Técnicas de campo y laboratorio para el estudio de algas y cianobacterias

Principales grupos taxonómicos de algas

María de los Ángeles Taboada

Conceptos y algunas definiciones

El término alga comprende un grupo diverso de organismos, extremadamente heterogéneo y desprovisto de significado taxonómico. Es un modo de designación colectiva de un grupo de organismos mayoritariamente acuáticos, fotosintéticos, autótrofos, pequeños y menos complejos que las plantas superiores, carentes de tallo, raíz, hojas y tejidos vasculares (Graham, 2009).

La clasificación de las algas en las distintas categorías es compleja y existen numerosos criterios: ecológicos, morfológicos, fisiológicos, ultraestructurales, bioquímicos y moleculares. Asimismo, los avances en los estudios genéticos y moleculares llevan a que se produzcan cambios en la taxonomía de forma permanente.

En sistemas de aguas continentales es común encontrar un grupo de organismos procariotas, las denominadas algas verdeazuladas o cianobacterias, y cinco grupos de organismos eucariotas: algas verdes, algas rojas, diatomeas, euglenoides y dinoflagelados.

A continuación, se detallan las características más destacadas de cada grupo:

Cianobacterias

Las cianobacterias forman parte de la comunidad fitoplanctónica natural de los cuerpos de agua, también se las encuentra en el suelo y formando parte de biofilms. Son organismos fotosintéticos. Algunos de ellos, pueden tener gran desarrollo cuando la concentración de nutrientes (P y N) aumenta en el sistema acuatico (eutrofización). Además del aumento en los nutrientes, propician su multiplicación las mayores temperaturas y una mayor estabilidad de la columna de agua. En condiciones de multiplicación excesiva pueden dar lugar a las floraciones (blooms), que en ocasiones se acumulan cerca de las orillas de los cuerpos de agua o en las capas superficiales formando espumas (“*scums*”) de mayor toxicidad. Algunas especies, principalmente las que tienen heterocistos, pueden fijar nitrógeno. En síntesis, su expansión a nivel global en los sistemas acuáticos se ha ido incrementando por la eutrofización (aumento de nutrientes en el medio acuático) y por el cambio climático (aumento de temperatura).

Algunas características:

- No tienen núcleo, pero presentan ADN y ARN.
- Presentan clorofila-a y tilacoides libres en el citoplasma. Al no tener cloroplastos, los pigmentos están distribuidos en toda la célula, por lo que siempre se los va a observar con una coloración homogénea.
- Pigmentos accesorios: ficocianina y ficoeritrina ubicados en ficobilisomas. También pueden presentar carotenoides.
- Ausencia de formas flageladas.
- La principal sustancia de reserva es el almidón de las mixofíceas.
- Se las encuentra en agua dulce, marina, hábitats terrestres y en ambientes extremos (termófilas, criófilas, etc.).

En la Fig. 1 se ilustran algunos de los taxa mas representativos de este grupo taxonómico.



Figura 1: Ejemplos de taxones de cianobacterias en sistemas acuáticos.

Algas verdes *(Clorophyta)*
La mayoría son acuáticas y, principalmente, dulceacuícolas (90%); también hay representantes marinos y de suelo. Las especies dulceacuícolas son, en general, microscópicas y de distribución cosmopolita, mientras que las marinas son macroscópicas. Crecen en un amplio rango de salinidad y nutrientes. Participan en una amplia variedad de asociaciones bióticas. Numerosos taxones de este grupo son empleados en bioindicación, por ejemplo, especies pertenecientes a las desmidiales (*Closterium, Cosmarium,* etc) se utilizan como indicadores de aguas "relativamente" limpias y ligeramente ácidas.

Algunas características:

- Los plastos varían en número y forma (de copa, banda, estrellados, discoides o en bandas helicoidales). Es un carácter taxonómico importante para la determinación de géneros y especies.
- Presentan clorofila-*a* y *b* no enmascarada por pigmentos accesorios y carotenos (luteina y xantofilas)
- Pueden presentar células flageladas con 2-4 flagelos lisos.
- Sustancia de reserva: almidón intraplastidial, como gránulos en el cloroplasto. El almidón es similar al de las plantas superiores y está compuesto de amilosa y amilopectina.
- Poseen Pirenoides visibles al microscopio óptico: estructuras proteicas asociadas a la formación de sustancias de reserva. Su ubicación puede ser intraplastidial o extraplastidial. Constan de un cuerpo esférico proteico rodeado por placas de almidón. El número de pirenoides es un carácter específico. Los pirenoides son un reservorio de la enzima ribulosa-1-5 difosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco), enzima que fija CO_2.

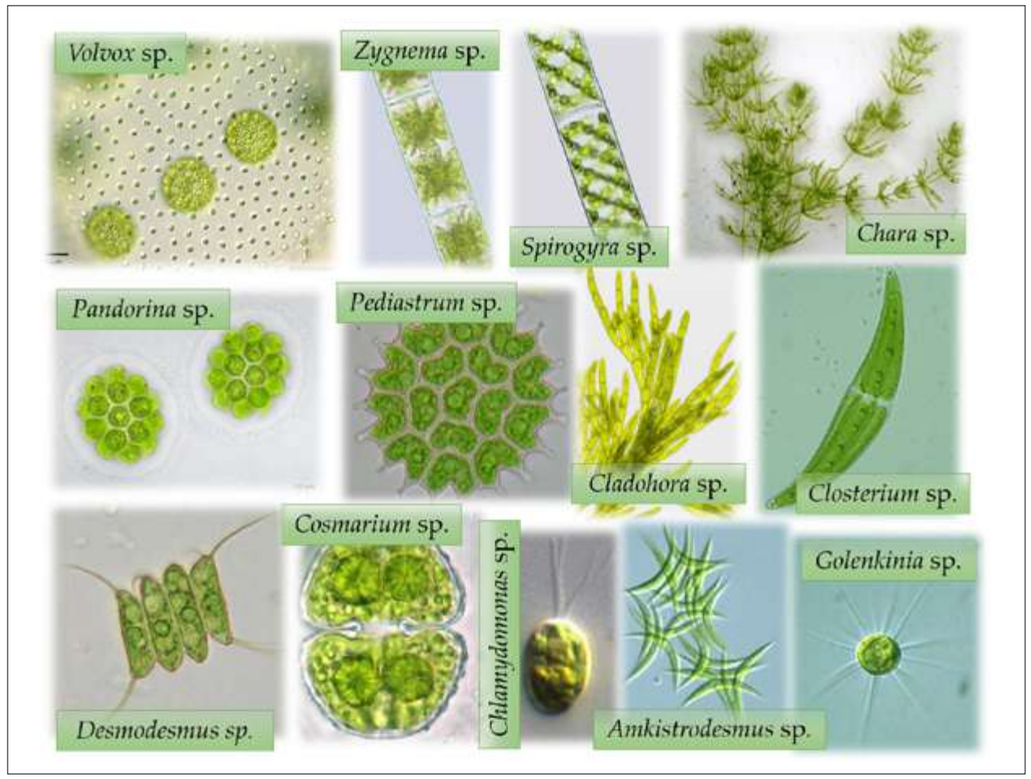


Figura 2: Taxones de algas verdes comunes en sistemas acuáticos continentales.

En la Fig. 2 se ilustran algunos de los taxa mas representativos de este grupo taxonómico.

Algas Rojas *(Rhodophyta)*
Algunas características:

- Presentan clorofila-*a* enmascarada por pigmentos hidrosolubles (ficobiliproteinas): ficocianina y ficoeritrina. α y β carotenos.
- No hay formas flageladas.
- Sustancia de reserva: almidón de las florídeas o rodamilón, ubicado como gránulos en el citoplasma.
- La mayoría son marinas, existen pocas especies de agua dulce (en aguas limpias, frías y bien oxigenadas) y algunas en suelo húmedo. A diferencia de las formas marinas, los pocos ejemplares de agua dulce son de coloración azul-verdoso (con mayor cantidad de ficocianina) y se las suele encontrar en sistemas acuáticos relativamente prístinos y con una buena concentración de oxígeno.

En la Fig. 3 se ilustran algunos de los taxa mas representativos de este grupo taxonómico.

Euglenoides *(Euglenophyta)*
Algunas características:

- Presentan clorofila-a y b, no enmascarada por pigmentos accesorios, β-carotenos y diversas xantófilas. Plastos en forma discoide, placa, cintas, urna etc.
- No tienen pared celular, presentan una película proteica debajo de la membrana plasmática. La película está formada por bandas proteicas sostenidas por microtúbulos y ubicada debajo de la membrana plasmática, la que puede ser

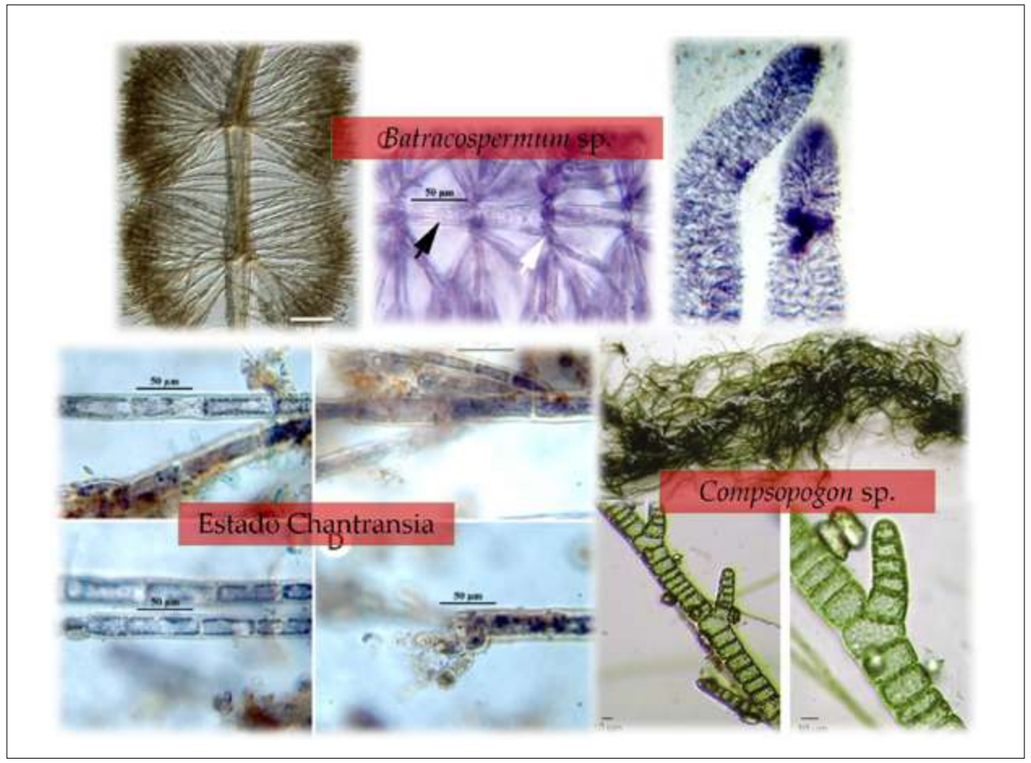


Figura 3: Ejemplos del aspecto y coloración de algas rojas comunes en sistemas de aguas contine ntales.

flexible o no. Las bandas están dispuestas en espiral de un extremo a otro de la célula. En las formas que tienen película elástica o flexible, pueden presentar metabolia (cambios de forma en la célula).

- Unicelulares flagelados, raramente en colonias sin perder el flagelo.
- Núcleo pequeño.
- La sustancia de reserva es el paramilon extraplastidial.
- Son buenas indicadoras de calidad de agua.
- Los taxones dulceacuícolas son frecuentes en aguas estancadas y con alto contenido de materia orgánica.

En la Fig. 4 se ilustran algunos de los taxa mas representativos de este grupo taxonómico.

Dinoflagelados *(Dinophyta)*
Algunas características:

- Presentan clorofila-a y c2. La clorofila enmascarada por pigmentos como β-caroteno y xantófilas.
- Sin pared celular, algunos con amfiesma: cubierta de la célula de los dinoflagelados ubicada por debajo de la membrana plasmática; está formada por alvéolos membranosos que pueden o no tener placas tecales de celulosa de variado espesor.
- Unicelulares flagelados, pocos son cocoides y filamentosos.

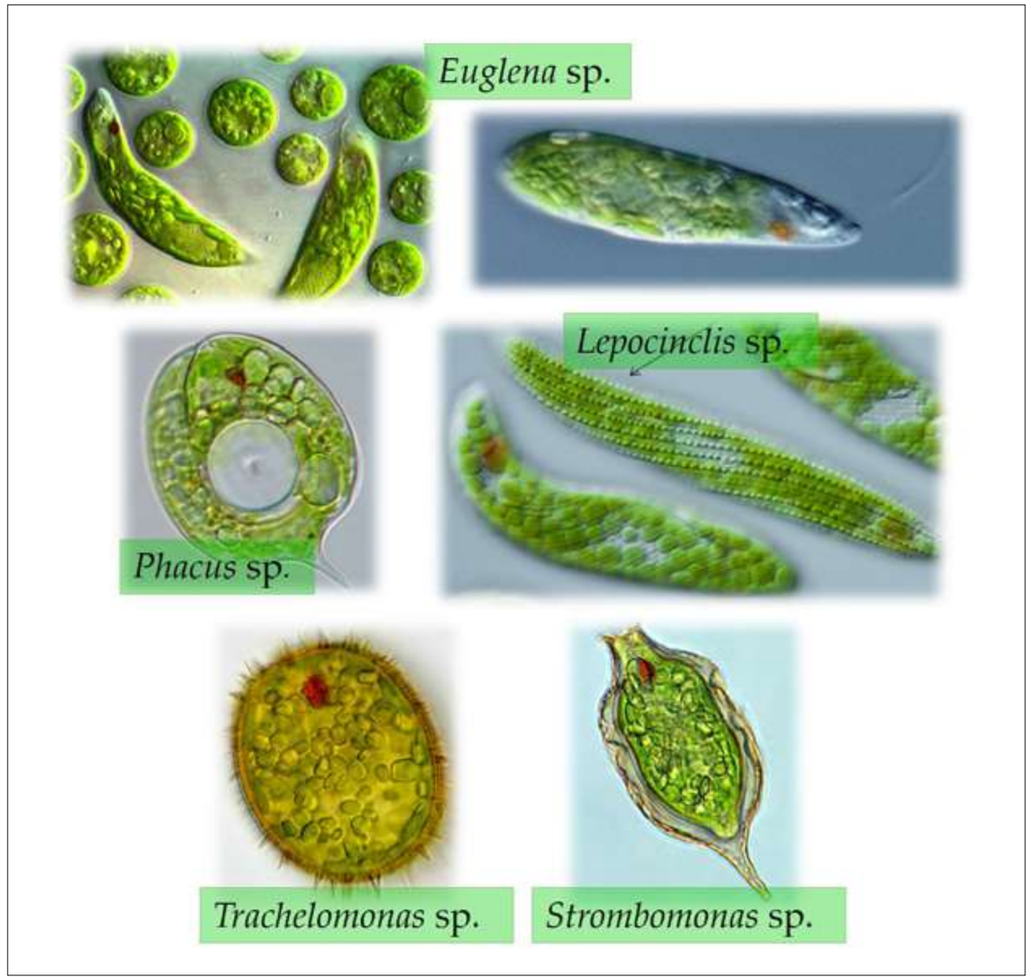


Figura 4: Euglenoideos pigmentados comunes en algunos ambientes fluviales

- Se las encuentra en mayor diversidad en ambientes marinos, pero tiene representantes en aguas dulces.
- Las especies del género *Ceratium* desarrollan floraciones en lagos y embalses de zonas tropicales y templadas. Sus floraciones no son tóxicas, sin embargo, pueden modificar el color y sabor del agua, obstruir filtros en los sistemas de potabilización y generar la muerte de peces por el agotamiento del oxígeno disuelto.

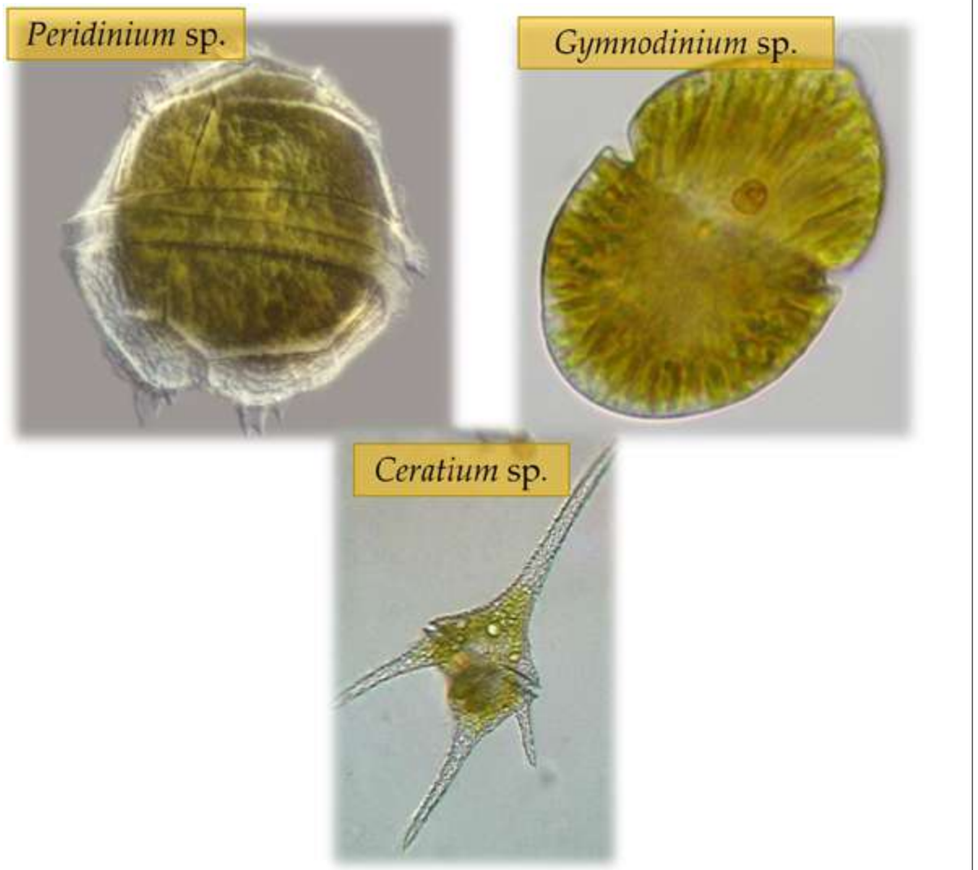


Figura 5: Dinoflagelados comunes en algunos ambientes fluviales.

Diatomeas *(Bacillariophyta)*

Las diatomeas son algas unicelulares que pueden formar pseudo filamentos o cadenas y llegar a distintos hábitats del río arrastradas por el agua. Esta estrategia hace que, a pesar de la heterogeneidad del río, ensambles de diatomeas que se desarrollan en ambientes de ecología semejantes sean también similares. En tal sentido hay diatomeas que viven en ambientes de aguas limpias y otras en aguas muy contaminadas, su fidelidad a estas condiciones permiten diagnosticar correctamente sitios con distintas condiciones ambientales.

Algunas características:

- Poseen clorofila-a, c1 y c2, carotenoides como el β-caroteno y diversas xantofilas, como la fucoxantina, que le da el color verdeamarillento.
- Son unicelulares coccoides, a veces agrupadas en colonias o pseudofilamentos.
- Como sustancia de reserva poseen crisolaminarina en vesículas en el citoplasma y lípidos.
- Lo característico en este grupo es la impregnación de la pared con sílice, dando lugar a un frústulo silicio. La pared celular está formada esencialmente por dos valvas, junto con varias estructuras de unión llamadas elementos cingulares o bandas conectivas, o cópulas. Todo el conjunto recibe el nombre de frústulo.

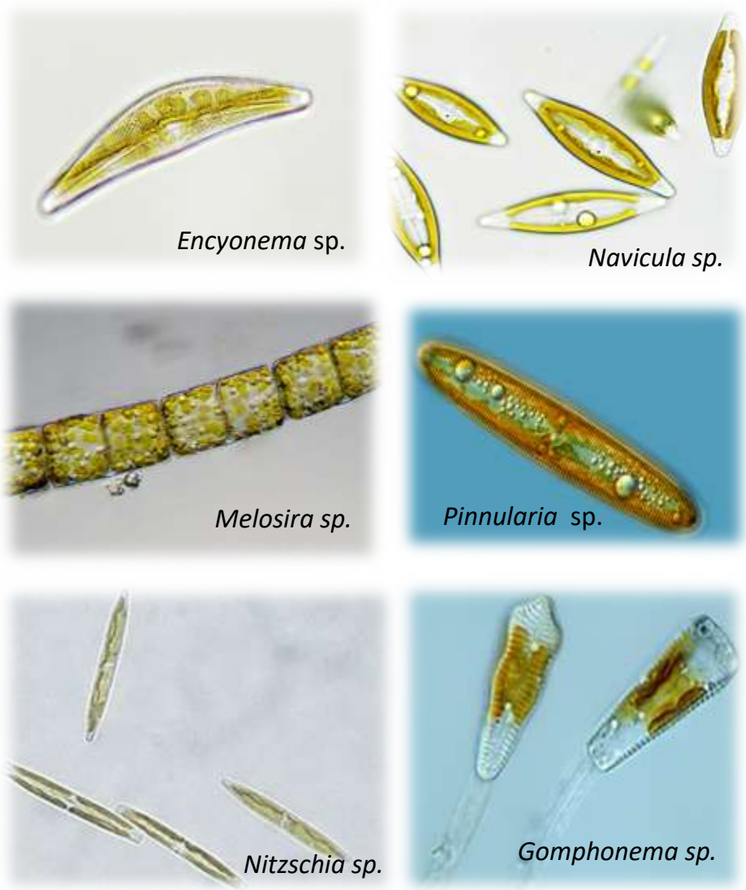


Figura 6: Algunas representantes de diatomeas bentónicas frecuentes en sistemas fluviales. Fuente: Nora Gómez

Muestreo de campo y conservación de muestras

Melina Devercelli

Elementos de campo

Se utilizan elementos citados en la sección “Materiales de colecta y equipo de muestreo”. Específicamente para algas y cianobacterias suelen utilizarse los que se detallan a continuación.

Protección personal

- botas
- guantes de látex

Recolección de muestras

- redes de plancton (de 20 µm de apertura de malla)
- jeringas descartables / aspiradores
- cepillo de dientes (de preferencia con cerdas gruesas)
- cuchillo de plástico (o algún instrumento que permita el raspado del sustrato)
- frascos de plástico (con tapa a rosca, de cierre hermético)
- marcador indeleble
- fijadores / conservantes

Heladera portátil o conservadora Provista de hielo o refrigerantes.

Materiales para el registro

- GPS
- cámara fotográfica
- lápiz y/o lapicera indeleble (para rotular las muestras)
- planilla o libreta de campo.

Recipientes

- Los recipientes para la toma de muestras pueden ser de vidrio o plástico (PET), preferentemente de boca ancha para evitar la desviación angular del agua y sesgos que afecten la recolección de los organismos de mayor tamaño. Los recipientes pueden reutilizarse una vez usados. Se deben lavar con agua y cepillo para desprender todas las partículas y organismos que podrían haber quedado adheridos y enjuagar con agua destilada o unas gotas de hipoclorito de sodio (lavandina). De lo contrario, se pueden dejar 24 h en ácido clorhídrico diluido al 20% y luego enjuagar con abundante agua. Además de los envases que comúnmente se comercializan, resultan útiles los recipientes para análisis clínicos, frascos de vidrio u otro tipo de recipiente que reúna características similares, e incluso botellas de agua mineral si se tratara de una emergencia. En el caso de las muestras para ADN ambiental, es conveniente que los recipientes sean estériles (como los recipientes para análisis clínicos) o estén autoclavados a 1 atm durante 20-30 minutos. Todos los recipientes deben identificarse adecuadamente con etiquetas y rótulos resistentes al agua y a solventes, como la acetona o el alcohol.

Red de fitoplancton

- Permite obtener una muestra concentrada de organismos para el análisis cualitativo del fitoplancton e identificación de especies. El diámetro del poro de la red más comúnmente empleado es de 25 µm, pero pueden emplearse redes de 10 a 30 µm de poro. Las muestras obtenidas con red no son adecuadas para la cuantificación ya que solo retienen una fracción del fitoplancton (aquellos organismos de mayor tamaño que el poro de la red). Algunas redes tienen un mango rígido que permite realizar recorridos en el agua para el filtrado, mientras que otras poseen una soga para realizar lances y arrastres en el agua. Una vez utilizadas, se deben lavar lo antes posible con abundante agua y sumergirse unas horas en agua con hipoclorito de sodio diluido para una limpieza más profunda.

Botella de van Dorn horizontal y vertical

- Estos muestreadores permiten extraer muestras a mayor distancia o a distintas profundidades. La botella horizontal es útil cuando se requiere colectar la muestra a unos metros de distancia de donde se encuentra la persona, desde embarcaciones altas y en zonas ribereñas vegetadas. Si la velocidad de la corriente fuera elevada, no es posible emplear la botella horizontal. La botella vertical es útil cuando los muestreos se realizan desde un puente o para tomar muestras a distintas profundidades. Tanto la botella vertical como la horizontal poseen un tubo central de PVC transparente y un sistema de cierre que se activa con un disparador mensajero.

Baldes

- Son muy útiles cuando resulta difícil acceder en forma directa al agua debido a la altura de la embarcación, la turbulencia del agua, o bien, en pequeños ríos o arroyos que pueden ser muestreados desde puentes. Es conveniente adicionar un peso a la base del balde para favorecer su hundimiento.

Fijadores

Un buen fijador debe prevenir la degradación de la materia orgánica, permitir el reconocimiento de los organismos y minimizar su pérdida por el shock químico. A continuación, se señalan los más recomendados y fáciles de conseguir:

- Solución de Lugol: se emplea para periodos cortos de conservación (las muestras pueden guardarse durante algunos meses y en oscuridad).

Se pueden emplear dos tipos de soluciones:

Solución ácida de Lugol (Willen, 1962): disolver 100 g de Yoduro potasico en 1 litro de agua destilada, agregar 50 gr de cristales de yodo, mezclar hasta disolver y, por último, agregar 100 gr de ácido glacial acético; dejar decantar la solución antes de usar. El lugol acidificado, conserva adecuadamente a la mayoría de los organismos, excepto a las valvas poco silicificadas de las diatomeas y las escamas de Mallomonas. Aumenta el peso específico de las células y facilita la sedimentación requerida para los conteos con microscopio invertido, y posee muy baja toxicidad. Posee la desventaja de ser sensible a la luz, por lo que las muestras deben almacenarse en oscuridad, y también la de teñir gran parte de los organismos de un color marrón oscuro. El lugol acidificado tiene una duración de 3 meses y debe almacenarse en frascos oscuros. Transcurrido ese tiempo es necesario renovar el ácido acético. Se utiliza a una concentración final del 1% en la muestra, o hasta que la misma adquiera color ámbar o caramelo. Al día siguiente de extraída la muestra se debe chequear que la coloración sea la adecuada ya que muestras con elevado contenido de materia orgánica o alta concentración de organismos pueden requerir adicionar unas gotas más. Pueden almacenarse en lugares frescos y la recomendación de mantenerlas refrigeradas hasta su observación es sólo a los efectos de disminuir la tasa de procesos que llevan a la reducción de la calidad de las muestras.

Solución alcalina de Lugol: se prepara igual que la mencionada anteriormente, solo que se agregan 100 gr de acetato de sodio ($C_2H_3Na0_2$) en lugar del ácido glacial acético. Se agregan entre 0,5.1 mL de Lugol iodado por cada 100 mL de muestra; esta cantidad puede variar dependiendo del contenido de materia orgánica presente. Se utiliza para la fijación en aguas alcalinas, es decir que tengan un pH mayor a 7.

- Formalina: es uno de los fijadores más efectivos en cuanto a la conservación de la muestra, especialmente si se quiere preservarla durante tiempos prolongados (años). Se deben tomar recaudos ya que se trata de un compuesto tóxico y la exposición prolongada es cancerígena. La formalina (formaldehído acuoso al 40%) se utiliza a una concentración final del 2 al 3% en la muestra. Las muestras fijadas con formalina se mantienen a temperatura ambiente y en oscuridad para preservar, en alguna medida, la auto-fluorescencia de las algas.

- Alcohol: solo si no se dispone de ninguno de los 2 fijadores anteriores, las muestras pueden conservarse con alcohol (97%) a una concentración final del 30%. El lugol debe adicionarse con posterioridad a las muestras cuantitativas para su observación con microscopio invertido.

Conservación y etiquetado de las muestras

- Muestras sin fijar (en vivo): mantenerlas en frío (entre 4 y 10 °C). En caso de que contenga una elevada cantidad de microorganismos

◀ volver al índice

y materia orgánica, se puede diluir la muestra con agua del propio sitio antes de refrigerar. El tiempo máximo de conservación para poder realizar el procesamiento es de 12 horas, luego es necesario agregar un conservante; caso contrario, la muestra podría sufrir procesos que alteren su composición y la inutilicen para los estudios posteriores.

- Muestras con conservantes: una vez fijadas las muestras pueden ser conservadas durante un periodo más prolongado de tiempo. En lo posible guardar los frascos en lugares protegidos de luz y frescos.

- Etiquetado: todas las muestras deben estar correctamente identificadas. Se puede emplear un sistema de codificación para diferenciar las distintas muestras. En la etiqueta también debe figurar: fecha de recolección, tipo de taxocenosis (fitoplancton o perifiton, especificar cuál en caso de tratarse de muestras perifíticas), sitio y si es una muestra cualitativa o cuantitativa. Todas las muestras se toman por duplicado o triplicado, por lo que también hay que indicar número de réplica. Se emplea un marcador/rotulador indeleble, o se puede confeccionar las etiquetas previamente también con tinta indeleble y colocarlas en los frascos.

◀ volver al índice

Ensambles de algas

Fitoplancton

Melina Devercelli

El fitoplancton es el ensamble de microalgas y cianobacterias que viven en suspensión en la columna de agua de los ecosistemas acuáticos. Son microorganismos autótrofos que, al igual que las plantas, requieren de la luz solar y los nutrientes para la vida. No obstante, ante la escasez de estos últimos, existen especies que pueden combinar la nutrición autotrófica con la heterotrófica. Poseen escasa movilidad que les impide contrarrestar la dirección de la corriente en los ríos por lo que son permanentemente arrastrados aguas abajo.

Los organismos que componen el fitoplancton son muy diversos en cuanto a tamaño, forma y fisiología. Las condiciones ambientales y la dispersión determinan qué especies estarán presentes en un ecosistema, con qué rasgos y en qué abundancia. Son sensibles a los cambios ambientales ante los cuales responden rápidamente por sus cortos tiempos generacionales (que varían de unas horas a unos pocos días. Estos cambios ambientales favorecen el desarrollo de algunas especies y perjudican a otras, y producen modificaciones en la composición y abundancia del ensamble fitoplanctónico.

Para diseñar el muestreo del fitoplancton fluvial, es fundamental tener en cuenta los siguientes aspectos:

- La **estacionalidad y el régimen hidrológico, y sedimentológico** del río influyen directamente sobre las características del fitoplancton, con especies y abundancias propias de cada período.

- El **cauce principal** de un río, generalmente, se encuentra conectado con otros ambientes (cauces, lagunas o ambientes de la llanura aluvial). Esa conectividad hidrológica es fundamental para mantener la dinámica del río y para intercambiar materiales y organismos. La influencia de estos ambientes varía según el caudal, la fase hidrológica y la dirección del flujo.

- En los ríos o tramos del río con **llanura aluvial**, la dimensión lateral cobra particular importancia para el desarrollo del fitoplancton. Las fluctuaciones hidrológicas determinan períodos de mayor y menor conectividad entre los ambientes de la llanura y el cauce principal posibilitando el intercambio de agua y organismos.

- Las **márgenes del río** son zonas particularmente heterogéneas en donde suelen desarrollarse poblaciones de organismos diferentes a los del resto del cauce. En las márgenes se forman remansos o zonas “muertas” con muy baja velocidad de la corriente que favorecen la concentración de nutrientes, sustancias y microorganismos. También la caída de ramas, desarrollo de vegetación, acumulación de material orgánico o cambios en el sedimento favorecen el desarrollo de poblaciones algales diferentes.

- Los puertos, puentes estrechos, balnearios, efluentes, fábricas y cualquier otra construcción desarrollada en las márgenes del río, o que interfiera con el flujo principal, son consideradas **discontinuidades del paisaje** que es necesario tener en cuenta ya que pueden ocasionar modificaciones en el fitoplancton.

- El **cauce principal** (con excepción de algunas zonas de las márgenes), generalmente, se encuentra en mezcla permanente por lo que no es necesario tomar muestras en distintas zonas ni profundidades. No obstante, puede existir estratificación de la columna de agua en ríos con escasa pendiente y velocidad de la corriente en los cuales será necesario tomar muestras a distintas profundidades o una muestra integrada de la columna de agua.

- El fitoplancton que se encuentra en un sitio del río **proviene de aguas arriba**. Por lo tanto, lo que observamos en un sitio determinado, indica lo que sucede aguas arriba. Sólo en las márgenes o sitios con nula o muy escasa velocidad de la corriente, el fitoplancton es indicador de una situación local.

- Los organismos del fitoplancton, por su pequeño tamaño, poseen **altas tasas reproductivas,** lo cual tiene implicancia directa al momento de establecer la frecuencia de muestreo.

- El fitoplancton en **ríos pequeños y arroyos** puede tener un desarrollo menor ya que por el escaso tiempo de permanencia en la columna de agua suelen ser organismos propios del bentos o del biofilm o epifiton que se encuentran ocasionalmente formando parte del plancton (por ello se lo denomina ticoplanton). Sin embargo, aún en ríos y arroyos de poca profundidad, puede desarrollarse una

comunidad planctónica permanente. En esos casos, debe tenerse en cuenta durante la realización de los muestreos evitar el contacto con las comunidades bentónicas usando elementos de colecta adapatados a esa escasa profundidad o tomando las muestras con balde o bomba y filtrándolas posteriormente a través de redes.

Los sitios de muestreo y la cantidad de muestras deben definirse en función del objetivo, representatividad del estado del río, accesibilidad y seguridad. La cantidad de sitios y de muestras a tomar es un compromiso entre los recursos económicos, el tiempo disponible, la capacidad humana de análisis y la heterogeneidad del paisaje. Al llegar a la zona de muestreo, se debe realizar una observación visual que puede ir acompañada de un registro fotográfico o esquemas, a fin de caracterizar los siguientes aspectos:

- el tramo: sinuosidad del cauce, zonas de mayor y menor velocidad de la corriente, zonas de erosión y sedimentación de materiales, desarrollo de brazos e islas, presencia de barrancas y llanura aluvial, conexiones con otros ambientes acuáticos.

- las márgenes: desarrollo de vegetación, playas, cambios de coloración del agua, etc.

- las discontinuidades del paisaje: construcciones, puentes, efluentes, balnearios, etc.

A continuación, se señalan algunas opciones para la selección de los sitios en función de los objetivos (**Fig. 1)**.

Si el objetivo contempla captar la **heterogeneidad espacial**: se debe realizar un muestreo en una transecta transversal del río en la cual los sitios se localizan en el centro (o en el talweg) y en las márgenes. También deben colectarse muestras en las discontinuidades del paisaje consideradas de interés según el objetivo del estudio. Tanto las márgenes como las discontinuidades son potenciales sitios para el desarrollo de organismos diferentes a los del flujo principal.

Si el objetivo es observar **cambios longitudinales**: los sitios de muestreo se localizan en el eje longitudinal del río aguas arriba, aguas abajo y en la fuente puntual de contaminación (por ejemplo, un efluente), o donde se encuentre el factor de disturbio o discontinuidad que pudiera estar ocasionando cambios en el fitoplancton (por ejemplo, estrechamiento del río, puente, modificación de las riberas). Los muestreos longitudinales se deben realizar desde aguas abajo hacia aguas arriba. El sitio localizado aguas arriba cumple la función de actuar como control del estado del río, en ausencia de dicha fuente o discontinuidad. Los sitios localizados aguas abajo (dos al menos) permiten analizar el efecto de la fuente, agente o discontinuidad, y la capacidad de autodepuración que posee el río. Si el tipo de contaminación es difusa, se deberá prestar especial atención a la pendiente y a la cobertura vegetal de las riberas y regiones adyacentes al curso buscando representatividad de estas áreas.

Si el objetivo es identificar **cambios temporales**: la frecuencia de muestreo debe establecerse en función de la dinámica natural del sistema o de los factores antropogénicos que se quiera observar teniendo en cuenta la rápida respuesta de las algas por sus bajos tiempos generacionales. El fitoplancton es particularmente sensible a los cambios de temperatura y a las fluctuaciones hidrológicas del río. Durante los períodos estivales, se recomienda aumentar la frecuencia de muestreo, ya que los cambios en el fitoplancton se aceleran.

En algunos tramos del río, se suceden, longitudinalmente, angostamientos (de mayor profundidad) y ensanchamientos (de menor profundidad) con la formación de islas centrales y brazos. Los angostamientos resultan sitios ideales para la toma de muestras si lo que se pretende es observar el estado del fitoplancton como indicador de los cambios que suceden aguas arriba, ya que por ellos fluye gran parte del caudal de esa sección.

En río con profundidad mayor a 5 m, si se observa **estratificación** de la columna de agua como consecuencia de un gradiente **térmico**, se deben tomar muestras a distintas profundidades. Esto puede chequearse midiendo las diferencias de temperatura entre la superficie y el fondo del río. Deben realizarse mediciones en la columna de agua cada 1 m. Si se observan cambios de temperatura de 1 °C o más por metro, se considera que la columna de agua se encuentra estratificada.

Si bien no existe un **horario** de preferencia para realizar el muestreo, es conveniente mantener una misma franja horaria. Si se observan floraciones de cianobacterias, es conveniente realizar el muestreo durante la mañana cuando se encuentran más concentradas en la superficie, ya que estos organismos son capaces de migrar mediante el empleo de vesículas de gas que les permite regular la posición más conveniente en la columna de agua.



Figura 1: Esquema del río en planta con ejemplos de diseño de muestreo longitudinal y transversal. ejemplo de márgenes naturales e intervenidos por la actividad humana, que aportan a la heterogeneidad del hábitat ribereño. Fuente: Melina Devercelli

a. Obtención de muestras de fitoplancton

Toma de muestras cualitativas

- Colocar la red en el curso de agua, contra la corriente y filtrar el agua durante aproximadamente 20-25 minutos.

- Enjuagar la red y extraer el contenido filtrado en un recipiente que contenga agua del mismo río/arroyo.

- Colocar el concentrado obtenido del filtrado en un frasco plástico opaco o en uno de vidrio color caramelo con una capacidad aproximadamente de 200 cc.

- Fijar la muestra.

- Etiquetar.

Muestras cuantitativas para recuento

- Tomar al menos 3 muestras de agua directamente del curso de agua, sin filtrar, empleando frascos plásticos con tapa hermética y llenarlos en un 90% para permitir, posteriormente, una homogeneización.

- Agregar el fijador.

- Etiquetar.



Figura 2: Pasos para el muestreo y conservación del fitoplancton. Fuente: Maria de los Angeles Taboada.

Muestras para el análisis de pigmentos (clorofila-***a***)

- Emplear recipientes opacos.
- Recoger un volumen de agua entre 0,5 a 2 litros de agua del sistema considerado. En general, en sistemas oligotróficos, es necesario filtrar un volumen mayor, mientras que en los eutróficos basta con un volumen pequeño.
- Mantener la muestra en frío y oscuridad.
- En el laboratorio proceder a su filtrado.

En el caso de los arroyos o ríos pequeños y poco profundos la colecta de la muestra puede realizarse accediendo al agua por tierra, mientras que en ríos medianos y grandes más profundos y anchos, las muestras se deben extraer desde una embarcación (detenida, nunca en movimiento) o puente. En el caso de los sitios localizados en las márgenes de estos últimos, se puede acceder por tierra, teniendo precaución de cambios en la pendiente y profundidad, y características del sedimento de fondo (puede resultar muy blando y ocasionar hundimientos). Si la coloración del agua resulta verdosa, o se observan cúmulos verdosos o existiera riesgo de contaminación, se deben utilizar guantes descartables.

Para extraer las muestras, se introduce el recipiente en forma directa en el agua, sub-superficialmente (a 20 cm de profundidad aproximadamente) y en el sentido contrario a la corriente. Si la toma se realiza accediendo a pie desde la orilla, se debe tener especial precaución de no remover el sedimento del fondo. Si se observa estratificación térmica de la columna de agua, deben tomarse muestras a distintas profundidades con botella tipo van Dorn vertical. También puede utilizarse dicha botella o baldes si se dificultara colectar la muestra en forma directa.

Es importante homogeneizar el contenido del balde y botellas previamente al llenado de los recipientes definitivos. Los baldes, botellas y recipientes deben estar limpios y enjuagarse 3 veces con agua del ambiente a un costado del sitio de donde se extrae la muestra, para evitar disturbios.

Una vez obtenidas las muestras, se procede a la medición de los parámetros ambientales.

Tipos de muestras. Para tener un análisis integral del fitoplancton, es necesario recolectar distintos tipos de muestras (Tabla 1), cada una de las cuales posee particularidades en cuanto a **volumen, recipiente y fijación**. La adición del fijador y rotulación de las muestras se debe realizar inmediatamente a la extracción de las mismas. Las muestras se trasladan refrigeradas (en heladeras portátiles con hielo o refrigerantes) al laboratorio o sitio de procesamiento. Solo las muestras fijadas pueden trasladarse a temperatura ambiente, si estas no fueran muy elevadas, y protegidas de la luz.

Muestra cuantitativa del fitoplancton y para el análisis particular de cianobacterias. Permiten estimar la densidad del fitoplancton y de las especies que lo componen, ya sean microalgas o cianobacterias. Es conveniente utilizar recipientes de vidrio para su obtención ya que el fijador que se utiliza para su conservación, el lugol, es absorbido por ciertos tipos de material plástico.

Muestra cualitativa del fitoplancton o muestra de red. Se utilizan para el análisis cualitativo del fitoplancton e identificación de especies. Estas muestras se obtienen con red, por lo que no resultan adecuadas para cuantificar ya que solo retienen una fracción del fitoplancton (aquellos organismos de mayor tamaño que el poro de la red).

Muestra de fitoplancton sin fijar. Resultan útiles para realizar cultivos celulares o para observar los movimientos y coloración de las algas vivas, lo cual facilita algunas identificaciones taxonómicas. Puede obtenerse con red o en forma directa. Es muy sensible a la luz y debe mantenerse refrigerada o entre 10 y 15° C.

b. Laboratorio

Muestra cuantitativa del fitoplancton

Para la cuantificación del fitoplancton es necesario tener experiencia en la identificación de los organismos y emplear microscopios con una resolución óptica que permita una magnificación apropiada para observarlos. Solo las células que estaban vivas al momento de tomar la muestra son las que se cuentan, para lo cual puede tomarse como referencia que posean cloroplastos y membranas celulares en buen estado. A continuación, se describen dos métodos de cuantificación del fitoplancton.

Método de cuantificación por sedimentación de la muestra (Utermöhl 1958). Es el más recomendado para la cuantificación del fitoplancton. Se requiere de microscopio invertido con aumento de 400x (al menos) y cámaras de sedimentación con sus respectivas columnas de distintos volúmenes (5, 10, 50 mL), vidrio grueso para tapar las columnas y vidrio fino para desplazar las columnas, y utilizar como cubreobjetos (Fig. 3). Las muestras deben estar fijadas con lugol para aumentar el peso específico de los organismos y a temperatura ambiente para evitar la formación de burbujas indeseadas en el fondo de la cámara.

Los pasos a seguir para la preparación de la muestra son:

- Homogeneizar la muestra agitando con movimientos en forma de “ocho” durante 30 segundos.
- Seleccionar una columna de sedimentación según el volumen de muestra a procesar. Montar la columna sobre la cámara de sedimentación, completarla con la muestra homogeneizada y taparla con el vidrio grueso de manera que genere presión para evitar el derrame del líquido (Fig. 3). El volumen de muestra a sedimentar dependerá de la concentración de organismos en el ambiente. Si la muestra estuviera muy concentrada, pueden realizarse diluciones que se deben tener en cuenta al momento de realizar el cálculo final. Si la concentración de organismos fuera baja, se utilizan columnas para más volumen de manera de concentrar un mayor número de organismos en el fondo de la cámara. El tiempo de sedimentación depende del volumen y alto de la cámara, aunque pueden dejarse de un día para el otro. Para cámaras de 2 mL y 0,5 cm de alto: 3 h de sedimentación; 10 mL y 2 cm: 8 h; 50 mL y 10 cm: 24 h.
- Transcurrido el tiempo de sedimentación, retirar la columna con el sobrenadante, desplazándola con el vidrio más fino (Fig. 3), y colocar la cámara con la muestra sedimentada en el microscopio invertido para su observación.

La cuantificación del fitoplancton se realiza con aumento de 400x, aunque la cuantificación de organismos de tamaño celular grande puede realizarse a 200x. Antes de iniciar el conteo, se debe realizar una observación general de la cámara a fin de chequear que el volumen de muestra sea el adecuado. En primer lugar, el número de organismos por campo tiene que ser tal que no dificulte la observación por exceso o deficiencia. La distribución de los organismos debe ser homogénea a simple vista. Si la mesada tiene una leve pendiente o se forman burbujas, o se deposita algún material de gran tamaño, la distribución podría verse groseramente sesgada hacia uno de los lados de la cámara. Por último, si la muestra contiene material inorgánico que dificulta la observación de los organismos, se deberá sedimentar un volumen menor de muestra y contar más campos e incluso más cámaras. Puede suceder que las vesículas de gas de organismos no colapsen y que se mantuvieran en suspensión; en tal caso, se deberá mover el tornillo macrométrico del microscopio para observar los distintos estratos de la cámara de sedimentación.

Las cámaras se recorren con el objetivo del microscopio realizando transectas verticales u horizontales evitando los bordes (Fig. 3). Dentro de dichas transectas, todos los organismos observados en campos al azar se identifican y enumeran. Se debe registrar el número de campos observados, los organismos identificados y la cantidad de veces que se observó cada organismo.

Los organismos se enumeran considerando como unidad el número de células. Se debería alcanzar al menos 100 individuos de la especie más frecuente. En algunas ocasiones, no es posible seguir este criterio por tener una baja densidad algal o una alta concentración de sedimentos. En ese caso, se

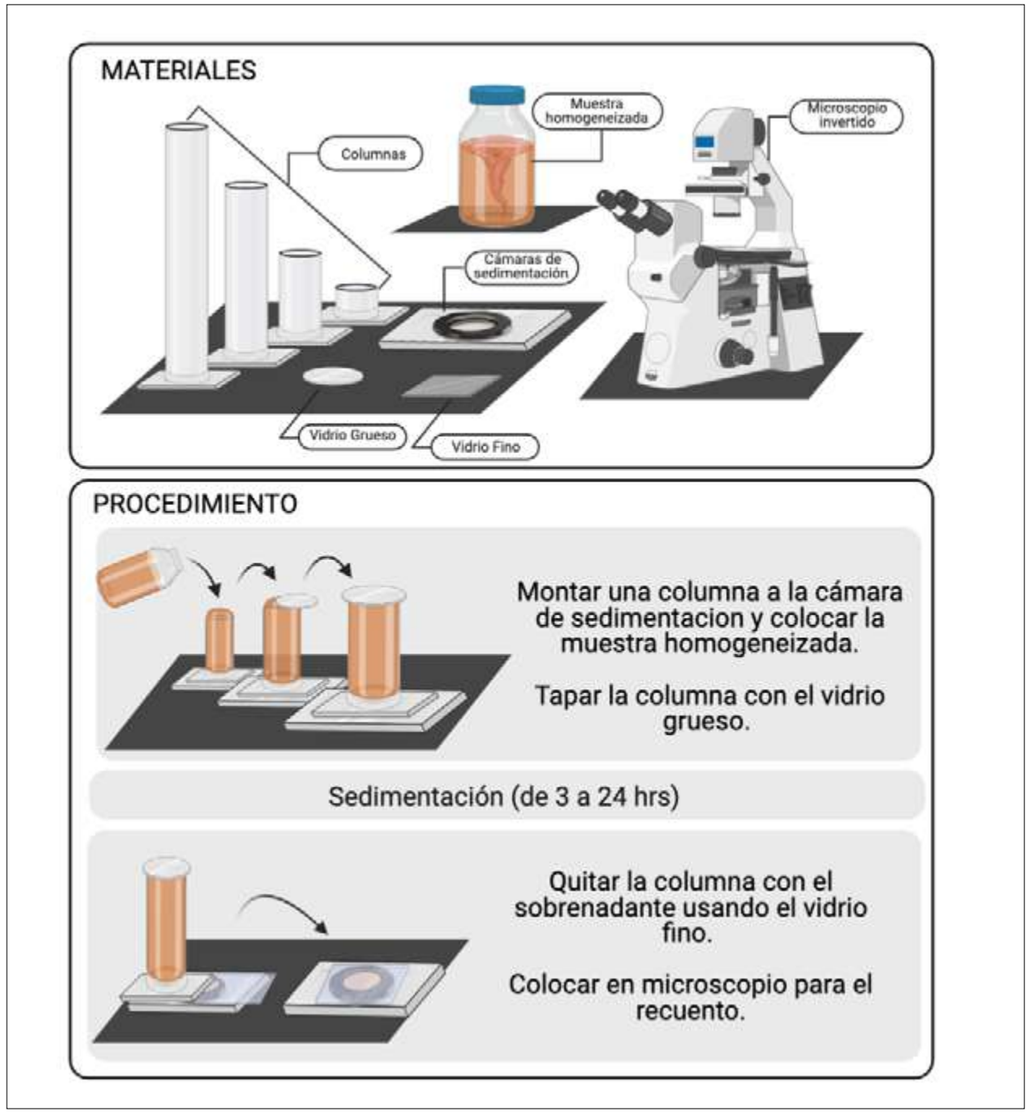


Figura 3: Pasos para la preparación de las muestras a observar en microscopio invertido. Fuente: Paula Huber

cuentan tantos campos como fueran necesarios para estabilizar el número de especies según el método del área mínima, o se realiza el cálculo del error para las especies más abundantes, que no debe exceder al 20%. A veces es necesario contar varias cámaras para completar el procedimiento. En el caso de las cianobacterias, también debe cuantificarse el número de células por colonia o filamento (ver apartado Cianobacterias). Para estimar la densidad del fitoplancton, se calcula un factor con el área de la cámara, el área de los campos observados, la cantidad de campos contados y el volumen de muestra sedimentado, que se multiplica por el número de organismos (expresados como individuos o células). La densidad se expresa como organismos por unidad de volumen: individuos por mililitro (ind/mL). La cuantificación particular de cianobacterias para la comparación con los niveles guía se expresa como células por mililitro (cél/mL) (ver apartado Cianobacterias).

Método de cuantificación con cámara de Sedgwick-Rafter. Esta cámara (Fig. 4) tiene capacidad para un volumen fijo de muestra, generalmente de

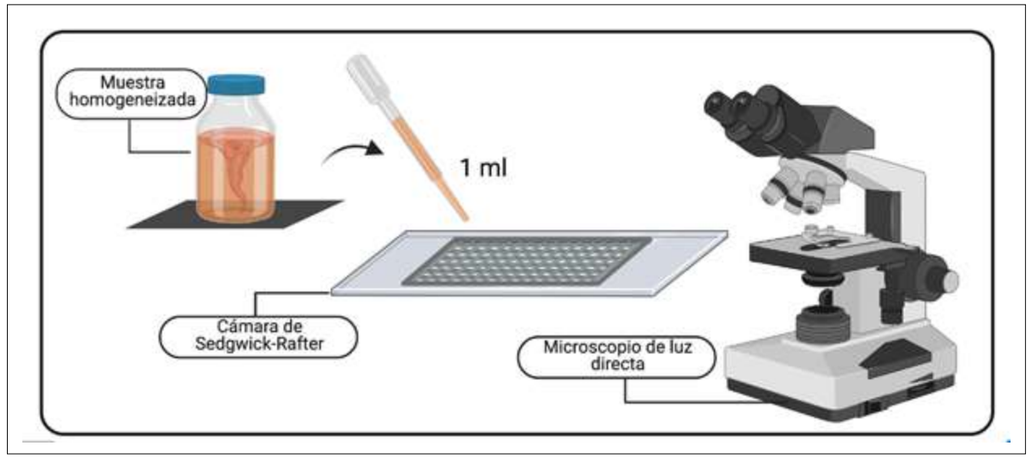


Figura 4: Esquema de método de conteo mediante cámara Sedgwick-Rafter. Fuente: Paula Huber

1 mL, y para su observación se utiliza microscopio de luz directa con aumentos de 200x, 400x. Luego de homogeneizar la muestra, se utiliza una pipeta Pasteur para submuestrear 1 mL de la muestra original. La cámara se observa con microscopio de luz directa, realizando recorridos de transectas horizontales en las cuales se enumeran e identifican todos los organismos como unidades naturales o individuos, o células según el objetivo. La estimación de la densidad se calcula teniendo en cuenta el área de cada transecta, el número de transectas y el volumen de la cámara.

Este método conlleva un error mayor que el anterior. Sin embargo, si se realizan varios conteos por cámara, puede calcularse cuál es el error con el que se expresan los resultados.

Muestra de fitoplancton sin fijar. Esta muestra es necesario mantenerla en oscuridad y refrigerada (4-10°C) con un tercio del recipiente vacío para permitir el intercambio de gases. Se debe observar antes de las 12-24 h ya que el fitoplancton puede ser consumido por predadores o atacado por bacterias y virus. No obstante, algunos organismos, como las cianobacterias, pueden mantenerse vivos por varios días entre 10 y 15° C.

Cálculo del biovolumen. El biovolumen es una estimación de la biomasa del fitoplancton. Puede calcularse para especies particulares o para el fitoplancton total (sumatoria de los biovolúmenes de todas las especies que componen el fitoplancton). A diferencia de la densidad, considera las dimensiones y la forma de los organismos. En el caso de las cianobacterias, resulta particularmente relevante para comparar con los niveles guía.

Para el cálculo del biovolumen es necesario contar con una regla micrométrica calibrada montada en el ocular del microscopio. Se realizan mediciones de las dimensiones celulares a 20 o 30 individuos de las morfoespecies que se encuentran en mayores densidades, y se calcula el volumen medio por aproximación a la forma geométrica más cercana (Hillebrand *et al.* 1999; Olenina *et al.* 2004) (Fig. 4). Luego se multiplica el volumen medio de cada morfoespecie por su densidad. Los resultados se expresan en milímetros cúbicos por litro (mm^3/L) o micrómetros cúbicos por mililitro ($um^3\ mL^{-1}$). Las estructuras celulares como espinas, setas, verrugas, vainas de mucílago y flagelos no se incluyen en el cálculo del **biovolumen.**

c. Almacenamiento de las muestras

Si el monitoreo estuviera sujeto a un procedimiento judicial, las muestras deben conservarse en su totalidad. De lo contrario, se puede optar por conservar las muestras de algunos de los sitios que resultaran más representativos del estado del río o almacenar una alícuota para tener un registro histórico, para realizar análisis posteriores. Se puede optar por conservar una muestra cuantitativa en recipientes de menor volumen previa homogeneización de la muestra original o reducir la muestra eliminando el sobrenadante y recolectando el material depositado en frascos más pequeños, previa sedimentación de la muestra durante 24 h.

Los recipientes deben estar herméticamente cerrados y, en el caso que no lo estuvieran, puede sellarse la tapa con teflón o colocarse un plástico blando entre la tapa y la rosca para evitar la evaporación.

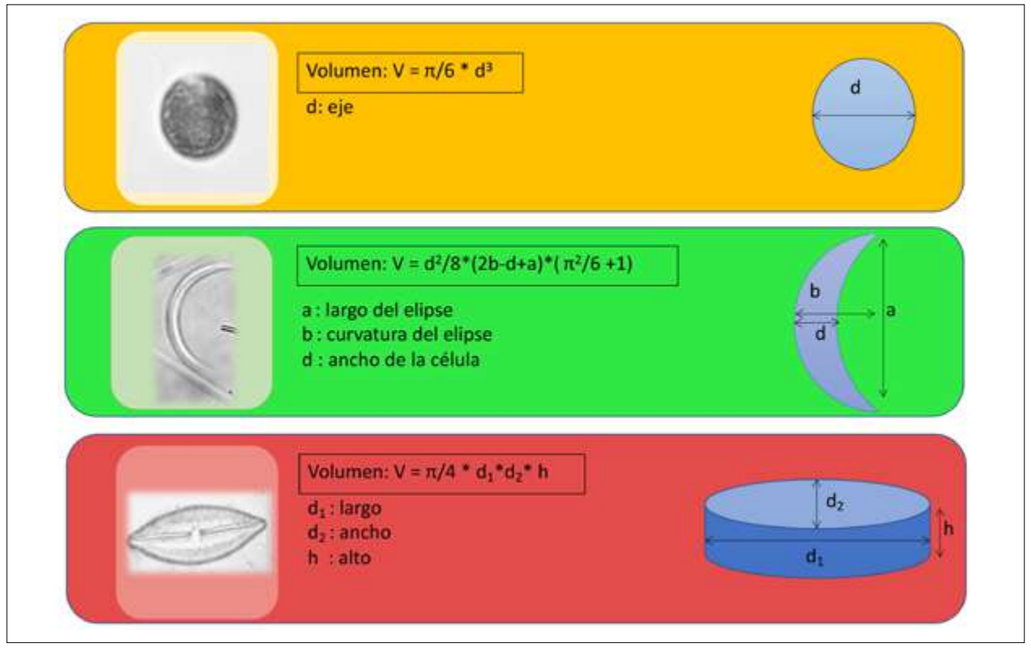


Figura 5: Ejemplos para el cálculo del biovolumen. Fuente: Melina Devercelli

Tipo de muestra	Volumen	Recipientes	Fijador	Traslado	Almacenamiento
Clorofila-a	500-1000 mL	Vidrio o PET Oscuros (1) Boca ancha	Sin fijador	Refrigerada	Filtrar antes de 24 h. Luego, freezar filtro
Cianotoxinas	300-1000 mL	Vidrio o PET Boca ancha	Sin fijador	Refrigerada	Freezar
ADN ambiental (3)	100-300 mL	Vidrio o PET Boca ancha (4)	Sin fijador	Refrigerada	Filtrar antes de 24 h. Luego, ultrafreezar filtro
Cuantitativa: Fitoplancton Cianobacterias	100-300 mL	Vidrio (pref.) o PET Boca ancha	Lugol acidificado 1% (color caramelo)	Refrigerada	En oscuridad. Refrigerada o lugar fresco
Cualitativa (red) Fitoplancton Cianobacterias	100 mL aprox. con red	Vidrio o PET	Formalina 2-3% ó alcohol (2)	Refrigerada	En oscuridad.
Muestra viva (3)	Opcional	Vidrio o PET	Sin fijador	Refrigerada	Refrigerada o a 10-15°C, 24 h, o más, dependiendo de los organismos

Tabla 1: Volúmenes, tipos de recipientes y condiciones de almacenamiento para las distintas muestras**.** (Refrigerada 4°C, freezada -17, ultrafreezada -80)
(1) La clorofila es sensible a la luz por lo que los recipientes deben evitar el paso de la misma.
(2) La fijación con alcohol posee la ventaja de que la muestra puede también utilizarse para análisis moleculares.
(3) Opcional.
(4) Preferentemente autoclavados o estériles.

d. Indicadores del fitoplancton

Si bien la bioindicación de las algas está basada en las especies, también es posible distinguir morfoespecies, grandes grupos taxonómicos o rasgos que indiquen respuestas a las condiciones y cambios ambientales. Incluso, el poder indicador del fitoplancton puede realizarse a diferentes niveles: comunitarios, de grandes grupos, especies, diversidad general o índices específicos. Cuando no existan valores guías, como para el caso de las cianobacterias o categorías, es muy importante compararlo con los valores de zonas no afectadas o momentos previos al disturbio. Los principales indicadores pueden clasificarse de la siguiente manera:

Indicadores comunitarios. La Clorofila-*a* (ver apartado Clorofila) y el biovolumen total del fitoplancton son indicadores de la biomasa que se relacionan con el estado trófico (por la capacidad de capturar nutrientes), la captación de la luz y la temperatura. Por ello, ambientes con muchos nutrientes (eutróficos) suelen tener valores más altos de biomasa algal, tanto si se estima como clorofila-*a* o como biovolumen.

Indicadores a nivel de rasgos. Un rasgo es una característica que refleja la adecuación del organismo al ambiente, de manera tal que se relaciona con los factores ambientales. Los rasgos pueden ser de distintos tipos (morfológicos, fisiológicos, ecológicos, etc.) y niveles (individuales, poblacionales, comunitarios). Por ejemplo, **los grupos fisiognómicos** (Reynolds 1984) son una clasificación basada en grandes rasgos; se relaciona con la capacidad de captar luz y nutrientes, y el grado de flotabilidad de los organismos, que se clasifican en:

- unicelulares flagelados,
- unicelulares no móviles,
- filamentos,
- colonias o cenobios.

La **clasificación funcional basada en morfología,** propuesta por Kruk (2010), se basa en la diferenciación de rasgos fácilmente observables al microscopio. Las entidades observadas se clasifican en 7 grupos funcionales con características, respuestas y preferencias ambientales particulares (Fig. 1). Posee la ventaja que puede ser aplicada por personas con poca experiencia en la identificación del fitoplancton. Esta clasificación es muy adecuada para encontrar patrones generales del fitoplancton y a escalas geográficas amplias, pero para su aplicación en ríos es conveniente realizar mayores discriminaciones dentro de los grupos para que reflejen más adecuadamente ciertas situaciones ambientales, como las que se proponen en el apartado siguiente.

Combinación de rasgos, grandes grupos taxonómicos y especies. Dado que la aplicación de la clasificación funcional al estudio del fitoplancton lótico basada en morfología (Kruk 2010) resulta

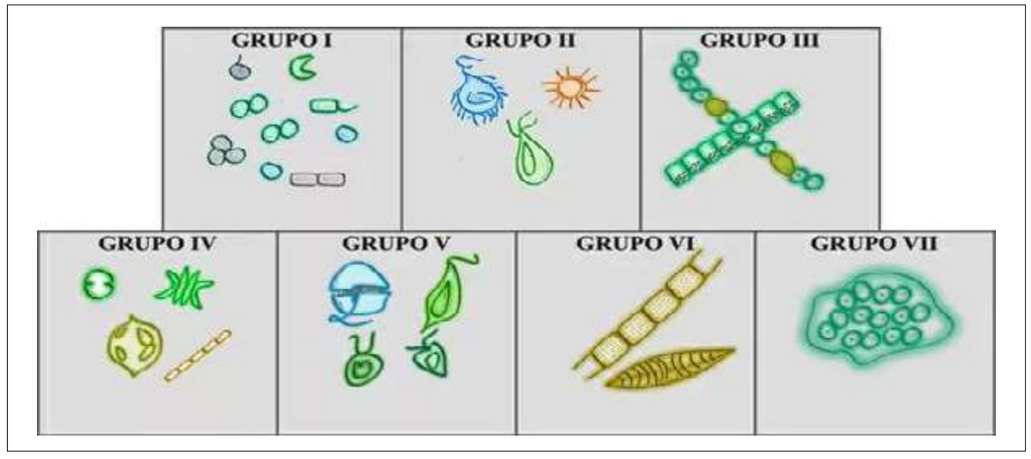


Figura 6: Propuesta para la identificación del fitoplancton de ríos, modificada de la clasificación de Kruk (2010). Grupo I: Organismos pequeños con alta relación superficie/volumen; Grupo II: Organismos pequeños, flagelados con estructuras silíceas en el exoesqueleto; Grupo III: Organismos pequeños con aerotopos; Grupo IV: Organismos medianos sin rasgos distintivos; Grupo V: Organimsmos flagelados de tamaño mediano a grande; Grupo VI: Organismos no flagelados con esqueletos silíceos; Grupo VII: Grandes colonias mucilaginosas.

muy general, aquí se propone subdividir 3 de los grupos originales y combinarlos con la identificación de géneros y especies a fin de obtener una indicación más fina. No obstante, es necesario continuar realizando estudios para validar cómo varían determinados rasgos y clasificaciones de las algas a través de gradientes ambientales para poder implementarlos en el biomonitoreo de ríos de la región.

Indicadores que utilizan grupos taxonómicos. Existen diversos índices de calidad de agua que emplean a las microalgas. Dentro de los índices más antiguos que emplean el fitoplancton, están los de Nygaard (1949), los cuales establecen relaciones entre el número de taxones de algas planctónicas de ambientes oligotróficos y el número de taxones de aguas eutróficas. Si las primeras predominan, se espera que el agua sea de buena calidad, y si lo hacen las segundas, las condiciones del agua pueden ser malas. Los índices propuestos por Nygaard no tienen en cuenta las abundancias de los grupos, por lo cual Barbe *et al.* (1990) propusieron un índice trófico planctónico (ITP) que considera los grupos taxonómicos del fitoplancton encontrados en una muestra, su abundancia relativa y los valores de clorofila-*a*.

Este índice se basa en las proporciones de los biovolumenes de los distintos grupos taxonómicos:

ITP= D+0,1*Cr+Cc+2 * (Dc+Chc)+3+Vc+4*Cia / I+2*(D+Cnc)+Chnc+Dnc

D: dinoflagelados, Cnc: Crisofitos no coloniales, Chcn: clorococales no coloniales, Dnc: diatomeas solitarias, Cr: criptofitos, Cc: crisófitos coloniales, Dc: diatomeas coloniales, Chc: clorococales coloniales, Vc: volvocales coloniales.

Si bien estos índices se desarrollaron para aplicar en lagos, se realizó su adaptación en ambientes lóticos de noroeste argentino; por ejemplo, para el río Gastona (Tucumán) se emplearon algunos índices desarrollados para el fitoplancton lacustre por Nygaard (1949), a fin de utilizar todos los grupos taxonómicos:

Índice compuesto = cianofitas+clorococales +centrales+euglenales/desmidiales

Índice Clo/Des = clorococales/desmidiales

Índice Ce/Pen = Centrales/Pennales

Índice Euglenal = euglenales/cianofitas +clorococales

Si el valor fuese <1 se trataría de agua probablemente oligotrófica y > 1 seria eutrófica (Patrick, 1973; Wetzel 1981).

La información detallada se encuentra en: Mirande, V. 2001. *Dinamica del Fitoplancton del Río Gastona (Tucumán, Argentina) en relación a la Calidad de sus aguas*. Tesis Doctoral. FCN e IML, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina. 271 pp.

NOTA: la nomenclatura de los grupos puede haber cambiado por lo que se recomienda consultar la base de datos: https://www.algaebase.org/

También se pueden analizar las diferentes taxocenosis algales mediante diversos índices ecológicos, que si bien no establecen categorías de la calidad de los ecosistemas fluviales, pueden brindar, en cambio, información complementaria:

- Índice de Diversidad (H') de Shannon y Wiener se basa en la estructura de la comunidad y es una medida que integra el número de taxones (o especies) y la distribución de sus abundancias o densidades.

- Índice de Kothé (Schwoerbel, 1975) de déficit de taxones considera el número total de especies, el cual decrece de manera sustancial bajo la influencia de contaminación. Solo el número total de especies es importante y no de qué especie se trate. Si aceptamos que cada muestra se estudia de la misma manera, el déficit de especies se puede calcular con la siguiente fórmula: F= (A1-Ax/ A1) x 100.

- Donde A1: nº de especies (riqueza) del sitio que se toma como referencia o menos impactado, es decir corresponde a las muestras aguas arriba del tramo contaminado. Ax: es la riqueza de especies del sitio contaminado.

- El valor se da en porcentaje y fluctúa entre: 0%= ningún déficit de especies y 100%=pérdida total de especies.

- Índice de equitatividad (E ó J): se define como el grado de igualdad en la distribución de la abundancia de los taxones de una comunidad.

Indicadores que utilizan especies de algas y cianobacterias. Entre los principales se encuentran:

Cianobacterias: su presencia y abundancia puede ser, en ciertos casos, indicadora de procesos de eutrofización, deterioro de la calidad del agua y cambios en las condiciones hidráulicas e hidrológicas de los ríos. Para este grupo pueden considerarse distintos atributos como densidad, biovolumen, número de células, presencia de especies potencialmente tóxicas y desarrollo de floraciones (ver apartado Cianobacterias).

- Euglenoideos: los géneros Euglena, Phacus y Lepocinclis y algunas especies de Trachelomonas y Strombomonas son indicadoras de altas concentraciones de materia orgánica y cambios hidrológicos en los ríos.

- Dinoflagelados: el género Ceratium es considerado invasor en Sudamérica y se encuentra frecuentemente en ambientes que han sufrido alteraciones antropogénicas. Este género puede desarrollar floraciones y la presencia de las mismas estaría indicando una modificación severa de la diversidad del ambiente por factores múltiples.

- Empleo de ensambles fitoplanctónicos: Sathicq et al. (2017) realizaron una propuesta validada para el estuario del Río de la Plata de 24 especies pertenecientes a los grupos de cianobacterias, clorofitas, diatomeas y euglenoideos, que resultan indicadoras del deterioro de la calidad del agua.

Consideraciones generales

Antes de utilizar un índice por primera vez en un área, es necesario hacer una evaluación previa del índice, analizando si las características de los sistemas acuáticos de la región en la que se creó el índice son similares a las de los sistemas acuáticos en los que deseamos aplicar el índice en cuestión. Una vez calculado el índice, se recomienda una validación de los resultados obtenidos con las correspondientes variables físico-químicas consideradas para su creación (es necesario que se midan estas variables la primera vez que se aplica un índice foráneo en una región).

Es importante que los taxones dominantes presentes en la región estén también representados en el índice, es decir, que cuenten con valor indicador.

La correcta aplicación de los índices requiere de la participación de un técnico entrenado en la identificación taxonómica.

Bentos y sustratos sumergidos

Nora Gómez y Magdalena Licursi

Es una microcomunidad que recubre diferentes tipos de sustratos sumergidos (Fig.1), que está compuesta por microalgas, bacterias, hongos y protozoos inmersos en una matriz de



Figura 1: Esquema del biofilm fluvial con las microalgas que lo componen. Fuente: Nora Gómez y Magdalena Licursi

polisacáridos. De acuerdo al tipo de sustrato que revisten se emplearán los términos: epipelon, cuando colonizan sedimentos con predominio de limos y arcillas; episamon, cuando coloniza sustratos arenosos; epiliton, cuando revisten rocas y epifiton, cuando recubren plantas. También se puede desarrollar sobre sustratos artificiales de distinta naturaleza.

En un mismo río puede haber distintos ensambles o comunidades de organismos de acuerdo al tipo de sustrato con el que estén relacionados. Para realizar un monitoreo adecuado, puede reunirse la información que provean todos ellos o elegir la comunidad más representada y volver a tomar muestras del mismo tipo de comunidad en cada oportunidad en que se realicen nuevos muestreos, con el objetivo de poder analizar sus cambios.

Epipelon

- Se emplean aspiradores, jeringas cortadas o sacabocados con una superficie muestreal conocida (ej.: 1 cm^2) que permiten extraer los primeros 5-10 mm de la capa superficial del sedimento.

- La profundidad recomendable para la extracción de las muestras es de no menos de 10 cm de la superficie del agua.

- Las unidades muestreales se extraen al menos por quintuplicado. Una parte del material colectado es fijado y la otra parte se conserva viva para examinar el estado fisiológico de las células (movilidad, estado de los cloroplastos, núcleos, etc) y medir la clorofila-*a* (Fig. 2).

Epiliton

Se recomienda tomar muestras de comunidades algales que se desarrollan sobre sustratos duros y estables ubicados en zonas sumergidas del lecho fluvial: rocas o cantos rodados de un tamaño mínimo de 10 x 10 cm. En caso de no encontrarse estos sustratos, se puede tomar la muestra de otras estructuras sumergidas, y del tamaño recomendado, como pilares de puentes o paredes. Se pueden tomar muestras de superficies artificiales como ladrillos o tejas, siempre y cuando hayan permanecido al menos dos meses en ese sitio (tiempo estimado para la colonización y maduración de la taxocenosis algal; este tiempo puede ser variable dependiendo de otros factores abióticos).

- Seleccionar como mínimo 5 rocas o, en caso de ser de un tamaño más pequeño, se pueden elegir hasta 10. Siempre seleccionar las rocas de zonas sumergidas, en porciones soleadas y con aguas corrientes.

- Eliminar, agregando un poco de agua y de manera suave, cualquier tipo de detritos que se encuentren adheridos a los sustratos.

- Se puede emplear una plantilla de acetato del tamaño previamente determinado (10 x 10 cm) que se coloca sobre el sustrato; luego, se procede a cepillar (o a raspar con cuchillo) la superficie determinada. Se debe limpiar como mínimo una zona de 10 cm^2 por roca (20 cm^2 en caso de emplear 5 rocas). La superficie total de muestreo será de unos 100 cm^2.

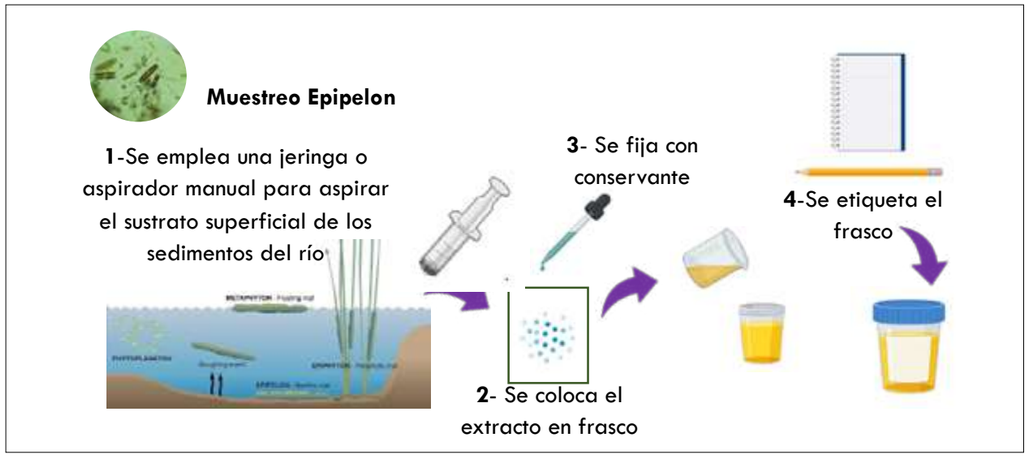


Figura 2: Pasos del muestreo sobre sustratos limosos o arcillosos. Fuente: María de los Ángeles Taboada

- Al ir colocando y lavando el extracto raspado con cepillo en un recipiente con 100 mL de agua destilada, el agua se tornará de color amarronadoverdoso.

- Proceder a etiquetar la muestra, emplear el fijador considerado (formaldehído, lugol o etanol) y cerrar correctamente el frasco para evitar derrames.

- Sustratos artificiales: se pueden colocar en los sitios, siempre y cuando se retiren una vez realizado todo el muestreo. Es preferible utilizar sustratos con superficies heterogéneas (ladrillos, tejas, cuerdas de propileno, etc) y lisas (por ejemplo, portaobjetos de vidrio). Es necesario insertarlos en los sistemas acuáticos un tiempo suficiente para que se realice la colonización. Se recomienda entre 7-8 semanas, sin embargo, el periodo de exposición varía con las condiciones ambientales. Debe tenerse en cuenta el diseño y la ubicación de los sustratos; asimismo, es importante colocar réplicas para minimizar el riesgo de pérdida por crecidas o vandalismo. Siempre considerar que todos los sustratos ingresados estén expuestos a las mismas condiciones y a la misma fecha de introducción. Se procede igual que con los sustratos “naturales”: raspado de las superficies y lavado con agua destilada en un volumen de 100 cc.

En el caso de que se quiera medir la clorofila-a, no fijar la muestra (dado que los conservantes degradan los pigmentos), conservarla en frío y oscuridad hasta llegar al laboratorio. Ahí, se separarán 50 mL que serán filtrados para determinar la biomasa epilítica. A los restantes 50 mL, se le agregará el fijador (Fig. 3).

En el caso de sistemas vegetados, se puede extraer el epifiton a partir de macrófitos y macroalgas sumergidas y/o partes sumergidas de helófitos.

- Macrófitos sumergidos: retirar la planta entera (en caso de que sea de un tamaño pequeño) o cortar una parte de la misma empleando un cuchillo o tijera y colocarla dentro de una bolsa plástica. Se seleccionarán 5 réplicas.

- En el laboratorio se deben lavar y agitar las plantas (aproximadamente 2 minutos) en un vaso de precipitado que contenga agua destilada. Para extraer la taxocenosis epifíticas, se puede emplear la ayuda de un pincel pequeño. Otro método para desprender las algas epífitas consiste en colocar la muestra en recipientes de vidrio dentro de una lavadora ultrasónica y aplicar de 3 a 5 períodos de un minuto con ultrasonido. Tiempos mayores suelen dañar las algas que pretendemos extraer.

- Conservar el extracto y fijar con el conservante seleccionado. (Fig.4)

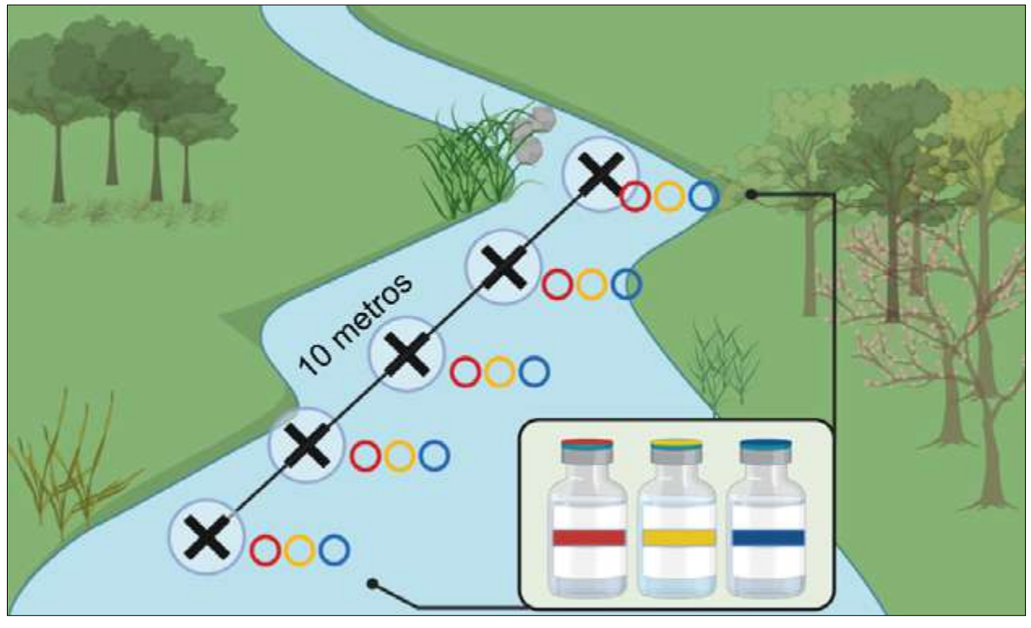


Figura 3: Ejemplo de diseño de muestreo en el cauce de un río. Fuente: Nora Gómez y Magdalena Licursi

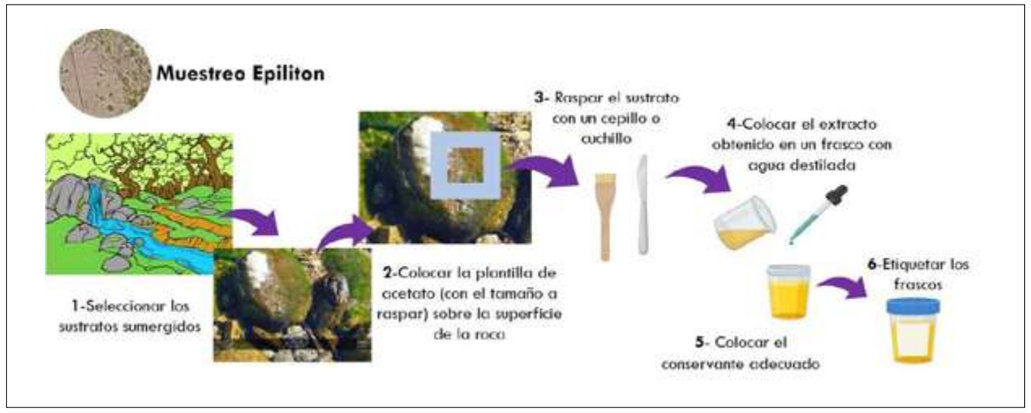


Figura 4: Pasos para el muestreo sobre rocas o guijarros. Fuente: María de los Ángeles Taboada

Macroalgas filamentosas

Se puede recoger una cantidad de ellas empleando pinzas. Luego, se deben colocar en un frasco con agua del sistema o agua destilada y fijar la muestra. En general, sobre estas macroalgas (algas verdes en su mayoría) tienden a desarrollarse diatomeas. El tratamiento será diferente si se quiere trabajar con todos los grupos algales o solo con diatomeas. Si se trabaja con todas las algas, la muestra se conservará con agua del sitio y se le agregará el fijador correspondiente. Si solo se emplean las diatomeas epífitas que se desarrollan sobre estas macroalgas, se debe conservar la muestra sin fijar, llevarla al laboratorio, proceder a lavados sucesivos con agua destilada y conservar el extracto. En caso de que, al observar al microscopio, luego de los lavados, aún persistan diatomeas adheridas, los talos pueden ser deshidratados en una estufa a 60° C durante 24 horas, o se pueden emplear técnicas de sonicado mencionadas más arriba.

Macrófitos emergentes

Considerar las partes que se encuentran sumergidas, pero que no correspondan a las secciones que estén afectadas por los sedimentos del fondo.

- Cortar las porciones por debajo del nivel del agua: se puede colocar una botella de plástico o vidrio boca abajo en la parte sumergida y cortar esa sección hasta la boca de la botella; girar la botella, que contendrá agua del sistema y la porción seccionada, y cerrar. Conservarla en frío y oscuridad

- En laboratorio se procederá al lavado y agitación de las porciones para extraer las microalgas.

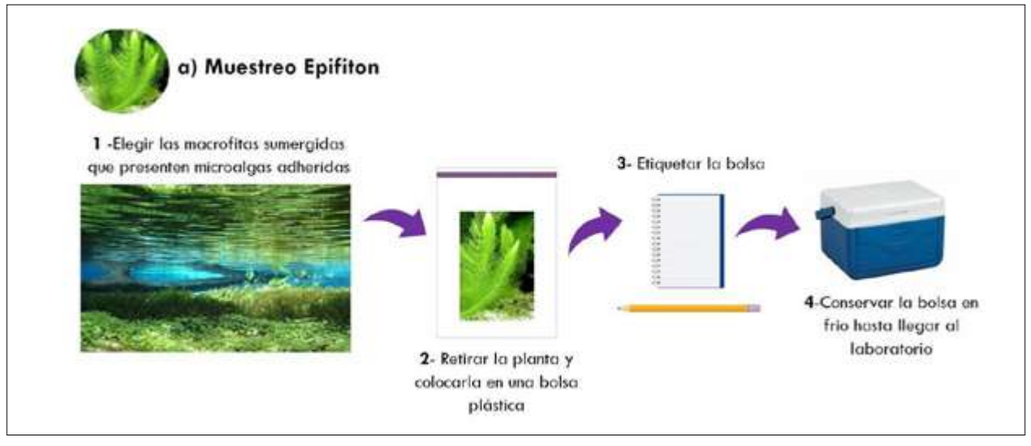


Figura 5: Pasos para el muestreo de epifiton en plantas sumergidas. Fuente: María de los Ángeles Taboada

- Conservar el extracto y fijar. (Fig. 5)

- En el caso de que se quiera medir la clorofila-a, separar un volumen conocido del extracto, no agregarle conservante y filtrarlo para la medición de la biomasa epifítica

En todos los casos que se muestrean algas del bentos o adheridas a sustratos sumergidos hay que evitar tomar muestras en:

- zonas sombreadas de los cursos de agua (a no ser que esta sea la característica distintiva del sitio a evaluar) y áreas debajo de puentes.

- zonas recientemente disturbadas (por dragados, canalizaciones, etc).

- zonas inundadas recientemente.

- pozas y zonas de escasa corriente en las que suele haber deposición de limos y de detritos; tampoco son recomendables las zonas de excesiva corriente (> 20 cm. seg^{-1}).

- áreas demasiado próximas a las orillas.

En la Figura 7 se resumen las comunidades de algas bentónicas que pueden ser muestreadas y la metodología de colecta de cada uno de ellos.

a. Índices taxonómicos empleando diatomeas

Los índices de calidad del agua se fundamentan en una puntuación que se da a cada especie en relación a las diferentes clases de calidad química del agua (CEMAGREF, 1982). El valor indicador de cada taxón se obtiene a partir de la información de las bases de datos existentes en distintas regiones del país. Así, para cada especie, se conoce su rango y su amplitud ecológica. Para asignar una puntuación determinada, se han considerado los parámetros físico-químicos más significativos en lo referente a perturbaciones que afectan a sistemas acuáticos (temperatura, pH, conductividad, oxígeno disuelto, DBO, DQO, nitrógeno total, amonio, nitritos, nitratos, fosfatos, cloruros, etc). Con estos datos, cada especie tiene asignada una probabilidad de encontrarse en un rango ecológico determinado. Esta información se categoriza para cada taxón y se obtiene así un factor de sensibilidad a la polución, que se relaciona con un valor indicador del taxón con de acuerdo a su respuesta respecto a la calidad del agua.

Índice de Polusensibilidad específica "IPS" (*Indice de Pollusensibilité Spécifique*, Cemagref 1982). Entre los numerosos índices europeos desarrollados para establecer la calidad del agua a partir de diatomeas, el "IPS" es uno de los más utilizados y ha sido considerado como el índice de referencia en la Directiva Marco del Agua de la Comunidad Europea. Fue diseñado considerando más de 5000 taxones a los que se le asignó un valor indicador; por la gran cantidad de información que reúne es ampliamente recomendado en esa región. Este índice fue diseñado para ríos europeos, frecuentemente empleado en programas de monitoreo y también ha sido aplicado en sistemas acuáticos de distintas regiones de

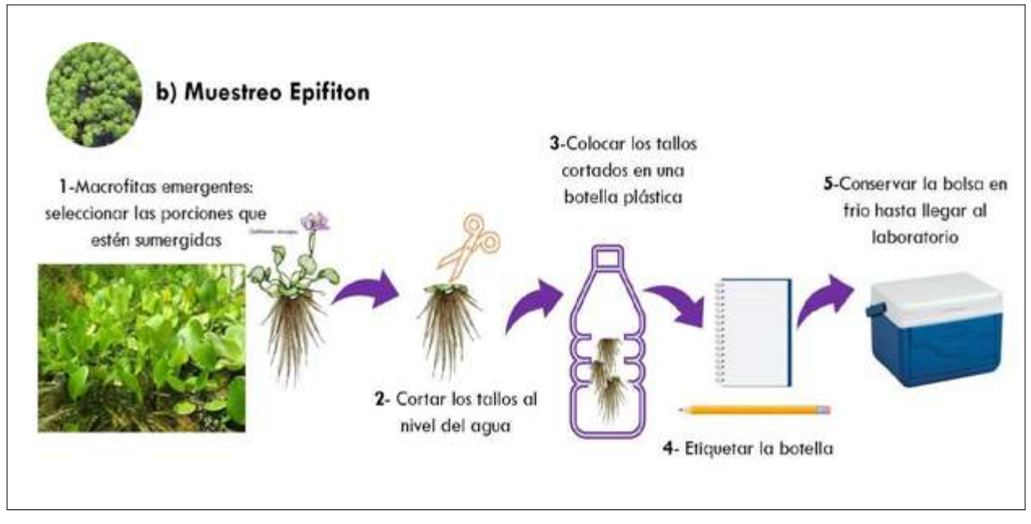


Figura 6: Pasos para realizar el muestreo de epifiton en plantas flotantes con raíces. Fuente: María de los Ángeles Taboada

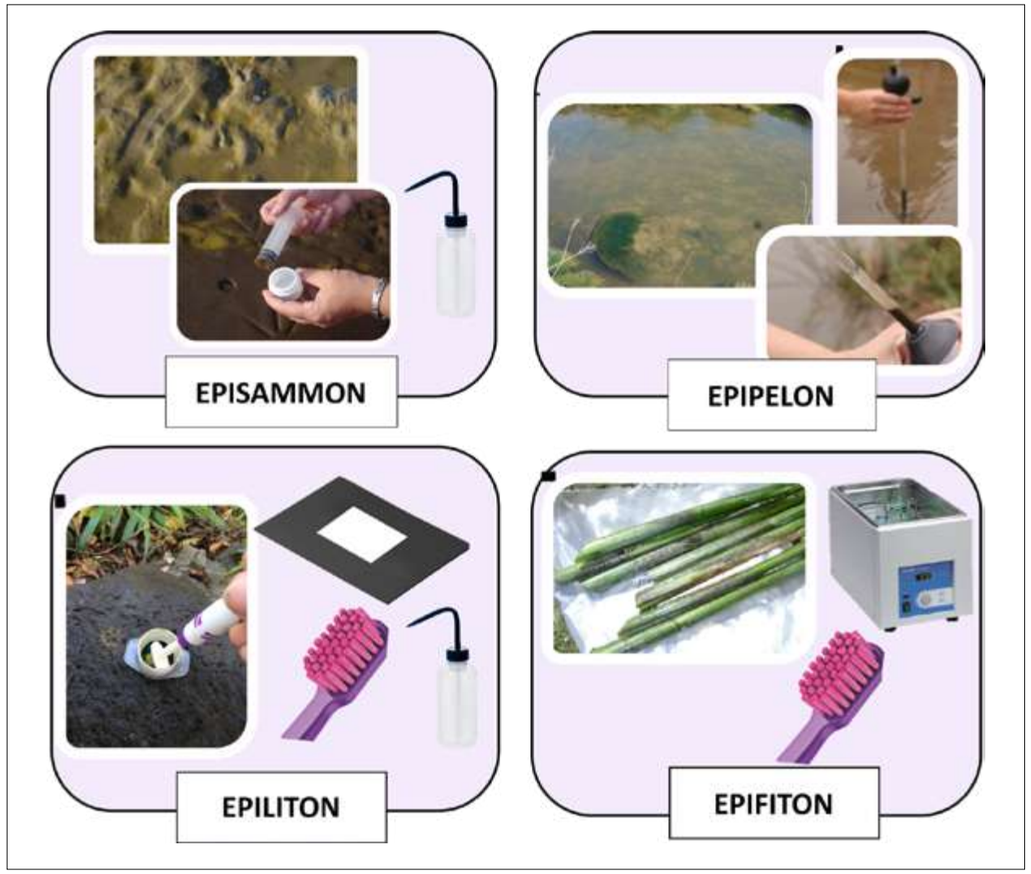


Figura 7: Resumen de métodos de colecta y separación de algas bentónicas. Fuente: Magdalena Licursi, Nora Gómez y Paula Huber

la Argentina. Ha mostrado diferentes grados de adecuación y sensibilidad en la evaluación de la calidad del agua.

El índice IPS se calcula sobre la base de las medias ponderadas de los valores de sensibilidad a la contaminación (Sj), valores de tolerancia a la contaminación (Vj) y la abundancia relativa de cada especie.

La fórmula para obtener el valor del índice es:

$$IPS = \frac{4{,}75 * Aj * Sj * Vj}{A\,i * V\,i} - 3{,}75$$

Dónde:

Aj = Abundancia relativa de la especie j
Sj = Valor de sensibilidad de la especie j
Vj = Valor de tolerancia de la especie j

El protocolo detallado para el cálculo e interpretación de este índice se puede obtener en el siguiente enlace: https://www.miteco.gob.es/es/agua/temas/estado-y-calidad-de-las-aguas/IPS-2013_24_05_2013_tcm30-175295.pdf

Existe un programa informático "OMNIDIA" (Lecointe *et al.*, 1993) que permite el manejo de los inventarios de las muestras de diatomeas y el cálculo de numerosos índices de calidad del agua, así como índices de riqueza y diversidad. Entre los índices de calidad del agua que este *software* permite calcular se encuentran el Índice de Polusensibilidad Específica (IPS), ya presentado en este protocolo, y el Índice de Diatomeas Pampeano (IDP) que se presenta a continuación:

Para la **ecoregión pampeana** se cuenta con el Indice IDP (Índice de Diatomeas Pampeano - Gómez & Licursi, 2001). Este índice ha sido diseñado para ríos y arroyos con sedimentos finos. Para su cálculo, se requiere conocer las abundancias relativas de las especies y el valor indicador de cada una de ellas (ver ANEXO I). Ha sido empleado, además de en la llanura pampeana argentina, en el sur de Brasil y algunas otras regiones de la Argentina. Para su aplicación por fuera de la zona para la cual fue diseñado, se requiere una validación.

Clases de calidad del agua	DBO5	NH4+– N	PO43- –P
0	≤ 3	≤ 0.1	≤ 0.05
I	> 3-8	> 0.1-0.5	> 0.05-0.1
II	> 8-15	> 0.5-0.9	> 0.1-0.5
III	> 15-25	> 0.9-2	> 0.5-1
IV	> 25	> 2	> 1

Tabla 1: Caracterización de las clases de calidad del agua basadas en NH_4^+– N, DBO_5 y PO_4^{3-} –P (mg l-1) como descriptores de la eutrofización y polución orgánica.

Índice de Diatomeas Pampeano (IDP) (Gómez & Licursi, 2001). El IDP fue diseñado con la finalidad de evaluar la eutrofización y polución orgánica de los ríos y arroyos del área pampeana. A cada taxón se le asignó un valor de sensibilidad a la polución con materia orgánica y eutrofización, teniendo en cuenta variables estrechamente relacionadas con estos procesos, como amonio, la demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5) y el fósforo reactivo soluble. Estas variables definieron 5 clases de calidad del agua (ver Tabla 1).

Para su cálculo se empleó la siguiente fórmula:

$$IDP = \frac{\sum_{j=1}^{n} Iidpj * Aj}{\sum_{j=1}^{n} Iidpj}$$

Donde:

I_{idp}: valor del IDP para la especie j
(fluctúa entre 0 y 4)
A_j: abundancia relativa de la especie j

Los valores del índice fluctúan entre 0 y 4. Se le asignan colores a las distintas calidades del agua para su identificación gráfica en mapas de calidad del agua y se las relaciona con las actividades antrópicas más frecuentes en el área de estudio (ver Tabla 2).

En el Anexo I se proporciona una planilla de Excel modelo que permite el cálculo del IDP.

Se presenta una planilla activada de Excel para el cálculo del Índice de Diatomeas Pampeano (IDP).

Se presenta el valor indicador para el IDP de las especies de diatomeas epipélicas más frecuentes en los sistemas lóticos pampeanos. Se lista el nombre del taxon, su acrónimo y, para los taxa que han cambiado su denominación, el nombre reciente y el nuevo acrónimo.

Índice de Diatomeas Pampeano. Adaptado para el NOA y Cuyo.
María de los Angeles Taboada y Liliana Moreno

El IDP fue diseñado con la finalidad de evaluar la eutrofización y polución orgánica de los ríos y arroyos del área pampeana, en Gómez & Licursi (2001), Licursi & Gómez (2003), pero también fue aplicado en el NOA (Taboada, 2017). A cada taxón se le asignó un valor de sensibilidad a la polución con materia orgánica y eutrofización, teniendo en cuenta variables estrechamente relacionadas con estos procesos, como amonio, la demanda bioquímica de oxígeno (DBO5) y el fosfato en sistemas lóticos del NOA. Estas variables definieron 5 clases de calidad del agua (ver Tabla 2 y ANEXO I).

El Índice de Diatomeas Pampeano (Modificado) ha sido empleado en el NOA y aplicado en dos arroyos: el Mista y el Calimayo. Varias de las especies y sus rangos fueron diferentes al índice aplicado en la Pampa. Estos cambios están detallados en:

Taboada M. de los Á. 2017. *Estudio de la Ficoflora como Bioindicadora del Estado Ecológico en Sistemas lóticos de Tucumán. Evaluación del Impacto Antrópico.* Tesis Doctoral, FCN e IML, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina. 272 pp.

Como los cambios solo se realizan en las especies, para su cálculo se utiliza el mismo algoritmo que en el IDP original.

Consignas para observar e identificar el material, claves generales o particulares (regionales) que puedan ser utilizadas. La identificación y recuento de las especies de diatomeas se realiza

Valor del IDP	Calidad del agua	Código de color	Características del agua	Grado de distrubio
0-0,5	Muy bueno		Sin polución, estado natural, pocos nutrientes y poco enriquecimiento orgánico	Mínimo: baja influencia humana
>0,5-1,5	Buena		Polución y eutrofización leve, bajos niveles de nutrientes y materia orgánica	Leve: ganadería extensiva y agricultura
>1,5-2	Aceptable		Polución y eutrofización moderada, altas concetraciones de nutrientes y materia orgánica	Moderado: actividad industrial y/o ganadería intensiva
>2-3	Mala		Polución y eutrofización fuerte, presencia de materia orgánica parcialmente degradada, nitrito, amonio y aminoácidos.	Fuerte: agricultura intensiva y ganadería, actividad industrial y densidad poblacional
>3-4	Muy mala		Polución y eutrofización muy fuerte, alta concetración de materia orgánica, predominio de procesos reductivos y presencia de productos industriales	Muy fuerte: actividad industrial intensiva y gran densidad poblacional

Tabla 2: Índice de Diatomeas Pampeano (IDP) y su relación con la calidad del agua y grado de disturbio antrópico. El código de color identifica las distintas calidades de agua en relación a la eutrofización y polución orgánica y se utiliza para su representación gráfica en mapas. (extraída de Licursi & Gómez, 2003).

con un microscopio óptico con el objetivo de 100X, añadiendo aceite de inmersión sobre el cubreobjetos y empleando un objetivo de contraste de fases para una mejor observación de la ornamentación de las diatomeas, necesarias para su identificación. Se hace el recuento de valvas enteras de diatomeas, en el caso de encontrar frústulos enteros se cuantificarán dos valvas. Se excluirán del recuento todas las valvas rotas. En todas las muestras se contabilizan aproximadamente 400 valvas. El conteo de las valvas se realiza por campos de visión y a lo largo de transectos.

Se coloca la preparación en la platina del microscopio y se anota la información que está en el portaobjetos en una hoja de recuentos. Se recomienda comenzar a contar en el margen de la muestra e identificar todas las valvas presentes en ese campo de visión utilizando el objetivo con aceite de inmersión. Si alguna valva no puede ser identificada en un primer momento, se recomienda tomar algún tiempo para: obtener fotografías o dibujos detallados. Tomar datos sobre la forma y dimensiones de la valva, densidad de estrías, forma del área central y detalles del rafe para que sea más fácil poder identificarla.

Una vez identificadas y contadas las valvas en el primer campo, nos iremos moviendo a lo largo de la muestra en un desplazamiento horizontal hasta el siguiente campo de visión hasta alcanzar las 400 valvas identificadas.

Al final del recuento, se retira la preparación de la platina y se limpia el aceite de inmersión del preparado, y los objetivos.

b. Índices no taxonómicos

Luciana Cibils Martina y Julieta del Rosario Lucero

Las especies identificadas se pueden caracterizar por sus rasgos funcionales, propuestos por Passy y Larson (2011) y Rimet y Bouchez (2012), y modificados por Cibils *et al.* (2015) para ríos de Córdoba. Estos rasgos biológicos están basados en la relación existente entre las estrategias y caracteres morfológicos de las algas que se encuentran en el epiliton o biofilm de rocas y su acceso a los recursos, y resistencia a las perturbaciones. Se los ha utilizado para evaluar el efecto perturbador de forestación en áreas serranas cuya vegetación natural es herbácea o arbustiva. Su utilización puede complementar la información provista por otros índices.

- **Tamaño:** Se considera el tamaño celular para asignar a las especies a una determinada clase de tamaño. Clasificado del 1 al 5, siendo las de clase 1 de menor biovolumen y las de clase 5 las de mayor. Las especies más pequeñas son, generalmente, las pioneras, tolerantes y aquellas que pueden colonizar un sustrato cuando el espacio es limitado. Mientras que, las especies de mayor tamaño poseen más requerimiento de nutrientes. Así se clasifican en: c1 taxones con biovolumen menor a 99 μm^3, c2 entre 100 y 299 μm^3, c3 entre 300 y 599 μm^3, c4 entre 600 y 1499 μm^3 y c5 mayores a 1500 μm^3. En el caso de especies cuyas células son de tamaño pequeño o intermedio, pero usualmente se encuentran formando cadenas de gran tamaño, se consideran de clase 5, por ejemplo: *Melosira varians*.

- **Gremio morfológico:** Clasificado en alto perfil, bajo perfil y móviles. Estos fueron definidos de acuerdo al acceso de los diferentes taxones a los recursos (luz y nutrientes) y a la susceptibilidad al arrastre, y desprendimiento por las perturbaciones (corriente y pastoreo). Aquellas algas que se elevan a muy poca altura del sustrato, sean inmóviles (adnatas, postradas, erectas y células solitarias, colonias pequeñas y cenobios) o diatomeas de movimiento lento, constituyen el gremio de bajo perfil. Las algas unicelulares, coloniales o filamentosas que se extienden a mayor altura sobre el sustrato conforman el gremio de alto perfil. Por último, las diatomeas birafidales de movimiento rápido o algas no diatomeas flageladas pertenecen al gremio móviles. Las especies que se asignan al gremio de bajo perfil son aquellas que están adaptadas a altas velocidades de corriente y baja concentración de recursos, contrariamente a lo que ocurre con las especies de alto perfil (que no resisten disturbios físicos, pero prefieren aguas ricas en nutrientes). Por otro lado, las algas móviles, dado que pueden moverse y seleccionar zonas con mejores condiciones, están libres de limitaciones por recursos y del estrés por los disturbios.

- **Requerimiento de recursos:** Este rasgo se clasifica en dos categorías (alto y bajo) y se define en función de la tolerancia o la sensibilidad de las especies a la falta de nutrientes y luz, que puede deberse a la baja disponibilidad ambiental o al sobrecrecimiento del biofilm. Los taxones que requieren elevadas concentraciones de recursos para el crecimiento y reproducción (mesoeutróficos a hipereutróficos) fueron considerados en la categoría altos requerimientos, mientras que los que pueden proliferar con bajos niveles de recursos (oligotróficos, mesotróficos e indiferentes) fueron considerados en la categoría bajos requerimientos.

- **Mecanismos de adhesión al sustrato:** Este rasgo determina la posición de las especies en el biofilm y la capacidad que tienen de resistir a los disturbios. Las categorías que se consideraron fueron: i) Adnatas: aquellas que se encuentran fuertemente adheridas al sustrato por su cara valvar (ej., *Cocconeis placentula*) o conectival (ej. *Eunotia* sp.). ii) Fijas por la base: producen mucílago en un polo que se adhiere al sustrato (ej. *Diatoma* sp., *Fragilaria* sp., *Ulnaria* sp.) iii) Con pedúnculos: las células producen un tracto mucilaginoso a través del campo poroso apical y esto se adhiere al sustrato; el pedúnculo puede ser simple (una célula) o puede enlazar varias células formando colonias arbusculares (ej., *Achnanthidium* sp., *Cymbella* sp., *Gomphonema* sp.). iv) Con células de fijación: filamentos adheridos por una célula inicial (ej. *Cladophora* sp., *Oedogonium* sp.). v) no adheridas: aquellas que no tienen ningún mecanismo especial para adherirse al sustrato porque flotan (ej. Diatomeas céntricas, cenobios, colonias y filamentos de cianobacterias, zygnematales) o porque se mueven libremente (ej., *Nitzschia* sp., *Navicula* sp., *Pinnularia* sp.).

- **Formas de vida:** Clasificadas en unicelular, colonial, cenobio, filamento. Este rasgo está relacionado con la arquitectura del biofilm, así es que no funciona de la misma manera una comunidad dominada por formas de vida unicelulares que una con mayor desarrollo de formas de vida filamentosas o coloniales. Las diatomeas que comúnmente forman cadenas o agregados arbusculares o en forma de roseta son asignadas a la categoría "colonia", aunque no formen verdaderas colonias.

Para obtener un índice a partir de los rasgos funcionales:

a) Asignar la categoría de cada rasgo correspondiente a cada especie o género. Si la identificación se realizó a nivel de género y hay variaciones entre las especies, elegir las categorías que mejor se ajusten a lo observado.

b) Sumar la densidad de todas las especies en cada categoría de cada rasgo para cada muestra.

c) Calcular las proporciones de cada categoría.

d) Calcular índices de diversidad funcional (Heino, 2005): índice de diversidad de Shannon-Wiener (DF), que describe tanto el número de grupos funcionales como la distribución de los individuos entre los grupos funcionales, y equitatividad funcional (EF), basado en el índice de Shannon-Wiener, que describe la distribución de los individuos entre los grupos funcionales.

e) Comparar entre sitios las proporciones de cada categoría y los índices de diversidad. En un sitio con altas concentraciones de nutrientes y baja velocidad de corriente es más común encontrar un predominio de especies móviles y de alto perfil, con altos requerimientos de recursos. Por otro lado, en ambientes con disturbios físicos o reducción de luz se observa un predominio de especies pequeñas, de bajo perfil (ej, Cibils *et al.*, 2015, Lucero, 2019). La mayor diversidad de rasgos funcionales está asociada a una mayor diversidad de estrategias de los organismos para obtener sus recursos y resistir los disturbios, por lo que un ambiente muy disturbado tendrá una menor diversidad funcional, con predominio de pocas especies resistentes.

Los rasgos funcionales propuestos fueron utilizados en arroyos de cabecera de las sierras de Córdoba forestados con pinos exóticos y en un río de llanura urbanizado. En los arroyos forestados se registró una menor diversidad funcional y, las categorías forma de vida unicelular y el gremio de alto perfil, fueron las que mejor respondieron al disturbio ocasionado por el cambio en la vegetación marginal (Cibils *et al.* 2015). Las comunidades de los arroyos forestados se mantuvieron estructuralmente simples, con mayor proporción de algas pequeñas y de bajo perfil, tolerantes a la menor intensidad lumínica, en comparación con los arroyos de pastizales (Cibils-Martina *et al.* 2017).

En el río Chocancharava, a la altura de la ciudad de Río Cuarto, los rasgos funcionales mostraron un predominio de especies de pequeño tamaño, de bajo perfil, unicelulares y que requieren altas concentraciones de nutrientes. En general, estas especies son pioneras, resistentes a las perturbaciones físicas y pueden colonizar rápidamente el sustrato, que en estos sitios es un sustrato arenoso, con gran inestabilidad y alto ingreso de nutrientes provenientes de la urbanización y la actividad agropecuaria. Los rasgos funcionales indicaron mejores condiciones en un sitio periurbano, dada la predominancia de especies que viven en condiciones de escasez de nutrientes, y en coincidencia a lo registrado con algunos índices taxonómicos utilizados. Los índices taxonómicos y no taxonómicos ofrecieron información complementaria, por lo que futuras herramientas de monitoreo deberían contemplar un enfoque basado en múltiples descriptores.

c. Particularidades para la región Patagonia

Cecilia Brand y Yanina Assef

Se recomienda realizar los muestreos de perifiton desde mediados a fines del verano. Esta temporada resulta adecuada, ya que coincide con las temperaturas más cálidas y un bajo caudal en los ríos y arroyos patagónicos. Sin embargo, la época y frecuencia de muestreo se deberán adecuar en función de los objetivos del estudio. Independientemente de la estación, se deben evitar los muestreos luego de lluvias intensas, ya que las comunidades se ven afectadas y pueden no reflejar las condiciones del entorno.

Muestreo de Didymosphenia geminata: en numerosos cursos de agua de la región patagónica se registra presencia de la diatomea *Didymosphenia geminata*. Esta especie exótica crece en ambientes muy pobres en nutrientes y suele no estar asociada a impacto antrópico, aunque si a su uso recreativo. Donde se establece, las muestras de perifiton alcanzan valores muy altos de peso seco y clorofila-*a*, por esto se sugiere evitar utilizar este indicador en lugares con floraciones de *D. geminata* evidentes o, por el contrario, utilizarlos en un monitoreo general para detectar posibles zonas de invasión (Fig. 1).

d. Muestreo

a) Selección del sitio de muestreo

En una etapa previa de gabinete se seleccionan los tramos del río/arroyo a evaluar. El sitio previamente seleccionado se puede redefinir en el campo cuando hay impedimento o dificultad de acceso al mismo.

El número de sitios a muestrear y su ubicación dependerá de la longitud del río objeto de estudio y del esfuerzo de muestreo necesario para responder al objetivo de trabajo planteado. La distancia entre sitios de muestreo no debería ser superior a 10 km para una red de monitoreo. Del mismo modo, deberá decidirse si se realizará una colecta de multi hábitat o por hábitat específico.

En ríos con alta productividad, se puede reducir el número de rocas raspadas que conforman una muestra, o bien usar un disco de menor superficie. Es importante que en la planilla de campo quede registrada la superficie colectada que conforma cada muestra. Se recomienda realizar este procedimiento 2-3 veces por tramo seleccionado, y luego los valores obtenidos serán promediados para los análisis posteriores.

b) Selección del tramo a muestrear

En arroyos, se sugiere elegir un tramo de 10-15 metros y, en ríos, un tramo de hasta 50 m que contenga la mayor cantidad de hábitats representados.

c) Extracción de muestras

El procedimiento para la obtención de muestras es el mismo para clorofila-*a* que para Peso Seco



Figura 1: Floraciones de *Didymosphenia geminata* en rocas (Chubut, Argentina).

Libre de Cenizas (PSLC). En cada tramo se seleccionarán tres rocas al azar por cada muestra. El tamaño de las rocas puede variar de acuerdo al tipo de sustrato predominante en el tramo, pero se buscará que sean de un tamaño intermedio entre 6 y 15 cm de diámetro.

En primer lugar, se debe enjuagar el frasco color caramelo dos o tres veces con agua de la corriente, luego se llena con agua del sitio a muestrear (cuidando que no entre barro o algún otro material) y se vuelca el contenido en la batea.

Se puede emplear una plantilla de acetato o de goma eva del tamaño previamente determinado (10 x 10 cm), o un disco de diámetro conocido. Se coloca sobre el sustrato y se procede a cepillar (o raspar con cuchillo) la superficie determinada. Se debe limpiar una zona aproximada de, como mínimo, 10 cm^2 por roca (20 cm^2 en caso de emplear 5 rocas). La superficie total de muestreo será de unos 100 cm^2. Luego, se coloca el disco de superficie conocida sobre la roca seleccionada; se sostienen ambos con una mano cerca de la superficie del agua corriente. Con la otra mano, se cepilla toda la superficie de la roca por fuera del disco, enjuagando periódicamente el cepillo en el agua del río. Una vez que nos aseguramos de quitar todo el perifiton que queda por fuera de la superficie delimitada por el disco (Fig. 2a), se raspa el contenido restante sobre la batea que contiene el agua del sitio, enjuagando el cepillo con esta misma agua para asegurarnos de que todo el contenido del perifiton quede en la batea (Fig. 2b). Este procedimiento se debe repetir en todas las rocas muestreadas. Luego, se vierte el contenido de la batea en el frasco color caramelo rotulado correctamente, se tapa y se guarda en la conservadora hasta su traslado al laboratorio.

d) Procedimiento de laboratorio

Filtrado: La muestra debe filtrarse dentro de las 24 horas.

Para la determinación del PSLC, previamente a la colecta, se deben secar los filtros a utilizar (65°C, 24 h) y pesar en balanza analítica. Se deben utilizar filtros de microfibra de vidrio que soporten las temperaturas de muflado. Los filtros deben individualizarse para luego conocer el peso previo al filtrado, para esto puede anotarse el peso en el sobre de aluminio en el que se guardan.

Se coloca un filtro de fibra de vidrio en un portafiltros adecuado, conectado a una bomba de vacío. Se filtra toda la muestra (el contenido completo del frasco color caramelo). Es importante agitar bien el contenido antes de volcarlo en el portafiltro para evitar que quede material en el fondo del envase.

Una vez que se ha filtrado todo el líquido, se remueve el filtro con cuidado, se dobla a la mitad con el contenido hacia adentro y se guarda en un sobre confeccionado con papel de aluminio correctamente rotulado. Los filtros pueden guardarse en el freezer hasta su análisis.

Determinación del Peso Seco Libre de Cenizas. Los filtros que contienen la muestra deben secarse en estufa por 24 horas a 65 °C o hasta peso constante (se pesa cada uno en balanza analítica para determinar el peso inicial (PI)). Luego, se quema el contenido orgánico en horno mufla a 405 °C, durante 4 horas. Una vez que el



Figura 2: a. Roca con el remanente de perifiton delimitado por el disco. b. Raspado de la muestra sobre la batea.

contenido se puede manipular, vuelven a pesarse en balanza analítica y, de esta forma, se obtiene el peso final (PF). La diferencia entre PI y PF corresponde al PSLC.

PSLC = PI - PF

Extracción de clorofila-*a* (Ver procedimiento de laboratorio) Clorofila-***a***.

Con el peso seco libre de cenizas y clorofila-*a* se han construido índices como el de Lakatos (1989) que fue desarrollado para lagos eutróficos pero que ha sido aplicado en la Argentina, particularmente en la región pampeana (Pizarro y Alemanni, 2005). El índice de Lakatos sirve para detectar situaciones de eutrofia a partir del estado de la comunidad perifítica, teniendo en cuenta el peso seco y el tipo de comunidad desarrollada de acuerdo a sus componentes autotróficas y heterotróficas.

En la Tabla 1 se detallan los parámetros empleados en el Indice de Lakatos.

Valores de referencia de biomasa perifítica. Teniendo en cuenta los valores de clorofila-*a* en ambientes patagónicos, se podrían categorizar los ríos según su concentración de clorofila perifítica (Tabla 1). Sin embargo, cabe aclarar que aún no están establecidos sistemáticamente los valores guías y solo se presenta una clasificación basada en datos publicados hasta el momento.

I	Biomasa elevada	> 4
II	Masa media	2-4
III	Masa Baja	< 2
Contenido de Cenizas		
I	Inorgánico	>75
II	Inorgánico - Orgánico	75-50
III	Orgánico - Inorgánico	50-25
IV	Orgánico	<25
Contenido de Clorofila-a		
I	Autotrófico	> 0,60
II	Autotrófico- Heterotrófico	0,60-0,25
III	Heterotrófico - Autotrófico	0,25-0,10
IV	Heterotrófico	<0,10

Tabla 1: Parámetros para el Indice de Lakatos (g/m2)

Índices no taxonómicos: rasgos morfológicos e Índice de Autotrofía (IA). Con los dos parámetros medidos anteriormente, se puede calcular el índice de autotrofía. Se utiliza para determinar el estado trófico de un ecosistema y distinguir la respuesta relativa del enriquecimiento orgánico e inorgánico (N y P). Se calcula como la relación entre el PSLC y la clorofila-*a*:

IA = PSLC (mg/cm^2) /clorofila-*a* (mg/cm^2)

Se ha observado que las muestras de perifiton que crecen en aguas relativamente libres de materia orgánica contienen aproximadamente entre 1-2% de clorofila-*a*. En cambio, aguas con alto contenido de materia orgánica pueden albergar grandes proporciones de ensambles de organismos heterótrofos y se obtienen IA más elevados.

De acuerdo a referencias bibliográficas de diferentes regiones del mundo, valores de IA entre 50 y 100 indican ausencia de contaminación. En el rango comprendido entre 100 y 200, se asume presencia de autótrofos. Los valores superiores a 200 son indicadores de que la comunidad está dominada por heterótrofos (Murdock *et al.*, 2013). Mientras que valores mayores a 400, indican que el detrito orgánico, junto con los heterótrofos, constituye la porción dominante de la comunidad (Wu 2017).

Si bien varían parcialmente los rangos propuestos por los autores en cada región, es claro que el índice es una medida rápida de aproximarse a la composición de la comunidad y que valores extremos indicarían contaminación orgánica o por nutrientes.

Rango	Descripción	Condición
≥5 µg/cm^2	Arroyos urbanos, alta carga de materia orgánica, nutrientes.	Mala condición
1 y 5 µg/cm^2	Prácticas agrícola-ganaderas semi-intensivas y extensivas. Urbanizaciones pequeñas.	Contaminación orgánica
0,4 y 1 µg/cm^2	Prácticas agropecuarias de menor intensidad, moderado incremento de nutrientes.	Bajo impacto
≤0,4 µg/cm^2	Arroyos oligotróficos, con bosque o vegetación ribereña en buen estado. Sin contaminación.	Condición de referencia

Tabla 1: Categorización aproximada de calidad del agual, de acuerdo a rangos de concentración de clorofila perifítica.

Bibliografía

Cibils Martina, L., R. E. Principe, J. A. Márquez, E. N. Gari, R. J. Albariño. 2015. Functional diversity of algal communities from headwater grassland streams: how does it change following afforestation? *Aquatic Ecology*, 49: 453-466.

Cibils-Martina L., R. E. Principe, J. A. Márquez, E. N. Gari, R. J. Albariño. 2017. Succession of algal communities in headwaters: a comparison of pine afforested and natural grassland streams. *Ecological Research*, 32: 423-434.

Gnesutta, L. 2018. *Evaluación de algas episámicas en el río Chocancharava: efectos de perturbaciones antrópicas.* Tesis de Grado. Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina. 67 pp.

Lucero, J. 2019. *Evaluación de la comunidad algal perifítica de la Reserva Provincial de Uso Múltiple Corredor del Chocancharava*. Tesis de Grado. Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina. 69 pp.

Región NOA

APHA AWWA & WEF. 2005. *Standard Methods for the examination of water and wastewater.* 21.st. ed. Washington, DC: American Public Health Association.

Barbe J., E. Lavergne, G. Rofes, M. Lascombe, J. Rivas, C. H. Bornard. 1990. Diagnose rapide des plans d'eau. Informations.*Techniques du CEMAGREF*, 79: 1-8.

Battarbee, E. W. 1986. Diatom Analysis. In: Berglund B. E. (ed.). *Handbook of Holocene Palaeoecology and Palaeohydrology.* New York: J. Wiley & Sons Ltd., pp. 527-570.

Domínguez, E., F. Romero, H. R. Fernández y M. G. Cuezzo. 2020. Aplicación de Indicadores Biológicos en el Noroeste Argentino: El caso de la cuenca Salí-Dulce. En: Dominguez, E, A. N. Giorgi y N. Gomez (Comp.). *La bioindicación en el monitoreo y evaluación de los sistemas fluviales de La Argentina: Bases para el análisis de la integridad ecológica.* Buenos Aires: Eudeba, pp. 56-80.

González, J. A. 2005. *Los ambientes naturales en áreas montañosas del Noroeste Argentino (NOA), su interrelación con países limítrofes, y su necesidad de protección, recuperación y conservación.* Serie conservación de la Naturaleza 15. Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina. 28 pp.

Graham, L. & L. Wilcox. 2009. Algae. Prentice Hall.

Licursi, M. y N. Gómez. 2003. Aplicación de índices bióticos en la evaluación de la calidad del agua en sistemas lóticos de la llanura pampeana Argentina a partir del empleo de diatomeas. *Biología Acuática,* 21: 31-49.

Morello J., S. D. Mateucci, A. F. Rodriguez y M. Silva. 2011. *Ecorregiones y complejos ecosistémicos argentinos.* Buenos Aires: Orientación Gráfica Editora S.R.L. 752 pp.

Nygaard G. 1949. Hydrobiological studies on some Danish ponds and lakes. II. The quotient hypothesis and some new or little known phytoplankton organisms. *Biol Skr Dan Vid Sel*, 7(1): 1-293.

Schworbel, J. 1975. *Métodos de Hidrobiología*. Madrid: H. Blume ediciones.

Taboada, M. de los A. 2017. *Estudio de la Ficoflora como Bioindicadora del Estado Ecológico en Sistemas Lóticos de Tucumán. Evaluación del Impacto Ántropico*. Tesis Doctoral. FCN e IML-Universidad Nacional de Tucumán. 272 pp.

Utermöhl, H. 1958. Zur Vervollkommung der Quantitativen Phytoplankton Methodik. Mitt. Int. Verein. *Limnol*. 9: 1-38.

Región NEA

Kruk, C., V. L. M. Huszar, E. T. H. M. Peeters, S. Bonilla, L. Costa, M. Lürling, C. S. Reynolds & M. Scheffer. 2010. A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton. *Freshwater Biology*, 55: 614–627.

Kruk C., M. Devercelli, V. L. Huszar; E. Hernández, G. Beamud, M. Díaz, L. H. Silva & A. Segura. 2017. Classification of Reynolds phytoplankton functional groups using individual traits and machine learning techniques. *Freshwater Biology*, 62(10): 1681-1692.

Kruk C., M. Devercelli, V. L. Huszar. 2021. Reynolds Functional Groups: a trait-based pathway 3 from patterns to predictions. *Hydrobiologia*, 848:113–129.

Región Cuyo

Gómez, N & M. Licursi. 2001. The Pampean Diatom Index (IDP) for assessment of rivers and streams in Argentina. *Aquatic Ecology*, 35: 173-181.

Licursi, M. y N. Gómez. 2003. Aplicación de índices bióticos en la evaluación de la calidad del agua en sistemas lóticos de la llanura pampeana argentina a partir del empleo de diatomeas. *Biología Acuática*, 21: 31-49.

Vallania, E. A., P. A. Garelis, E. S. Tripole. y M. A. Gil. 1996. Un Índice Biótico para sierras de San Luis (Argentina). *Rev. UNRC*, 16(2): 129-136.

Región Centro

Biggs, B. J. F. y C. Kilroy. 2000. *Stream Periphyton monitoring manual*. Christchurch, New Zealand: Publishers NIWA for the New Zealand Ministry for the Environment.

Cibils, L., R. Principe, J. Márquez, N. Gari y R. Albariño. 2015. Functional diversity of algal communities from headwater grassland streams: How does it change following afforestation? *Aquatic Ecology*, 49: 453–466.

Coste, M. 1986. *Les methodes microfloristiques d'evaluation de la qualite des euux*. Bordeaux: Cemagref. 25 pp + annexe.

Descy, J. P. 1979. A new approach to water quality estimation using diatom. Beih. *Nova Hedwigia*, 64: 305-323.

Gómez, N., J. C. Donato, A. Giorgi, H. Guasch, P. Mateo y S. Sabater. 2009. La biota de los ríos: los microorganismos autótrofos. En: Elosegi, A., S. Sabater (Eds.). *Conceptos y técnicas en ecología fluvial.* España: Fundación BBVA, pp. 219-242.

Gómez, N. & M. Licursi. 2001. The Pampean Diatom Index (IDP) for assessment of river and streams in Argentina. *Aquat. Ecol*., 35: 173–181.

Guiry, M. D. & G. M. Guiry. 2020. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. http://www.algaebase.org

Heino, J. 2005. Functional biodiversity of macroinvertebrate assemblages along major ecological gradients of boreal headwater streams. *Freshwater Biology*, 50: 1578–1587.

Komárek, J. 2013. Cyanoprokaryota 3. Teil: Heterocytous Genera. En: Büdel, B., G. Gärtner, L.Krienitz & M. Schagerl (Eds.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/3, Springer-Verlag*, Berlin: Heidelberg, 1130 pp., 1328 figs.

Komárek, J. & K. Anagnostidis. 1998. Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales. En: Ettl, H., G. Gärtner, H. Heynig & D. Mollenhauer (Eds.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1*, Gustav Fischer, Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm, 548 pp.

Komárek, J. & K. Anagnostidis. 2005. Cyanoprokaryota 2. Teil: Oscillatoriales. En: Büdel, B., L. Krienitz, G. Gärtner & M. Schagerl (Eds.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2*, Elsevier GmbH, München. 757 pp.

Lange-Bertalot, H. 2001. Diatoms of Europe. *Diatoms of the european inland waters and comparable habitats. Vol 2. Navicula sensu stricto, 10 Genera separated from Navicula sensu lato, Frustulia.* Gantner Verlag K.G., Germany, 526 pp., 140 plates.

Metzeltin, D. y H. Lange-Bertalot. 1998. *Tropoische Diatomeen in Südamerika I. 700 übermengen wenig bekannte oder neue Taxa repräsantativ als Elemente der neotropischen Flora.* Koeltz Scientific Books. 695 pp, 2515 figures on 220 plates..

Metzeltin, D., H. Lange-Bertalot & F. García-Rodriguez. 2005. Diatoms of Uruguay compared with other taxa from South America and elsewhere. A.R.G Gantner Verlag K.G. 736 pp, 3603 figures on 241 plates,

Passy, S. & C. A. Larson. 2011. Succession in stream biofilms is an environmentally driven gradient of stress tolerance. *Microb. Ecol*., 62: 414–424.

Patrick, R. & C. W. Reimer. 1966. The Diatoms of the United States exclusive of Alaska and Hawaii. Vol. 1. Acad. Nat. Sci. Philadelphia. *Monog*., 13: 1–688.

Patrick, R. & C. W. Reimer. 1975. The Diatoms of the United States exclusive of Alaska and Hawaii. Vol. 2. Acad. Nat. Sci. Philadelphia. *Monog*., 13: 1–213.

Rimet, F. y A. Bouchez. 2012. Life-forms, cell-sizes and ecological guilds of diatoms in European rivers. *Knowl. Manag. Aquat. Ec*., 406: 1–14.

Zelinka, M. y P. Marvan. 1961. Zur Prazisiemng der biologischen Klassifikation des Reinheit fliessender Gewasser. *Arch. Hydrobiol*. 57: 389–407.

Región Pampa

CEMAGREF 1982. *Etude des methods biologiques d'appréciation quantitative de la qualité des eaux.* Rapport Q.E. Lyon, Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse-Cemagref, Lyon, 218 pp.

Díaz C. y N. Maidana. 2004. *Diatomeas de los Salares de Atacama y Punta Negra, II Región, Chile.* Editor: Fernando Novoa, Manuel Contreras, Mario Parada & Andrés Camaño.

Gómez N. & M. Licursi. 2001. The Pampean Diatom Index (IDP) for assessment of rivers and streams in Argentina. *Aquatic Ecology*, 35: 173-181.