intensidad lumínica y permite determinar el parámetro α que es la pendiente inicial de la curva. Al aumentar la intensidad lumínica la respuesta deja de ser lineal, o sea la fotosíntesis deja de estar limitada por la intensidad lumínica. Se alcanza la fase de saturación o máxima tasa fotosintética. Al inicio de la fase de saturación corresponde la intensidad de luz I_k, a la cual la fotosíntesis pasa a estar regulada por otros factores. En esta fase se determina la producción primaria máxima P_m^B. El parámetro I_k es característico del tipo de comunidad o especie en la muestra y denota las preferencias a altas o bajas intensidades de luz. El valor I_k se puede calcular como:

$$I_k = P_m^B / \alpha$$

A mayor irradiancia y dependiendo de la duración de la exposición, se puede registrar una disminución de la tasa fotosintética relativa, siendo ésta la tercer fase de la curva, llamada de fotoinhibición (Geider & Osborne 1992; Sakshaug *et al.* 1997) y con una pendiente negativa (parámetro β).

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; c) predecir la tasa fotosintética *in situ* a partir de la irradiancia y clorofila; d) comparar la respuesta de una especie o comunidad con otros casos, y e) determinar la aclimatación de los organismos estudiados.

TÉCNICAS DE ESTIMACIÓN DE LA PRODUCCIÓN PRIMARIA. Los dos métodos clásicos más comunes consisten en medir la incorporación de carbono inorgánico o la liberación de oxígeno en un tiempo determinado (Dokulil 1984a; Kirk 1996; Gazeau *et al.* 2007). Ambos se realizan en muestras de agua contenidas en botellas de vidrio o cuarzo. El último permite el pasaje de toda la radiación solar, incluida la ultravioleta, por lo que es recomendado para simular las condiciones reales de iluminación o cuantificar

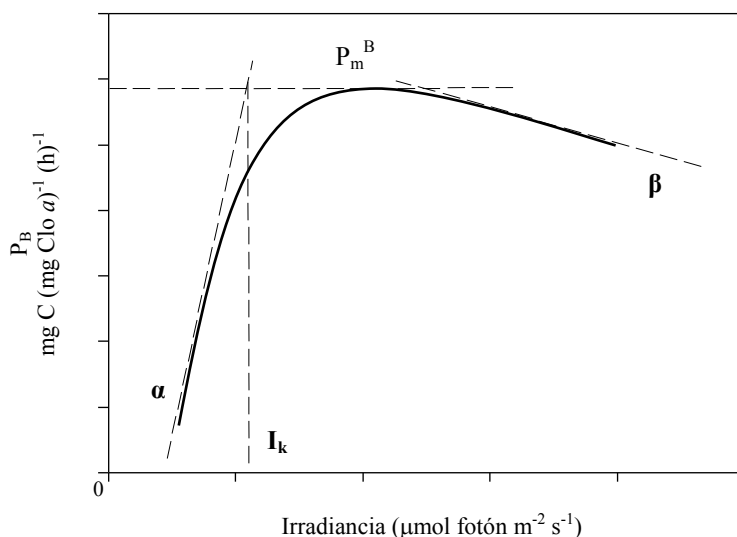


Figura 9.4. Relación teórica entre la tasa fotosintética (P_B) y la radiación fotosintéticamente activa (PAR) (curva P-I), indicando las tres fases de la respuesta: limitada, saturada e inhibida. P_B : tasa fotosintética; P_m^B : tasa fotosintética máxima; α : pendiente inicial lineal (fase de limitación); I_k : intensidad de luz de subsaturación; β : pendiente de fotoinhibición.

los efectos de la luz ultravioleta en la tasa fotosintética. La muestra de agua contiene seston, o sea que además del fitoplancton, también están presentes bacterias, protozoarios y metazoarios que respiran al igual que los organismos del fitoplancton. Se toma la muestra del sitio deseado y se incuban en los recipientes mencionados durante determinado tiempo. La incubación se puede realizar *in situ* dentro del ecosistema de estudio o en mesocosmos próximos, 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 (*e.g.*, 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 inferiores por parte de las superiores. En los estudios en laboratorio, pueden utilizarse mallas plásticas o metálicas neutras que filtran todo el espectro en forma similar para producir el gradiente de radiación deseado, que se recomienda sea al menos de 10 niveles de intensidad. Además se incluyen botellas oscuras en ambos métodos, que tienen distinto objetivo (ver enseguida), para corregir la lectura final. Se detallan a continuación los dos métodos mencionados y se presentan luego referencias de métodos alternativos.

9.6.1. 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 1984a; Kirk 1996). Se basa en estimar la tasa fotosintética mediante la cuantificación del oxígeno liberado durante la primera fase de la fotosíntesis. En la botella clara ocurre el proceso de fotosíntesis y respiración, por lo que el valor de dicha botella indica la producción neta, mientras que la botella oscura mide el consumo por respiración. De este

modo, 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) mediante titulación (método de Winkler; ver Cap. 6), 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), en mg/l de oxígeno. La producción bruta ($\text{mg O}_2 \text{ l}^{-1}$) es 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), lo cual no siempre es así. Es un método sencillo, pero sensible solo a concentraciones de clorofila superiores a $5 \mu\text{g l}^{-1}$ y cambios en la concentración de oxígeno superiores a 0.1 mg l^{-1} . Otras desventajas son la posible formación de burbujas durante la incubación, y que la respiración en la botella oscura se deba a una acumulación de organismos no fitoplanctónicos. Es un método que puede dar buenos resultados en lagos eutróficos con alta concentración de fitoplancton. Una descripción detallada del mismo se encuentra en Strickland & Parsons (1972).

Procedimiento

- 1) Tomar para cada profundidad una muestra de agua con botella muestreadora oscura. Llenar cuidadosamente 6 botellas claras y 3 oscuras tipo DBO de 120-300 ml evitando la formación de burbujas.
- 2) Evitando la radiación solar directa, fijar inmediatamente tres botellas claras con los reactivos 1 y 2 de Winkler (Cap. 6).
- 3) Incubar las 3 botellas claras restantes y las 3 oscuras a la profundidad de muestreo durante 3 a 5 h. Las incubaciones deben realizarse entre las 10:00 y las 14:00 h, bajo radiación solar máxima. Controlar periódicamente las botellas, desechando las 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. 6).
- 5) Calcular la producción bruta, la producción neta y la respiración de acuerdo a la fórmula detallada arriba, que se expresa en $\text{mg O}_2 \text{ l}^{-1}$.

9.6.2. MÉTODO DEL ^{14}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. Es un método altamente sensible que requiere tiempos relativamente más breves que el de oxígeno, y permite obtener valores directos de la cantidad de carbono fijado. La principal limitación de este método es que utiliza un isótopo radioactivo de una vida media aproximada de 5700 años. El carbono radioactivo emite partículas beta de relativamente baja energía que no se pueden detectar a bajas concentraciones con un contador tipo Geiger. Las soluciones concentradas que se requieren son generalmente costosas y pueden tener dificultades de envío por tratarse de material radioactivo. Toda la manipulación de sustancias radioactivas debe hacerse por personal entrenado, con las precauciones necesarias y la infraestructura adecuada para realizar los experimentos, conservar las soluciones y descartar los desechos.

Una cantidad conocida de ^{14}C es agregada a la muestra, en la que se conoce el ^{12}C disponible (ver método de alcalinidad, Cap. 6). Se asume que la relación entre el ^{12}C

asimilado y el disponible es igual a la que existe entre el ^{14}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}C realizada en oscuridad por algas, bacterias y otros heterótrofos, lo que se conoce como la fijación no fotosintética. Su valor no está relacionado con la respiración y se resta a la incorporación de las botellas claras, siendo un control de fijación no fotosintética. También es posible agregar otro control, utilizando una muestra previamente fijada con formol a la cual se le agrega la misma solución de ^{14}C . En este caso se busca evaluar la posible fijación abiótica por adsorción.

Preparación de la solución de ^{14}C

Es recomendable preparar una solución de trabajo a partir de una solución concentrada de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ que se debe conservar en congelador. La solución de trabajo se lleva a temperatura ambiente y a partir de la misma se preparan las soluciones de campo inmediatamente antes de cada experimento. Se sugiere que la solución de campo tenga una concentración de 300 a 500 μCi cada 500 μl . Un μCi equivale a 2.2×10^6 desintegraciones por minuto (DPM). Dada la vida media del ^{14}C no hay decaimiento significativo del isótopo durante los experimentos.

Todas las soluciones de ^{14}C deben tener un pH cercano a 8.3 (se debe medir con papel pH) para que domine el HCO_3^- , la forma disponible para las algas, y para evitar perder ^{14}C debido a la volatilización del CO_2 que se da a pH menor a 6.3 (ver Cap. 7). El agua ultrapura tipo MilliQ® para preparar las soluciones debe ser fresca y estéril (15 min en autoclave a 1 atm). Las condiciones de esterilidad y el ajuste del pH de las soluciones son fundamentales para asegurar la estabilidad de las mismas a lo largo del tiempo. El ^{14}C puede perderse en corto tiempo por contaminación bacteriana o evaporación.

Las soluciones se deben preparar en una campana de gases en condiciones asépticas y guardarse en recipientes con tapa hermética previamente esterilizados. 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 contaminado se debe lavar con HCl 25% y dejar burbujeando al menos 12 h en campana de gases, o bien acumularse en un recipiente debidamente etiquetado para luego trasladarlo al lugar previsto para desechos radiactivos.

Se han desarrollado dos variantes de la misma técnica del ^{14}C , 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 μm 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}C inorgánico disuelto que quedó remanente en la muestra y se cuantifica el carbono orgánico particulado (COP) y disuelto (COD) en conjunto. Esta opción es una mejora de la técnica ya que evita los artefactos de la filtración, tiene mayor precisión y queda incluida la fracción disuelta de la producción primaria (Riemann & Jensen 1991). A continuación se describen los pasos de esta variante.

Procedimiento

- 1) Llenar con agua de la muestra tres cuartas partes de al menos tres botellas claras y dos botellas oscuras de 60 ml, aproximadamente (ver también fotosintetrón más adelante).
- 2) Inocular cada botella con 500 μl de solución de campo de ^{14}C con pipeta automática, cuidando que la punta no toque la muestra. El volumen de la solución de campo dependerá de la concentración. Completar el llenado de las botellas

con la muestra, evitando la formación de burbujas, ya que el carbono radioactivo podría liberarse como CO₂. Taparlas e instalarlas inmediatamente en los soportes de incubación a la profundidad deseada.

- 3) Incubar 1 a 2 h sobre el mediodía, dependiendo de la concentración fitoplanctónica y la concentración de la solución de carbono radioactivo.
- 4) Finalizar la incubación fijando las muestras con 0.5 a 1 ml de formol puro (formaldehído 40%) neutralizado. Algunos autores sugieren no utilizar fijadores, realizando el análisis inmediatamente (Holm-Hensen & Helbling 1995) manteniendo las muestras en oscuridad.
- 5) Una vez en el laboratorio, agitar suavemente cada botella hasta asegurar su homogeneización. Tomar con pipeta automática 2 o 3 submuestras de 5 ml, y colocarlas en viales de centelleo de 20 ml con tapa rosca.
- 6) Agregar 100 µl de HCl para que el descenso del pH permita la transformación a CO₂ del carbono radiactivo que no ha sido incorporado, el que pasará a la atmósfera. Burbujear 15 a 20 min para acelerar la remoción del CO₂. 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 pueden 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 solución (cóctel) de centelleo para muestras acuosas. Cerrar y homogeneizar con agitación fuerte en un vórtex hasta obtener una consistencia gelatinosa. No colocar marcas en las caras laterales de los viales, que deben etiquetarse en sus tapas.
- 8) Medir la radiactividad en un contador de centelleo que incluya el rango completo de energía de las partículas beta emitidas por el ¹⁴C. 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. La medición de las muestras, luego de agregado el cóctel, debe ser inmediata y no mayor a las 48 h.
- 9) La producción primaria neta ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) es:

$$(\text{CID} \times 1.06 \times (\text{DPM}_c - \text{DPM}_o) / \text{DPM}) \times 200 / t$$

donde CID es la cantidad de carbono inorgánico disuelto (μg) en 5 ml, calculado a partir del pH y la alcalinidad (Cap. 7), 1.06 la corrección isotópica (¹⁴C/¹²C), DPM_c, DPM_o y DPM, las desintegraciones por minuto en 5 ml de agua de la botella clara, oscura y agregado, respectivamente, 200 el factor para expresar el resultado en l l y t el tiempo de incubación (h).

9.6.3. 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 ¹⁵NO₃ (Peña & Harrison 1995) y de ¹⁵NH₄ (Legendre & Gosselin 1996).
- 2) Basados en las propiedades del medio, por ejemplo, en los cambios químicos producidos por los organismos: flujo de NO₃, acumulación neta de O₂ en la zona eufótica, relación ²³⁸U/²³⁴Th, 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) (Huot & Babin 2011; Roy *et al.* 2011). 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 (Platt & Sathyendranath 1993; Falkowski & Raven 1997; ver Cap. 10).

Las curvas P-I se pueden construir con los métodos clásicos mencionados (O_2 y ^{14}C) o con los de uso más reciente, basados en fluorescencia. Sin embargo, en el caso del O_2 , se trabaja con grandes volúmenes de agua, mientras que con ^{14}C se utilizan volúmenes de muestra pequeños (5 ml), colocados directamente en viales de centelleo de vidrio 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 natural. En el primer caso, tres muestras de 5 ml por cada nivel de intensidad se incuban en viales de centelleo cubiertos lateralmente con polietileno negro. Las muestras pueden incubarse por un período corto de tiempo (20-30 min) con ca. 5 μCi de ^{14}C , en una bandeja con agua circulante para evitar el calentamiento. También se puede usar un aparato denominado fotosintetrón. El fotosintetrón consiste de un baño de agua, un soporte portaviales para 16 a 20 viales y una lámpara que ilumina desde abajo los viales. La lámpara se puede ajustar para generar un gradiente de luz junto con el uso de filtros. Debido a que cada vial tiene una luz única e irrepetible, no existen réplicas, las que se obtienen repitiendo las curvas. También se puede utilizar un microfotosintetrón que utiliza placas multipozas de 96 pocillos (cada poza tiene 250 ml de capacidad) con iluminación fría en base a luces led (Johnson & Sheldon 2007).

En el caso de la luz natural, las diferentes intensidades se obtienen cubriendo las botellas de 60 a 120 ml con sucesivas capas de malla neutra (tejido tipo mosquitero negro) y colocadas en una bandeja por la que circula agua. La incubación se realiza por un período de 2 a 4 h, agregando ca. 3 μCi de ^{14}C . En ambos casos se incuban otras 3 réplicas en oscuridad y 3 más fijadas (control abiótico).

Uno de los modelos matemáticos más utilizados para describir las curvas P-I es la función hiperbólica tangencial de Jassby & Platt (1976) que no considera fotoinhibición:

$$P^B = P_m^B \tan(\alpha^B I / P_m^B)$$

En cambio, el modelo de Platt *et al.* (1980) considera la fotoinhibición:

$$P^B = P_m^B [1 - \exp(-\alpha^B I / P_m^B)] \exp(-\beta^B I / P_m^B)$$

INTEGRACIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE P^B . Con los valores de P^B calculados para varias profundidades de la zona eufótica (*e.g.*, 100, 75, 50, 25, 10 y 1% de I_0) se puede estimar la tasa fotosintética instantánea por área $P_s^B(h)$ en $mg\ C\ m^{-2}\ h^{-1}$, integrando $P^B(z)$ en profundidad:

$$P^B(z) = P_s^B [1 - \exp(-\alpha^B I_z / P_s^B)]^{-\beta^B I_z / P_s^B}$$

En este cálculo se asume que la concentración de clorofila *a* y el coeficiente de atenuación son uniformes en toda la zona eufótica.

$$P^B(h) = \int_0^{z_{euf}} P^B(z) dz \quad (dz = 0.01\ m)$$

Si se realizan curvas P-I y se conoce el coeficiente de atenuación PAR a varias horas del día (e.g., 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:

$$P^B(d) = \int_{06:00}^{20:00} P^B(t) dt \quad (dt = 1 \text{ h})$$

El mismo tipo de modelo se aplica en curvas de respuesta de crecimiento frente al aumento de la intensidad lumínica. En este caso la variable de respuesta es el aumento de la biomasa de los organismos en el tiempo y se calcula la tasa de crecimiento ($\mu\text{g día}^{-1}$).

9.7 RESULTADOS

9.7.1. TAXONOMÍA

La Laguna de Castillos (34°15' S, 53°41' W) es un área muy importante para la preservación de la biodiversidad y para la pesquería artesanal. En dicho ecosistema se registró una floración de cianobacterias que dominó la biomasa del fitoplancton de enero a marzo de 1990 (Pérez *et al.* 1999). Los ejemplares encontrados eran similares a *Nodularia spumigena* (Nostocales), una especie que se distribuye en ambientes salobres y es muy conocida por las grandes floraciones que produce en el mar Báltico. Sin embargo, es una especie de distribución restringida en comparación con otras del grupo y existen muy pocos registros de la misma en el continente americano. El análisis de los ejemplares de dicha floración se realizó mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido, lo que permitió la caracterización de las células especializadas (Fig. 9.5). El tamaño celular, la relación largo/ancho de las células, el tamaño de los acinetes y la vaina en láminas transversales y la ultraestructura en microscopía electrónica de barrido, se usaron como caracteres diacríticos. La población fue definida como grupo *N. baltica-spumigena* por presentar caracteres intermedios entre ambas especies, tratándose probablemente de un ecotipo particular (Pérez *et al.* 1999). En 1997 se registró otra floración de esta especie (Bonilla *et al.* 2006), y más recientemente se han registrado floraciones de otras especies de cianobacterias en la misma laguna, que sugieren un proceso de eutrofización creciente.

9.7.2. ESTRUCTURA DEL FITOPLANCTON EN LAGOS SUBURBANOS

Con el objetivo de caracterizar el fitoplancton en lagos subtropicales, se muestrearon siete lagos artificiales del departamento de Canelones (Botavara, Jardín, Javier, Pomacea, Prohibido, Leandro y Ton-Ton). Las muestras cuantitativas fueron analizadas mediante microscopio óptico. Se identificaron y contaron los grupos más abundantes. Se realizaron medidas de los organismos (largo, ancho y profundidad) para calcular el volumen específico y luego el biovolumen según Hillebrand *et al.* (1999). Además, se determinaron las variables limnológicas, el estado trófico y el índice de diversidad de Shannon (H).

Todos los lagos fueron pequeños, de entre $48.3 \times 10^3 \text{ m}^2$ (Leandro) y $739.0 \times 10^3 \text{ m}^2$ (Botavara), con una profundidad de entre 1.5 y 10 m en el sitio de muestreo, la temperatura estuvo entre 11.6 y 12.4 °C, la profundidad del disco de Secchi fue de entre 0.15 y 2.67 m y todos estaban mezclados.

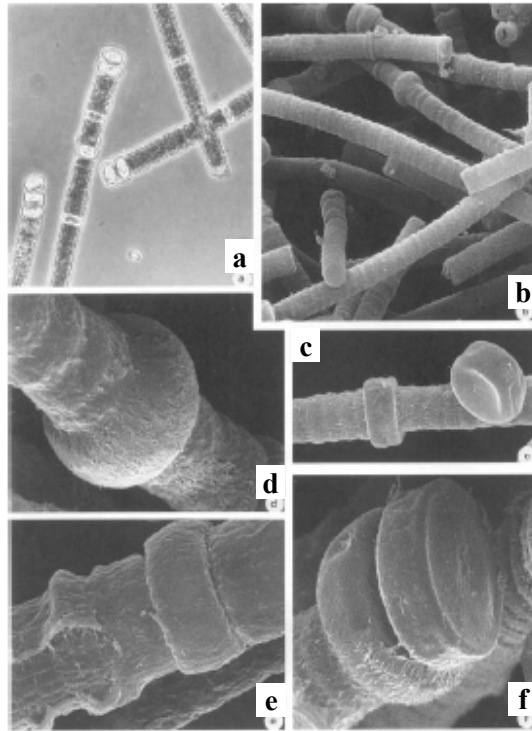


Figura 9.5. Grupo *Nodularia baltica-spumigena* de la Laguna de Castillos. **a:** Filamentos rectos y solitarios con heterocitos y acinetes en cadena (microscopio óptico); **b:** Filamentos; **c:** Heterocitos; **d:** Acinetes; **e:** Vaina celular (*thick cell sheath*); **f:** Conexión entre heterocitos (microscopio electrónico de barrido) (tomado de Pérez *et al.* 1999).

La diversidad fue máxima en Botavara ($H = 3.5$), el lago con menor estado trófico, donde dominaron *Staurastrum* sp. y *Closterium* sp. (clorofitas), y *Ceratium hirundinella* (dinoflagelado). En Ton-Ton dominaron *Aulacoseira granulata* (diatomea) y *Trachelomona volvocinopsis* (euglenofita). En Jardín hubo codominancia de *Rhodomonas lacustris* (criptofitas), *A. granulata* (diatomea) y *Euglena* sp. (euglenofita). Estos lagos fueron eutróficos, mientras que los demás fueron hipereutróficos (Javier, Pomacea, Leandro y Prohibido). En Leandro codominaron las cianobacterias *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Aphanocapsa delicatissima* y *Coelomorion tropicalis*, junto con la diatomea *Synedra acus*. En Pomacea, la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* dominó 100% la comunidad. Javier fue el lago con mayor número de grupos y dominaron las cianobacterias *M. aeruginosa* y *C. raciborskii*, junto con el dinoflagelado *C. hirundinella* (Fig. 9.6).

A pesar de las bajas temperaturas, características de la estación invernal, se registraron las cianobacterias *M. aeruginosa* y *C. raciborskii* en alta biomasa, contrariamente a lo esperado según la bibliografía (Chen *et al.* 2003; Padisák 1997). Asimismo, la presencia de cianobacterias no estuvo necesariamente acompañada de una baja en la diversidad de la comunidad, como en Javier y Leandro. Esto puede deberse a que la eco-estrategia de las cianobacterias dominantes (*C. raciborskii*, filamentos finos) es dispersiva, generando menor sombreadamiento que las especies acumulativas de gran tamaño (*e.g.*, *M. aeruginosa*) (Tucci & Sant'Anna 2003).

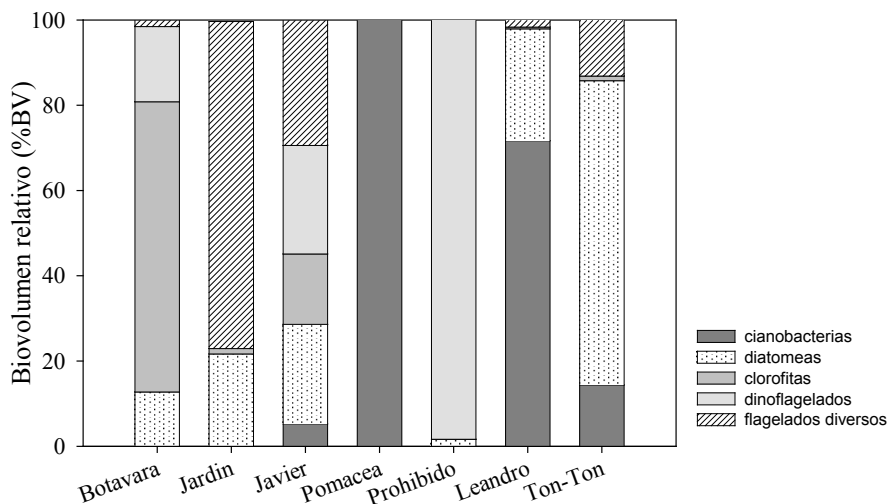


Figura 9.6. Contribución relativa al biovolumen de fitoplancton total (%) de los grandes grupos filogenéticos del fitoplancton en siete lagos suburbanos meso a hipereutróficos. La categoría “flagelados diversos” incluye a criptofitas, crisofitas y euglenofitas (tomado de Fabre *et al.* 2010).

9.7.3. CLASIFICACIONES FUNCIONALES DEL FITOPLANCTON

La Laguna de Rocha (54°15' W, 34°37' S) es un ecosistema somero que ha sido muy estudiado (Conde *et al.* 2002; Bonilla *et al.* 2005, 2006). Tiene la particularidad de estar conectado intermitentemente con el océano Atlántico, a través de la apertura y el cierre de una barra arenosa en la zona sur.

En un estudio sobre el fitoplancton realizado entre 1996 y 2000, se observó que tanto la composición relativa como el biovolumen total de la comunidad variaban según periodos de alta y baja influencia marina, determinados por las precipitaciones (Bonilla *et al.* 2005). En dicho estudio se utilizó el modelo propuesto por Reynolds (1991), basado en Grime (1977), que permite clasificar al fitoplancton según tres estrategias de vida. La clasificación se aplicó a los taxa más representativos (>25% del biovolumen total). El modelo identifica invasores (estrategas C), ruderales (estrategas R) y estrés tolerantes (estrategas S). Esta clasificación se basa en variables morfológicas (largo lineal máximo, MLD, biovolumen específico, cociente superficie/volumen, S/V), asumiendo que la morfología refleja la fisiología y la estrategia de vida del organismo. Los estrategas C son pequeños ($<5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$), con alto cociente S/V ($>0.3 \mu\text{m}^{-1}$) y corto MLD ($<80 \mu\text{m}$), presentando ciclos de vida cortos con preferencia por ambientes con buena disponibilidad de recursos. Los estrategas S son individuos de gran tamaño ($>10^4 \mu\text{m}^3$), bajo S/V ($<0.3 \mu\text{m}^{-1}$) y largo MLD (hasta $500 \mu\text{m}$), con crecimiento lento y tolerancia a estrés por nutrientes. Finalmente, los estrategas R son individuos con alto cociente S/V ($>0.3 \mu\text{m}^{-1}$), tamaño intermedio (de 500 a $10^5 \mu\text{m}^3$) y MLD intermedio (10 - $300 \mu\text{m}$), asociados a crecimiento rápido y tolerancia a ambientes de mezcla y baja disponibilidad lumínica (Reynolds 1991).

En el estudio se identificó un período de alta influencia marina (I) y otro de baja influencia marina (II), con una conductividad promedio en la zona norte de 7 y 3 mS cm^{-1} respectivamente. En el período I predominaron los estrategas tipo CR y CS

(Fig. 9.7). Algunas de las especies encontradas fueron las diatomeas *Thalassiosira* sp. (CS), *Melosira moniliformis* (CS), *Melosira dubia* (CR), *Nitzschia* spp. (CR) y el dinoflagelado *Prorocentrum minimum* (CR), mientras que las especies tolerantes al estrés (S), como *Surirella splendida* y *Euglena* cf. *acusiformis* fueron las más escasas durante este período. Por otro lado, en el período con menor salinidad (II) la mayor contribución fue de los organismos pequeños, principalmente Chlorophyceae y Euglenophyceae con estrategia C (Fig. 9.7). Con menor conductividad, las especies presentes fueron *T. fasciculata* (R), *Trachelomonas* sp. (CS), *Eutreptiella* sp. (CR) y *Euglena* spp. (CR).

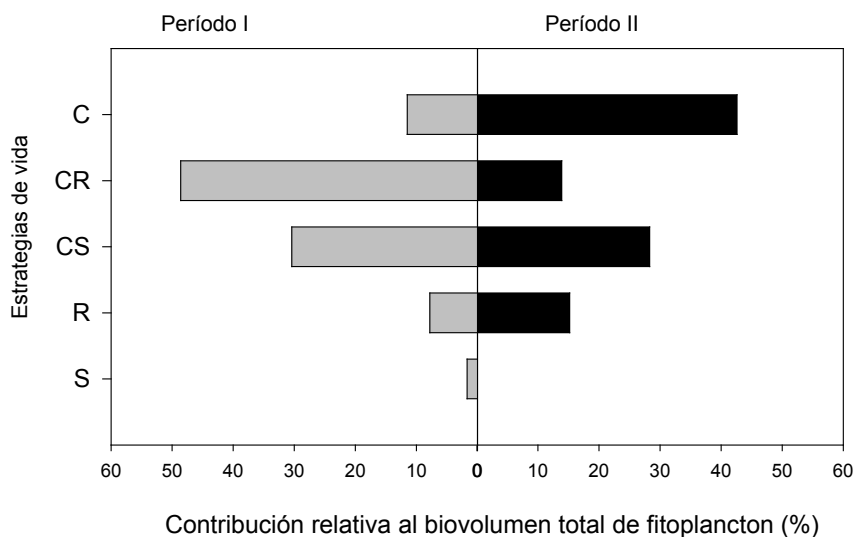


Figura 9.7. Contribución relativa de estrategias C, R y S y sus combinaciones CR y CS al biovolumen total de fitoplancton (%) para la zona norte de la Laguna de Rocha. Promedios para un período de alta influencia marina (I, agosto 1996 a febrero 1998) y otro de baja influencia marina (II, diciembre 1998 a marzo 2000) (datos reanalizados de Bonilla *et al.* 2005).

Kruk *et al.* (2010) proponen un modelo funcional conceptual para agrupar al fitoplancton basándose en rasgos morfológicos (Grupos Funcionales Basados en Morfología, GFBM): volumen, superficie, diámetro, relación superficie/volumen, presencia de flagelo, aerótopos, estructuras de sílice y mucilago. El modelo se basa en que los rasgos morfológicos son simples de determinar y están estrechamente relacionados con los rasgos fisiológicos, reflejando la funcionalidad del organismo en el ambiente. Se definen siete grupos funcionales. En el grupo I están los organismos pequeños con alta relación S/V; en el II, pequeños flagelados con exoesqueletos de sílice; en el III, grandes filamentos con aerótopos; en el IV, los de tamaño medio sin otros rasgos distintivos; en el V, unicelulares flagelados de tamaño medio a grande; en el VI, sin flagelos con exoesqueleto de sílice, y en el VII, grandes colonias con mucilago. Esta clasificación ha sido aplicada, por ejemplo, para modelar la sucesión del fitoplancton en un lago urbano de Montevideo, resultando en un buen ajuste con los datos empíricos (Segura *et al.* 2013), y para estudiar la variación en la estructura estacional del fitoplancton de lagunas costeras (Pacheco *et al.* 2010).

9.7.4. ACLIMATACIÓN PIGMENTARIA

Para evaluar la flexibilidad pigmentaria (cambios reversibles en la composición relativa de los pigmentos) de una cepa uruguaya de la cianobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii*, se estudió la respuesta en los cambios pigmentarios en cultivos, previamente aclimatados, cultivados a siete intensidades diferentes de luz. Se midió la fluorescencia *in vivo* de la ficocianina (FC) y la clorofila *a* (Clo *a*) de cada cultivo. Los resultados indicaron que la proporción FC/Clo *a* difiere –en algunos casos en forma significativa– entre tratamientos lumínicos, siendo mayor en los tratamientos con menor intensidad lumínica (Fig. 9.8). Se puso en evidencia que la estructura pigmentaria de esta cepa es flexible y le permite regular la captación lumínica para optimizar el crecimiento. En el tratamiento de mayor intensidad lumínica, el cociente baja abruptamente por un aumento en la cantidad relativa de clorofila *a* respecto a la ficocianina. Las aclimataciones pigmentarias de esta especie pueden ser una ventaja importante frente a otros organismos menos flexibles (Bonilla *et al.* 2012).

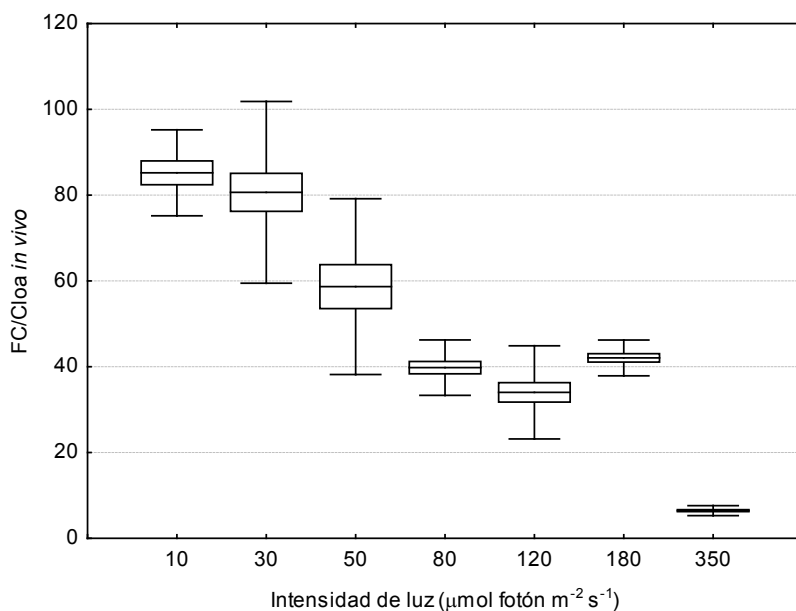


Figura 9.8. Cociente ficocianina/clorofila *a in vivo* de cultivos de una cepa de cianobacteria cultivada a diferentes intensidades lumínicas. Las líneas centrales representan la mediana, la caja los percentiles 75 y 25, y las verticales representan el desvío estándar, $n = 3$ para cada punto (datos de Fabre 2011).

9.7.5. PIGMENTOS Y CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL PICOFITOPLANCTON

En un estudio comparativo del fitoplancton de lagunas costeras del país, se analizaron las fracciones nano y picoplantónica mediante microscopía óptica convencional, microscopía óptica con epifluorescencia, análisis fino de pigmentos lipídicos con HPLC y citometría de flujo (Vidal *et al.* 2007). La concentración de Clo *a* total varió en

promedio para todas las lagunas entre 2.19 y 6.75 $\mu\text{g}/\text{l}$, lo que corresponde a ecosistemas oligotróficos a mesotróficos. La concentración de Clo *a* del picofitoplancton varió entre 0.09 $\mu\text{g}/\text{l}$ (Rocha) y 6.15 $\mu\text{g}/\text{l}$ (Castillos), lo que representó entre el 5% (Rocha) y 97% (Castillos) del total del fitoplancton, evidenciando que esta fracción de pequeño tamaño puede dominar la comunidad. Se encontró una correlación inversa entre el porcentaje de contribución del picofitoplancton y del nanofitoplancton, mientras que no se observó una tendencia negativa entre la contribución relativa del picofitoplancton y la concentración de nutrientes (Vidal *et al.* 2007). Además se demostró, por las señales pigmentarias obtenidas mediante HPLC, que el picofitoplancton era altamente diverso, con predominancia de grupos eucariotas (Fig. 9.9) y de los grupos ataxonómicos obtenidos por citometría de flujo (Vidal *et al.* 2007). Por ejemplo, la presencia de clorofila *b* y luteína indicó la presencia del grupo Chlorophyta; la fucoxantina y la diadinoxantina, la presencia de Bacillariophyceae, Prymnesiophyceae y/o Chrysophyceae; la diadinoxantina es un pigmento importante en Euglenophyceae, Chrysophyceae, Bacillariophyceae, Dinophyceae, Prymnesiophyceae y/o Chrysophyceae, mientras que la zeaxantina es marcador de cianobacterias. Los grupos eucariotas Chrysophyceae, Bacillariophyceae, Dinophyceae, Cryptophyceae Prymnesiophyceae y Chrysophyceae tienen además clorofila *c*₂ y los dos últimos también *c*₃. La composición del picofitoplancton marcó la dominancia de picoeucariotas, llegando a representar más del 65% del biovolumen del picofitoplancton en todas las lagunas (Cryptophyceae y Chlorophyta) en verano y otoño (Vidal 2008; Vidal *et al.* 2007).

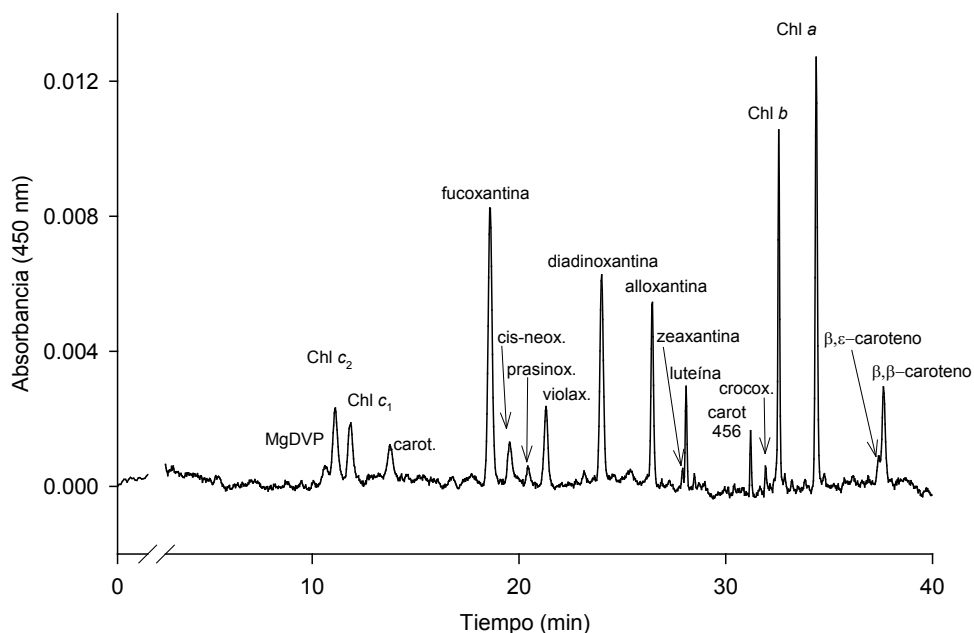


Figura 9.9. Cromatograma de pigmentos lipídicos de una muestra de picofitoplancton ($<3 \mu\text{m}$) de la Laguna de Castillos (mayo de 2005) obtenido por HPLC, detector PDA y método heterocrático (Zapata *et al.* 2000) modificado por Bonilla *et al.* (2005). Se destaca la diversidad de xantofilas y clorofilas que reflejan la alta diversidad de grupos filogenéticos en la muestra. Chl: clorofila; cis-neox.: cis-neoxantina; crocox.: crocoxantina; violax.: violaxantina; prasinox.: prasinoxantina; carot: carotenoide no identificado; carot456: carotenoide no identificado con máxima absorbancia en 456 nm (datos no publicados de S. Bonilla).

9.7.6. PERFILES DE PIGMENTOS *IN VIVO*

En un lago profundo suburbano se realizaron perfiles de temperatura y de pigmentos *in vivo*, ficocianina y clorofila *a*, con una sonda multiparamétrica. Dichos pigmentos evidencian la presencia de todos los organismos del fitoplancton en conjunto (clorofila *a*) y de cianobacterias (ficocianina). La concentración de pigmento se expresa en unidades de fluorescencia relativas (UFR), un indicador cualitativo.

El perfil de temperatura evidencia que el lago se encontraba mezclado hasta los 6 m, con un descenso de temperatura debajo de esa profundidad (Fig. 9.10). Por lo tanto el fitoplancton circularía en la zona superior a la termoclina. Ambos pigmentos indican que la mayor biomasa de fitoplancton se encontraba entre 1 y 6.5 m de profundidad, donde se da el descenso de temperatura. La presencia de cianobacterias es similar a lo largo de la columna de agua, probablemente debido a que el tipo de cianobacterias presentes forma floraciones dispersivas, homogéneamente distribuidas en la columna de agua. Se observó un pico de clorofila *a* a los 2.5 m de profundidad indicando la presencia de organismos fotosintetizadores no pertenecientes al grupo de las cianobacterias, ya que no estuvo acompañado de un pico de ficocianina.

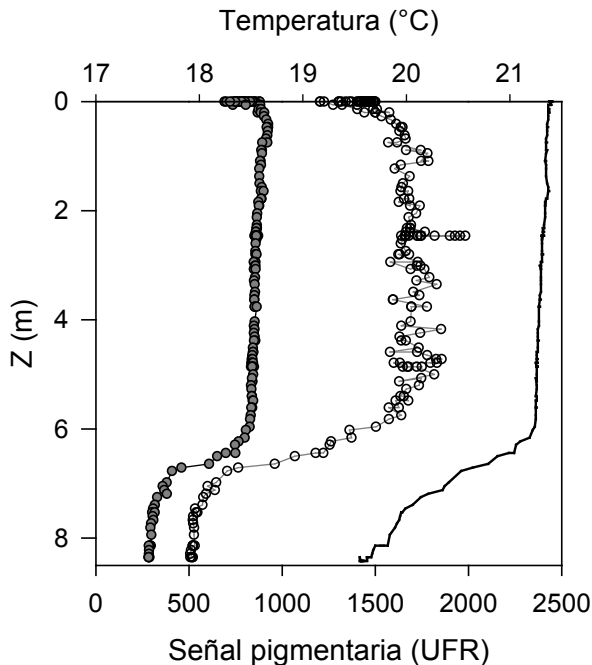


Figura 9.10. Perfil en profundidad de señales pigmentarias *in vivo* (en unidades de fluorescencia relativas, UFR) y de temperatura, obtenidas *in situ* con sonda multiparamétrica en el lago Javier, Canelones (abril de 2014). Círculos blancos: clorofila *a*; círculos grises: ficocianina; línea continua: temperatura (datos no publicados de L. Aubriot).

Este estudio permitió identificar zonas con mayor productividad y descartar la presencia de acumulaciones de cianobacterias profundas, en general imperceptibles desde la superficie. Esta información es de interés, por ejemplo, para establecer la profundidad de las tomas de agua para potabilización.

9.7.7. EFECTOS DEL UV EN EL FITOPLANCTON

Con el objetivo de evaluar el efecto de la radiación UV sobre la actividad fotosintética del fitoplancton, se realizaron experimentos *in situ* en la Laguna de Rocha (Conde 2000; Conde *et al.* 2002). La Laguna de Rocha es muy somera y está influenciada tanto por el aporte de agua dulce desde sus afluentes, como por el aporte de agua marina por la apertura de una barra arenosa. Este régimen afecta la radiación que percibe el fitoplancton, ya que el coeficiente de absorción de la luz (K_d) en la zona salobre es 70% menor (o sea, el agua es más transparente) respecto a la zona de agua más dulce y turbia.

Los experimentos se realizaron en el norte y sur de la laguna, con muestras de agua con fitoplancton acondicionadas en a) tubos de cuarzo, transparentes a la radiación ultravioleta (PAR + UV-A + UV-B), b) dichos tubos cubiertos por lámina Mylar D, que excluye la radiación UV-B con $\lambda < 320$ nm (PAR + UV-A) y c) cubiertos por cloruro de vinilo, que excluye toda la radiación UV (PAR) (Conde 2000). La tasa fotosintética fitoplanctónica se determinó por el método de ^{14}C según Parsons *et al.* (1984). La respuesta del fitoplancton se expresó como la capacidad fotosintética, definida como la tasa fotosintética por hora normalizada por la concentración de clorofila *a* ($\text{mg C mg Clo}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Luego se evaluó el ajuste de los datos a la curva P-I con inhibición de Platt *et al.* (1980).

Los resultados indicaron que la radiación UV afecta negativamente a la producción primaria del ecosistema. En las curvas P-I se observa una zona de saturación y de fotoinhibición del fitoplancton en los tres tratamientos y en ambas zonas de la laguna (Fig. 9.11). A su vez, la suma de bandas (PAR + UV-B + UV-A) tuvo un efecto negativo mayor que una sola banda de UV (PAR + UV-A). Los efectos de la radiación UV fueron mayores en el sur de la laguna, con influencia marina, lo que puede explicarse por las características del agua en cada zona.

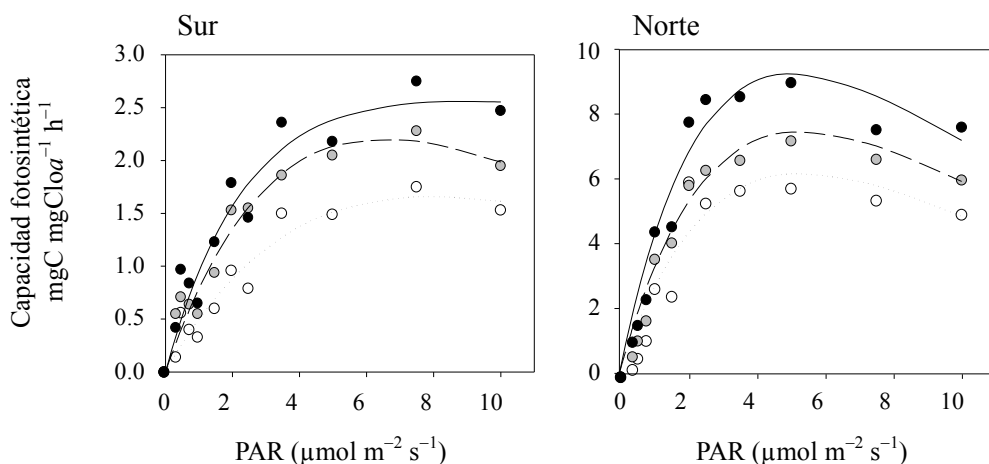


Figura 9.11. Curvas P-I del fitoplancton de la Laguna de Rocha en las zonas sur y norte. Círculos negros y líneas enteras: PAR sin UV; círculos grises y líneas entrecortadas: PAR + UV-A; círculos blancos y líneas punteadas: PAR + UV-A + UV-B (datos de Conde 2000).

ALGAS Y CIANOBACTERIAS DEL PERIFITON

SYLVIA BONILLA Y DANIEL CONDE

SE DENOMINA PERIFITON A LA COMUNIDAD DE ORGANISMOS ADHERIDOS A cualquier sustrato sólido sumergido en un cuerpo de agua. Se trata de una comunidad compleja que incluye bacterias, protistas, pequeños invertebrados, algas y cianobacterias (Wetzel 2001; Azim *et al.* 2005). La terminología para referirse a este tipo de comunidades es utilizada en forma laxa y varía según los autores.

Todo sustrato acuático iluminado permite el desarrollo de productores primarios. Existe una relación inversa entre la profundidad de un ecosistema límnic y el número y diversidad de productores primarios potenciales, debido al aumento de hábitats iluminados (sedimento, rocas, plantas, caparazones de animales, columna de agua) al disminuir la profundidad del ecosistema. El microfítobentos corresponde a la comunidad de productores primarios que vive asociado al sedimento. Muchas veces se incluye también como perifiton, en el sentido más amplio. En los ecosistemas someros el perifiton en general juega un papel clave en el ciclo de nutrientes y la red trófica, contribuyendo en forma significativa a la producción primaria ecosistémica (Vadeboncoeur & Steinman 2002).

Según cómo sea el tipo de sustrato y cómo se asocian los organismos al mismo, se pueden definir distintas comunidades. El epifiton incluye los organismos que viven sobre macrófitas acuáticas (plantas o macroalgas). Este es un sustrato relativamente firme y con una alta actividad metabólica. Pueden existir interacciones biológicas negativas (*e.g.*, aleloquímicos) o positivas (intercambio de nutrientes) entre el sustrato vegetal y el epifiton (Round 1973; Wetzel 1990; Stevenson 1996; Jones *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2012). La microflora que se desarrolla sobre sustratos rocosos (epiliton) es común en ambientes lóticos transparentes como los primeros tramos de las aguas corrientes. El epipsamon es la comunidad de microfítobentos asociada a sedimento arenoso, generalmente dominado por diatomeas pequeñas e inmóviles, adheridas a los granos de arena. En general el organismo es de igual o menor tamaño que la unidad de sedimento (grano de arena). Por su parte, el epipelon está conformado por individuos asociados (pero no adheridos) al sedimento fino, generalmente grandes diatomeas móviles que se desplazan entre el sedimento, y

también cianobacterias. Sobre el sedimento fino bien estructurado o sobre rocas también pueden aparecer gruesas matas microbianas (de hasta varios centímetros de espesor), usualmente dominadas por cianobacterias, denominadas genéricamente microfítobentos o biofilm.

Los grupos algales más comunes en el perifiton son Bacillariophyceae (diatomeas), Chlorophyta y Cyanobacteria. También pueden encontrarse especies de otros grupos algales eucariotas, aunque generalmente con una baja abundancia relativa. En el perifiton se pueden encontrar especies que difieren de tamaño en hasta 5 órdenes de magnitud, desde pequeñas especies unicelulares (ca. 1 μm) a grandes clorofitas de talos ramificados (ca. 10 cm). La arquitectura de estas comunidades varía mucho según el tipo de sustrato y el ambiente en donde se desarrollen (léntico o lóxico, de baja o alta corriente) (Stevenson 1996; Azim *et al.* 2005). Por ejemplo, el epifiton de sistemas lénticos puede estar formado por organismos de gran tamaño (cm), filamentosos y con ramificaciones hacia el final de la sucesión autogénica (Stevenson 1996). Las especies de comunidades sobre sustratos duros pueden crecer en forma postrada o erecta (Wetzel 1983b), lo que determinará su mayor o menor resistencia a los movimientos del agua y al pastoreo por invertebrados.

El microfítobentos puede desarrollar capas que difieren en composición y compactación en profundidad (de milímetros a centímetros). Algunos organismos tienen la posibilidad de migrar dentro de la mata en las capas inferiores (Du *et al.* 2010; Seródio *et al.* 2008); otros presentan pigmentos protectores de la radiación UV en las capas superiores (Bonilla *et al.* 2005, 2009; Stal 2012). Las especies pueden diferir significativamente en su comportamiento y respuesta fotosintética dentro de la comunidad (Underwood *et al.* 2005). La capacidad de aclimatación a cambios lumínicos es crítica para el microfítobentos que debe tolerar muchas veces largas horas de oscuridad total. Las diatomeas son un grupo de organismos particularmente flexible en la capacidad de adecuar sus pigmentos y aparato fotosintético para optimizar la utilización de la luz (Steinman *et al.* 1991; Wilhelm *et al.* 2014).

Los valores de abundancia, biomasa y productividad por unidad de área del perifiton en los sistemas lénticos –y más aún en los lóxicos–, pueden superar en varios órdenes de magnitud a los del fitoplancton, especialmente en ambientes de alta transparencia a la radiación solar (Hargrave *et al.* 1983; Sand-Jensen & Borum 1991; Stevenson 1996). En sedimentos arenosos la luz puede penetrar hasta 3-5 mm de profundidad, donde se puede registrar el 1% de la luz disponible en superficie, mientras que en sedimentos con mayor contenido de limo y arcilla, la luz solamente llegará al primer milímetro (Lassen *et al.* 1992), condicionando entonces la zona colonizable por el microfítobentos.

En el presente capítulo entendemos el perifiton en el sentido más amplio, incluyendo el microfítobentos. Se describen los procedimientos de muestreo del perifiton, así como diversas técnicas para estimar su abundancia, biomasa y producción primaria. La identificación taxonómica se realiza con claves específicas por grupo (ver 9.3.3).

10.1. MUESTREO

Diversas técnicas de muestro pueden ser utilizadas en el estudio de las comunidades asociadas a los sustratos, dependiendo de los objetivos de la investigación, el tipo de sustrato y la densidad de organismos presentes (Schwarzbold 1990). A diferencia del fitoplancton, para el cual es posible asumir una distribución homogénea de los organismos, estas comunidades tienen distribución agregada, por lo que el número mínimo de muestras requerido debe ser cuidadosamente considerado en cada caso en base a estudios piloto. Por ejemplo, para el epifiton en general se utili-

za un tamaño de muestra de entre 3 y 10 réplicas de 5 a 15 cm² de área (Aloi 1990). Morin & Cattaneo (1992) realizan una revisión sobre el tamaño de muestra apropiado. El esfuerzo de muestreo, número de réplicas y tamaño de la muestra se pueden calcular en forma sencilla a partir del desvío estándar de los datos obtenidos del muestreo piloto (Biggs & Kilroy 2000; Zar 2009; ver 1.6.1). También es necesario definir los atributos a muestrear que pueden ser estructurales (biomasa, riqueza) o funcionales (fotosíntesis, tasa de asimilación de nutrientes, crecimiento). En general, el análisis cualitativo y cuantitativo de las muestras está basado en modificaciones de técnicas utilizadas para el estudio del fitoplancton.

En particular, para el estudio del epifiton y epilíton 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 de los organismos o estandarizar la comparación entre distintos hábitats. Son mayormente utilizados en estudios de sucesión y evaluación de respuestas frente a condiciones experimentales (e.g., presencia de un herbicida; Bonilla *et al.* 1998).

Los sustratos artificiales pueden ser de superficie rugosa (acrílico, cerámica, ladrillo, roca) o lisa (vidrio). El vidrio 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 puede ser horizontal o vertical, siendo esta última más recomendable ya que evita la sedimentación del material detrítico sobre el sustrato artificial 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 Schwarzbald *et al.* (2013).

La obtención de las muestras difiere según se trate de comunidades adheridas a sustratos rígidos (como son el epifiton y el epilíton) y el que debe ser diseñado para las comunidades asociadas o embebidas en el sedimento (epipsamón y epipelón).

La obtención del epifiton y epilíton se realiza en dos etapas: 1) muestreo del sustrato con la comunidad a estudiar y 2) extracción de éste en el laboratorio o en terreno. El muestreo del epifiton 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). El procedimiento es el mismo en el caso del epilíton, seleccionando rocas con el material adherido que se acondicionan del mismo modo que el epifiton.

Procedimiento para muestreo de epifiton o epilíton

- 1) Colocar agua del lugar en un tubo plástico (puede ser un tubo de centrifuga de 50 ml con tapa de rosca). Si el fitoplancton es muy abundante, filtrar el agua a través de un copo de 10 o 20 µm de tamaño de poro.
- 2) Colocar inmediatamente en dicho tubo la piedra con epilíton o la parte de la planta con epifiton cortada con trincheta o tijera.
- 3) Tapar y acondicionar a 4 °C y en oscuridad hasta su procesamiento en el laboratorio, donde se debe realizar la extracción de la comunidad lo antes posible.

En el laboratorio se sugiere guardar la muestra con agua del lugar filtrada por filtros de fibra de vidrio tipo GF/C para eliminar el fitoplancton. Si la muestra se destina al análisis de pigmentos, se recomienda que sea procesada inmediatamente. Si esto no es posible, se debe congelar inmediatamente a -20 °C. De todas formas, la muestra para pigmentos se debe procesar lo antes posible (días a semanas) o congelar a -80 °C si se debe esperar más tiempo (meses).

Procedimiento para muestreo de microfitorbentos

El muestreo de las comunidades asociadas al sedimento (microfitorbentos) debe minimizar los disturbios del mismo debido a que los parámetros que explican la dinámica de estas comunidades varían espacialmente en términos de micras. Se recomienda el uso de tubos cilíndricos de acrílico (*corers*) más que las dragas, las que alteran el perfil del sedimento.

- 1) Obtener en forma manual o con muestreador tipo Kajak, 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. 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 como en el caso anterior.
- 3) Lo antes posible, y en condiciones de baja luminosidad, eliminar el agua sobrenadante sifoneando con un tubo de goma fino, evitando remover la superficie del sedimento. Retirar la última capa del agua sobrenadante con una pipeta.
- 4) Retirar el tapón inferior y con un pistón empujar desde abajo la columna de sedimento hasta que la superficie del mismo asome 0.5 a 1 cm por encima del borde superior. Retirar la capa superior expuesta con la ayuda de una espátula u hoja de trincheta. De ser necesario un estudio del perfil vertical, repetir el procedimiento cada 0.5 o 1 cm, hasta la profundidad deseada.

10.2. EXTRACCIÓN Y PRESERVACIÓN

En ocasiones es necesario observar las comunidades intactas sobre el sustrato en lupa binocular o microscopio a bajo aumento, especialmente aquellas adheridas sobre sustratos rígidos que desarrollan arquitecturas complejas. El tipo de arquitectura será un indicador de las condiciones hidrológicas del lugar. Es posible entonces identificar desde comunidades adheridas contra el sustrato, a otras con organismos de gran porte y muy ramificados que se pueden desprender fácilmente. También es posible utilizar microscopía electrónica de barrido para observar la arquitectura fina de la comunidad.

La metodología de extracción depende de la resistencia mecánica del sustrato, y en general ninguna técnica es totalmente satisfactoria (Delbecque 1985; Aloí 1990; Rieder 1993). Existen métodos mecánicos como el raspado con pinceles o espátulas de borde romo. Este método, uno de los más utilizados (Schwarzbold *et al.* 2013), es apropiado para obtener epifiton de sustratos firmes y superficie lisa, como *Schoenoplectus*, *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) (33:22:12:34 volúmenes de alcohol 95%, formol comercial, ácido acético glacial y agua destilada, respectivamente). 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: para el análisis de diatomeas la planta puede ser oxidada por completo, obteniendo los frústulos limpios para hacer preparados permanentes (ver Cap. 9).
- 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 3% 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. Se debe tener en cuenta que el formol es una sustancia altamente tóxica y cancerígena, por lo que su manipulación debe ser hecha en campana de gases utilizando guantes.

10.3. IDENTIFICACIÓN Y CONTEO

Para el epifiton y epiliton se deben utilizar métodos de identificación y cuantificación apropiados para cada clase de tamaño, ya que pueden existir grandes diferencias como se mencionó anteriormente. 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, dependiendo del objetivo del estudio.

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. 9). Sin embargo, la identificación específica de algunas algas verdes filamentosas se basa en estructuras de reproducción sexual, no siempre presentes. Las diatomeas se identifican por la estructura y ultraestructura 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 (pedúnculos o tubos mucilaginosos).

La cuantificación de la muestra se realiza partiendo del material algal fijado en un volumen conocido de agua, mediante el método de Utermöhl desarrollado para fitoplancton (Cap. 9), que por ser un método de concentración es útil cuando la abundancia es muy baja. Es posible utilizar cámaras de 1 ml (tipo Kolkwitz) cuando la abundancia es alta. En todos los casos es necesaria 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 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 (mm^2), V el volumen de muestra (ml), AC el área del campo aleatorio (mm^2), na el número de campos contados, v el volumen de la cámara (ml) y A el área del sustrato muestreada (cm^2).

La mayoría de los métodos para la estimación de la abundancia del microfitorbentos son modificaciones de técnicas originalmente desarrolladas para algas planctónicas o para diatomeas fósiles (ver Caps. 9 y 15). 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).

10.4. BIOMASA

10.4.1. BIOVOLUMEN

Uno de los indicadores de biomasa más utilizados es el biovolumen (ver 9.4.2). Se debe medir el largo y ancho de 10-30 individuos (célula, colonia o filamento) por especie, y con el promedio se calcula el volumen de una forma geométrica aproxi-

mada y sencilla (Steinman *et al.* 1992) como se hace para el fitoplancton (Rott 1981; Hillebrand *et al.* 1999), o con algunas modificaciones (Konoplya & Soares 2011). En el caso de algas de mayor porte (algunos centímetros de altura) se puede utilizar el cálculo de biovolumen directamente por medio del desplazamiento de un volumen de agua en una probeta graduada.

10.4.2. 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. Todos los métodos de extracción, determinación y cuantificación de pigmentos se deben realizar con luz tenue, ya que los pigmentos extraídos son muy sensibles a la fotodegradación. Partiendo de la metodología descrita en el capítulo 9 que utiliza etanol caliente como solvente, la fórmula de cálculo es modificada, siendo la concentración de clorofila *a* (Clo *a*) expresada en $\mu\text{g cm}^{-2}$:

$$\text{Clo } a = 29.6(A_{665} - A_{750}) - (Aa_{665} - Aa_{750}) v1000L/A$$

donde 29.6 es el factor basado en el coeficiente de absorción específico de la clorofila *a* en etanol (en $1 \mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$) (Cap. 9), 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), *L* el trayecto óptico de la cubeta (cm) y *A* el área de la muestra (cm^2).

En el caso de las comunidades de microfítobentos, ricas en diatomeas, se utiliza comúnmente una técnica clásica que usa acetona como solvente. El siguiente es el método de extracción original con acetona 90% descrito por Lorenzen (1967) para plancton, con leves modificaciones para muestras de sedimentos.

Procedimiento

- 1) Colectar entre 3 y 5 réplicas de sedimento según el tipo de estudio y muestreos previos.
- 2) Homogeneizar el sustrato colectado (*i.e.*, primer medio centímetro de sedimento superficial). Pesar 3 submuestras de *ca.* 1 g de sedimento fresco con precisión de décimas de mg. Colocar la muestra en tubos de centrifuga de plástico de 15 ml con tapa de rosca.
- 3) La muestra se puede procesar fresca, con lo que se obtendrá la concentración de clorofila por gramo de peso fresco. Sin embargo, la cantidad de agua puede variar en forma significativa entre muestras según el tipo de sedimento, por lo que se recomienda liofilizar las muestras antes de comenzar la extracción. Para ello se pesan los tubos con la muestra fresca antes de liofilizar y luego de la liofilización, y se determina el peso seco. La clorofila se expresará por unidad de peso seco.
- 4) Debido a que los pigmentos se pueden degradar rápidamente, se debe agregar lo antes posible 10 ml de acetona 90% a la muestra con el sedimento fresco o liofilizado y mezclar en vórtex. A partir de este momento se debe proteger la muestra de la luz.
- 5) Sonicar la muestra en tres ciclos de 10 segundos, con una pausa de 10 segundos entre cada ciclo a una potencia intermedia, colocando la muestra en un baño de hielo y agua durante el procedimiento, protegido de la luz directa.
- 6) Extraer durante 12 h en oscuridad en refrigerador (4 °C).
- 7) Para clarificar el extracto, centrifugar a 3000 rpm durante 5 min y luego filtrar el sobrenadante por filtro GF/C.
- 8) Leer la absorbancia del filtrado a 664 y 750 nm en cubeta de 1 cm, contra un blanco de acetona 90%. Acidificar con *ca.* 100 μl de HCl 0.12 N, esperar 3 minu-

tos hasta que se establezca la lectura y medir nuevamente ambas absorbancias. Calcular el cociente ácido (ver Cap. 9).

- 9) Calcular la concentración de clorofila *a* (Clo *a*) en $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco o seco, usando la ecuación de Lorenzen (1967) modificada para muestras de sedimento:

$$\text{Clo } a = K \times (A_{665} - A_{750}) - (A_{a665} - A_{a750}) \times 2.43 \times v / (L \times P)$$

donde K es el coeficiente derivado del coeficiente de extinción específico de la clorofila *a* en acetona 90% ($K = 1/91.1 \times 1000 = 11 \mu\text{g cm ml}^{-1}$), A_{665} y A_{a665} son las absorbancias antes y después de acidificar y A_{750} y A_{a750} son las absorbancias de la turbidez antes y luego de la acidificación, *v* el volumen de acetona usado en la extracción (ml), *L* el trayecto óptico (cm) y *P* el peso (g) de sedimento fresco o liofilizado utilizado en la extracción. Algunos autores proponen ligeras diferencias en el factor K, según la determinación del coeficiente de extinción específico (e.g., para acetona 90% a longitud de onda 664 nm, el coeficiente específico = $87.67 \text{ l gm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Jeffrey & Humphrey 1975).

También es posible calcular la concentración de la Clo *a* total (en $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco o seco) sin corrección por acidificación, mediante la siguiente fórmula que usa otro factor (11.93):

$$\text{Clo } a = 11.93 \times (A_{665} - A_{750}) \times v / (L \times P)$$

10.4.3. CLOROFILA *a* MEDIANTE OTROS MÉTODOS

La cromatografía de alta performance (HPLC) es una técnica que permite identificar, cuantificar, separar y purificar los pigmentos lipídicos en un solvente orgánico. Esta técnica es precisa y permite identificar clorofilas, carotenoides y scitonemina, y los pigmentos de degradación en cada caso (Jeffrey *et al.* 1997). Los equipos de HPLC configurados para la detección de pigmentos tienen generalmente dos detectores: un arreglo de diodos y un fluorómetro que permite elegir las longitudes de onda de excitación y emisión. El arreglo de diodos permite convertir la luz (rango visible a UV) en una señal eléctrica medible. Mediante difracción de la luz, se obtiene la absorbancia en un rango de longitudes de onda simultáneamente. Además, permite realizar un espectro de absorción con alta frecuencia temporal (i.e., cada 1 segundo).

Los métodos utilizados para pigmentos algales son de fase reversa (fase estacionaria apolar y fase móvil polar), utilizan columnas C18 o C8 y combinación de eluentes que se dispensan en forma heterocrática (Jeffrey *et al.* 1997; Zapata *et al.* 2000). Las señales pigmentarias se pueden utilizar para estudiar la composición de los principales grupos filogenéticos y respuestas fisiológicas a, por ejemplo, la radiación UV, la desecación o el estrés nutricional (Bonilla *et al.* 2005, 2009). También es posible calcular la contribución de cada grupo algal a la clorofila *a* de toda la comunidad, asumiendo cocientes pigmentarios (pigmento X/clo *a*) indicadores de los principales grupos algales (i.e., zeaxantina para cianobacterias, luteína para clorofitas, clorofila *c3* y fucoxantina para diatomeas, etc.), aproximación conocida como quimiotaxonomía (Sherrard *et al.* 2006; Laviale & Neveux 2011; Thomas *et al.* 2013). Sin embargo, algunos autores advierten que muchas veces, debido a la fotoaclimatación de los organismos, los cocientes pigmentarios varían y no se obtienen buenos resultados utilizando los pigmentos como indicadores de los grandes grupos algales en comparación con la información obtenida en el microscopio (conteo y biovolumen) (Havens *et al.* 1999).

Los métodos fluorométricos se basan en la propiedad de emisión de luz (a una longitud de onda de baja energía) de la clorofila *a* cuando es excitada a determinada longitud de onda (luz de excitación) (Jeffrey *et al.* 1997). Los métodos fluorométricos son más sensibles ($<0.1 \mu\text{g l}^{-1}$) que los espectrofotométricos. Es posible utilizar fluorescencia para medir la clorofila *a* en un extracto (*in vitro*) o en las células vivas (*in vivo*). A diferencia de los métodos espectrofotométricos, la respuesta de fluorescencia es relativa a la configuración óptica del equipo, por lo que es necesario realizar calibraciones con soluciones estándar de clorofila *a* (en fluorescencia *in vitro*) o con cultivos de concentración de clorofila conocida (en fluorescencia *in vivo*). También es posible realizar la corrección por feopigmentos, calculando el cociente ácido máximo (Fm) (Jeffrey *et al.* 1997). Al igual que los métodos espectrofotométricos clásicos, los fluorométricos (Holm-Hansen *et al.* 1965; Lorenzen 1966; Nusch 1980) sobrestiman la concentración de clorofila *a*, aunque ofrecen rapidez, sensibilidad y facilidad para ser realizados *in situ*.

El uso de estimaciones de pigmentos *in vivo* ha ganado atención en los últimos años en el monitoreo de comunidades adheridas (Maggi *et al.* 2013). Existen dos grandes tipos de aproximaciones basadas en la fluorescencia: los fluorómetros que miden cantidad relativa de pigmentos y los que permiten estudiar la cinética de la fotosíntesis (Jeffrey *et al.* 1997; González Moreno *et al.* 2008). En el primer grupo, los fluorómetros de medición de pigmentos *in vivo* pueden ser desde muy simples, estimando solamente clorofila *a*, hasta otros muy sofisticados que diferencian varios grupos algales basados en pigmentos indicadores de grupos filogenéticos. Estos fluorómetros indican la suma de pigmentos activos existentes en unidades de fluorescencia relativa. En todos los casos, las señales de fluorescencia no tienen unidades y deben ser calibradas contra cultivos de concentraciones conocidas si se quiere inferir una concentración. Las estimaciones cuantitativas basadas en fluorescencia no son tan precisas como las obtenidas por mediciones en técnicas de espectrofotometría o HPLC.

10.4.4. PESO SECO Y PESO SECO LIBRE DE CENIZAS

El total de la biomasa perifítica se puede determinar por peso seco simplemente pesando la muestra de perifiton sin sustrato (o sobre sustrato artificial de peso conocido) y secando dicha muestra en estufa (ver a continuación). Por otro lado, el peso seco libre de cenizas es ampliamente utilizado en estudios de perifiton como indicador de la materia orgánica de la muestra. Esta aproximación no es recomendada con valores muy bajos de $\text{Clo } a$ ($<2 \text{ g m}^{-2}$) ya que no es sensible y puede dar resultados erróneos (Schwarzbold *et al.* 2013). La diferencia entre el peso seco (peso inicial) y el peso seco luego de la combustión en mufla, es el peso seco libre de cenizas.

Procedimiento (PSLC, mg m^{-2}) (APHA1995)

- 1) Pesar a 0.1 mg de resolución el sedimento de un área conocida (m^2) en un crisol de cerámica.
- 2) Secar en estufa a $105 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h, dejar enfriar y volver a pesar. Se obtiene en esta etapa el peso seco. Ver recomendaciones para usar temperaturas menores y mayores tiempos de secado en Schwarzbold *et al.* 2013.
- 3) Quemar en mufla a $500 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 h, dejar enfriar y agregar agua para rehidratar arcillas y otros minerales. Volver a secar a $105 \text{ }^\circ\text{C}$, dejar enfriar y volver a pesar. Se obtendrá el peso de la materia orgánica libre de cenizas. El paso final de rehidratación es importante porque los minerales y arcillas pierden agua a $500 \text{ }^\circ\text{C}$. Muchos autores recomiendan quemar el material a $400 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 4 h (Schwarzbold *et al.* 2013).

Luego se puede calcular el índice autotrófico (IA) que es un indicador de la naturaleza trófica de la comunidad. El IA se calcula como la relación:

$$IA = PSLC/Clo a$$

expresando ambas variables en las mismas unidades. Cuando este índice es mayor a 50 y menor a 200 indica comunidades principalmente autotróficas, y cuando es mayor a 200, comunidades principalmente heterotróficas (Schwarzbold *et al.* 2013).

10.5. PRODUCCIÓN PRIMARIA

La estimación de la producción primaria de las comunidades adheridas se realiza en experimentos de corto plazo *in vitro*, con mayor o menor alteración de la comunidad original, como se ha descrito para el fitoplancton (ver 9.5.2). Los experimentos se pueden diseñar con muestras extraídas del sustrato, en donde se altera la estructura natural de la comunidad algal, o se puede utilizar el sustrato con la comunidad intacta, para lo cual pueden utilizarse sustratos artificiales. En general se recomienda realizar un mínimo de cinco réplicas.

10.5.1. MÉTODO DEL ^{14}C

Una de las técnicas clásicas para evaluar la producción primaria del epifiton es la incorporación de ^{14}C (Kairesalo 1983; Aloí 1990). Idealmente se trabaja con epifiton adherido a un sustrato artificial (*e.g.*, vidrio, cerámicas) que no van a interferir en la determinación de la fotosíntesis algal. Si bien es una técnica extremadamente sensible que permite una cuantificación absoluta, tiene la desventaja de utilizar sustancias muy peligrosas como son los compuestos radioactivos.

Precauciones para el trabajo con radioactividad

Antes de comenzar a trabajar con radioactividad es necesario tomar un curso de seguridad para el trabajo en el laboratorio con sustancias radioactivas. Se debe acondicionar adecuadamente el área de trabajo con antelación, etiquetar adecuadamente y en forma visible el material radioactivo de campo y en stock, 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 se debe utilizar guantes descartables 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 burbujeando aire durante 12 h en campana de gases. 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.

Solución de ^{14}C

Preparar una solución de campo conteniendo de 2 a 4 μCi en 500 μl , a partir de un producto comercial concentrado de 2 mCi ml^{-1} , usando AD estéril con pH ajustado entre 8 y 9 usando una solución de NaOH diluido. Se recomienda utilizar frascos previamente esterilizados y conservar todas las soluciones de ^{14}C en oscuridad y congeladas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso.

Procedimiento

- 1) Colocar agua filtrada del lugar y el sustrato artificial con epifiton en botellas de borosilicato de 60 ml.

- 2) Inocular de 2 a 4 μCi , dependiendo de la concentración de la biomasa algal.
- 3) Disponer *in situ* las botellas en soportes 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 al utilizado para fitoplancton (ca. 2 h).
- 4) Fijar con 500 μl de formalina para finalizar el experimento.
- 5) Extraer cuidadosamente el epifiton asociado mediante raspado mecánico en campana de gases.
- 6) Controlar que no se haya desprendido parte del epifiton durante la incubación, el que puede colectarse por filtración.
- 7) Colocar el material obtenido en un vial de centelleo y procesar como se ha descrito para el fitoplancton (ver 9.6.2, puntos 6 a 8).
- 8) La producción primaria (P) del epifiton, estimada en $\text{mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ será:

$$P = {}^{14}\text{C}_i \text{ CT } 1.064 / ({}^{14}\text{C}_a \text{ tA})$$

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 (mg l^{-1}), t el tiempo (h) y A el área del sustrato (m^2) incubado. Los resultados se deben expresar por unidad de biomasa o de clorofila *a*.

La técnica de ${}^{14}\text{C}$ es también utilizada para determinar la producción primaria en el microfitobentos, por lo que la técnica tiene algunas modificaciones. Se debe tener en cuenta que la muestra presenta un decrecimiento exponencial negativo en su biomasa y actividad en los primeros milímetros del sedimento, debido a la disminución rápida de la radiación fotosintéticamente activa en profundidad del sedimento. Existen dos aproximaciones básicas. Es posible sacar un *minicorer* en el cual se agrega la solución radioactiva y se incuba *in situ* como se detalla en Jönsson (1991).

Otra opción más simple, pero que implica disgregar la comunidad, es utilizar una muestra de peso conocido de un *corer* (e.g., el primer mm) y dispersarla en un volumen conocido de agua filtrada, para luego incubarla en viales de vidrio en un fotosintetrón como en el caso del fitoplancton. La ventaja de esta aproximación es la sencillez y la mayor homogeneidad en la respuesta a obtener. Por otro lado, se disgregan las comunidades, por lo que no se mantienen necesariamente las condiciones naturales. Para ambas comunidades se pueden construir las curvas P-I como fue detallado para el fitoplancton.

10.5.2. OTROS MÉTODOS

Existen métodos no invasivos y prácticamente instantáneos que utilizan la fluorescencia del fotosistema II o la producción o consumo de oxígeno como base para medir la actividad fotosintética y derivar la producción primaria (Campbell *et al.* 1998; Roháček & Barták 1999). Estos métodos son muy atractivos por su rapidez, bajo costo de insumos, no alteración de la comunidad a analizar y seguridad para el investigador. Los equipos disponibles en el mercado son generalmente de altos costos y se necesita conocer muy bien el tipo de organismo a estudiar para obtener resultados confiables.

Existen fluorómetros que permiten medir la cinética de la fluorescencia en el tiempo y por lo tanto estudiar el estado fisiológico de la comunidad o población (González Moreno *et al.* 2008). Los fluorómetros pueden emitir pulsos de luz regulables para determinar el estado de actividad del fotosistema II (PSII), discriminado entre la proporción que está siendo utilizada y la que está siendo disipada. Entonces es posible determinar la eficiencia fotoquímica. Esto permitiría, por ejemplo, estudiar el impacto de un herbicida en la fotosíntesis de comunidades de microalgas

adheridas (Schmitt-Jansen & Altenburger 2007) o las respuestas frente a cambios de concentración de nutrientes (Whorley & Francoeur 2013). Existen dos técnicas básicas: la fluorescencia polifásica o de excitación continua y la fluorescencia de pulsos modulados (PAM, *Pulse Amplitude Modulated*) (González Moreno *et al.* 2008). Este tipo de aproximación tiene la ventaja de que se utiliza sobre muestras sin procesar (intactas) y es altamente sensible y rápido, pudiendo procesar un gran número de muestras en pocos minutos. Sin embargo, es importante la calibración previa y el conocimiento de la comunidad para obtener los mejores resultados.

10.6. RESULTADOS

En nuestro país numerosos ecosistemas acuáticos son propicios para el desarrollo del perifiton y el microfitobentos. En su extensa red hidrográfica, los ecosistemas lóticos de bajo orden (pequeños arroyos, cañadas y ríos someros) son hábitats colonizados por estas comunidades de algas y cianobacterias adheridas. Otro tipo de ecosistema a destacar son las lagunas costeras, en donde la luz penetra generalmente hasta el sedimento y que muchas veces cuenta con una zona de bañados también apta para el epifiton. Se darán ejemplos para ecosistemas lóticos y lagunas costeras del país.

10.6.1. ARROYOS DE LA CUENCA DEL SANTA LUCÍA

En marzo de 2007 se realizó una comparación del microfitobentos superficial en 25 arroyos de la cuenca del Santa Lucía (Arocena *et al.* 2008) con sedimento fino arcilloso, determinándose la concentración de clorofila *a* en éste. Los arroyos se clasificaron según estuvieran en cuencas muy impactadas o no muy impactadas por las diversas actividades antrópicas de la región. Se encontró una concentración de Clo *a* significativamente más alta (Kruskall-Wallis, H: 5.34, $p < 0.05$) en aquellos arroyos de zonas muy impactadas que en la de zonas no muy impactadas (Fig. 10.1), probablemente debido a un aumento del estado trófico del agua, lo que promovió el mayor crecimiento del microfitobentos.

Por el contrario, un estudio de la composición de diatomeas del microfitobentos de estos arroyos permitió identificar mayor número de taxa (géneros y especies) en las zonas no impactadas respecto de las impactadas (140 y 125, respectivamente). Dentro de las especies de diatomeas más frecuentes se destacaron: *Nitzschia agnita*, *N. palea*, *N. amphibia*, *N. nana*, *Navicula riediana*, *Rhicosphaenia abbreviata*, *Rhopalodia gibba*, *Amphipleura lindheimeri* y *Sellaphora densistriata*.

Un estudio en el arroyo Chal Chal (Florida), permitió demostrar mediante una aproximación experimental, la relevancia de la intensidad de luz como factor regulador de la concentración de la Clo *a* perifítica acumulada, encontrándose el doble de concentración de Clo *a* ($\sim 0.4 \mu\text{g cm}^{-2}$) en los tratamientos de alta irradiancia lumínica (Corrales 2013). Por lo tanto, se esperaría que modificaciones en la cuenca que afecten directa o indirectamente la luz en los ecosistemas lóticos, impacten sobre el perifiton (Corrales 2013).

10.6.2. PERIFITON EN LAGOS SUBTROPICALES: FACTORES ESTRUCTURALES

Las plantas flotantes y sumergidas pueden jugar un papel clave en la estructuración de las comunidades perifíticas y la fauna asociada. Un estudio experimental que comparó comunidades asociadas a macrófitas flotantes y sumergidas (sustratos artificiales) entre lagos subtropicales (Uruguay) y templados (Dinamarca), permitió identificar grandes diferencias estructurales y de funcionamiento entre las dos regio-

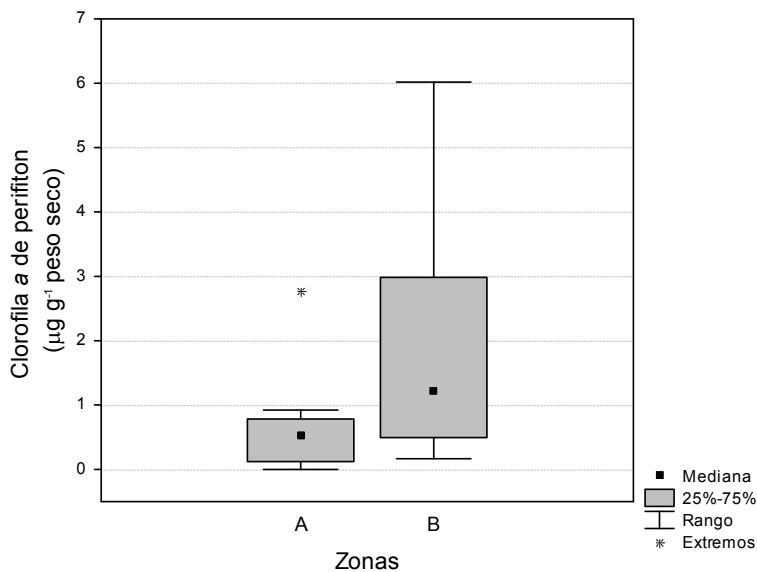


Figura 10.1. Microfitobentos (perifiton) estimado como la concentración de Clorofila *a* en dos series de arroyos de la cuenca del río Santa Lucía en marzo de 2007 (Arocena *et al.* 2008). A: zonas no muy impactadas (11 arroyos); B: zonas muy impactadas (10 arroyos). Se indica la mediana, percentiles (25 y 75%), rango mínimo y máximo y valores extremos.

nes climáticas (Meerhoff *et al.* 2007). El perifiton de los lagos uruguayos fue cerca de 4 veces más bajo, en términos de Clorofila *a*, que el encontrado en los lagos daneses (Tabla 10.1). Por el contrario, la abundancia de peces fue un orden de magnitud mayor en los lagos uruguayos. Los autores hipotetizan que el efecto combinado de la depredación y de factores físicos podrían explicar estas diferencias en el perifiton, remarcando el débil control descendente en ecosistemas subtropicales donde dominan los peces omnívoros (Meerhoff *et al.* 2007).

Tabla 10.1. Distribución de perifiton y otras comunidades asociadas a plantas artificiales en un experimento, comparando 5 lagos de una región templada y 5 lagos de una región subtropical (datos tomados de la Tabla 1 de Meerhoff *et al.* 2007).

	Región templada (Dinamarca)	Región subtropical (Uruguay)
Perifiton, Clo <i>a</i> (mg m ⁻² , cobertura de macrófitas)	132 (112-156)	33 (27-40)
Peces (ind. m ⁻²)	6 (5-8)	67 (53-82)
Macroinvertebrados (ind. m ⁻² , ×100)	189 (169-212)	23 (20-26)
Cladóceros (ind. l ⁻¹)	67 (60-76)	12 (11-14)

10.6.3. COMPOSICIÓN DEL EPIFITON DE UNA LAGUNA COSTERA

En la zona litoral de las lagunas costeras del sureste de Uruguay, existen macrófitas emergentes que actúan como sustrato para el desarrollo del epifiton. En

la Laguna de Rocha esta comunidad está restringida a la zona norte, área de menor influencia oceánica. Dentro de las especies epifíticas más comunes presentes en el junco *Schoenoplectus californicus* en la Laguna de Rocha se encuentran: *Enteromorpha flexuosa* y *Spirogyra* sp. (algas verdes), y *Tabularia fasciculata*, *T. affinis*, *Gomphonema* spp., *Mastogloia* spp., *Navicula perminuta* y *Nitzschia palea* (diatomeas) (Bonilla 1997; Bonilla et al. 2006).

10.6.4. BIOMASA DEL FITOBENTOS EN LAGUNAS COSTERAS

En la cuenca atlántica de nuestro país existe una cadena de lagunas costeras (Diario, José Ignacio, Garzón, Rocha y Castillos) en un gradiente de oeste a este de aumento de tamaño y disminución del impacto antrópico directo. En un estudio comparativo de los 5 ecosistemas (Fig. 10.2) fue posible establecer un gradiente inverso entre la concentración de microfítobentos y la de fitoplancton (Rodríguez-Gallego 2010).

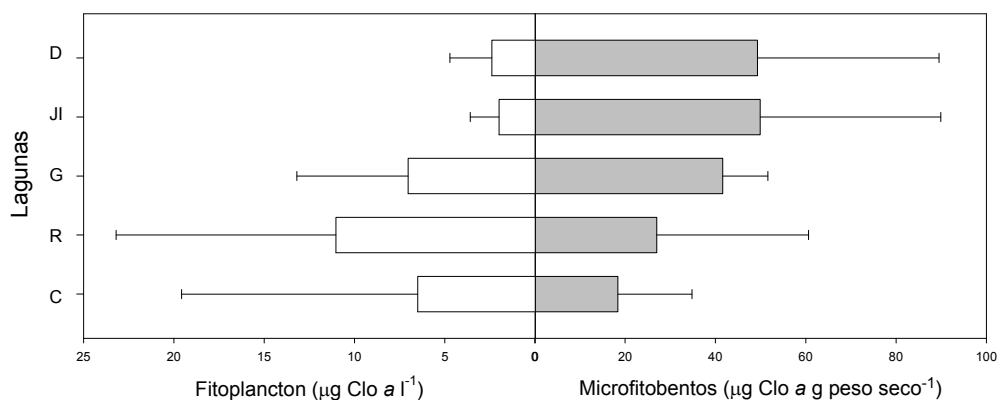


Figura 10.2. Concentración de Clorofila *a* como indicador del fitoplancton (izq.) y del microfítobentos (der.) en 5 lagunas costeras de Uruguay. Las lagunas están ordenadas de arriba a abajo según su ubicación geográfica de oeste a este: Diario (D), José Ignacio (JI), Garzón (G), Rocha (R) y Castillos (C). Nótese las diferencias en las unidades de ambas comunidades. Los datos son promedios (barras) y desvíos estándar (líneas) de varios años, recopilados de Bonilla et al. (2006), Vidal et al. (2007) y Rodríguez-Gallego (2010).

En estos cuerpos de agua someros ($Z_{med} = 0.4$ a 1.3 m) se desarrollan importantes comunidades de perifiton y microfítobentos. En general, la máxima biomasa autotrófica alcanzada por comunidades microbianas corresponde al microfítobentos, característica de ambientes acuáticos someros donde la luz no es un factor limitante. En la Laguna de Rocha se pudo observar diferencias significativas en el microfítobentos entre la zona sur de influencia marina y mayor transparencia de la columna de agua, y la zona norte de influencia límnic y mayor turbidez. Entre agosto de 1996 y setiembre de 1997, la biomasa de las microalgas bentónicas varió entre 2.7 y 162.7 mg m^{-2} (Conde et al. 1999). La máxima biomasa se registró en la estación norte (Fig. 10.3), 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 ($p < 0.05$).

Diferencias significativas en el sedimento de ambas zonas de estudio (arena lamosa 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.

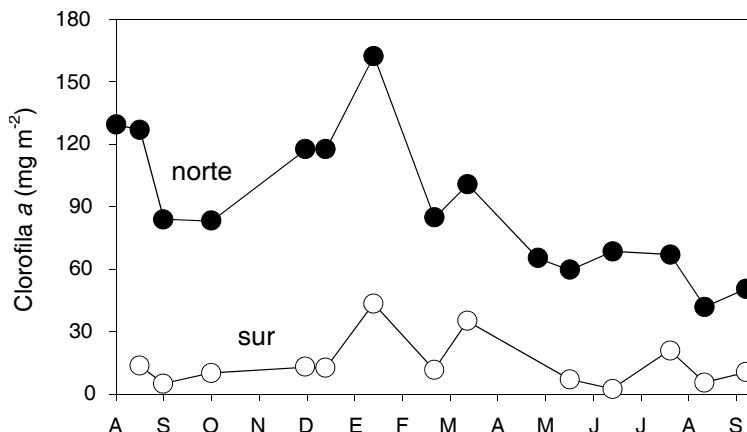


Figura 10.3. Variación anual de la biomasa del microfitobentos en las estaciones norte y sur de la Laguna de Rocha en 1996-1997 (tomado de Conde *et al.* 1999).

10.6.5. EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA DE TRES PRODUCTORES PRIMARIOS EN LA LAGUNA COSTERA DE ROCHA

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 10.2). En el caso del microfitobentos, la comunidad de la zona sur presentó los mayores valores de eficiencia (0.145 y 0.527 mg C m⁻² E⁻¹ 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 autosombra que se produce en comunidades adheridas que presentan una alta biomasa.

Tabla 10.2. 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 (datos no publicados de D. Conde *et al.*).

Estación	Comunidad	Promedio (mg C m ⁻² E ⁻¹ h ⁻¹)	Rango (mg C m ⁻² E ⁻¹ h ⁻¹)	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

En un estudio posterior realizado en la primavera de 2008, mediante curvas PI realizadas en un fotosintetrón (método ^{14}C) con el primer mm de sedimento, fue posible determinar que la zona sur es más productiva que la norte y que se satura a menores intensidades lumínicas (Tabla 10.3; López 2011).

Tabla 10.3. Parámetros del modelo de Jassby & Platt (1976) con el que se ajustaron los datos de las curvas PI obtenidas para el microfitobentos en la zona norte y sur de la Laguna de Rocha (datos de octubre de 2008; López 2011). $P_{\text{max}}^{\text{B}}$: tasa fotosintética máxima; α : pendiente; I_k : intensidad de luz de subsaturación. Promedios de dos experimentos (cada uno con 3 réplicas).

	Norte	Sur
$P_{\text{max}}^{\text{B}}$ (mg C mg Clo $\text{a}^{-1} \text{h}^{-1}$)	1.19	6.8
α (mg C mg Clo a^{-1}) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) $^{-1} \text{h}^{-1}$	0.035	0.301
I_k ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	40	27

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 2001). En algunas cuencas con bajas pendientes, la línea de costa es difusa y su extensión puede variar desde unos pocos metros a cientos de kilómetros. Estas áreas inundables, asociadas tanto a sistemas lénticos como lóticos, 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 durante algún período del año. Generalmente tienen un suelo sustancialmente diferente del de las tierras adyacentes más elevadas, y presentan 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 microfitobentos. El término incluye a las macroalgas, briófitas, pteridófitas y angiospermas. Las plantas vasculares acuáticas se denominan hidrófitas. Raunkiaer (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 para designar las plantas acuáticas de los ecosistemas continentales. Posteriormente, propuso 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 a todas aquellas formas vegetales que crecen en agua, suelos cubiertos o generalmente saturados de agua. Esta definición es la más utilizada. Sculthorpe (1967) y Cook (1990) presentan una de las clasificaciones más claras de las hidrófitas según la forma de vida (Tabla 11.1).

Tabla 11.1. 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; 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; órganos reproductivos flotantes o aéreos, raramente sumergidos.
-

11.1. ESTRUCTURA 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.

11.1.1. APROXIMACIÓN FISONÓMICA

Uno de los métodos fisonómicos más comunes es el de las formas de vida de Raunkiaer (1934, 1937), utilizado para describir tipos de vegetación a escala mundial. Este sistema se basa en la altura con respecto al sustrato, de la yema que inicia el crecimiento en la estación favorable. Implica categorizar todas las plantas de un área dada y representar sus porcentajes (Fig. 11.1). Incluye epífitos, fanerófitos (leñosas), caméfitos (en el suelo), criptófitos (bajo el suelo o el agua) y terófitos (semillan en la estación adversa).

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. 11.2).

El método de Kùchler (1967) incluye dos grandes categorías: leñosas con siete tipos y herbáceas con tres. Este sistema se complementa con las formas de vida, características de las hojas, altura y cobertura. El procedimiento de Fosberg (1961) proporciona un esquema de clasificación de vegetación a escala mundial, y por ello fue adoptado por el Programa Biológico Internacional (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.

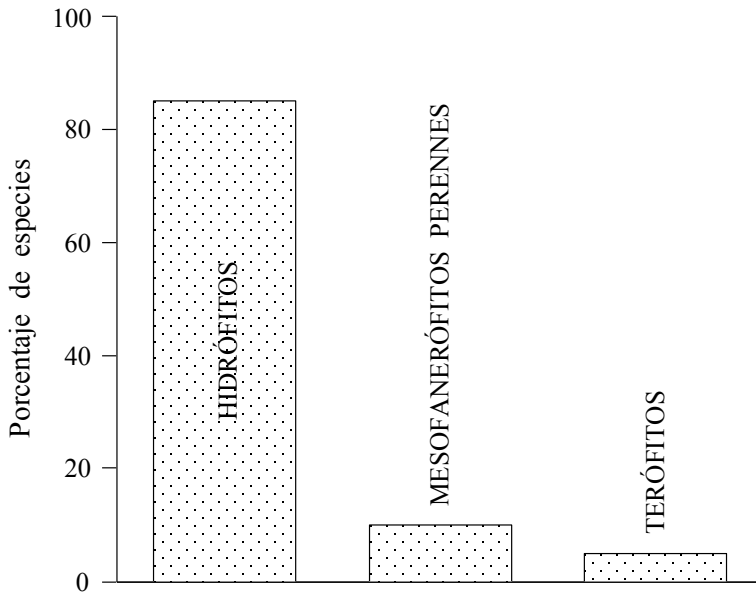


Figura 11.1. Categorización de la vegetación y representación gráfica de una comunidad litoral hipotética de acuerdo al sistema de Raunkiaer (1934, 1937).

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 de campo, por lo que siempre está presente cierta subjetividad (Kent & Coker 1992).

11.1.2. APROXIMACIÓN FLORÍSTICA

HERBORIZACIÓN

La identificación de las especies generalmente se realiza en el laboratorio debido a la necesidad de analizar un conjunto de caracteres de los especímenes (varios de los cuales requiere de observación con lupa o microscopio) 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 y el material pueda ser utilizado en nuevas revisiones taxonómicas. Finalmente, la permanencia de un registro permite conocer con mayor detalle la distribución de las especies.

Un buen ejemplar de herbario debe presentar todas las partes de la planta (flores, frutos, hojas y madera) y debe acompañarse de 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. Aquellas especies con heterofilia, muy común en las plantas acuáticas, deben colectarse incluyendo 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 con el ejemplar de herbario:

Forma de vida

- Árboles (T)
- ◐ Arbustos (F)
- ▽ Hierbas (H)
- ◑ Briófitas (B)
- △ Epífitas (E)
- ⌒ Lianas (L)

Forma y tamaño de la hoja

- ◌ Acicular (n)
- ◊ Graminoide (g)
- ◊ Pequeña (a)
- ◊ Latifoliada (h)
- ◊ Compuesta (v)
- Taloide (q)

Función

- Deciduo (d)
- ▨ Semideciduo (s)
- ▩ Siempreverde (e)
- ▧ Suculento áfido (g)

Textura de la hoja

- ▨ Pelúcida (f)
- Membranosa (z)
- Esclerófila (x)
- ▧ Suculenta o fúngica (k)

Tamaño

- Alto (t)
- Medio (m)
- Bajo (l)

Cobertura

- Inexistente o muy escasa (b)
- Discontinua (i)
- En grupos (p)
- Continua (c)

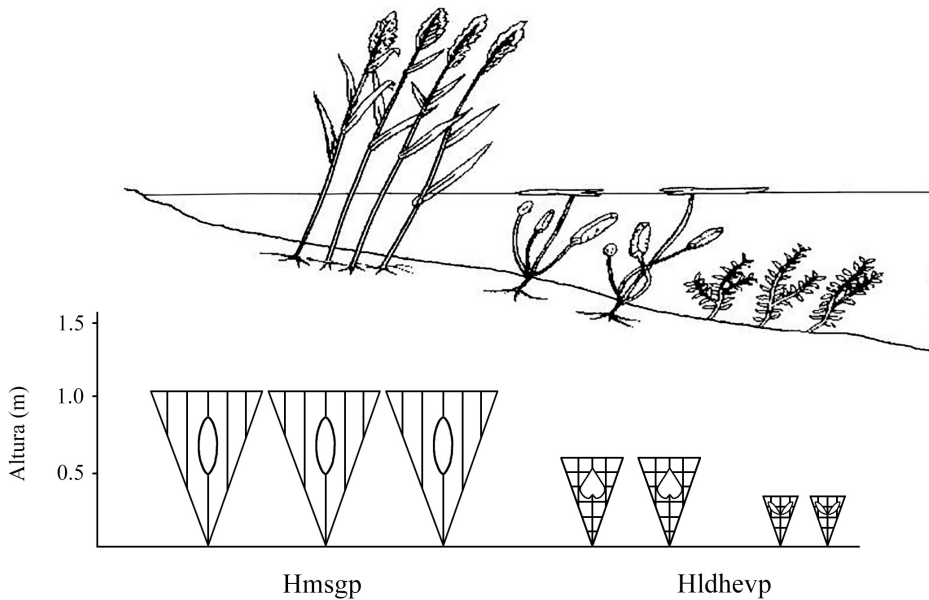


Figura 11.2. Simbología y ejemplo esquemático del sistema de Dansereau.

Localización: indicar un lugar fácilmente ubicable en los mapas, evitando nombres locales. Incluir latitud, longitud, fecha y número de colecta.

Hábitat: características del cuerpo de agua o suelo, altitud y tipo de vegetación.

Hábito: si es árbol, arbusto, hierba, epífita o liana, y demás características que posteriormente no serán visibles en el ejemplar.

Exudados: látex, resinas u otros.

Color de las hojas, flores y frutos.

Observaciones: biológicas/ecológicas (frecuencia, dominancia, tipo de polinización).

Nombres y usos locales 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. Las 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.

El herbario “Ing. Agr. Bernardo Rosengurtt” de la Facultad de Agronomía, es el herbario uruguayo que contiene el mayor número de especímenes de plantas vasculares nativas. También son de destacar los herbarios del Museo y Jardín Botánico “Prof. Atilio Lombardo” de la Intendencia de Montevideo, y el del Museo Nacional de Historia Natural y Antropología. Otros herbarios nacionales son los de las Facultades de Química y de Ciencias.

IDENTIFICACIÓN

Para la identificación de las especies acuáticas de Uruguay se puede recurrir a las Floras de la región: Flora Montevicensis (Lombardo 1982); Flora de Entre Ríos (Burkart 1974); Flora de la Provincia de Buenos Aires (Cabrera 1970); Flora de los Alrededores de Buenos Aires (Cabrera & Zardini 1978); Flora de Santa Catarina; Flora de Paraguay, y Flora de Chile (Marticorena & Rodríguez 1995), 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 del 70% de las especies acuáticas presentes en Uruguay. Otros trabajos muy útiles son Benl (1972), Marta (1983), Cook (1990), Tur (1995), Brussa & Grela (2007), Geymonat & Lombardi (2012). 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 Plant Information Retrieval System (APIRS) de la Universidad de Florida, EE.UU. (disponible en <<http://plants.ifas.ufl.edu/APIRS>>).

ÁREA DE MUESTREO

La cuantificación de la abundancia de las especies identificadas requiere definir un área estándar o cuadrante que puede ser cuadrado, rectangular o circular, y cuyo tamaño varía de acuerdo al tipo de vegetación (Tabla 11.2). 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. 11.3) es asintótica y permite escoger el área de muestreo correspondiente a un determinado porcentaje de la asíntota.

Tabla 11.2. Tamaños de cuadrantes sugeridos para diferentes comunidades de macrófitas.

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

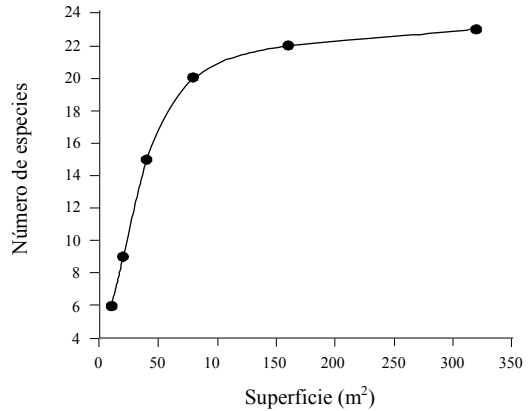
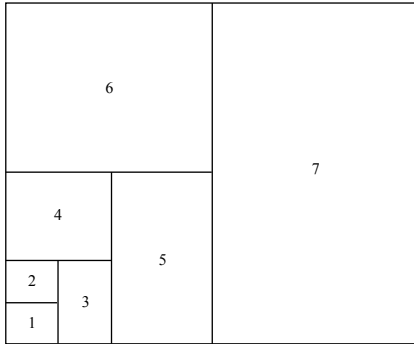


Figura 11.3. Relación entre el tamaño del cuadrante de muestreo y el número de especies registradas (curva especie-área).

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 atributos ambientales como la variación espacial de la profundidad de la columna de agua o la transparencia de la misma, la granulometría del sustrato y su contenido de materia orgánica o nutrientes, entre otros. La ventaja de este método radica en 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 asociados a factores ambientales que varían en el espacio y/o el tiempo. Los muestreos estratificados al azar combinan las dos estrategias antes indicadas, asignando al azar unidades muestrales en estratos definidos *a priori*.

El muestreo sistemático implica la observación a intervalos regulares, que deben ser ubicados sin considerar previamente patrones estructurales o funcionales de la vegetación. La técnica más común es la de transectas, que consiste en trazar una línea sobre la que son registradas las observaciones. 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*), de los cuales el más simple es el del individuo 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. 11.4). La densidad (D) de cada especie es:

$$D = \sqrt{(1/\bar{l}^2)}$$

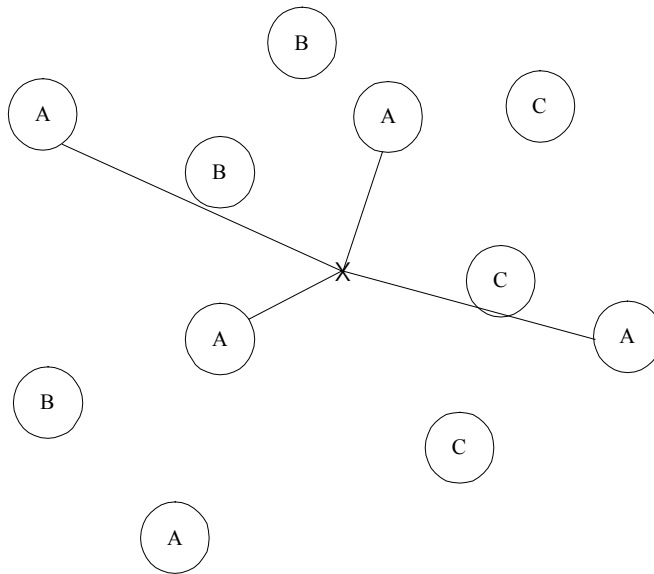


Figura 11.4. Esquema del método del individuo más próximo con un punto elegido al azar.

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 11.3). Estos métodos en general sobrestiman las especies en flor, las más atractivas o conspicuas.

Entre los métodos objetivos, la densidad o número de individuos en un área determinada es utilizada para un conjunto de especies y raramente para una comunidad completa, pues demanda mucho tiempo y esfuerzo al requerir la identificación *in situ* de todos los individuos. En las especies 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.

Tabla 11.3. Escalas 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%	5 - 10%
5	76 - 100%	11 - 25%
6		26 - 33%
7		34 - 50%
8		51 - 75%
9		76 - 90%
10		91 - 100%

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 10 × 10 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.

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.

La biomasa (*standing crop*) es la cantidad de materia vegetal en un área dada. Solo es utilizada ocasionalmente como medida de abundancia por el tiempo y esfuerzo que requiere. La biomasa dentro del cuadrado es cortada a ras del suelo y separada por especies; en general también se separa la necromasa o tejidos muertos. Posteriormente es pesada en fresco o pueden tomarse submuestras, las que se secan en estufa a 80-100 °C para determinar el peso seco. En plantas flotantes libres se suele coleccionar toda la planta, incluyendo las raíces. Generalmente se expresa el peso de cada especie como un porcentaje de la biomasa total en el cuadrado, o como gramos de peso seco o fresco en un metro cuadrado (g PS m⁻²).

A partir de los años 90 la estimación de la abundancia de plantas sumergidas contempla un estimador denominado PVI (*Plant volume infested*, Canfield *et al.* 1984), atributo que permite analizar adecuadamente las interacciones entre la vegetación acuática y las comunidades planctónica, bentónica y nectónica, y con las propiedades físico-químicas del agua. El PVI se estima considerando la cobertura de las especies, su altura y la profundidad de la columna de agua. La cobertura puede ser estimada de acuerdo a los procedimientos antes indicados, pueden utilizarse cuadrantes de referencia o emplear un *grapnel* (ancla rezón o de ganchos, dispositivo que se desempeña como un gran tenedor que colecta la vegetación sumergida). En el caso de aguas muy transparentes puede emplearse un visor. Cuando la co-

lumna de agua se encuentra completamente ocupada por plantas acuáticas y los ejemplares alcanzan la superficie de la misma, el PVI corresponde al 100%. En la sección Resultados (11.5) se ilustra la utilización de este indicador de abundancia.

11.2. 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 otra 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 de las plantas acuáticas se determina generalmente mediante las variaciones de biomasa en el tiempo. Además de las medidas de biomasa, son necesarias medidas del sistema de asimilación (área foliar, contenido de proteínas o de clorofila de las hojas).

11.2.1. BIOMASA AÉREA

MÉTODOS DESTRUCTIVOS

La biomasa aérea se estima removiendo las partes vegetales delimitadas en el área de muestreo. Una de las estrategias más frecuentes es seleccionar el número de unidades muestrales antes de comenzar el relevamiento. El número de cuadrados necesarios (n) puede ser estimado cosechando entre 10 y 20 cuadrados (generalmente de 1.0 o 0.5 m²) y aplicando la fórmula de Roberts *et al.* (1985):

$$n = (ts)^2 / (Dx)$$

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 (*e.g.*, 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), que utiliza cuadrados encajados de cinco tamaños diferentes (Fig. 11.5). 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:

$$Cr = Cf + (xCv) / (Cf + Cv)$$

donde Cf son los costos fijos de cada cuadrado (*e.g.*, tiempo requerido para la cosecha, determinación del peso y registro de la información), Cv el costo para 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. 11.5).

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 condiciona la cantidad y composición del tejido. A modo de ejemplo, pueden ocurrir pérdidas por respiración de carbohidratos no estructurales

mientras se alcanza la temperatura suficiente para desnaturalizar las enzimas (Chiariello *et al.* 1989). Temperaturas elevadas pueden volatilizar compuestos altamente energéticos. A efectos de evitar estos inconvenientes conviene 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.

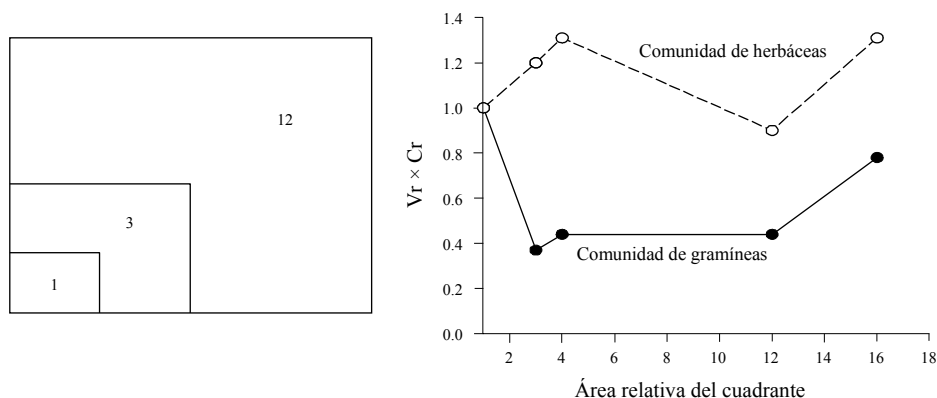


Figura 11.5. Izq.: cuadrantes encajados para la determinación del área óptima en la cuantificación de la biomasa; der.: producto varianza relativa (V_r) por costo relativo (C_r) en función del área del cuadrante para dos comunidades. El producto menor determina el área mínima del cuadrante (tomado de Roberts *et al.* 1985).

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 h en mufla. En plantas pequeñas como *Azolla* y *Lemna*, 3 h es suficiente. Temperaturas mayores a 500 °C pueden volatilizar algunos materiales inorgánicos.

MÉTODOS INDIRECTOS

La biomasa se puede estimar indirectamente mediante correlaciones con el largo de las hojas o de los tallos (Roberts *et al.* 1985). Se requiere de una fase previa de cosecha para establecer las ecuaciones de mejor ajuste entre estos parámetros. 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 o el agua. A modo de ejemplo, 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 los cambios en 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.

Pueden ocurrir errores en la estimación de la biomasa cuando existe gran cantidad de material muerto, el que debe ser menor al 75% del total para obtener esti-

maciones confiables. 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.

11.2.2. BIOMASA SUBTERRÁNEA

La biomasa subterránea generalmente no es considerada, a pesar de que puede representar más del 80% de la biomasa total (Wetzel 1983a). Esto se explica por las dificultades de muestreo y por la complejidad de la separación del material vivo del muerto, particularmente en suelos inundados. El método más efectivo es tomar muestras en el centro de los cuadrados utilizados para la cosecha de la biomasa aérea. La biomasa subterránea se puede extraer con una pala de bordes cortantes o a través de *corers*. La primera presenta inconvenientes para controlar la profundidad y el área muestreada y es difícil aplicar en suelos inundados, al contrario de los *corers*. Éstos pueden construirse en metal, acrílico o plástico (ver 5.1.2), pero son adecuados solo para suelos livianos.

Las muestras pueden ser lavadas bajo agua a presión, 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 aireada 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 (*e.g.*, 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.

11.2.3. ÁREA FOLIAR Y ESTRUCTURA DE DOSEL

La determinación del área foliar debe ser considerada en un sentido más amplio, 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 del área foliar (L) igual al área de la superficie foliar proyectable dividida por el área del sustrato.

El área de la superficie foliar proyectable puede ser determinada mediante la cosecha de todo el material por encima del cuadrante, ubicando las hojas sobre una superficie horizontal. El área de la superficie foliar generalmente se refiere al área de la cara adaxial (superior) de la hoja. En el caso de hojas suculentas o tallos fotosintéticos, esta área 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 fotogramétricos. En éstos, las hojas son colocadas sobre papel fotográfico o se pueden 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 (L). Sin embargo, en un dosel erectófilo (donde predominan hojas verticales), 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 β el ángulo de inclinación de la aguja. Warren-Wilson (1963) determinó 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 mismo 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_{β}) que recorre la aguja con una inclinación β , puede ser relacionada con la altura vertical (z):

$$z_{\beta} = z/\text{sen}\beta$$

Esto permite calcular ΔF 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°. 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.

11.2.4. PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

Los principios y detalles del método se explican en el capítulo 9. 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. Para asegurar la completa extracción de las hojas se las puede congelar previamente (*e.g.*, con N líquido). Algunos tejidos y células necesitan varias horas para completar la extracción (Coombs *et al.* 1985). También se utilizan 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.

11.2.5. ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO

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.

11.2.5.1. APROXIMACIÓN CLÁSICA

La tasa de crecimiento relativo (RGR) o específico (SGR) (Blackman 1919) en d^{-1} , es el incremento de peso vegetal (ΔW) por unidad de peso en un período de tiempo. 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 tiempo o el espacio, 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) 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; Williams 1946), el NAR promedio se estima ($g\ m^{-2}\ d^{-1}$) de acuerdo a:

$$NAR = (W_2 - W_1)(\ln A_2 - \ln A_1)/(A_2 - A_1)(t_2 - t_1)$$

donde A_1 y A_2 son el área asimiladora 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. Además, dado que la respiración de tejidos no fotosintéticos afecta el crecimiento vegetal, la tasa de asimila-

ción neta no incluye totalmente esta fracción no asimiladora del total de biomasa (Chiariello *et al.* 1989).

El cociente área foliar (LAR) se define como la fracción asimiladora por unidad de materia 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.

$$\text{LAR} = (A_2 - A_1)(\ln W_2 - \ln W_1)/(W_2 - W_1)(\ln A_2 - \ln A_1)$$

11.2.5.2. APROXIMACIÓN INTEGRAL

Esta aproximación incorpora dos parámetros integrados en el tiempo: la duración del área foliar (LAD) en $\text{m}^2 \text{d}^{-1}$ y de la biomasa (BMD) en 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 del área foliar (RA, d^{-1}) 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:

$$\text{BMD} = (W_2 - W_1)(t_2 - t_1)/(\ln W_2 - \ln W_1)$$

Por lo tanto, la tasa de crecimiento relativo (RGR) y la tasa de asimilación neta (NAR) se pueden relacionar con los parámetros descritos de acuerdo a:

$$\text{RGR} = (W_2 - W_1)/\text{BMD}$$

$$\text{NAR} = (W_2 - W_1)/\text{LAD}$$

11.2.5.3. 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). Ésta 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 es-

tar contenida en dos ecuaciones, y pueden desarrollarse nuevas funciones para calcular valores instantáneos de RGR, NAR y LAR.

11.3. PÉRDIDAS DE BIOMASA

Para determinar la producción neta, las medidas de cambio de biomasa viva deben ser combinadas con el registro de pérdidas por muerte, herbivoría y excreción. Dos procedimientos son utilizados para estimar la tasa de descomposición o pérdida en un período de tiempo. Las técnicas de puntos pareados y sus variantes solo 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.

11.3.1. PUNTOS PAREADOS

Varios pares de cuadrantes con límites contiguos son seleccionados al azar (Wiegert & Evans 1964). La biomasa viva 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 otro cuadrante. 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 periodos de tiempo prolongados. Sin embargo, 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 alternativo para expresar la proporción RD de material muerto en el intervalo ($t_{i+1} - t_i$), y que no considera la relación matemática entre D y t (Roberts *et al.* 1985) es:

$$RD = [2(D_i - D_{i+1})/(D_i + D_{i+1})]/(t_{i+1} - t_i)$$

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 solo puede ocurrir en 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, o si hay crecimiento y senescencia en el segundo cuadrante 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, solo el material muerto es removido del primer punto. Al final del intervalo, todo el material muerto de los dos puntos es retirado y registrado. La cantidad de material muerto en el primer punto es la cantidad producida en el intervalo de tiempo (D'_{i+1}), mientras que en el segundo punto se estima la desaparición de 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, solo es aplicable a las partes aéreas de la vegetación.

11.3.2. 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 secado del material antes de ser incluido en la bolsa debe realizarse con extremo cuidado, ya que puede afectar la tasa de descomposición. Una alternativa es secar el material al aire en una habitación libre de humedad. El tamaño de las perforaciones determina el tamaño de los invertebrados que descomponen el material, generalmente se recomienda 2 mm. El material debe ser lavado en tamices del mismo tamaño de malla. Las bolsas deben ubicarse en la columna de agua donde se quiere determinar la descomposición.

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.

11.3.3. 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.

11.4. PRODUCCIÓN PRIMARIA

La producción primaria de las macrófitas puede estimarse mediante la tasa de fotosíntesis, la fluorescencia de la clorofila o la asimilación de los nutrientes.

11.4.1. 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 ambas porque son procesos 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 más 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.

SISTEMAS CERRADOS

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 Δt 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.

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 cuantifican flujos de aire de entrada o salida, por lo que son más pequeños y portátiles, y pueden analizar un gran número de muestras.

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:

$$A_n = (U_e C_e - U_o C_o)/\Delta t$$

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 pueden 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.

SISTEMAS DE RADIOISÓTOPOS

Cualquier tejido fotosintético expuesto a una atmósfera que contiene $^{14}\text{CO}_2$ incorporará ^{14}C en los productos de la fotosíntesis. El ^{14}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 (Δt), 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 muestreos destructivos y no brindan resultados inmediatos en el terreno. Requieren un equipamiento importante de laboratorio y no permiten cuantificar simultáneamente el intercambio de agua y anhídrido carbónico.

11.4.2. 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, y 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 del 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 re-oxidación de las moléculas aceptoras de electrones del fotosistema PSII, y maximiza la probabilidad de 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 minutos. 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. La luz actínica es la que va del azul al UV (400-480 nm) y tiene efectos químicos en los tejidos vivos. 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, algunos 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 (Φ_{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 (Genty *et al.* 1989) son:

$$\text{Eficiencia cuántica del } \Phi_{PSII} = (F_m' - F_s)/F_m'$$

$$\text{Coeficiente de extinción fotoquímica } qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_0)$$

$$\text{Coeficiente de extinción no fotoquímica } qNP = (F_m - F_m')/(F_m - F_0)$$

$$\text{Definición alternativa de extinción no fotoquímica } NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$$

$$\text{Tasa de transporte de electrones } ETR = PAR \% 0.5 \% 0.84 \% \Phi_{PSII}$$

11.4.3. 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 periodos 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, la biomasa de un individuo puede ser cuantificada no destructivamente (por alometría) a la vez que sobre individuos vecinos se practica la cosecha destructiva y se determina la concentración de nutrientes. Alternativamente, distintos 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 periodo 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 dificultades en este procedimiento son para lograr uniformidad en el suministro del isótopo (principalmente en el sustra-

to) y para predecir la cantidad disponible. En la disponibilidad se debe tener en cuenta los mecanismos de adsorción en el suelo y el agua, y la inmovilización microbiana.

ASIMILACIÓN DE NUTRIENTES

Una aproximación más adecuada para los 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 macro y micronutrientes (Chapin & van Cleve 1989). La estimación puede realizarse a través de 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 7.

ANÁLISIS DE NUTRIENTES EN PLANTAS

El primer paso en el análisis de nutrientes en la biomasa es la destrucción del componente orgánico mediante digestión húmeda o seca. En la primera se utiliza una combinación de varios ácidos (HNO_3 , H_2SO_4 , 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. Deben 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 °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 (Bremmer & 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 7. Otros elementos (K, Na, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn) contenidos en la digestión pueden ser determinados por espectrofotometría de absorción atómica (Cap. 6).

11.5. RESULTADOS

11.5.1. ROL DEL FUEGO EN LA ESTRUCTURA DE HUMEDALES

En diciembre de 1999 se produjo un incendio de pastizales y humedales en una parte del bañado de la Estación Biológica Potrerillo de Santa Teresa (33°57'16" S, 53°38'28" W). Para comprender los cambios en la vegetación palustre y determinar el tiempo necesario para su restauración, se estableció un diseño de muestreo tipo CI (*Control-Impact Design*, Osenberg & Schmitt 1996) con cuatro cuadrantes permanentes (Kent & Coker 1992) de 10 × 10 m en la zona quemada y en la zona testigo. Los cuadrantes de cada tratamiento fueron dispuestos en transectos ubicados al azar (Fig. 11.6). Éstos se trazaron desde el límite entre el humedal y la pradera o bosque hacia la parte más profunda del bañado. En cada transecto se ubicaron dos cuadrantes a 50 m y dos a 100 m de distancia del margen del humedal.

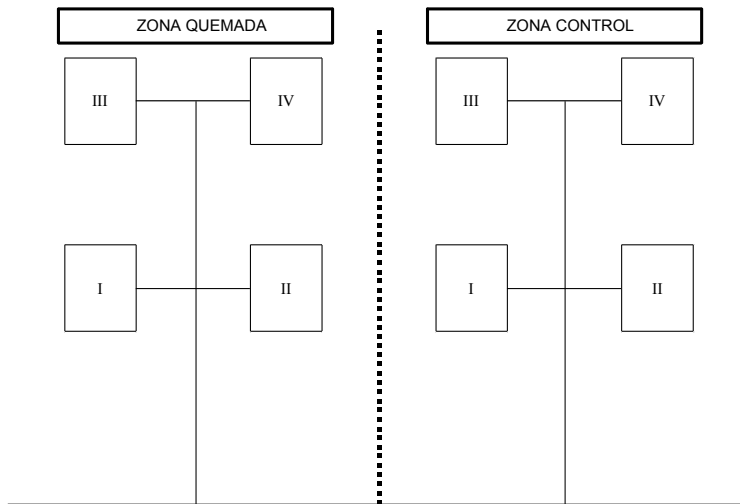


Figura 11.6. Ubicación de ocho parcelas permanentes de 100 m², distribuidas equitativamente en dos transectos que se adentran 100 m en el bañado.

Considerando la homogeneidad de la vegetación, se aplicó la metodología de Braun-Blanquet para determinar el área mínima de la comunidad (Mueller-Dombois & Ellenberg 1974). Las especies fueron clasificadas según sus formas de vida siguiendo el sistema de Raunkiaer (1934). Asimismo, fue considerado el sistema de clasificación de formas de vida de plantas acuáticas de Sculthorpe (1967) y Cook (1990). Para la estimación de la frecuencia los cuadrantes fueron divididos en 100 unidades de 1 m², registrando en cada uno la presencia y ausencia de especies. La cobertura se determinó usando la metodología *Cover Pin Frame* o *Point quadrats*, que consistió en disponer verticalmente una varilla de 0.5 cm de diámetro en intervalos de 1 m (100 por cuadrante). Las especies que hicieron contacto con ella fueron registradas para el cálculo de cobertura que también se expresa como porcentaje (Mueller-Dombois & Ellenberg 1974; Kent & Coker 1992).

Los valores de frecuencia y cobertura fueron utilizados para calcular la diversidad y equitatividad de cada parcela permanente en el período de tiempo considerado. La importancia relativa (IR) fue calculada como la sumatoria de la cobertura y la frecuencia relativa de cada especie. Como el valor máximo de cobertura o frecuencia para cada especie puede ser de 100, la importancia relativa puede alcanzar un máximo de 200. Se tomó el criterio de dividir entre dos la importancia relativa para que presentara valores entre 1 y 100 (Johnson & Knapp 1995).

La curva especies-área indicó una superficie mínima de relevamiento de entre 14 y 33 m², obtenida al proyectar los puntos tangentes a la curva correspondientes a un incremento de 10% y 5% de las especies respectivamente sobre el área (Fig. 11.7) (Mueller-Dombois & Ellenberg 1974). Por lo tanto, una parcela de 100 m² representa satisfactoriamente la estructura de esta comunidad.

Fueron registrados 39 taxa de 14 familias, mayoritariamente ciperáceas (11 especies), poáceas y asteráceas (5 especies en cada una). Los geófitos rizomatosos fueron las formas de vida dominantes (44.7% de las especies), los nanofanerófitos y caméfitos representaron el 18.4% cada uno, los hemicriptófitos, terófitos y mesofanerófitos el 10.5%, 5.3% y 2.6%, respectivamente (Fig. 11.8). Todas las especies fueron plantas emergentes. Algunas no fueron estrictamente hidrófitas ya que tam-

bién pueden encontrarse en ambientes terrestre (*Senecio selloi*, *Erianthus angustifolius*, *Vigna luteola*, *Mikania micrantha*, *Baccharis pingraea*, *Brachystele dilatata* y *Erythrina crista-galli*).

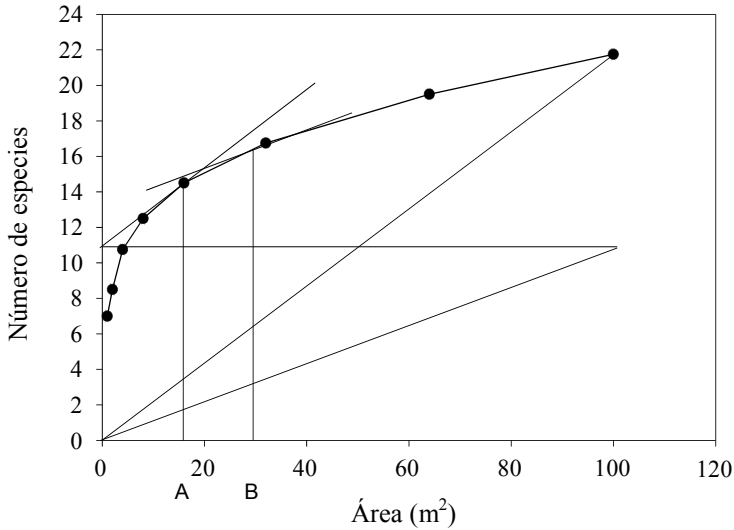


Figura 11.7. Curva especies-área de la vegetación del humedal. Se indica el área mínima ubicada entre 14 y 32 m².

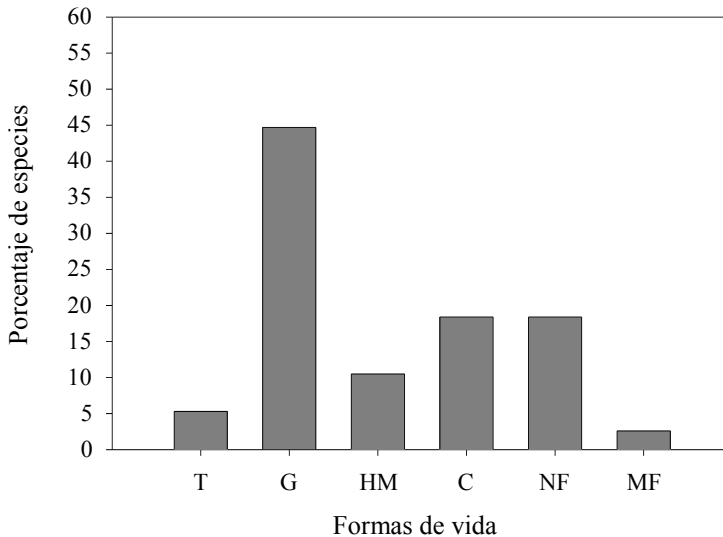


Figura 11.8. Espectro biológico de las especies del humedal. Formas de vida según Raunkiaer (1934): T: terófito; G: geófito; HM: hemicriptófito; C: caméfito; NF: nanofanerófito; MF: mesofanerófito.

Las curvas dominancia-diversidad a un año del incendio se ajustan a un modelo exponencial negativo (Fig. 11.9). Hay pocas especies con IR alta (*Scirpus giganteus*, *Eryngium pandanifolium*, *Leersia hexandra*). Las mayores diferencias entre tratamientos se dieron en la franja de la curva con IR inferior a 20%, donde las parcelas sometidas al fuego presentaron un mayor número de especies.

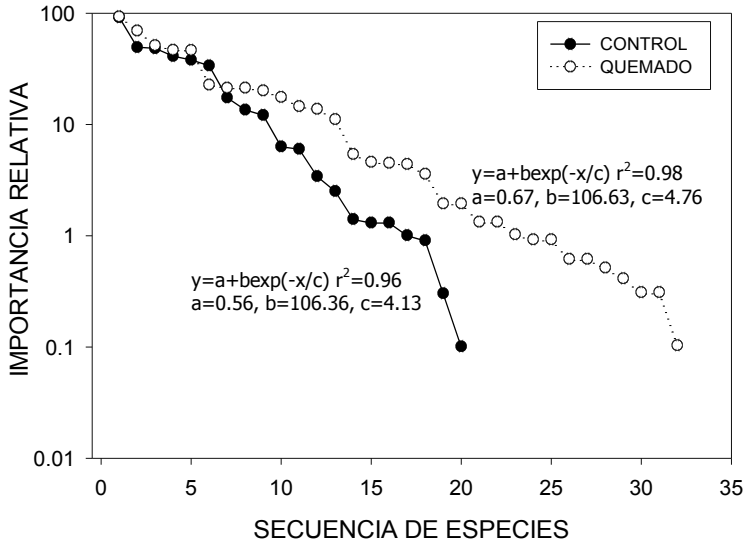


Figura 11.9. Curva dominancia-diversidad que compara parcelas control con incendiadas. Se muestra el ajuste a las funciones exponenciales negativas.

La zona quemada presentó una mayor riqueza y diversidad de especies que la zona control (Tabla 11.4). Se constató un aumento significativo en el número de especies a los 10 y 14 meses luego del incendio para ambos tratamientos. Los cuadrantes más próximos a la pradera presentaron una diversidad significativamente menor que los más lejanos. En cambio, no se observaron mayores diferencias en la equitatividad entre los tratamientos y en el tiempo.

En los análisis de ordenación se puede observar una notoria separación entre la zona control y la zona quemada, tanto en términos de frecuencia (Fig. 11.10) como de cobertura. El mayor número de especies encontrado en los sitios quemados explica estas diferencias. Algunas especies como *Panicum helobium*, *E. angustifolius*, *Chaetotropis chilensis*, *Rhynchospora corymbosa* y *Thelypteris interrupta*, se encontraron exclusivamente en la zona quemada. Solamente dos especies fueron exclusivas de la zona control: *Typha domingensis* y *Rumex argentinus*. Especies como *S. giganteus*, *L. hexandra*, *Carex riparia*, *E. pandanifolium* y *Polygonum acuminatum*, estuvieron bien representadas tanto en la zona control como quemada.

Por último, se estimó la biomasa mediante cosecha en cinco parcelas al azar aledañas a los cuadrantes permanentes, luego de transcurrido un año del incendio. Los valores destacan la elevada producción primaria de este tipo de ambiente, ya que en un corto período de tiempo pudo recuperarse una parte muy importante de la biomasa fotosintéticamente activa y logró acumularse cerca del 50% de la biomasa seca con relación al control.

Tabla 11.4. Análisis de varianza entre sitios (C: control; Q: quemado), distancia (50 y 100 m) y tiempo (S: setiembre; N: noviembre; D: diciembre; A: abril).

RIQUEZA ESPECÍFICA			
	F	P	Observación
Sitios (S)	112.13	0.001	C < Q
Distancia (D)	6.22	0.05	50 < 100
Tiempo (T)	50.17	0.001	S < N < D = A
S × D	4.27	0.05	C50 = C100 < Q50 < Q100
S × T	10.25	0.001	
D × T	2.2	NS	
S × D × T	0.92	NS	

DIVERSIDAD			
	F	P	Observación
Sitios (S)	123.79	0.001	C < Q
Distancia (D)	16.53	0.001	50 < 100
Tiempo (T)	81.58	0.001	S < N < D = A
S × D	0.05	NS	
S × T	16.09	0.001	
D × T	2.89	0.05	
S × D × T	1.43	NS	

EQUITATIVIDAD			
	F	P	Observación
Sitios (S)	2.36	NS	
Distancia (D)	4.97	0.05	50 < 100
Tiempo (T)	3.75	0.05	S ≠ A
S × D	8.65	0.01	
S × T	3.18	0.05	
D × T	0.30	NS	
S × D × T	0.62	NS	

Los resultados permiten afirmar que el fuego desencadenó una sucesión secundaria, con el establecimiento de especies procedentes del banco de semillas o de lugares aledaños.

En el bañado de Santa Teresa el fuego actúa como un disturbio intermedio, aumentando la diversidad específica de la comunidad vegetal. La matriz vegetal se recuperó rápidamente porque el sistema de renuevo de las especies dominantes quedó protegido del disturbio. El tiempo necesario para alcanzar la condición previa al disturbio (restauración) es relativamente breve, y puede estimarse en 3 a 5 años. La elevada producción de estos ambientes y el proceso asociado de maduración, conllevan a la formación de una importante biomasa muerta y extremadamente seca próxima al sustrato y en las partes más elevadas de la vegetación. Esta materia seca plantea la posibilidad de que en años secos ocurran incendios naturales, alternativa que debería ser investigada con procedimientos paleolimnológicos. Kuhry (1994), investigando humedales de América del Norte con gran acumulación de materia orgánica, reportó la ocurrencia de fuegos naturales con una recurrencia aproximada de 1000 años, afectando la evolución de estos ambientes.

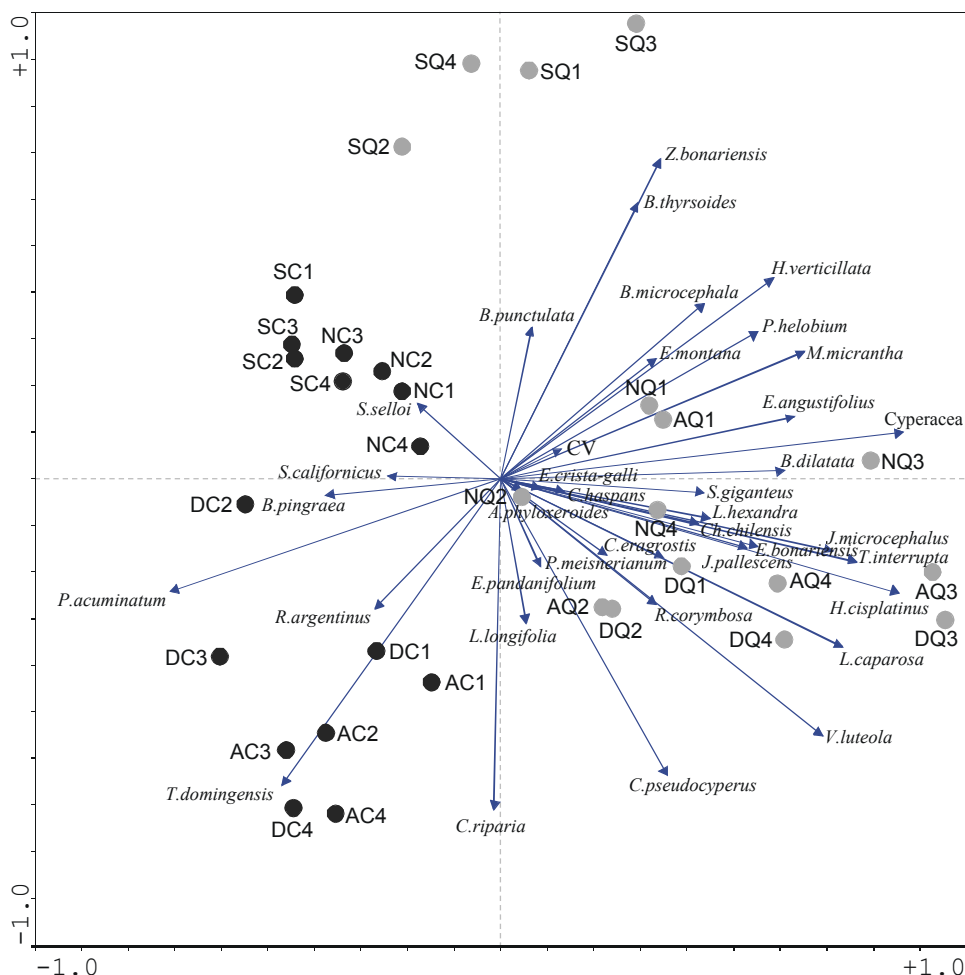


Figura 11.10. Análisis de componentes principales con datos de frecuencia. La primera letra indica el mes, la segunda el tratamiento y el número indica la parcela. S: setiembre; N: noviembre; D: diciembre; A: abril; C: control; Q: quemado. La varianza acumulada explicada por los componentes 1 al 4 fue 31, 50.3, 61.2 y 69.4, respectivamente.

11.5.2. EFECTOS DE LA RADIACIÓN UV EN HIDRÓFITAS FLOTANTES

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 (34°40'54" S, 54°17'51" W). Considerando una aproximación florística, uno de los efectos estudiados fue la incidencia de este tipo de radiación en el porcentaje de biomasa de las diferentes especies de esta comunidad. En este estudio se recurrió al uso de parcelas permanentes flotantes de 1 m² de superficie, sobre los cuales se colocaron diferentes films plásticos en función de tres tratamientos: a) control que recibe toda la radiación solar (PAR + UVA + UVB); b) PAR + UVA,

y c) solo PAR. De acuerdo a los resultados indicados en la figura 11.11 y los análisis estadísticos asociados, los niveles naturales de UVA y UVB no afectaron la estructura de la comunidad durante el período de estudio.

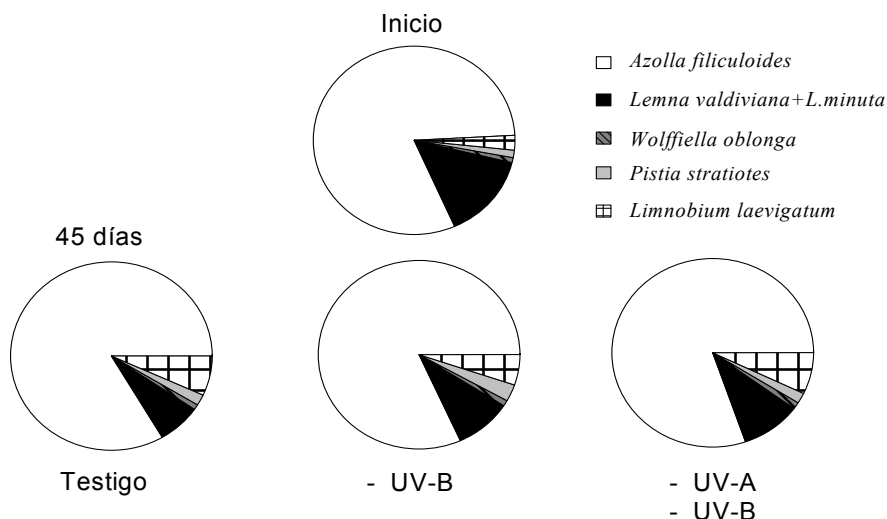


Figura 11.11. Porcentaje de biomasa de las seis especies más abundantes, al inicio y luego de 45 días de experimento. *Lemna valdiviana* y *L. minuta* se consideran juntas debido a la imposibilidad de identificar todos los ejemplares presentes en la muestra (datos sin publicar de N. Mazzeo, Proyecto CSIC I+D 1998-2000 “Respuestas estructurales y funcionales de una comunidad de hidrófitas flotantes inducidas por la radiación solar ultravioleta”).

La incidencia de la radiación solar ultravioleta sobre la eficiencia fotosintética fue estudiada con el mismo diseño experimental, analizando los efectos sobre la eficiencia máxima, eficiencia cuántica del PSII y coeficiente de extinción fotoquímica en *Pistia stratiotes*, el 27 de diciembre de 1998 (luego de 24 días de experimento). Para ello se elaboró la rutina indicada en la figura 11.12, donde a una muestra adaptada a 45 min de oscuridad se aplicó luz ámbar modulada, actínica e infrarroja sucesivamente y dos pulsos saturantes de luz entre ellas. La aplicación de la luz infrarroja permite una mayor precisión en la estimación de la disipación fotoquímica y no fotoquímica de la energía. El F_0' determinado sustituye al F_0 en las fórmulas indicadas en 11.4.2. 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 nuestros resultados sugieren que los niveles naturales no tienen influencia en las respuestas consideradas.

A efectos de interpretar adecuadamente los resultados, debemos considerar que todas las especies estudiadas han sobrevivido períodos con niveles superiores a los actuales de radiación ultravioleta natural incidente a lo largo de su proceso evolutivo, por lo tanto no resultan sorprendentes las respuestas registradas tanto a nivel de producción de biomasa como de eficiencia fotosintética. Por último, es importante resaltar que las diferencias entre aproximaciones experimentales de laboratorio y de campo, pueden deberse a dosis insuficientes de PAR y/o bajas e irreales proporciones de PAR:UVB de los primeros.

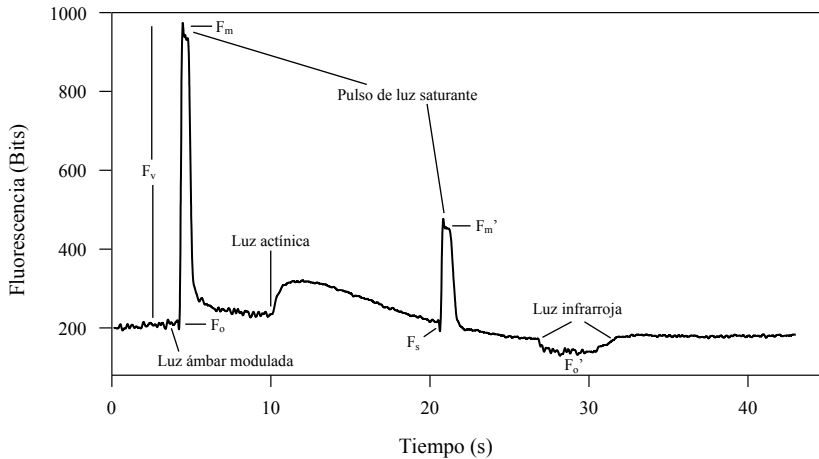


Figura 11.12. Curva de fluorescencia de una hoja de *P. stratiotes* adaptada a 45 minutos de oscuridad en horas del mediodía (datos sin publicar de N. Mazzeo, Proyecto CSIC I+D 1998-2000 “Respuestas estructurales y funcionales de una comunidad de hidrófitas flotantes inducidas por la radiación solar ultravioleta”).

11.5.3. EFECTO DE LA SIMAZINA EN EL CRECIMIENTO DE *LEMNA GIBBA*

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), fue realizado mediante bioensayos de 14 días de duración en condiciones controladas (Mazzeo *et al.* 1998). La respuesta analizada fue el crecimiento a través de la producción de individuos. Una vez verificado el crecimiento exponencial en un cultivo sin herbicida y durante 14 días de cultivo Hutner (Fig. 11.13 A), se analizó la relación entre la biomasa y el número de individuos (Fig. 11.13 B). 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.

11.5.4. PRODUCCIÓN Y DESCOMPOSICIÓN DE *PISTIA STRATIOTES* EN UN RESERVORIO SOMERO

Las respuestas a los procesos de eutrofización pueden ser múltiples, en algunos sistemas aumenta la biomasa del fitoplancton, en otros, la biomasa y cobertura de plantas sumergidas o flotantes. La Laguna del Cisne (34°45'07" S, 55°49'42" W) es un sistema eutrófico que presenta en determinados momentos una extensa cobertura de plantas flotantes. En el siguiente ejemplo se presenta una evaluación del proceso de producción y descomposición de la especie dominante *Pistia stratiotes*. Los valores mensuales de la producción primaria neta fueron estimados como incremento de la biomasa por unidad de superficie y tiempo (Fig.11.14) (Mazzeo *et al.* 1993). Para su cálculo se estimó la biomasa mediante cosecha de cuadrantes de 0.25 m², y se estimó la fracción del espejo de agua ocupada por *Pistia*. El peso de las

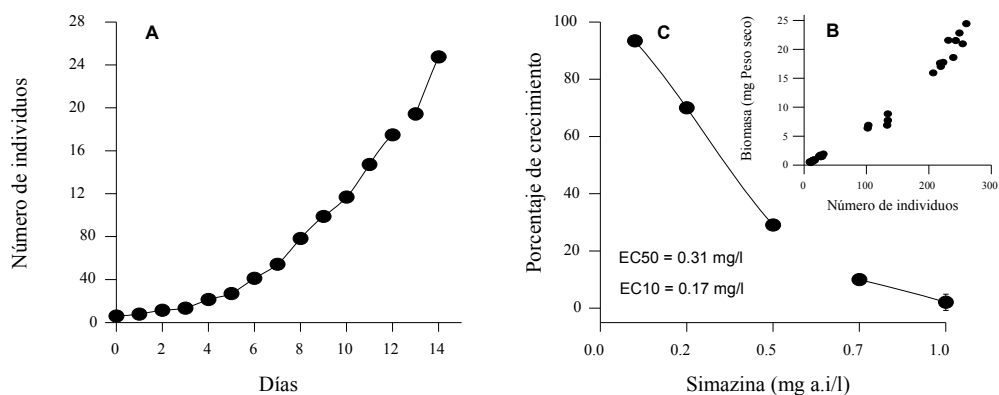


Figura 11.13. A) Crecimiento exponencial del clon Sudáfrica de *Lemna gibba*; B) Relación lineal entre el número de individuos y la biomasa; C) Variación del porcentaje de crecimiento relativo en función de la concentración de simazina; los EC50 y EC10 se estimaron de acuerdo a la ecuación $\ln y = a + bx$ ($r^2 = 0.97$) (tomado de Mazzeo *et al.* 1998).

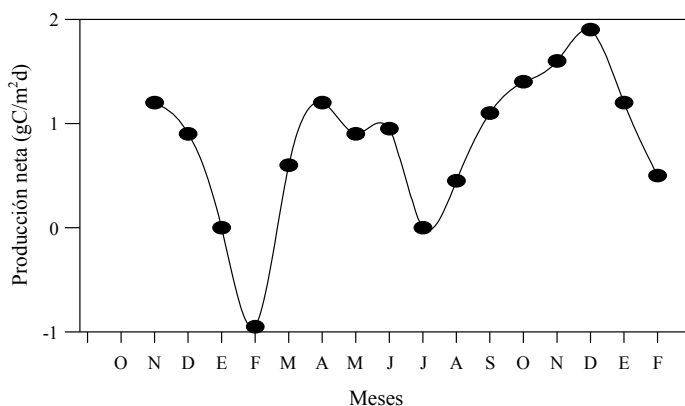


Figura 11.14. Variación mensual de la producción neta de *Pistia stratiotes* en la Laguna del Cisne, estimada como incremento de la biomasa por unidad de superficie y tiempo.

plantas en este caso puede ser estimado directa o indirectamente, a través del registro del diámetro de la roseta o el largo de la raíz (Fig. 11.15). Un muestreo robusto permite simplificar los procedimientos en función de las relaciones que se detectan entre la forma de la planta y su biomasa. Los valores más elevados de productividad se observaron en primavera y otoño. La menor productividad en verano puede asociarse a varios factores, en primer lugar, las tasas de respiración generalmente superan a las de fotosíntesis en este periodo. Además, puede contribuir la presencia del coleóptero *Neohydronomus 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.

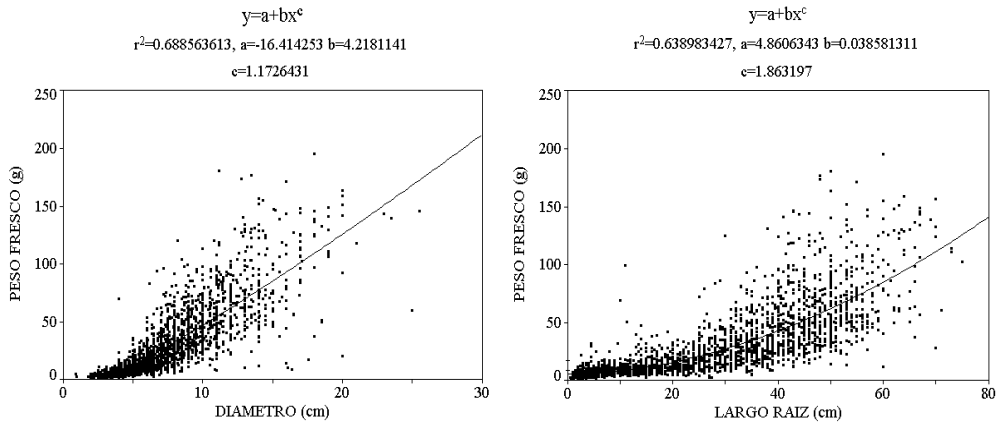


Figura 11.15. Relaciones entre los parámetros morfológicos y el peso fresco de los individuos de *P. stratiotes*; $n = 2771$ (tomado de Mazzeo *et al.* 1993).

En la misma especie y lugar del estudio anterior se analizó la descomposición de acuerdo a la técnica de bolsa de broza, realizando experimentos simultáneos en las zonas litoral (L) y pelágica (P). Las bolsas fueron dispuestas cerca de la superficie en el caso de las hojas y en el sedimento en el caso de las raíces, procurando simular el proceso de descomposición que ocurre en la naturaleza. Para ello se diseñó un dispositivo de aros que se desplazaban libremente sobre un pilote enterrado en el sedimento. El dispositivo permitía ajustar la profundidad de flotación de las hojas y al mismo tiempo acceder a las bolsas que se dispusieron tanto en superficie como fondo. Las tasas de descomposición registradas pueden ser catalogadas como rápidas para las hojas y lentas para las raíces, como consecuencia del menor contenido de fibra en las primeras (Fig. 11.16). 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. Las tasas de descomposición menor en L que en P puede ser atribuido a diferencias significativas en la concentración de oxígeno; la menor disponibilidad de oxígeno en la zona litoral se origina por la propia cobertura de la vegetación flotante que limita el intercambio gaseoso.

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. 11.16). 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 $g\ m^{-2}$. 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 $\mu g-at\ l^{-1}$. 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.

11.5.5. CONTROL DEL CRECIMIENTO EXCESIVO DE LA VEGETACIÓN SUMERGIDA

La vegetación acuática tiene una serie de efectos positivos sobre la calidad del agua, fundamentalmente en aquellos ecosistemas utilizados para el suministro de agua potable o la recreación (Scheffer 1998; Jeppesen *et al.* 1998). A modo de ejem-

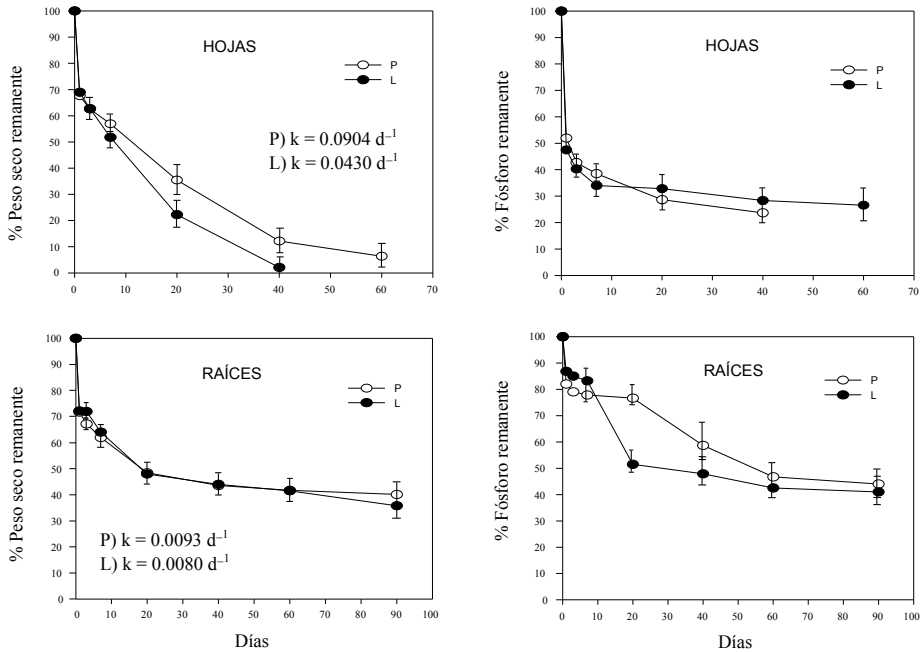


Figura 11.16. Tasas de descomposición (k) y porcentaje del peso seco y fósforo remanente en hojas y raíces de *P. stratiotes* en la zona litoral (L) y pelágica (P). Las barras verticales representan ± 1 desvío estándar (tomado de Sommaruga *et al.* 1993).

plo se pueden indicar, entre otros, el aumento de la transparencia del agua y la generación de una mayor heterogeneidad espacial que condiciona, a su vez, una mayor diversidad de peces y aves. Sin embargo, un crecimiento desmedido puede generar interferencias con la navegación y la recreación, deterioro paisajístico y de la calidad del agua. Controlar la vegetación sumergida sin generar transiciones bruscas a estados dominados por fitoplancton, es una tarea compleja y de gran interés desde el punto de vista tanto teórico como práctico (Scheffer & Carpenter 2003).

En el ejemplo que se presenta a continuación se ilustra un caso de manejo adaptativo de la cosecha de plantas sumergidas basado, entre otros aspectos, en el PVI de las especies presentes y sus respuestas a los programas de cosecha diseñados. El PVI se estimó relevando más de 100 puntos de muestreos dispuestos en transectos perpendiculares al eje máximo.

A partir de 2003 la Laguna del Diario presentó una rápida colonización de plantas sumergidas, observándose un reemplazo de especies tolerantes a condiciones de alta turbidez (*Potamogeton pusillus*) por especies competitivamente superiores en condiciones de elevada transparencia (*Myriophyllum quitense*) (Fig. 11.17). Este proceso culminó en 2006 con la cobertura del 100% del espejo de agua por plantas sumergidas, principalmente *M. quitense*. *Potamogeton illinoensis* presentó un crecimiento paulatino desde 2003 hasta 2006. Esta especie tiene un crecimiento clonal formando parches circulares de vegetación abierta donde otras especies sumergidas no se establecen. En general, *P. illinoensis* no acumula biomasa sobre la superficie del agua como *M. quitense*, y se distribuye fundamentalmente en el sector norte.

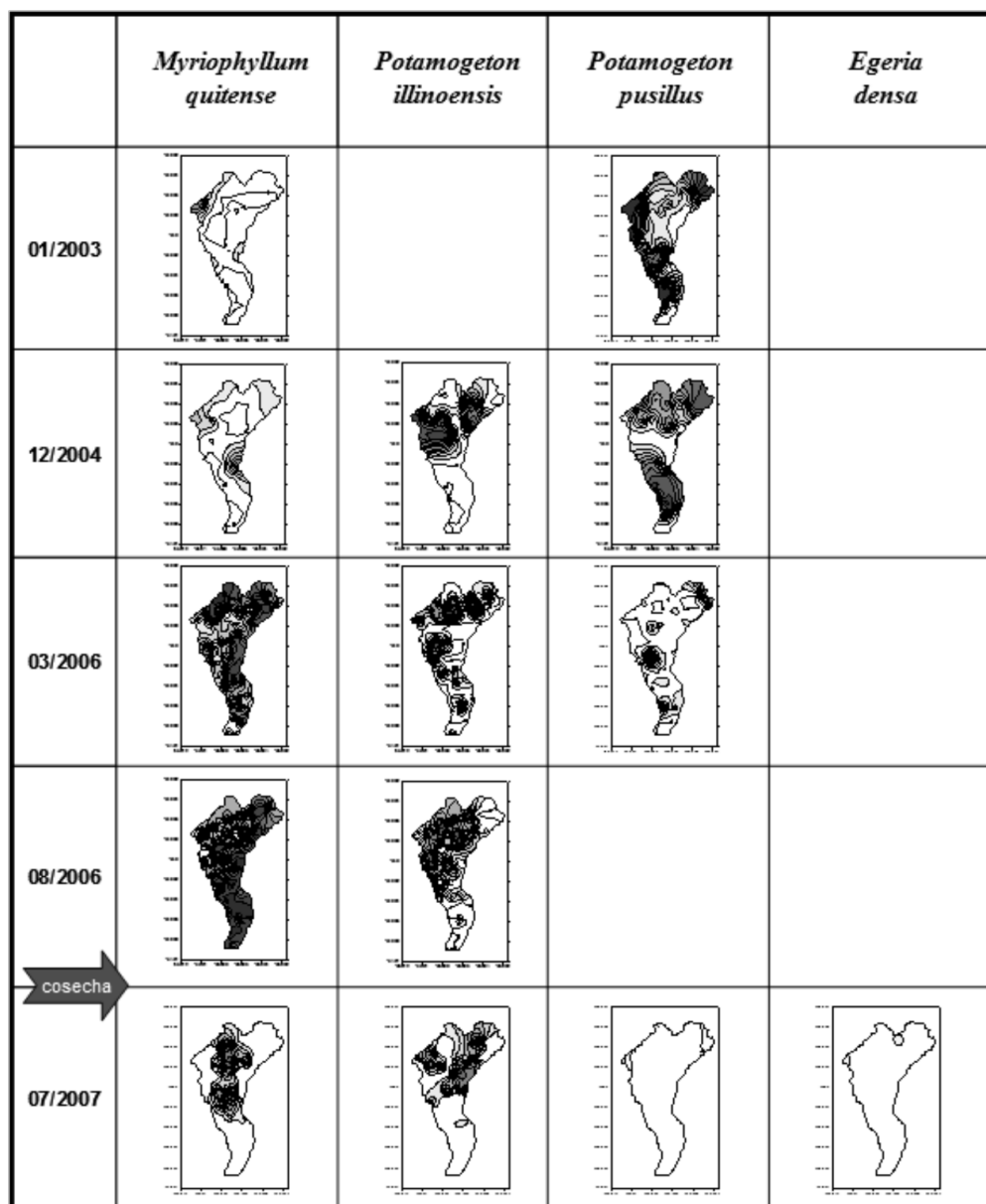


Figura 11.17. Distribución espacial de la abundancia de las principales especies sumergidas en la Laguna del Diario en distintas fechas. La abundancia es expresada en términos del PVI (volumen de la columna de agua ocupado por plantas). Los grises más oscuros corresponden al 100% del PVI (información proveniente del proyecto PDT 2006-2008 “Diseño de estrategias para recuperar Laguna del Diario de acuerdo a sus usos actuales”).

El objetivo inicial de la cosecha mecánica fue controlar *Myriophyllum quitense*, y conservar y facilitar la expansión de *P. ferrugineus*. Para ello se diseñó un plan de manejo adaptativo, comenzando a cosechar en el sector sur de la laguna durante los meses de enero y febrero de 2007 con el dispositivo mostrado en la figura 11.18.



Figura 11.18. Equipamiento utilizado en la cosecha mecánica.

Los resultados (Fig. 11.17) indican que los objetivos originalmente planteados fueron alcanzados con gran rapidez. Las condiciones de elevada turbidez generadas por la cosecha, tanto por el aumento del material resuspendido como por el incremento de la biomasa algal, se propagaron desde el sector sur al resto del sistema, debido a la orientación del largo máximo de la laguna en sentido de los vientos predominantes. Esto determinó la desaparición de *Myriophyllum quitense* y su sustitución por *Potamogeton pusillus*, especie que prácticamente había desaparecido a finales de 2006.

Durante los meses de diciembre de 2007 y enero de 2008 se procedió a controlar *P. pusillus* en el mismo sector sur cosechado anteriormente. La separación temporal de los programas de cosecha tuvieron como objetivo conservar los bancos de *P. illinoensis* en el sector norte, los cuales durante el invierno de 2007 se vieron seriamente afectados por el crecimiento excesivo de perifiton, recuperándose totalmente durante la primavera de ese mismo año.

El programa de cosecha, a pesar de ser exitoso a luz de los resultados, fue sin duda demasiado arriesgado. El área de extracción (ca. 25 ha, sector aledaño a la comunicación con el océano) casi determinó la desaparición de la totalidad de la ve-

getación sumergida y el pasaje a un estado dominado por fitoplancton. El estado turbio dominado por fitoplancton es considerado más adverso de acuerdo a las funciones que cumple la Laguna del Diario, así como más difícil de rehabilitar en comparación con el estado dominado por las plantas sumergidas. De acuerdo a la evidencia científica disponible, es recomendable distribuir espacialmente las áreas de cosecha a efectos de aumentar la resiliencia del sistema.

Uno de los factores que jugaron un papel clave en evitar una transición crítica fue el rápido restablecimiento de *Potamogeton pusillus*, muy probablemente a partir del banco de semillas alojado en el sedimento. Por otra parte, la capacidad de *Potamogeton illinoensis* de controlar y eliminar el perifiton asociado fue muy notorio. En el caso de *P. ferrugineus illinoensis* parece existir una importante capacidad de síntesis de compuestos alelopáticos (Vanderstukken *et al.* 2011). Estos compuestos también podrían explicar la ausencia de otras plantas sumergidas en los bancos de *P. illinoensis*. El manejo implementado logró revertir el proceso de sucesión en cinco años, existiendo un mecanismo adicional de resiliencia originalmente no considerado. La utilización del PVI como indicador de la abundancia resulta de gran utilidad para este tipo de manejo.

ZOOPLANCTON

DANIEL FABIÁN

EL ZOOPLANCTON COMPRENDE UN GRUPO DE ANIMALES MICROSCÓPICOS QUE habita la columna de agua. Debido a su pequeño tamaño y limitada capacidad de locomoción en relación al movimiento del agua, están sujetos al mismo. Son importantes intermediarios en la transferencia de energía entre el fitoplancton del que se alimentan y organismos mayores como otros invertebrados y peces que los consumen. Por otra parte participan, mediante la excreción, en la regeneración de nutrientes disueltos que se vuelven rápidamente disponibles para algas y bacterias.

En los ambientes acuáticos continentales, el zooplancton constituye un conjunto diverso de organismos que se pueden caracterizar por su elevado dinamismo, con tiempos de generación comprendidos entre horas y varios días o semanas, y poblaciones que son capaces de consumir el equivalente de sus recursos básicos completos en pocos días. El tamaño que presentan los individuos del zooplancton está comprendido entre unas 50 μm (0.05 mm) y algunos milímetros (generalmente menos de 2 mm).

Los grupos más importantes son protozoarios libres (ciliados y flagelados heterotróficos), rotíferos y microcrustáceos (Cladocera y Copepoda) como formas permanentes o euplanctónicas. A éstos se suma el meroplancton presente solo en su etapa larvaria, como moluscos, dípteros y peces (ictioplancton). Entre los primeros se destaca el mejillón dorado *Limnoperna fortunei*, especie invasora en nuestros ecosistemas acuáticos, y entre los segundos son frecuentes los Chaoboridae, larvas transparentes que durante el día son bentónicos y en la noche migran hacia el plancton.

12.1. COMPOSICIÓN

12.1.1. PROTOZOARIOS

Los protozoarios rara vez 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 período de disminu-

ción del fitoplancton a principios del verano. Los protozoarios pueden vivir en concentraciones bajas de oxígeno y aun en anaerobiosis, principalmente los ciliados que se desarrollan notablemente en aguas contaminadas y ricas en materia orgánica.

12.1.2. ROTÍFEROS

Su cuerpo (Fig. 12.1) es generalmente elongado y cubierto de una cutícula que en algunas especies se ensancha, denominándose lorica. El tamaño varía entre 30 y 2000 μm 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 de gran valor sistemático (Fig. 12.9). 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 el 90% de las especies conocidas, y Digononta. Aquélla incluye tres órdenes con 14 familias (ver 12.7.3). 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 ciclomorfosis. Se reproducen por partenogénesis alternada con reproducción sexual. Presentan dimorfismo sexual, siendo los machos de menor tamaño.

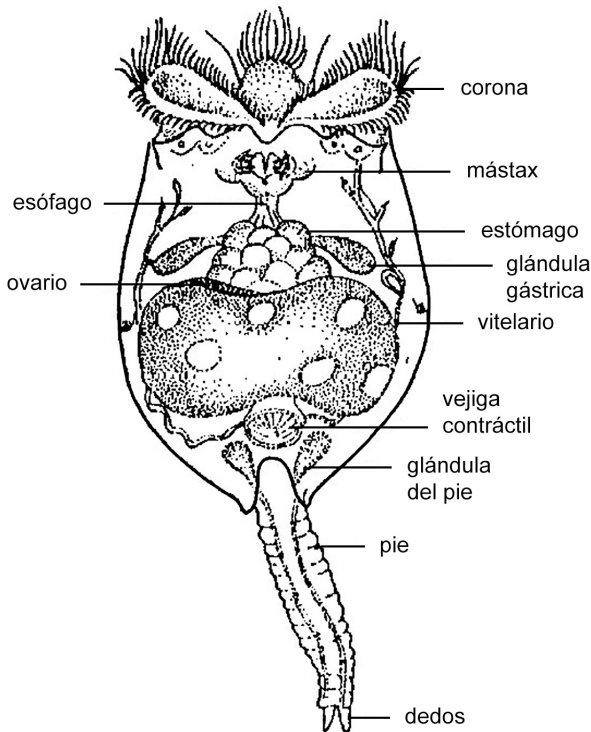


Figura 12.1. Esquema general de la estructura de un rotífero (modificado de José de Paggi 1995).

12.1.3. 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. 12.2). Incluye los Ctenopoda y los Anomopoda, con una y cinco familias conocidas en Uruguay respectivamente (ver 12.7.2).

La mayoría de las especies vive en la región litoral. Miden entre 0.2 y 3.0 mm 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, robustas y principalmente locomotoras, y en la región ventral las anténulas no segmentadas, menos robustas y 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.

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 dorsal del caparazón, donde se desarrollan hasta que emerge un juvenil semejante al adulto.

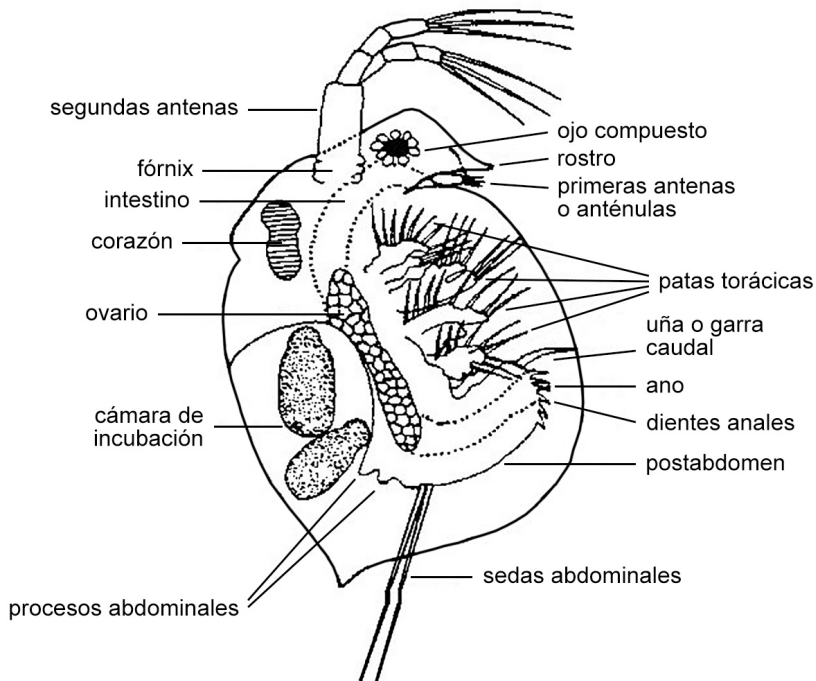


Figura 12.2. Esquema general de la estructura de un cladócero (modificado de González de Infante 1988).

12.1.4. 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. 12.3). 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, maxilulas y maxila. Los apéndices del primer segmento torácico, o maxilípedos, también intervienen en los procesos de alimentación.

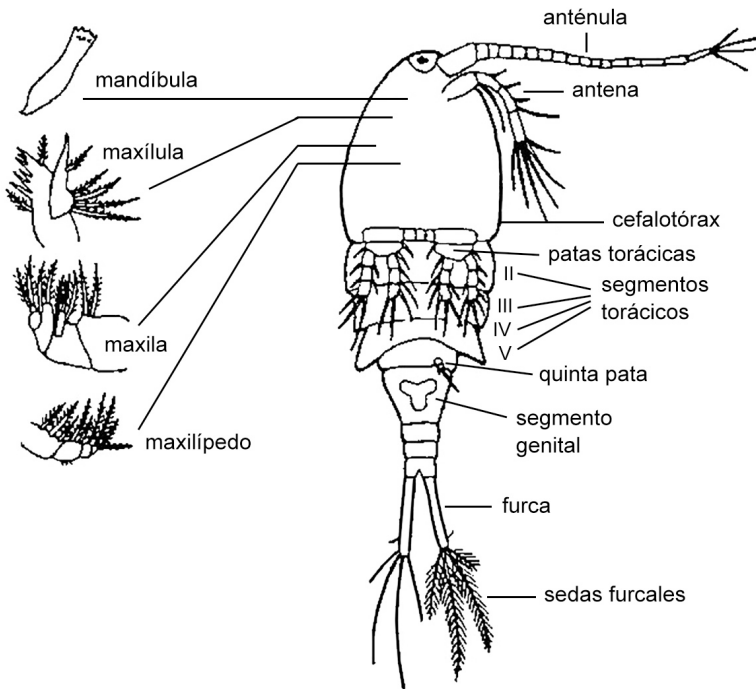


Figura 12.3. Esquema general y parcial de la estructura de un copépodo (modificado de González de Infante 1988).

Este orden incluye tres subórdenes: Calanoida, Ciclopoida y Harpacticoida (Fig. 12.4). Los calanoides son típicamente planctónicos 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 ovigero. Los machos presentan solamente una anténula derecha acodada para abrazar a la hembra durante la cópula (Fig. 12.4, 4).

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 (Fig. 12.4, 5). La hembra posee dos sacos ovígeros.

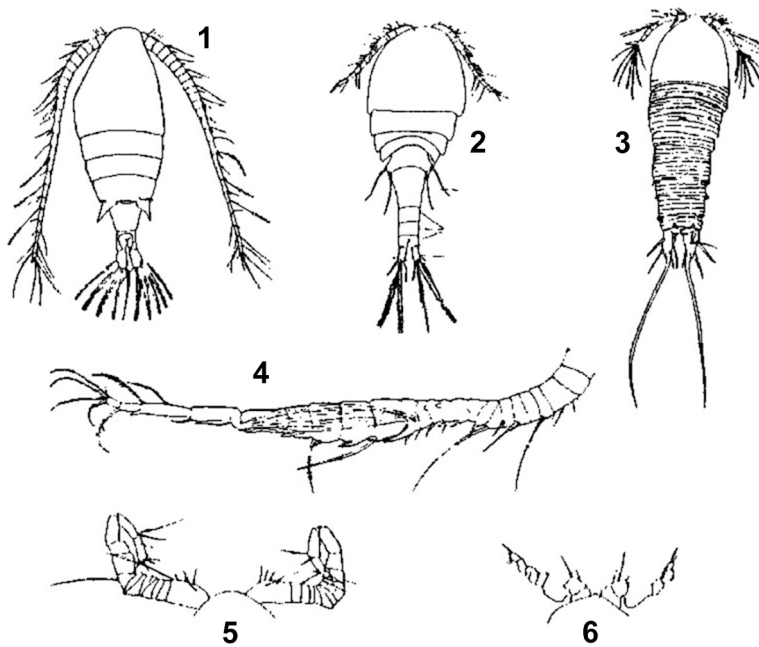


Figura 12.4. Esquemas de 1) Calanoida, 2) Cyclopoida, 3) Harpacticoida, 4) anténula derecha geniculada del macho de Calanoida, 5) *idem* de Cyclopoida y 6) *idem* de Harpacticoida (basado en Reid 1985 y Rocha & Matsumura-Tundisi 1976).

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 solo 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.

12.2. MUESTREO

Los muestreadores más comunes son las redes y las trampas, ya descritas en el capítulo 9. Las redes colectan y concentran simultáneamente la muestra. Aunque más apropiadas para el muestreo cualitativo, es posible estimar el volumen aproximado (V , en m^3) de agua filtrada según:

$$V = \pi r^2 d$$

donde r es el radio de la boca de la red y d la distancia de arrastre. 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 volumen teórico es el ofrecido a la boca de la red, y equivale al cilindro que define el aro de la boca en su

recorrido por el seno del líquido. 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 adecuadas para un control cualitativo rápido y primario. Tienen la ventaja de colectar muestras grandes e integradas. 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 turbulencia 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 pasa más agua por la red.

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 aun desde un bote pequeño. Las trampas de plancton más comunes son la Juday, que cierra mediante un mensajero, la Patalas y la Schindler (Fig. 3.2 c), 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).

12.3. FIJACIÓN Y MONTAJE

El fijador más común es el formaldehído 40% neutralizado con bórax o carbonato de magnesio, 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%. También puede utilizarse agua de mesa gasificada.

Una solución de 40 g l⁻¹ 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⁻¹ 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.

12.4. DENSIDAD

Si el número de individuos es grande, se deben tomar alicuotas 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 pera de goma y una pipeta graduada 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 Sedwick-Rafter de 1 ml (Fig. 9.3) y las cubetas Bogorov de 5 ml (Fig. 12.5), pero también se puede emplear cajas de Petri con fondo reticulado.

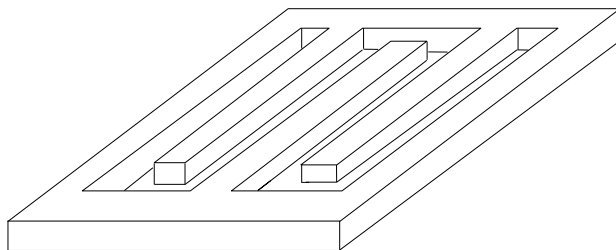


Figura 12.5. Cubeta abierta tipo Bogorov para el conteo de zooplancton.

Procedimiento

- 1) Dependiendo de la densidad de organismos, llevar la muestra concentrada 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 en la cámara enjuagando la misma 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 obtiene 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.
- 6) Calcular la concentración en el medio (C) en ind l⁻¹ según:

$$C = (a_1 + a_2 + \dots + a_n)V_m / [(v_1 + v_2 + \dots + v_n)V_f]$$

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 (en ml), v_1 , v_2 , v_n el volumen de las alícuotas (en ml) y V_f el volumen de agua filtrada en el campo (en l).

12.5. 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.

12.5.1. PESO SECO

Para estimar el peso seco en rotíferos se deben pesar juntos varios 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 la densidad de individuos en el sistema para así obtener la biomasa.

Para obtener un nivel de precisión adecuado, se recomienda trabajar con réplicas cuyo coeficiente de variación resulte menor a 17%.

12.5.2. 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. Para las mediciones se usa un micrómetro ocular previamente calibrado (Cap. 9). 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 a la biomasa.

12.5.3. RELACIÓN LARGO-PESO

La técnica más frecuente en microcrustáceos consiste en determinar el 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.

12.6. 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 temporario para el individuo que lo sintetiza (exuvias); 2) crecimiento individual, y 3) 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) distinguen entre los 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.

12.6.1. 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 (ΔN) 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):

$$P = b N W$$

donde NW representa la biomasa de la población.

12.6.2. 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 (ΔW_t), la producción (P_t) se expresa por la fórmula de Bojensen-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:

$$P = \int_{W_i}^{W_f} N dW$$

12.6.3. 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 $\Delta W_1 \dots \Delta W_n$ el aumento de peso entre diferentes estadios.

12.7. CLAVES PARA FAMILIAS REGISTRADAS EN URUGUAY

Las siguientes claves se confeccionaron sobre la base de Brook (1959), Ringuélet (1958), Olivier (1962), Ruttner-Kolisko (1974), Koste (1978), Pennak (1989), González de Infante (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).

12.7.1. COPEPODA (Fig. 12.6)

- 1 a. Cefalotórax y abdomen de diferente ancho y longitud 2
- b. Cefalotórax y abdomen casi igualesorden 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 ovígeroorden 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 dos o tres cerdas o ausente CYCLOPIDAE 5
- 3 a. Anténulas de 20 a 22 artejos. Del primero al cuarto par de patas torácicas con endópodos triarticulados. Quinta pata de la hembra sin endópodos y del macho con endópodos de un artejo. Furca de ramas largasPSEUDODIAPTOMIDAE
- 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, solo el derecho termina en gancho; endópodos rudimentarios. Quinta pata de la hembra con el tercer 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 tercer artejo exopodial sin proceso espiniforme desarrollado
 BOECKELLIDAE
- 5 a. Artejo terminal de la quinta pata de la hembra con tres cerdas o espinas. Primero al cuarto par de patas triarticuladas..... Subfamilia EUCYCLOPINAE
- b. Artejo terminal de la quinta pata de la hembra con una o dos cerdas o espinas. Primero al cuarto par de patas bi o triarticuladas..... Subfamilia CYCLOPINAE

12.7.2. CLADOCERA (Fig. 12.7)

- 1 a. Cinco o seis pares de patas, la primera y segunda prensiles y las restantes foliáceas. Antenas con cerdas cortas y poco 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
- c. Antenas muy robustas, con dos artejos en la rama dorsal con cerdas insertas en la cara anterior y tres artejos en la rama 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. Postabdomen 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. Postabdomen de forma variada, sin ninguna de las características antes citadas. Anténulas insertas en el extremo anteroventral o cara ventral de la cabeza MACROTHRICIDAE

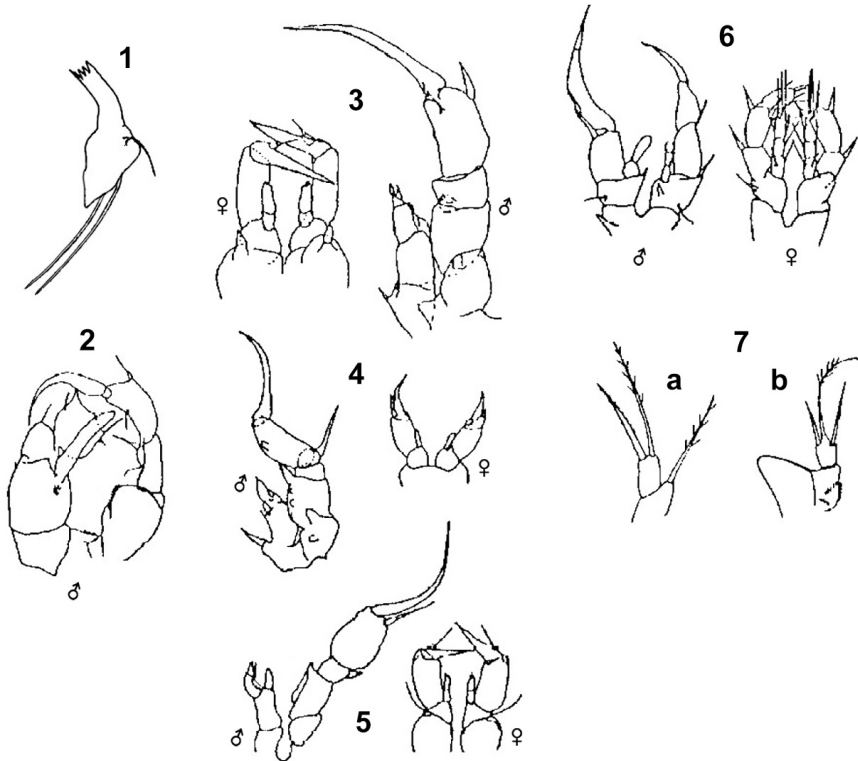


Figura 12.6. Palpo mandibular de diferentes copépodos: 1) Cyclopoidae; 2) Pseudodiaptomidae (*Pseudodiaptomus richardi inequalis*); 3) Diaptomidae (*Notodiaptomus* sp.); 4) Diaptomidae (*Odontodiaptomus michaelsoni*); 5) Diaptomidae (*Diaptomus* sp.); 6) Boeckelliidae (*Boeckella* sp.); 7 a) Cyclopinae (*Thermocyclops* sp.), y 7 b) Eucyclopinae (*Macrocyclops* sp.) (basado en Reid 1985 y Battistoni 1995).

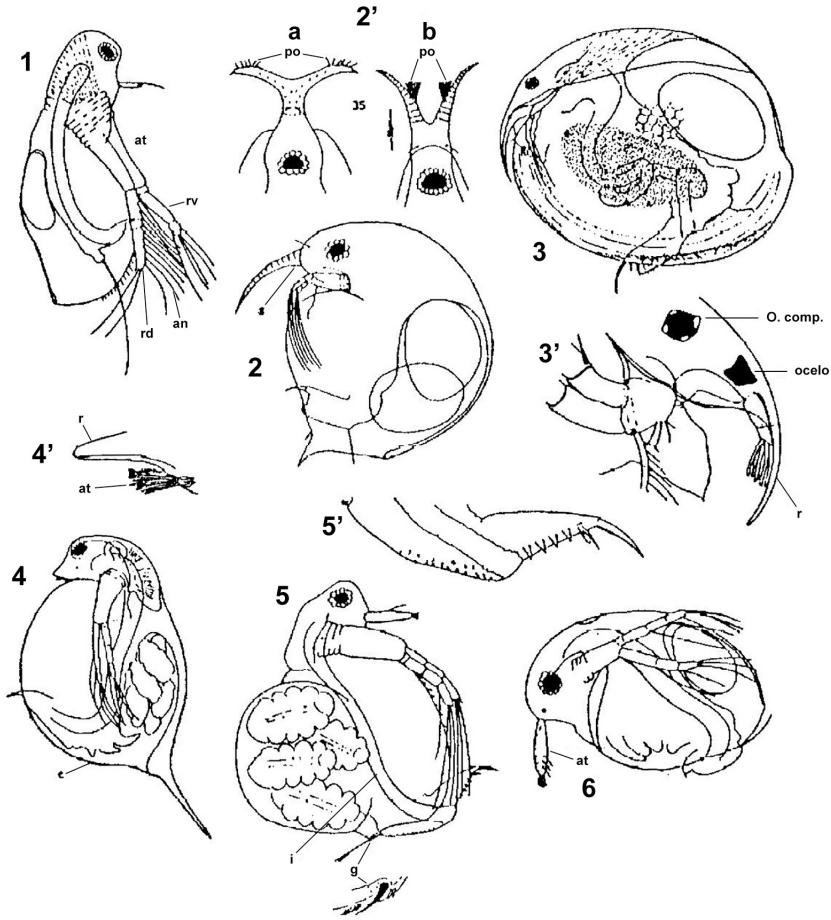


Figura 12.7. Ejemplos de diversas familias de cladóceros del cono sur de América: 1) Sidiidae (*Diaphanosoma fluviatile*); rv: rama ventral; rd: rama dorsal de la antena; an: antena; at: anténula. 2) Bosminidae (*Bosmina hagdmani*); 2') parte de la cabeza y anténulas (vista dorsal); a: *Bosminopsis*; b: *Bosmina*; po: papilas olfatorias. 3) Chydoridae (*Pseudochydorus globosus*); 3') detalle de la cabeza, anténulas, rostro y ojo compuesto. 4) Daphnidae (*Daphnia spinulata*); 4') r: rostro; at: anténula. 5) Moinidae (*Moina minuta*); i: intestino; g: gancho valvar; 5') postabdomen. 6) Macrothricidae (*Guernella raphaelis*) (modificado de Paggi 1995).

12.7.3. ROTIFERA (Fig. 12.8)

- 1 a. Con dos ovarios, *trophi* ramado (Fig. 12.9), siempre con pie, con o sin dedos Clase DIGONONTA Orden BDELLOIDEA
- b. Con un ovario, *trophi* de otro tipo, nunca ramado (maleorramado, maleado, incurvado, forcipado, uncinado, virgado o cardado, Fig. 12.9) con o sin pie Clase MONOGONONTA 2
- 2 a. *Trophi* maleorramado 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 cilias en
 forma de herradura, con una brecha o porción sin cilias CONOCHILIDAE
- 6 a. Cuerpo cónico sin pie, con seis apéndices como brazos, con anchas bandas
 musculares HEXARTHRIIDAE
 b. Cuerpo más bien cilíndrico y corto, con dos espinas anteriores que nacen por
 debajo de la corona, generalmente más largas que el cuerpo, una o dos espinas
 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 tres segmentos. General-
 mente con seis 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
 dos laterales BRACHIONIDAE
 b. Siempre con pie corto y dedos mucho más largos que el mismo 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 separando
 la placa dorsal de la ventral o un surco ventral 10
- 10 a. Pie con dos segmentos, dos dedos más largos que el pie. Surcos laterales se-
 parando la placa dorsal de la ventral, extremos del margen anterior de las
 placas terminados en espinitas más o menos desarrolladas. Cuerpo fuerte-
 mente comprimido dorsoventralmente LECANIDAE
 b. Pie con tres segmentos. Surco ventral a lo largo del todo el cuerpo o con una
 profunda incisión por la cual sale el pie, o bien con un escudo semicircular,
 transparente, que cubre la corona COLURELLIDAE
- 11 a. *Trophi* incudado. Cuerpo sacciforme, transparente, sin loriga, con o sin pie
 ASPLANCHNIDAE
 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, cuatro estiletos en la corona y extensiones laterales a modo
 de aurículas con cilias, o con 12 apéndices foliáceos 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
 dos dedos cortos SYNCHAETIDAE

- 14 a. Cuerpo cilíndrico, lorica de una sola pieza. Dedos filiformes, cortos y de igual longitud, o solo uno bien desarrollado y el otro atrofiado. Corona ubicada apicalmente.....TRICHOCERCIDAE
- b. Cuerpo ahusado, sin lorica. Campo bucal de la corona ubicado ventralmente. En algunas especies, grupos de cilias sobre aurículas laterales. Pie con dedos cortos..... NOTOMMATIDAE

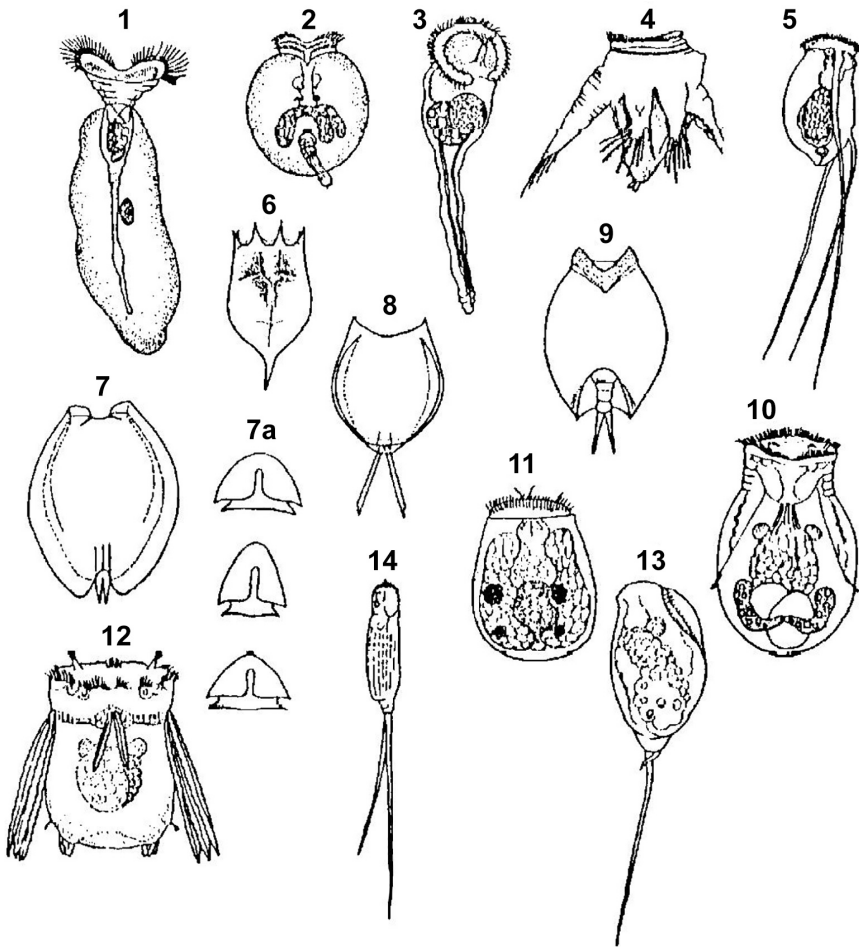


Figura 12.8. Ejemplos de diversas familias de Rotifera: 1) Collothecidae (*Collotheca mutabilis*); 2) Testudinellidae (*Testudinella patina*); 3) Conochilidae (*Conochilus unicornis*); 4) Hexarthridae (*Hexarthra intermedia*); 5) Filiniidae (*Filinia longiseta*); 6) Brachionidae (*Keratella cochlearis*); 7) Euchlanidae (*Euchlanis dilatata*); 7a) 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*); 14) Notommatidae (*Monommata longiseta*) (modificado de José de Paggi 1995).

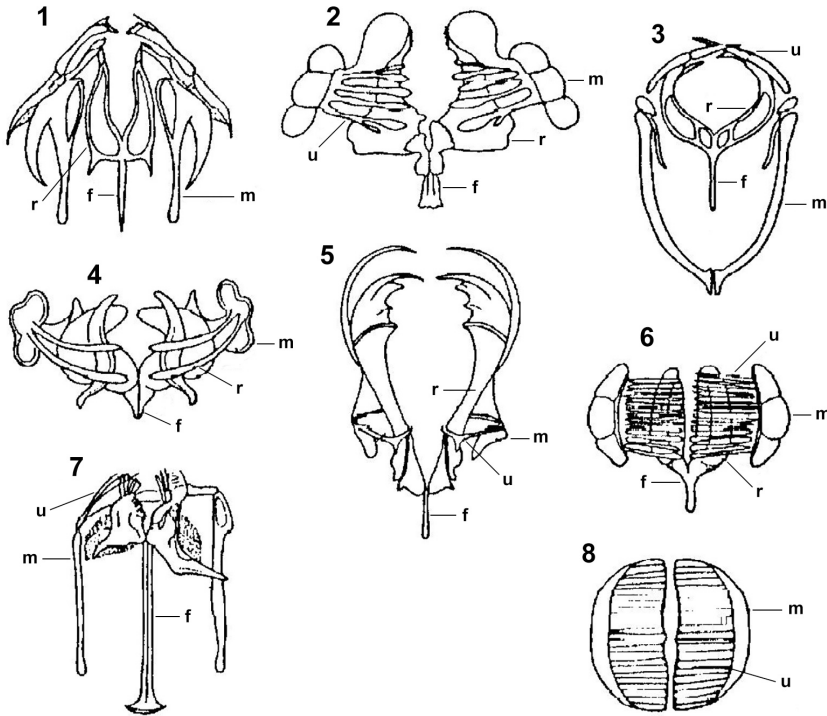


Figura 12.9. Tipos de *trophi*: 1) cardado; 2) maleado; 3) forcipado; 4) uncinado; 5) incudado; 6) maleorramado; 7) virgado; 8) ramado. Estructuras: f: fulcrum; m: manubrio; r: rami; u: uncus (modificado de José de Paggi 1995).

12.8. RESULTADOS

12.8.1 VARIACIÓN MENSUAL DEL ZOOPLANCTON EN UN LAGO

El comportamiento estacional de la abundancia del zooplancton en el lago Ton-Ton (Canelones, 34°52' S, 56°02' W, Fabián 1995) es típicamente bimodal con pulsos en primavera y otoño (Fig. 12.10). Esta comunidad fue dominada por 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.

12.8.2. ZOOPLANCTON DE DOS LAGOS ARTIFICIALES

En la tabla 12.1 se comparan algunas características del lago Ton-Ton con el reservorio del Cisne (33°44' S, 55°49' W). En ambos ambientes la diversidad del zooplancton presenta valores similares entre sí, y normales en comparación con otros ambientes de la región (Paggi 1980). También la composición es muy similar. Esta similitud puede cuantificarse como el número de especies comunes respecto al total de especies o géneros en ambos sistemas ($9/17 = 53\%$).

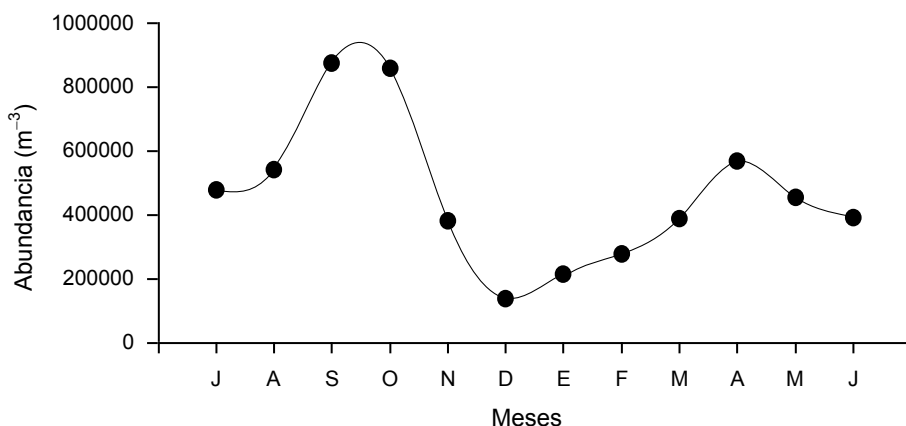


Figura 12.10. Variación de la abundancia total de zooplancton en el lago Ton-Ton entre julio de 1988 y junio de 1999 (Fabián 1995).

Tabla 12.1. 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, 1995). La abundancia relativa entre paréntesis corresponde al porcentaje del total de grupos incluyendo rotíferos. s/d: sin datos.

CARACTERÍSTICAS	LAGO TON-TON	EMBALSE DEL CISNE
Superficie (ha)	13.6	48.5
Estado trófico	Eutrófico	Mesotrófico
Régimen térmico	Monomíctico cálido	Polimíctico tibiocontinuuo
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.

12.8.3 ABUNDANCIA Y BIOMASA DEL ZOOPLANCTON EN LOS EMBALSES DEL RÍO NEGRO

El río Negro es el mayor sistema lótico de Uruguay (71280 km², 96% de la cuenca del río Uruguay). Tiene sus nacientes en Brasil y corre en dirección NE-SW a lo largo de 690 km hacia el río Uruguay. Presenta tres grandes embalses: Bonete (Bo), Baygorria (By) y Palmar (Pa) construidos para la producción de energía. Los embalses presentan características eutróficas con altos valores de fósforo total promedio

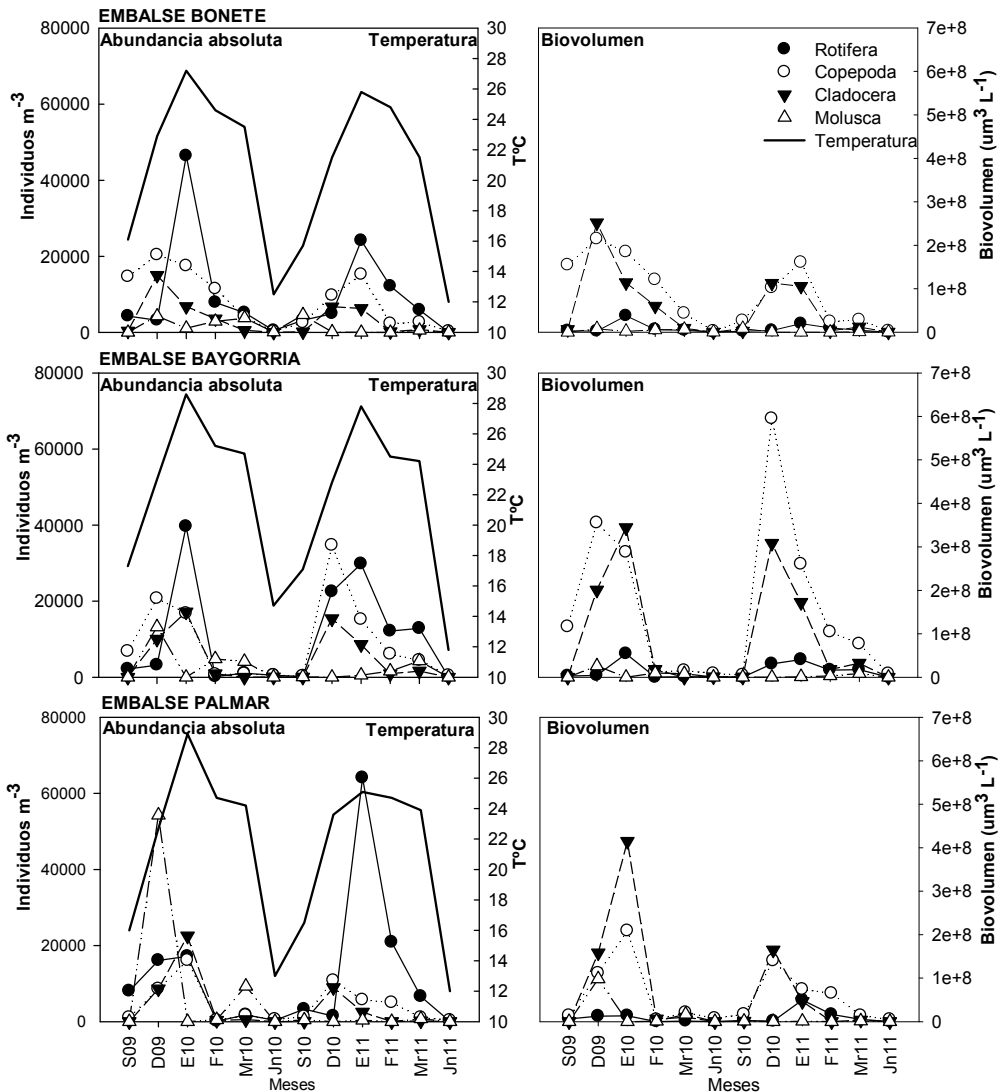


Figura 12.11. Variación interanual de la abundancia, biovolumen de la comunidad de zooplancton y temperatura (°C) en los tres embalses del río Negro.

(Bo = 85 $\mu\text{g l}^{-1}$, By = 94 $\mu\text{g l}^{-1}$, Pa = 134 $\mu\text{g l}^{-1}$), nitrógeno total (Bo = 547 $\mu\text{g l}^{-1}$, By = 554 $\mu\text{g l}^{-1}$, Pa = 909 $\mu\text{g l}^{-1}$) y dominancia de cianobacterias (Chalar *et al.* 2010).

Las muestras cuantitativas y cualitativas de zooplancton se obtuvieron mediante arrastres verticales y horizontales, respectivamente, con una red de 30 cm de diámetro y 68 μm de apertura de malla. La biomasa se estimó como biovolumen ($\mu\text{m}^3 \text{l}^{-1}$). Se obtuvo una medida de cada organismo ajustada a una elipse de revolución, cuyo diámetro mayor corresponde a la mayor longitud entre dos puntos extremos y el diámetro menor a la mayor perpendicular al diámetro mayor entre dos extremos opuestos, mediante la expresión:

$$V = (d^2 D \pi) / 6$$

donde V es el volumen (μm^3), d el diámetro menor (μm) y D el diámetro mayor (μm) (Gilabert 2001). Así, el volumen individual (μm^3) multiplicado por el número total de organismos de esa especie (org. l^{-1}), nos da una estimación de la biomasa expresada como biovolumen.

Durante el período analizado (setiembre de 2009 - junio de 2011) se registraron en los tres embalses un total de 42 taxa discriminados en 28 Rotífera, 9 Cladocera, 4 Copepoda y 1 Mollusca. En los tres embalses la comunidad zooplanctónica mostró un claro comportamiento estacional, con las abundancias máximas en verano y las mínimas en invierno.

A pesar de la dominancia numérica de los rotíferos en los tres embalses, los microcrustáceos, principalmente copépodos, dominaron en términos de biomasa durante el período estudiado. Ello nos indica que los microcrustáceos son la principal fuente disponible de materia orgánica para los niveles tróficos superiores (principalmente peces), y una vía importante de transferencia de materiales y reciclaje de nutrientes (excreción, sedimentación, descomposición) en el ecosistema. En Palmar los cladóceros fueron los que contribuyeron más a la biomasa total del zooplancton.

ZOOBENTOS

RAFAEL AROCENA

EL ZOOBENTOS ES LA COMUNIDAD DE INVERTEBRADOS QUE HABITA LA INTER-fase 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 éstas es preferentemente denominada macrofitobentos. Ocasionalmente los fondos no presentan acumulación de sedimentos sino lechos rocosos, y tampoco las orillas, que suelen estar vegetadas. Cualquiera de estos sustratos, así como los artificiales, suelen tener una fauna de invertebrados que integran el zoobentos.

Estos organismos pueden habitar sobre el fondo e incluso en el agua sobrenadante (epibentos), aunque en estrecha relación con el sedimento, o bien dentro del mismo (infauna o endobentos). Según el sustrato sea roca, arena o lodo, se distingue un epiliton, epi/endopsammon y epi/endopelon, respectivamente.

En los ríos, y fundamentalmente en los arroyos, los invertebrados están tanto en el fondo como en la corriente de agua, que les proporciona sostén y un medio de transporte llamado deriva fluvial. Por ello es común referirse a esta comunidad como la de los invertebrados más que como zoobentos.

Por su posición en el ecosistema acuático, estos organismos se alimentan principalmente de la materia orgánica particulada que sedimenta. De este modo, aprovechan parte importante de los desechos que de no ser así se perderían depositados y enterrados en el fondo. Al ser un importante alimento de peces y otros vertebrados, los invertebrados bentónicos reincorporan a la red trófica dicha materia orgánica. También facilitan la descomposición de la misma al fragmentarla durante su propia alimentación o al digerirla y liberarla en sus heces.

Este rol ecológico, junto a su permanencia en el lugar, su ciclo de vida largo, su tamaño y abundancia, entre otros factores, hacen de estos organismos buenos bioindicadores de la calidad del agua.

Es metodológicamente útil una clasificación por tamaños en a) microbentos, organismos menores a 100 o 200 μm como los protozoos, b) meiobentos, organismos de hasta 0.5 o 1 mm como los rotíferos, nemátodos, copépodos y ostrácodos, y c) macrobentos, principalmente oligoquetos, moluscos e insectos.

13.1. COMPOSICIÓN TAXONÓMICA

En las figuras 13.1 a 13.3 se presentan ejemplos de varios grupos de invertebrados bentónicos. A continuación se realiza una revisión de sus características morfológicas y ecológicas más importantes. Asimismo se incluyen las referencias a varios registros realizados en Uruguay, excluyendo el estuario del Río de la Plata, para lo cual se sugiere consultar a Scarabino (2006) entre otros.

Los eucariotas unicelulares que antes conformaban el *phylum* Protozoa del reino animal, actualmente constituyen varios *phyla* en el reino Protista. 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. Por su tamaño microscópico y su rol ecológico se los incluye en la comunidad microbiana (ver referencias en el capítulo 8) y difícilmente sean estudiados como parte del zoobentos.

13.1.1. ESPONJAS

Las esponjas (*phylum* Porifera) de la clase Demospongiae, caracterizada por sus fibras de espongina y espículas de sílice, incluyen al orden Haplosclerida y éste a siete familias dulceacuícolas con <300 especies (Frost 2001). Los grandes ríos sudamericanos, como buenos corredores ecológicos, comparten muchas especies de las familias Spongillidae, Potamolepidae y Metaniidae, del suborden Spongillina (Ezcurra de Drago 2004). Sus larvas planctónicas se fijan en cualquier sustrato estable en aguas someras. 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, y Ezcurra & Bonetto (1969) citaron otras 5 para el río Uruguay.

13.1.2. CELEENTERADOS

El *phylum* Cnidaria (antes Coelenterata) incluye a las inconspicuas hidras (clase Hydrozoa), pólipos típicos de estanques, cursos limpios y litorales lacustres (Fig. 13.1). Se adhieren a sustratos duros, generalmente a menos de 1.5 m de profundidad, pero faltan en fondos blandos y aguas pobres en oxígeno. Las hidras no toleran metales pesados pero sí eutrofización. Otros celenterados son las dos medusas de agua dulce, anémonas, corales y otros pólipos de distintos órdenes.

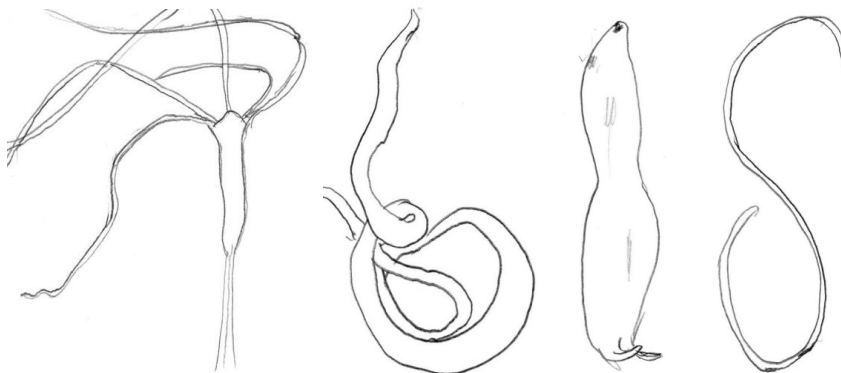


Figura 13.1. De izquierda a derecha: hidra, nemertino, gastrotrico y nematomorfo.

Por su simpleza y fácil cultivo, las hidras son muy usadas en ecotoxicología (Slobodkin & Bossert 2010). Zamponi (1995) y Deserti & Zamponi (2011) mencionan las especies citadas por Cordero en 1939, Cordero (1941) y Dioni (1974) para Uruguay, como *Chlorohydra viridissima* e *Hydra attenuata thomsoni*.

13.1.3. GUSANOS NO SEGMENTADOS

Los *phyla* Platyhelminthes y Nemertea incluyen importantes predadores hermafroditas de desarrollo directo, en ocasiones abundantes en las aguas dulces (Kolasa & Tyler 2010).

PLATELMINTOS

La clase Turbellaria incluye especies dulceacuícolas de distintos órdenes. Principalmente las planarias (orden Tricladida) están en diversos ambientes someros bien oxigenados, usualmente bajo las piedras (Fig. 13.2).

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. Posteriormente, Kawakatsu *et al.* (1992) describen *Dugesia ururiograndeana*, proveniente de la Quebrada de los Cuervos (Treinta y Tres).

NEMERTINOS

Los gusanos proboscídeos abundan entre la vegetación y los detritos litorales de lagos y arroyos. Son difíciles de encontrar por su agregación extrema (Fig. 13.1). Se conocen unas seis especies en el mundo.

13.1.4. BRIOZOARIOS

Incluyen los *phyla* Ectoprocta y Entoprocta. Los ectoproctos comprenden unas 50 especies dulceacuícolas. Se encuentran en aguas cálidas, oxigenadas y someras de estanques, lagos y arroyos lentos, debajo de ramas y piedras. Muchas especies comunes toleran la turbidez. Se adhieren sobre casi cualquier material sólido abiótico. Mañé-Garzón (1964) registró la presencia de *Hislopia corderoi* y del único endoprocto dulceacuícola conocido, *Umatella gracilis*, sobre bivalvos, y hace mención a una colección de briozoarios reunida por Cordero. Bonetto & Cordiviola (1965) registraron *Fredericella australiensis* en el río Uruguay.

13.1.5. 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. Las distintas especies se adaptan a diversas condiciones. Algunos toleran anaerobiosis (<1 ppm) por cortos períodos. Son usados en toxicología gracias a sus huevos de resistencia y facilidad de cultivo (Wallace & Snell 2010).

13.1.6. GASTROTRICOS

De sus dos órdenes, Chaetonotoidea es predominantemente dulceacuícola (Fig. 13.1). Tres de sus cinco familias tienen amplia distribución (Balsamo *et al.* 2008).

Son gusanos aplanados ventralmente, de 50 a 800 μm de largo, incoloros, ampliamente distribuidos y abundantes, sobre todo en sedimentos orgánicos. Habitan el sedimento fino, la vegetación y los detritos de las aguas estancadas, asociados a nemátodos, rotíferos y pequeños oligoquetos, y también arroyos limpios. Soportan bajas tensiones de oxígeno y probablemente anaerobiosis temporaria. *Turbanella corderoi* fue citada para el intermareal montevideano por Dioni en 1961 (Scarabino 2006).

13.1.7. 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 (Fig. 13.1). Poinar (2010) menciona una decena de géneros. De Villalobos *et al.* (2000) mencionan *Paragordius varius* para Uruguay descrito por Carvalho (1946), quien también reporta *Chordodes brasiliensis*.

13.1.8. NEMÁTODOS

Similares y relacionados con los anteriores (Poinar 2010), incluyen 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 orgánicos de una gran variedad de hábitats. Son tolerantes en el sedimento pobre en oxígeno, pero es alrededor de las raíces de las plantas acuáticas donde ocurre una gran variedad de especies. Muchas especies desaparecen donde hay aguas de saneamiento debido a su alta carga bacteriana (Poinar 2010).

13.1.9. TARDÍGRADOS

Hay unas 800 especies acuáticas y terrestres, cosmopolitas, ocasionales e inconspicuas (250-500 μm) de “ositos de agua”. Viven entre la vegetación litoral e intersticios arenosos de cuerpos lénticos y lóticos. Claps & Rossi (1997) identificaron 28 especies acuáticas y terrestres de 10 géneros y 4 familias de Uruguay. De ellas, 21 provenían de cursos de agua.

13.1.10. ANÉLIDOS

OLIGOQUETOS

Constituyen entre el 80 y 100% de la fauna de sustratos arenosos y lodosos, pero están presentes en todos los ambientes, con una distribución fuertemente agregada. Los tubificidos 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 nauidos tienden a reemplazarlos. Según revisión de Gavrilov (1977) se conocían en Uruguay 33 especies, citadas en su mayoría por Cordero. Luego se registran 6 en el arroyo Toledo (Arocena & Chalar 1989) y 2 especies más (Arocena 1996), llevando a 41 el número de especies conocidas. Los estudios en arroyos de la cuenca del Santa Lucía (Arocena *et al.* 2008) sumaron 6 géneros más y otros 4 los de la cuenca de Paso Severino (datos sin publicar de R. Arocena).

Limnodrilus es, en general, el género más frecuente y abundante en diversos ambientes como arroyos (Arocena 1996), bañados (Clemente & Arocena 2003) y ríos (Boccardi 2012).

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.

En reiteradas ocasiones y diversos sitios de la Laguna de Rocha y sus afluentes se encontraron abundantes *Nephtys fluviatilis*, *Heteromastus similis* y *Laeonereis culveri* (Arocena 2007; Arocena & Rodríguez 2011; Arocena & Prat 2006; Arocena *et al.* 2000). Las mismas especies fueron encontradas en el estuario del arroyo Pando (Passadore *et al.* 2007).

HIRUDÍNEOS

Las sanguijuelas son predominantemente dulceacuícolas, de estanques, litorales lacustres y arroyos lentos. Las formas libres son predatoras y 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.

13.1.11. MOLUSCOS

Scarabino (2004) reporta 97 especies dulceacuícolas nativas más las introducidas *Limnoperna fortunei* y *Corbicula fluminea*, que tienen un considerable impacto en la biodiversidad local (Masciadri *et al.* 2010). Solo 2 clases están en el agua dulce.

GASTERÓPODOS

Aunque presentes en casi cualquier tipo de aguas, 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 o fuera del agua. Figueiras (1964, 1965) describió las 42 especies de operculados (subclase Prosobranchia) y 21 de pulmonados (Pulmonata) conocidas hasta entonces en Uruguay. Scarabino (2004) reporta 33 y 19 respectivamente, distribuidas en 3 y 5 familias.

Los operculados Ampullariidae, Cochliopidae (Hydrobiidae) y Lithoglyphidae (Hydrobiidae) y los pulmonados Planorbidae y Physidae son comunes en gran variedad de ambientes. Otros pulmonados como Lymnaeidae se encuentran en aguas no contaminadas, con poca corriente y muchas plantas, Ancyliidae también con poca corriente y Succineidae en sistemas lóticos, litorales, sobre la vegetación e incluso en ausencia de agua (Cuezzo 2009).

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. Éstos 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 lograr una gran dispersión. Además, resisten la desecación y pueden enterrarse hasta 25 cm en el sedimento blando.

Figueiras (1965) hizo 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 en Uruguay de *Corbicula*, y Scarabino & Verde (1995) la de *Limnoperna fortunei*.

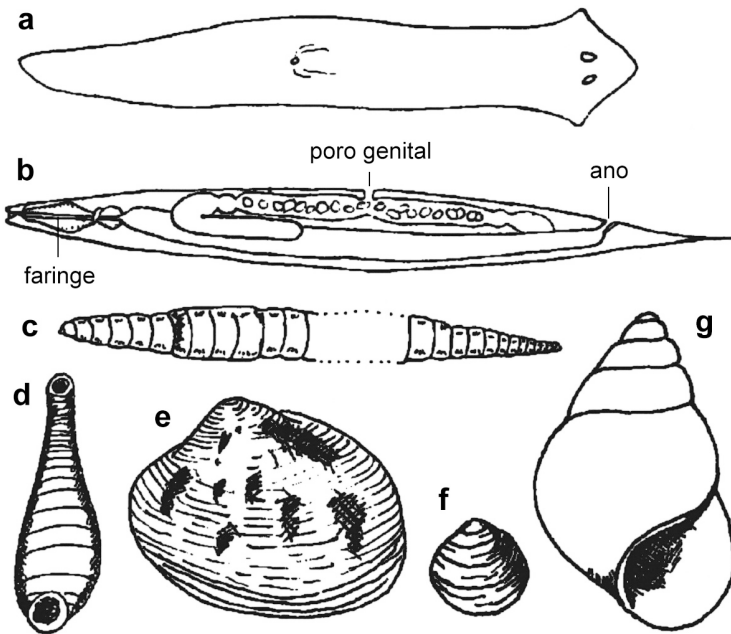


Figura 13.2. Esquemas de algunos representantes del zoobentos: a) planaria; b) nematodo; c) oligoqueto; d) hirudineo; e) y f) bivalvos Sphaeriidae; g) gasterópodo.

13.1.12. CRUSTÁCEOS

En el grupo artificial Entomostraca, los Eubranchiopoda son microscópicos habitantes de aguas temporales. Los Cladocera están en casi cualquier tipo de hábitat, principalmente integrando el plancton 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 –mayormente planctónicos– 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 muy contaminadas, más o menos confinados al sustrato somero. La única especie dulceacuicola reportada en Uruguay es *Hyalella curvispina*.

Los Decapoda también ocurren en una gran variedad de ambientes principalmente someros, e incluyen macruros o camarones de agua dulce (Parastacidae y Palaemonidae), anomuros (Aeglidae) y brachiuros o cangrejos (Trichodactylidae).

En los bañados de Rocha, Verdi (2000) registró 6 especies de decápodos de 4 familias: Parastacidae (*Parastacus varicosus*), Palaemonidae (3 especies), Aeglidae (*Aegla uruguayana*) y Trichodactylidae (*Trychodactylus panoplus*). En la Laguna de Rocha y sus afluentes habita el cangrejo *Cyrtograpsus* spp. (Arocena & Rodríguez 2011; Arocena *et al.* 2000). En la cuenca del Santa Lucía se encontraron los palemónidos Palaemonetes y Macrobrachium (Arocena *et al.* 2008).

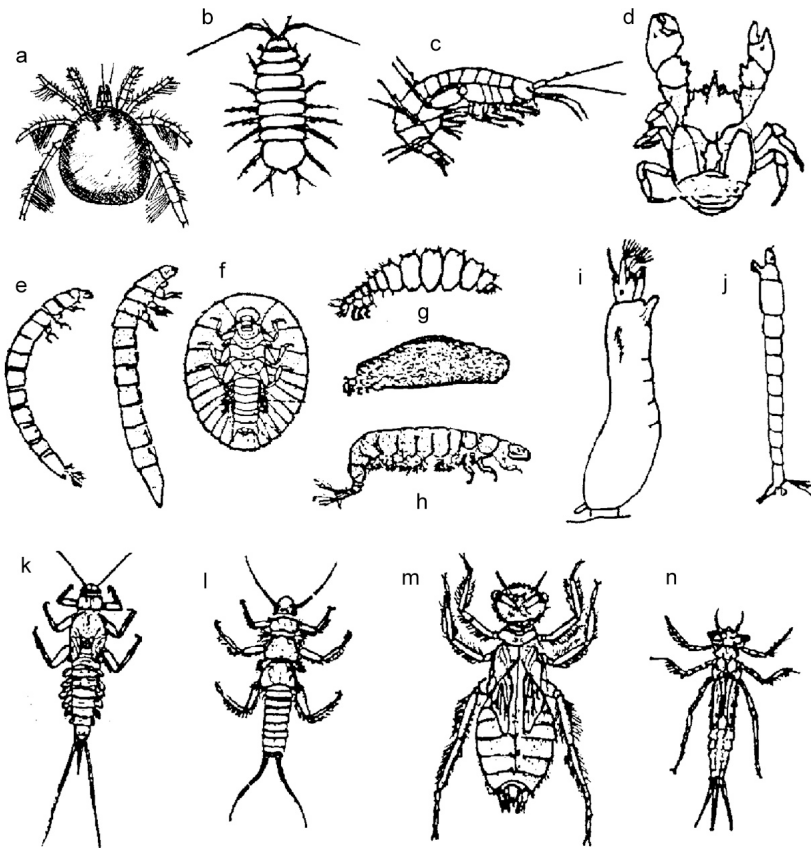


Figura 13.3. Esquemas de algunos artrópodos del zoobentos: a) hidracárido; b) isópodo; c) anfípodo; d) decápodo *Aegla*; e) coleóptero Elmidae; f) coleóptero Psephenidae adulto y larva; g) tricóptero Hydroptilidae con su habitáculo; h) tricóptero Hydropsichidae; i) díptero Simuliidae; j) díptero Chironomidae; k) efemeróptero; l) plecóptero; m) odonato Anisoptera; n) odonato Zygoptera.

13.1.13. HIDRACÁRIDOS

Este grupo artificial reúne las familias de ácaros adaptadas al agua dulce. Ocupan muchos tipos de hábitat, pero prefieren fondos someros de arroyos y estanques y los litorales con vegetación.

13.1.14. INSECTOS

Los hemimetábolos acuáticos tienen ninfas caminadoras que respiran por branquias abdominales (Ephemeroptera), torácicas (Plecoptera) o caudales (Odonata). Los paurometábolos (Hemiptera) son acuáticos todo el ciclo de vida. Ninfas y adultos se asemejan, excepto por el tamaño y grado de esclerotización. En los holometábolos solo 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 o debajo de ellas, aunque algunos se entierran en los sedimentos blandos de sistemas lénticos. Su amplio rango de tolerancias los hace buenos bioindicadores de la calidad del agua. De las 14 familias sudamericanas (Dominguez *et al.* 2009), 5 se encontraron en la cuenca del Santa Lucía (Arocena *et al.* 2008), sumando los comunes y bien distribuidos Caenidae a las cuatro reconocidas en Uruguay por Bentancourt *et al.* (2009).

Los plecópteros viven bajo las piedras y entre detritos vegetales, en aguas corrientes bien oxigenadas y frías. Se conocen en Uruguay las 2 familias más amplias de Sudamérica (Gripopterygidae y Perlidae). Los odonatos son predadores comunes entre la vegetación acuática. Se subdividen en Zygoptera y Anisoptera con 3 familias cada una en todo el país (Bentancourt *et al.* 2009) y en la cuenca del Santa Lucía (Arocena *et al.* 2008).

Los hemípteros son predadores y carroñeros de gran variedad de ambientes. Los semiacuáticos Gerrnomorpha incluyen 6 familias sudamericanas, 5 en Uruguay, 3 de ellas registradas en la cuenca del Santa Lucía, donde hay 5 (6 en Uruguay) de las 10 Nepomorpha sudamericanas (Mazzucconi *et al.* 2009; Arocena *et al.* 2008).

Los coleópteros exhiben diversidad de hábitos en aguas someras con mucha vegetación y oxígeno. Los adultos pueden respirar en el aire, de una burbuja atrapada en el vientre, bajo los élitros o en la ampolla rectal. Se subdividen en Adephaga y Polyphaga, con 2 y 7 familias en la cuenca del Santa Lucía, que aumentaron a 4 y 12 con los registros en afluentes de los bañados de Farrapos (com. pers. B. Bazzoni) y de Paso Severino (datos sin publicar de R. Arocena).

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. A las 7 familias registradas en Uruguay por Bentancourt *et al.* (2009), se deben sumar Limnephilidae y Odontoceridae (Arocena *et al.* 2008).

Los dípteros habitan varios hábitats, a veces en grandes cantidades. Incluyen los subórdenes Nematocera y Brachycera con 7 y 3 familias, respectivamente, en la cuenca del Santa Lucía de las 8 y 7 mencionadas por Bentancourt *et al.* (2009) para Uruguay. La familia Chironomidae suele ser la más frecuente y abundante, y domina junto con tubificidos en sedimentos orgánicos pobres en oxígeno.

13.2. MUESTREO

El muestreo cuantitativo del zoobentos 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 la mayor eficiencia en la técnica de muestreo selec-

cionada. 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 repetibilidad 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 separar los organismos de su sustrato que para su colecta. Para lograr determinada precisión, a igual abundancia de organismos, la eficiencia es mayor cuanto mayor es el número de muestras de sedimento de menor tamaño que con pocas de mayor tamaño (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 casi exclusivamente a éstos.

Los primeros, ya descritos en el capítulo 5, son los que permiten capturar la endofauna e incluso estudiar su distribución vertical. Los muestreadores más utilizados son la draga Ekman y los *corers* o núcleos 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, tomando en cada hábitat un número de réplicas proporcional a la extensión del mismo. 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 solo los organismos (Fig. 13.4), figuran distintos tipos de redes de tamaño de malla conocido (0.25, 0.5, 1 mm). 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 cm²) 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.

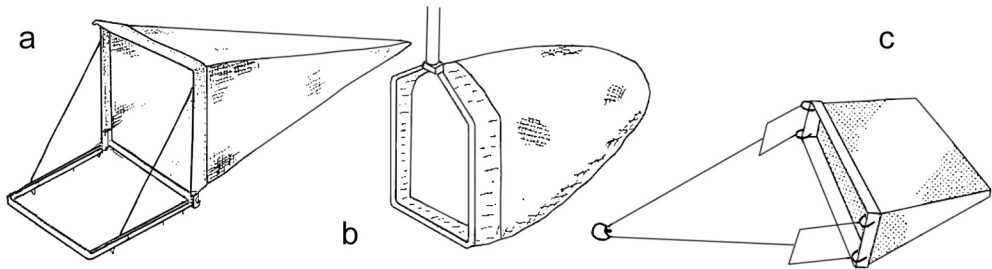


Figura 13.4. Muestreadores del zoobentos: a) *surber*; b) red de mano; c) draga de arrastre.

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 en forma de D acostada (*D-net*) provisto de una red y un mango largo. Es especialmente apta para estudios cualitativos del zoobentos asociado a las macrófitas o macrofitobentos. También se la emplea de manera cuantitativa cuando se logra estandarizar por tiempo y/o distancia de arrastre, incluso sobre sedimentos sin vegetación. En éstos también es empleada a

modo de *surber*, apoyándola en el fondo. Es muy utilizada, particularmente en estudios rápidos como los programas de biomonitorio, pasándola por cada tipo de sustrato durante un tiempo proporcional a la extensión del mismo (muestreo multihábitat).

Un método cuantitativo de colecta del macrofitobentos, es el aislamiento de un área conocida donde se cortan al ras todas las macrófitas. Éstas 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.

13.3. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Es conveniente observar las primeras muestras frescas en una bandeja blanca y de paredes altas, a efectos de apreciar el movimiento y el color natural de los organismos, detectar las formas más frágiles e inconspicuas, y decidir qué fijador utilizar o si es preciso narcotizar los individuos para su relajamiento. Sin embargo, la gran cantidad de muestras que se suelen tomar, hace necesario fijarlas hasta que sea posible su procesamiento en el laboratorio.

El fijador más usado y recomendado ya no es el formaldehído 4% (formol 10%) sino el alcohol (70-95%), especialmente útil para determinaciones de biomasa ya que el primero produce una subestimación de ésta. Los organismos de cuerpo blando (efemerópteros, tricópteros) pueden desintegrarse si se mantienen mucho tiempo en estos fijadores (Downing 1984). Para analizar el contenido estomacal se deben preservar en formol (Rodríguez-Capítulo *et al.* 2009).

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 fijador, permitiendo la separación de los organismos sin riesgo para la salud del investigador.

En caso de muestras muy grandes o con alta densidad de individuos, se procede a un submuestreo. Para ello el sedimento debe homogeneizarse y extenderse sobre una bandeja para su cuarteado (subdivisión en cuatro u ocho sectores radiales), tomándose los sectores necesarios al azar o enfrentados, hasta completar 500 individuos (Rodrigues-Capitulo *et al.* 2009).

La tinción de la muestra con Rosa de Bengala u otro colorante vital (de tejidos orgánicos), facilita la localización de los organismos distinguiéndolos del sustrato y así poder separarlos. La separación puede realizarse individualmente, primero a simple vista y luego bajo lupa, o por el método de flotación, siempre que el sedimento no sea excesivamente orgánico. En este caso se hace con una solución de azúcar de 1.12 de densidad (aproximadamente 300 g l⁻¹; 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 red, pincel o pinzas. 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 más cuidadosamente, ya que estos organismos son muy delicados. Conviene mantener los organismos vivos para poder observar sus movimientos y facilitar el tratamiento de las muestras, las que pueden mantenerse a 4 °C hasta 4 días (Rodrigues-Capitulo *et al.* 2009). Se lavan sobre un tamiz de 100 o 200 µm, con agua del lugar o al menos a igual temperatura que la de su medio. 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 narcotizarlos y teñirlos con Rosa de Bengala u otros colorantes. Si la densidad de organismos es muy alta, conviene tomar submuestras luego de homogeneizar la muestra.

Para el microbentos se toman muestras o submuestras con pequeños *corers* de ca. 1 cm de diámetro (0.8 cm²), de las que se observan gotas directamente en 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 de los mismos. Los organismos separados se guardan en pequeños frascos (10-30 ml) herméticos, completos de alcohol 90%. Para mantener las estructuras blandas y flexibles se le agregan 3 o 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. Antes deben secarse a 70 °C durante 1 o 2 días hasta que ya no varíe el peso. Se pesan con una balanza de precisión (0.001 g), ya sea individualmente si tienen suficiente tamaño, o en grupos de varios individuos similares si son muy pequeños. Para determinar el peso seco libre de cenizas se calcula la diferencia entre el peso seco y las cenizas resultantes de su combustión en mufla a 450 °C durante 4 horas (Rodrigues-Capitulo *et al.* 2009).

En caso de una muestra muy grande, puede convenir establecer con parte de la misma la relación estadística entre el peso y alguna medida como el largo total o de la cabeza. Una vez establecidas las relaciones alométricas entre ambos parámetros, es suficiente medir los individuos y determinar su peso con las mismas.

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 peceras de 40 × 20 × 20 cm, con sedimento y agua del lugar, provistas de aireador y cubiertas por una malla que impida el vuelo del adulto cuando emerja (Roldán 1988).

13.4. 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 Ringuet y posteriormente por Castellanos, así como las obras de Lopretto & Tell (1995) y de Domínguez & Fernández (2009), que reúnen métodos y claves de prácticamente todos los grupos. Otras obras generales que también pueden consultarse son las de Merritt & Cummins (1984), Pennak (1989), Thorp & Covich (2010) y Dobson *et al.* (2012). Para el estudio de los oligoquetos de la región puede consultarse Brinkhurst & Marchese (1992).

Se brindan a continuación dos claves elementales y generales, basadas en las antes citadas, una para la identificación de los grandes grupos de macroinvertebrados hasta las principales clases, y otra para los órdenes de insectos.

13.4.1. CLAVES DE MACROINVERTEBRADOS (basadas en varias fuentes con distinta sistemática)

I. A PHYLUM

- 1 a. Simetría bilateral, no reticulados, independientes, libres, alargados 4
 - b. Simetría radial, sésiles, redondeados o globosos 2
- 2 a. Reticulados, con agujeros de distinto tamaño PORIFERA
 - b. Tubulares, con una abertura terminal rodeada de tentáculos 3
- 3 a. Coloniales, tentáculos ciliados Bryozoarios 6
 - b. 5 a 6 (o hasta 3-12) tentáculos cilíndricos CNIDARIA
- 4 a. Tegumento quitinoso, segmentado, apéndices articulados ARTHROPODA 10
 - b. Cuerpo blando, no articulados 5
- 5 a. No segmentado, con caparazón calcárea MOLLUSCA 9
 - b. Segmentado, sin caparazón ANNELIDA 7
- 6 a. Cuerpo bulboso sobre tallo segmentado ENTOPROCTA
 - b. Sin tallo segmentado ECTOPROCTA

II. A CLASE

- 7 a. Ventosas en los extremos, fusiformes, sin quetas HIRUDINEA
 - b. Sin ventosas, cilíndricos, con quetas 8
- 8 a. Proyecciones laterales o parapodia con quetas visibles POLICHAETA
 - b. Sin parapodios, pocas quetas (poco visibles) OLIGOCHAETA

- 9 a. Concha espiralada o cónica, con tentáculosGASTROPODA
- b. Dos valvas, sin tentáculos, con sifones BIVALVIA
- 10 a. Fusiformes, sin apéndices articulados, cuerpo poco diferenciado
.....LARVAS INSECTA
- b. Cuerpo diferenciado, 3 o más pares de patas 11
- 11 a. Cefalotórax, 4 o más pares de patas..... 12
- b. Cabeza, tórax y abdomen, 3 pares de patas, 1 par de antenas..... INSECTA
- 12 a. Segmento posterior (opistosoma) globoso, con 4 pares de patas (3 en juveni-
les), palpos, quelíceros y acetábulo genitalHydracaridos
- b. Más de 6 pares de patas, 2 pares de antenas CRUSTACEA

HIRUDINEA

- 1. Boca microscópica, faringe eversible Rhynchobdellida (Glossiphoniiformes)
 - a. Cuerpo foliáceo, sin regiones diferenciadas.....Glossiphoniidae
 - b. Cuerpo cilíndrico, 2 zonas diferenciadas, cúpula separadaPiscicolidae
- 2. Boca grande, faringe no protrusible, sangre roja.....
..... Arhynchobdellida (Hirudiniformes)
 - a. 5 pares de ojos en II-VI, con mandíbulas Hirudinidae
 - b. 0, 3 o 4 pares de ojos, sin mandíbulas Erpobdellidae

OLIGOCHAETA

- 1 a. 1 queta ventral por haz, prostomio largo Haplotaxidae (*Haplotaxis*)
- b. 2 o más o ninguna quetas ventrales, prostomio corto 2
- 2 a. Quetas unicúspides, ventrales y dorsales semejantes Enchytraeidae
- b. Quetas de otras formas 3
- 3 a. 2 o 1 queta, unicúspides o bífidas con diente superior pequeño..... 4
- b. Quetas múltiples, unicúspides, bífidas o capilares 5
- 4 a. Quetas bífidas con diente superior pequeño Lumbriculidae
- b. Quetas unicúspides Alluroididae (*Brinkhurstia*)
- 5 a. Procesos posteriores 1 medio y 2 laterales Opistocystidae
- b. Sin procesos posteriores o sin 1 medio 6
- 6 a. Capilares desde III, ventrales 1-2 unicúspide y 1-2 bífida Phreodrilidae
- b. De otras formas 7
- 7 a. >1 cm, dorsales desde II, dorsales y ventrales similares, sin ojos, proboscis ni
branquias, clitelo en X-XI..... Tubificidae
- b. <1 cm, con alguna de esas características opuesta Naididae

GASTROPODA

- 1 a. Sin opérculo, concha frágil, 2 pares de tentáculosPulmonata 2
- b. Operculados, concha sólida, 1 par de tentáculos, dextrógira..... 5

- 2 a. Concha pateloide, no espiralada..... Ancyliidae
- b. Concha espiralada 3
- 3 a. Concha planiespiral, levógira (sinestrosa) Planorbidae
- b. Concha helicoidal, espira elevada, cónica 4
- 4 a. Levógira, espira aguda, callo amplio Physidae (*Aplexa*, ex *Physa*)
- b. Dextrógira..... Lymnaeidae
- 5 a. Concha (sub)globosa o planiespiral, mediana a grande Ampullariidae
- b. Concha alargada 6
- 6 a. Concha oval o elongada, delgada, espira larga Cochliopidae (*Heleobia*)
- b. Concha globosa, gruesa, espira breve Lithoglyphidae (*Potamolithus*)

BIVALVIA

- 1. Interior nacarado, ovalados, con biso
 Filibranchia (Mytiloidea), Anisomyaria Mytilidae
- 2. Eulamellibranchia
 - a. Interior nacarado, >4 cm Schizodonta (Unionoidea)
 - 1. Charnela esquizodonta (diente central izquierdo bífido) Hyriidae (*Diplodon*)
 - 2. Charnela edéntula o con pseudodientes Mycetopodidae (*Anodontites*)
 - b. No nacarados, <4 cm, charnela heterodonta Heterodonta (Veneroidea)
 - 1. 3 dientes cardinales, estrías fuertes Corbiculidae
 - 2. 1-2 dientes cardinales, sin estrías o leves Sphaeriidae
 - 3. Inequivalva, rostrada, 2 dientes cardinales derecha Aloididae (*Erodona*)

CRUSTACEA

- 1. Dentro de un caparazón bivalvado Ostracoda
- 2. Cilíndricos, segmentados, sin caparazón Copepoda
- 3. Con pleópodos abdominales, caparazón cefalotorácico Malacostraca
 - a. 6 pares de patas, ojos pedunculados prominentes Mysidacea
 - b. Comprimidos lateralmente, 5 pares de patas Amphipoda
 - c. Deprimidos dorsoventralmente, 7 pares de patas Isopoda
 - d. 3-5 pares de maxilípedos, caparazón con cámara branquial Decapoda
 - 1. Rostro y abdomen comprimidos, pereiópodos III no quelados, pleópodos nadadores (ex Natantia), “camarones” Caridea Palaemonidae
 - 2. Rostro y abdomen deprimidos, pleópodos no nadadores (ex Reptantia)
 - a. Abdomen desarrollado Anomura Aeglididae (*Aegla*)
 - b. Abdomen corto y delgado bajo el cefalotórax
 Brachyura Trichodactylidae
 - c. pereiópodos I-III quelados, “langostas”
 Astacidea Parastacidae (*Parastacus*)

INSECTOS ACUÁTICOS (a Orden)

- 1 a. Inactivos, en general encapsulados, alas y patas plegados PUPAS 2
- b. Activos, con alas, patas articuladas, pseudopatas o sin patas..... 4
- 2 a. Cuerpo corto, duro y oscuro (crisálida) PUPA de DIPTERA
- b. Apéndices plegados al cuerpo dentro de un estuche translúcido (momia)..... 3
- 3 a. Dentro de una cápsula vegetal o mineral.....PUPA de TRICOPTERA
- b. Sin cápsula, a veces un tubo sedoso o capullo fibroso PUPA de DIPTERA
- 4 a. Sin patas torácicas articuladas, cuerpo corto y duro LARVA de DIPTERA
- 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 tarsales, branquias digitiformes torácicas.....
..... NINFA de PLECOPTERA
- b. Con 3 (a veces 2) cercos caudales, 1 uña tarsal y branquias abdominales.....
.....NINFA de EPHEMEROPTERA
- 7 a. Alas anteriores duras o correosas (élitros) sobre el abdomen, boca masticadora.
..... ADULTO de COLEOPTERA
- b. Sin élitros 8
- 8 a. Pequeños (<3 mm), sin alas, largo apéndice bifurcado debajo del abdomen (furca), en la superficie de aguas calmas.....COLEMBOLA
- 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 picoNINFA y ADULTO de HEMIPTERA
- b. Boca masticadora. Labium, cuando extendido, largo y como cuchara, y cuando plegado, una máscara que cubre el resto de la bocaNINFA de ODONATA
- 11 a. Boca chupadora larga y curva. Pequeñas larvas en esponjas Spongillidae
.....LARVA de NEUROPTERA *Sisyridae*
- b. Boca masticadora 12
- 12 a. 5 pares de pseudopatas abdominales..... LARVA de LEPIDOPTERA
- b. Sin pseudopatas o solo en el último segmento abdominal 13
- 13 a. Procesos laterales robustos en 7-8 segmentos abdominales
..... LARVA de MEGALOPTERA
- b. Sin tales procesos o son largos y finos 14
- 14 a. Un par de pseudopatas terminales, generalmente branquias abdominales pequeñas y digitiformes. Individuos en cápsulasLARVA de TRICOPTERA
- b. Sin pseudopatas terminales ni cápsulasLARVA de COLEOPTERO

13.5. ANÁLISIS CUANTITATIVO

Una vez determinados y cuantificados los organismos, conviene construir una primera tabla de resguardo con todos los datos por taxón y muestra en filas y co-

lumnas respectivamente. En esta tabla conviene mantener la Sistemática, o sea los diferentes niveles jerárquicos utilizados (*phylum*, clase, orden, familia, género, especie), y todas las observaciones que sean necesarias. Por estas razones, esta tabla no es apta para su tratamiento cuantitativo, por lo que una copia de la misma debe ser depurada.

En la copia deben eliminarse todas las columnas y filas que no contengan datos, y eliminar todo texto o contenido no numérico de las celdas. Se debe mantener una sola columna de taxa pero puede haber más de una fila para caracterizar las muestras, ya que las mismas pueden estar agrupadas a distintos niveles jerárquicos (réplicas, estaciones de muestreo, zonas del agua, cuerpos de agua, grupos de éstos, fechas, etc.). Esta nueva tabla es lo que se llama una matriz de datos, la que conviene mantener de esta forma para darle diferentes tratamientos usando copias de la misma.

En una nueva fila después de la última se puede hacer la suma de cada columna, la que corresponde al total de individuos por muestra (abundancia total). Otra fila con el número de celdas ocupadas por números en cada columna, corresponde al número de taxa (riqueza taxonómica, genérica o específica). También conviene determinar los valores mínimo y máximo de cada columna.

Del mismo modo, una nueva columna después de la última puede alojar el total de individuos de cada especie y el total de muestras donde la misma está presente (frecuencia), y demás estadísticos de interés. Estos totales permiten ubicar fácilmente los taxa más abundantes y frecuentes, y las muestras más abundantes y ricas. Frecuentemente es aconsejable eliminar los taxa muy raros y/o escasos antes de proseguir con el análisis. En esta etapa es útil realizar gráficos que muestren claramente la estructura y composición de la comunidad en cada estación, a efectos de ir obteniendo los primeros grandes resultados.

Una matriz de datos así construida permite su adaptación a los requerimientos de los programas estadísticos que se escoja utilizar. Se podrá entonces realizar cálculos de riqueza, diversidad y equitatividad en cada muestra, en promedio y en el total, así como comparar las distintas estaciones o sus grupos mediante análisis multivariados.

13.6. RESULTADOS

13.6.1. RECUPERACIÓN DE UN ARROYO DEL IMPACTO LECHERO

A efectos de evaluar la recuperación de un arroyo receptor de los efluentes de un tambo, Rodríguez (2012) comparó la comunidad bentónica entre una estación aguas arriba de los efluentes y cinco estaciones aguas abajo a distancias crecientes. Predominaron en todas las estaciones grupos indicadores de enriquecimiento orgánico, pero la riqueza, diversidad y equitatividad fueron similares en la primera y última estaciones. Los máximos de riqueza y diversidad se encontraron en la quinta estación, 1.2 km aguas abajo del efluente, donde se halló el monte ribereño menos alterado.

13.6.2. COMPOSICIÓN DEL ZOOBENTOS A LO LARGO DE UN ARROYO URBANO MUY CONTAMINADO

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 com-

paró 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 de aquéllas (Arocena 1996). Los resultados (Fig. 13.6) muestran el predominio de los tubificidos en la estación más contaminada en todos los muestreos, mientras que solo 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.

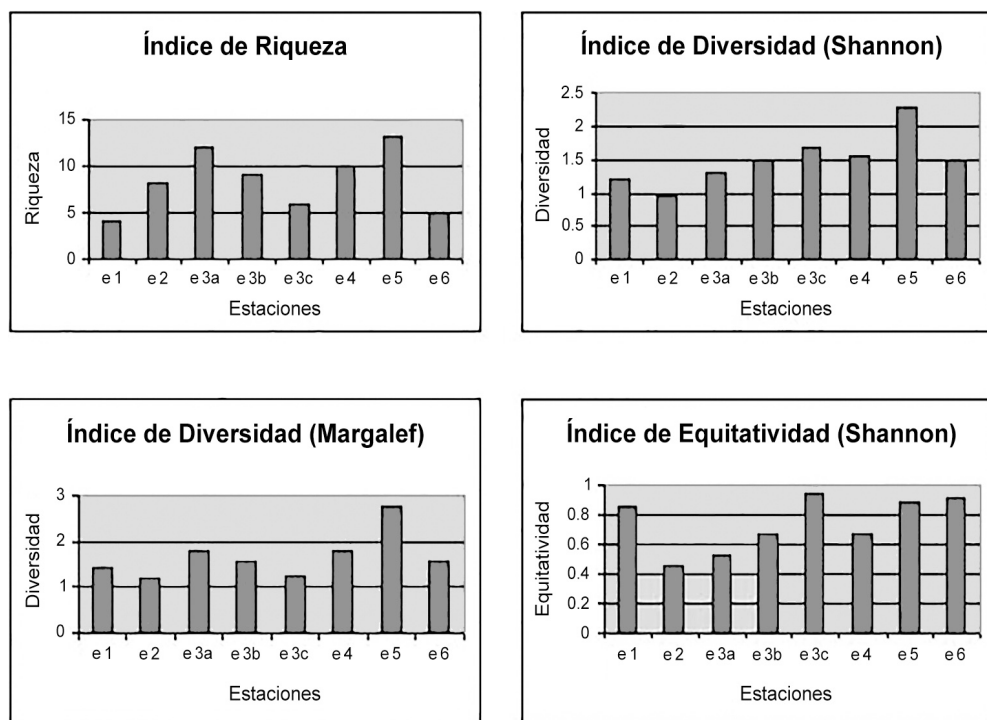


Figura 13.5. Parámetros comunitarios del zoobentos de seis estaciones a lo largo de un arroyo receptor de efluentes lecheros.

13.6.3. EFECTO COMPARADO DE TRES TAMBOS EN UNA CAÑADA

La cañada Clara (Libertad, San José) recibe efluentes sin depurar de tres tambos medianos. Para evaluar el efecto de los efluentes en la calidad de agua, se muestrearon los macroinvertebrados aguas arriba y abajo de cada tambo. El aumento de la conductividad del agua ($\times 1.5-2$) refleja el impacto de todos ellos, pero parece ser significativo solo en el primero por el aumento de materia orgánica del sedimento ($\times 2$), la dominancia de quironómidos (8 a 93%) y el índice BMWP que baja de 60 a 22 puntos. Además, solo allí disminuyen la diversidad de Shannon y la riqueza taxonómica (Fig. 13.7). Esto puede asociarse a un menor desarrollo de su zona riparia, pudiendo amortiguar menos el impacto que en las otras dos estaciones (Vilaboa 2012).

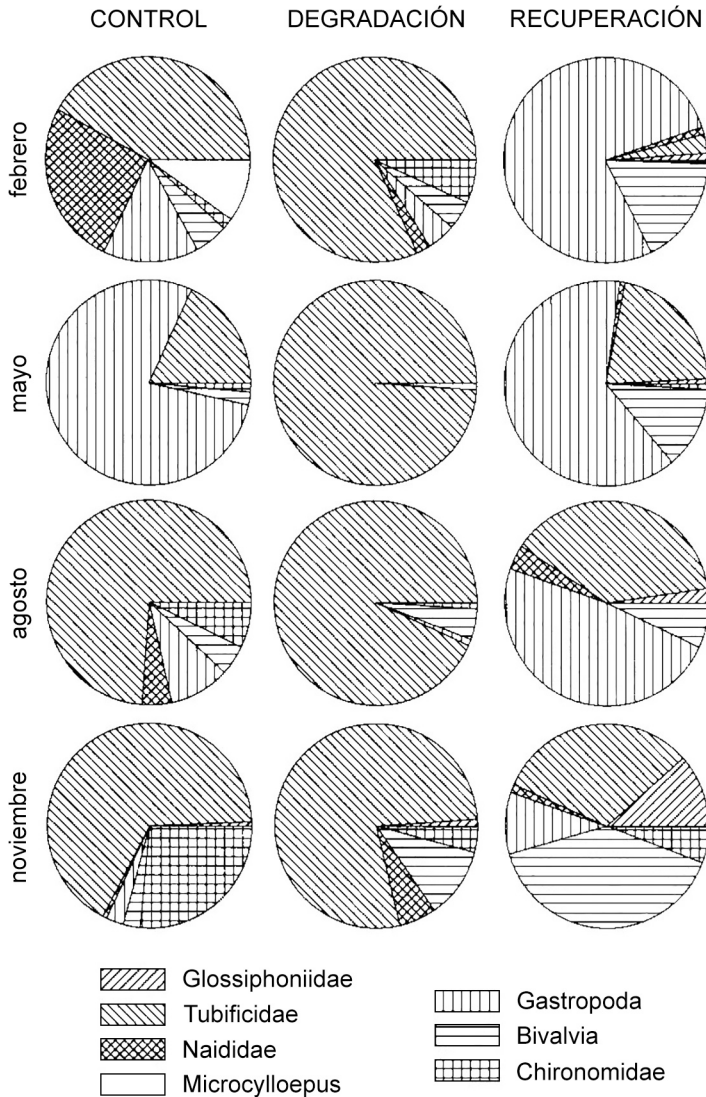


Figura 13.6. Composición del macrozoobentos en tres estaciones del arroyo Toledo con diferente calidad de agua (Arocena 1996).

13.6.4. COMUNIDAD BENTÓNICA EN UNA CUENCA VITIVINÍCOLA

Las cañadas Rocha (puntos 2-7) y Benítez (5-6) confluyen en el arroyo Colorado (8-10), que drena una cuenca vitivinícola. Cada punto estuvo dominado por un taxón diferente: ostrácodos, hemípteros, planórbidos, tubificidos, hidróbidos y efemerópteros, respectivamente (datos no publicados; Fig. 13.8). Esta variedad sugiere que diversos impactos como eutrofización en la primera cañada y agrotóxicos de las bodegas en la segunda, se suman a lo largo del sistema que muestra cierto grado de recuperación pero incompleta.

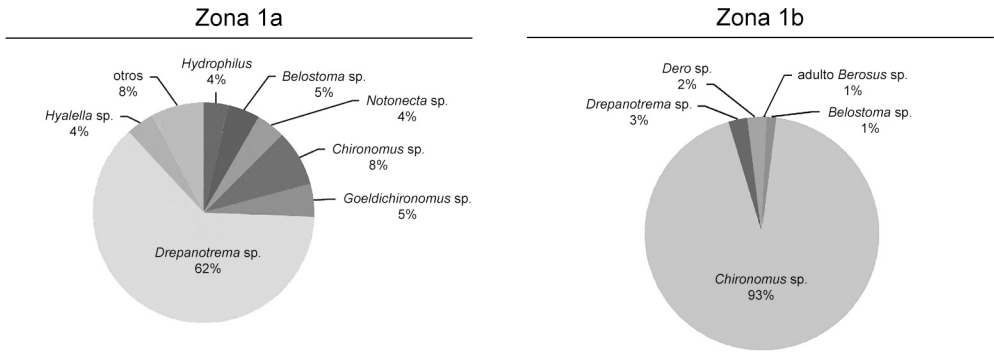


Figura 13.7. Composición de la comunidad zoobentónica aguas arriba (Zona 1a) y abajo (Zona 1b) del ingreso del efluente de un tambo en la cañada Clara (Libertad, San José).

- | | | | |
|----------------|--------------------|----------------|------------------|
| a. Ostracoda | f. Decapoda | k. Amphipoda | o. Ephemeroptera |
| b. Odonata | g. Lepidoptera | l. Hemiptera | p. Coleoptera |
| c. Diptera NI | h. Chironomidae | m. Culicidae | q. Sphaeriidae |
| d. Hydrobiidae | i. Ampullariidae | n. Planorbidae | r. Ancylidae |
| e. Lymnaeidae | j. Glossiphoniidae | ñ. Tubificidae | |

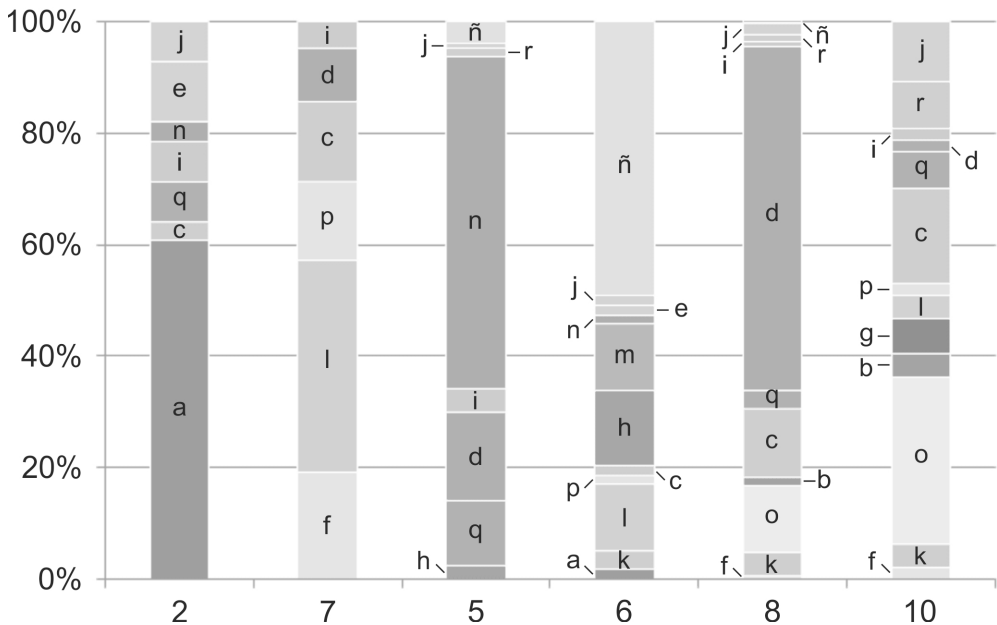


Figura 13.8. Composición de la comunidad zoobentónica aguas arriba y abajo de las cañadas Rocha (2 y 7), Benítez (5 y 6) y el arroyo Colorado (8 y 10) en Sauce, Canelones.

PECES

FLAVIO SCASSO Y FEDERICO QUINTANS

EL NECTON ESTÁ COMPUESTO POR ORGANISMOS QUE SE DESPLAZAN ACTIVAMENTE en el agua, independientemente de las corrientes. En aguas continentales el necton está representado por los peces, de los que se han descrito unas 10000 especies (Nelson 2006), a los que se suman otras 100 especies de peces diadromos, que migran entre el mar y el agua dulce.

La zona litoral de los lagos presenta la mayor diversidad de especies nectónicas, fundamentalmente de pequeño tamaño, y es utilizada como área de reproducción, cría, refugio y alimentación. En sistemas de aguas corrientes, los peces de los tramos altos están adaptados a aguas frías y torrentosas. 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).

14.1. MUESTREO

La selección del lugar y método de muestreo dependen de los objetivos de la investigación y del sistema acuático bajo estudio. Los diversos métodos de captura y muestreo de peces pueden ser clasificados en métodos pasivos o activos, de observación, tóxicos y técnicas de inspección.

14.1.1. CAPTURA PASIVA

Las artes de pesca pasivas son aquellas que se calan en un lugar determinado, y el pez es capturado por su propia actividad y desplazamiento (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).

ESPINELES O PALANGRES. Consisten en un cabo fondeado dispuesto 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. 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.

TRAMPAS NASA. Consisten en cilindros horizontales de mimbre o de red con dos bocas en forma de embudo (Fig. 14.1). 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. 14.1). 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. 14.1). Pueden estar compuestas 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 apropiado 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 coleccionar 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 atrapa-

dos 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.

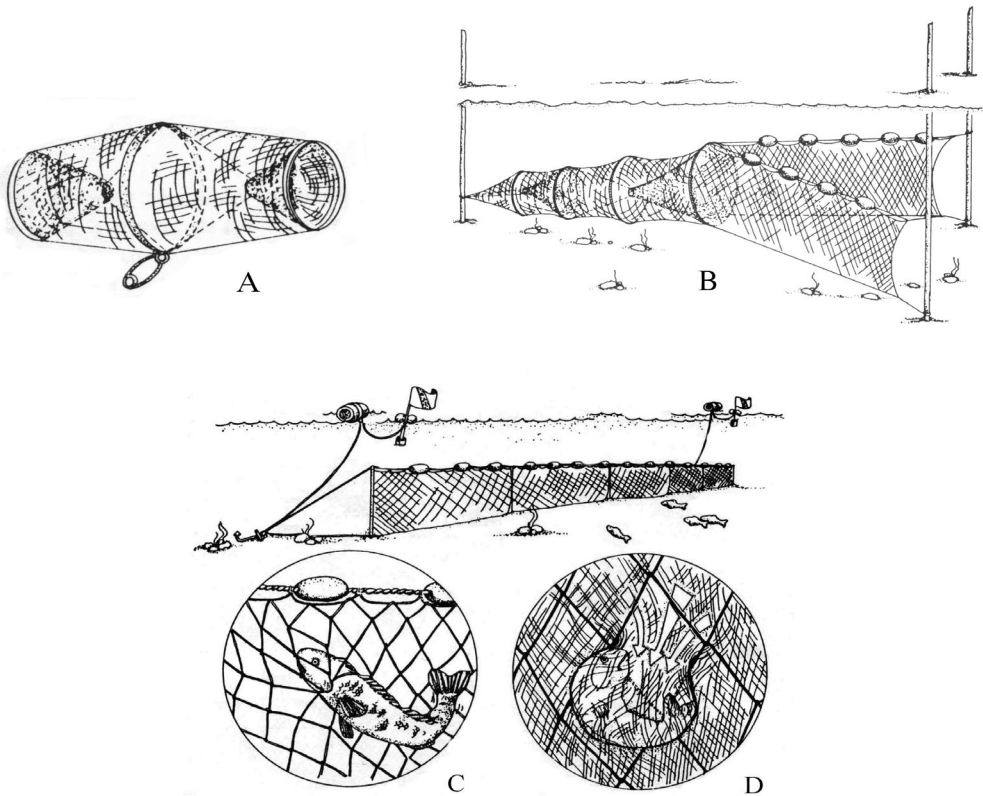


Figura 14.1. Ejemplos de artes de pesca pasivos: A) trampa nasa; B) red nasa; C) red de enmalle; D) trasmallo (modificado de Hubert 1983).

14.1.2. CAPTURA ACTIVA

PESCA CON ANZUELO. 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 coleccionar 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 lastre. Las de fondo tienen una relinga inferior más larga, con rodillos que facilitan su desplazamiento, y cadenas como protección de objetos sumergidos que podrían dañarla (Fig. 14.2). El volumen de agua filtrada depende de 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 atrapar 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 pequeño 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. 14.2). 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.

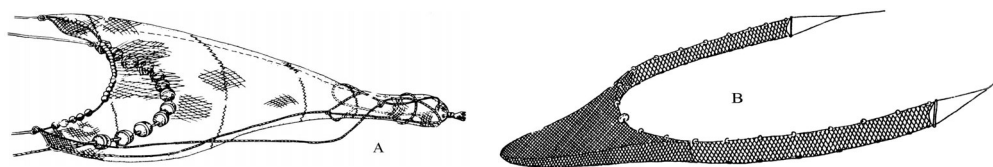


Figura 14.2. Ejemplos de artes de pesca activos: A) red de arrastre; B) red de arrastre litoral (modificado de Hayes 1983 y Padín & Iriart 1995).

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, por lo que pueden ser liberados con vida. La corriente alterna hace que los peces se orienten perpendicularmente 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 aguas turbias, con fondos irregulares 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).

14.1.3. 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 pueden aplicar técnicas de conteo de ecos. Para cuantificar 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 instalados fijos 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.

14.1.4. 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 período 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; Battaglene 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.

14.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Cuando los datos de los peces capturados son obtenidos rápidamente, éstos pueden ser devueltos con vida a su ambiente. De lo contrario, deben ser conservados para su posterior análisis en laboratorio. Pueden mantenerse en frío si son procesados poco tiempo después de su captura, o bien congelados o fijados con formol al 5 o 10% y luego mantenidos en alcohol etílico 70%.

14.3. TAXONOMÍA

Debido a que no existen obras de consulta completas para la identificación taxonómica de los peces de agua dulce de Uruguay, se emplean claves incluidas en trabajos de autores regionales como Ringuelet *et al.* (1967) o Menni *et al.* (1995) entre otras. 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. Se recomienda consultar la reciente obra de Teixeira de Mello *et al.* (2011).

CARACTERES BIOMÉTRICOS. Son caracteres externos que pueden ser medidos (morfométricos) 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. 14.3)

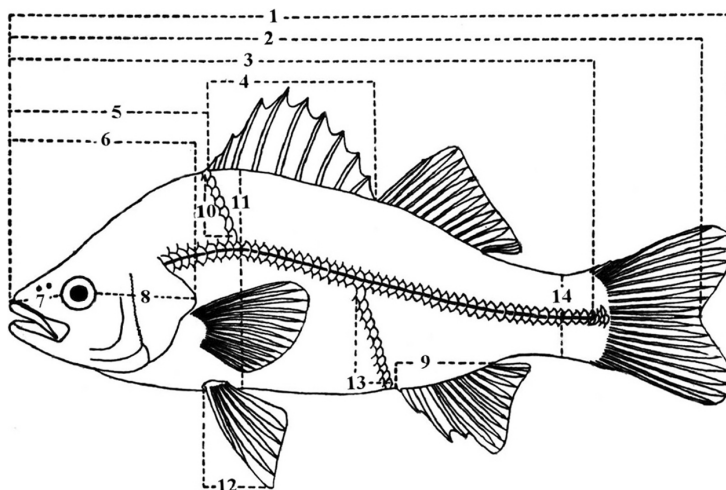


Figura 14.3. Principales caracteres morfométricos y merísticos de los peces: 1) longitud total; 2) longitud de la horquilla; 3) longitud estándar; 4) longitud de la base de la primera aleta dorsal; 5) longitud predorsal; 6) longitud de la cabeza; 7) longitud del hocico; 8) longitud post-orbital de la cabeza; 9) longitud de la base de la aleta anal; 10) número de escamas sobre la línea lateral; 11) altura del cuerpo; 12) altura de la aleta pélvica; 13) número de escamas debajo de la línea lateral; 14) altura mínima del pedúnculo caudal (modificado de Lagler *et al.* 1962).

14.4. ANÁLISIS CUANTITATIVO

14.4.1. 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 capturados por unidad de esfuerzo de pesca. Se expresa de diferen-

te 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 valor 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 las 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 kg ha^{-1} .

14.4.2. 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):

$$\log_{10} P = -0.42 + 1.084 \log_{10} B$$

o el modelo de Downing & Plante (1993):

$$\log_{10} P = -0.25 + 0.901 \log_{10} B - 0.151 \log_{10} W + 0.291 \log_{10} TP$$

donde P es la producción de peces ($\text{kg ha}^{-1} \text{año}^{-1}$), B la biomasa (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 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):

$$\log_{10} Y = -6.00 + 2.00 \log_{10} PP$$

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_{∞} es el tamaño máximo del stock (biomasa en kg ha^{-1}), k la tasa de crecimiento instantáneo del stock:

$$k = e^{-K}$$

y K la tasa de crecimiento de Bertalanffy (1938).

14.5. ESTUDIOS DE ALIMENTACIÓN

Los peces pueden llegar a influir en la estructura de otras comunidades a través de efectos directos y en cascada, transporte y resuspensión de nutrientes (Matthews 1998). El estudio de su dieta es un aspecto básico relativo al funcionamiento de los ecosistemas. La mayoría de las especies de peces pequeños (pocos centímetros) consumen principalmente zooplancton y otros organismos cuya escala se encuentra en el orden de las micras o milímetros (Lazzaro 1987). En ambientes donde la predación sobre el zooplancton es importante, se pueden generar efectos en cascada en la cual disminuye la presión de predación del zooplancton sobre el fitoplancton y este último puede desarrollar grandes abundancias (Carpenter *et al.* 1987).

Existen muchos métodos para estudiar la dieta de los peces. Todos ellos se basan en la observación de su contenido estomacal. Se puede determinar la frecuencia de ocurrencia de las presas o hacer un análisis cuantitativo determinando el volumen, peso o número de las mismas (García de Jalón *et al.* 1993). Para la identificación de las presas pequeñas es necesario contar con una lupa estereoscópica e incluso con un microscopio. Asimismo, cuando las presas son muy abundantes, es necesario analizar alícuotas del contenido estomacal (Rocha Aranha 1993).

Para determinar la selectividad sobre los alimentos disponibles o el grado de preferencia de las presas, es necesario conocer tanto la relación numérica de éstas en el contenido estomacal como su disponibilidad en el ambiente. Existen varios índices que miden la selectividad del pez por determinado tipo de presa, generalmente derivados del índice de selectividad de Ivlev (Ivlev 1961), el cual determina los valores de selectividad (E) en función de la proporción (R) de la presa i en la dieta y en el ambiente (P):

$$E = (R_i - P_i)(R_i + P_i)$$

Se debe tener en cuenta que además de la abundancia relativa de la presa, existen otras variables que también inciden en dicha selección, como son su movilidad, visibilidad, grado de exposición, comportamiento, probabilidad de encuentro con el pez, etc. Estas variables deben ser tenidas en cuenta en el momento de interpretar los resultados de cualquier índice de selectividad utilizado.

14.6. RESULTADOS

14.6.1. COMPOSICIÓN ÍCTICA DEL LAGO RODÓ

Entre los años 1997 y 2003 el lago Rodó (un sistema artificial de la ciudad de Montevideo, $35^{\circ}55' \text{ S}$, $56^{\circ}10' \text{ W}$) fue intensamente estudiado desde el punto de vista limnológico. Dentro de ese marco se realizaron estudios de la comunidad íctica. Entre 1997 y 1998 se realizaron colectas de peces en 4 estaciones de muestreo con una red de arrastre litoral de $20 \times 2 \text{ m}$ y una abertura de malla de 1 mm.

La tabla 14.1 muestra la lista de especies encontradas en el lago. La biomasa íctica estimada se presenta a través de sus valores absolutos expresados en kg ha^{-1} (Fig. 14.4).

Tabla 14.1. 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 rhabdotus</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

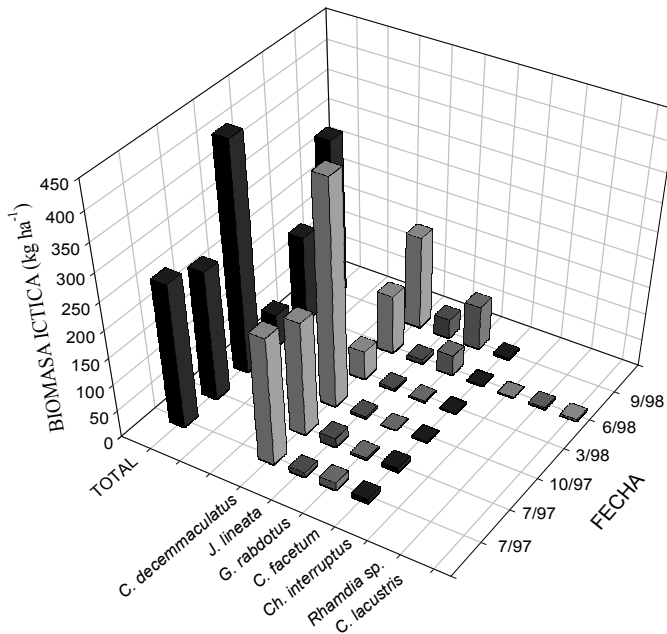


Figura 14.4. Biomasa total y de las especies presentes en el lago Rodó (Scasso *et al.* 2001).

La composición específica y abundancia de peces se caracterizó por presentar una alta biomasa y por la dominancia de *Cnesterodon decemmaculatus*, un pequeño omnívoro. Esta especie representó entre 71% y 98% de la biomasa total de peces, cuyo promedio anual fue de 307 kg ha⁻¹ en 1997 y de 172 kg ha⁻¹ en 1998.

Esta especie es común en cuerpos de agua de todo el país, alcanzando gran abundancia en ambientes degradados (Bistoni *et al.* 1999). La bibliografía la califica como pequeño omnívoro que se alimenta de pequeños invertebrados como larvas de insectos y organismos planctónicos, además de algas perifíticas (Ringuélet *et al.* 1967).

Dada la dominancia de esta especie en el lago, se estudió su rol en la regulación de otras comunidades a través de su alimentación. Para ello, entre 1999 y 2000 se realizaron seis muestreos estacionales a partir de los cuales se analizó el contenido estomacal de 278 individuos, categorizados en tres clases de talla: menores a 25 mm,

entre 25 y 35 mm y mayores a 35 mm. Los resultados mostraron que las principales fuentes de alimento fueron organismos zooplanctónicos (cladóceros y copépodos, principalmente), algas perifíticas y detritos. Estos componentes resultaron altamente variables entre los diferentes muestreos, probablemente relacionados con la gran variabilidad en cuanto a la disponibilidad de los organismos planctónicos (Fig. 14.5). Debido a que se contaba con información acerca de las abundancias de zooplancton, se hipotetizó que éste era el alimento preferido, pero en los periodos en que era escaso, los peces recurrían a otras fuentes de alimento.

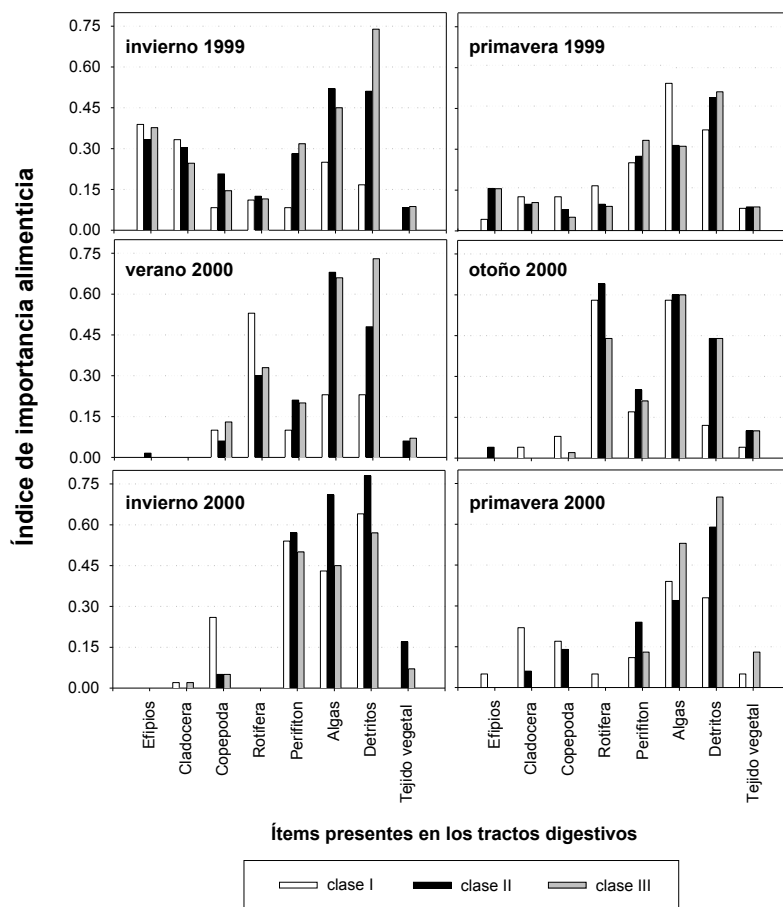


Figura 14.5. Composición de la dieta de *Cnesterodon decemmaculatus* expresada como índice de importancia alimenticia (Quintans *et al.* 2009).

Con el objeto de conocer con mayor precisión las preferencias por diferentes tipos de alimento, se llevaron a cabo experimentos donde se controló la abundancia de las presas. Para ello se trabajó con aislamientos para cada una de las tallas mencionadas de *Cnesterodon decemmaculatus*, donde fueron suministradas cantidades controladas de cladóceros, copépodos, larvas de mosquito y larvas de quironómidos. Los resultados se presentan en la figura 14.6.

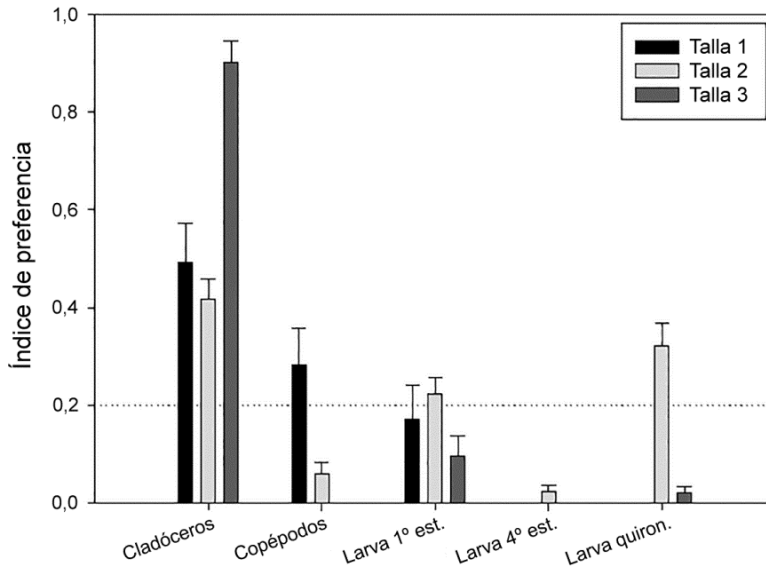


Figura 14.6. Preferencia por las diferentes presas suministradas en los experimentos, para tres clases de tamaño diferentes (expresadas en el índice de selectividad de Chesson) (Quintans *et al.* 2010).

Con esta serie de estudios se pudo concluir que la presión que ejerce *Cnesterodon decemmaculatus* sobre el zooplancton, fundamentalmente cladóceros y copéodos, es importante. Esto puede desencadenar una reducción de presión sobre el fitoplancton, generando en ocasiones una gran proliferación de estos organismos y consecuencias importantes sobre la reducción de la transparencia y calidad del agua.

PALEOLIMNOLOGÍA

DERMOT ANTONIADES Y GLORIA DANERS

LOS SEDIMENTOS DE LOS LAGOS ARCHIVAN CONSTANTEMENTE LOS PROCESOS que tienen lugar en sus aguas, sus sedimentos y sus cuencas. Como consecuencia, guardan un registro de los cambios que ocurren a lo largo del tiempo, tanto de variables bióticas como químicas y físicas (Smol 2008). No obstante, como los sedimentos depositados provocan la colmatación de los lagos al cabo de un cierto tiempo (Moss 1980), la mayoría de ellos tienen una duración de solo algunas decenas de miles de años, aunque el lago más antiguo del mundo, el lago Baikal en Rusia, tiene una edad estimada de más de 25 millones de años (Khlystov *et al.* 2013). La edad máxima posible de los lagos está relacionada con las características geomorfológicas de los paisajes entorno, mientras que la duración se rige por su tamaño, productividad y características sedimentarias.

La paleolimnología estudia el pasado de los ambientes lacustres usando los sedimentos para inferir aspectos de la biología, la química y la física del agua y el sedimento, y sus relaciones con la cuenca (Cohen 2003; Smol 2008). 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 allí preservados (Wetzel & Likens 1991).

15.1. MUESTREO

15.1.1. DISEÑO

El diseño de un estudio paleolimnológico se hace en base a los objetivos del proyecto y la morfología del lago. Entre las características determinadas por estos factores cuentan el lago a estudiar, el número de testigos obtenido, su largo y el sitio

de muestreo. Normalmente los lagos se muestrean en su punto más profundo, ya que el enfoque de la sedimentación implica que contiene contribuciones de procesos a través del lago, incluyendo las partes someras, por lo que contiene los registros sedimentarios más completos (Blais & Kalff 1995). En lagos grandes con morfologías complicadas o con múltiples ollas, puede ser apropiado la selección de otros sitios menos profundos para extraer testigos, en función de las metas del estudio (e.g., un estudio de entradas localizadas de contaminantes).

15.1.2. TOMA DE MUESTRAS

Los sedimentos lacustres se muestrean por medio de tubos (*corers*), en general de plástico, acrílico o metal (ver 5.1.2), ya sea de forma manual o mediante diversos equipos diseñados para obtener una columna inalterada desde el tope hasta el fondo del depósito, de acuerdo a los objetivos y al tipo de sedimento. En aguas poco profundas, los sedimentos superficiales suelen ser accesibles para muestreos manuales, en donde el cilindro es empujado dentro del sedimento y luego retirado con la ayuda de un pistón en el extremo superior cerrado, evitando la presión del agua sobre la muestra. En lagos más profundos, el método más común para obtener testigos superficiales es mediante un equipo de gravedad; el mismo se baja hasta el fondo utilizando cuerdas y penetra el sedimento utilizando su propio peso o con el uso de pesos adicionales. Dependiendo del modelo, una vez en el sedimento se cierra de forma automática o con un mensajero. La succión resultante entonces levanta el sedimento, y la parte inferior del tubo tiene que ser tapada antes de elevarse por encima de la superficie del agua. Equipos más sofisticados, incluyendo aparatos de pistón o de percusión, pueden requerirse cuando, de acuerdo al objetivo del estudio, es aconsejable la obtención de tubos que alcancen grandes profundidades.

Cada tipo de aparato tiene sus puntos fuertes y débiles, incluyendo su capacidad para preservar la interfase agua-sedimento, la longitud del registro que se puede recuperar y la capacidad de extraer testigos superficiales o secciones múltiples, entre otros. Equipos simples de gravedad se pueden utilizar desde casi cualquier embarcación, mientras que equipos más grandes de pistón o de percusión, necesarios para sedimentos más profundos y consolidados, pueden requerir infraestructura más complicada, incluyendo trípodes y plataformas estables. La selección de aparatos de extracción de muestras debe hacerse teniendo en cuenta las características del lago y el periodo de tiempo de interés para el estudio. Un tratamiento exhaustivo de la física de recuperación de testigos y los tipos de aparatos disponibles, fue realizada por Glew *et al.* (2001).

Cada vez más se aplican múltiples *proxies* en estudios paleolimnológicos. En estos casos se necesitan grandes cantidades de material, lo que implica el uso de tubos de diámetro más grande o múltiples testigos. El reparto de los sedimentos debe ser considerado cuando se planifica una campaña de muestreo, teniendo en cuenta el número de análisis que se realizarán y la cantidad de material necesario para cada uno. Posteriormente, si el material disponible es insuficiente, la única opción es combinar los niveles, lo que reduce la resolución temporal del análisis.

15.2. DESCRIPCIÓN Y SUBMUESTREO DE SEDIMENTOS

La composición y estructura de los sedimentos brindan información acerca de su origen, el ambiente de deposición y los eventos ocurridos en la cuenca. Una descripción del testigo se hace frecuentemente antes del submuestreo para preservar

información importante que ayuda en los análisis posteriores, a fin de optimizar las inferencias posibles. La primera descripción se realiza generalmente en el campo, ya que algunas características como el color pueden alterarse con el tiempo, 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 de Troels-Smith (1955, en Birks & Birks 1980) basado en tres tipos de propiedades principales: físicas (color, estratificación, contenido de agua, elasticidad y límite superior), humificación o grado de descomposición de la materia orgánica, y composición (arcilla, limo, detritos, turba de *Sphagnum*, etc.). Los métodos más sofisticados disponibles para descripciones en el laboratorio se describen en Zolitschka *et al.* (2001).

En los lagos donde fondos anóxicos u otros factores impiden la bioturbación por invertebrados, pueden preservarse laminaciones obvias llamadas ritmitas. En algunos casos, cada una de estas capas representa un año de deposición, en cuyo caso se refieren como varvas, las cuales pueden ser de entre 25 μm y 3 mm de espesor (Margalef 1983). Si se puede establecer que estas láminas son, de hecho, anuales, entonces pueden también ser útiles para el desarrollo de cronologías y estudios de alta resolución temporal (Lamoureux 2001; Brauer *et al.* 2009). Las láminas pueden observarse como variaciones periódicas de color o de la disposición de las partículas sedimentarias, que generalmente reflejan ciclos de condiciones paleoambientales o paleoclimáticas particulares. Simola (1977) describió laminaciones debidas a la deposición cíclica de frústulos de diatomeas. Muchos lagos en ambientes glaciares presentan sedimentos laminados típicos 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 (Zolitschka 2013). La interpretación correcta de los resultados de los análisis químicos y biológicos, tiene que tomar en cuenta los procesos estacionales que pueden ser asociados con este tipo de estructura.

15.2.1. SUBMUESTREO

Hay dos estrategias principales para el submuestreo de los testigos: hacer el trabajo en el sitio de muestreo o el transporte de los testigos enteros al laboratorio. Cada uno tiene sus ventajas. El submuestreo en el sitio asegura el muestreo sin perturbaciones de la interfaz sedimento-agua, elimina las preocupaciones sobre la perturbación de los sedimentos durante el transporte, y también hace más fácil el transporte de las muestras, siendo más compactos. El transporte de testigos enteros al laboratorio permite la descripción básica en un ambiente más controlado, así como también la posibilidad de aplicar técnicas tales como radiografías, tomografías, escáneres de XRF y análisis paleomagnéticos. En el caso de llevar los testigos al laboratorio, la interfaz agua-sedimento debe ser estabilizada antes del transporte con el fin de evitar la mezcla de la sección superior de la secuencia sedimentaria. Los métodos para lograr esto incluyen espuma floral y la formación de un gel a partir de sustancias absorbentes de agua como el poliacrilato de sodio (Tomkins *et al.* 2008).

El intervalo para el submuestreo se debe elegir teniendo en cuenta la resolución temporal deseada, la cantidad de muestra requerida para los análisis elegidos y la litología de los sedimentos. Para el análisis de microfósiles abundantes como polen o diatomeas, en la mayoría de los lagos será suficiente una submuestra de 1 a 2 cm^3 , mientras que para macrofósiles se necesitan muestras de 100 a 400 cm^3 (Birks & Birks 1980).

15.3. DATACIÓN DE LOS SEDIMENTOS

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 radioisótopos se desintegran a tasas constantes y específicas. Estas tasas suelen expresarse como vida media, o tiempo necesario para que la mitad de una cantidad determinada del isótopo original se desintegre en otro u otros.

Para los estudios que se tratan de los últimos dos siglos, los radioisótopos preferidos son el ^{210}Pb y el ^{137}Cs (Appleby 2001). El ^{210}Pb tiene una vida media de 22.26 años, siendo útil para datar los últimos *ca.* 150 años. La deposición de ^{210}Pb de la atmósfera está relacionada con la precipitación, por lo que el uso de este método en las regiones desérticas, incluyendo las regiones polares, puede ser difícil. La asignación de edades basado generalmente en ^{210}Pb utiliza modelos que hacen suposiciones sobre la deposición sedimentaria en el pasado del lago. Por lo tanto, la elección del modelo correspondiente es fundamental para el modelado preciso de las relaciones edad-profundidad. Los detalles completos sobre estos modelos y sus cálculos se encuentran en Appleby (2001).

El ^{137}Cs es un radionúclido antrópico. La precipitación radioactiva del ^{137}Cs empezó en los años '50 debido a las pruebas atmosféricas de bombas termonucleares, y alcanzó su punto máximo en 1963, después de lo cual se redujo notablemente debido a los acuerdos sobre la prohibición de dichas pruebas (Appleby 2001). En las regiones del hemisferio norte, un pico de ^{137}Cs también se puede observar en los sedimentos correspondientes a 1986, debido al accidente ocurrido en la central nuclear de Chernóbil. Por lo tanto, el ^{137}Cs no brinda información completa de la relación edad-profundidad, pero brinda un marcador que puede establecer puntos cronológicos específicos en la estratigrafía, así como validar de manera independiente las cronologías basadas en ^{210}Pb .

Para sedimentos más viejos el ^{14}C es el más utilizado en paleolimnología, siendo útil para datar sedimentos de entre 200 y 40000 años, ya que la vida media del ^{14}C es de 5730 ± 40 años. La datación con ^{14}C mediante espectrometría de acelerador de masas (AMS) requiere muestras pequeñas (*ca.* 5 mg) y puede aplicarse a gran variedad de materiales que incorporan carbono orgánico, como madera u otras plantas, huesos, valvas de moluscos, quitina subfósil de restos de insectos, ácidos húmicos extraídos de sedimentos, el componente orgánico de los sedimentos totales y otros (Björck & Wohlfarth 2001).

El paleomagnetismo da otro método de establecer la cronología de la deposición de los sedimentos. Propiedades como el ángulo, la inclinación y la intensidad del campo magnético de la Tierra, se conservan en los sedimentos en escalas centenarias a milenarias (King & Peck 2001). Estas características varían regionalmente en todo el mundo. Las edades en un testigo generalmente se establecen haciendo correlaciones cruzadas con estratigrafías de referencia con cronologías bien establecidas basadas en técnicas independientes, tales como el ^{14}C (St-Onge & Stoner 2011).

Existen otros métodos diversos para la datación absoluta de los sedimentos que se puede consultar en Last & Smol (2001).

15.4. ANÁLISIS QUÍMICOS

15.4.1. MATERIA ORGÁNICA DE LOS SEDIMENTOS

El análisis de la fracción orgánica de los sedimentos puede proporcionar información diversa e importante con respecto a la procedencia de los mismos, y sobre

los procesos biogeoquímicos que ocurrieron en el lago en el momento de su deposición y posteriormente a ésta. La materia orgánica sedimentaria es producida principalmente por los organismos fotosintéticos y las bacterias ubicadas en un lago y en su cuenca (Meyers & Teranes 2001).

La cantidad de materia orgánica contenida en el sedimento es un índice del estado trófico y la productividad del sistema, aumentando en ecosistemas con más productividad (Moore *et al.* 1991). Habitualmente representa entre el 1 y el 30% del peso fresco, aunque puede llegar al 100% como en el caso de la turba (Margalef 1983). El método más fácil y más barato de determinación del contenido de materia orgánica es por la pérdida-por-combustión (Dean 1974), aunque analizadores elementales permiten mediciones más precisas y fiables, y son capaces de discriminar entre el carbono y el nitrógeno orgánico (Meyers & Teranes 2001). La metodología para la determinación del contenido de materia orgánica en sedimentos puede consultarse en el capítulo 5. La relación entre el carbono y el nitrógeno en los sedimentos (C/N) se utiliza habitualmente para discriminar las fuentes de materia orgánica sedimentaria. La materia orgánica procedente de la fotosíntesis autóctona (principalmente algas) normalmente tiene un relación C/N entre 4 y 10, mientras que las plantas terrestres vasculares tienen relaciones >20 (Meyers 2003). Bajas relaciones C/N (<10) son por lo tanto interpretadas como una indicación de que la materia orgánica acuática domina la deposición, mientras que proporciones más altas indican el predominio de fuentes alóctonas (Meyers & Teranes 2001).

Los isótopos estables de carbono y nitrógeno también proporcionan información importante sobre las fuentes de deposición sedimentaria (Leng *et al.* 2006). Existen diferencias en el fraccionamiento isotópico de carbono entre algas marinas y de agua dulce, y diferencias pronunciadas entre las plantas C3 y C4 (Meyers 1997). Además, hay diferencias en las firmas isotópicas de nitrógeno de las algas y las plantas terrestres, en gran parte debido a las diferentes fuentes que estos grupos utilizan para obtener su nitrógeno (*i.e.*, nitrógeno disuelto o atmosférico) (Meyers 1997). Revisiones completas de las aplicaciones de los isótopos estables en la paleolimnología se encuentran en Meyers y Teranes (2001) y Leng *et al.* (2006).

15.4.2. QUÍMICA INORGÁNICA DE LOS SEDIMENTOS

El uso de la geoquímica inorgánica en paleolimnología ha evolucionado mucho durante el último medio siglo, mientras que las metodologías han avanzado junto con nuestra comprensión de los procesos implicados en la sedimentación y alteración post-deposicional (Boyle 2001). Hay una comprensión creciente de la complejidad de los procesos involucrados. En general, en lagos oligotróficos los sedimentos reflejan la geología y los suelos de la cuenca, mientras que en sistemas más eutróficos existen procesos importantes dentro del lago que modifican la composición de los sedimentos (Engstrom & Wright 1984; Boyle 2001). No obstante, hay que ser cautelosos en la aplicación de la geoquímica inorgánica a testigos de sedimento. El análisis de los sedimentos P, una vez común, ha caído en desuso debido a las preocupaciones sobre la confiabilidad de los registros por la alteración de las concentraciones post-deposicional. Fe y Mn son también variables que son interpretadas con precaución, debido a los efectos de procesos redox en su concentración final.

Los análisis químicos inorgánicos del registro sedimentario se pueden aplicar a una serie de cuestiones de interés. Cambios en el estado trófico pueden determinarse utilizando mediciones de P (siempre y cuando se den una serie de condiciones en el lago) o, alternativamente, el sílice biogénico puede brindar un índice de los cambios en la productividad en el pasado (Boyle 2001). También se pueden abordar los procesos antrópicos, incluyendo la acidificación de la cuenca (a través

de cambios en las concentraciones de metales pesados tales como Al o Zn) y la contaminación atmosférica (mediante los análisis de registros de Hg, Pb y Cd, entre otros) (Boyle 2001). Revisiones comprehensivas del uso de la química inorgánica en la paleolimnología se encuentran en Engstrom & Wright (1984) y Boyle (2001).

La técnica más comúnmente aplicada es la determinación de la concentración total de elementos, incluyendo elementos traza (Boyle 2001). Escáneres de fluorescencia de rayos X representan un método cada vez más popular para determinar dichas concentraciones, ya que brindan datos de alta resolución de muchos elementos mediante análisis no destructivos, y pueden analizar secuencias largas muy rápidamente (Croudace & Rothwell 2010). Una revisión de los elementos que se pueden medir con confianza y sus aplicaciones potenciales, se encuentra en Croudace *et al.* (2006).

15.5. ANÁLISIS VEGETALES

Gran cantidad de organismos, o sus restos, pueden quedar preservados en los sedimentos lacustres. Los restos vegetales más comunes incluyen algas silíceas como las diatomeas, pigmentos fotosintéticos, polen u esporas, frutos, microfósiles de plantas y silicofitolitos.

15.5.1. PIGMENTOS

Los pigmentos producidos por plantas, algas y bacterias fotosintéticas se depositan en los sedimentos lacustres, y a menudo se conservan mucho tiempo después de que los organismos de los que procedan hayan desaparecido (Leavitt & Hodgson 2001). En paleolimnología los pigmentos se aplican en los estudios de eutrofización, cambio climático, cambios en el uso del suelo y muchos otros temas.

Existen dos clases principales de pigmentos: las clorofilas y los carotenoides. La clorofila *a* y *b*, y sus productos de degradación, se utilizan habitualmente en los estudios paleolimnológicos y sirven como indicadores de la productividad general (Clo *a*) y de clorofitas y plantas terrestres (Clo *b*). Los carotenoides incluyen pigmentos diversos que se aplican como pigmentos marcadores de grupos de productores primarios. Algunos carotenoides son producidos por más de un grupo de organismos, por lo que sirven como indicadores de productividad general (β -caroteno) o de una serie de grupos algales (*e.g.*, Fucoxantina, producido por Bacillariophyta, Chrysophyta y Dinophyta) (Leavitt & Hodgson 2001). Otros sirven como pigmentos de diagnóstico de algas específicas, por lo cual son muy útiles para reconstruir la dinámica entre grupos de organismos fotosintéticos en el pasado (*e.g.*, zeaxantina: cyanobacteria). Al realizar los análisis de pigmentos es muy importante ser consciente de los procesos de degradación que se producen durante la sedimentación, después de la deposición y, potencialmente, durante la manipulación de las muestras. Distintos pigmentos tienen estabildades diferentes, algo que debe tenerse en cuenta al interpretar los registros (Leavitt & Hodgson 2001).

Los pigmentos fotosintéticos pueden analizarse utilizando varias metodologías que difieren en el tratamiento de las muestras, los equipos analíticos requeridos, la cantidad de datos producidos y los costos. Los tres métodos utilizados principalmente son espectrofotometría, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectroscopía de reflectancia visible (VRS).

La espectrofotometría puede determinar las clorofilas y los carotenoides totales, que brindan información general sobre la productividad del ecosistema en el pasado. Este método requiere una etapa de extracción, por lo general con etanol o ace-

tona, después de lo cual la muestra líquida a medir se coloca en una cubeta en el espectrofotómetro. El análisis es rápido y relativamente fácil.

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica altamente sofisticada, que puede diferenciar entre las clorofilas y carotenoides individuales tanto como sus productos de degradación. Por lo tanto, extiende enormemente la información ambiental y ecológica que se puede inferir a partir de pigmentos sedimentarios. Sin embargo, el equipo es costoso y el proceso, desde la extracción hasta los análisis de datos, es trabajoso. Por otra parte, se requiere una manipulación cuidadosa de las muestras protegiéndolas de la luz solar, el oxígeno y las altas temperaturas, con el fin de prevenir la degradación de los pigmentos antes de análisis. No obstante, la cantidad de información crítica que puede derivar de los análisis con HPLC, tales como la abundancia de grupos específicos de algas o cianobacterias mediante sus pigmentos marcadores, los cambios en el predominio de distintos grupos de algas a través del tiempo e información acerca de los procesos diagenéticos, ha hecho que el uso de HPLC sea cada vez más común en las investigaciones paleolimnológicas en los últimos años. Una revisión completa y exhaustiva de HPLC dirigida a paleolimnólogos, desde el muestreo hasta el análisis e interpretación de datos, se puede encontrar en Leavitt y Hodgson (2001). Detalles sobre la metodología para el análisis de pigmentos y productos de degradación se pueden consultar en los capítulos 9 y 10.

En contraste con los otros dos métodos, la VRS es una técnica no destructiva y rápida. Los sedimentos deben ser homogeneizados antes del análisis, pero las mediciones se toman en unos pocos segundos y no requieren reactivos. El análisis de los datos y la cuantificación también es relativamente fácil. Sin embargo, la VRS tiene un alto costo para la adquisición de los equipos, y aunque se trata de una metodología de desarrollo, ahora solo puede proporcionar mediciones de clorofila *a* total. Una revisión de los métodos y aplicaciones de la VRS en la paleolimnología se puede encontrar en Korsman *et al.* (2001).

15.5.2. DIATOMEAS

La taxonomía de las diatomeas (algas unicelulares de la clase Bacillariophyceae) se basa en las características morfológicas de los frústulos silíceos que forman sus paredes celulares, por lo que una buena conservación de los mismos permite identificarlas al nivel de especies sub-especies. Los frústulos suelen ser abundantes y bien preservados en la gran mayoría de los sedimentos lacustres y fluviales (Battarbee *et al.* 2001). La erosión química de las válvulas puede ocurrir 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 rangos diferentes y específicos de tolerancia a los parámetros ambientales (Smol & Stoermer 2010). El desarrollo de los modelos que utilizan a las comunidades de diatomeas para inferir cuantitativamente las variables limnológicas importantes tales como el pH (Battarbee *et al.* 2001), el fósforo (Hall & Smol 2010) y la salinidad (Fritz *et al.* 2010), entre otros, ha provocado que las diatomeas sean uno de los bioindicadores más utilizados en estudios limnológicos y paleolimnológicos (Smol & Stoermer 2010; Smol 2008).

Las muestras de diatomeas se examinan después de eliminar la materia orgánica 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. La metodología para el análisis de diatomeas, incluyendo tratamientos más complejos y eficaces, se puede consultar en el capítulo 9, en Ferrario *et al.* (1995) o en Battarbee *et al.* (2001).

15.5.3. POLEN Y ESPORAS

Los sedimentos lacustres guardan restos de plantas vasculares y briofitas que pueden provenir de las macrófitas propias de la cuenca o de la vegetación que rodea la misma. Entre estos restos, los más abundantes son los granos de polen y esporas que, conjuntamente con los microfósiles vegetales, representan los fósiles más informativos y más extensamente estudiados (Cohen 2003). Los granos de polen son los gametofitos masculinos de las plantas con semilla, mientras que las esporas son los gametofitos inmaduros de helechos, musgos y plantas afines. Una pared extremadamente resistente a los procesos de degradación en medios anóxicos (Erdtman 1960), favorece su preservación en grandes cantidades. De acuerdo a sus características morfológicas, los granos de polen pueden ser identificados a diferentes niveles taxonómicos y así indicarnos el tipo de planta que los produjo. Su análisis es una de las principales herramientas utilizadas en la reconstrucción de los ambientes del período Cuaternario. La terminología utilizada en estos grupos es muy específica; se sugiere consultar el excelente glosario ilustrado *Glossary of Pollen and Spore Terminology* (Hoen, *on line*).

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, pueden incorporarse directamente en los sedimentos del mismo y reflejan la vegetación que crecía en las proximidades, mientras que los granos de polen de otras plantas, especialmente árboles, son transportados por el agua o el 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 los periodos 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 determinado ambiente de depósito los distintos tipos de granos de polen y esporas presentan potencial de preservación variable, que depende en gran medida de la morfología específica y de la cantidad de esporopolenina, un polisacárido muy complejo y resistente que compone 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 cm³ 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. Existen numerosas publicaciones que detallan la metodología para la extracción de polen y esporas de sedimentos. Entre las más importantes están Faegri & Iversen (1989), Moore *et al.* (1991) y Traverse (2007). Aquí se resume la técnica palinológica de Jackson (1999) para sedimentos no consolidados.

Procedimiento

- 1) Si el sedimento es rico en arcillas, desagregar 1 cm³ de muestra en baño caliente con pirofosfato de sodio al 5% durante 10 min. Si el sedimento es rico en mate-

ria orgánica, desagregar 1 cm³ de muestra en baño caliente con hidróxido de potasio al 10% durante 10 min.

- 2) Filtrar a través de malla de acero inoxidable de 180 µm (la fracción gruesa puede ser analizada para microfósiles o descartada).
- 3) Remover los carbonatos agregando HCl al 10% durante 10 min. Repetir hasta que no se observe reacción efervescente. Neutralizar con sucesivos lavados.
- 4) Remover los silicatos agregando HF concentrado y dejando actuar durante 24 h, agitando ocasionalmente. Neutralizar con sucesivos lavados.
- 5) Agregar ácido acético glacial a la muestra para deshidratar.
- 6) Remover la celulosa agregando mezcla acetolítica (9:1 de anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrados) preparada en el momento y sometiendo a baño María durante 1 a 5 min.
- 7) Agregar ácido acético glacial para enfriar al retirar del baño María y neutralizar con sucesivos lavados mediante centrifugación.
- 8) Si aún hay mucha arcilla en suspensión, tratar con pirofosfato de sodio al 5% seguido de dos o tres lavados con agua
- 9) Montar el residuo en un portaobjetos en un medio de montaje con índice de refracción menor a 1.55 y observar al microscopio óptico.

Para la identificación de los granos de polen y esporas en sedimentos del Cuaternario, es imprescindible confeccionar una palinoteca de referencia de 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) de Chile, Markgraf & D'Antoni (1978) de Argentina, McAndrews *et al.* (1973) y Roubik & Moreno (1991) de Norteamérica, Moore *et al.* (1991) de Europa y Colinvaux *et al.* (1999). Una revisión de los métodos y aplicaciones del polen en paleolimnología se puede encontrar en Bennett & Willis (2001).

15.5.4. SILICOFITOLITOS

Los silicofitolitos son cuerpos microscópicos (20 a 50 µm) 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 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 determinación en 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.

Algunas síntesis sobre este grupo, tanto a nivel general como taxonómico o aplicado, son las de Piperno (2001), Pearsall (1989) y Rapp & Mulholland (1992). La clasificación parataxonómica (clasificación artificial para restos o señales fósiles) tempranamente propuesta por Bertoldi do Pomar (1971) continúa siendo de 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 la extracción de silicofitolitos en sedimentos.

Procedimiento (resumido de Piperno 2001)

- 1) Medir 10-15 cm³ de sedimentos y agitarlos en 5% de Calgon durante 24 h.
- 2) Remover carbonatos con HCl al 10%.
- 3) Remover la materia orgánica con H₂O₂ al 30%.
- 4) Filtrar la muestra a través de malla de 250 µm.
- 5) Permitir la decantación de limos y arenas y descartar el sobrenadante para eliminar acillas (repetir hasta que el sobrenadante sea limpio).
- 6) Si es necesario, remover ácidos húmicos calentando suavemente durante 10 min en KOH al 10%.
- 7) Agregar líquido pesado o ZnBr a una gravedad específica de 2.3.
- 8) Pipetear y transferir la fracción liviana a tubos limpios (repetir el proceso de flotación para asegurar la remoción de la mayor cantidad posible de silicofitolitos).
- 9) Agregar agua destilada suficiente para disminuir la gravedad específica a menos de 1.
- 10) Deshidratar usando acetona o etanol al 100%.
- 11) Montar en benzoato de bencilo o Permount®.

Muchos investigadores dividen la muestra en fracciones de tamaño para facilitar la observación en microscopio óptico (Pinilla com. pers., en del Puerto 1998).

15.5.5. 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).

Mientras los granos de polen y las esporas son fácilmente dispersados por diversos agentes, los macrofósiles vegetales son considerados autóctonos de la cuenca dado que se depositan cerca del sitio donde vivía la planta que les dio origen, debido a su gran tamaño y alta resistencia al transporte. De este modo, su asociación fósil 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 1983a). Generalmente la cantidad de macrofósiles vegetales por volumen de sedimento es muy baja, por lo que deben examinarse muestras grandes.

Procedimiento (Birks 2001)

- 1) Desagregar 50-100 cm³ de sedimento sumergiéndolo en una solución de pirofosfato de sodio al 10% si es necesario.
- 2) Colocar la muestra en un tamiz con una malla de 125 µm (dependiendo del tipo de sedimento, tamices de menor apertura pueden colocarse serialmente por debajo de éste).
- 3) Lavar el sedimento agregando agua en forma de lluvia con fuerza suficiente para eliminar el material más fino a través del tamiz, pero sin dañar los fósiles delicados.
- 4) Transferir el residuo a un contenedor con tapa y refrigerar hasta el momento de su estudio.

15.6. RESTOS ANIMALES

Entre los restos animales que se aplican en paleolimnología, los más comunes son los crustáceos (particularmente cladóceros y ostrácodos) y los insectos (especialmente cápsulas cefálicas de quironómidos) (Smol *et al.* 2001).

15.6.1. DÍPTEROS

Las larvas de quironómidos, familia perteneciente al orden Diptera, son macroinvertebrados abundantes en los sistemas acuáticos, que en algunas etapas de su ciclo de vida viven en o sobre los sedimentos del fondo. De ellas suelen preservarse las cápsulas cefálicas que permiten las determinaciones taxonómicas. A partir de la composición de la comunidad se pueden inferir características ambientales, entre ellas la temperatura y anoxia en las aguas del fondo, y por lo tanto realizar 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 Walker (2001). 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; Walker 2001).

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 µm y lavar con agua. Mantener las dos fracciones aparte para facilitar la separación.
- 3) Vaciar los tamices dentro de cajas de Petri y poner con pipeta una submuestra en una cámara tipo Bogorov de 5 mm de profundidad y 5 mm de ancho.
- 4) Separar las cápsulas cefálicas bajo lupa usando agujas o 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 a un 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 13, y otras en Cranston (1982) y Wiederholm (1983).

15.6.2. CLADÓCEROS

Los cladóceros son los crustáceos que se preservan en mayor abundancia en sedimentos lacustres, en particular los de las familias Bosminidae (pelágica) y Chydoridae (litoral). Generalmente son de tamaño <1 mm (Korhola & Rautio 2001). Luego

de la deposición y la descomposición de partes blandas, se conservan separadamente los escudos cefálicos, las valvas y los extremos de los abdómenes. Aunque la familia Daphniidae suele representar una parte importante de la comunidad pelágica, sus exoesqueletos son frágiles y no se preservan en sedimentos, por lo que solo están representados en general por sus grandes y resistentes huevos (efipios), los que difícilmente pueden ser identificados a nivel específico (Birks & Birks 1980; Korhola & Rautio 2001).

Ejemplares de Chydoridae y Bosminidae generalmente se preservan de una manera que refleja sus abundancias en el agua y su composición en los sedimentos, por lo tanto pueden servir como indicadores de cambios comunitarios (Korhola & Rautio 2001). 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). Distintos grupos de cladóceros son indicadores de hábitats diferentes, siendo indicadores útiles de biomasa proveniente del litoral, plancton, rocas, arena, sedimentos y vegetación (Korhola & Rautio 2001).

Procedimiento (Korhola & Rautio 2001)

- 1) Calentar una muestra de volumen conocido en 150 ml de KOH 10% hasta 70-80 °C durante 30-60 min, revolviendo suavemente para deflocular el material orgánico.
- 2) Tamizar a través de una malla de 50 μm y enjuagar con agua hasta que salga transparente.
- 3) Transferir los restos en la malla a un tubo (5-15 ml) y agregar 2-3 gotas de solución safranina-glicerina para dar color a la muestra, y unas gotas de formalina o alcohol como conservante. Anotar el volumen final de la muestra.
- 4) Pipetear 200 μl de la muestra en un portaobjeto y cubrir con un cubreobjetos. Se pueden hacer portaobjetos permanentes usando glicerina y esmalte de uñas para sellar.
- 5) El mínimo recomendado para enumeraciones es de 200 ejemplares, que normalmente requiere dos portaobjetos. Se enumeran por separado todos los restos de los cladóceros, pero solo se usa la parte más abundante de cada taxón para calcular su abundancia.
- 6) Calcular la abundancia en restos por cm^3 utilizando la información volumétrica de la muestra preparada, la cantidad de muestra diluida en el tubo y la proporción de la muestra contada.

Más detalles sobre los cladóceros, incluyendo imágenes de las partes fosilizadas e información taxonómica, se encuentra en Korhola & Rautio (2001).

15.6.3. OSTRÁCODOS

Los ostrácodos son pequeños crustáceos (de 200 a 3000 μm 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. Son muy abundantes en margas (calcitas arcillosas), donde pueden conformar 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. Son particularmente sensibles a cambios de salinidad, teniendo cada especie un rango de tolerancia específico, desde aguas dulces 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).

Además de los análisis taxonómicos, mucha información ambiental puede obtenerse a partir de los análisis químicos de sus conchas. Los ostrácodos pueden brindar información sobre la temperatura, el estado trófico y las condiciones químicas de los cuerpos de agua en los cuales existieron, derivada de mediciones de isótopos estables en sus conchas (especialmente los de O, Sr y C) (Holmes 2001). Revisiones completas de las aplicaciones de los ostrácodos en la paleolimnología se pueden encontrar en Holmes (2001) y Holmes & Chivas (2002).

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 de 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 entre 75 y 1000 μm . 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 12.

15.7. RESULTADOS

Los estudios paleolimnológicos en Uruguay se han concentrado principalmente en dos temas: la evolución ambiental a largo plazo de los ecosistemas, incluyendo cambios climáticos, paleosalinidad y estado trófico (Bracco *et al.* 2005, 2011; del Puerto *et al.* 2006, 2013; García-Rodríguez 2006; García-Rodríguez *et al.* 2001, 2004a, 2004b, 2010; Inda *et al.* 2006), y los efectos antrópicos en lagos y lagunas (Gabito *et al.* 2013; García-Rodríguez *et al.* 2002). Las investigaciones se realizaron principalmente en las lagunas costeras del este de Uruguay, con estudios publicados de las lagunas Blanca, Castillos, Merín, Negra y Rocha, además de lagos urbanos como el Lago Rodó en Montevideo. Los indicadores más frecuentemente usados en dichos trabajos han sido las diatomeas y los silicofitolitos.

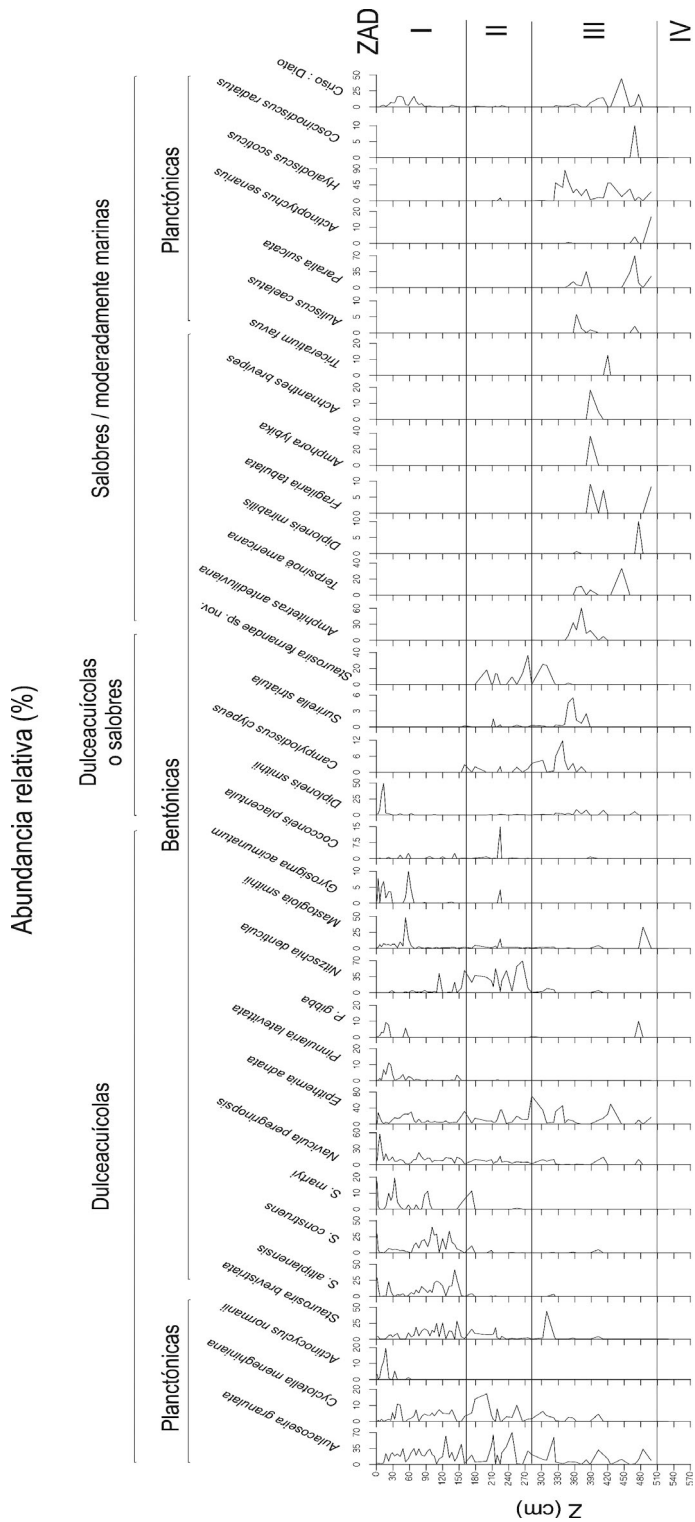


Figura 15.1. Abundancia relativa de las especies de diatomeas en el sedimento de la Laguna Blanca, mostrando su evolución a largo plazo desde el ecosistema terrestre (grupo IV) hasta marino-salobre (III), salobre-agua dulce (II) y agua dulce (I) (tomado de García-Rodríguez *et al.* 2004b).

15.7.1. PALEORREGISTROS DE LA LAGUNA BLANCA

Entre 2002 y 2006 se publicaron una serie de estudios sobre paleolimnología de la Laguna Blanca en Maldonado (del Puerto *et al.* 2006; García-Rodríguez *et al.* 2002, 2004b). En mayo de 2000 se realizó un muestreo paleolimnológico, para lo cual se tomó una muestra de sedimento de 545 cm de profundidad que representó los últimos 7300 años de sedimentación. Se determinó la concentración de materia orgánica, de nitrógeno y de fósforo, la abundancia de especies de diatomeas y silicofitolitos, el tamaño de grano y la concentración de clorofila por espectrofotometría (Fig. 15.1).

Cambios en las abundancias relativas de las diatomeas permitieron distinguir varias épocas en la historia de la laguna. Por la falta de diatomeas se interpretó que el fondo del testigo representaba un ambiente terrestre. Después, por cambios sucesivos en la composición de su comunidad, de marinos a salobres hasta dulcea-cuicolas, se concluyó que el lago evolucionó en su salinidad a lo largo del tiempo (García-Rodríguez *et al.* 2004b). También se detectaron cambios en la vegetación a partir de análisis de silicofitolitos, que permitieron hacer inferencias de los cambios climáticos a largo plazo en la zona (del Puerto *et al.* 2006).

Aunque se ha detectado una tendencia a largo plazo hacia condiciones oligotróficas, esta tendencia se volteó en el último medio siglo debido al cambio del uso del suelo en la cuenca de la laguna. Diversos indicadores mostraron los efectos de la eutrofización, incluyendo la materia orgánica, las concentraciones de pigmentos y la composición de especies de diatomeas (Fig. 15.2) (García-Rodríguez *et al.* 2002).

Esta serie de estudios demuestra la utilidad de la paleolimnología para inferir cambios, tanto naturales como antrópicos, en los ecosistemas de nuestro país, en escalas de tiempo de décadas hasta milenios, así como la potencia de los enfoques *multiproxy* para la generación de datos ambientales complementarios.

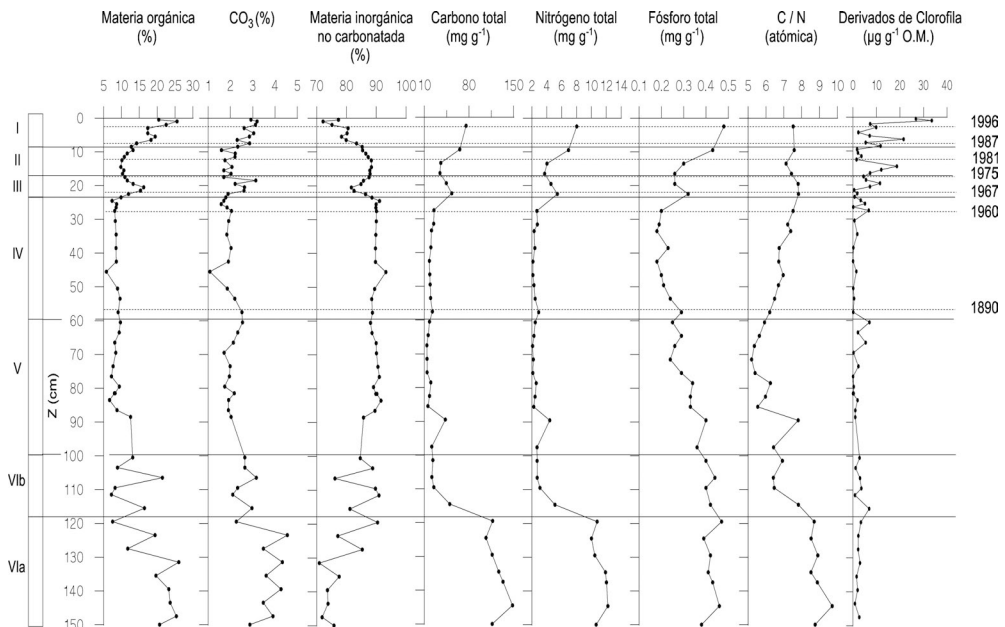


Figura 15.2. Indicadores geoquímicos que muestran la eutrofización de la Laguna Blanca por efectos humanos durante el último medio siglo. Se destacan los aumentos en materia orgánica, nitrógeno y clorofila (tomado de García-Rodríguez *et al.* 2002).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta Hoyos LE (1972): *Guía práctica para la investigación y redacción de informes*. Paidós Educador. Buenos Aires: 172 p.
- Admiraal W, H Peletier & H Zomer (1982): *Observations and experiments on the population dynamics of epipelagic 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.
- Allan JD & MM Castillo (2007): *Stream Ecology: Structure and Function of Running Waters*. 2nd ed. Springer: 445 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.
- Alonso C, C Piccini, F Unrein, F Bertoglio, D Conde & J Pernthaler (2013): *Environmental dynamics as a structuring factor for microbial carbon utilization in a subtropical coastal lagoon*. *Frontiers in Microbiology* 4(14).
- Amann RI, W Ludwig & KH Schleifer (1995): *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation*. *Microbiological Reviews* 59: 143-169.
- Ammerman JW (1993): *Microbial cycling of inorganic and organic phosphorus in the water column*. En: Kemp PF, BF Sherr, EB Sherr & JJ Cole (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.
- APHA (1998): *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20th ed. American Public Health Association. Washington.
- Appleby PG (2001): *Chronostratigraphic techniques in recent sediments*. En: Last WM & JP Smol (eds.): *Tracking environmental change using lake sediments. Volume 1: Basin analysis, coring, and chronological techniques*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 171-203.
- 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. Udelar. 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 (2007): *Effects of submerged aquatic vegetation on macrobenthos in a coastal lagoon of the Southwestern Atlantic*. International Review of Hydrobiology 92: 33-47.
- Arocena R & G Chalar (1989): *Aportes al conocimiento del macrozoobentos del arroyo Toledo (Montevideo - Canelones)*. Bol. Soc. Zool. Uruguay 5: 9-10.
- Arocena R, G Chalar, R Fabián, L de León, E Brugnoli, M Silva, E Rodó, I Machado, JP Pacheco, R Castiglioni & L Gabito (2008): *Evaluación ecológica de cursos de agua y biomonitorio*. Informe final del Convenio de Cooperación Técnica y Científica entre DINAMA y Facultad de Ciencias. Disponible en <<http://limno.fcien.edu.uy/publications/informes.html>> [Fecha de acceso: octubre de 2015].
- 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.
- Arocena R, D Fabián & J Clemente (2000): *Las causas naturales versus la contaminación orgánica como factores estructuradores del zoobentos en tres afluentes de una laguna costera*. Limnética 18: 99-113.
- 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 & N Prat (2006): *Efectos de la eutrofización en el zoobentos de una laguna costera: experimentos con mesocosmos*. En: Tundisi JG, T Matsumura-Tundisi & C Sidagis (eds.): *Eutrofização na América do Sul: causas, consequências e tecnologias de gerenciamento e controle*. IIE, AIEGA, ABC, CNPq, IAPIINAC: 387-412.
- Arocena R & L Rodríguez (2011): *Small-scale structure of macrophytes and macrobenthos in coastal "Laguna de Rocha". Sav and macrobenthos in "Laguna de Rocha"*. Pan-American Journal of Aquatic Sciences 6(2): 148-160.
- Arrigo K (2005): *Marine microorganisms and global nutrient cycles*. Nature 437: 349-355.
- Atlas RM (1993): *Detecting gene sequences using the polymerase chain reaction*. En: Kemp PF, BF Sherr, EB Sherr & JJ Cole (eds.): *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publ. London: 267-271.
- Aubriot L & S Bonilla (2012): *Rapid regulation of phosphate uptake in freshwater cyanobacterial blooms*. Aquatic Microbial Ecology 67: 251-263.
- Aubriot L, S Bonilla & G Falkner (2011): *Adaptive phosphate uptake behaviour of phytoplankton to environmental phosphate fluctuations*. FEMS Microbiology Ecology 77: 1-16.

- Aubriot L, F Wagner & G Falkner (2000): *The phosphate uptake behaviour of phytoplankton communities in eutrophic lakes reflects alterations in the phosphate supply*. European Journal of Phycology 35: 255-262.
- Azim ME, MCJ Verdegem, AA van Dam & MCM Beveridge (eds.) (2005): *Periphyton: Ecology, Exploitation and Management*. CABI Publishing. Cambridge.
- 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.
- Balsamo M, JL d'Hondt, J Kisielewski & L Pierboni (2008): *Global diversity of gastrotrichs (Gastrotricha) in fresh waters*. Hydrobiologia 595: 85-91.
- Battaglione SC (1985): *A creel survey of the Lake Keepit recreational fishery*. The Australian Zoologist 21: 565-578.
- Battarbee RW (1973): *A new method for the estimation of absolute numbers, with reference specially to diatoms*. Limnol. Oceanogr. 18: 647-653.
- Battarbee RW (1986): *Diatom analysis*. En: Berglund BE (ed.): *Handbook of Holocene Paleocology and Paleohydrology*. Wiley. New York: 527-531.
- Battarbee RW, VJ Jones, RJ Flower, NG Cameron, H Bennion, L Carvalho & S Juglins (2001): *Diatoms*. En: Smol JP, HJB Birks & WM Last (eds.): *Tracking environmental change using lake sediments. Volume 3: Terrestrial, algal, and siliceous indicators*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 155-202.
- 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 PF, BF Sherr, EB Sherr & JJ Cole (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.
- Bennett KD & KJ Willis (2001): *Pollen*. En: Smol JP, HJB Birks & WM Last (eds.): *Tracking environmental change using lake sediments. Volume 3: Terrestrial, algal, and siliceous indicators*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 5-32.
- Bentancourt CM, IB Scatoni & E Morelli (2009): *Insectos del Uruguay*. Facultad de Agronomía/Facultad de Ciencias. Udelar. Montevideo: 658 p.
- 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 inquiries 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.
- Biggs BJF & C Kilroy (2000): *Stream periphyton monitoring manual*. NIWA. Christchurch: 246 p.
- Birge EA (1915): *The heat budgets of American and European lakes*. Trans. Wis. Acad. Sci. Arts Lett. 18: 341-391.

- Birks HH (2001): *Plant Macrofossils*. En: Smol JP, HJB Birks & WM Last (eds.): *Tracking environmental change using lake sediments. Volume 3: Terrestrial, algal, and siliceous indicators*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 49-74.
- Birks HJB & HH Birks (1980): *Quaternary Palaeoecology*. Arnold. London: 289 p.
- Bistoni MA, A Hued, M Videla & L Sagretti (1999): *Water quality effects on fish communities of the central part of Argentina*. *Revista Chilena de Historia Natural* 72: 325-335.
- Björck S & B Wohlfarth (2001): *¹⁴C chronostratigraphic techniques in paleolimnology*. En: Last WM & JP Smol (eds.): *Tracking environmental change using lake sediments. Volume 1: Basin analysis, coring, and chronological techniques*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 205-245.
- Blackman V (1919): *The compound interest law and plant growth*. *Ann. Bot.* 33: 353-360.
- Blais JM & J Kalff (1995): *The influence of lake morphometry on sediment focusing*. *Limnology and Oceanography* 40(3): 582-588.
- Boccardi L (2012): *Estructura de la comunidad bentónica en un tramo inferior del río Uruguay y potenciales indicadores para la evaluación de efluentes de plantas de celulosa*. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales. Facultad de Ciencias. Udelar. Montevideo: 97 p.
- 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 (1995a): *Taxonomía y morfología de los dinoflagelados: Métodos de trabajo*. En: Alveal K, ME Ferrario, EC Oliveira & E Sar (eds.): *Manual de métodos ficológicos*. Univ. Concepción: 55-82.
- Boltovskoy A (1995b): *Técnicas de microscopía electrónica de barrido: Aplicación a las microalgas*. En: Alveal K, ME Ferrario, EC Olivera & E Sar (eds.): *Manual de métodos ficológicos*. Univ. Concepción: 119-138.
- 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.
- Bonetto AA & EA Cordivola (1965): *Notas sobre briozoos (Endoprocta y Ectoprocta) del río Parana. III. Fredericella sultana (Blumenbach) en el Paraná medio*. *Physis* 25: 255-262.
- 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. Udelar. Montevideo: 106 p.
- Bonilla S, L Aubriot, MCS Soares, M González-Piana, A Fabre, VLM Huszar, M Lürning, D Antoniades, J Padisák & C Kruk (2012): *What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria Planktothrix agardhii and Cyndrospermopsis raciborskii?* *FEMS Microbiology Ecology* 79: 594-607.
- 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 Fe 18-24/09/97.
- Bonilla S, D Conde, L Aubriot, L Rodríguez-Gallego, C Piccini, E Meerhoff, L Rodríguez-Graña, D Calliari, P Gómez, I Machado & A Britos (2006): *Procesos estructuradores de las comunidades biológicas en lagunas costeras de Uruguay*. En: Menafra R, L Rodríguez-Gallego, F Scarabino & D Conde (eds.): *Bases para la conservación y el manejo de la costa Uruguaya*. Vida Silvestre Uruguay/US-Fish Wildlife Service. Montevideo: 611-630.

- Bonilla S, D Conde & H Blanck (1998): *Comparison of the photosynthetic response between marine phytoplankton, periphyton and epipsammon to the herbicides paraquat and simazine*. *Ecotoxicology* 2: 99-105.
- Bonilla S, M Pérez & L de León (1995): *Cyanophyceae planctónicas del Lago Ton-Ton, Canelones, Uruguay*. *Hoehnea* 21(1/2): 185-192.
- Bonilla S, M Rautio & WF Vincent (2009): *Phytoplankton and phytobenthos pigment strategies: Implications for algal survival in the changing Arctic*. *Polar Biology* 32: 1293-1303.
- Bonilla S, V Villeneuve & WF Vincent (2005): *Benthic and planktonic algal communities in a high Arctic lake: Pigment structure and contrasting responses to nutrient enrichment*. *Journal of Phycology* 41: 1120-1130.
- Booth BC (1993): *Estimating cell concentration and biomass of autotrophic plankton using microscopy*. En: Kemp PF, BF Sherr, EB Sherr & JJ Cole (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. Boubée & Cie. Paris: 572 p.
- Bourrelly P (1981): *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique. Tome II: Les algues jaunes et brunes*. N. Boubée & Cie. Paris: 517 p.
- Bourrelly P (1985): *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique. Tome III: Les algues bleues et rouges*. N. Boubée & Cie. Paris: 606 p.
- Box JD (1981): *Enumeration of cell concentrations in suspensions of colonial freshwater microalgae, with particular reference to Microcystis aeruginosa*. *British Phycological Journal* 16: 153-164.
- Boyle JF (2001): *Inorganic geochemical methods in paleolimnology*. En: Last WM & JP Smol (eds.): *Tracking environmental change using lake sediments. Volume 2: Physical and geochemical methods*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 83-141.
- Bracco R, L del Puerto, H Inda, D Panario, C Castiñeira & F García-Rodríguez (2011): *The relationship between emergence of mound builders in SE Uruguay and climate change inferred from opal phytolith records*. *Quaternary International* 245(1): 62-73.
- Bracco R, H Inda, L del Puerto, C Castiñeira, P Sprechmann & F García-Rodríguez (2005): *Relationships between Holocene sea-level variation, trophic development and climate change in Negra Lagoon, southern Uruguay*. *Journal of Paleolimnology* 33: 253-263.
- Bratbak G (1985): *Bacterial biovolume and biomass estimations*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1488-1493.
- Bratbak G (1993): *Microscope methods for measuring bacterial biovolume: epifluorescence microscopy, scanning electron microscopy, and transmission electron microscopy*. En: Kemp PF, BF Sherr, EB Sherr & JJ Cole (eds.): *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publ. London: 309-315.
- Brauer A, P Dulski, C Mangili, J Mingram & J Liu (2009): *The potential of varves in high-resolution paleolimnological studies*. *PAGES News* 17: 96-98.
- 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: 103-123.

- Brinkhurst RO & MR Marchese (1992): *Guía para la identificación de oligoquetos acuáticos continentales de Sud y Centroamérica*. Colección Climax 6. Santa Fe: 207 p.
- Brook JL (1959): *Cladocera*. En: Edmondson WT (ed.): *Freshwater Biology*. Wiley. New York: 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.
- Bruner de Miranda L (2002): *Principios de Oceanografía Física de Estuários*. Vol. 42. EdUSP. São Paulo: 411 p.
- Brussa CA & IA Grela (2007): *Flora arbórea del Uruguay: con énfasis en las especies de Rivera y Tacuarembó*. Cofusa. Montevideo: 544 p.
- Buesing N & MO Gessner (2003): *Incorporation of radiolabeled Leucine into protein to estimate bacterial production in plant litter, sediment, epiphytic biofilms, and water samples*. Microb. Ecol. 45: 291-301.
- Burkart AE (1974): *Flora ilustrada de Entre Ríos (Argentina)*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- 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 AL (1970): *Flora de la Provincia de Buenos Aires*. Col. Cient. INTA. Buenos Aires.
- Cabrera A & H Fabris (1948): *Plantas acuáticas de la Provincia de Buenos Aires*. Publicaciones Técnicas. Dirección Agropecuaria. La Plata 5(2): 1-131.
- Cabrera AL & EM Zardini (1978): *Manual de la flora de los alrededores de Buenos Aires*. 2a ed. Acme. Buenos Aires: 788 p.
- Cáceres E (1995): *Métodos de preparación de algas para su observación con microscopía electrónica de transmisión convencional (METC)*. En: Alveal K, ME Ferrario, EC Olivera & E Sar (eds.): *Manual de métodos ficológicos*. Univ. Concepción: 147-168.
- Campbell L (1993): *Immunofluorescence method for the detection and characterization of marine microbes*. En: Kemp PF, BF Sherr, EB Sherr & JJ Cole (eds.): *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publ. London: 295-302.
- Campbell D, V Hurry, AK Clarke, P Gustafsson & G Öquist (1998): *Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation*. Microbiology and molecular biology reviews 62: 667-683.
- Campos S & L del Puerto (1998): *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.
- Canfield DE Jr., JV Shireman, DE Colle, WT Haller, CE Watkins II & MJ Maceina (1984): *Prediction of chlorophyll-a concentrations in Florida lakes: Importance of aquatic macrophytes*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 41(3): 497-501.
- Canter-Lund H & JWG Lund (1995): *Freshwater algae: Their microscopic world explored*. Biopress. Bristol: 360 p.
- 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 PF, BF Sherr, EB Sherr & JJ Cole (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.

- Carpenter SR, JF Kitchell, JR Hodgson, PA Cochran, JJ Esler, MM Esler, DM Lodge, D Kretchmer, X He & CN von Ende (1987): *Regulation of lake primary productivity by food web structure*. Ecology 68: 1863-1876.
- Carty S (2003): *Dinoflagellates*. En: Wehr JD & RG Sheath (eds.): *Freshwater algae of North America: Ecology and classification*. Academic Press. San Diego: 685-714.
- Carvalho JC (1946): *Gordiáceos do Museu de Historia Natural de Montevideo*. Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo 2(32): 1-7.
- CBE (Council of Biology Editors) (1983): *CBE Style Manual*. Bethesda.
- 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 & D Conde (2000): *Antecedentes y estado actual del conocimiento científico de los embalses de Uruguay*. En: Fernández Cirelli A (ed.): *Memorias del Taller "El agua en Iberoamérica: Acuíferos lagos y embalses"*. CYTED-X: 145-147.
- 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.
- Chalar G, D Fabián, M González-Piana & L Delbene (2010): *Limnología de los embalses del río Negro: Noviembre 2000-Marzo 2009*. Informe del Convenio UTE - Facultad de Ciencias. Montevideo: 63 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 & J Newton (1994): *On the chlorophyll a retention properties of glass-fiber GF/F filters*. Limnol. Oceanogr. 40(2): 428-433.
- Chen F, JR Lu, B Binder & RE Hodson (2001): *Enumeration of viruses in aquatic environments using SYBR Gold stain: application of digital image analysis and flow cytometer*. Appl. Environ. Microbiol. 67: 539-545.
- Chen Y, B Qin, K Teubner & MT Dokulil (2003): *Long-term dynamics of phytoplankton assemblages: Microcystis-domination in Lake Taihu, a large shallow lake in China*. Journal of Plankton Research 25: 445-453.
- 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.
- Chorus I & J Bartram (1999): *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Chapman & Hall. London.
- Claps MC & GC Rossi (1997): *Tardígrados de Uruguay, con descripción de dos nuevas especies (Echiniscidae, Macrobiotidae)*. Iheringia, Sér. Zool. 83: 17-22.
- Clemente JM & R Arocena (2003): *Zoobentos de diversos microhábitats en tres bañados de los Humedales del Este (Uruguay)*. En: Neiff JJ (ed.): *Humedales de Iberoamérica*. CYTED: 303-310.
- Codd G, S Bell & W Brooks (1989): *Cyanobacterial toxins in water*. Water Science and Technology 21: 1-13.
- Cohen AS (2003): *Paleoecological archives in lake deposits 2: Records from important groups*. En: Cohen AS: *Paleolimnology: The History and Evolution of Lake Systems*. Oxford Univ. Press. New York: 287-327.

- Cole GA (1983): *Manual de Limnología*. Hemisferio Sur. Buenos Aires: 405 p.
- Colinvaux P, PE de Oliveira & JE Moreno Patiño (1999): *Amazon pollen Manual and Atlas*. Harwood Academic Publishers. Amsterdam: 332 p.
- Coll J (1979): *Catálogo de algas citadas para Uruguay*. SOHMA. Montevideo: 133 p.
- Comas A & MC Pérez (2002): *Chlamydomphyceae (Chlorophyceae) from Merin lagoon (Brazil-Uruguay, South America) with special references to the family Botryococcaeae*. *Algological Studies* 107: 49-65.
- Conde D (2000): *Influencia del régimen hidrológico y de la radiación solar ultravioleta en la producción de comunidades microalgales en una laguna costera del Atlántico Sur*. Tesis de Doctorado en Ecología. PEDECIBA - Facultad de Ciencias. Udelar. Montevideo: 190 p.
- Conde D (2009): *Eutrofización, cambio climático y cianobacterias*. En: Bonilla S (ed.): *Cianobacterias planctónicas del Uruguay: Manual para la identificación y medidas de gestión*. Documento técnico PHI-LAC 16: 12-15.
- Conde D, L Aubriot, S Bonilla & R Sommaruga (2002): *Marine intrusions in a coastal lagoon enhance the negative effect of solar UV radiation on phytoplankton photosynthetic rates*. *Marine Ecology Progress Series* 240: 57-70.
- Conde D, S Bonilla, L Aubriot, R de León & W Pintos (1999): *Comparison of the areal amount of chlorophyll a of planktonic and attached microalgae in a shallow coastal lagoon*. *Hydrobiologia* 408/409: 285-291.
- Conde D, J Gorga, M Paradiso, J Clemente, S Bonilla & D Fabián (1998a): *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.
- Conde D & R Sommaruga (1999): *A review of the state of Limnology in Uruguay*. En: Wetzel RG & B Gopal (eds.): *Limnology in developing countries*. International Association for Limnology. New Delhi: 1-31.
- Conde D, R Sommaruga & L Aubriot (1998b): *Underwater UV radiation field in a brackish coastal lagoon associated to extreme DOC gradients I: Optical aspects*. Proceedings of XXVII International Congress of Limnology (SIL, Dublin, Irlanda).
- Conforti V & MC Pérez (2000): *Euglenophyceae of Negro River, Uruguay, South America*. *Algological Studies* 97: 59-78.
- 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.
- Corrales N (2013): *Factores determinantes de la producción perifítica en arroyos de bajo orden: Evaluación experimental en arroyo Chal Chal (Florida)*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Udelar, Montevideo: 38 p.
- Cottrell MT & DL Kirchman (2000): *Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the Cytophaga-Flavobacter cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1692-1697.
- 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 Orthocladiinae (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.
- Crosbie ND, K Teubner & T Weiss (2003): *Flow cytometry mapping provides novel insights into the seasonal and vertical distributions of freshwater autotrophic picoplankton*. Aquatic Microbial Ecology 33: 53-66.
- Croudace IW, A Rindby & RG Rothwell (2006): *ITRAX: Description and evaluation of a new multi-function X-ray core scanner*. En: Rothwell RG (ed.): *New techniques in sediment core analysis*. Geological Society. Special Publications. London 267: 51-63.
- Croudace I & G Rothwell (2010): *Micro-XRF sediment core scanners: Important new tools for the environmental and earth sciences*. Spectroscopy Europe 22: 6-13.
- Cuezco MG (2009): *Mollusca: Gastropoda*. En: Domínguez E & HR Fernández (eds.): *Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos: Sistemática y biología*. Fundación Miguel Lillo. Tucumán: 595-629.
- 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.
- Dahm CN, HM Valett, CV Baxter & WW Woesner (2006): *Hyporheic zones*. En: Hauer FR & GA Lamberti (eds.): *Methods in stream ecology*. 2nd ed. Academic Press: 119-142.
- 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. New York.
- Davis M (2005): *Scientific papers and presentations*. Elsevier. Academic Press: 356 p.
- de León L (1993): *Fitoplancton de un sistema eutrófico. Composición y variación anual de su biomasa*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Udelar. Montevideo: 83 p.
- de Villalobos C, G Ramirez, S Chavarria & F Zanca (2000): *Cuticular ultrastructure of Paragordius esavianus Carvalho and P. varius (Leidy) (Nematomorpha: Chordodidae: Paragordinae)*. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia 150: 135-144.
- de Vogel EF (ed.) (1987): *Manual of herbarium taxonomy. Theory and practice*. UNESCO. Regional Office for Science and Technology for Southeast Asia. Jakarta.
- Dean WE (1974): *Determination of carbonate and organic matter in calcareous sediments and sedimentary rocks by loss on ignition: comparison with other methods*. Journal of Sedimentary Petrology 44: 242-248.
- 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. Udelar. Montevideo.
- del Puerto L, R Bracco, H Inda, O Gutiérrez, D Panario, F García-Rodríguez (2013): *Assessing links between late Holocene climate change and paleolimnological development of Peña Lagoon using opal phytoliths, physical and geochemical proxies*. Quaternary Research 287: 89-100.
- del Puerto L, F García-Rodríguez, H Inda, R Bracco, C Castiñeira & JB Adams (2006): *Paleolimnological evidence of Holocene climatic changes in Lake Blanca, southern Uruguay*. J Paleolimnol 36: 151-163.

- 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 PF, BF Sherr, EB Sherr & JJ Cole (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.
- Deserti MI & MO Zamponi (2011): *Hydra vulgaris Pallas, 1766, (=Hydra attenuata) (Cnidaria: Hydrozoa) from the Los Padres Lagoon (Buenos Aires province, Argentina)*. *R. bras. Bioci.* Porto Alegre 9(4): 482-487.
- Dieterich H (1996): *Nueva guía para la investigación científica*. Planeta. México: 236 p.
- Digerfeldt G (1965): *A new type of large-capacity sampler*. *Geol. Fören. Förhandl. Stock.* 87: 425-430.
- Digerfeldt G & U Lettevall (1969): *A new type of sediment sampler*. *Geol. Fören. Förhandl. Stock.* 91: 399-406.
- Dilcher DL (1974): *Approaches to the identification of angiosperm leaf remains*. *Bot. Gaz.* 40: 1-157.
- Dioni W (1974): *Noticia sobre un raro hidroide de agua dulce de la Argentina y Uruguay*. *Calpasoma dactyloptera*. *Physis B* 33(86): 147-150.
- Dobson M, S Pawley, M Fletcher & A Powell (2012): *Guide to freshwater invertebrates*. SP68. Freshwater Biological Association. Ambleside: 216 p.
- Dodson A & W Thomas (1978): *Filtration*. En: Sournia A (ed.): *Phytoplankton manual*. UNESCO. Paris: 104-107.
- Dokulil M (1984a): *Metodología de medición de fotosíntesis en fitoplancton*. En: Bahamonde N & S Cabrera (eds.): *Embalses, fotosíntesis y productividad primaria*. MaB-UNESCO. Chile: 73-84.
- Dokulil M (1984b): *Physical limnology of lakes*. Lecture notes for the Limnology Postgraduate Course. Austria: 68 p.
- Domínguez E & HR Fernández (eds.) (2009): *Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos: Sistemática y biología*. Fundación Miguel Lillo. Tucumán: 654 p.
- Domínguez E, C Molineri & C Nieto (2009): *Ephemeroptera*. En: Domínguez E & HR Fernández (eds.): *Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos: Sistemática y biología*. Fundación Miguel Lillo. Tucumán: 55-93.
- 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 (1993): *Production of fish populations in lakes*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50: 110-120.
- 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.
- 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.
- Du GY, M Son, S An & IK Chung (2010): *Temporal variation in the vertical distribution of microphytobenthos in intertidal flats of the Nakdong River estuary, Korea*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 86: 62-70.
- 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*. *Öecologia* 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 (1959): *Freshwater biology*. Wiley. New York.
- 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.
- Elliott JM (1977): *Some methods for the statistical analysis of samples of benthic invertebrates*. Sci. Publ. 25 Freshwater Biological Association. Ferry House: 156 p.
- Elser JJ, T Andersen, JS Baron, AK Bergström, M Jansson, M Kyle, KR Nydick, L Steger & DO Hessen (2009): *Shifts in lake N:P stoichiometry and nutrient limitation driven by atmospheric nitrogen deposition*. Science 326: 835-837.
- Engstrom DR & HE Wright (1984): *Chemical stratigraphy of lake sediments as a record of environmental change*. En: Haworth EY & JWG Lund (eds.): *Lake sediments and environmental history*. Univ. of Minnesota Press: 11-67.
- Erdtman G (1960): *The acetolysis method: a revised description*. Svensk Botanisk Tidskrift 54: 561-564.
- Esteves FA (coord.) (2011): *Fundamentos de Limnologia*. 3a ed. Interciência. Rio de Janeiro: 790 p.
- Ezcurra de Drago I (2004): *Biodiversidad de Porifera en el litoral argentino. Grado de competencia con el bivalvo invasor Limnoperna fortunei (Dunker, 1857) (Bivalvia, Mytilidae)*. En: Aceñolaza FG (coord.): *Temas de la biodiversidad del litoral fluvial argentino*. INSUGEO. Miscelánea 12: 195-204.
- Ezcurra de Drago I & AA 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 (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. Udelar. Montevideo: 79 p.
- Fabián D & A Schinca (1990): *Distribución vertical de los cladóceros en el Lago Ton-Ton: diferencias entre los períodos de estratificación y mezcla*. Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral 21(2): 105-115.
- Fabre A (2011): *Flexibilidad fenotípica de la cianobacteria invasora Cylindrospermopsis raciborskii en un gradiente lumínico*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Udelar. Montevideo: 42 p.
- Fabre A, C Carballo, E Hernández, P Piriz, L Bergamino, L Mello, S González, G Pérez, JG León, L Aubriot, S Bonilla & C Kruk (2010): *El nitrógeno y la relación zona eufótica/zona de mezcla explican la presencia de cianobacterias en pequeños lagos subtropicales artificiales de Uruguay*. Pan-American Journal of Aquatic Sciences 5: 112-125.
- Faegri K & J Iversen (1989): *Textbook of pollen analysis*. 4th ed. Wiley: 328 p.
- Falconer I (1996): *Potential impact on human health of toxic cyanobacteria*. Phycologia 35(6 Suppl.): 6-11.
- Falconer I & A Humpage (1996): *Tumour promotion by cyanobacterial toxins*. Phycologia 35(6 Suppl.): 74-79.
- 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, ME Katz, AH Knoll, A Quigg, JA Raven, O Schofield & FJR Taylor (2004): *The evolution of modern eukaryotic phytoplankton*. Science 305(5682): 354-360.
- 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.
- Ferguson RL, EN Buckley & AV Palumbo (1984): *Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement*. Applied and Environmental Microbiology 47: 49-55.
- 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*. Univ. 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 PF, BF Sherr, EB Sherr & JJ Cole (eds.): *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publ. London: 505-508.
- Fisher TR & DRS Lean (1992): *Interpretation of radiophosphate dynamics in lake waters*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49: 252-258.
- 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.
- Fritz SC, BF Cumming, F Gasse & KR Laird (2010): *Diatoms as indicators of hydrologic and climatic change in saline lakes*. En: Smol JP & EF Stoermer (eds.): *The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences*. 2nd ed. Cambridge Univ. Press. Cambridge: 186-208.
- Frost TM (2001): *Freshwater sponges*. En: Smol JP, HJB Birks & WM Last (eds.): *Tracking environmental change using lake sediments. Volume 3: Terrestrial, algal, and siliceous indicators*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 253-263.

- Fuhrman JA & RT Noble (1995): *Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawaters*. *Limnology and Oceanography* 40: 1236-1242.
- Fuhrman JA & CA Suttle (1993): *Viruses in marine planktonic systems*. *Oceanography* 6(2): 51-63.
- Gabito L, S Bonilla & D Antoniadis (2013): *Paleolimnological reconstruction of change in a subtropical lake: a comparison of the subfossil record to limnological data*. *Limnética* 32: 175-188.
- García de Jalón D, M Mayo, F Hervella, E Barceló & T Fernández (1993): *Principios y técnicas de gestión de la pesca en aguas continentales*. Mundi-Prensa. Madrid: 247 p.
- García-Rodríguez F (2006): *Inferring paleosalinity changes using the chrysophyte cyst to diatom ratio in coastal shallow temperate/subtropical lagoons influenced by sea level changes*. *Journal of Paleolimnology* 36: 165-173.
- García-Rodríguez F, L del Puerto, H Inda, C Castiñeira, R Bracco, P Sprechmann & B Scharf (2001): *Preliminary paleolimnological study of Rocha lagoon, SE Uruguay*. *Limnologica* 31: 221-228.
- García-Rodríguez F, N Mazzeo, P Sprechmann, D Metzeltin, F Sosa, HC Treutler, M Renom, B Scharf & C Gaucher (2002): *Paleolimnological assessment of human impacts in Lake Blanca, SE Uruguay*. *Journal of Paleolimnology* 28(4): 457-468.
- García-Rodríguez F, D Metzeltin, P Sprechmann & L Beltrán (2004a): *Upper Pleistocene and Holocene paleosalinity and trophic state changes in relation to sea level variation in Rocha Lagoon, southern Uruguay*. *Journal of Paleolimnology* 32: 117-137.
- García-Rodríguez F, P Sprechmann, D Metzeltin, L Scafati, D Melendi, W Volkheimer, F Scasso & N Mazzeo (2004b): *Holocene trophic state changes in relation to sea level variation in Lake Blanca, SE Uruguay*. *Journal of Paleolimnology* 31: 99-115.
- García-Rodríguez F, S Stutz, H Inda, L del Puerto, R Bracco & D Panario (2010): *A multiproxy approach to infer Holocene paleobotanical changes linked to sea-level variation, paleosalinity levels and shallow lake alternative states in Negra Lagoon, SE Uruguay*. *Hydrobiologia* 646: 5-20.
- Gasol JM & PA del Giorgio (2000): *Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities*. *Scientia Marina* 64: 197-224.
- 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.
- Gazeau F, JJ Middelburg, M Loijens, J-P Vanderborcht, M-D Pizay & J-P Gattuso (2007): *Planktonic primary production in estuaries: comparison of ^{14}C , O_2 and ^{18}O methods*. *Aquat. Microb. Ecol.* 46: 95-106.
- Geider RJ & BA Osborne (1992): *Algal photosynthesis*. Chapman & Hall. New York: 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.
- Geymonat G & R Lombardi (2012): *Manual de campo: flora y fauna de los bosques de Uruguay*. [Mastergraf]. Montevideo: 384 p.
- Gilbert J (2001): *Seasonal plankton dynamics in a Mediterranean hypersaline coastal lagoon: the Mar Menor*. *Journal of Plankton Research* 23: 201-217.
- Glew J, JP Smol & EM Last (2001): *Sediment core collection and extrusion*. En: Last WM & JP Smol (eds.): *Tracking environmental change using lake sediments, Volume 1: Basin analysis, coring, and chronological techniques*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 73-105.

- 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 p.
- González de Infante A (1988): *El plancton de las aguas continentales*. Monografías de OEA. Serie Biología N° 33.
- González Moreno S, H Perales Vela & MO Salcedo Álvarez (2008): *La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas*. REB 27: 119-129.
- Gopen G & Swan J (1990): *The Science of Scientific Writing*. American Scientist 78: 550-558.
- Gosselain V, PB Hamilton & JP Descy (2000): *Estimating phytoplankton carbon from microscopic counts: an application for riverine systems*. Hydrobiologia 438: 75-90.
- Govindjee (1995): *Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence*. Aust. J. Plant Physiol. 22: 131-160.
- Graham LE, JM Graham & LW Wilcox (2009): *Algae*. Benjamin Cummings. San Francisco.
- 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. New York: 257 p.
- Gregor J & B Maršálek (2004): *Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a: a comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods*. Water Research 38: 517-522.
- Grime JP (1977): *Evidence of the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory*. The American Naturalist 111(982): 1169-1194.
- 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 p.
- 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.: 29(2): 169-176.
- Häkanson L (1981): *A Manual of lake morphometry*. Springer-Verlag. New York: 78 p.
- Häkanson L & M Jansson (1983): *Principles of lake sedimentology*. Springer-Verlag. Berlin: 316 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.
- Hall RI & JP Smol (2010): *Diatoms as indicators of lake eutrophication*. En: Smol JP & EF Stoermer (eds.): *The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences*. 2nd ed. Cambridge Univ. Press. Cambridge: 122-151.
- Haney JF & DJ Hall (1973): *Sugard-coated Daphnia: a preservation technique for Cladocera*. Limnol. Oceanogr. 18: 331-333.
- Happey-Wood CM (1991): *Ecology of freshwater planktonic green algae*. En: Sandgren CD (ed.): *Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton*. Cambridge Univ. Press. Cambridge: 175-226.
- 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.

- Havens KE, AD Steinman, HJ Carrick, JW Louda, NM Winfree & EW Baker (1999): *Comparative analysis of Lake Periphyton communities using high performance liquid chromatography (HPLC) and light microscope counts*. *Aquatic Sciences* 61: 307-322.
- Hawkins PR, J Holliday, A Kathuria & L Bowling (2005): *Change in cyanobacterial biovolume due to preservation by Lugol's Iodine*. *Harmful Algae* 4(6): 1033-1043.
- Hawkins CP, JL Kershner, PA Bisson, MD Bryant, LM Decker, SV Gregory, DA McCullough, CK Overton, GH Reeves, RJ Steedman & MK Young (1993): *A hierarchical approach to classifying stream habitat features*. *Fisheries* 18(6): 3-4, 6-12.
- 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.
- Hillebrand H, CD Dürselen, D Kirschtel, U Pollingher & T Zohary (1999): *Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae*. *J. Phycol.* 35: 403-424.
- Hobbie J (1993): *Introduction*. En: Kemp PF, BF Sherr, EB Sherr & JJ Cole (eds.): *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publ. London: 1-5.
- Hoer P: *Glossary of Pollen and Spore Terminology*. Laboratory of Palaeobotany and Palynology. Utrecht. Disponible en <<http://www.pollen.mtu.edu/glos-gtx/glos-int.htm>> [Fecha de acceso: mayo de 2015].
- Holben WE, VGM Calabrese, D Harris, JO Ka & JM Tiedje (1993): *Analysis of structure and selection in microbial communities by molecular methods*. En: GuerreroR, Pedrós-Alió C (ed.): *Trends in microbial ecology*. Spanish Society for Microbiology. Madrid: 367-370.
- 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.
- Holmes JA (2001): *Ostracoda*. En: Smol JP, HJB Birks & WM Last (eds.): *Tracking environmental change using lake sediments. Volume 4: Zoological indicators*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 125-152.
- Holmes JA & AR Chivas (eds.) (2002): *The Ostracoda: Applications in Quaternary research*. Geophysical Monograph Series. American Geophysical Union 131: 313 p.
- 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 LA & DL Johnson (eds.): *Fisheries techniques*. Am. Fish. Soc. Bethesda: 95-111.
- Hudson JJ, WD Taylor & DW Schindler (2000): *Phosphate concentrations in lakes*. *Nature* 406: 54-56.
- Humphries SE & F Widjaja (1979): *A simple method for separating cells of Microcystis aeruginosa for counting*. *British Phycological Journal* 14(4): 313-316.
- Huot Y & M Babin (2011): *Overview of fluorescence protocols: Theory, basic concepts, and practice*. En: Suggett DJ, O Prášil, MA Borowitzka (eds.): *Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: Methods and applications*. Springer. *Developments in Applied Phycology* 4: 31-74.
- Huse SM, L Dethlefsen, JA Huber, D Mark Welch, DA Relman & ML Sogin (2008): *Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing*. *Plos-genetics* 4(11): e1000255.

- Hutchinson GE (1957): *A Treatise on Limnology. I. Geography, Physics and Chemistry*. Wiley. New York: 1015 p.
- Hutchinson GE & H Löffler (1956): *The thermal classification of lakes*. Proc. Nat. Acad. Sci. 42: 84-86.
- Hynes HBN (1970): *The ecology of running waters*. Univ. Toronto Press: 555 p.
- Inda H, F Garcia-Rodriguez, L del Puerto, V Acevedo, D Metzeltin, C Castiñeira, R Bracco & JB Adams (2006): *Relationships between trophic state, paleosalinity and climatic changes during the first Holocene marine transgression in Rocha Lagoon, southern Uruguay*. Journal of Paleolimnology 35: 699-713.
- ISO (1992): *Water quality. Measurement of biochemical parameters. Spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration*. ISO 10260. International Organization for Standardization. Geneva: 6 p.
- Iversen J (1936): *Biologische Pflanzentypen als hilfsmittel in der vegetations-forschung*. Thesis. Univ. Copenhagen.
- Ivlev VS (1961): *Experimental ecology in the feeding of fishes*. Yale Univ. Press. New Haven: 302 p.
- 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.
- Izydorczyk K, M Tarczynska, T Jurczak, J Mrowczynski & M Zalewski (2005): *Measurement of phycocyanin fluorescence as an online early warning system for cyanobacteria in reservoir intake water*. Environmental Toxicology 20(4): 425-430.
- Jackson ST (1999): *Techniques for analysing unconsolidated lake sediments*. En: Jones TP & NP Rowe (eds): *Fossil plants and spores: modern techniques*. Geological Society. London: 274-278.
- 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.
- Jeffrey SW & GF Humphrey (1975): *New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c₁ and c₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton*. Biochem. Physiol. Pflanz. 167: 191-194.
- Jeffrey SW, RFC Mantoura & SW Wright (eds.) (1997): *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. Monographs on oceanographic methodology 10. UNESCO. Paris: 661 p.
- Jensen A (1980): *Seasonal changes in near IR reflectance ratio and standing crop biomass in a salt marsh dominated by Halimione portulacaoides*. New Phytol. 86: 57-68.
- Jeppesen E, M Søndergaard, M Søndergaard & K Christoffersen (eds.) (1998): *The structuring role of submerged macrophytes in lakes*. Springer Verlag. New York.
- Jespersen AM & K Christoffersen (1987): *Measurements of chlorophyll-a from phytoplankton using ethanol as extraction solvent*. Arch. Hydrobiol. 109: 445-454.
- Johnsen G, A Bricaud, N Nelson, BB Prézelin & RR Bidigare (2011): *In vivo bio-optical properties of phytoplankton pigments*. En: Roy S, C Llewellyn, ES Egeland & G Johnsen (eds.): *Phytoplankton pigments: Characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography*. Cambridge Univ. Press. Cambridge: 496-537.
- Johnson SR & AK Knapp (1995): *The influence of fire on Spartina pectinata wetland communities in a northeastern Kansas tallgrass prairie*. Canadian J. Bot. 73: 84-90.
- Johnson ZI & TL Sheldon (2007): *A high-throughput method to measure photosynthesis-irradiance curves of phytoplankton*. Limnol. Oceanogr. Methods 5: 417-424.
- Jones JG (1980): *Some differences in the microbiology of profundal and littoral lake sediments*. J. Gen. Microbiol. 315: 3-17.

- Jones JI, Young JO, Haynes GM, Moss B, Eaton JW & Hardwick KJ (1999): *Do submerged aquatic plants influence their periphyton to enhance the growth and reproduction of invertebrate mutualists?* *Oecologia* 120: 463-474.
- Jönsson B (1991): *A ¹⁴C-incubation technique for measuring microphytobenthic primary productivity in intact sediment cores.* *Limnol. Oceanogr.* 36(7): 1485-1492.
- José 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.
- Kalff J (2002): *Limnology: Inland water ecosystems.* Prentice Hall. Upper Saddle River: 592 p.
- 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.
- Katz MJ (2006): *From research to manuscript: A guide to scientific writing.* Springer. Dordrecht: 210 p.
- Kawakatsu M, J Hauser & R Ponce de León (1992): *Freshwater planarians from Uruguay and Rio Grande do Sul, Brazil: Dugesia ururiograndeana sp. n. and Dugesia tigrina (Girard, 1850) (Turbellaria: Tricladida: Paludicola).* *Bull. Biogeogr. Soc. Jap.* 47: 33-50.
- 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.
- Khlystov O, M de Batist, H Shoji, A Hachikubo, S Nishio, L Naudts, J Poort, A Kha-buev, O Belousov, A Manakov & G Kalmychov (2013): *Gas hydrate of Lake Baikal: discovery and varieties.* *J. Asian Earth Sci.* 62(1): 162-166.
- King J & J Peck (2001): *Use of paleomagnetism in studies of lake sediments.* En: Last WM & JP Smol (eds.): *Tracking environmental change using lake sediments. Volume 1: Basin analysis, coring, and chronological techniques.* Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 371-389.
- Kirchman DL (1993): *Statistical analysis of direct counts of microbial abundance.* En: Kemp PF, BF Sherr, EB Sherr & JJ Cole (eds.): *Handbook of methods in aquatic microbial ecology.* Lewis Publ. London: 117-120.
- Kirk JTO (1996): *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems.* 2nd ed. Cambridge Univ. Press. Cambridge: 525 p.
- Klaveness D (1991): *Ecology of the Cryptomonadida: a first review.* En: Sandgren C (ed.): *Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton.* Cambridge Univ. Press. Cambridge: 105-133.
- Kogure K, U Simidu & N Taga (1978): *A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria.* *Canadian Journal of Microbiology* 25: 415-420.
- Kolasa J & S Tyler (2010): *Flat worms: Turbellaria and Nemertea.* En: Thorp JH & AP Covich (eds.): *Ecology and classification of North American freshwater invertebrates.* 3rd ed. Academic Press: 143-161.
- Komárek J, J Komárková & H Kling (2003): *Filamentous Cyanobacteria.* En: Wehr J & R Sheath (eds.): *Freshwater algae of North America.* Academic Press. San Diego: 117-196.

- Komárek J & J Mares (2012): *An update to modern taxonomy (2011) of freshwater planktic heterocytous cyanobacteria*. *Hydrobiologia* 698: 327-351.
- Konoplya BI & FS Soares (2011): *New geometric models for calculation of microalgal biovolume*. *Brazilian archives of biology and technology* 54: 527-534.
- Korhola A & M Rautio (2001): *Cladocera and other small branchiopods*. En: Smol JP, HJB Birks & WM Last (eds.): *Tracking environmental change using lake sediments. Volume 4: Zoological indicators*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 5-41.
- Kornijów R & T Kairesalo (1994): *A simple apparatus for sampling eiphytic 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.
- Korsman T, I Renberg, E Dåbakk & M Nilsson (2001): *Near-infrared spectrometry (NIRS) in palaeolimnology*. En: Last WM & JP Smol (eds.): *Tracking environmental change using lake sediments. Volume 2: Physical and geochemical methods*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 299-317.
- 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.
- Kruk C, VLM Huszar, ETHM Peeters, S Bonilla, L Costa, M Lürling, CS Reynolds & M Scheffer (2010): *A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton*. *Freshwater Biology* 55: 614-627.
- Kruk C, L Rodríguez-Gallego, M Meerhoff, F Quintans, G Lacerot, N Mazzeo, F Scasso, J Paggi, ETHM Peeters & M Scheffer (2009): *Determinants of biodiversity in subtropical shallow lakes (Atlantic coast, Uruguay)*. *Freshwater Biology* 54: 2628-2641.
- Küchler A (1967): *Vegetation Mapping*. Ronald Press. New York.
- Kugrens P & BL Clay (2003): *Cryptomonads*. En: Wehr JD & RG Sheath (eds.): *Freshwater algae of North America: Ecology and classification*. Academic Press. San Diego: 715-755.
- Kuhry P (1994): *The role of fire in the development of Sphagnum-dominated peatlands in western boreal Canada*. *Journal of Ecology* 82(4): 899-910.
- Lagler K, J Bardach, R Miller & D May (1962): *Ichthyology*. Wiley. New York: 506 p.
- Lamoureux S (2001): *Varve chronology techniques*. En: Last WM & JP Smol (eds.): *Tracking environmental change using lake sediments. Volume 1: Basin analysis, coring, and chronological techniques*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 247-260.
- Lampert W & U Sommer (2007): *Limnoecology: The ecology of lakes and streams*. Oxford Univ. Press, New York: 335 p.
- 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.
- Last WM & JP Smol (eds.) (2001): *Tracking environmental change using lake sediments. Volume 1: Basin analysis, coring, and chronological techniques*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 548 p.
- Laviale M & J Neveux (2011): *Relationships between pigment ratios and growth irradiance in 11 marine phytoplankton species*. *Marine Ecology Progress Series* 425: 63-77.

- Lazzaro X (1987): *A review of planktivorous fishes: Their evolution, feeding, behaviours, selectivities and impacts*. *Hidrobiologia* 146(2): 97-167.
- 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.
- Leavitt PR & DA Hodgson (2001): *Sedimentary pigments*. En: Smol JP, HJB Birks, WM Last (eds.): *Tracking environmental change using lake sediments. Volume 3: Terrestrial, algal and siliceous indicators*. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht: 295-325.
- 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 ¹⁵N or ¹³C: revising the usual computation formulae*. *J. Plankton Res.* 19: 263-271.
- Leng MJ, AL Lamb, THE Heaton, JD Marshall, BB Wolfe, MD Jones, JA Holmes & C Arrowsmith (2006): *Isotopes in lake sediments*. En: Leng MJ (ed.): *Isotopes in palaeoenvironmental research*. Springer. Dordrecht: 147-176.
- 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.
- Li WK & PM Dickie (2001): *Monitoring phytoplankton, bacterioplankton, and virioplankton in a coastal inlet (Bedford Basin) by flow cytometry*. *Cytometry* 44: 236-246.
- Livingston DA (1955): *A lightweight piston sampler for lake deposits*. *Ecology* 36: 137-139.
- Loferer-Krößbacher M, J Klima & R Psenner (1998): *Determination of bacterial cell dry mass by transmission electron microscopy and densitometric image analysis*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 688-694.
- Lombardo A (1970): *Las plantas acuáticas y las plantas florales*. Intendencia Municipal de Montevideo. Montevideo.
- Lombardo A (1982): *Flora Montevicensis. Vol. 1*. Intendencia Municipal de Montevideo: 316 p.
- Lomnicki A, E Bundola & K Jankowska (1968): *Modification of the Wiegert-Evans method for estimation of net primary production*. *Ecology* 49: 147-149.
- Long S & J Hallgren (1985): *Measurements of CO₂ 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.
- López G (2011): *El microfitorobentos aporta significativamente a la biomasa y la producción primaria pelágica de una laguna costera*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Udelar. Montevideo: 32 p.
- López HL & AA Mariazzi (1994): *Limnology in Argentina: an historical account*. *Freshwater Forum* 4(3): 169-178.
- 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 phaeopigments: Spectrophotometric equations*. *Limnol. Oceanogr.* 12: 343-346.
- Ludwig JA & JF Reynolds (1988): *Statistical ecology*. Wiley. New York: 337 p.

- MacIsaac EA & JG Stockner (1993): *Enumeration of phototrophic picoplankton by autofluorescence microscopy*. En: Kemp PF, BF Sherr, EB Sherr & JJ Cole (eds.): *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publ. London: 187-197.
- Mackereth FJH (1969): *A short core for sub-aqueous deposits*. *Limnol. Oceanogr.* 14: 145-151.
- Mackereth FJH, J Heron & JF Talling (1989): *Water analysis*. Sci. Publ. 36 Freshwater Biological Association. Ferry House: 121 p.
- MacLennan DN & EJ Simmonds (1992): *Fisheries acoustics*. Chapman & Hall. 325 p.
- Maggi E, AC Jackson, T Tolhurst, AJ Underwood & MG Chapman (2013): *Changes in microphytobenthos fluorescence over a tidal cycle: Implications for sampling designs*. *Hydrobiologia* 701: 301-312.
- 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 hyper-eutrophic, 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 (1978): *Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment*. *Oceanologica Acta* 1(4): 493-509.
- Margalef R (1983): *Limnología*. Omega. Barcelona: 1010 p.
- Margalef R (ed.) (1994): *Limnology now: A paradigm of planetary problems*. Elsevier. Amsterdam: 553 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, Santa Fe: 44 p.
- Martcorena C (1992): *Bibliografía botánica taxonómica de Chile*. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 41: 1-587.
- Martcorena C (1996): *Bibliografía botánica taxonomica de Chile*. Suplemento 1. *Gayana Bot.* 53(1): 1-263.
- Martcorena C & R Rodriguez (1995): *Flora de Chile. Vol. 1*. Univ. Concepción: 351 p.
- Masciadri S, E Brugnoli & P Muniz (2010): *InBUy database of Invasive and Alien Species (IAS) in Uruguay: a useful tool to confront this threat to biodiversity*. *Biota Neotrop.* 10(4): 205-214.
- Massana R, JM Gasol, PK Bjørnson, N Blackburn, Å Hagström, S Hietanen, BH Hygum, J Kuparinen & C Pedrós-Alió (1997): *Measurement of bacterial size via image analysis of epifluorescence preparations: description of an inexpensive system and solutions to some of the most common problems*. *Scientia Marina* 61(3): 397-407.
- Matthews WJ (1998): *Patterns in freshwater fish ecology*. Chapman & Hall. New York: 757 p.
- 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 Marticorena (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.
- Mazzucconi SA, ML López Ruf & AO Bachmann (2009): *Hemiptera-Heteroptera: Gerromorpha y Nepomorpha*. En: Domínguez E & HR Fernández (eds.): *Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos: Sistemática y biología*. Fundación Miguel Lillo. Tucumán: 167-231.
- 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.
- McIntosh R (1987): *The background of ecology: concept and theory*. Cambridge Univ. Press. Cambridge: 383 p.
- McManus GB (1993): *Growth rates of natural populations of heterotrophic nanoplankton*. En: Kemp PF, BF Sherr, EB Sherr & JJ Cole (eds.): *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publ. London: 557-562 p.
- Meerhoff M, C Iglesias, F Teixeira de Mello, JM Clemente, E Jensen, TL Lauridsen & E Jeppesen (2007): *Effects of habitat complexity on community structure and predator avoidance behaviour of littoral zooplankton in temperate versus subtropical shallow lakes*. Freshwater Biology 52: 1009-1021.
- Méndez S, W Pintos & C Lucchi (1988): *Estudio de las características físico-químicas del agua de una zona del río Santa Lucía (Uruguay)*. Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral 19(2): 123-133.
- 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.
- Meyers PA (1997): *Organic geochemical proxies of paleoceanographic, paleolimnologic, and paleoclimatic processes*. Org. Geochem. 27(5-6): 213-250.
- Meyers PA (2003): *Applications of organic geochemistry to paleolimnological reconstructions: a summary of examples from the Laurentian Great Lakes*. Organic Geochemistry 34: 261-289.
- Meyers PA & JL Teranes (2001): *Sediment organic matter*. En: Last WM & JP Smol (eds.): *Tracking environmental change using lake sediments. Volume 2: Physical and geochemical methods*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 239-269.
- Montagnes DJS, JA Berges, PJ Harrison & FJR Taylor (1994): *Estimating carbon, nitrogen, protein and chlorophyll a from volume in marine phytoplankton*. Limnol. Oceanogr. 39: 1044-1060.
- Montgomery DR & JM Buffington (1997): *Channel-reach morphology in mountain drainage basins*. Bulletin of the Geological Society of America 109: 596-611.
- 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.
- Mueller-Dombois D & H Ellenberg (1974): *Aims and methods of vegetation ecology*. John Wiley & Sons. New York: 547 p.
- Müller R & O Weidemann (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.
- Nedoma J, J Vrba, T Hanzl & L Nedbalova (2001): *Quantification of pelagic filamentous microorganisms in aquatic environments using the line-intercept method*. FEMS Microbiology Ecology 38: 81-85.
- Nelson JS (2006): *Fishes of the world*. 4th ed. Wiley Publ.: 624 p.
- Neufeld JD, T Zhongtang, W Lam & WW Mohn (2004): *SARST, Serial Analysis of Ribosomal Sequence Tags*. En: Kowalchuk GA, FJ de Bruijn, IM Head, AD Akkermans & JD van Elsas (eds.): *Molecular microbial ecology manual*. 2nd ed. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 543-568.
- Nicholls KH & DE Wujek (2003): *Chrysophycean Algae*. En: Wehr JD & RG Sheath (eds.): *Freshwater algae of North America: Ecology and classification*. Academic Press. San Diego: 471-509.
- 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 PF, BF Sherr, EB Sherr & JJ Cole (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*. Archiv für Hydrobiologie Ergebnisse der Limnologie 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.
- Oglesby RT, CA Carlson & JA McCann (1972): *River ecology and man*. Academic Press: 465 p.
- 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.
- Osenberg CW & RJ Schmitt (1996): *Detecting ecological impacts caused by human activities*. En: Schmitt RJ & CW Osenberg (eds.): *Detecting ecological impacts: Concepts and applications in coastal habitats*, Academic Press. San Diego: 3-17.

- Pace ML & JD Orcutt (1981): *The relative importance of protozoans, rotifers and crustacean in a freshwater zooplankton community*. *Limnol. Oceanogr.* 26: 822-830.
- Pacheco JP, C Iglesias, M Meerhoff, C Fosalba, G Goyenola, F Teixeira-de Mello, S García, M Gelós & F Rodríguez (2010): *Phytoplankton community structure in five subtropical shallow lakes with different trophic status (Uruguay): a morphology based approach*. *Hydrobiologia* 646: 187-197.
- 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.
- Padisák J (1997): *Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology*. *Archiv Für Hydrobiologie Supplementband Monographische Beitrage* 107(4): 563-593.
- Paerl HW & TG Otten (2013): *Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls*. *Microb. Ecol.* 65: 995-1010.
- 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): *Campana limnológica "Keratella I" en el río Paraná medio, zooplankton de ambientes leníticos*. *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.
- Parker PG, AA Snow, MD Schug, GC Booton & PA Fuerst (1998): *What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker*. *Ecology* 79: 361-382.
- 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.
- Parsons TR, Y Maitia & CM Lalli (1984): *A manual of chemical and biological methods for seawater analysis*. Pergamon Press. Oxford: 173 p.
- Passadore C, L Giménez & A Acuña (2007): *Composition and intra-annual variation of the macroinfauna in the estuarine zone of the Pando Stream (Uruguay)*. *Braz. J. Biol.* 67(2): 197-202.
- Patel A, RT Noble, JA Steele, MS Schwalbach, I Hewson & JA Fuhrman (2007): *Virus and prokaryote enumeration from planktonic aquatic environments by epifluorescence microscopy with SYBR Green I*. *Nature protocols* 2: 269-276.
- 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.): *Paleoethnobotany: a Handbook of Procedures*. Academic Press. San Diego: 311-438.
- Pearsall DM & EH Dinan (1992): *Developing a phytolith classification system*. En: Rapp G & SC Mulhollan (eds.): *Phytolith Systematics: Emerging Issues*. Plenum. New York.
- 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. New York: 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.
- Pérez MC (2005): *The phytoplankton structure of Merin Lagoon: a subtropical world biosphere reserve system (Brazil-Uruguay)*. Acta Botanica Croatica 64(2): 247-261.
- Pérez MC, S Bonilla, L de León, J Smarda & J Komárek (1999): *A bloom of Nodularia baltica-spumigena group (Cyanobacteria) in a shallow coastal lagoon of Uruguay, South America*. Algological Studies 93: 91-101.
- Pernthaler J (2005): *Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications*. Nature Reviews Microbiology 3: 537-546.
- 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.
- Piccini C, L Aubriot, A Fabre, V Amaral, M González-Piana, CC Figueredo, A Gianni, L Vidal, C Kruk & S Bonilla (2011): *Genetic and eco-physiological differences of South American Cylindrospermopsis raciborskii isolates support the hypothesis of multiple ecotypes*. Harmful Algae 10: 644-653.
- Piccini C, D Conde, C Alonso, R Sommaruga & J Pernthaler (2006): *Blooms of single bacterial species in a coastal lagoon of the southwestern Atlantic Ocean*. Appl. Environ. Microbiol. 72: 6560-6568.
- Piccini C, D Conde, J Pernthaler & R Sommaruga (2009): *Alteration of chromophoric dissolved organic matter by solar UV radiation causes rapid changes in bacterial community composition*. Photochemical & Photobiological Sciences 8: 1321-1328.
- Pintos W & R Arocena (1988): *Manual de prácticos de Limnología*. SPDI/Facultad de Humanidades y Ciencias. Montevideo: 60 p.
- Pintos W, D Conde, R de León, MJ Cardezo, A Jorcín & R Sommaruga (1991): *Some limnological characteristics of Laguna de Rocha*. Revista Brasileira de Biología 51: 79-84.
- Pintos W, D Conde & W Norbis (1993): *Estudio de la contaminación orgánica del Río Uruguay (Paysandú)*. Rev. Cien. Nat. Lit. 23(1-2): 21-30.
- Piperno DR (1988): *Phytolith Analysis: An Archeological and Geological Perspective*. Academic Press. San Diego: 280 p.
- Piperno DR (2001): *Phytoliths*. En: Smol JP, HJB Birks & WM Last (eds.): *Tracking environmental change using lake sediments. Volume 3: Terrestrial, algal, and siliceous indicators*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 235-251.
- Platt T, CL Gallegos & WG Harrison (1980): *Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton*. J. Mar Res. 38: 687-701.
- Platt T & S Sathyendranath (1993): *Fundamentals issues in measurement of primary production*. IECS Mar. Sci. Symp. 197: 3-9.
- Poinar GO (2010): *Nematoda and Nematomorpha*. En: Thorp JH & AP Covich (eds.): *Ecology and classification of North American freshwater invertebrates*. 3rd ed. Academic Press: 237-276.
- Pollinger U (1991): *Freshwater armored dinoflagellates: growth, reproduction strategies, and population dynamics*. En: Sandgren C (ed.): *Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton*. Cambridge Univ. Press. Cambridge: 134-174.
- Pomeroy L (1974): *The ocean's food web, a changing paradigm*. Bioscience 24: 499-504.
- Porter KG & YS Feig (1980): *The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora*. Limnol. Oceanogr. 25(5): 943-948.

- Posch T, M Loferer-Krößbacher, G Gao, A Alfreider, J Pernthaler & R Psenner (2001): *Precision of bacterioplankton biomass determination: a comparison of two fluorescent dyes, and of allometric and linear volume-to-carbon conversion factors*. *Aquatic Microbial Ecology* 25: 55-63.
- Potterton S & W Shults (1967): *An evaluation of the performance of the nitrate-selective electrode*. *Analyt. Let.* 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.
- Pozo J & A Elosegi (2009): *El marco físico: la cuenca*. En: Elosegi A & S Sabater (eds.): *Conceptos y técnicas en ecología fluvial*. Rubes Editorial - Fundación BBVA. Bilbao: 39-49.
- 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 PF, BF Sherr, EB Sherr & JJ Cole (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.
- Quigg A, ZV Finkel, AJ Irwin, Y Rosenthal, TY Ho, JR Reinfelder, O Schofield, FMM Morel & PG Falkowski (2003): *The evolutionary inheritance of elemental stoichiometry in marine phytoplankton*. *Nature* 425: 291-294.
- Quinn SP (1992): *Angler perspective on walleye management*. *North American Journal of Fisheries Management* 12: 367-378.
- Quintans F, F Scasso & O Defeo (2010): *Unsuitability of Cnesterodon decemmaculatus (Jenyns 1842) for mosquito control in Uruguay: evidence from food-preference experiments in microcosms*. *Journal of Vector Ecology* 35(2): 333-338.
- Quintans F, F Scasso, M Loureiro & A Yafe (2009): *Diet of Cnesterodon decemmaculatus (Poeciliidae) and Jenynsia multidentata (Anablepidae) in a hypertrophic shallow lake of Uruguay*. *Iheringia, Sér. Zool.* 99: 105-111.
- Rabinowitz H & Vogel S (2009): *The manual of scientific style: A guide for authors, editors, and researchers*. Academic Press: 968 p.
- 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. New York.
- Raunkiaer C (1934): *The life forms of plants and statistical plant geography*. Clarendon Press. Oxford.
- Raunkiaer 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. São 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. São Paulo: 240 p.
- Reynolds CS (1984): *The ecology of phytoplankton*. Cambridge Univ. Press. Cambridge: 384 p.
- Reynolds CS (1987): *Cyanobacterial water blooms*. Adv. Bot. Research V. 13.
- Reynolds CS (1991): *Functional morphology and adaptative strategies of freshwater phytoplankton*. En: Sandgren C (ed.): *Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton*. Cambridge Univ. Press. Cambridge: 388-426.
- Reynolds CS (2006): *Ecology of phytoplankton*. Cambridge Univ. Press. Cambridge: 550 p.
- Reynolds CS, V Huszar, C Kruk, L Naselli-Flores & S Melo (2002): *Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton*. Journal of Plankton Research 24(5): 417-428.
- Reynolds CS & AE Walsby (1975): *Water blooms*. Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. 50: 437-481.
- Riaux Gobin C & B Klein (1993): *Microphytobenthic measurement using HPLC and conventional pigment analysis*. En: Kemp PF, BF Sherr, EB Sherr & JJ Cole (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*. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 14: 70-78.
- Riemann B & RT Bell (1990): *Advances in estimating bacterial biomass and growth in aquatic systems*. Arch. Hydrobiol. 118: 385-402.
- Riemann B & LM Jensen (1991): *Measurements of phytoplankton primary production by means of the acidification and bubbling method*. J. Plankton Res. 13: 853-862.
- Rigler FH (1956): *A tracer study of the phosphorus cycle in lake water*. Ecology 37: 550-562.
- 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.
- 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 Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires. La Plata: 602 p.
- Ritchie RJ (2006): *Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents*. Photosynth. Res. 89: 27-41.
- Ritchie RJ (2008): *Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents*. Photosynthetica 46: 115-126.
- 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, São Carlos). Vol. I. Copepoda*. Centro de Ciencias e Tecnologia, Univ. São Carlos: 68 p.
- Rocha Aranha JM (1993): *Método para análise quantitativa de algas e outros itens microscópicos de alimentação de peixes*. Acta Biológica Paranaense 22: 71-76.
- Rodrigues-Capitulo A, I Muñoz, N Bonada, A Gaudes & S Tomanova (2009): *La biota de los ríos: los invertebrados*. En: Elosegi A & S Sabater (eds.): *Conceptos y técnicas en ecología fluvial*. Rubes Editorial - Fundación BBVA. Bilbao: 253-270.
- Rodríguez SY (2012): *Autodepuración del impacto lechero en un arroyo, evaluada a través de macroinvertebrados bentónicos*. Informe final de pasantía de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Udelar. Montevideo: 35 p.
- Rodríguez-Gallego L (2010): *Eutrofización de las lagunas costeras de Uruguay: impacto y optimización de los usos del suelo*. Tesis de Doctorado. PEDECIBA - Facultad de Ciencias. Udelar. Montevideo: 172 p.
- Rodríguez-Ramos T, M Dornelas, E Marañón & P Cermeño (2014): *Conventional sampling methods severely underestimate phytoplankton species richness*. Journal of Plankton Research 36: 334-343.
- Roháček K & Barták M (1999): *Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications*. Photosynthetica 37: 339-363.
- 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*. Univ. Antioquía. Medellín: 529 p.
- Rosowski JR (2003): *Photosynthetic Euglenoids*. En: Wehr JD & RG Sheath: *Freshwater algae of North America: Ecology and classification*. Academic Press. San Diego: 383-422.
- Rott E (1981): *Some results from phytoplankton counting intercalibrations*. Schweiz. Z. Hydrol. 43(1): 34-62.
- Rott E, N Salmaso & E Hoehn (2007): *Quality control of Utermöhl-based phytoplankton counting and biovolume estimates – an easy task or a Gordian knot?* Hydrobiologia 578: 141-146.
- 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.
- Round FE (1973): *The biology of the Algae*. Cambridge Univ. Press. Cambridge.
- Round FE, RM Crawford & DG Mann (1992): *The diatoms: Biology and morphology of the genera*. Cambridge Univ. Press. Cambridge: 760 p.
- Rovner I (1990): *Notas técnicas. Análisis de fítolitos. Extracción de fítolitos de muestras de suelos*. Antropológicas 4: 49-53.
- Roy S, C Llewellyn, ES Egeland & G Johnsen (2011): *Phytoplankton pigments: Characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography*. Cambridge Univ. Press. Cambridge: 845 p.
- 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. Stuttgart: 26(1): 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.
- Salmaso N & J Padisák (2007): *Morpho-functional groups and phytoplankton development in two deep lakes (Lake Garda, Italy and Lake Stechlin, Germany)*. Hydrobiologia 578: 97-112.
- Sand-Jensen K & Borum J (1991): *Interactions among phytoplankton, periphyton, and macrophytes in temperate freshwaters and estuaries*. Aquatic Botany 41: 137-175.
- 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.
- Santibañez I (1939): *Contribución al conocimiento de las diatomeas uruguayas*. Revista Sudamericana de Botánica 6: 6-9.
- Saville A (1978): *Métodos de reconocimiento para la evaluación de los recursos pesqueros*. FAO Doc. Tec. Pesca 171: 78 p.
- Scarabino F (2004): *Conservación de la malacofauna uruguaya*. Com. Soc. Malacol. Urug. 8: 267-273.
- Scarabino F (2006): *Faunística y taxonomía de invertebrados bentónicos marinos y estuarinos de la costa uruguaya*. En: Menafría R, L Rodríguez-Gallego, F Scarabino & D Conde (eds.): *Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya*. Vida Silvestre Uruguay/US-Fish Wildlife Service. Montevideo: 113-142.
- Scarabino F & M Verde (1995): *Limnoperna fortunei (Dunker 1857) en la costa uruguaya del Río de la Plata (Bivalvia: Mytilidae)*. Com. Soc. Malac. Urug. 7: 374-375.
- Scasso F, N Mazzeo, J Gorga, C Kruk, G Lacerot, J Clemente, D Fabián & S Bonilla (2001): *Limnological changes in a sub-tropical shallow hypertrophic lake during its restoration: two years of a whole-lake experiment*. Aquatic Conserv.: Mar. Freshw. Ecosyst. 11: 31-44.
- Scheffer M (1998): *Ecology of shallow lakes*. Chapman & Hall. London: 357 p.
- Scheffer M & Carpenter SR (2003): *Catastrophic regime shifts in ecosystems: linking theory to observation*. Trends Ecol. Evol. 12: 648-656.
- Schindler DW, RE Hecky, DL Findlay, MP Stainton, BR Parker, MJ Paterson, KG Beaty, M Lyng & SEM Kasian (2008): *Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: results of a 37-year whole-ecosystem experiment*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105(32): 11254-11258.
- 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.
- Schmitt-Jansen M & R Altenburger (2007): *The use of pulse-amplitude modulated (PAM) fluorescence-based methods to evaluate effects of herbicides in microalgal systems of different complexity*. Toxicological and Environmental Chemistry 89: 665-681.
- Schnürer J & T Rosswall (1982): *Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter*. Appl. Environ. Microbiol. 43(6): 1256-1261.
- Schwarzbold A (1990): *Métodos ecológicos aplicados ao estudo do perifiton*. Acta Limnol. Brasil. 3: 545-592.
- Schwarzbold A, AL Burliga & LC Torgan (2013): *Ecologia do perifiton*. RiMa. São Carlos: 397 p.

- Schwoerbel J (1975): *Métodos de hidrobiología*. Blume. Madrid: 262 p.
- Sculthorpe C (1967): *The biology of aquatic vascular plants*. Arnold. London.
- Segura A, C Kruk, D Calliari & H Fort (2013): *Use of a morphology-based functional approach to model phytoplankton community succession in a shallow subtropical lake*. *Freshwater Biology* 58: 504-512.
- Seródio J, S Vieira & S Cruz (2008): *Photosynthetic activity, photoprotection and photoinhibition in intertidal microphytobenthos as studied in situ using variable chlorophyll fluorescence*. *Continental Shelf Research* 28: 1363-1375.
- 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, AD Caron & BF Sherr (1993a): *Protistan grazing rates via uptake of fluorescently labeled prey*. En: Kemp PF, BF Sherr, EB Sherr & JJ Cole (eds.): *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publ. London: 695-701.
- Sherr EB, AD Caron & BF Sherr (1993b): *Staining of heterotrophic protists for visualization via epifluorescence microscopy*. En: Kemp PF, BF Sherr, EB Sherr & JJ Cole (eds.): *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publ. London: 213-227.
- Sherr BF, PA del Giorgio & EB Sherr (1999): *Estimating the abundance and single-cell characteristics of respiring bacteria via the redox dye, CTC*. *Aquat. Microb. Ecol.* 18: 117-131.
- Sherr EB & BF Sherr (1993): *Preservation and storage of samples for enumeration of heterotrophic protists*. En: Kemp PF, BF Sherr, EB Sherr & JJ Cole (eds.): *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publ. London: 207-212.
- Sherrard NJ, M Nimmo & CA Llewellyn (2006): *Combining HPLC pigment markers and ecological similarity indices to assess phytoplankton community structure: An environmental tool for eutrophication?* *Science of the Total Environment* 361: 97-110.
- 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 Lovöjärvi, a small eutrophicated lake*. *Ann. Bot. Fenn.* 14: 143-148.
- Sims PA, DG Mann & LK Medlin (2006): *Evolution of the diatoms: insights from fossil, biological and molecular data*. *Phycologia* 45: 361-402.
- Slobodkin LB & PE Bossert (2010): *Cnidaria*. En: Thorp JH & AP Covich (eds.): *Ecology and classification of North American freshwater invertebrates*. 3rd ed. Academic Press: 125-142.
- Smayda T (1978): *From phytoplankters to biomass*. En: Sournia A (ed.): *Phytoplankton manual*. UNESCO. Paris: 273-279.
- Smayda TJ (1997): *What is a bloom? A commentary*. *Limnol. Oceanogr.* 42(5, part 2): 1132-1136.
- Smith AG, JR Pilcher & G Singh (1968): *A large capacity hand-operated peat sampler*. *New Phytol.* 67: 119-124.
- Smith VH & DW Schindler (2009): *Eutrophication science: where do we go from here?* *Trends in Ecology & Evolution* 24: 201-207.
- Smol JP (2008): *Pollution of lakes and rivers: A paleoenvironmental perspective*. 2nd ed. Wiley-Blackwell Publishing. Oxford: 383 p.
- Smol JP, HJB Birks & WM Last (eds.) (2001): *Tracking environmental change using lake sediments. Volume 4: Zoological indicators*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 217 p.
- Smol JP & EF Stoermer (eds.) (2010): *The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences*. 2nd ed. Cambridge Univ. Press. Cambridge: 667 p.

- 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: Moore RC (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 (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 (1990): *Distribución de materia orgánica en los sedimentos recientes de la Laguna de Rocha (Uruguay)*. *Atlántica* 12(1): 35-44.
- Sommaruga R & D Conde (1997): *Factors controlling the seasonal variability of metabolically active bacterioplankton in a hypertrophic lake*. *Aquat. Microb. Ecol.* 13: 241-248.
- 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.
- Sondergaard M & M Danielsen (2001): *Active bacteria (CTC+) in temperate lakes: temporal and cross-system variations*. *J. Plank. Res.* 23: 1195-1210.
- Sorokin YI (1999): *Aquatic microbial ecology*. Backhuys Publishers. Leiden: 260 p.
- 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.
- South GR & Whittick A (1987): *Introduction to Phycology*. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Sparre P & SC Venema (1992): *Introduction to tropical fish stock assessment*. FAO Fish. Tech. Paper 306.1(1): 376 p.
- St-Onge G & JS Stoner (2011): *Paleomagnetism near the North Magnetic Pole: A unique vantage point for understanding the dynamics of the geomagnetic field and its secular variations*. *Oceanography* 24(3): 42-50.
- 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.
- Stal LJ (2012): *Cyanobacterial mats and stromatolites*. En: Whitton BA (ed.): *Ecology of Cyanobacteria II. Their diversity in space and time*. Springer. Dordrecht: 65-126.
- 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 (¹⁴C) 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.
- Steinman AD, PJ Mulholland & WR Hill (1992): *Functional responses associated with growth from in stream algae*. *Journal of the North American Benthological Society* 11: 229-243.

- Steinman AD, PJ Mulholland, AV Palumbo, TF Flum & DL DeAngelis (1991): *Resilience of lotic ecosystems to a light-elimination disturbance*. Ecology 72: 1299-1313.
- Sternin VG, IV Nikonorov & YK Bumeister (1976): *Electrical fishing, theory and practice*. Halsted Press. New York: 316 p.
- 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.
- Stevenson AC, HJB Birks, RJ Flower & RW Battarabee (1989): *Diatom-based reconstruction of Lake Acidification Using Canonical Correspondance Analysis*. Ambio 18(4): 228-233.
- Stoermer E & J Smol (1999): *The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences*. Cambridge Univ. Press. Cambridge: 469 p.
- Strickland J & TR Parsons (1972): *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Fish. Res. Bd. Can. Bull. 167: 310.
- Sukenik A, O Hadas, A Kaplan & A Quesada (2012): *Invasion of Nostocales (cyanobacteria) to subtropical and temperate freshwater lakes – physiological, regional, and global driving forces*. Frontiers in Microbiology 3: 86.
- 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.
- 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.
- Suttle C (1993): *Enumeration and isolation of virus*. En: Kemp PF, BF Sherr, EB Sherr & JJ Cole (eds.): *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publ. London: 121-134.
- Swain AM (1973): *A history of fire and vegetation in northeastern 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.
- Tamayo y Tamayo M (2003): *El proceso de la investigación científica. Incluye evaluación y administración de proyectos de investigación*. Limusa. México: 183 p.
- Teixeira de Mello F, I González-Bergonzoni & M Loureiro (2011): *Peces de agua dulce del Uruguay*. PPR-MGAP. Montevideo: 188 p.
- Tell G & V Conforti (1986): *Euglenophyta pigmentadas de la Argentina*. J. Cramer. Berlin-Stuttgart: 301 p.
- The National Academy of Sciences (1995): *On being a scientist: Responsible conduct in research*. 2nd ed. National Academy Press. Washington: 40 p.
- Thingstad TF & R Lignell (1997): *Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand*. Aquatic Microbial Ecology 13: 19-27.
- Thingstad TF, EF Skjoldal & RA Bohne (1993): *Phosphorus cycling and algal-bacterial competition in Sandefjord, western Norway*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 99: 239-259.
- Thomas KE, RI Hall & GJ Scrimgeour (2013): *Evaluating the use of algal pigments to assess the biological condition of streams*. Environmental Monitoring and Assessment 185: 7895-7913.
- 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.

- Thorp JH & AP Covich (eds.) (2010): *Ecology and classification of North American freshwater invertebrates*. 3rd ed. Academic Press: 1021 p.
- Thronsdén 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 standardization of pigment methodology in Nordic countries*. Arch. Hydrobiol. Beih. 14: 81-87.
- Tomkins JD, D Antoniadis, SF Lamoureux & WF Vincent (2008): *A simple and effective method for preserving the sediment-water interface of sediment cores during transport*. Journal of Paleolimnology 40: 577-582.
- Traverse A (2007): *Paleopalynology*. 2nd ed. Springer Science & Business Media. Dordrecht: 813 p.
- Troels-Smith J (1955): *Karakterisering af løse jordarter*. Danm. geol. Unders. Ser. IV 3(10): 73 p.
- Tucci A & C Sant'Anna (2003): *Cylindrospermopsis raciborskii (Wolosynska) Seenayya & Suba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, Brasil*. Revista Brasileira Botânica 26: 97-112.
- Tuchman ML, EF Stoermer & HJ Carney (1984): *Effects of increased salinity on the diatom assemblage in Fonda Lake, Michigan*. Hydrobiologia 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. New York: 183 p.
- Underwood GJC, RG Perkins, MC Consalvey, ARM Hanlon, K Oxborough, NR Baker & DM Paterson (2005): *Patterns in microphytobenthic primary productivity: Species-specific variation in migratory rhythms and photosynthetic efficiency in mixed-species biofilms*. Limnology and Oceanography 50: 755-767.
- 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.
- Vadeboncoeur Y & AD Steinman (2002): *Periphyton function in lake ecosystems*. The Scientific World 2: 1449-1468.
- 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. Buenos Aires: 351 p.
- van Apeldoorn ME, HP van Egmond, GJA Speijers & GJI Bakker (2007): *Toxins of cyanobacteria*. Molecular Nutrition and Food Research 51: 7-60.
- van Den Hoek C, DG Mann & HM Jahns (1995): *Algae: An introduction to phycology*. Cambridge Univ. Press. Cambridge: 623 p.
- Vanderstukken M, N Mazzeo, W Van Colen, S Declerck & K Muylaert (2011): *Biological control of phytoplankton by the subtropical submerged macrophytes Egeria densa and Potamogeton illinoensis: a mesocosm study*. Freshwater Biology 56(9): 1837-1849.
- Vaz-Ferreira R (1943): *Sobre algunas especies del Género "Ceratiium" Schrank de aguas uruguayas*. Servicio Oceanográfico y de Pesca. Departamento Oceanográfico. Montevideo: 23 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 dulceacuícola*. En: Alveal K, M Ferrario, EC Oliveira & E Sar (eds.): *Manual de métodos ficológicos*. Univ. Concepción: 199-218.
- Verdi AC (2000): *Estudio de la comunidad de crustáceos decápodos en los humedales del este (departamento de Rocha-Uruguay)*. Acta Biol. Venez. 20(4): 43-50.
- Verity PG & M Sieracky (1993): *Use of color image analysis and epifluorescence microscopy to measure plankton biomass*. En: Kemp PF, BF Sherr, EB Sherr & JJ Cole (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.
- Vidal L (2008): *Estructura y biomasa del fitoplancton en lagunas costeras: relevancia del picoplancton autótrofo*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. PEDECIBA - Facultad de Ciencias. Udelar. Montevideo: 177 p.
- Vidal L, S Bonilla, L Rodríguez-Gallego D, Conde & W Martínez-López (2007): *Biomass of autotrophic picoplankton in subtropical coastal lagoons: Is it relevant?* Limnetica 26: 441-452.
- Vidal L & A Britos (2012): *Uruguay: occurrence, toxicity and regulation of Cyanobacteria*. En: Chorus I (ed.): *Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries*. Federal Environment Agency (Umweltbundesamt). Dessau-Roßlau: 130-136.
- Vidal L, A Fabre, L Gabito, C Kruk, A Gravier, A Britos, MC Pérez, L Aubriot & S Bonilla (2009): *Fichas de identificación de las especies*. En: *Cianobacterias planctónicas del Uruguay: Manual para la identificación y medidas de gestión*. Documento Técnico PHI-LAC 16. UNESCO. Montevideo: 45-76.
- Vidal L & MC Pérez (2009): *Claves taxonómicas*. En: Bonilla S (ed.): *Cianobacterias planctónicas del Uruguay: Manual para la identificación y medidas de gestión*. Documento Técnico PHI-LAC 16. UNESCO. Montevideo: 41-44.
- Vilaboa N (2012): *Evaluación de calidad de agua en un curso de agua con cuenca lechera mediante el uso de macroinvertebrados acuáticos*. Informe final de pasantía de grado. Facultad de Ciencias. Udelar.
- Vollenweider RA (1968): *Water management research: Scientific fundamentals of the eutrophication of lakes and flowing waters, with particular reference to nitrogen and phosphorus as factors in eutrophication*. OECD. Technical Report DAS/CS1/68. Paris.
- 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.
- Vuorio K, L Lepistö & AL Holopainen (2007): *How to produce comparable data – Intercalibrations of freshwater phytoplankton analysis*. Boreal Environment Research 12: 561-569.
- 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 (2001): *Midges: Chironomidae and related Diptera*. En: Smol JP, HJB Birks & WM Last (eds.): *Tracking environmental change using lake sediments. Volume 4: Zoological indicators*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 43-66.

- Walker IR, SE Wilson & JP Smol (1995): *Chironomidae (Diptera) quantitative paleosalinity indicators for lakes of western Canada*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 52: 950-960.
- Wallace RL & TW Snel (2010): *Rotifera*. En: Thorp JH & AP Covich (eds.): *Ecology and classification of North American freshwater invertebrates*. 3rd ed. Academic Press: 173-254.
- 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. New York.
- Wehr JD & RG Sheath (2003): *Freshwater algae of North America: Ecology and classification*. Academic Press. San Diego: 918 p.
- Welch PS (1948): *Limnological Methods*. Blakiston. Philadelphia: 381 p.
- Wetzel RG (1983a): *Limnology*. Saunders. New York: 767 p.
- Wetzel RG (ed.) (1983b): *Periphyton of freshwater ecosystems*. Dr. W. Junk Publishers. Boston.
- Wetzel RG (1990): *Land-water interfaces: metabolic and limnological regulators*. Verh. intern. Verein. Limnol. 24: 6-24.
- Wetzel RG (2001): *Limnology: Lake and river ecosystems*. 3rd ed. Academic Press: 1006 p.
- Wetzel RG & GE Likens (1991): *Limnological analysis*. Springer-Verlag. New York: 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.
- Whitton BA (ed.) (1975): *River Ecology. Studies in ecology. Vol. 2*. Univ. California Press. Berkeley: 725 p.
- Whorley SB & SN Francoeur (2013): *Active fluorometry improves nutrient-diffusing substrata bioassay*. Freshwater Sciences 32: 108-115.
- Wiederholm T (ed.) (1983): *Chironomidae of the Holarctic Region. Keys and diagnoses. Part 1. Larvae*. Ent. scand. Suppl. 19: 1-457.
- Wiegert R (1962): *The selection of an optimal quadrat size for sampling the standing crop of grasses and forbs*. Ecology 43: 125-129.
- 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.
- Wilhelm C, A Jungandreas, T Jakob & R Goss (2014): *Light acclimation in diatoms: From phenomenology to mechanisms*. Marine Genomics 16: 5-15.
- Wilhelm SW & CA Suttle (1999): *Viruses and nutrient cycles in the sea: Viruses play critical roles in the structure and function of aquatic food webs*. Bioscience 49(10): 781-788.
- Williams R (1946): *The physiology of plant growth with special reference to the concept of net assimilation rate*. Ann. Bot. 10: 41-62.
- Williams PJ (1993): *On the definition of plankton production terms*. IECS Mar. Sci. Symp. 197: 9-19.
- Wommack KE & Colwell RR (2000): *Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64: 69-114.
- 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.

- Zapata M, F Rodriguez & JL Garrido (2000): *Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine containing mobile phases*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 195: 29-45.
- Zar JH (2009): *Biostatistical analysis*. Prentice Hall. New Jersey.
- Zhang N, H Li, E Jeppesen & W Li (2012): *Influence of substrate type on periphyton biomass and nutrient state at contrasting high nutrient levels in a subtropical shallow lake*. Hydrobiologia 710: 129-141.
- Zimba PV, PD Moeller, K Beauchesne, HE Lane & RE Triemer (2010): *Identification of euglenophycin - A toxin found in certain euglenoids*. Toxicon 55: 100-104.
- 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.
- Zolitschka B (2013): *Varved lake sediments*. En: Elias SA (ed.): *Encyclopedia of Quaternary Science*. 2nd ed. Elsevier. Amsterdam: 582-589.
- Zolitschka B, J Mingram, S van der Gaast, JHF Jansen & R Naumann (2001): *Sediment logging techniques*. En: Last WM & JP Smol (eds.): *Tracking environmental change using lake sediments. Volume 1: Basin analysis, coring, and chronological techniques*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 137-153.
- Zucol A (1995): *Microfitolitos: II. Análisis de las clasificaciones*. Ameghiniana 32(3): 243-248.

Se indica para cada autor: nombre, títulos académicos, lugares de trabajo, áreas de desempeño profesional y correo electrónico. Las instituciones mencionadas son uruguayas salvo indicación expresa.

DERMOT ANTONIADES

Dr. en Geología, Universidad de Toronto, Canadá, 2004. Posdoctorado en Ecología y paleoecología de ambientes acuáticos del Ártico, Universidad Laval, Quebec, Canadá, 2010.

Docente Libre de la Sección Limnología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Prof. Adjunto del Departamento de Geografía, Universidad Laval, Quebec, Canadá.

Investiga en paleolimnología.

dermot.antonιάdes@cen.ulaval.ca

RAFAEL AROCENA

Dr. en Ciencias Naturales, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, 2000.

Prof. Adjunto y Encargado de la Sección Limnología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Investiga el zoobentos y la calidad del agua en sistemas fluviales.

rarocena@fcien.edu.uy

LUIS AUBRIOT

Dr. en Ciencias Biológicas (Ecología), PEDECIBA-Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 2008.

Asistente de la Sección Limnología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Investiga la asimilación de nutrientes por microalgas y la calidad del agua.

laubriot@fcien.edu.uy

SYLVIA BONILLA

Dra. en Ciencias Biológicas, PEDECIBA-Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 2002. Posdoctorado en Limnología, Universidad Laval, Quebec, Canadá, 2004.

Prof. Adjunta de la Sección Limnología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Investiga la ecología y fisiología del fitoplancton, con énfasis en cianobacterias de ecosistemas de aguas continentales.

sbon@fcien.edu.uy

GUILLERMO CHALAR

Dr. en Ciencias de la Ingeniería Ambiental, Universidad de San Pablo, Brasil, 1998.
Asistente de la Sección Limnología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Investiga la química y la calidad del agua y el sedimento.
gchalar@fcien.edu.uy

DANIEL CONDE

Dr. en Ciencias Biológicas (Ecología), PEDECIBA-Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 2001.

Prof. Agregado de la Sección Limnología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Investiga la producción primaria, la química del agua, la gestión costera y en microbiología.

vlad@fcien.edu.uy

GLORIA DANERS

Lic. en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 1992.

Asistente del Departamento de Paleontología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Investiga en paleopalinología.

glo@fcien.edu.uy

LIZET DE LEÓN

Ms. en Ciencias Biológicas (Botánica), Universidad de Concepción, Chile, 2000.

Ex Asistente de la Sección Limnología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Integra un equipo técnico multidisciplinario que entiende en temas de medio ambiente en el Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente.

Investiga el fitoplancton.

lizet.deleon@mvtoma.gub.uy

DANIEL FABIÁN

Dr. en Ciencias Biológicas, Universidad de Granada, España, 2002.

Ex Asistente de la Sección Limnología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Investiga el zooplancton y es formador de docentes.

danielfabianroland@gmail.com

AMELIA FABRE

Ms. en Ciencias Biológicas (Ecología), PEDECIBA-Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 2015.

Ex Ayudante de la Sección Limnología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Consultora en fitoplancton para el Programa de Monitoreo de Fitoplancton Nocivo, Laboratorio de Fitoplancton, Departamento de Biología Poblacional, Dirección Nacional de Recursos Acuáticos.

Investiga la ecología y fisiología de cianobacterias y la ecología del fitoplancton marino potencialmente nocivo.

ameliafabre@gmail.com

JAVIER GORGA

Ex Asistente de la Sección Limnología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Investiga la química del agua.

dart@fcien.edu.uy

NÉSTOR MAZZEO

Dr. en Ciencias, Universidad de Concepción, Chile, 1996.

Ex Prof. Adjunto de la Sección Limnología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Prof. Agregado del Departamento de Ecología Teórica y Aplicada, Centro Universitario Regional Este, Universidad de la República.

Investiga las macrófitas y en ecotoxicología.

mazzeobeyhaut@yahoo.com

CLAUDIA PICCINI

Dra. en Ciencias Biológicas, PEDECIBA-Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 2006.

Prof. Agregado de Investigación Profesional del Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas “Clemente Estable”.

Investiga en ecología microbiana acuática.

cpiccini@iibce.edu.uy

FEDERICO QUINTANS

Ms. en Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 2008.

Asistente de la Sección Limnología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Investiga el necton y la calidad del agua.

cara@fcien.edu.uy

FLAVIO SCASSO

Dr. en Ciencias Ambientales, Universidad de Concepción, Chile, 1996.

Ex Asistente de la Sección Limnología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Analista en el Área de Medio Ambiente del Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD).

Investiga el necton y la restauración de ambientes acuáticos.

flavio.scasso@undp.org



Si bien en Uruguay los recursos de agua dulce son relativamente abundantes y están bien distribuidos, el aumento de su consumo y deterioro, tanto a nivel local como 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 ecología acuática, hace que estudiantes e investigadores con diferentes formaciones e intereses necesiten 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 exponen aquí sus métodos de investigación, aportando además resultados de trabajos efectuados en ambientes acuáticos de Uruguay.