

Conceptos y técnicas en ecología fluvial

Edición a cargo de:

ARTURO ELOSEGI

Profesor titular de Ecología en la Universidad del País Vasco

SERGI SABATER

Catedrático de Ecología en la Universidad de Girona

Separata del capítulo 7

La química de las aguas. Los nutrientes

ANDREA BUTTURINI

SERGI SABATER

ANNA M. ROMANÍ

Primera edición: abril 2009

ISBN: 978-84-96515-87-1

© los autores, 2009

© de la edición en español, Fundación BBVA, 2009

La química de las aguas. Los nutrientes

ANDREA BUTTURINI, SERGI SABATER Y ANNA M. ROMANÍ

7.1. Introducción

La química de las aguas es un factor esencial en los ecosistemas fluviales. La composición del agua, en sus componentes mayoritarios y en componentes traza, refleja su origen y vías de transporte, además de determinar la composición y abundancia de las comunidades y el funcionamiento del ecosistema fluvial. Desde una perspectiva más aplicada, las características químicas limitan los usos a que se puede destinar el agua, y la contaminación de ríos y acuíferos es una de las principales preocupaciones ambientales de muchos gobiernos, además de una fuente de graves problemas de índole sanitario y social.

La ecología necesita analizar de forma detallada las dinámicas y transformaciones de los solutos para comprender las interacciones entre los organismos fluviales y su entorno químico. De aquí la relevancia de los estudios biogeoquímicos en ecología fluvial, como ya se ha mostrado en los capítulos 4 y 6. En el marco de la biogeoquímica, el carbono, nitrógeno y fósforo tienen un protagonismo destacado porque son elementos esenciales para la biota y porque la alteración de sus concentraciones como consecuencia de la actividad humana tiene unas implicaciones socioeconómicas y sanitarias que van más allá de las estrictamente ecológicas. Sin embargo, aunque este capítulo se centra en los nutrientes, no podemos olvidar que, en la naturaleza, el agua es una disolución extremadamente compleja, con infinidad de sustancias disueltas, muchas de las cuales pueden tener relevan-

cia biológica, ya sea por influir directamente en algunos organismos, por su toxicidad, por afectar a la solubilidad de otros compuestos, o simplemente por su efecto global en las relaciones osmóticas (Margalef 1983).

7.2. Las sustancias disueltas en el agua

Se dice a menudo que el agua es el disolvente universal, ya que es capaz de disolver tanto sustancias polares como apolares. Por ello, y dado que el ciclo hidrológico pone el agua en contacto con muy diversos sustratos (las rocas de los acuíferos, el mantillo del suelo, los compuestos orgánicos de los sedimentos...) y con organismos de todo tipo, el análisis exhaustivo de cualquier muestra de agua refleja un largo listado de sustancias inorgánicas, y otro habitualmente aún mayor de sustancias orgánicas disueltas. Ello hace imposible describir con exactitud la química de las aguas fluviales sobre la base de parámetros químicos como constantes de solubilidad, potencial redox o pH (Manahan 1994). Ante la imposibilidad de una caracterización total de ese tipo, el investigador en ecología fluvial se ve limitado a medir un determinado conjunto de variables que permitan una descripción somera del medio (por ejemplo, la conductividad eléctrica como reflejo de la cantidad total de sales disueltas), o que ofrezcan información de interés sobre algún aspecto parcial del ecosistema, como ocurre, por ejemplo, cuando se estudian ciertos contaminantes. Es habitual hacer la distinción entre elementos conservativos, cuyas concentraciones apenas se ven afectadas por la actividad biológica, y elementos no conservativos, básicamente los nutrientes de mayor relevancia biológica (macronutrientes).

Entre los gases disueltos en el agua, tienen especial importancia el oxígeno y el CO_2 . Además de determinar la posibilidad o no de presencia de innumerables organismos en las aguas, la concentración de oxígeno influye en la solubilidad de otras muchas sustancias, como hierro, manganeso o fósforo, y su disponibilidad es fundamental en la regulación de solutos como el amonio y el nitrato. El dióxido de carbono disuelto en el agua forma ácido carbónico, que tiene un papel fundamental en la disolución de las rocas. Además, el ácido carbónico puede perder protones y formar iones bicarbonato y carbonato. Estos dos ácidos débiles conforman el sistema carbónico-carbonato, que controla la alcalinidad de las aguas continentales, es decir, la capacidad de tamponar el pH ante la llegada de protones al medio.

El metal más abundante
en aguas fluviales es el
calcio

Las aguas fluviales incorporan numerosos elementos disueltos del grupo de los metales, que normalmente aparecen ligados a otras especies químicas (por ejemplo, como hidróxidos, o quelados a compuestos orgánicos), y no como cationes aislados. El metal más abundante es habitualmente el calcio, que proviene, entre otros, de la disolución de rocas carbonatadas y determina (junto con el magnesio) la dureza del agua. El calcio es un componente en los esqueletos de numerosos organismos acuá-

tos, por lo que su concentración es una variable química de interés biológico. Otros metales, como el magnesio, aluminio o el hierro, son micronutrientes necesarios para los organismos, pero en condiciones ácidas su solubilidad aumenta de forma que pueden producir efectos tóxicos. El sodio y el potasio son nutrientes de gran importancia, pero que rara vez son limitantes en ríos. Entre los metaloides, el silicio (habitualmente en forma de silicato) es uno de los elementos más abundantes, y se halla asociado a sustratos silicatados, como areniscas. Su relevancia biológica es significativa para grupos específicos, como las algas diatomeas. Entre los no metales cabe destacar el nitrógeno y fósforo, importantes macronutrientes que trataremos más adelante, el cloro, que habitualmente forma ion cloruro, o el azufre, que en condiciones anaeróbicas da lugar a interesantes rutas metabólicas.

Aparte de las sustancias inorgánicas que hemos mencionado, en las aguas fluviales se encuentra gran número de sustancias orgánicas disueltas. El más importante es el carbono orgánico disuelto, que incluye moléculas muy diversas en cuanto a su peso molecular y biodisponibilidad: glucosa, celulosa, hemicelulosa... También otras moléculas de lípidos, fosfolípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Las sustancias orgánicas fluviales muestran un amplio espectro, desde compuestos simples, como aminoácidos o azúcares sencillos, a polímeros complejos como algunas sustancias húmicas, o incluso a sustancias coloidales, en la frontera entre la materia disuelta y la particulada. Algunas de estas sustancias son liberadas directamente de los seres vivos como, por ejemplo, por lavado de hojarasca o por excreción extracelular del fitoplancton, otras se forman en complejas reacciones a partir de precursores más sencillos. Otras muchas provienen directamente de la lisis celular.

Además, un gran número de materiales orgánicos sintéticos llega a las aguas fluviales como resultado de la acción humana. Su diversidad va aumentando conforme las nuevas sustancias sintéticas creadas por la actividad del hombre van siendo utilizadas y vertidas al medio ambiente, lo que hace de las aguas continentales un cóctel de creciente complejidad. Algunas sustancias orgánicas tienen importantes efectos biológicos a concentraciones muy bajas, del orden de partes por trillón o incluso inferiores. Un aspecto que está causando preocupación es la disrupción hormonal, o efecto de sustancias que actúan como hormonas al ser absorbidas. Por ejemplo, la concentración de estrógenos humanos en aguas fluviales cercanas a las grandes ciudades se está convirtiendo en un problema de enorme trascendencia (Petrovic et al. 2002). Igualmente preocupante es la presencia de plaguicidas, sobre todo como el DDT, de larga persistencia y cuya concentración aumenta a lo largo de las redes tróficas por bioacumulación.

La concentración de estrógenos humanos en aguas fluviales cercanas a las grandes ciudades se está convirtiendo en un problema de enorme trascendencia

Las propiedades químicas del agua de los ríos son altamente variables. Ejemplos de la diversidad de la composición química de diferentes sistemas continentales naturales pueden hallarse en numerosos libros y artículos (Drever 1997, Van der

Leeden et al. 1991, Meybeck 1987, Gaillardet et al. 1999). La presencia y abundancia de un soluto en un determinado río y momento depende de complejas interacciones entre condicionantes. Entre ellas se pueden indicar el conjunto de propiedades litológicas y geográficas de la cuenca de drenaje, su régimen climático e hidrológico, la actividad biótica tanto en la cuenca como en el cauce fluvial y, finalmente, las complejas interacciones entre los mismos solutos.

La principal fuente de solutos en las aguas fluviales es el sustrato litológico por el que fluye el agua antes de entrar en el cauce. La litología de la cuenca influye en la concentración de SiO_2^- , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , CO_3^{2-} , HCO_3^- , SO_4^{2-} , Cl^- , y en el grado de acidez, alcalinidad y fuerza iónica de las aguas. Por ello, las características químicas de las aguas difieren mucho entre cuencas, mostrando algunos ríos tipos de agua muy especiales y valores extremos en variables químicas (Margalef 1983). El agua almacenada en acuíferos profundos está en condiciones de baja temperatura y elevada presión, condiciones en las que aumenta su capacidad de disolver carbonatos. Al manar por las fuentes, su temperatura y presión se equilibran con las exteriores, lo que implica cambios en la carga disuelta, por ejemplo, precipitación de carbonatos en los arroyos travertínicos. En su transporte longitudinal, el agua entra en contacto durante tiempos variables con los sedimentos fluviales y/o estructuras físicas que ralentizan su movimiento y activan reacciones de oxidorreducción en presencia de materia orgánica. Además, se producen complejas reacciones de intercambio iónico con los sedimentos, especialmente en el caso de arcillas, cuya gran relación superficie-volumen las hace especialmente activas.

El clima es un factor importante en la definición del quimismo de las aguas circulantes. La temperatura regula, entre otras cosas, la solubilidad de O_2 y CO_2 en el agua y acelera la disolución de minerales. La evaporación concentra las sales minerales en el agua restante. La lluvia es ligeramente ácida, por lo que en escalas de tiempo geológicas contribuye a disolver y erosionar el sustrato litológico. A más acidez, más disolución de minerales. Se especula que cambios en la acidez de la lluvia pueden alterar incluso la movilización de la *materia orgánica disuelta* (MOD). A menor acidez menor MOD en las aguas continentales. En zonas costeras, la influencia marina se manifiesta con la llegada de lluvias y aguas fluviales ricas en Cl^- y Na^+ .

7.3. Variaciones en el quimismo de los ríos

Los cambios hidrológicos tanto estacionales (sequías, deshielos) como repentinos (crecidas) determinan unos cambios biogeoquímicos que pueden aportar información sobre el funcionamiento del sistema fluvial y sus interacciones con la cuenca. Así, en una cuenca forestada, durante las crecidas los aportes terrígenos en el agua de escorrentía causan incrementos en las concentraciones de MOD y

de nitratos, mientras que el pH y la concentración de sales minerales pueden disminuir bruscamente. Por otro lado, durante las sequías la concentración de sales, MOD y amonio puede dispararse, mientras que el oxígeno y nitrato pueden desaparecer por actividad microbiana.

La actividad biótica tanto en la cuenca como en el cauce fluvial modula la disponibilidad de carbono, nitrógeno, fósforo y otros elementos. Por ejemplo, cambios de usos del territorio, a raíz de la actividad humana, pueden inducir cambios en la concentración de HCO_3^- en los freáticos y aguas de escorrentía, y las actividades fotosintéticas y de respiración influyen en la concentración de oxígeno, del carbono inorgánico disuelto (y por tanto en la alcalinidad) y del pH.


















En este capítulo nos proponemos describir las principales técnicas de recogida y preservación de muestras de aguas fluviales, así como algunas de las técnicas analíticas básicas más utilizadas en su caracterización. El conjunto de técnicas que aparece a continuación se centra en las analíticas del carbono, nitrógeno y fósforo, tanto inorgánicos como orgánicos (cuadro 7.1). Hemos creído conveniente incluir algunas técnicas específicas básicas relativas a la caracterización tanto cuantitativa como cualitativa de la MOD, porque el acrónimo MOD integra una compleja mezcla de compuestos húmicos (ácidos húmicos y fúlvicos y otras moléculas no totalmente caracterizadas) y no húmicos (sustancias grasas, carbohidratos, polisacáridos, aminoácidos, proteínas y resinas) de diferentes tamaños y composiciones, que refleja sus diferentes orígenes y disponibilidad para los microorganismos. En consecuencia, en muchas ocasiones interesa conocer no solamente el contenido de carbono, nitrógeno y fósforo orgánico disueltos (COD, NOD y POD, respectivamente) sino su calidad, que puede aportar información muy valiosa en lo que se refiere a los procesos de descomposición y transformación del material orgánico.

Las características químicas de las aguas y la biota se influyen mutuamente

Elemento	Soluto	Método	Referencia	
Carbono	Orgánico	MOD	Carbono orgánico disuelto biodegradable Índice de fluorescencia	Servais et al. 1989 McKnight et al. 2001
	Inorgánico	CID	Viraje de un indicador de pH Método de Gran	Mackereth et al. 1978
Nitrógeno	Total	NTD	Método de la oxidación	Adaptado de Koroleff 1983
	Inorgánico	NO_2^-	Método de la sulfanilamida	Mackereth et al. 1978
		NH_4^+	Método del salicilato	Reardon et al. 1966.
		NO_3^-	Método de la reducción a nitrito	Adaptado de Mackereth et al. 1978
Fósforo	Total	PTD	Método de la oxidación	Adaptado de Koroleff 1983
	Inorgánico	PRS	Método del molibdato	Murphy y Riley 1962

Cuadro 7.1:
Lista de los solutos y métodos analíticos descritos en este capítulo

Cuadro 7.2:
Peligrosidad específica de los reactivos utilizados en este capítulo.

Sustancia	Nivel de peligrosidad		
Cd			
NaNO ₂			
H ₂ SO ₄ ; HCl; NaOH			
C ₃ Cl ₂ N ₃ NaO ₃ ·2H ₂ O; CuSO ₄ ; C ₄ H ₄ O ₇ SbK			
HgCl ₂ ; NaN ₃			
K ₂ O ₈ S ₂			
NH ₄ Cl; C ₁₂ H ₁₆ Cl ₂ N ₂			
KNO ₃			

Nota: Los demás reactivos descritos en los diferentes métodos no mencionados en esta lista no constituyen un peligro ni para el analista ni para el medio ambiente.

Las técnicas que se describen no pretenden abarcar el universo de la química analítica. Este capítulo es un texto introductorio a la química analítica aplicada a la biogeoquímica fluvial, y un primer paso hacia textos más específicos (véanse referencias bibliográficas). Asimismo, no se mencionan las técnicas de medida rutinarias, de campo o laboratorio mediante aparatos específicos (como oxígeno, pH y conductividad), ya que sus detalles técnicos varían de uno u otro aparato. Hemos intentado describir técnicas analíticas que no precisen instrumentación sofisticada y costosa, aunque sí es necesario un laboratorio equipado con el material básico, que para algunas técnicas requerirá de campana extractora, espectrofotómetro, fluorímetro y analizador de carbono orgánico disuelto (COD). Por último, se recomienda a los que deban efectuar los análisis que consideren las medidas de seguridad adecuadas para el analista y para el medio ambiente (cuadro 7.2).

7.4. Muestreo, almacenamiento y conservación de las muestras

Es esencial tomar y almacenar las muestras de manera adecuada

Para gran parte de los análisis, las muestras pueden almacenarse en botellas de polietileno. Son botellas ligeras que no se rompen fácilmente y bastante inertes (a excepción del fosfato), resultando así particularmente apropiadas para la recolección de muestras in situ. Se puede optar por envases más inertes como el cuarzo o el borosilicato, pero son más caros. Aunque dichos materiales son imprescindibles si el interés se centra en el fosfato (para utilizar botellas de polietileno, véase Mackereth et al. 1978).

Las botellas necesitan un mínimo de mantenimiento para limitar al máximo los problemas de contaminación. Hay que limpiar las botellas nuevas con ácido (por ejemplo, una solución al 10% de HCl). Antes de recoger la muestra es indispensable limpiar las botellas unas cuantas veces en el campo con la misma agua que se quiere muestrear. Si se muestrean de forma repetida ríos con marcadas dife-

rencias químicas, es aconsejable utilizar siempre las mismas botellas para cada sitio y evitar así una contaminación cruzada. El último paso consiste en eliminar las partículas en suspensión (orgánicas o inorgánicas y vivas o muertas) que pueden alterar las características químicas de las muestras antes de llegar al laboratorio. En consecuencia, si las condiciones lo permiten, es muy recomendable filtrar inmediatamente las muestras en el campo. Se pueden recoger las muestras con una jeringa equipada con un portafiltros y verter la muestra filtrada directamente en la botella. Si se necesita un volumen importante, la filtración se puede ejecutar mediante bombas peristálticas de campo (existen modelos comercializados alimentados con batería de 12 V). Si no pudiese realizarse in situ, la filtración se debe efectuar lo más rápidamente posible en el laboratorio.

La filtración es un paso fundamental en la fase de muestreo y almacenamiento de las muestras. Se utilizan mucho los filtros de fibra de vidrio (por ejemplo los GF/F de Whatman). Aunque tienen una porosidad no totalmente definida ($\sim 0,7 \mu\text{m}$) y pueden dejar pasar bacterias, poseen numerosas ventajas porque son inertes, permiten una filtración bastante rápida y se pueden calcinar previamente en una mufla a $450 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 4 horas para eliminar trazas de sustancias orgánicas. Si se necesita eliminar totalmente las bacterias del agua, los filtros de nailon de porosidad $0,2 \mu\text{m}$ representan una solución válida, aunque no son totalmente inertes. Para filtrar en el campo se aconseja utilizar filtros de 47 mm de diámetro, ya que se colmatan más lentamente que los de 25 mm. Además, son muy útiles los portafiltros transparentes que permitan ver el estado del filtro durante el proceso. Es fundamental manipular siempre los filtros con pinzas. Los filtros de fibra de vidrio calcinados se envuelven previamente en papel de plata para facilitar su transporte e impedir su contaminación.

Las muestras se deben filtrar, a ser posible en el campo

Una vez filtradas, las muestras están listas para su análisis y se pueden almacenar unas horas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Si por cuestiones logísticas la analítica no puede llevarse a cabo inmediatamente, es indispensable preservar las muestras. No existe una técnica universal de conservación de muestras que sea efectiva para todos los solutos. Además, añadir algún conservante químico implica manipular las muestras (abrir y cerrar botellas y utilizar pipetas) y aumentar así los riesgos de una contaminación imprevista. Seguramente la técnica de conservación menos agresiva es la congelación, siempre y cuando no interese cuantificar gases, *carbono inorgánico disuelto* (CID), pH, fósforo y calcio (Mackereth et al. 1978). Acidificar las muestras hasta $\text{pH} = 2$ es también otra solución parcial y obligatoria para la analítica del COD. Inevitablemente, el uso de un ácido impide siempre la ejecución de algún tipo de analítica. Por ejemplo, acidificar las muestras con ácido nítrico o clorhídrico altera las concentraciones de nitrógeno y cloro respectivamente. Además cualquier tipo de acidificación impide la analítica del CID. Para conservar la materia orgánica disuelta y evitar el crecimiento bacteriano se utilizan el cloruro de mercurio (HgCl_2) o la azida de sodio (NaN_3), pero el mercurio es un elemento altamente

Las muestras que no se pueden analizar inmediatamente deben ser preservadas

tóxico y los residuos líquidos que contienen trazas de este elemento necesitan un tratamiento especial. La azida también es muy tóxica, puede traspasar la piel y contamina las muestras de nitrógeno y sodio.

7.5. Material de laboratorio indispensable

El cuadro 7.3 detalla el material de laboratorio, tanto inventariable como fungible, indispensable para la ejecución de las técnicas descritas en este capítulo. En el cuadro se especifican cubetas de diferente longitud para las lecturas con el espectrofotómetro y el fluorímetro. La longitud de las cubetas puede variar dependiendo de

Cuadro 7.3:
Material de laboratorio necesario para el desarrollo de las técnicas analíticas descritas

Material de laboratorio	Técnicas							
	CID	MOD	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NTD	PRS	PTD
Espectrofotómetro		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Fluorímetro		✓						
Analizador de COD		✓						
Campana extractora							✓	✓
Horno-mufla		✓						
Autoclave						✓		✓
pH-metro	✓							
Cubetas de cuarzo (1, 5 o 10 cm)		✓				✓		
Cubetas de vidrio (1, 5 o 10 cm)			✓	✓	✓		✓	✓
Agitador magnético	✓							
Estufa	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Balanza de precisión	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓
Dispensador de precisión	✓							
Micropipetas (0,1-10 mL)		✓		✓	✓	✓	✓	✓
Pipetas repetidoras (1-10 mL)		✓		✓	✓	✓	✓	✓
Erlenmeyer de 100 mL	✓							
Matraces aforados (1000, 100, 50 y 25 mL)		✓		✓	✓	✓	✓	✓
Frascos de Pyrex de 250 mL		✓						
Frascos de vidrio ámbar (100-1000 mL)	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓
Botellas de polietileno (1000 mL)							✓	✓
Bureta de vidrio de 50 mL					✓			
Tubos (con tapones) de teflón + cinta de teflón						✓		✓
Viales de vidrio de 25 mL		✓	✓	✓	✓		✓	✓
Cuentagotas de vidrio	✓							
Espátula					✓			
Filtros Whatman GF/F	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Filtros de nailon de 0,2 mm de poro		✓						
Pinzas	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

PRS: fósforo reactivo soluble.

las concentraciones esperadas. Para concentraciones bajas utilizar cubetas de 10 cm. En el caso del COD, la cubeta de 1 cm de cuarzo suele ser suficiente. Las pipetas automáticas se pueden sustituir por pipetas normales, aunque ello redundaría en una menor cantidad de muestras analizadas por unidad de tiempo. La campana extractora es indispensable durante la fase de preparación de un reactivo de la analítica del fósforo reactivo soluble (PRS), que desprende vapores durante su elaboración.

Técnica 9. Determinación del carbono inorgánico disuelto (CID)

En las aguas naturales, la forma predominante de CID es el ion carbonato ácido (ion bicarbonato). Este soluto es un ácido débil que viene hidrolizado en el agua con la consecuente producción de iones hidróxido y el incremento de pH. La concentración de iones carbonato ácidos se puede estimar mediante un proceso de titulación con un ácido de concentración conocida que sustrae los iones hidróxidos y transforma el ion carbonato ácido en ácido carbónico o anhídrido carbónico disuelto. Esto se verifica a un pH de 4,5. La cantidad de ácido que se necesita añadir a la muestra para llegar a este pH se corresponde, aproximadamente, con los equivalentes de carbonato ácido que contenía la muestra antes de empezar la titulación. En definitiva, mediante la titulación con el ácido se mide la alcalinidad en equivalentes de la muestra, aunque a la alcalinidad del agua pueden contribuir otros ácidos débiles, además de los bicarbonatos, como ácidos orgánicos, silicatos y fosfatos.

El carbono inorgánico es un importante nutriente para las plantas, además de tamponar el pH de las aguas

En este apartado se ilustran dos técnicas de medida de la alcalinidad de una muestra: mediante el viraje de un indicador de pH = 4,5 (el verde de bromocresol) y mediante el método de Gran. El primer método es muy apropiado para estimar la alcalinidad en el campo, mientras que el segundo es más preciso, e indicado para aguas de baja alcalinidad y/o alto contenido en materia orgánica.

Técnica 9a. Viraje de indicador de pH (Mackereth et al. 1978)

PROCESADO DE LAS MUESTRAS

1. Verter 80 mL de muestra filtrada en un matraz Erlenmeyer de 100 mL al que se le introduce un agitador magnético a la mínima velocidad del aparato.
2. Añadir 4-5 gotas de solución de verde de bromocresol (indicador de pH = 4,5) con un cuentagotas. La muestra adquiere un color azul-verdoso.
3. Empezar la titulación añadiendo, poco a poco, y mediante un dispensador de precisión una solución de H_2SO_4 0,02 N hasta que el color de la muestra pase a ser rosa pálido. El cambio de color indica que el pH de la solución ha llegado a 4,5. Apuntar el volumen de ácido utilizado.

4. Calcular la alcalinidad (*Alk*) de la muestra en meq/L mediante la siguiente fórmula:

$$CID \approx Alk = \frac{V_A \cdot N_A}{V_M} 1000 \quad (7.1)$$

donde V_A : volumen de ácido utilizado durante la titulación (mL), N_A : normalidad del ácido, y V_M : volumen inicial de la muestra.

MATERIAL NECESARIO

Véase el cuadro 7.2.

- El matraz de Erlenmeyer de 100 mL es adecuado para poder agitar la muestra sin que el líquido vierta al exterior.
- La solución de H_2SO_4 se coloca en un frasco de vidrio de 1000 mL con un dispensador de precisión que indica el volumen de ácido añadido.
- La botella de vidrio de unos 200 mL se necesita para el indicador verde de bromocresol.

Reactivos necesarios

- Solución de 1 L de H_2SO_4 0,02 N (guardada en botella de vidrio).
- Agua desionizada.
- Indicador de color a pH = 4,5. Se puede utilizar el indicador de verde de bromocresol sal de sodio ($C_{21}H_{13}O_5Br_4SNa$). Diluir 100 mg de bromocresol en 100 mL de agua destilada.

Es importante estimar la normalidad exacta del ácido antes de valorar las muestras. La estandarización del ácido se establece midiendo la alcalinidad de una solución de normalidad conocida siguiendo los pasos descritos anteriormente. La normalidad del ácido (N_A , en meq/L) se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$N_A = \frac{V_{SA} \cdot N_{SA}}{V_A} 1000 \quad (7.2)$$

donde V_{SA} : volumen de la solución alcalina (mL), N_{SA} : normalidad de la solución alcalina, y V_A : volumen del ácido utilizado durante la titulación (mL).

Técnica 9b. Método de Gran (Mackereth et al. 1978)

En este método la muestra se acidifica hasta un pH $\leq 3,5$; se necesita disponer de un pH-metro y un dispensador muy precisos.

PROCESADO DE LAS MUESTRAS

1. Verter 80 mL de muestra filtrada en un matraz de Erlenmeyer de 100 mL al que se le introduce un agitador magnético a la mínima velocidad del aparato. Colocar el pH-metro dentro de la muestra.
2. Añadir el ácido previamente estandarizado hasta llegar a un pH de 4,3, y anotar el volumen de ácido utilizado.
3. Añadir dos gotas más de ácido y apuntar el valor de pH de la muestra y el volumen del ácido utilizado.
4. Repetir el paso anterior de cinco a siete veces hasta llegar a un pH de 3,5.
5. Del conjunto de datos de pH y de volumen de ácido añadido (V_A , en mL) se calcula el valor F mediante la siguiente fórmula:

$$F = [\text{anti log}(5 - pH)](V_M - V_A) \quad (7.3)$$

donde V_M : volumen inicial de la muestra (mL), y V_A : volumen de ácido utilizado en la titulación (mL).

6. Representar la recta que relaciona el valor F (eje y) con el volumen de ácido añadido (eje x) y calcular el valor de V_A cuando $F = 0$.
7. Calcular la alcalinidad mediante la ecuación 7.1 y utilizar en la fórmula el valor de V_A estimado en el paso anterior.

MATERIAL NECESARIO

Véase el cuadro 7.2. La solución de H_2SO_4 se coloca en un frasco de vidrio de 1000 mL con un dispensador de precisión que indica el volumen de ácido añadido. Es fundamental utilizar un pH-metro bien calibrado y sensible a los cambios de pH bajos.

Reactivos necesarios

- Agua desionizada.
- Solución de 1000 mL de H_2SO_4 0,02 N, dispuesta en botella vidrio.

Técnica 10. Materia orgánica disuelta (MOD)

En muchos estudios biogeoquímicos y microbiológicos es preciso analizar una cantidad muy elevada de muestras, para lo que puede ser interesante disponer de técnicas que indiquen la calidad de la MOD sin requerir grandes equipos analíticos. A continuación se describen dos técnicas con esta finalidad: el análisis del *carbono orgánico disuelto biodegradable* (CODB) y el análisis del índice de fluorescencia.

Una parte importante de la materia orgánica disuelta consiste en formas refractarias, de escasa utilidad para los descomponedores

Técnica 10a. Carbono orgánico disuelto biodegradable (CODB) (Servais et al. 1989)

Este análisis consiste en un pequeño bioensayo de laboratorio que permite cuantificar el consumo de carbono orgánico disuelto (COD) mediante una incubación de las muestras durante 28 días. Para su desarrollo es preciso disponer de un analizador de COD. Este bioensayo debe realizarse en cuanto sea posible, con las muestras frescas y transportadas a 4 °C para evitar cualquier proceso de degradación microbiana de la materia orgánica previa al análisis. Se recomienda analizar cinco réplicas de cada muestra, ya que es fácil que aparezca alguna contaminada.

PROCESADO DE LAS MUESTRAS

1. Filtrar la muestra mediante filtros Whatman GF/F previamente muflados y luego por filtros de 0,2 μm de poro (por ejemplo, de nailon). Así se eliminan las partículas y la mayor parte de bacterias.
2. Verter 200 mL de muestra filtrada por 0,2 μm en un frasco de vidrio Pyrex de 250 mL previamente muflado (4 horas a 450 °C).
3. Añadir en el frasco 2 mL de muestra filtrada por filtros Whatman GF/F previamente muflados. Estos 2 mL serán el inóculo de bacterias de la misma agua muestreada y, por tanto, los responsables del proceso de mineralización de la MOD contenida en la muestra.
4. Tapar el frasco con tapón de rosca y agitar suavemente.
5. Tomar dos muestras de 20 mL (en viales de vidrio muflados) del frasco para determinar el contenido de COD inicial. Fijar con 100 μL de azida sódica 2,7 mM y acidificar con 100 μL de ácido clorhídrico 2 N. Guardar las muestras para analizarlas juntamente con las muestras finales.
6. Incubar el frasco durante 28 días en lugar seco, a oscuras y a una temperatura constante (18-20 °C).
7. Tomar dos muestras de 20 mL (en viales de vidrio muflados) del frasco para determinar el contenido de COD final. Fijar con 100 μL de azida sódica 2,7 mM y acidificar con ácido clorhídrico.
8. Analizar el contenido de carbono en las dos muestras iniciales y las dos muestras finales con el analizador de COD, añadiendo las muestras patrón necesarias.
9. Calcular el contenido CODB mediante la diferencia entre el COD inicial y final. Si se conoce el COD de la muestra se puede calcular también el porcentaje de CODB y el complementario, el porcentaje de CODR (*carbono orgánico disuelto recalitrante*).

MATERIAL NECESARIO

Véase el cuadro 7.3.

Reactivos necesarios

- Ácido clorhídrico 2 N.
- Azida sódica (NaN_3) 2,7 mM: disolver 1,76 mg en 100 mL de agua desionizada. Guardar en un frasco de vidrio en la nevera.

Técnica 10b. Índice de fluorescencia (McKnight et al. 2001)

Esta técnica se basa en las características fluorescentes de la materia orgánica, especialmente del material húmico, y requiere el uso de un fluorímetro. Es un índice que se desarrolló para aguas dulces y que permite tener una indicación del origen de la MOD: terrestre (con más contenido de anillos aromáticos en los compuestos húmicos) o microbiano. La técnica es sencilla y permite tratar un número elevado de muestras; consiste en hacer dos mediciones de fluorescencia. Actualmente este campo metodológico está en fase de expansión. Por ejemplo, en lugar de hacer mediciones puntuales se pueden realizar espectros de fluorescencia (barrido de un rango de longitudes de onda de excitación y de emisión), lo que permite tener una idea más detallada de las propiedades de la MOD.

La materia orgánica de origen terrestre se puede distinguir por su mayor contenido en anillos aromáticos

PROCESADO DE LAS MUESTRAS

1. Filtrar de 5 a 20 mL de muestra (Whatman GF/F previamente muflados).
2. Acidificar la muestra hasta $\text{pH} = 2$ con ácido clorhídrico 2 N.
3. Preparar el blanco (patrón de concentración cero) con agua Milli-Q acidificada hasta $\text{pH} = 2$.
4. Medir la fluorescencia en cubeta de cuarzo de la muestra y del blanco a 370 nm de excitación y 450 y 500 nm de emisión (si el fluorímetro permite hacerlo, escanear la fluorescencia de emisión entre 400-700 nm fijando la excitación a 370 nm, para comprobar que el máximo de fluorescencia ocurre aproximadamente a los 450 nm de emisión).
5. Corregir la fluorescencia de la muestra con el blanco.
6. Calcular el índice de fluorescencia como el cociente entre la fluorescencia a 370/450 nm de excitación/emisión y a 370/500 nm de excitación/emisión.
7. El índice de fluorescencia adquiere habitualmente valores de entre 1,2 y 2. Valores en el extremo superior del rango indican un mayor contenido de MOD de origen microbiano y valores en el extremo inferior, un mayor contenido de MOD de origen terrestre.

MATERIAL NECESARIO

Véase el cuadro 7.3.

Reactivos necesarios

— Ácido clorhídrico 2 N.

Técnica 11. Nitrógeno inorgánico disuelto

El *nitrógeno inorgánico disuelto* (NID) en aguas naturales está formado principalmente por iones nitrato (NO_3^-), amonio (NH_4^+) y nitrito (NO_2^-).

Técnica 11a. Amonio: método del salicilato (Reardon et al. 1966)

Es importante analizar el amonio cuanto antes y evitar la contaminación de las muestras

Técnica colorimétrica que consiste en añadir a la muestra dos reactivos que reaccionan con el amonio disuelto en el agua, proporcionando a la muestra un color característico cuya intensidad es función de la concentración del amonio. Es indispensable preparar una serie de patrones de concentración conocida de amonio y un blanco (patrón de concentración cero) que permita convertir las lecturas de absorbancia en concentraciones. Los patrones se procesan como las muestras. El amonio es un soluto que hay que analizar lo antes posible. Si la analítica no se puede ejecutar rápidamente puede considerarse el congelar las muestras. Cuando se añaden los reactivos es importante que las muestras no estén en contacto durante mucho tiempo con el aire, ya que éste puede ser una fuente de contaminación.

PROCESADO DE LAS MUESTRAS

1. Colocar 10 mL de muestra filtrada en un vial de vidrio de 25 mL.
2. Añadir a la muestra 1 mL de reactivo 1. Agitar. Esperar un minuto.
3. Añadir a la muestra 1 mL de reactivo 2. Agitar.
4. Colocar la muestra a la oscuridad y esperar una hora.
5. Medir la intensidad del color de la muestra mediante un espectrofotómetro a la longitud de onda de 690 nm.
6. Anotar la absorbancia.
7. Calcular la concentración en función de la recta patrón.

MATERIAL NECESARIO

Véase el cuadro 7.3.

Reactivos necesarios

— Reactivo 1. Disolver 3,4 g de salicilato sodico ($\text{HO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{COONa}$), 4 g de citrato trisódico dihidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y 0,04 g de nitroprusiato de sodio dihidratado ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en 100 mL de agua desionizada.

- Reactivo 2. Disolver 1 g de hidróxido de sodio (NaOH) y 0,08 g de sal de sodio del ácido dicloroisociamina ($\text{Cl}_2\text{Na}(\text{NCO})_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en 100 mL de agua desionizada.
- Solución madre de ion amonio de 1000 mg/L de $\text{NH}_4\text{-N}$: disolver 3,821 g de NH_4Cl en 1000 mL de agua desionizada. Conservar en la nevera en la oscuridad.

Técnica 11b. Nitrito: método de la sulfanilamida (Mackereth et al. 1978)

La siguiente técnica es colorimétrica. El procesado de las muestras es idéntico al método del amonio descrito anteriormente. Es indispensable preparar una serie de patrones de concentración conocida de nitrito y un blanco (patrón de concentración cero) que permita convertir las lecturas de absorbancia en concentraciones. Los patrones se procesan como las muestras. El nitrito es un soluto muy inestable y suele detectarse a concentraciones muy bajas, por lo cual se debe analizar lo antes posible. Es adecuado congelar las muestras si la analítica no se puede ejecutar rápidamente.

El nitrito debe analizarse lo más rápidamente posible o congelar las muestras

PROCESADO DE LAS MUESTRAS

1. Colocar 20 mL de muestra filtrada en un vial de vidrio de 25 mL.
2. Añadir a la muestra 0,4 mL del reactivo 1. Agitar.
3. Esperar 5 minutos.
4. Añadir 0,4 mL de reactivo 2. Agitar.
5. Colocar la muestra en la oscuridad y esperar 30 minutos.
6. Medir la intensidad del color de la muestra mediante un espectrofotómetro a la longitud de onda de 543 nm.
7. Anotar la absorbancia.
8. Calcular la concentración en función de la recta patrón.

MATERIAL NECESARIO

Véase el cuadro 7.3.

Reactivos necesarios

- Reactivo 1. Disolver 1 g de sulfanilamida ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) en 100 mL de una solución al 10% de ácido clorhídrico (10 mL de HCl en 90 mL de agua desionizada).
- Reactivo 2. Disolver 0,1 g de dihidrocloruro de N-1-naftil-etilendiamina ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2$) en 100 mL de agua desionizada.
- Solución madre de nitrito de 100 mg/L de $\text{NO}_2\text{-N}$: disolver 0,492 g de NaNO_2 en 1000 mL de agua desionizada. Conservar en la nevera.

Técnica 11c. Nitrato: método de la reducción a nitrito (adaptado de Mackereth et al. 1978)

El nitrato se reduce a nitrito al atravesar una columna de cadmio

Técnica colorimétrica que consiste en reducir previamente el nitrato a nitrito mediante cadmio. Posteriormente, la analítica es idéntica a la detallada anteriormente para el nitrito (técnica 11b). Este método mide la suma de nitrato + nitrito. Si la concentración de nitrito es relevante, la estima del nitrato se hace por diferencia. El uso del cadmio complica notablemente el procesado de las muestras, sobre todo si se necesita analizar muchas muestras manualmente. Esta misma técnica es mucho más cómoda y rápida si se dispone de un autoanalizador.

PROCESADO DE LAS MUESTRAS

1. Añadir 2 mL de cloruro de amonio concentrado a 50 mL de muestra filtrada.
2. Hacer pasar la muestra por la bureta con cadmio activado. Desechar los primeros 25 mL de muestra.
3. Guardar 20 mL de la segunda parte alícuota de la muestra que ha pasado por la bureta; añadir los reactivos restantes a este volumen.
4. A partir de este momento, seguir los mismos pasos detallados para el análisis del nitrito descrito en la técnica 11b.

Reactivos necesarios

- Cadmio granular de 0,3-1,6 mm de diámetro. Tratamiento: antes de utilizarlo, el cadmio necesita ser activado. La activación es un proceso que consiste en eliminar impurezas en la superficie del cadmio mediante una sucesión de soluciones de acetona y ácido clorhídrico hasta que el metal adquiere un color plateado-metálico bastante brillante.
 1. Mezclar el cadmio con acetona para eliminar partículas orgánicas adheridas en la superficie del metal. Agitar y dejar reposar 15 min.
 2. Purgar la acetona usada y limpiar el cadmio con agua desionizada.
 3. Purgar el agua y reponer nueva acetona. Repetir los pasos 1 y 2 tres veces.
 4. Mezclar el cadmio con una solución 6 N de HCl. Agitar y dejar reposar 15 min.
 5. Purgar la solución ácida usada y limpiar el cadmio con agua desionizada.
 6. Purgar el agua y reponer nueva solución ácida. Repetir los pasos 4 y 5 tres veces.
 7. Mezclar el cadmio con una solución de sulfato de cobre al 2%. Agitar 5 min.
 8. Purgar la solución del sulfato de cobre usada y limpiar el cadmio con agua desionizada.
 9. Repetir los pasos 7 y 8 tres veces hasta obtener un cadmio de color plateado brillante y el agua desionizada sin impurezas. Introducir el cadmio limpio en 25 mL de una solución de cloruro de amonio diluida. Colocar la so-

lución en una bureta de vidrio de 50 mL. Vigilar que no haya burbujas de aire entre las partículas de cadmio dentro de la bureta. La bureta con el cadmio está lista para el procesado de las muestras.

[El cadmio es un metal tóxico. Los residuos líquidos generados a través de la activación del cadmio necesitan un tratamiento específico.]

- Solución 6 N de HCl: 0,5 L de HCl en 0,5 L de agua desionizada.
- Solución diluida de cloruro de amonio: 5 g de NH_4Cl en 1 L de agua desionizada.
- Solución concentrada de cloruro de amonio: 200 g de NH_4Cl en 1 L de agua desionizada.
- Solución al 2% de sulfato de cobre: 20 g de CuSO_4 en 1 L de agua desionizada.
- Reactivos 1 y 2 de la analítica del nitrato.
- Solución madre de nitrato de 100 mg/L de $\text{NO}_3\text{-N}$: disolver 7,22 g de KNO_3 en 1000 mL de agua desionizada. Conservar en la nevera.

MATERIAL NECESARIO

Véase el cuadro 7.3. Para este análisis se necesita específicamente: una espátula para ir removiendo el cadmio durante el proceso de la activación, y una bureta de vidrio de 50 mL donde se colocará el cadmio activado inmerso en solución de cloruro de amonio diluida.

Técnica 11d. Nitrógeno total disuelto (NTD) (adaptado de Koroleff 1983)

La medida del nitrógeno total disuelto requiere convertirlo a nitrato mediante una oxidación básica a alta presión. Posteriormente, la concentración del nitrato se estima mediante lectura espectrofotométrica. Este método mide la suma del nitrógeno inorgánico y orgánico disueltos (NID + NOD). Si interesa cuantificar la concentración del NOD será necesario haber estimado anteriormente las concentraciones de las diferentes formas del NID. En esta técnica se utilizan patrones de nitrato y es indispensable también preparar blancos con agua desionizada para restar la influencia de los reactivos de oxidación en la lectura espectrofotométrica.

PROCESADO DE LAS MUESTRAS

1. Colocar 20 mL de muestra filtrada en un tubo de teflón.
2. Añadir 2 mL de reactivo de oxidación.
 1. Cerrar el tubo y agitar.
4. Autoclavar los tubos durante 90 minutos a 110 °C.

5. Una vez enfriada, agitar la muestra y disponer en una cubeta de cuarzo. Medir la absorbancia a 275 (A_{275}) y a 220 nm (A_{220}).
6. Estimar la diferencia de las dos absorbancias: $A_{220} - A_{275}$ (A_{275} debe ser menor del 10% de A_{220}). La lectura a 275 sirve para restar la interferencia que pueda tener la materia orgánica a la lectura a 220 nm.

Reactivos necesarios

- Solución de NaOH a 0,375 M: 15 g de NaOH en 1 L de agua desionizada. Esta solución se puede almacenar durante meses a la nevera en una botella de polietileno.
- Reactivo de oxidación: disolver 5 g de peroxidisulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) y después 3 g de ácido bórico (H_3BO_3) en 100 mL de la solución de NaOH preparada previamente. No invertir el orden de los reactivos en la preparación del reactivo de oxidación.

MATERIAL NECESARIO

Véase el cuadro 7.3. Se necesita específicamente: un autoclave o una olla a presión de dimensiones apropiadas. Se precisa asimismo tubos de teflón con tapones que se puedan autoclavar. La cinta de teflón sirve para poder sellar bien los tubos antes de ponerlos en el autoclave. Por último, se requiere un frasco de polietileno para guardar la solución de NaOH.

Técnica 12. Fósforo

Técnica 12a. Fósforo reactivo soluble (PRS) (método del molibdato de Murphy y Riley 1962)

Técnica colorimétrica que consiste en hacer reaccionar molibdato con el fósforo, proporcionando a la muestra un color azul. Los patrones se preparan con fosfato y se procesan como las muestras. La preparación de los patrones es la misma descrita para las analíticas anteriores. Si las muestras no se pueden analizar inmediatamente se aconseja congelarlas.

PROCESADO DE LAS MUESTRAS

1. Colocar 20 mL de muestra filtrada en un vial de vidrio de 25 mL.
2. Añadir a la muestra 2 mL de reactivo 1. Agitar.
3. Añadir inmediatamente 0,4 mL de reactivo 2. Agitar.
4. Colocar la muestra a la oscuridad y esperar 45 minutos.
5. Medir la intensidad del color de la muestra mediante un espectrofotómetro a 880 nm.

Reactivos necesarios

- Reactivo 1. Para la preparación de este reactivo se aconseja una campana extractora que elimine los vapores generados. Es un reactivo muy estable que se puede conservar en frasco, en nevera a 4 °C, siempre y cuando no tenga un color azulado, que indica la contaminación por fósforo.
 1. Pesar 0,2 g de tartrato de potasio y antimonio ($C_4H_4O_7SbK$) y ponerlos en un matraz de 1 L.
 2. Añadir 500 mL de agua desionizada
 3. Añadir, muy lentamente, 111 mL de ácido sulfúrico. Rellenar hasta cerca de 800 mL con agua desionizada.
 4. Sucesivamente, pesar 11,2 g de molibdato de amonio tetrahidratado [$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$], y diluirlos poco a poco en la solución. Agitar continuamente para facilitar la completa disolución del molibdato.
 5. Una vez enfriada, enrasar la solución hasta 1 L.
- Reactivo 2. Disolver 27 g de ácido ascórbico en 500 mL de agua desionizada. Se puede conservar en la oscuridad, en la nevera, mientras no adquiera un color rosado. También se puede congelar en una botella de polietileno durante meses.
- Solución madre de fosfato de 1000 mg/L de $PO_4\text{-P}$: pesar 4,390 g de fosfato diácido de potasio KH_2PO_4 y diluirlos en un matraz hasta 1000 mL de agua desionizada. Conservar en oscuridad, en la nevera.

MATERIAL NECESARIO

Véase el cuadro 7.3. Se necesita específicamente una campana extractora.

Técnica 12b. Fósforo total disuelto (PTD) (adaptado de Koroleff 1983)

El fósforo total disuelto se digiere mediante el mismo proceso de oxidación que se ha descrito para el NTD. En la digestión todo el PTD se oxida a fosfatos y sucesivamente se cuantifica su contenido mediante el método del molibdato detallado anteriormente (técnica 12a).

El fósforo total disuelto incluye el fósforo reactivo soluble y el fósforo orgánico disuelto

Este método mide la suma del PRS y del fósforo orgánico disuelto (POD). Si interesa cuantificar la concentración del POD será necesario estimar anteriormente la concentración de PRS. Se utilizan patrones de fosfato, como en la analítica del PRS, y es indispensable también preparar unos blancos con agua desionizada para restar la influencia de los reactivos de oxidación en la lectura espectrofotométrica.

PROCESADO DE LAS MUESTRAS

La fase de la digestión es idéntica a la descrita para el NTD (técnica 11d). Una vez oxidadas las muestras se procede a analizar el PRS siguiendo el método del molibdato descrito anteriormente (técnica 12a).

Reactivos necesarios

Se preparan los mismos reactivos necesarios para las analíticas del NTD y del PRS.

MATERIAL NECESARIO

Véase el cuadro 7.3. Se necesita el mismo material utilizado para las analíticas del NTD y del PRS.

7.6. Bibliografía

- DREVER J.I. *The geochemistry of natural waters: Surface and groundwater environments*. Nueva Jersey: Prentice Hall, 1997.
- GAILLARDET J., DUPRÉ B., LOUVAT P., y ALLÈGRE C.J. «Global silicate weathering and CO₂ consumption rates deduced from the chemistry of large rivers». *Chemical Geology* 159 (1999): 3-30.
- KOROLEFF F., y WEINHEIMER F. «Simultaneous oxidation of nitrogen and phosphorus compounds by persulfate». En K. Grasshoff, M. Eberhardt, y K. Kremling, eds. *Methods of seawater analysis*. Berlín: Verlag Chemie, 1983: 168-169.
- MACKERETH F.J.K., HERON J., y TALLING J. *Water analysis*. Cumbria, Reino Unido: Freshwater Biological Association, Scientific publication n.º 36, 1978.
- MANAHAN S.E. *Environmental chemistry*. Boca Raton: CRC Press, 1994.
- MARGALEF R. *Limnología*. Barcelona: Omega, 1983.
- MCKNIGHT D., BOYER E., WESTERHOFF P., DORAN P., KULBE T., y ANDERSEN D. «Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity». *Limnology and Oceanography* 46 (2001): 38-48.
- MEYBECK M. «Global chemical weathering of surficial rocks estimated from river dissolved loads». *American Journal of Science* 287 (1987): 401-428.
- MURPHY J., y RILEY J. «A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters». *Analytica Chimica Acta* 27 (1962): 31-36.
- PETROVIC M., SOLÉ M., LÓPEZ DE ALDA M.J., y BARCELÓ D. «Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: Integration of chemical analysis and biological effects on feral carp». *Environmental Toxicology and Chemistry* 21 (2002): 2146-2156.
- REARDON J., FOREMAN J.A., y SEARCY R.L. «New reactants for the colorimetric determination of ammonia». *Clinica Chimica Acta* 14 (1966): 403-405.
- SERVAIS P., ANZIL A., y VENTRESQUE C. «Simple method for determination of biodegradable dissolved organic carbon in water». *Applied Environmental Microbiology* 55 (1989): 2732-2734.
- VAN DER LEEDEN F., TROISE F.L., y TODD D.K. *The water encyclopedia*. Boca Raton: Lewis Publishers, Inc., 1991.