Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Sustancias húmicas solubles presentes en ambientes acuáticos

Conzonno, Victor Hugo

1996

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Conzonno, Victor Hugo. (1996). Sustancias húmicas solubles presentes en ambientes acuáticos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2828_Conzonno.pdf

Cita tipo Chicago:
Conzonno, Victor Hugo. "Sustancias húmicas solubles presentes en ambientes acuáticos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2828_Conzonno.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

SUSTANCIAS HUMICAS SOLUBLES PRESENTES EN AMBIENTES ACUATICOS

VICTOR HUGO CONZONNO

Departamento de Química Orgánica

Director de Tesis
Dra. Alicia Fernández Cirelli

Tesis presentada para optar al Título de
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS
1996

№ 28281
ej 2

A Eremy, a mis padres, a mi hermano y sobrinos.

Mi más profundo agradecimiento a
la Dra. Alicia Fernández Cirelli,
quien dirigiera el presente trabajo,
por su apoyo y constante estímulo,
por sus enseñanzas y por el afecto
que me ha brindado.

Agradezco también:

Al Departamento de Química Orgánica y al Instituto de Limnología de La Plata "Dr. Raúl A. Ringuelet" por brindarme el lugar para el desarrollo del trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC).

Al Dr. Raúl A. Ringuelet por el apoyo para mi formación y desarrollo en el Intituto de Limnología de La Plata.

Al Dr. Aldo A. Mariazzi por haberme introducido en el campo de la limnología, por sus enseñanzas y guía en esta especialidad y por los buenos momentos compartidos.

A la Farm. Elsa F. Claverie por haberme brindado todos sus conocimientos, apoyo y estímulo para mi desarrollo en la limnología química.

A Oscar Moradei, Silvana Leit, Mariano Castro, Cecile du Mortier, Elisa Oliva, Roland Zenk, Lidia Iñigo, Javier Covián, José Kovensky, Carlos Lima, Rosa Erra Ballsells, Cecilia Di Risio, Mabel Tudino, Carmen Peralta, Diego Fraidenraich, Rocío Sanchez Flores, Jorge Aznares y Ana del Carril por toda la ayuda y afecto brindado.

A Romualdo Lanzon por la impresión de la Tesis.

A Carlos R. Tremouilles por la confección de las figuras.

A los compañeros y demás miembros del Departamento de Química Orgánica, del Instituto de Limnología de La Plata y del Museo de Ciencias Naturales de La Plata que de una u otra manera han colaborado para el desarrollo de este trabajo.

A Eremy Cecilia Espinosa por la realización de los gráficos, la corrección y la inestimable ayuda y aliento para la culminación de esta Tesis.

Sustancias húmicas solubles presentes en ambientes acuáticos

Resumen

Las sustancias húmicas son componentes normales (polímeros acídicos, predominantemente aromáticos) de la materia orgánica soluble en aguas naturales. En este trabajo, se presentan estudios efectuados en cuerpos de agua de la cuenca del Río Salado. En la primera parte, se realizaron relevamientos que indicaron la influencia de la composición química del agua y de factores climáticos e hidrológicos en la distribución y dinámica de las sustancias húmicas, al igual que su posible incidencia sobre la producción primaria fitoplanctónica. En la segunda parte, mediante pruebas de laboratorio, se comprobó su resistencia a la biodegradación, la influencia del pH y fuerza iónica sobre la forma y tamaño molecular, la interacción con hidratos de carbono y la formación de complejos con metales. En la tercera parte, se efectuaron estudios estructurales sobre un ácido fúlvico, que establecieron la presencia de anillos aromáticos o-disustituidos, grupos carboxilos, ésteres y aminas terciarias en su estructura.

Palabras clave:

Sustancias húmicas acuáticas, cuenca del Río Salado, distribución y dinámica de sustancias húmicas, propiedades físico-químicas de sustancias húmicas, estructura del ácido fúlvico.

Soluble humic substances present in aquatic environments

Abstract

Humic substances are normal components (acidic polymers, predominantly aromatic) of the soluble organic matter in natural waters. Studies performed on water bodies from Río Salado drainage basin are presented. In the first part of this work, the influence of the water chemical composition and of climatic and hydrological factors on the distribution and dynamics of humic substances was established. The data obtained also show that humic substances probably incide on phytoplankton primary production. Through laboratory experiments performed in the second part, it could be concluded that these substances are resistant to biodegradation, that their molecular size and shape are influenced by pH and ionic strength, and that they interact with carbohydrates and form complexes with metals. The structural studies of a fulvic acid included in the third part of this thesis, confirmed the presence of o-disubstituted aromatic rings, carboxyl groups, esters and tertiary amines in their structure.

Key words

Aquatic humic substances, Río Salado drainage basin, humic substances distribution and dynamics, humic substances physico-chemical properties, fulvic acid structure.

INTRODUCCION

Las sustancias húmicas son polímeros acídicos, predominantemente aromáticos presentes en la naturaleza, que se originan a partir de los productos de descomposición de plantas y animales y dada su heterogeneidad, no pueden ser definidos unívocamente en términos estructurales.

Se encuentran presentes en suelos y en aguas naturales y son relativamente estables frente a la microflora y microfauna. Se separan en varios componentes, de los cuales los más importantes son los ácidos húmicos (mayor peso molecular, insolubles a pH ácido) y los ácidos fúlvicos (menor peso molecular, solubles en todo el rango de pH). Los primeros estudios se realizaron en sustancias húmicas de suelos debido a la vinculación de éstas con la fertilidad, en relación directa con la explotación agrícola. El estudio de las sustancias húmicas provenientes de ambientes acuáticos siguió en sus inicios las mismas líneas metodológicas. Sin embargo, el hecho de existir otra flora y fauna con condiciones particulares en el medio acuático, obliga al planteo de líneas de acción dirigidas específicamente.

Las sustancias húmicas inciden en los ciclos biogeoquímicos de la materia influenciando el metabolismo y evolución de los cuerpos de agua. Es conocida su capacidad de formación de complejos con metales y de asociación con metabolitos y contaminantes hidrofóbicos (pesticidas), interviniendo en la biodisponibilidad y toxicidad de los mismos. Confieren a las aguas un color pardo característico y contribuyen a la formación de trihalometanos en los procesos de potabilización.

Este trabajo de tesis tuvo por objeto iniciar estudios sistemáticos de las características estructurales y funcionales de las sustancias húmicas presentes en cuerpos de agua en nuestro país. Los estudios abarcaron la distribución, comportamiento, propiedades y estructura de estas sustancias

presentes en ambientes acuáticos ubicados en la cuenca del Río Salado (Provincia de Buenos Aires).

Los resultados obtenidos de los ambientes acuáticos estudiados indicaron que las aguas poseen concentraciones significativas de sustancias húmicas, que se evidencian en el color pardo amarillento característico. Dichas sustancias son no biodegradables, de manera que los factores que influyen en su distribución y dinámica son fundamentalmente climáticos e hidrológicos. Estos factores condicionan la formación de carbonato de calcio, que conduce a la remoción selectiva de los ácidos húmicos frente a los ácidos fúlvicos.

La propiedad de absorción en el UV-visible permitió obtener una correlación entre la absorbancia y la demanda química de oxígeno, de utilidad con fines cuantitativos.

Se comprobó la influencia del pH y fuerza iónica sobre la forma y tamaño molecular y la interacción con hidratos de carbono y metales pesados.

Se desarrolló un método de aislamiento y purificación que permite conservar la estructura nativa de estas sustancias. Por este procedimiento, se obtuvo el ácido fúlvico de una laguna de la cuenca del Río Salado (Laguna del Burro), a partir del cual se realizaron estudios estructurales que determinaron la presencia de núcleos aromáticos o-disustituidos, ácidos carboxílicos, ésteres y aminas terciarias como principales unidades estructurales integrantes. Estas unidades permiten la formación de complejos tipo quelato con metales y la interacción con metabolitos a través de uniones iónicas, coordinadas, puente de hidrógeno, dipolo-dipolo y fuerzas de van der Waals. Las características mencionadas explican la influencia de las sustancias húmicas en la solubilidad y biodisponibilidad de oligoelementos y metabolitos presentes en el medio y consecuentemente, en el desarrollo de la vida acuática.

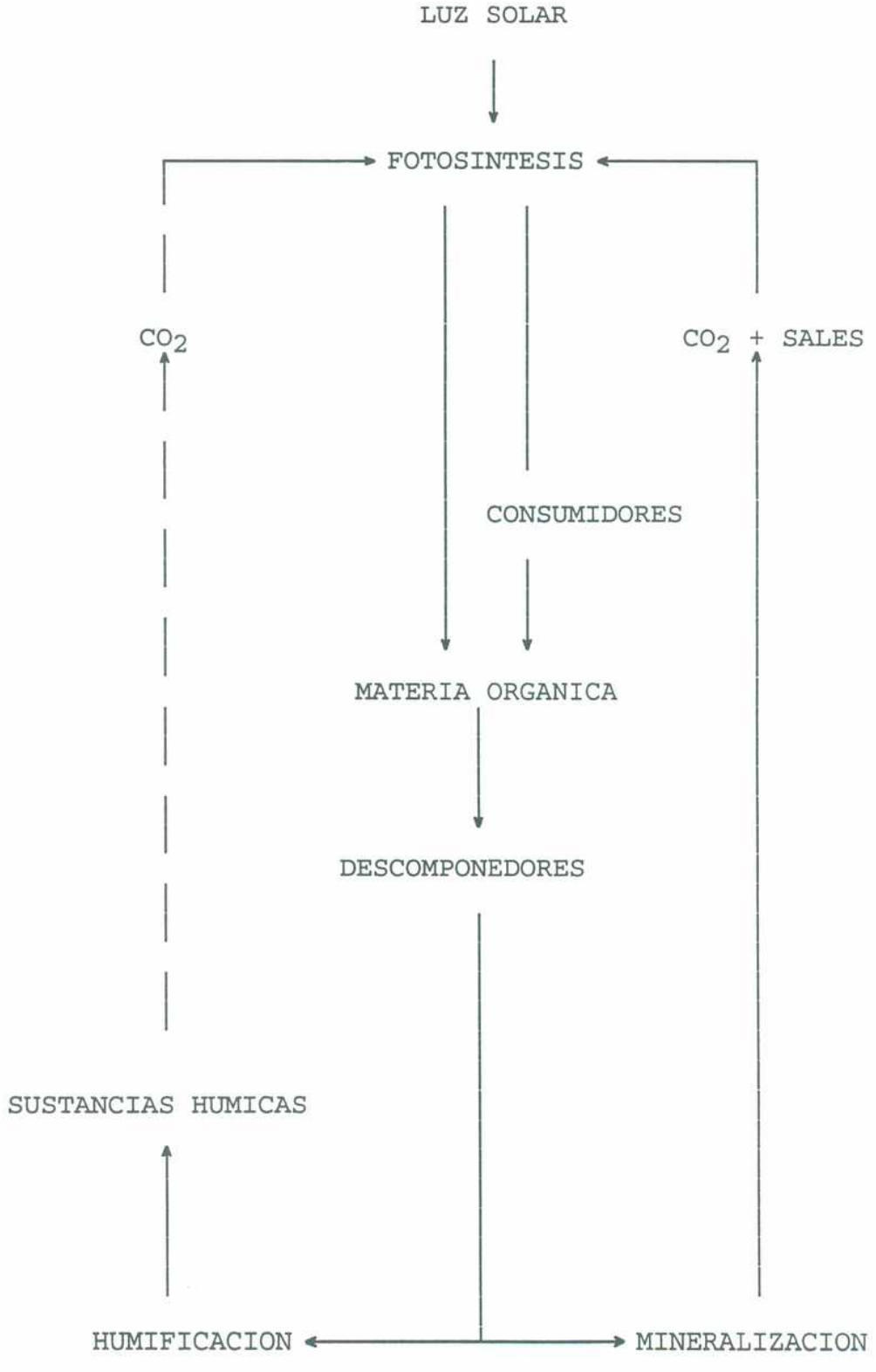
CAPITULO I

SUSTANCIAS HUMICAS EN SUELOS

Introducción

Es importante, previo a las consideraciones específicas, ubicar las sustancias húmicas en el contexto del medio ambiente natural. Según puede apreciarse en la figura 1, con la llegada de la luz solar a la superficie de la tierra, las radiaciones promueven el desarrollo del fenómeno de fotosíntesis llevado a cabo por los productores primarios. En forma simplificada, en esta figura se ilustran los ciclos existentes correspondientes a los ambientes terrestres y acuáticos. El proceso fotosintético en ambientes terrestres es realizado por vegetales como las plantas vasculares, mientras que en los ambientes acuáticos, por algas y plantas acuáticas sumergidas, emergentes, arraigadas y flotantes. La característica común para todos los productores primarios es su capacidad de sintetizar materia orgánica a partir de dióxido de carbono, sales inorgánicas y radiación solar. Este conjunto, es decir la flora terrestre y acuática, constituye la fuente de materia orgánica para los animales herbívoros y éstos a su vez para los carnívoros. El sistema así formado es el que se conoce con el nombre de "cadena trófica". En el caso de los ambientes acuáticos los consumidores están integrados por el zooplancton y los peces. Cada uno de los componentes de este sistema aporta materia orgánica ya sea durante su ciclo vital, en forma de deshechos metabólicos, o al término del mismo. Toda esta materia orgánica es atacada por los organismos descomponedores dando lugar a dos procesos que son el de mineralización y el de humificación. El primero es realizado por bacterias en medio aerobio. Los pasos metabólicos ejercidos por estas bacterias conducen a la formación de dióxido de carbono y sales minerales inorgánicas, que son posteriormente aprovechados en el proceso de fotosíntesis, cerrándose de esta manera el ciclo, como se puede observar en la figura 1.

Figura 1: Esquema simplificado del ciclo del carbono.



El segundo proceso, el de humificación, es efectuado principalmente por bacterias, hongos y protozoarios, que a través de complejas reacciones, tiene como producto final las sustancias húmicas. Estas sustancias son polímeros acídicos predominantemente fenólicos y aromáticos, cuya característica es ser prácticamente no biodegradables y surgir como producto final de todas las transformaciones de la materia orgánica en el ambiente natural. No obstante, pueden sufrir cambios por reacciones químicas, tanto por oxidación química como fotoquímica, generando dióxido de carbono y completando el ciclo de acuerdo a lo expuesto en la figura 1.

Es posible observar que si bien existen ciclos y procesos similares que se cumplen en ambientes terrestres y acuáticos, la velocidad y magnitud de los mismos dependerá de las condiciones físicas, químicas y biológicas. Es decir de variables climáticas, hidrológicas, concentración y disponibilidad de nutrientes, como así también de la composición de la flora y fauna del ambiente en estudio. Lo antedicho termina por condicionar, entre otras cosas, el producto final del proceso de humificación, que son las sustancias húmicas, cuya composición, peso molecular y otras características dependerá en última instancia de variables ecológicas. En consecuencia, las sustancias húmicas no poseen una composición definida, impidiendo la existencia de un patrón universal. A pesar de poseer características comunes, las diferencias planteadas por causas ecológicas imponen la necesidad de estudios específicos de las sustancias húmicas para cada ambiente en particular.

Los antecedentes sobre el tema, indican que los primeros estudios se realizaron sobre sustancias húmicas presentes en suelos. Hecho que en gran parte se debe, a la vinculación de estas sustancias con la fertilidad y otros fenómenos de importancia que se desarrollan en los suelos en directa relación con la explotación agrícola. Los trabajos sobre el

tema, inicialmente, han integrado publicaciones en revistas sobre ciencias del suelo, edafología, agronomía, para luego comenzar a ser de interés en medio ambiente, al igual que actualmente, en revistas especializadas de química. Entre los libros más importantes referidos al tema figuran Kononova (1961, 1966), Schnitzer y Khan (1972), Povoledo y Golterman (1975), Christman y Gjessing (1982), Stevenson (1982), Choudhry (1984), Aiken y col.(1985), Rashid (1985), Suffet y MacCarthy (1989) y Hayes y col. (1989). En nuestro país el aporte más importante en el tema ha sido realizado por el Dr. Rosell y colaboradores del Laboratorio de Humus y Biodinámica del Suelo, Departamento de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Sur (Bahía Blanca) quienes han trabajado en sustancias húmicas del suelo. No se han realizado, previo a este trabajo, estudios sistemáticos sobre sustancias húmicas en cuerpos de agua en nuestro país.

Para seguir la línea histórica, se considerará la materia orgánica en suelos para hacer posteriormente referencia a la materia orgánica en ambientes acuáticos.

Materia orgánica en suelos

El componente orgánico del suelo está formado por un sistema complejo de compuestos y sustancias orgánicas e individuos biológicos, que se encuentran en un estado continuo de transformación (Rosell, 1970). La concentración de materia orgánica varía dependiendo del suelo de que se trate. También es necesario tener en cuenta la profundidad, dado que la proporción de dicha materia puede disminuir considerablemente en el perfil vertical. La fracción orgánica del suelo está constituida por los siguientes grupos:

I. Componente biológico

Es el principal responsable de la dinámica que sufre la materia orgánica del suelo. Si bien los procesos químicos de descomposición (hidrólisis, oxidación, etc.) y síntesis, así como algunos fenómenos físicos (temperatura, humedad, etc.) desempeñan cierto papel en la desintegración de los residuos de las plantas, estos cambios son principalmente generados por los miembros de la flora y fauna del suelo. A grandes rasgos se pueden mencionar los siguientes:

a. Microflora. Los grupos más importantes son:

- *Bacterias*, dentro de este grupo se encuentran las autótrofas y las heterótrofas. Las autótrofas obtienen energía a partir de compuestos inorgánicos y el carbono del dióxido de carbono. Algunos géneros pertenecientes a este subgrupo son las *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Thiobacillus*, *Hydrogenomonas*, *Desulfovibrio* y *Methanomonas*. Las heterótrofas obtienen su carbono y energía de compuestos orgánicos complejos. Se clasifican en géneros que se caracterizan por fijar nitrógeno (*Rhizobium*, *Azotobacter*), géneros relacionados al proceso de amonificación (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Micrococcus*, etc.) y géneros vinculados a la descomposición de celulosa, polisacáridos, ligninas, materiales fibrosos, etc. (*Achromobacter*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Cellvibrio*, *Clostridium*, *Cytophaga*, *Pseudomonas*, etc.).

- *Hongos*, de los cuales existen numerosos géneros (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillum*, etc.)

- *Actinomicetes*, con géneros como *Micromonosporas*, *Nocardia*, *Streptomyces*, etc.

b. Fauna (micro, meso y macro)

Entre los grupos más importantes en cuanto a la actividad en la descomposición y transformación de la materia orgánica y en la formación del humus, figuran los protozoarios, nemátodos, gusanos, insectos, etc.

II. Residuos y compuestos orgánicos

Es el conjunto de compuestos orgánicos con o sin nitrógeno, que pertenecen a grupos definidos, tales como: proteínas y sus productos de descomposición, hidratos de carbono, ácidos orgánicos, grasas, ceras, ligninas, resinas, etc. Los compuestos orgánicos tienen su origen en los residuos vegetales y animales en descomposición y en las sustancias resintetizadas por acción bacteriana y forman un 10 al 15% de la cantidad total de la materia orgánica del suelo. Dichos compuestos sufren, en general, procesos de descomposición a formas simples, pudiendo ser empleados como materiales de síntesis, principalmente biológica, de formas relativamente estables como las sustancias húmicas.

III. Sustancias húmicas

Están constituidas por una serie de polímeros acídicos, predominantemente fenólicos y aromáticos, con pesos moleculares que oscilan entre pocos cientos de unidades y 300.000, y cuya acidez es debida principalmente a grupos carboxílicos. Estas sustancias son relativamente estables frente a la microflora y microfauna. En un suelo agrícola común, se mineraliza entre el 2 y el 5% del carbono total por año, mientras que no alcanza al 1% el carbono mineralizado de las sustancias húmicas.

Las mismas son de suma importancia en las propiedades del suelo. Así por ejemplo, intervienen en la textura y porosidad, en el mantenimiento de la humedad del suelo, en la acumulación de micronutrientes vitales para el crecimiento de las plantas y como buffer ácido-base. Además, interactúan con metales esenciales para el desarrollo de vegetales formando complejos o a través de mecanismos de intercambio iónico. Influyen en el estado redox y dependiendo de las circunstancias, provocan la solubilización o inmovilización del metal. Considerando los distintos tipos de suelos, las sustancias húmicas pueden integrar entre el 46 y el 91% de la materia orgánica total.

Las sustancias húmicas constituyen uno de los materiales más complejos de la naturaleza, lo cual ha dificultado su estudio. Se ha tratado de separar sus componentes en base a la solubilidad en agua, ácidos, álcalis y solventes orgánicos. En la figura 2 se encuentra representada la marcha que usualmente se utiliza para separar las distintas fracciones. Las más importantes en cuanto a la concentración son las siguientes:

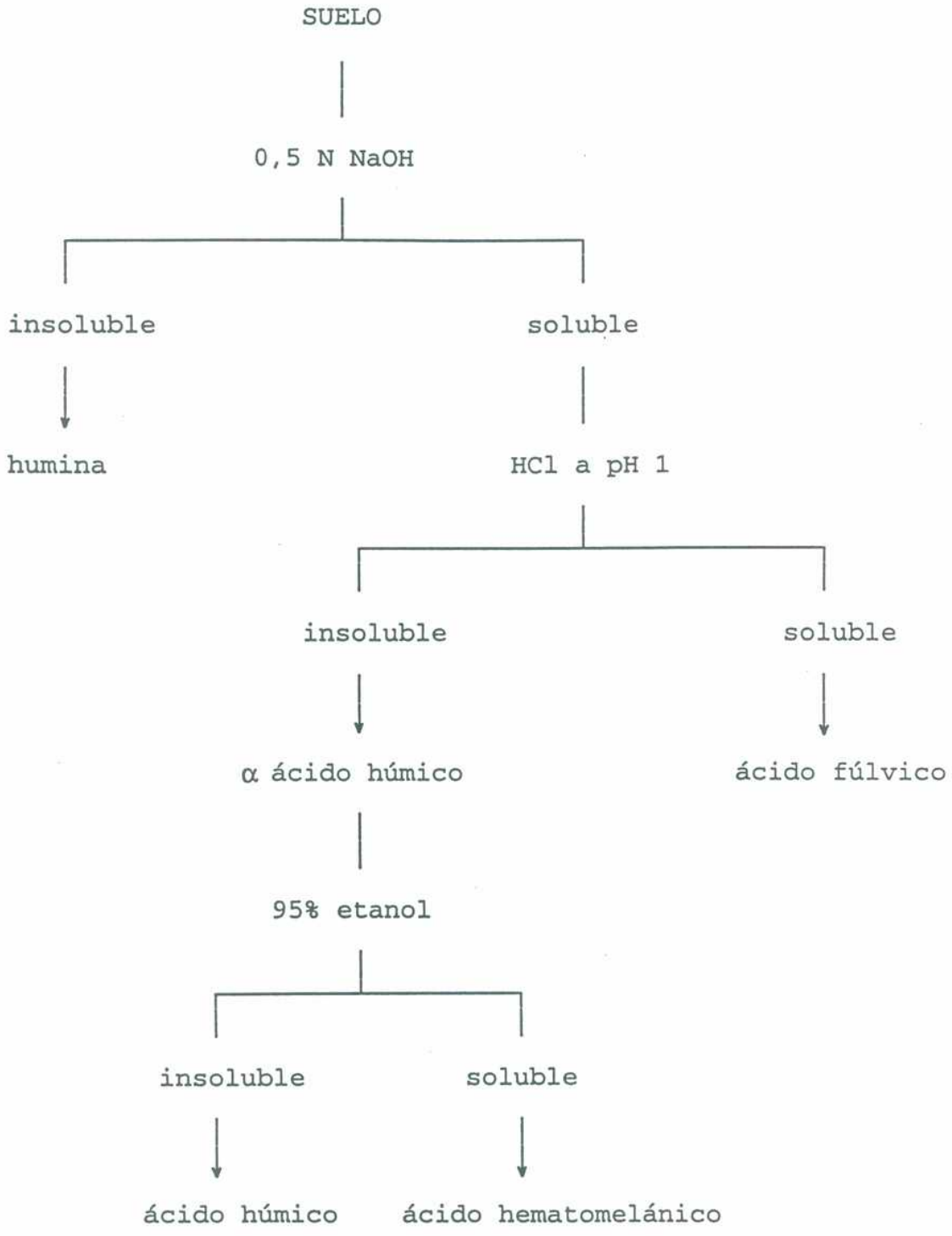
a. El *ácido fúlvico* que es el componente de menor peso molecular y soluble en ácidos y bases.

b. El *ácido húmico*, de peso molecular medio, soluble en álcalis e insoluble en ácidos.

c. La *humina*, de peso molecular elevado, insoluble en álcalis y ácidos, excepto bajo condiciones muy drásticas.

La proporción en que se encuentran depende del tipo de suelos, así los ácidos húmicos son el principal componente del humus en los suelos chernozem, mientras que los ácidos fúlvicos son los predominantes en los suelos podzólicos.

Figura 2: Marcha de separación de las fracciones que integran las sustancias húmicas presentes en el suelo.



Hipótesis sobre la formación de las sustancias húmicas

Los residuos de origen vegetal y animal sufren la acción de varios agentes al alcanzar el suelo. En primera instancia, los agentes físicos y químicos actúan en forma más o menos importante pero, en definitiva, los microorganismos y la fauna (principalmente la micro y mesofauna) ejercen una acción decisiva sobre el proceso de humificación.

La acción primaria de los agentes no biológicos puede describirse (Kononova,1961) como:

- Cambios debidos a la acción física de los factores naturales (agua, viento, etc.) y del hombre (labores del suelo).

- Cambios químicos de los residuos orgánicos, bajo la acción directa del agua, luz, aire y reacción del medio (autooxidación de grasas y resinas, oxidación de compuestos aromáticos a pH alcalino, hidrólisis, etc.).

- Cambios debidos a la acción residual de sistemas enzimáticos de organismos muertos. La formación de un pigmento oscuro durante el marchitamiento de hojas de té es un ejemplo de este tipo de reacción oxidativa. Los taninos, polifenoles y aminoácidos sufren oxidaciones que los convierten en complejos oscuros.

Los cambios mencionados, en forma individual o en conjunto, no son suficientes para obtener un grado de humificación avanzada. La acción de los microorganismos y de los animales del suelo acelera la culminación del proceso iniciado por los agentes físicos y químicos. La etapa biodinámica del proceso transforma definitivamente a los

residuos de origen vegetal y animal, según las siguientes fases:

- La descomposición microbial de los componentes originados en los tejidos y su conversión en productos de constitución simple y/o totalmente mineralizados (CO_2, NH_3, NO_2^-, NO_3^-, H_2O, CH_4, etc.).

- La síntesis de sustancias orgánicas de naturaleza húmica de elevado peso molecular.

Los microorganismos participan fundamentalmente de la primera etapa de formación de sustancias húmicas (descomposición y mineralización de los tejidos orgánicos originales) y en la síntesis de tejido protoplasmático. Las reacciones de condensación propias de la segunda etapa en la formación del humus, son consideradas de naturaleza fisicoquímica además de microbiana.

En lo que respecta a la formación de sustancias húmicas es obvia la participación de la lignina como fuente de materia orgánica, para ello basta considerar el trabajo de Ertel y col. (1984) que demuestra la presencia, entre otros, de núcleos aromáticos existentes en las mismas. Lo que resulta más difícil de establecer claramente, son los diferentes pasos de síntesis. Seguidamente se muestran algunos ejemplos de reacciones mediadas por microorganismos con la participación de ligninas y otros sustratos orgánicos. La degradación de la lignina, a través de reacciones bioquímicas, conduce a la formación de compuestos como los representados en la figura 3 (Flaig, 1975), a partir de los cuales pueden producirse oxidaciones en la doble ligadura, luego desmetilaciones, hidroxilaciones, descarboxilaciones, ruptura de anillos aromáticos y finalmente las reacciones siguen hacia dimerizaciones y polimerizaciones.

Además de esta vía de producir precursores aromáticos de compuestos húmicos, los microorganismos pueden hacerlo partiendo de compuestos alifáticos. Muchos hongos, actinomycetes y bacterias son capaces de producir moléculas aromáticas, antibióticos y otros productos de fermentación. Es probable que las sustancias húmicas se originen a través de polimerizaciones de compuestos aromáticos provenientes de carbohidratos y otros compuestos simples de acuerdo a la figura 4 (Haider y col., 1975).

Otras reacciones importantes son las reacciones de tipo Maillard (Kalinowski, 1987; Anderson y col., 1989; Ikan y col., 1990) entre azúcar y aminas como la expuesta en la figura 5, que contribuye a explicar la presencia de nitrógeno, en baja proporción, en algunas sustancias húmicas.

Estructura de las sustancias húmicas

Seguidamente se describen estructuras hipotéticas que han sido propuestas para las sustancias húmicas:

I. Modelo de Fuchs (1930).

Este modelo tiene valor histórico y está representado en la figura 6. En el mismo se pone en evidencia la presencia de núcleos aromáticos y grupos carboxilos e hidroxilos característicos de las sustancias húmicas.

II. Modelo de Flaig (1960).

En él se considera los productos derivados de la lignina, que conduce por degradación a polifenoles sustituidos. Estos por oxidación forman quinonas, que por condensación con aminoácidos producen sustancias húmicas. El modelo se expone en la figura 7 y resulta cuestionable si se tiene en cuenta

que en la formación de sustancias húmicas pueden intervenir otros precursores además de los derivados de la lignina.

Figura 3: Formación de precursores aromáticos de sustancias húmicas a partir de la lignina.

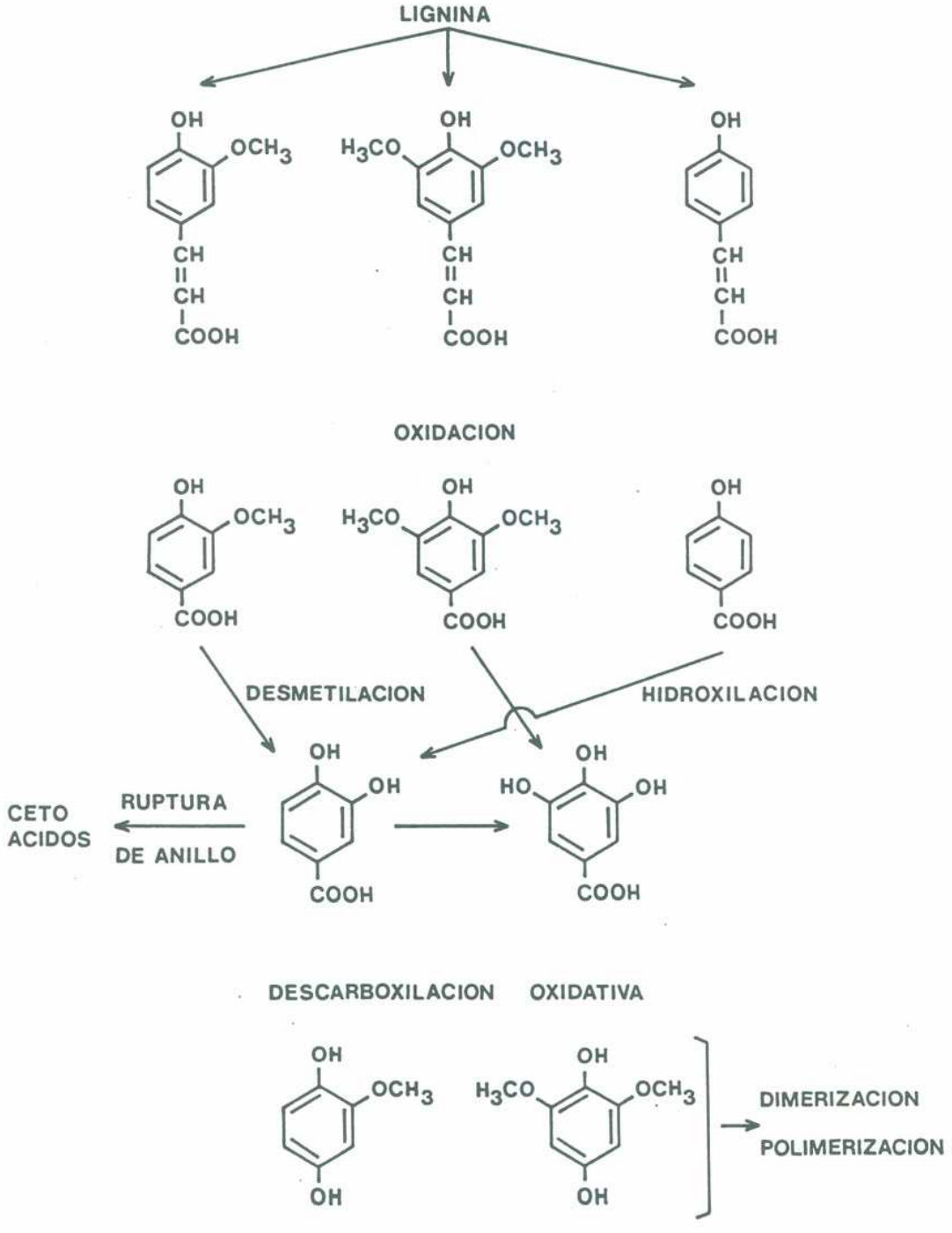


Figura 4: Formación de precursores aromáticos de sustancias húmicas a partir de compuestos alifáticos.

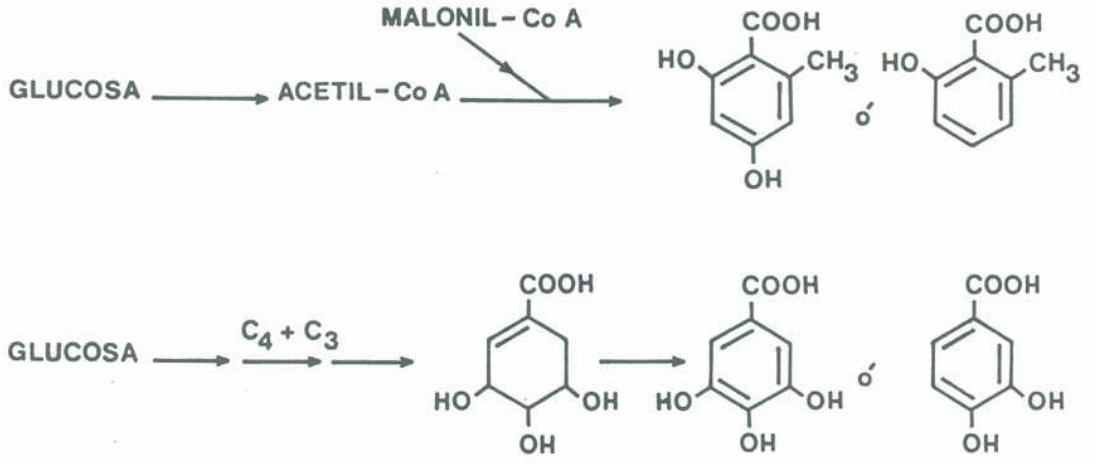


Figura 5: Reacción de Maillard entre hidratos de carbono y aminoácidos.

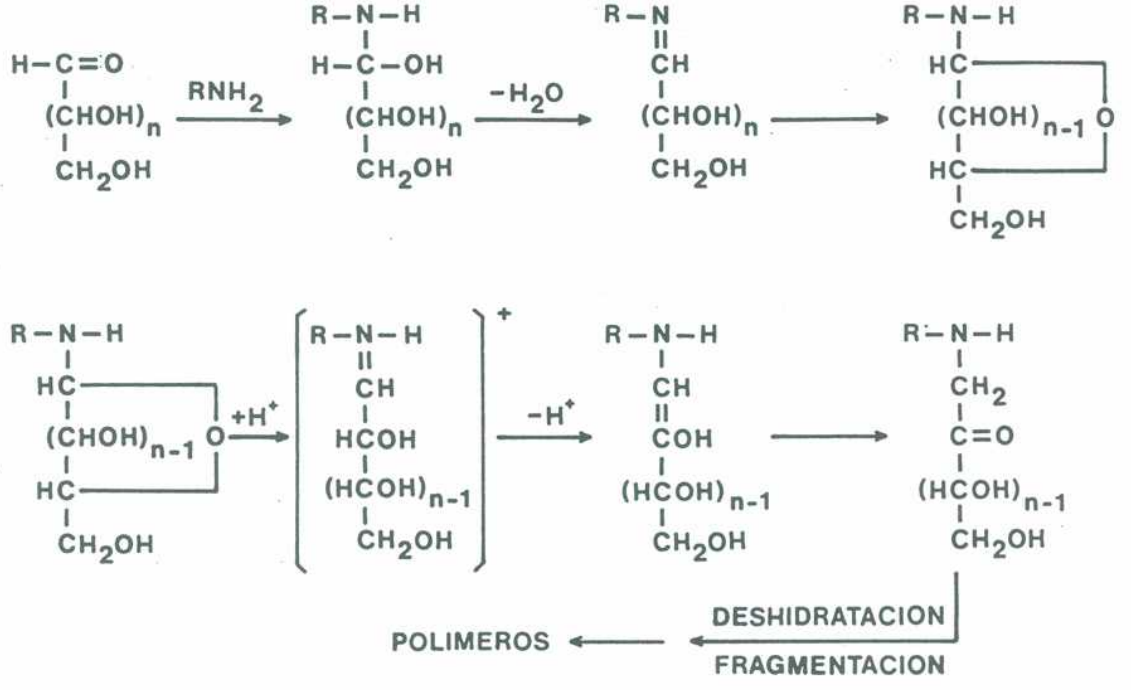
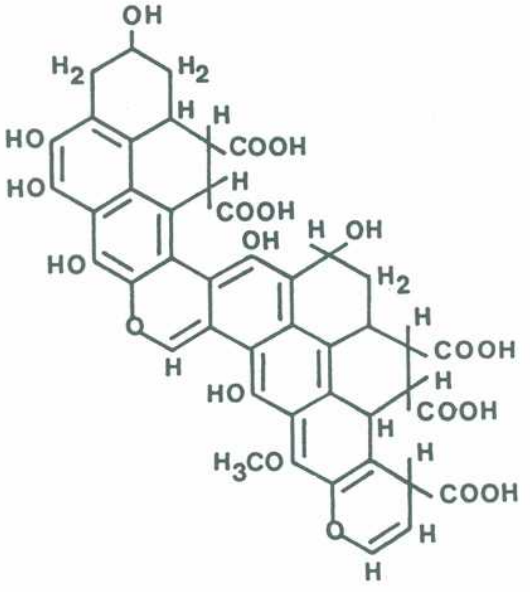


Figura 6: Modelo de Fuchs (1930).



III. Modelo de Dragunov (1961).

La estructura parte de di y tri-hidroxibencenos que se oxidan a quinonas, donde el nitrógeno se encuentra en forma cíclica o alifática. Lateralmente se encuentran unidos hidratos de carbono (figura 8).

IV. Modelo de Felbeck (1965).

En este caso se propone la participación de los microorganismos en la síntesis de unidades pironas las cuales se encuentran unidas por puentes metilénicos en las posiciones 2 y 6. A esta cadena central se ligan unidades fenólicas y aminoácidos o péptidos de la forma que se indica en la figura 9.

Figura 7: Modelo de Flaig (1960).

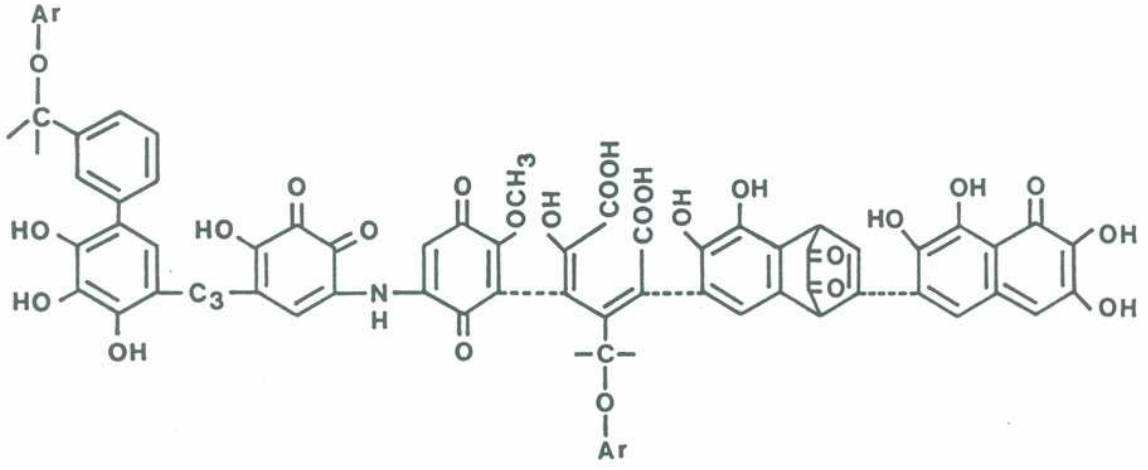


Figura 8: Modelo de Dragunov (1961).

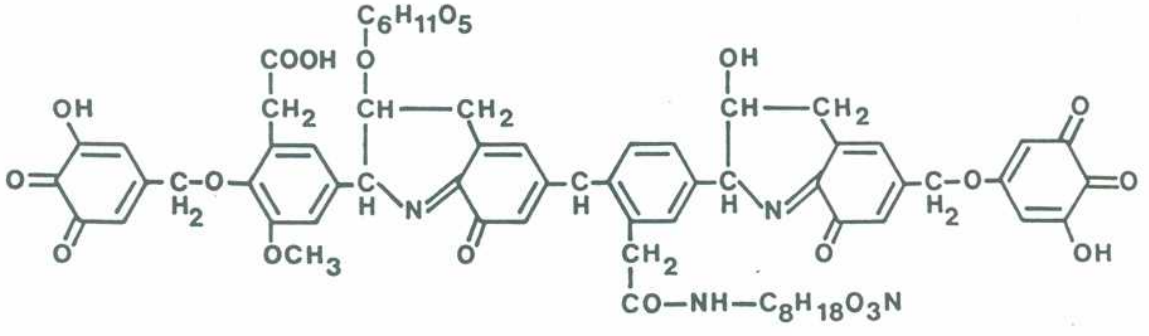
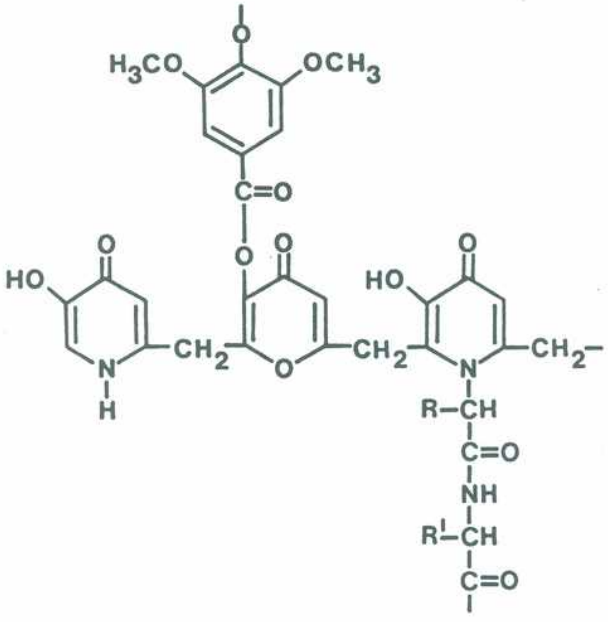


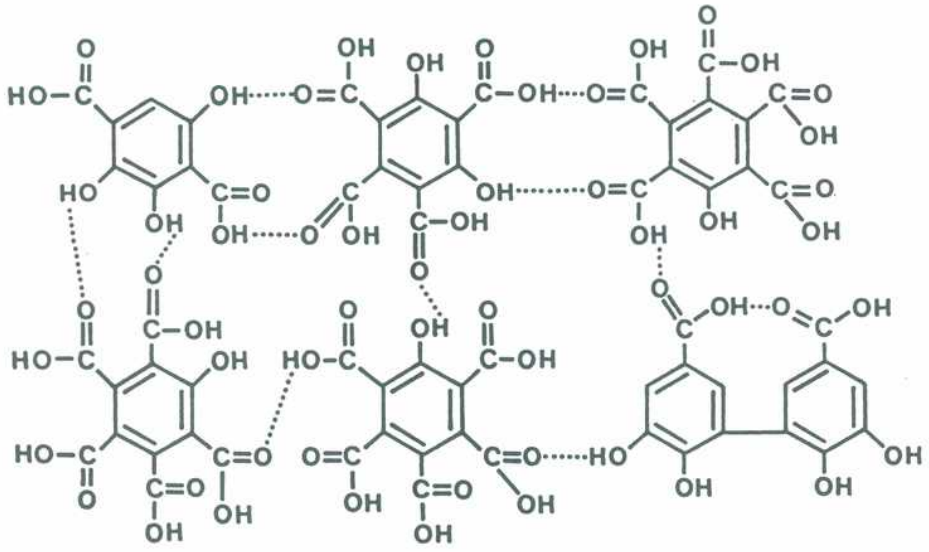
Figura 9: Modelo de Felbeck (1965).



V. Modelo de Schnitzer y Khan (1972).

El modelo consiste en asociaciones moleculares entre ácidos fenólicos y ácidos bencencarboxílicos mantenidas mediante uniones puente hidrógeno, fuerzas de van der Waals, etc. (figura 10). A medida que aumenta el peso molecular estas estructuras se encuentran relacionadas por uniones C-C y C-O. Por otra parte, pueden existir a través de los grupos OH fenólicos, esterificaciones con ácidos grasos o puentes éter con carbonos de cadenas alifáticas o de anillos aromáticos.

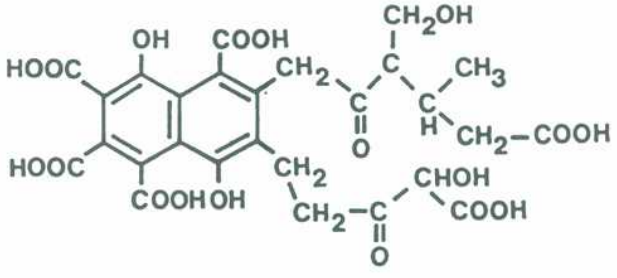
Figura 10: Modelo de Schnitzer y Khan (1972).



VI. Modelo de Buffle (1977).

El modelo, con una densidad elevada de grupos carboxilos y fenólicos (figura 11), permite explicar las propiedades fisicoquímicas, en especial las reacciones de formación de complejos.

Figura 11: Modelo de Buffle (1977).

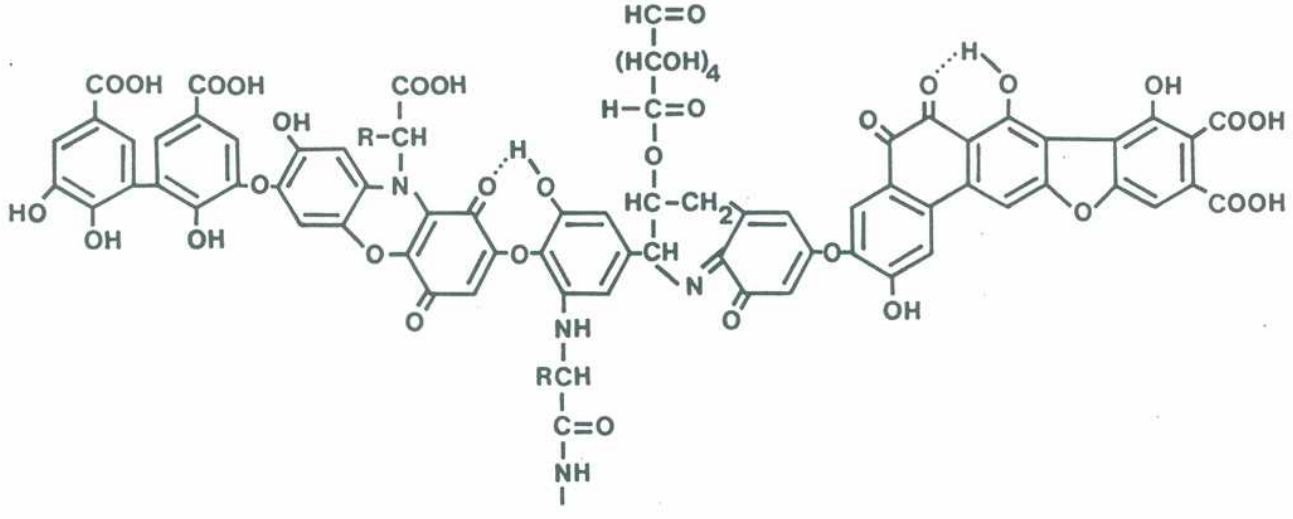


VII. Modelo de Stevenson (1982).

Como se puede apreciar en la figura 12, la estructura presenta ácidos fenólicos, orto y para quinonas unidas por puentes C-C, éter o amino. El nitrógeno y el oxígeno pueden encontrarse constituyendo heterociclos. A esta cadena central pueden estar unidos carbohidratos y péptidos.

Todos los modelos se han establecido sobre la base de estudios que involucran la aplicación y combinación de muchas técnicas (RMN, IR, rayos X, EPR, degradación y análisis de los fragmentos obtenidos por gas cromatografía o gas cromatografía-espectrometría de masa, etc.). La existencia de distintos modelos se debe a la gran complejidad de estas sustancias y al hecho de que no existe una sola estructura, puesto que cada ambiente las desarrolla obedeciendo a sus condiciones ecológicas particulares.

Figura 12: Modelo de Stevenson (1982).



CAPITULO II

SUSTANCIAS HUMICAS EN AGUAS NATURALES

Introducción

Los estudios comenzaron a realizarse en sustancias húmicas de suelos y en consecuencia, los correspondientes a sustancias provenientes de ambientes acuáticos surgieron siguiendo las mismas líneas metodológicas. Conservándose incluso, la definición de ácido húmico, fúlvico y humina. Sin embargo, el hecho de tratarse del medio acuoso y obviamente el de existir otra flora y fauna con condiciones particulares, obliga al planteo de líneas de acción dirigidas específicamente en este campo. Por lo tanto, se impone el desarrollo y la aplicación de métodos y técnicas en algunos casos sensiblemente diferentes respecto de los de suelos. La influencia de las sustancias húmicas en los ciclos biogeoquímicos y en la evolución de los cuerpos de agua, marca la necesidad de estudios profundos a nivel químico. Las investigaciones en relación a la estructura se han realizado, fundamentalmente, sobre la base de estudios degradativos y análisis de los fragmentos obtenidos, que en el caso de moléculas complejas puede inducir a errores de asignación en la molécula original, por transformación del fragmento durante el proceso o formación de "artifacts". Con el advenimiento y desarrollo de métodos analíticos, cromatográficos y espectrométricos que permiten trabajar sobre la sustancia sin someterla a tratamientos drásticos que la alteren, se ha avanzado y se espera mejorar el conocimiento sobre su estructura. Esta base posibilitará ahondar los estudios acerca de la función de las sustancias húmicas en el medio acuático.

Materia orgánica en aguas naturales

Si bien existe analogía con la materia orgánica de suelos en cuanto a la presencia del componente biológico, residuos

orgánicos y sustancias húmicas, en las aguas naturales se comienza por clasificarla como materia orgánica particulada (manejada en términos de carbono orgánico particulado) y materia orgánica soluble (en términos de carbono orgánico soluble). La división entre ambas es operacional, siendo el criterio generalizado aquel por el cual se considera soluble aquello que pasa a través de filtros de membrana de 0,45 µm de poro.

Integran la materia orgánica particulada los organismos comenzando con las bacterias y siguiendo con fito y zooplancton hasta los vertebrados (peces), al igual que los residuos orgánicos provenientes de deshechos y descomposición de estos organismos. Asimismo forman parte de dicha materia, los residuos incorporados de la cuenca de drenaje mediante los tributarios. De esta manera se puede clasificar la materia orgánica en autóctona, generada dentro del mismo cuerpo de agua, y alóctona, de origen externo al ambiente acuático en estudio.

La materia orgánica soluble, que también puede ser autóctona o alóctona, está constituida por compuestos orgánicos originados por descomposición y transformación de residuos orgánicos y por sustancias húmicas. Entre los primeros, pueden mencionarse hidratos de carbono, proteínas y diversos metabolitos, los cuales poseen la característica de ser biodegradables y de peso molecular relativamente bajo. Las sustancias húmicas, por su parte, son de mayor peso molecular, generalmente no biodegradables y constituyen alrededor del 70-80% de la materia orgánica soluble (Münster, 1985). Cabe destacar que teniendo en cuenta datos de diversos cuerpos de agua, se observa que comparando el carbono orgánico particulado y el soluble, la relación entre ambos es de 1:6 a 1:10, señalando una mayor proporción de materia orgánica soluble (Wetzel, 1981).

En la figura 13 se encuentra esquematizado el ciclo del carbono en cuerpos de agua. En el mismo se pone en evidencia la entrada y salida del sistema de sustancias húmicas y otros materiales, la entrada de carbono vía fotosíntesis y las transformaciones que se producen en el agua y el sedimento, que entre otras cosas, promueven la formación de sustancias húmicas autóctonas.

Sustancias húmicas presentes en ambientes acuáticos

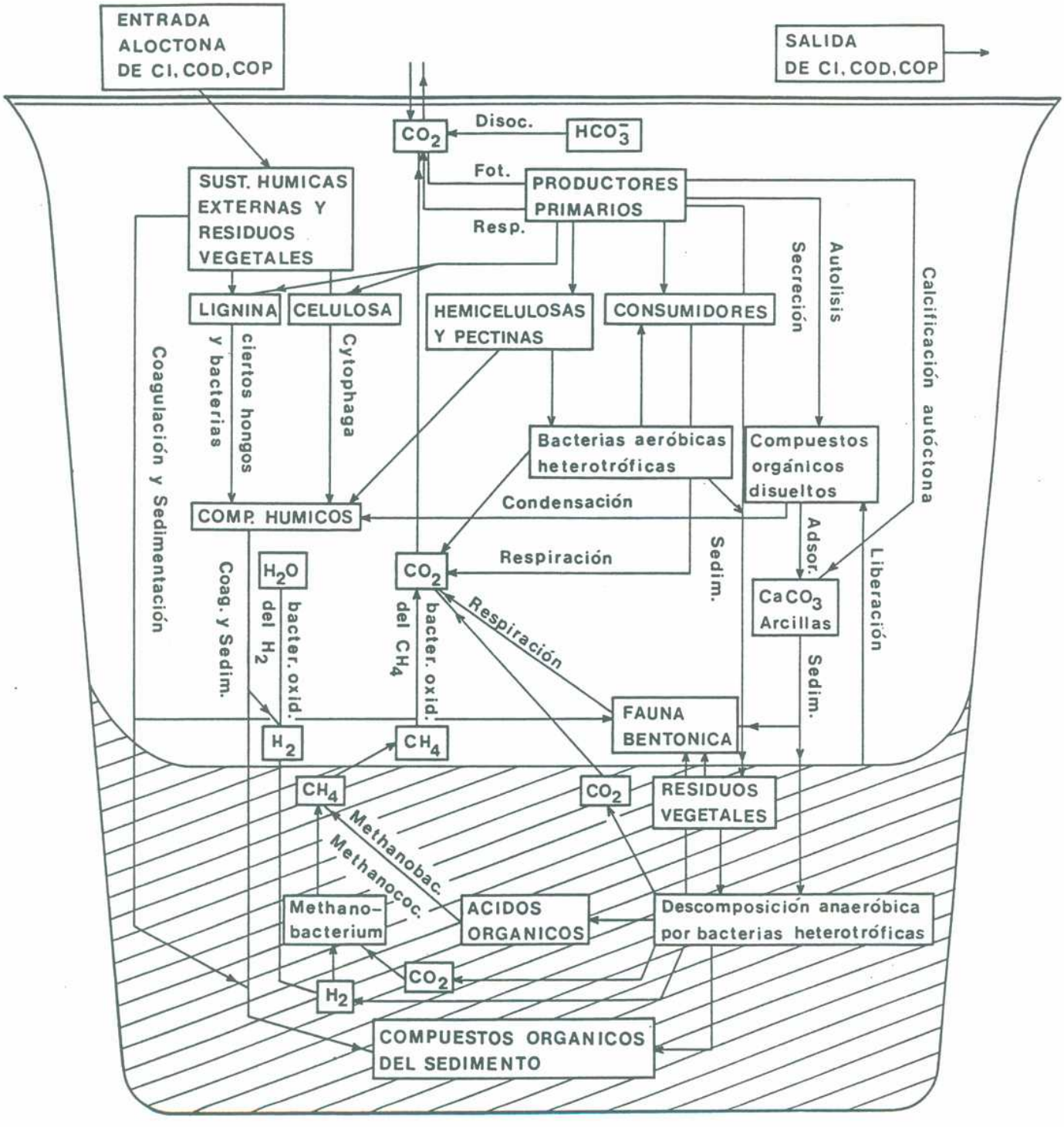
Las sustancias húmicas presentes en un cuerpo de agua pueden tener origen alóctono y autóctono. En el primer caso, las sustancias húmicas provienen, fundamentalmente, de los suelos de la cuenca de drenaje transportados por los afluentes al sistema. Estas sustancias al ser incorporadas al medio acuoso se enfrentan a nuevas condiciones, entre las que se pueden mencionar las siguientes:

- *pH*. Las aguas naturales tienen un rango de pH entre 6 y 10 aproximadamente.

- *Salinidad*. La concentración de sales tiene un rango amplio. Se puede encontrar aguas con concentraciones entre 50 mg/l hasta 40 g/l, superando la salinidad de las aguas marinas.

- *Redox*. En las aguas naturales existen condiciones de ambiente oxidante por la presencia de oxígeno disuelto. La concentración de este último depende de la solubilidad a una determinada temperatura, presión y composición química del agua. Puede ocurrir que dicha concentración alcance niveles de sobresaturación debido a fenómenos de turbulencia inducidos por el viento o a la actividad fotosintética.

Figura 13: Ciclo del carbono orgánico en ambientes acuáticos. CI: carbono inorgánico, COD: carbono orgánico disuelto, COP: carbono orgánico particulado.



Por el contrario, en ambientes con estratificación térmica de verano (sin mezcla vertical que permite la llegada de oxígeno disuelto hasta el fondo), por debajo de cierta profundidad comienzan a estar favorecidas las condiciones reductoras, debido a que, en ausencia de fotosíntesis (asimilación de dióxido de carbono y liberación de oxígeno al medio) prevalece la actividad respiratoria (asimilación de oxígeno y liberación de dióxido de carbono), que en algunos casos provoca anoxia cerca del sedimento del fondo.

- *Material particulado en suspensión*, también denominado seston, está integrado por el componente orgánico y el componente inorgánico formado por una gran variedad de minerales (óxidos metálicos, silicatos, carbonatos, etc.). En las aguas naturales existe un amplio rango en la concentración de material particulado en suspensión, desde el miligramo por litro hasta los 100 mg/l, como ocurre en algunas lagunas de la Provincia de Buenos Aires.

Teniendo en cuenta estas variables, la fracción humina (insoluble en agua) de las sustancias húmicas provenientes del suelo (alóctonas), al ingresar al medio acuoso formará parte de la materia orgánica particulada, mientras que los ácidos húmicos y fúlvicos permanecerán en solución. De acuerdo al pH, los grupos carboxilos y fenólicos de ambos ácidos, se encontrarán ionizados y debido a los cambios en el potencial redox, podrán sufrir procesos de óxido-reducción. Considerando el material particulado en suspensión, pueden desarrollarse fenómenos a nivel de superficie: adsorción, formación de complejos, coprecipitación, etc. Los ácidos húmicos y fúlvicos que participen en estos fenómenos pasarán a integrar dicho material particulado.

Además de las sustancias húmicas de origen alóctono existe producción de sustancias húmicas autóctona (dentro del

mismo cuerpo de agua). En la formación de las mismas intervienen las reacciones y procesos de una manera análoga a la descripta para suelos, donde la materia orgánica utilizada como fuente proviene en gran parte de la descomposición algal, cuyas paredes celulares tienen estructura similar a la lignina. Comparando las sustancias húmicas del suelo con las del agua , se observa que existen diferencias debidas a las condiciones del medio y a la estructura de la materia orgánica fuente, promoviendo que las sustancias húmicas acuáticas tiendan a ser más alifáticas, menos aromáticas, pobres en grupos fenólicos y en carbono y ricas en nitrógeno, azufre, hidrógeno y en grupos carbonilo y carboxilo (Otsuki y Hanya, 1967; Rashid y King, 1970; Rashid y Prakash, 1972; Nissembaum y Kaplan, 1972; Jackson, 1975).

CAPITULO III

AISLAMIENTO Y PROPIEDADES DE LAS SUSTANCIAS HUMICAS

Introducción

Los estudios acerca de las sustancias húmicas acuáticas son relativamente recientes en limnología. En un principio se consideraba la materia orgánica disuelta total (Birge y Juday, 1926, 1934; Ohle, 1933, 1934), de la cual las sustancias húmicas constituyen la fracción presente en mayor porcentaje, a través de parámetros como color, demanda química de oxígeno y carbono orgánico total. Parámetros que si bien son útiles, en muchos casos no son suficientes para el estudio y caracterización de las sustancias húmicas acuáticas. De igual manera puede resultar insuficiente la definición tradicional proveniente de los estudios de suelos, basados en el fraccionamiento de acuerdo a las solubilidades frente a ácidos y bases. El empleo de técnicas cromatográficas conduce a fraccionamientos que permiten una mejor caracterización.

A pesar de que cada ambiente, de acuerdo a las condiciones ecológicas, genera sustancias húmicas de características estructurales particulares, existen propiedades que son comunes a todas estas sustancias. Las propiedades, que a continuación se mencionan, están en relación a que las sustancias húmicas son polímeros con presencia, en general, de grupos carboxílicos, fenólicos, hidroxilos y metoxilos en su estructura.

Fraccionamiento de Sustancias Húmicas

El primer paso en el estudio de las sustancias húmicas en ambientes acuáticos, lo constituye el fraccionamiento de las mismas, que consiste en la separación de las distintas fracciones que las integran. Comunmente se realiza por cromatografía en geles y tiene por finalidad determinar:

I. La caracterización de los ambientes

La identificación, determinación del número de fracciones y tamaño molecular de las sustancias húmicas, permiten la caracterización y diferenciación entre distintos cuerpos de agua, aventajando desde un punto de vista cualitativo, a la determinación del carbono orgánico total, resultando este último útil para el cómputo del flujo de carbono en estudios de balance de materia en un ecosistema.

Cabe destacar que en estudios de relevamiento en un cuerpo de agua, el fraccionamiento permite seguir las fluctuaciones a lo largo del tiempo y evaluar la influencia de fenómenos hidrológicos y climáticos sobre las sustancias húmicas.

II. El origen autóctono y alóctono

La presencia de sustancias húmicas en un cuerpo de agua léntico, puede deberse al aporte proveniente de la cuenca de drenaje (alóctono) y/o tener origen dentro del mismo (autóctono). Por lo tanto, el fraccionamiento llevado a cabo en los tributarios (afluentes) y en muestras del cuerpo de agua permitirá, por comparación de los picos, establecer el origen y a su vez el grado de influencia de la materia alóctona sobre el cuerpo de agua.

III. La influencia del pH y la fuerza iónica

El fraccionamiento de las muestras a distintos pH y concentraciones salinas permite seguir la influencia de estas variables en base a los cambios observados en los perfiles de elución cromatográficos.

IV. Los fenómenos de interacción

Esta es otra de las aplicaciones importantes del fraccionamiento, en que lo limitante está determinado por la separación entre los picos de sustancia húmica y los de la sustancia con la cual se desea estudiar la interacción. De modo que, si a través de una primera corrida de sustancia húmica y de una segunda corrida de la sustancia en estudio, se observa separación neta de los picos, se podrá efectuar una tercera que será la mezcla de ambas. Si existiera interacción, se observará un pico de la sustancia superpuesto con el de la sustancia húmica, en donde además, el área del mismo brindará información acerca de la magnitud de dicha interacción.

La técnica que se emplea para esta clase de investigaciones, es la cromatografía en geles, también llamada permeación por gel o filtración por gel. Esta técnica, simple y de bajo costo, ha resultado más efectiva en su aplicación para el fraccionamiento y caracterización de sustancias húmicas que otras técnicas como electroforesis en geles, cromatografía en papel o ultracentrifugación.

Entre los primeros en utilizar cromatografía en geles en sustancias húmicas figura Posner (1963), quien la aplicó a sustancias provenientes de suelos. Teniendo en cuenta que éstas poseen en su estructura anillos aromáticos capaces de inducir fenómenos de adsorción con los geles y que, por el contrario, su característica de polielectrolito provoca la existencia de efectos de repulsión con las cargas negativas del gel, Posner destacó la importancia del uso de electrolitos para eliminar estos efectos en el fraccionamiento de sustancias húmicas. Sus experimentos consistieron en efectuar el pasaje por Sephadex G-50 de la muestra disuelta en 0,05 N de cloruro de amonio y eluirla con

esta solución. Estos ensayos no le permitieron obtener un buen fraccionamiento, es decir, una buena separación entre fracciones de alto y bajo peso molecular. En un segundo pasaje utilizó la muestra disuelta en agua destilada y a la vez agua destilada como eluyente. Sólo obtuvo un pico completamente excluido, pues bajo estas condiciones, no se eliminan los efectos de repulsión de las cargas negativas y terminan por ser excluidas las fracciones, aún las de bajo peso molecular. En un tercer pasaje disolvió la muestra en cloruro de amonio 0,2 N y usó agua destilada como eluyente obteniendo un pico excluido (mayor peso molecular) y uno incluido (menor peso molecular) que salía inmediatamente después de los electrolitos. El autor pudo concluir que si bien es difícil elegir una concentración de electrolitos, es conveniente el empleo de los mismos para lograr un fraccionamiento efectivo.

A partir de estos resultados se comenzó a utilizar la cromatografía en geles, pero con criterios dispares en cuanto a las condiciones de la muestra a sembrar y a la elección del eluyente. Seguidamente se mencionan los principales trabajos que marcan una evolución en estos aspectos.

Gjessing (1965) empleó la cromatografía en geles para la estimación del peso molecular de sustancias húmicas provenientes de aguas de pantanos. La muestra concentrada a vacío fue pasada sin éxito a través de gel de Sephadex G-25 y G-50 ya que se producía adsorción irreversible o coagulación, visible en la forma de flóculos amarronados a lo largo de toda la columna. Hecho que relacionó con la carga negativa del gel que producía un efecto de desalado en la muestra con la consecuente coagulación de las sustancias. Sin embargo obtuvo resultados satisfactorios por pasaje de la muestra a través de gel de Sephadex G-75, G-100 y G-200 con agua como eluyente. En estas condiciones obtuvo dos picos que difieren considerablemente en su peso molecular.

Gjessing (1967) volvió a utilizar la cromatografía en geles en las mismas condiciones que en el trabajo anterior para comparar distintos cuerpos de agua y destacó la importancia de esta técnica para la clasificación y caracterización de las sustancias húmicas presentes en ambientes acuáticos.

Shapiro (1967) estudió las sustancias húmicas provenientes de 22 lagos de Minnesota. Estas fueron aisladas mediante intercambio iónico, liofilización, acidificación, extracción con butanol y por último evaporación del solvente. El residuo obtenido fue disuelto en hidróxido de amonio 0,5 M y se cromatografió en gel de Sephadex G-10, G-25, G-50 y G-75, empleando hidróxido de amonio 0,5 M como eluyente. En este trabajo no se observaron los inconvenientes de Gjessing (1967) y debido a la mayor resolución, se usó Sephadex G-50 para la comparación de los distintos cuerpos de agua. A pesar de no analizar las razones de estas diferencias, cabe destacar que Shapiro empleó hidróxido de amonio 0,5 M como eluyente, mientras que Gjessing agua destilada. Finalmente los perfiles de elución indicaron la existencia de cuatro tipos de comportamiento para los 22 lagos, los cuales difieren fundamentalmente, en la proporción de las fracciones de alto y bajo peso molecular.

Lindqvist (1967) realizó un estudio acerca de los efectos de la adsorción de las sustancias húmicas sobre el gel y sus consecuencias en la elución de fracciones. Puntualizó que todos los compuestos aromáticos son adsorbidos por el gel en mayor o menor grado y que la naturaleza poliaromática de las sustancias húmicas conduce a efectos serios de adsorción. Considera que Posner (1963) está en lo correcto cuando afirma que la adsorción tiene lugar en medio salino, pero que es errónea la interpretación de sus resultados. Los experimentos de Lindqvist parten de que en medio salino, las sustancias húmicas son fuertemente adsorbidas ocupando todos los sitios

disponibles del gel y recién después de ocupados todos los sitios, el resto de muestra pasa a través de la columna completamente excluida. Si se interrumpe el pasaje de solución salina y se comienza a eluir con agua destilada, las moléculas de sustancia húmica se liberan de los sitios de adsorción y se acumulan en el frente de disminución de fuerza iónica. En principio llevó a cabo los experimentos con gel de Sephadex G-15 que le permitió demostrar lo antedicho. Incluso reprodujo el experimento de Posner consistente en sembrar la muestra disuelta en NaCl 1 M. En estas condiciones obtuvo un primer pico excluido, mientras otra porción de la muestra era adsorbida debido al efecto iónico del NaCl. A medida que el NaCl va pasando a través de la columna, las moléculas de sustancia húmica dejan de estar adsorbidas y consecuentemente, bajan detrás del frente salino. Finalmente obtuvo el pico excluido de sustancias húmicas, el pico de NaCl e inmediatamente después, nuevamente el pico de sustancias húmicas. Concluyó entonces que el segundo pico de sustancias húmicas en las experiencias de Posner no es realmente un pico de sustancias húmicas de menor peso molecular sino un "artifact". En una segunda parte Lindqvist utilizó Sephadex G-100 y realizó pasajes de una muestra de sustancias húmicas que realmente poseían una fracción de mayor y otra de menor peso molecular. Logró la separación empleando como eluyente NaCl 0,05 M. Observó que al interrumpir la elución con solución salina y continuar con agua destilada aparecía el pico correspondiente a las sustancias húmicas adsorbidas durante el pasaje con solución salina. Mediante sucesivas experiencias, pudo demostrar que dicho pico estaba integrado por las de mayor y también por las de menor peso molecular.

Paralelamente decidió dializar la muestra de sustancias húmicas con el objeto de eliminar todo resto de sal y realizar un pasaje utilizando agua destilada como eluyente.

El resultado obtenido bajo estas condiciones, fue de una separación menos eficiente de ambas fracciones.

Como conclusión y sobre la base de que existe fuerte adsorción entre los geles de Sephadex y las sustancias húmicas (de mayor y de menor peso molecular), Lindqvist estableció como regla general, evitar gradientes salinos durante la separación. Por lo tanto, se debe usar solución salina como eluyente y descartar las sustancias húmicas adsorbidas (de mayor y de menor peso molecular) o emplear muestras dializadas y agua destilada como eluyente. Esta ha constituido una regla fundamental en los estudios posteriores que involucraron el uso de la cromatografía en geles.

Ghasemi y Christman (1968) realizaron estudios acerca de las propiedades de las sustancias húmicas acuáticas. Dichos trabajos incluyeron pasajes por Sephadex G-25, G-50, G-75 y G-100 de la muestra concentrada a vacío utilizando como eluyente NaCl 0,01 N a distintos pH ajustados con HCl o NaOH. Entre las conclusiones más importantes figuró la comprobación del aumento del tamaño molecular a medida que aumenta el pH.

Gjessing (1971) estudió el efecto del pH sobre el tamaño molecular de las sustancias húmicas mediante experimentos con geles y membranas de diálisis. Para ello, concentró la muestra de agua a vacío (200 veces) y luego la disolvió en soluciones de NaCl, Na_2SO_4, HCl, H_2SO_4, NaOH y NH_3, de esta manera obtuvo la muestra a distintos pH y fuerza iónica. Sus resultados, tanto por cromatografía en geles como por diálisis, demostraron el aumento del tamaño molecular con el incremento del pH. En una crítica hacia el trabajo de Lindqvist (1967) afirmó la no influencia de la fuerza iónica sobre el tamaño molecular y descartó fenómenos de adsorción, como consecuencia del uso de agua destilada como solvente que promueve la existencia de gradientes salinos en la columna. Sin embargo, del examen de sus propios datos de tabla, se comprueba la influencia de la fuerza iónica sobre el tamaño

molecular de las sustancias húmicas, al igual que la adsorción de las mismas en el gel.

A partir de estos estudios en numerosos trabajos se ha empleado la cromatografía en geles con los propósitos anteriormente mencionados, en los cuales se ha utilizado soluciones buffer como eluyentes. Estos terminaron por ratificar la influencia del pH sobre el tamaño molecular.

Con repecto a la fuerza iónica, Aho y Lehto (1984) realizaron, de manera de tener un amplio rango de salinidad, experimentos de dilución-concentración de una muestra proveniente de un cuerpo de agua, empleando la cromatografía en geles con agua como eluyente. Los resultados indicaron que conforme aumentaba la fuerza iónica, la elución de las sustancias húmicas se desplazaba hacia pesos moleculares más bajos. Esto fue corroborado con muestras provenientes de distintos cuerpos de agua de fuerzas iónicas similares a las obtenidas por dilución-concentración. La conclusión a la que llegaron los autores es que los cambios observados en los perfiles de elución se debieron a la interacción entre el gel y las sustancias húmicas y no a un cambio del tamaño molecular. Este artículo fue criticado por De Haan y col. (1987) quienes en su trabajo "Does ionic strength affect the configuration of aquatic humic substances, as indicated by gel filtration?", ponen de manifiesto que dichos autores emplearon agua como eluyente provocando el desarrollo de gradientes salinos en la columna y conduciendo a resultados erróneos de acuerdo a Lindqvist (1967). Consecuentemente son incorrectas las apreciaciones acerca de que los cambios en los perfiles cromatográficos se deben atribuir exclusivamente a interacciones entre el gel y las sustancias húmicas. En experimentos diseñados con solventes de distinta concentración salina y comparando resultados obtenidos mediante cromatografía en geles y diálisis, estos autores

comprueban la disminución real del tamaño molecular con el incremento de la fuerza iónica.

De modo que se demuestra la utilidad de la cromatografía en geles para los distintos estudios de sustancias húmicas mencionados al comienzo, siempre que las condiciones experimentales sean las de utilizar soluciones buffer que eviten cambios de pH y gradientes salinos en la columna. Trabajando al mismo pH y fuerza iónica existentes en el cuerpo de agua, las sustancias húmicas conservan la forma y el tamaño molecular que poseen en el medio natural.

Propiedades de las Sustancias Húmicas

En la tabla 1 se resumen las propiedades más importantes de las sustancias húmicas y los fenómenos asociados a estas propiedades en el medio ambiente.

- Formación de complejos

La existencia de grupos carboxilo e hidroxilo en la estructura molecular de las sustancias húmicas, permite la unión de tipo iónica y coordinada con metales, determinando la formación de complejos tipo quelato. En la tabla 2 figuran datos sobre las constantes de estabilidad. En realidad no son constantes termodinámicas, pues dependen de una serie de condiciones como el pH y la fuerza iónica. Entre los métodos para determinar estas constantes pueden mencionarse los que involucran técnicas voltamétricas (Chau, 1973; Brezonik y col., 1976; Campbell y col., 1977; Shuman y Woodward, 1977; Hanck y Dillard, 1977; Shuman y Cromer, 1979; Nürnberg, 1983; Sterrith y Lester, 1984; Florence, 1986; Lund y col., 1990; Filella y col., 1990), intercambio iónico (Guy y col., 1975; Crosser y Allen, 1977; Davis y Leckie, 1978),

Tabla 1: Propiedades y comportamiento de las sustancias húmicas presentes en ambientes acuáticos.

PROPIEDADES	COMPORTAMIENTO EN MEDIO AMBIENTE
- Formación de complejos	Biodisponibilidad, toxicidad.
- Asociación con metabolitos	Interacción con carbohidratos, proteínas, contaminantes hidrofóbicos, productos extracelulares, etc.
- Coagulación	Coagulación por cambios salinos (estuarios, sistemas fluviomarítimos).
- Fenómenos de superficie	Aumento de la estabilidad de coloides en procesos de coagulación. Efecto inhibitorio en fenómenos de disolución de rocas.
- Redox	Reductor, convierten metales a estados de oxidación menor.
- Fotoquímica	Participación en la formación de especies reactivas tales como oxígeno singulete, radicales orgánico peróxido, superóxido, peróxido de hidrógeno, etc.

Tabla 2: Ejemplos de constantes de estabilidad de sustancias húmicas con metales.

Origen	M	m	pH	log K	R
Lago Ontario	1	Cu	7,4	8,6	1
Lago Chapel Hill	1	Cu	6,0	5,0	1
Lagos Suizos	1	Cu	8,8	10,9	1
Río Newport	1	Cu	7,0	9,7	1
Río Neuse	1	Cu	6,8	7,6	1
Magela Creek (Australia)	1	Cu	6,0	7,6	1
Laguna Fontainebleau (Francia)	2	Cu	6,0	5,0	2
Laguna Fontainebleau (Francia)	2	Pb	6,7	6,0	2
Río Negro (Zaire)	2	Cu	6,0	4,8	2
Río Negro (Zaire)	2	Pb	6,8	5,5	2
Lago Celyn (Gales)	3	Cu	8,0	8,42	3
Lago Celyn (Gales)	3	Ni	8,0	5,14	3
Lago Celyn (Gales)	3	Zn	8,0	5,14	3
Lago Celyn (Gales)	3	Cd	8,0	4,57	3
Lago Celyn (Gales)	3	Hg	8,0	19,4	3
Lago Celyn (Gales)	3	Co	8,0	5,14	3
Lago Celyn (Gales)	3	Mn	8,0	4,85	3

M = Métodos: 1 = voltamétricos, 2 = electrodo específico, 3 = filtración por gel.

m = metal

R = Referencias: 1. Florence (1986).
2. Buffle y col. (1977).
3. Mantoura y col. (1978).

electrodos selectivos (Ramamoorthy y Kushner, 1975; Buffle y col., 1977; Bresnaban y col., 1978; Giesy y col., 1978; McCrady y Chapman, 1979; Saar y Weber, 1980a,b), solubilización (Kunkel y Manahan, 1973; Elder y col., 1976; Kerr y Quinn, 1980), diálisis (Truitt y Weber, 1981), filtración por gel (Mantoura y Riley, 1975b, 1978), ultrafiltración (Gamble, 1986a,b; Ephraim y Marinsky, 1990), fluorescencia (Seitz, 1981; Saar y Weber, 1980a,b; Senesi, 1990b) y respuesta biológica (Davey y col., 1973; Gillespie y Vaccaro, 1978; Gachter y col., 1978).

La propiedad de formar complejos es de decisiva importancia en el ciclo, transporte y biodisponibilidad de los metales, especialmente de los metales que se encuentran a nivel traza en el medio ambiente. De esta manera, la existencia de estos complejos evita que los metales formen óxidos insolubles y precipiten, permitiendo, a resultas del equilibrio químico, que cierta proporción del metal se encuentre libre para que el mismo pueda ser aprovechado por los organismos (Steinberg y Muenster, 1985; McCarthy, 1989; Perumal, 1992; Tomita, 1993; Warwick y col., 1993; Pettersson y col. 1993).

Cabe destacar, que en el caso de los metales tóxicos, la toxicidad está en directa relación con la concentración de los mismos en forma libre, o sea iónica. Por lo tanto la formación de complejos, como los obtenidos con sustancias húmicas, disminuyen el poder tóxico constituyendo un factor positivo en el ambiente (Steinberg y Muenster, 1985; Starodub y col., 1987; McCarthy, 1989; Witters y col., 1990; Garvey y col., 1991; Goodrich y col., 1991; Florence y col., 1992; Ortego y Benson, 1992). Sin embargo, la ocurrencia de marea roja en los mares (floración o crecimiento desmedido de una especie algal perteneciente al grupo de los Dinoflagelados) se asocia en parte a la presencia de sustancias húmicas. Esto se basa en que la concentración de cobre normalmente presente

en el mar es suficiente para atemperar el crecimiento exagerado de algas, motivo por el cual, la formación del complejo con las sustancias húmicas terminaría por disminuir el efecto regulador del mismo (Carreto, 1987).

Un experimento muy concluyente, referido a la influencia de la formación de complejos y la toxicidad, es el expuesto en la figura 14 (Allen, y col., 1980). En el mismo, un cultivo del alga *Microcystis aeuroginosa* es sometida a una concentración tóxica de Zn conteniendo concentraciones variables de un quelante, el ácido nitrilo triacético (NTA). Se observa que a partir de una determinada concentración de NTA, el Zn ya no tiene influencia negativa en el crecimiento algal.

- **Asociación con metabolitos**

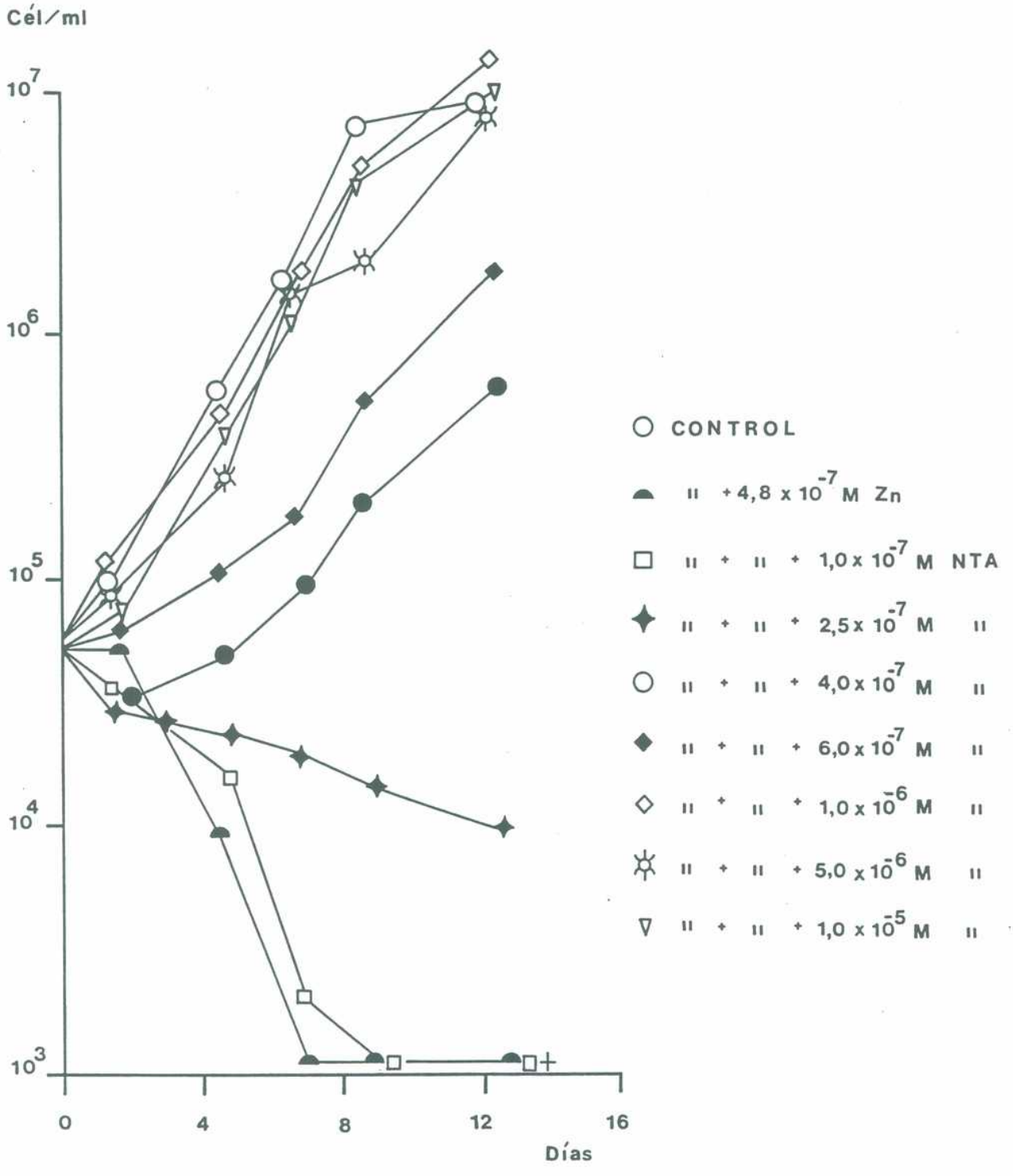
La presencia de grupos polares permite la interacción por puente hidrógeno y fuerzas de van der Waals, con carbohidratos, proteínas, productos extracelulares, etc. (De Haan y De Boer, 1978, 1979; Lytle y Perdue 1981), interviniendo al igual que con los metales, en la biodisponibilidad y ciclo geoquímico de las mismas (Steinberg y Muenster, 1985; McCarthy, 1989; Manahan, 1989).

Asimismo pueden asociarse con contaminantes hidrofóbicos, como en el caso de pesticidas, disminuyendo la disponibilidad para los organismos y en consecuencia el poder tóxico (Carter y Suffet, 1982; Hasset y Milicic, 1985; Lara y Ernst, 1989; Sabljic y col., 1989; Caron y Suffet, 1989; Wang y col., 1990; Matthews y col., 1995; Kopinke y col., 1995).

- **Coagulación**

Las sustancias húmicas, al igual que muchos polímeros naturales, pueden coagular por influencia de los cambios de

Figura 14: Crecimiento de *Microcystis aeruginosa* en un medio conteniendo concentraciones crecientes de Zn y de sal sódica del ácido nitrilotriacético (NTA).



concentración salina y pH del medio. La magnitud de la coagulación depende del peso molecular y otras características químicas del polímero (Tipping y Ohnstad, 1984), siendo particularmente importante en estuarios y sistemas fluviomarítimos. La coagulación de las sustancias húmicas implica además, la coprecipitación de metales complejados, oligoelementos y otras sustancias asociadas (Sholkovitz, 1976; Sholkovitz y Copland, 1981), incidiendo en definitiva en los ciclos geoquímicos respectivos.

- Fenómenos a nivel de superficie

Muchos de los procesos que ocurren en el medio ambiente, se producen a través de reacciones que tienen lugar en la interfase, a través de reacciones redox, ácido-base o formación de complejos. Así por ejemplo, los iones metálicos presentes en la superficie de óxidos -que actúan como ácidos de Lewis- pueden reemplazar sus iones hidroxilos de coordinación, mediante reacciones de intercambio de ligandos, con aniones o ácidos débiles. Este fenómeno tiene influencia en los procesos de coagulación durante el tratamiento de aguas para potabilización, debido a que la asociación entre coloides y sustancias húmicas provoca el aumento de la estabilidad, pues estas últimas forman una cubierta protectora que impide el acercamiento y aglomeración necesarias para una coagulación eficiente (Suffet y MacCarthy, 1989). En gran medida, impedimentos de este tipo en cuerpos de agua, previenen la formación de carbonato de calcio insoluble (Küchler-Krischun y Kleiner, 1990).

Otro ejemplo lo constituye la disolución de rocas, que se encuentra favorecida por la presencia de microorganismos. Los mismos por respiración producen dióxido de carbono incrementando la acidez y al mismo tiempo formando metabolitos como oxalatos, citratos, etc., que se comportan

como complejantes. Ambos procesos conducen a la solubilización de los minerales. Sin embargo la presencia de sustancias húmicas, en especial de ácidos húmicos (mayor peso molecular), determina luego de ser adsorbidas en la superficie de la partícula, efectos de protección frente a la disolución de la misma (Stumm, 1987). De igual manera, la adsorción de las sustancias húmicas al material particulado en suspensión en los cuerpos de agua, provoca la alteración de las propiedades de la partícula (Amy y col., 1989; Zhou y col., 1994; Shaw, 1994; Davis y Bhatnagar, 1995), modificando entonces su comportamiento en el medio acuático.

- **Redox**

Las sustancias húmicas pueden comportarse como reductor de algunos cationes, es decir convertirlos a estados de oxidación menor (Szilágyi, 1971; Skogerboe y Wilson, 1981; Deng y Stumm, 1994).

Cabe mencionar el ejemplo del plutonio que, como es sabido, es un elemento que se produce en reacciones nucleares. Llega al medio ambiente a través de explosiones de armas nucleares y también como deshecho de centrales nucleares y de plantas de tratamiento de combustible nuclear. Este elemento puede encontrarse en estados de oxidación III, IV, V y VI. En las aguas marinas prevalece el estado V, de manera que una vez introducido en estado VI pasa inmediatamente al estado V. En caso de existir en el medio sustancias húmicas, éstas promueven la reducción a estado IV, que tiende a hidrolizarse y desaparecer de la fase acuosa. Aparentemente se establece una competencia entre el pasaje de VI a V y la formación de un complejo entre el VI y las sustancias húmicas previo a la reducción. Dicha formación es más probable a medida que se incrementa la concentración de sustancias húmicas (Morse, 1987). Por lo tanto, el caso del

plutonio constituye un ejemplo de la influencia de las sustancias húmicas en el ciclo de este elemento, no sólo a través de su propiedad redox, sino también en su capacidad de formación de complejos.

- Fotoquímica

Las sustancias húmicas tienen un espectro de absorción caracterizado por una fuerte absorción en el ultra violeta, que decrece hacia el visible hasta llegar aproximadamente a los 500 nm. Se ha observado que por absorción de la luz solar entre 300-500 nm, las sustancias húmicas pueden participar en la formación de especies reactivas tales como oxígeno singulete, radicales organoperóxido, superóxido, peróxido de hidrógeno, etc. (Cooper y col., 1989). Las posibles reacciones fotoquímicas son las siguientes, donde SH son las sustancias húmicas y R un radical orgánico:

$$^1SH \xrightarrow{luz} {}^1SH^*$$
$$^1SH^* \longrightarrow {}^3SH^*$$
$$^3SH^* + {}^3O_2 \longrightarrow {}^1SH^* + {}^1O_2$$
$$^3SH^* \longrightarrow (SH^{+}\cdot + e^-)$$
$$(SH^{+}\cdot + e^-) \longrightarrow (SH^{+}\cdot + e\ aq^-)$$
$$O_2 + e\ aq^- \longrightarrow O_2^{-}\cdot$$
$$^3SH^* + {}^3O_2 \longrightarrow SH^{+}\cdot + O_2^{-}\cdot$$
$$^1SH + {}^1O_2 \longrightarrow SH^{+}\cdot + O_2^{-}\cdot$$
$$^3SH^* + RNH_2 \longrightarrow SH^{-}\cdot + RNH_2^{+}\cdot$$
$$SH^{+}\cdot + {}^3O_2 \longrightarrow SHO_2^{+}\cdot$$
$$SHO_2^{+}\cdot + RH \longrightarrow SHO_2H + R^{+}\cdot$$

Las especies reactivas formadas son de gran interés, puesto que pueden provocar transformaciones químicas en contaminantes orgánicos presentes en las aguas naturales (Hoigné y col. 1989).

Influencia de las Sustancias Húmicas en procesos de tratamiento de aguas para consumo humano

Entre los temas aplicados relacionados a las sustancias húmicas, figura la influencia de las mismas en los procesos de potabilización de aguas para consumo. Las sustancias húmicas son componentes normales del medio natural y no resultan nocivas para el ser humano. No obstante, superando ciertos niveles de concentración, pueden traer aparejados una serie de inconvenientes y terminar involucradas en fenómenos relacionados a la contaminación, algunos de los cuales pasamos a detallar:

I. Disminución de la capacidad de las resinas de intercambio iónico.

Es de importancia en las plantas industriales que necesitan agua desmineralizada para utilizarla por ejemplo, en procesos de refrigeración. La condición de polielectrolitos a pH neutro y alcalino, provoca la disminución de la capacidad de las resinas de intercambio iónico, específicamente de la resina de intercambio aniónica (Wilson, 1959; Fu y Symons, 1989). En consecuencia, obliga a la regeneración de las mismas con más frecuencia, dificultando los procesos y aumentando la cantidad de sales a eliminar luego de las sucesivas regeneraciones.

II. Imparten un color estéticamente indeseable en las aguas potables.

Esta circunstancia obliga a intensificar el proceso de coagulación (Vik y Eikebrokk, 1989), el tratamiento con carbono activo (Weber y Smith, 1989) o resinas de intercambio iónico (Odegaard y Thorsen, 1989).

III. Dificultan el proceso de coagulación por el aumento de estabilidad de los coloides.

De acuerdo a las propiedades descriptas, las sustancias húmicas pueden adsorberse en la superficie de los coloides y aumentar su estabilidad frente a la coagulación, implicando un incremento de la dosis de coagulante, por ejemplo sulfato de aluminio, durante el proceso de potabilización (Weber y Jodellah, 1985; Kim y col., 1989; Dempsey, 1989).

IV. Compiten con otros contaminantes en el proceso de adsorción con carbono activo.

En los casos en que el proceso de potabilización incluye el tratamiento con carbono activo granulado, con el objeto de eliminar contaminantes orgánicos (por ejemplo organoclorados), las sustancias húmicas ejercen competencia por los sitios de adsorción disminuyendo la eficiencia de este tratamiento (Weber y Smith, 1989; Pirbazari y col., 1989; Zimmer y col., 1989).

V. Formación de trihalometanos

Los trihalometanos se forman durante la etapa de cloración en el tratamiento de potabilización (Rook, 1976; Stevens y col., 1989). La reacción halofórmica se produce a partir de precursores orgánicos presentes, por ejemplo en anillos aromáticos que poseen dos grupos hidroxilo en posición meta, al igual que ciclohexano con la siguiente configuración: $-CO-CH_2-CO-$.

En la tabla 3 se puede apreciar la formación de cloroformo en moléculas que presentan dichos precursores y la influencia del pH en la reacción. Las sustancias húmicas al poseer en su estructura formas precursoras, son las

principales responsables de la formación de trihalometanos durante la etapa de cloración antedicha. Dado que los trihalometanos son cancerígenos, se impone la necesidad de prevenir su formación. Por tal motivo, una de las soluciones consiste en eliminar las sustancias húmicas en la etapa de coagulación previo al tratamiento con cloro. En la tabla 4 se observa la diferencia entre agua sin tratar y agua sometida a coagulación. A pesar de que la coagulación no ha sido efectiva -sólo elimina el 17% del carbono inicial- evidentemente la fracción coagulada poseía la mayor proporción de las formas precursoras en razón de que la concentración de trihalometanos se redujo casi a la mitad. Lo más efectivo, tanto en la eliminación de carbono como en la formación de trihalometanos, según puede apreciarse en la tabla 4, lo constituye el tratamiento de las aguas con resina de intercambio iónico. Consecuentemente surge el inconveniente de la regeneración de las mismas que debe llevarse a cabo con cantidades elevadas de cloruro de sodio, sal que, luego de su utilización al ser deshechada, se convierte en otro contaminante del medio.

Otra forma de evitar la generación de trihalometanos, es el tratamiento con ozono luego de la etapa de coagulación, con el objeto de emplearlo como preoxidante de la materia orgánica para disminuir la presencia de formas precursoras en el momento del tratamiento con cloro (Kruithof y col., 1989). También es posible prevenir la formación, haciendo pasar el agua por carbono activo como complemento de la coagulación y previo a la etapa de cloración (Jodellah y Weber, 1985; Lykins y Clark, 1989). Teniendo en cuenta la volatilidad de los trihalometanos, se podría pensar en eliminarlos por aireación de las aguas luego de la cloración, pero el costo de la operación hace impracticable este tratamiento.

Atendiendo a los problemas anteriormente mencionados en relación a la formación de trihalometanos, se presenta la

necesidad de elegir convenientemente la combinación de tratamientos frente a una determinada calidad de agua.

Tabla 3: Formación de cloroformo (%) luego de 4 horas de cloración a 10 °C.

SUSTANCIA	pH 7,5	pH 11
Resorcinol	75	80
Catecol	traza	5
Hidroquinona	traza	26
Pirogalol	traza	5
Dimedona	85	100
1,3-ciclohexanodiona	50	71
1,3-ciclohexananodiol	0	0
1,2-ciclohexanodiona	0	0
1,4-ciclohexanodiona	0	14

Tabla 4: Eliminación de la reacción halofórmica por remoción de la materia orgánica. COT: carbono orgánico total presente en el agua, THM t: trihalometanos total.

Tipo de agua	COT mg/l	$CHCl_3$ µg/l	$CHCl_2Br$ µg/l	$CHClBr_2$ µg/l	$CHBr_3$ µg/l	THM t µg/l
Sin tratar	5,9	65	19	10	6	100
Coagulación, 11 mg/l Fe	4,9	28	13	8	6	55
Pasada por resina	2,6	9	5	traza	0	14

CAPITULO IV

DESCRIPCION Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Introducción

El objeto del presente trabajo es el de contribuir al conocimiento de las sustancias húmicas de ambientes acuáticos, en especial de cuerpos de agua pertenecientes al sistema del Río Salado de la Provincia de Buenos Aires, cuenca situada en la unidad geomorfológica de la Pampa deprimida. Las condiciones climáticas, hidrológicas y geológicas favorecen la generación y presencia de las mismas en dichos ambientes. El estudio se realizó considerando los siguientes aspectos:

I. Estudio del comportamiento de las sustancias húmicas en su ambiente natural.

En esta parte se consideraron las sustancias húmicas presentes en ambientes lénticos y lóticos, evaluando los factores involucrados en la distribución y variación de la concentración a lo largo del tiempo.

II. Estudio de las propiedades de las sustancias húmicas.

En base a experimentos de laboratorio, se estudiaron ciertas propiedades, con el objeto de extrapolar los resultados al comportamiento que las sustancias tienen en el medio natural.

III. Estudios estructurales del ácido fúlvico aislado de la Laguna del Burro.

Se realizaron determinaciones analíticas, espectrométricas y degradaciones sobre sustancias húmicas aisladas y purificadas de las aguas de la Laguna del Burro,

laguna libre de influencia humana, con el propósito de formular una estructura para estas sustancias.

Terminología y definiciones

En el presente trabajo se emplean términos relacionados a cuerpos de agua cuyas definiciones y conceptos, extraidos de Ringuelet (1962), Vallentyne (1978), Wetzel (1981) y Margalef (1983), se detallan a continuación.

Limnología es el estudio científico de las aguas naturales continentales. La palabra deriva del griego limne y hace referencia a una divinidad griega asociada a las aguas. En sentido amplio, es el estudio de la productividad de las comunidades bióticas de las aguas dulces en relación a los parámetros físicos y químicos ambientales.

Ambiente léntico o lenítico, del latín lentus, contracción de lenitus que significa lento, perezoso, calmo. Es decir es un cuerpo de agua estancado, carente de un gradiente de las condiciones físicas, químicas y biológicas en una dirección definida, que posee un circuito metabólico que se cierra y completa en sí mismo. Son ejemplos: lago, laguna, pantano, estero, bañado, embalse (lago artificial) y estanque (laguna artificial).

Ambiente lótico, del griego lotio que significa lavado. Se caracteriza por mostrar un desplazamiento de las aguas en una dirección determinada, carece de período prolongado de estancamiento y su capacidad biogenética es relativamente baja. Las condiciones cambian desde las nacientes hasta la desembocadura con un gradiente definido de los factores físicos, químicos y biológicos. Ejemplos: río, arroyo, arroyuelo, canal y acequia.

Lago, es un cuerpo de agua léntico, estable, sin comunicación directa con el mar, que posee: lecho o plataforma, talud y llanura béntica (fondo), un perfil térmico definido, sedimento característico y un complejo litoral o periférico con hidrófitas (plantas acuáticas) arraigadas, a diferencia del complejo béntico o profundo que carece de las mismas. En verano puede mostrar estratificación térmica, que implica la existencia de una capa superior llamada epilimnio, superpuesta a la capa del salto térmico o metalimnio donde el punto de inflexión de dicho salto se denomina termoclina. Ambas capas están por encima de la capa profunda o hipolimnio. El epilimnio, donde tiene lugar el proceso de fotosíntesis, es la capa productora o trofógena (que engendra alimento), mientras que en las otras dos capas al no llegar luz y por lo tanto, no existir fotosíntesis, predomina el fenómeno de respiración (descomposición de la materia orgánica). Esta última es la zona que se conoce como trofolítica.

Laguna, es un cuerpo de agua léntico permanente o transitorio, sin estratificación térmica persistente, de circulación continua (mezcla vertical), sin diferenciación entre región litoral y profunda o ésta es sólo cuantitativa. Debido a su escasa profundidad, con un perfil en forma de U muy abierta, de palangana o bañera, ofrece en todo su ámbito condiciones para el desarrollo de la vegetación arraigada.

Plancton es la comunidad de microorganismos constituida por vegetales (fitoplancton) y animales (zooplancton), que habita la zona libre de los ambientes lénticos y lóticos.

Floración es el aumento repentino de algas en los estratos superiores del cuerpo de agua.

Zona eufótica es la profundidad a la que llega el 1% de la luz incidente en superficie.

Lectura del disco de Secchi se denomina a la profundidad en la cual un disco de 20 cm de diámetro desaparece de la vista. El disco está dividido en cuatro secciones iguales, dos de las mismas son de color blanco y las otras dos de color negro. Dicha profundidad tiene relación con la transparencia del agua y la lectura obtenida multiplicada por tres, es aproximadamente, la zona eufótica del cuerpo de agua en estudio.

Nivel trófico, el término proviene de trofos: alimento, que trasladado a los cuerpos de agua se refiere al nivel de concentración de nutrientes y productividad, o sea a su grado de fertilidad. De acuerdo a este nivel los ambientes acuáticos se clasifican en oligotróficos y eutróficos, con un nivel intermedio entre ambos que es el mesotrófico.

Oligotrófico, es el propio de lagos de regiones montañosas, profundo, con orillas abruptas, volumen del hipolimnio mayor al epilimnio, agua transparente, escasa concentración de sales, poco nitrógeno y fósforo, pH alrededor de 7, elevada concentración de oxígeno disuelto (que disminuye gradualmente hacia el fondo), escasa hidrofitia, plancton numéricamente pobre y productividad en peces no mayor de 10 kg por hectárea y por año.

Eutrófico, es el nivel típico de lagos de llanura, poco profundo, con orillas de suave declive, epilimnio con más volumen que el hipolimnio, de escasa transparencia, elevadas concentraciones de sales, de nitrógeno y de fósforo, con pH mayor de 7, una concentración de oxígeno disuelto que disminuye abruptamente hacia el fondo, abundante hidrofitia

litoral, plancton numéricamente rico, floraciones algales y con una productividad en peces superior a 50 kg por hectárea y por año.

Un cuerpo de agua puede experimentar una sucesión de oligotrofía a eutrofía, en cuyo caso se dice que ocurre un proceso de maduración o eutroficación. Este proceso, que si bien puede suceder naturalmente en largos períodos de tiempo, se acelera por influencia de la actividad humana. Los factores más importantes son las aguas residuales, tanto domésticas como industriales, y las aguas sobrantes en la agricultura que han sido enriquecidas con abonos. En estos últimos tiempos, el uso masivo de detergentes ha sido la causa de un rápido incremento de fósforo en muchos lagos, produciendo en consecuencia gravísimos problemas de eutroficación. Entre estos problemas pueden mencionarse las floraciones algales indeseables, el decaimiento del oxígeno hipolimnético con el favorecimiento de la producción de metano y ácido sulfídrico, y el avance de las plantas acuáticas con disminución de la superficie del espejo de agua.

I. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LAS SUSTANCIAS HUMICAS EN SU AMBIENTE NATURAL

Introducción

En esta parte y para estudiar el comportamiento de las sustancias húmicas en el medio ambiente, se procedió a realizar un relevamiento de las mismas en distintos cuerpos de agua de la Provincia de Buenos Aires.

Cabe destacar, que el relevamiento consiste en realizar determinaciones de ciertos parámetros en el medio en un momento determinado. El número y clase de variables escogidas depende del objetivo perseguido, que puede ser específico, cuando se pretende estudiar el comportamiento de una variable en función de las demás, o general, si la idea es tener un conocimiento global del funcionamiento del sistema. Con los datos obtenidos se procede a efectuar tratamientos estadísticos pudiendo ser desde una correlación simple hasta correlaciones múltiples. En los estudios generales, en donde tiene importancia conocer el grado de interdependencia entre las variables, suele ser muy útil el análisis de componente principal. La elaboración de estos datos conduce a la obtención de modelos de carácter predictivo y/o al conocimiento de la interdependencia de variables que plantea nuevos objetivos o sugiere experimentos de laboratorio, en este caso, bajo condiciones controladas.

En el presente trabajo, se han realizado relevamientos en la Laguna de Chascomús, sus arroyos tributarios y en el Río Samborombón, con el objeto de estudiar algunas características del comportamiento de las sustancias húmicas, en ambientes lénticos como así también lóticos.

En dichos relevamientos, las variaciones en la concentración de sustancias húmicas se siguieron mediante la absorción a 250 nm, aprovechando la presencia de núcleos aromáticos que absorben a dicha longitud de onda, y a 365 nm, dada la absorción que presentan en el visible (De Haan y col., 1982).

Otra manera indirecta de registrar las sustancias húmicas fue a través de las unidades color. Con respecto al parámetro color en las aguas naturales, es necesario tener en consideración la diferencia entre el color aparente y el color verdadero. El color aparente está integrado por las sustancias que imparten color y por el material en suspensión o turbidez. De manera que eliminando la turbidez por filtración, se obtiene el color verdadero, es decir las sustancias que realmente otorgan el color a las aguas y que son responsables de la absorción de luz en el visible. En las aguas naturales, las sustancias que por excelencia constituyen el color verdadero son las sustancias húmicas, que imparten a las mismas un color pardo amarillento característico. La forma de evaluar este color es por comparación visual, utilizando patrones de cloroplatinato de potasio, donde una unidad color equivale a la concentración de 1 miligramo de platino por litro (capítulo V parte experimental).

Se ha recurrido además, a la medición de la demanda química de oxígeno para seguir las fluctuaciones de las sustancias húmicas, para ello se asume que prácticamente toda la materia orgánica soluble está integrada por estas sustancias (Münster, 1985). La demanda química de oxígeno, también llamada oxidabilidad, es el oxígeno consumido del oxidante (permanganato) necesario para oxidar la materia orgánica y se expresa en miligramos por litro de oxígeno consumido.

Estudios realizados en la Laguna de Chascomús

La Laguna de Chascomús (35° 36' S, 58° O) se encuentra localizada en la Provincia de Buenos Aires, pertenece a la cuenca del Río Salado y yace en la unidad geomorfológica Pampa deprimida (Frenguelli, 1950), en la cual existe una

gran variedad de lagunas pampásicas, que difieren en su origen y en sus características químicas y biológicas de acuerdo a Ringuelet (1962, 1968, 1972) y Ringuelet y col. (1967). Detalles sobre su morfometría, pueden observarse en la tabla 5 (Dangavs, 1976).

Esta laguna posee las características de un escosistema eutrófico y como tal es un cuerpo de agua alcalino, con elevada concentración de nutrientes, material particulado en suspensión y biomasa algal (fitoplancton). Asimismo se encuentra colonizada por abundante vegetación acuática (macrófitas) sumergida (*Potamogeton*, *Ceratophyllum*, *Myriuphillum*) y emergente (*Scirpus californicus*). Según datos del año 1966 (Dangavs, 1976), la zona litoral cubierta por plantas acuáticas alcanzó 3,93 Km^2.

En la tabla 6, pueden apreciarse los datos de parámetros químicos relacionados a la calidad de agua obtenidos para el período de estudio que abarcó desde julio 1983 a enero de 1985 (Conzonno y Claverie, 1990), donde la biomasa algal se encuentra expresada en términos de clorofila *a*, y la capacidad de producción de materia orgánica vía fotosíntesis por parte de dicha biomasa, en miligramos de carbono por metro cuadrado y por día (Conzonno y Claverie, 1987/8). La composición del fitoplancton estuvo dominada por especies de Cyanophyta (características de ambientes eutróficos) con un valor medio de 526.000 células por mililitro que representó el 86% de la población algal, seguido por Chlorophyta (10%) y Chrysophyta (3%) (Claudia Intartaglia, 1986).

En la figura 15 puede observarse que la Laguna de Chascomús posee los afluentes: Arroyo Vitel, Arroyo Valdez, Arroyo Brown, Arroyo San Felipe, Arroyo Tamberas y un efluente que es el Arroyo Girado. En dicha figura, se encuentran señalados los puntos de muestreo que abarcaron los arroyos previo a la entrada de la laguna y dentro de la misma

Tabla 5: Parámetros morfométricos de la Laguna de Chascomús

Largo máximo	9,57 km
Ancho máximo	6,26 km
Profundidad máxima	1,90 m
Profundidad media	1,53 m
Superficie	30,126 km^2
Volumen	47.015.317 m^3
Perímetro	28.120 m
Desarrollo de la línea de costa	1,44

la estación centro (Ce), elegida como punto representativo de este cuerpo de agua, al igual que estaciones (A, C, D, E) cercanas a la zona cubierta por vegetación acuática coincidentes con las desembocaduras de los arroyos. La estación B está ubicada previa al efluente (Arroyo Girado).

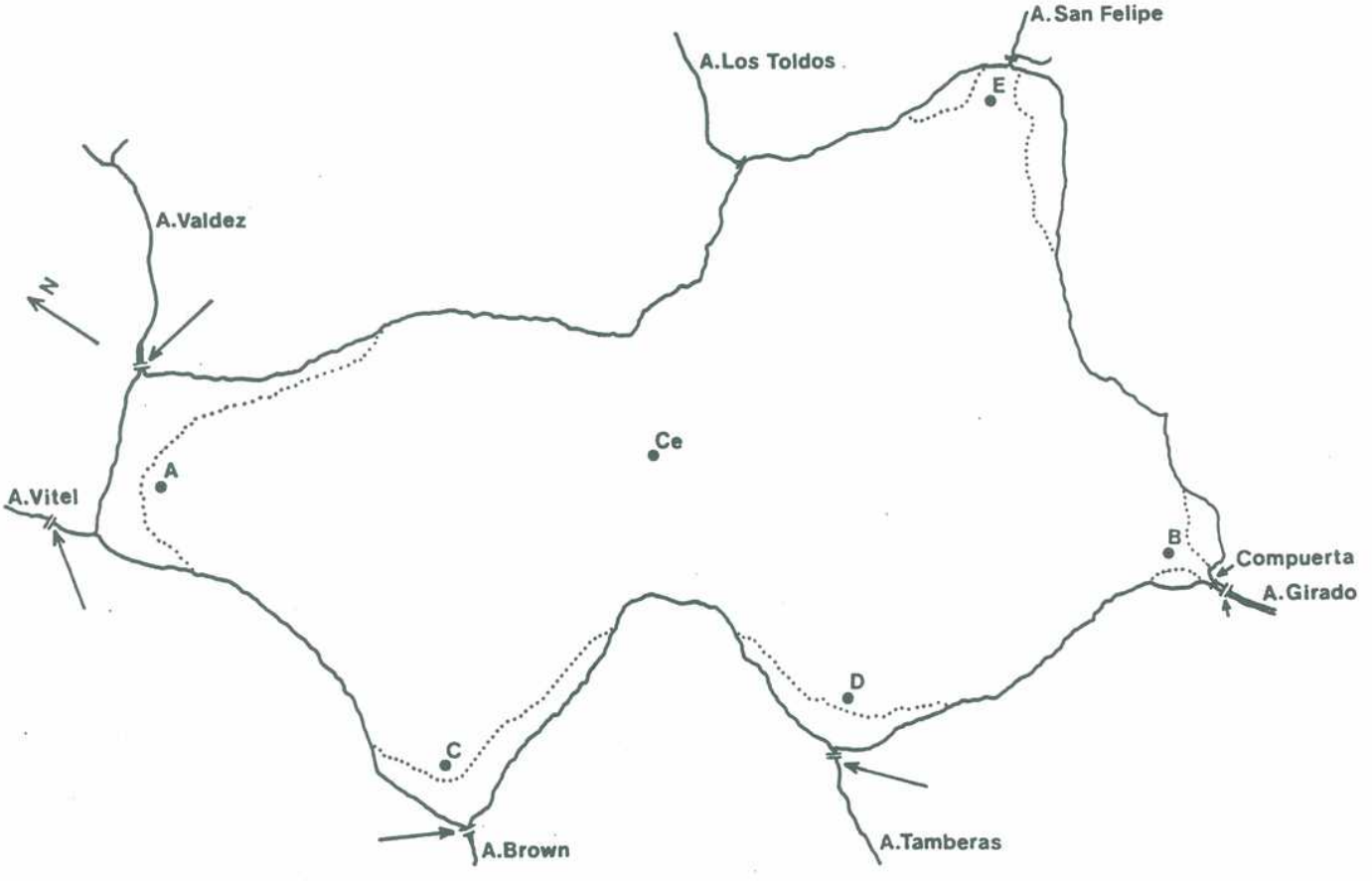
La concentración de sustancias húmicas fue seguida mediante determinaciones de demanda química de oxígeno de la muestra filtrada (0,45 µm) y absorción a 250 nm y 365 nm, longitudes de onda comunmente utilizadas para el cómputo de las mismas (De Haan y col., 1982).

En la figura 16, por razones de simplicidad se encuentran datos correspondientes a la estación Vitel, debido a que las concentraciones son similares a los otros arroyos y por la misma causa, se representa la estación A, cuyas concentraciones son del mismo orden que las estaciones C, D y E. En la figura se incluyen las estaciones Ce y B. Como se puede apreciar la concentración de sustancias húmicas es menor en la laguna con respecto al arroyo de acuerdo a los datos de demanda química de oxígeno (figura 16 A) y a las

Tabla 6: Parámetros químicos de la Laguna de Chascomús

	Valor medio
pH	8,6
Conductividad específica, µmho/cm	735
Residuo sólido soluble, mg/l	649
Carbonato, mg CO_3^{2-}/l	17,2
Bicarbonato, mg HCO_3^-/l	265,1
Cloruro, mg Cl^-/l	133,3
Sulfato, mg SO_4^{2-}/l	58,2
Sodio, mg Na^+/l	148,8
Potasio, mg K^+/l	11,8
Calcio, mg Ca^{2+}/l	20,9
Magnesio, mg Mg^{2+}/l	14,0
Nitrato, µg N/l	61
Nitrito, µg N/l	7
Amonio, µg N/l	76
Nitrógeno total, mg N/l	1,56
Ortofosfato, µg P/l	8
Fósforo total, µg P/l	250
Sílice reactiva, mg SiO_2/l	8,0
Demanda química de oxígeno, mg O_2/l	13,4
Seston, mg/l	112,8
Carbono orgánico particulado, mg C/l	7,6
Clorofila *a*, µg/l	25,3
Feofitina, µg/l	26,6
Producción primaria, mg C/m^2.d	305,8

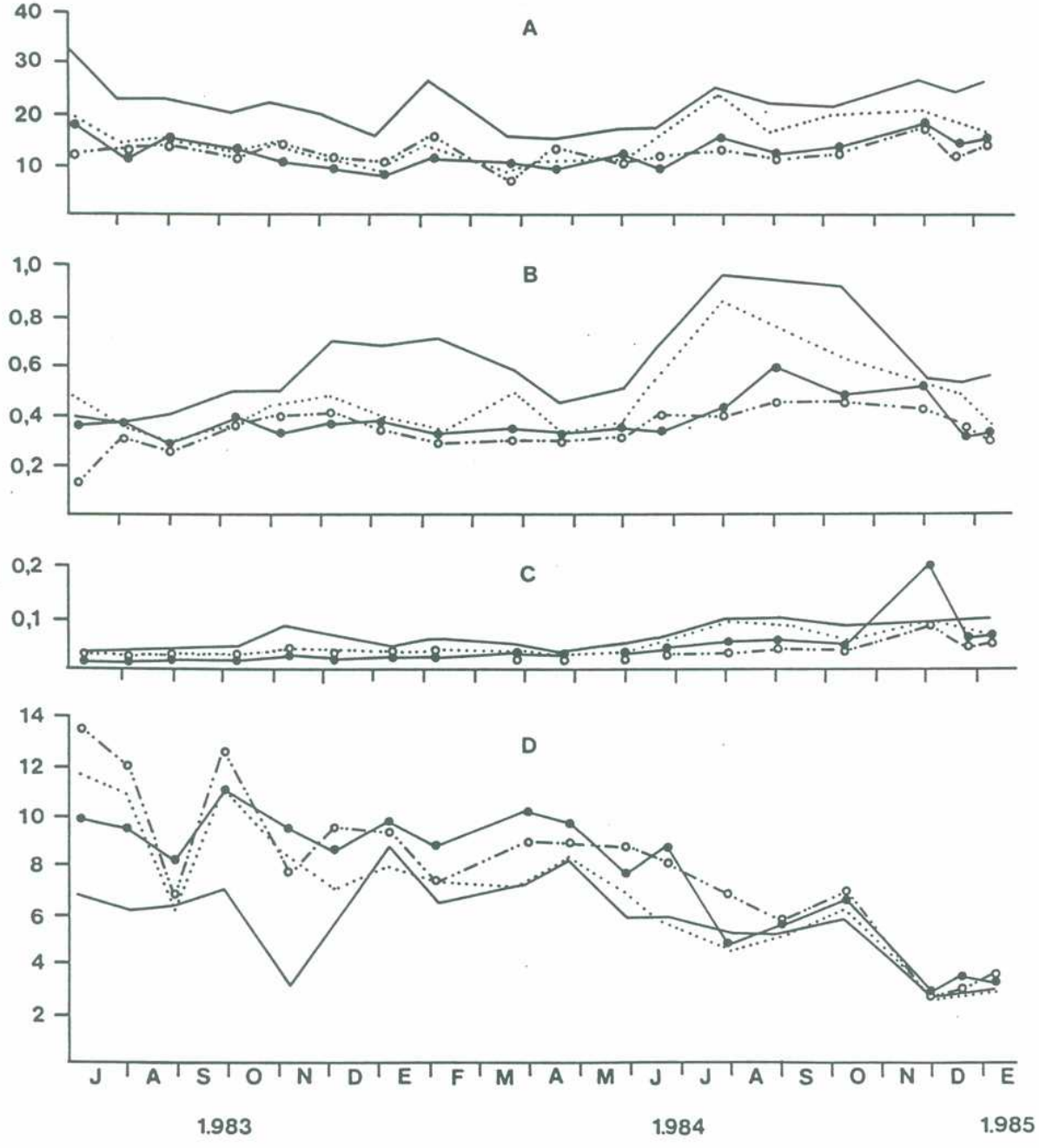
Figura 15: Laguna de Chascomús. Los círculos y flechas indican las estaciones de muestreo. Las líneas punteadas muestran los límites de la zona cubierta por plantas acuáticas arraigadas.



lecturas de absorción a 250 nm (figura 16 B) y a 365 nm (figura 16 C). La causa de una menor concentración, se puede adjudicar a un fenómeno de dilución, puesto que considerando el volumen total de la laguna, el aporte de aguas por parte de los arroyos es menor respecto al proveniente de las aguas subterráneas (Groeber, 1945). Estas últimas, a diferencia de las superficiales, no poseen sustancias húmicas, pues las mismas son retenidas durante el proceso de filtración y percolación a través de los distintos estratos del suelo. La estación A recibe la influencia del arroyo y por lo tanto, su concentración es mayor si se compara con el resto de la laguna. La estación B, según indican los datos, es similar a Ce, de manera que el agua de salida superficial por el Arroyo Girado, tiene la misma concentración que la del centro.

En la figura 16 D se encuentra representado el cociente A_{250}/A_{365}. Donde A_{250} es la absorción a 250 nm debida, fundamentalmente, a la absorción de los núcleos aromáticos, mientras que A_{365} es causada por transiciones complejas de difícil asignación. Las hipótesis acerca del origen de estas últimas son discutidas en la parte III del presente capítulo. Este cociente ha sido correlacionado con el tamaño molecular de las sustancias húmicas (De Haan, 1972a; De Haan y De Boer, 1987), comprobándose que a medida que el cociente disminuye, el tamaño molecular aumenta. El hecho se debe a que, conforme el tamaño aumenta, se incrementa la cantidad de los grupos aromáticos responsables de la absorción a 250 nm. Estos grupos, que constituyen la fracción hidrófoba de la molécula, están prácticamente restringidos a ocupar la parte central de la misma. Igualmente aumenta el número de grupos alifáticos que poseen la función carboxilo (fracción polar que permite la solubilidad en agua) y que absorben menos radiación UV. Estos rodean a los grupos aromáticos y se orientan hacia las moléculas de agua (dado su carácter hidrofílico), provocando un efecto pantalla para la radiación UV, que impide en gran

Figura 16: Variación estacional de: A. Demanda química de oxígeno, DQO; B. Absorción a 250 nm, A_{250}; C. Absorción a 365 nm, A_{365}; D. Relación A_{250}/A_{365} de las estaciones Vi ———, Ce o··–··o··, A ..... y B –•–•–•.

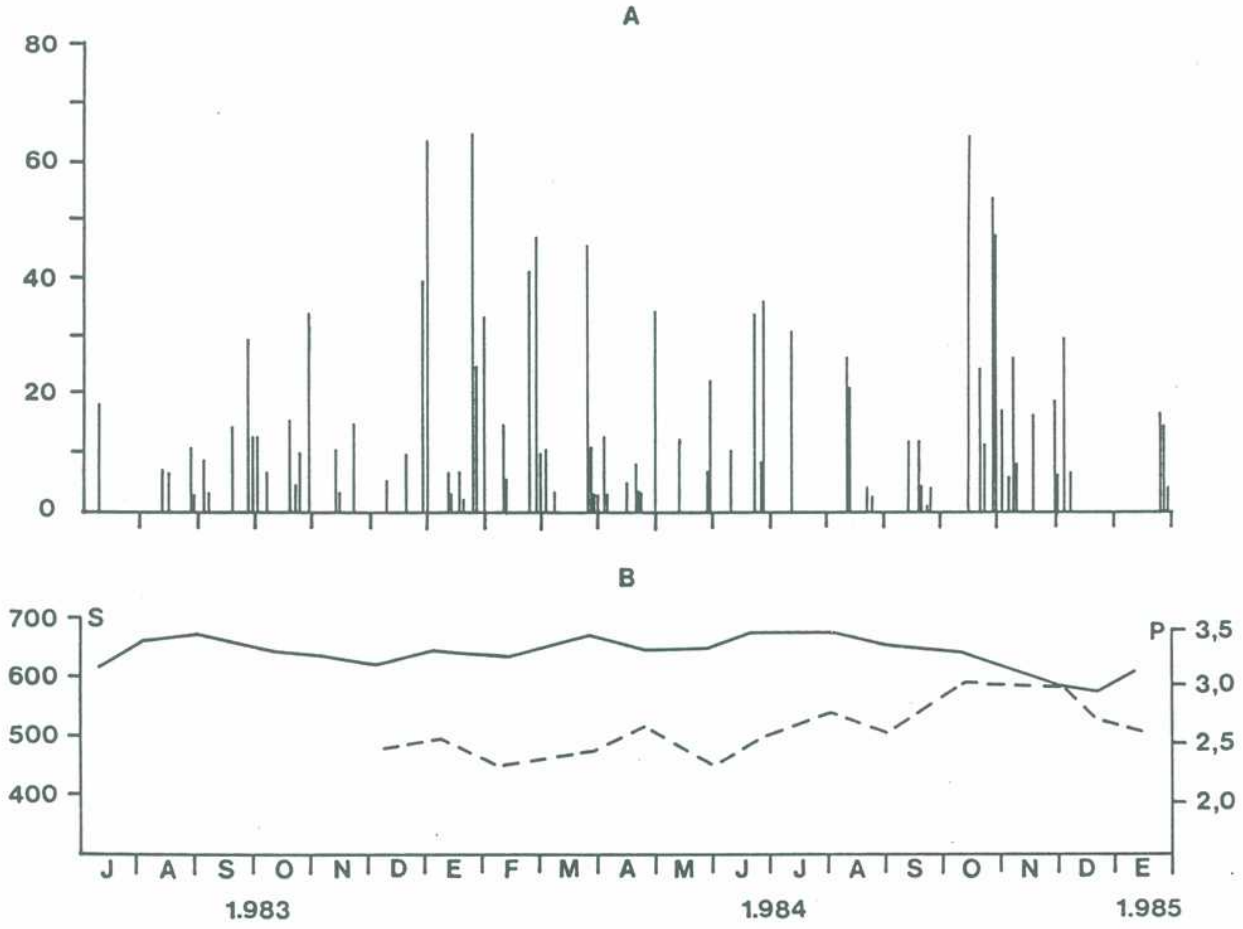


medida la absorción de esta radiación por parte de los grupos aromáticos. Dicho impedimento determina la menor absorción por unidad de carbono. Como no ocurre este fenómeno para la radiación visible es decir a 365 nm, el cociente entre ambas radiaciones disminuye conforme aumenta el tamaño molecular (Stewart y Wetzel, 1981a).

Como se puede apreciar en la figura 16 D, hasta julio de 1984, los valores de las estaciones Ce, A y B son más altos (en promedio 9,34; 8,10 y 9,24 respectivamente) que los del Arroyo Vitel (6,37) y del Arroyo Valdez (4,36) no incluido en el gráfico. Para explicar estos resultados, es necesario repasar las características químicas de las aguas de la laguna, que indican que son aguas alcalinas (pH promedio 8,60), con concentraciones de carbonato y calcio que promueven la formación y precipitación de carbonato de calcio. Las sustancias húmicas tienen la propiedad de coprecipitar con éste y en particular las de mayor peso molecular de acuerdo a Stewart y Wetzel (1981a). No ocurre lo mismo en los arroyos puesto que si consideramos el pH, éste se encontró en promedio -en el A. Vitel (7,90) y el A. Valdez (7,82)- por debajo del valor de formación del carbonato (8,30). Por lo tanto, en los arroyos existen condiciones que favorecen la permanencia de las fracciones de sustancias húmicas de mayor peso molecular, conduciendo a la disminución del cociente A_{250}/A_{365}.

Entre el 15 de octubre y 12 de noviembre, se produjeron precipitaciones de tal magnitud (figura 17 A), que provocaron el aumento de la profundidad de la laguna y la disminución del residuo sólido soluble por efecto de la dilución (figura 17 B). Al mismo tiempo descendió el pH por debajo de 8,30, eliminando la existencia de carbonato de calcio y favoreciendo la permanencia de sustancias húmicas de mayor peso molecular, provenientes de la cuenca e incorporadas por medio de los arroyos tributarios. Estas condiciones se ponen

Figura 17: A. Precipitaciones (mm); B. Salinidad, S (mg/l) ____ y profundidad, P (m) _____ .



de manifiesto, si se tiene en cuenta que, de acuerdo a la figura 16 A, B y C, la concentración de sustancias húmicas no aumentó significativamente para la laguna, sino que por el contrario, se observa la disminución del cociente A_{250}/A_{365} a valores prácticamente iguales a los obtenidos para los arroyos hasta el final del período de estudio (figura 16 D). Se evidencia de este modo, la presencia de sustancias húmicas de características similares a las encontradas en estos últimos. Finalmente los resultados obtenidos indican que las

fluctuaciones de las sustancias húmicas pueden ser no sólo cuantitativas sino también cualitativas en un sistema lagunar como el estudiado.

En el mismo período, se realizaron mediciones de la producción primaria fitoplanctónica con el objeto de relacionarla con la dinámica de las sustancias húmicas recién tratada. La determinación de la producción primaria fitoplanctónica tiene por finalidad evaluar la capacidad de síntesis de materia orgánica que tiene un cuerpo de agua. Globalmente y en forma simplificada se puede plantear la siguiente ecuación:

$$n\ CO_2 + n\ H_2O \underset{}{\overset{luz}{\rightleftharpoons}} C_n(H_2O)_n + n\ O_2 \qquad 1$$

El proceso de síntesis, aquí ejemplificado para hidratos de carbono, consiste en la asimilación de dióxido de carbono en presencia de luz (fotosíntesis) y en la formación de oxígeno. El proceso inverso, la respiración (mineralización), se produce por consumo del oxígeno que se usa para oxidar la materia orgánica y generar nuevamente el dióxido de carbono.

De acuerdo a 1, si se pretende evaluar la capacidad de un ecosistema de generar materia orgánica por parte de los organismos fotosintetizadores -o productores primarios, en este caso del fitoplancton- y medir la materia disponible para los consumidores integrantes de la cadena trófica, debe considerarse el dióxido de carbono consumido o el oxígeno liberado. En el primero de los casos se utiliza el radioisótopo ^{14}C en forma de $NaH^{14}CO_3$ y se determina el ^{14}C (incorporado en la biomasa algal) mediante técnicas de centelleo líquido, mientras que en el segundo se valora el oxígeno disuelto (generado por la biomasa algal) mediante determinación química. Este último fue el método empleado en el período citado y básicamente consiste en la incubación en

el cuerpo de agua (in situ) o en forma artificial (en el laboratorio).

La producción primaria in situ se pone en práctica empleando botellas que contienen muestras en un caso denominadas claras (reciben luz y dan lugar al proceso de fotosíntesis) y en el otro oscuras (donde se produce el proceso de respiración por ausencia de luz). Se calcula la producción diaria mediante los datos de oxígeno liberado (botellas claras) y oxígeno consumido (botellas oscuras), el tiempo de incubación, factores para pasar de oxígeno a carbono y la curva de variación diaria de la intensidad de la radiación solar (Strickland y Parsons, 1960). El valor calculado dividido por el fotoperíodo permite obtener el dato de producción por hora (capítulo V parte experimental).

El proceso de fotosíntesis se encuentra restringido a la presencia de luz que decae en forma exponencial en la columna de agua. Se considera que el desarrollo de la fotosíntesis tiene lugar en la zona eufótica, por debajo de la cual termina por ser despreciable en cuanto a magnitud. De acuerdo a la profundidad de la zona eufótica, se eligen estratégicamente las profundidades de incubación. En este cuerpo de agua y debido al elevado material en suspensión (promedio 106,1 mg/l), puesto en evidencia por la lectura del disco de Secchi (promedio 0,19 m), la zona eufótica estuvo comprendida entre 0,5 y 1 metro de profundidad, de manera que las incubaciones se realizaron suspendiendo botellas cada 10 centímetros. En la figura 18 se observan los perfiles obtenidos para cada uno de los meses de muestreo. La integración de los mismos permite evaluar la productividad diaria por unidad de superficie (Pd) y la producción óptima (Pópt), que es la máxima producción del perfil dividida por el fotoperíodo.

La temperatura del agua es uno de los factores principales que estimulan la producción primaria. En la

laguna estuvo comprendida entre 7,0 °C en invierno y 28 °C en verano (figura 19 A). En la figura 19 B, tanto Pd como Pópt siguen el comportamiento de la temperatura hasta la aparición, a fines de octubre, de las precipitaciones destacadas en el tratamiento de la dinámica de las sustancias húmicas. En consecuencia se produjo un arrastre y lavado que determinó la disminución de la biomasa algal, que medida en términos de clorofila *a* con valores por encima de 8 µg/l descendió a valores alrededor de 2 µg/l (figura 19 A). Debido a la disminución de la población algal la producción fue menor, según se observa en los valores de Pd, que con 76,7 mg $C/m^2.d$ a fines de octubre se asemeja a valores del período invernal (figura 19 B). Lo mismo ocurre con Pópt, cuyo valor en octubre es de 49,9 mg $C/m^3.h$, que es del mismo orden que el del período de invierno (figura 19 B). Sin embargo la producción óptima por unidad de clorofila *a* -cociente que indica la actividad fotosintética por unidad de biomasa algal- presentó un incremento significativo, pues con valores por debajo de 7 mg C/mg clorofila *a*.h alcanzó en octubre 27,7 mg C/mg clorofila *a*.h (figura 20 A).

Paralelamente se realizaron mediciones de la producción primaria en laboratorio, consistentes en incubar botellas en un gradiente de intensidad de luz, realizado mediante una lámpara de 500 watts y colocando las mismas a distintas distancias en un incubador con agua a la misma temperatura de la laguna (capítulo V parte experimental). En la figura 21 se observan las curvas obtenidas caracterizadas por una zona de respuesta exponencial de la producción que se corresponde con la zona de limitación de luz. A continuación aparece la zona de producción máxima (Pmáx) donde la luz no es limitante y en algunos meses, se pudo observar la zona de declinación debida al efecto de fotoinhibición a intensidades elevadas. De estas curvas se puede obtener información desde el punto de vista fisiológico, por ejemplo la eficiencia fotosintética α, de

Figura 19: Variación estacional de: A. Temperatura, T (°C) —.—.—, Clorofila *a*, Clor (µ g/l) ———— ; B. producción primaria diaria, Pd (mg C/m^2.d) —.—.—, producción primaria óptima, Pópt (mg C/m^3.h) ———— , producción primaria máxima, Pmáx (mg C/m^3.h) - - - - .

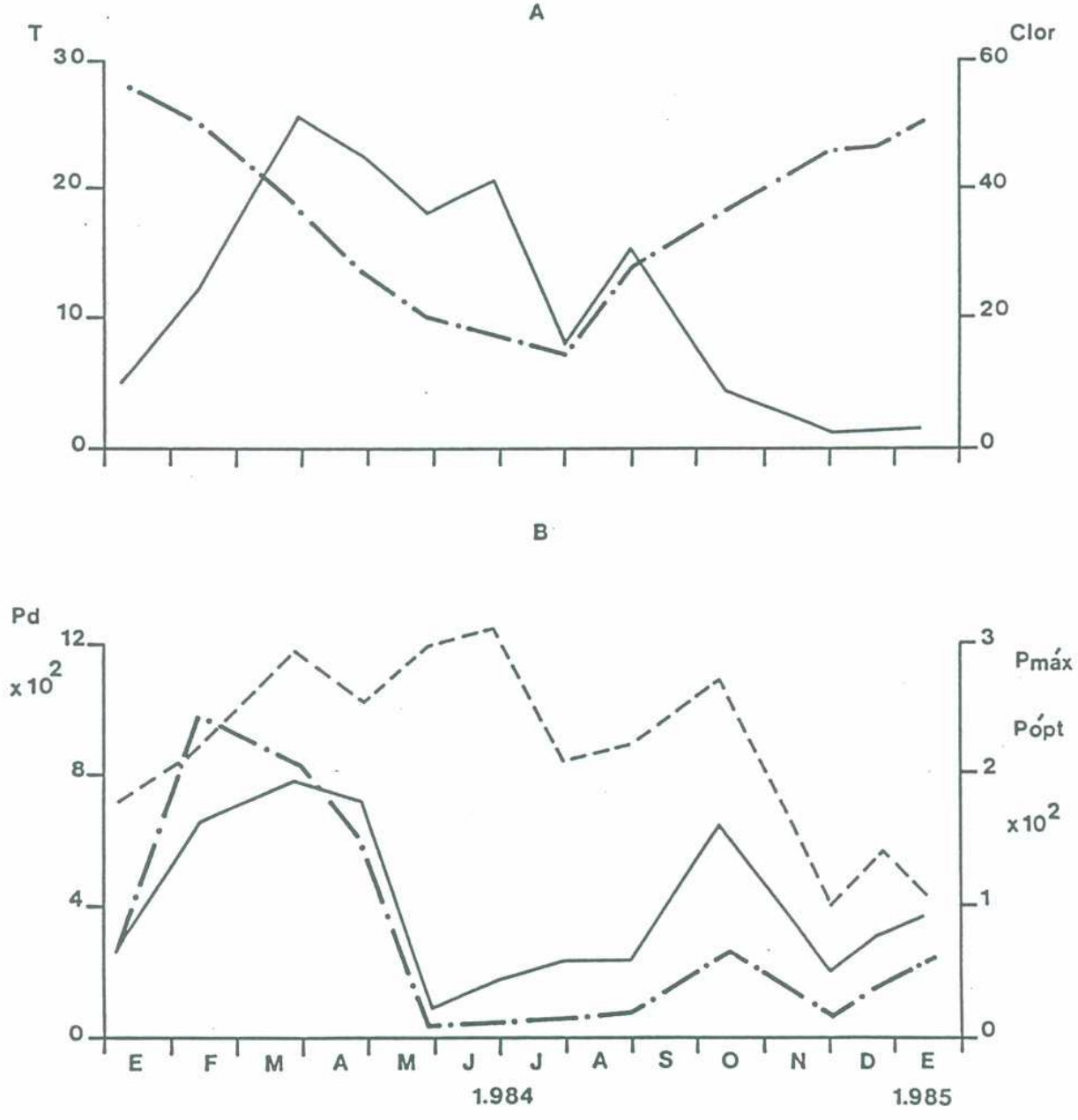


Figura 20: Variación estacional de: A. Producción primaria óptima/clorofila *a*, Pópt/clor (mg C/mg clor.h) —.—.—. ; producción primaria máxima/clorofila *a*, Pmáx/clor (mg C/mg clor.h) ———— ; B. eficiencia fotosintética, α (mg C/mg clor.h.µEinst. m^{-2} s^{-1}).

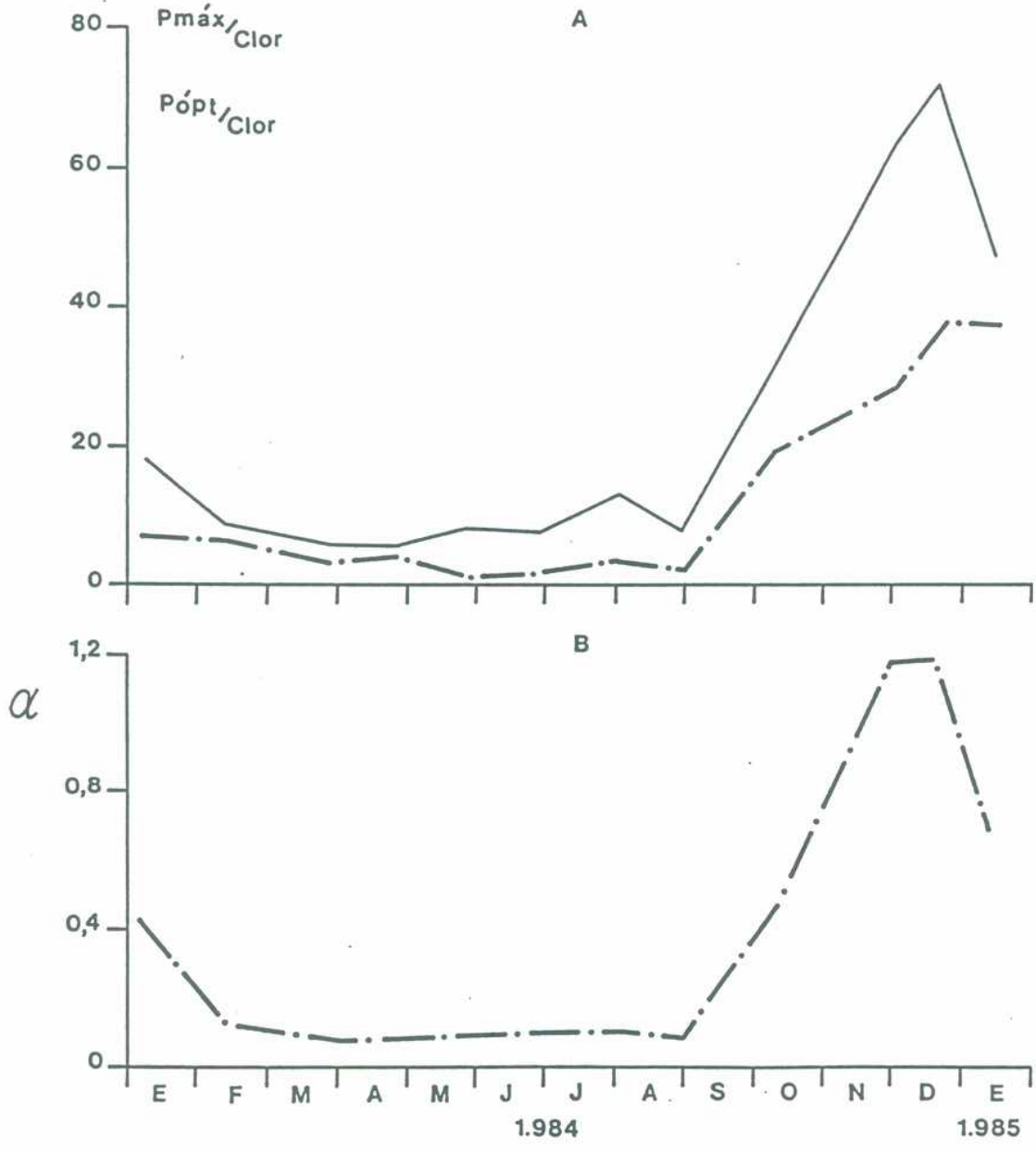


Figura 21: Producción primaria (mg $C/m^3.h$) en función de la intensidad de luz (µEinst. m^{-2} s^{-1}) obtenida por incubación artificial para los distintos meses de muestreo.

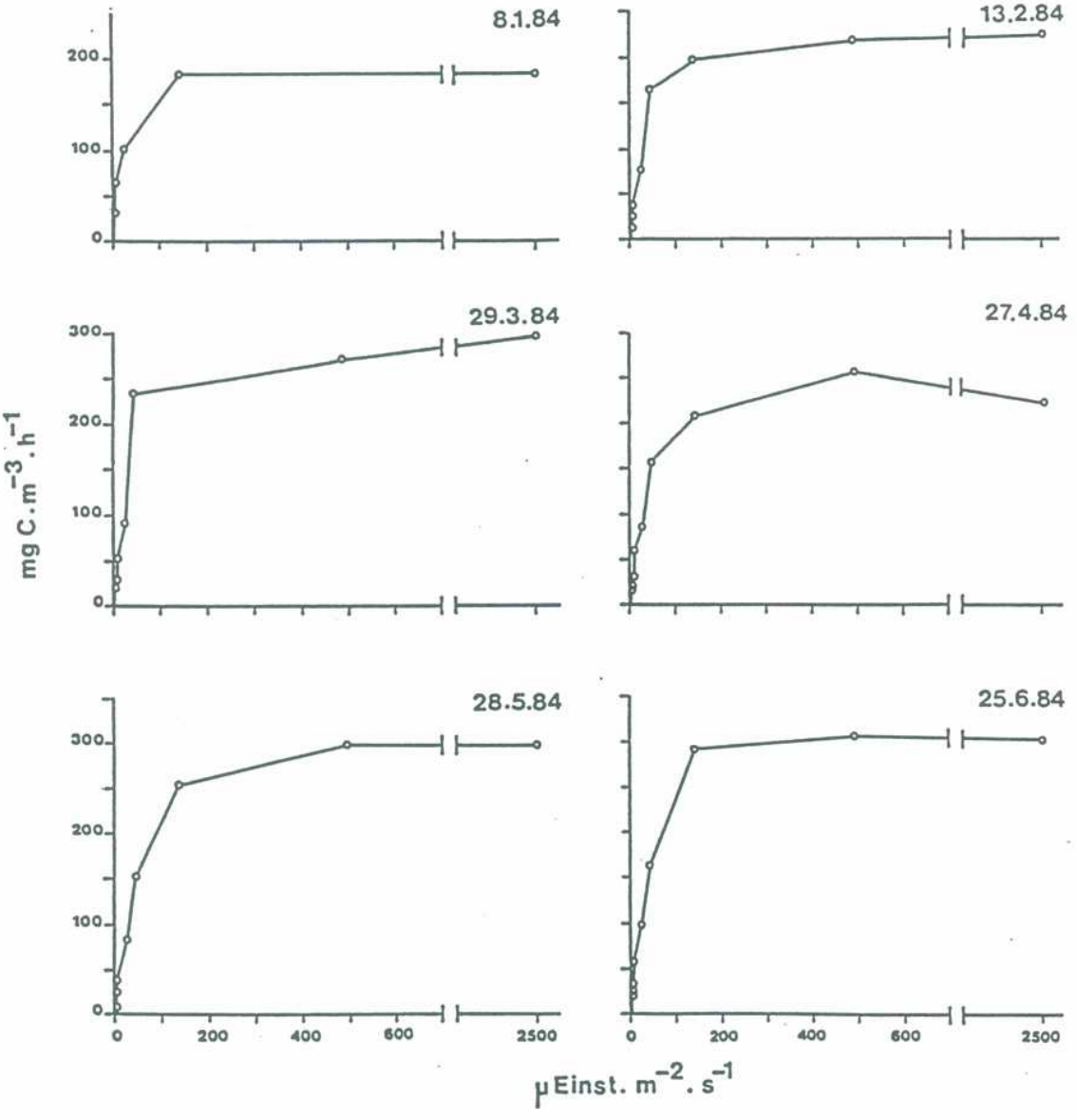
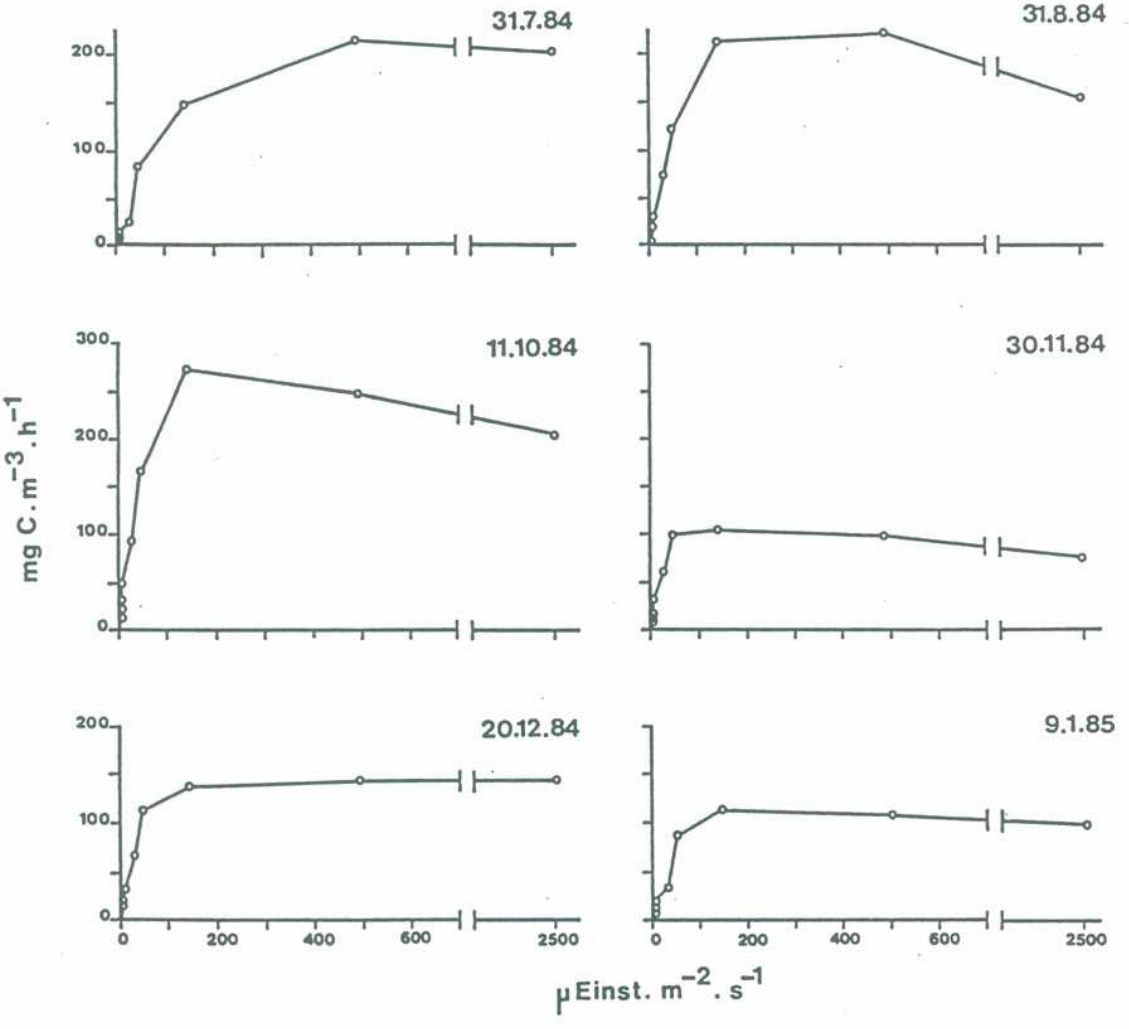


Figura 21: Continuación.



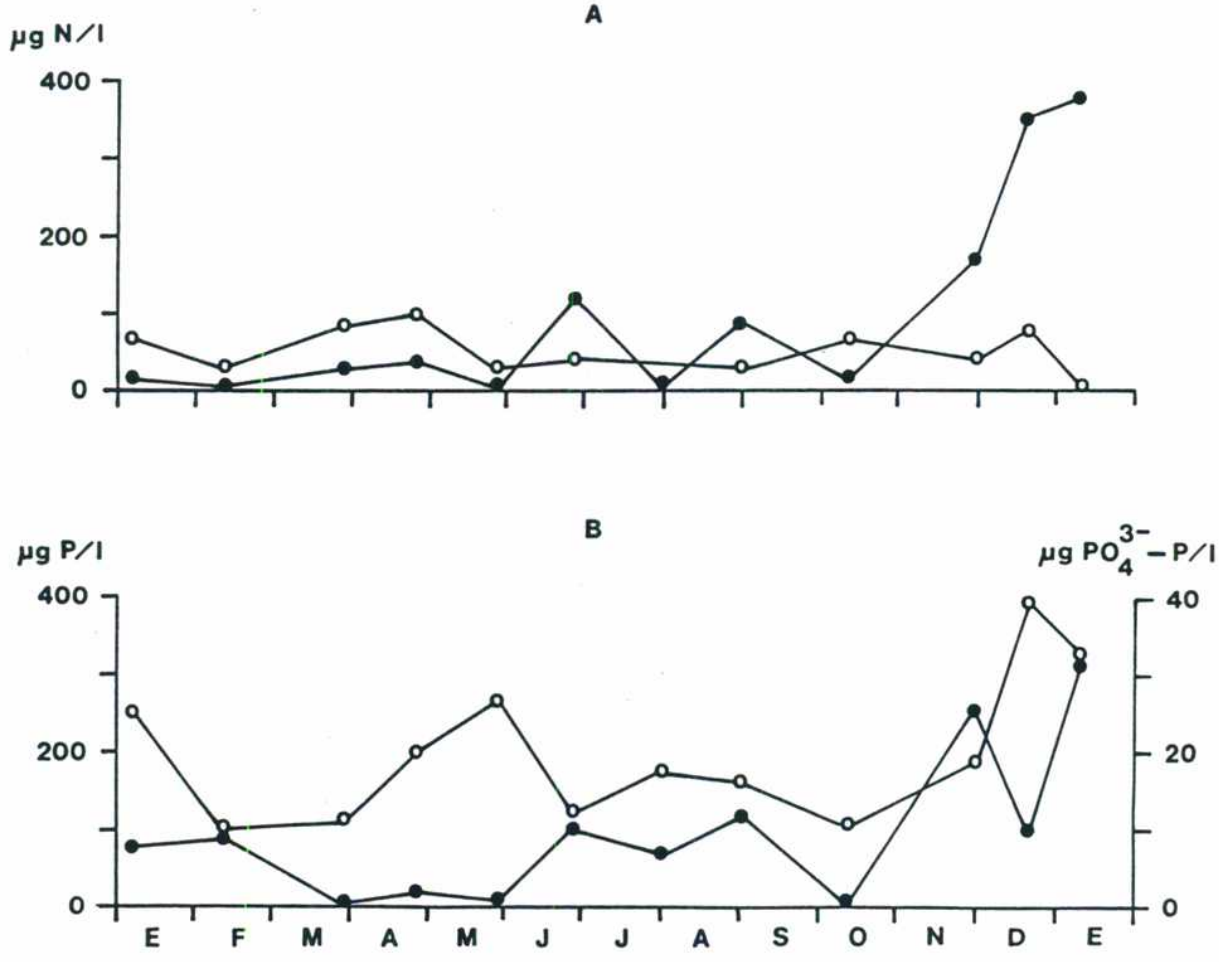
acuerdo a Platt y Jassby (1976), que es la pendiente inicial normalizada por unidad de clorofila *a*. En este caso, según puede observarse en la figura 20 B, α se mantiene por debajo de 0,1 mg C/mg clorofila *a*.h.µEinst.m^{-2}.s^{-1} y luego de las precipitaciones de fines de octubre aumenta en forma significativa alcanzando un máximo de 1,18 mg C/mg clorofila *a*.h.µEinst.m^{-2}.s^{-1}.

Respecto a Pmáx (parámetro análogo a la Pópt) con valores superiores a 200 mg C/m^3.h disminuye, a fines de octubre, a valores del orden de 100 mg C/m^3.h (figura 19 B). No obstante el cociente entre la producción máxima por unidad de clorofila *a*, también conocido como número de asimilación, se incrementó de manera similar a Pópt por unidad de clorofila *a*, pues con valores por debajo de 20 mg C/mg clorofila *a*.h en octubre aumentó a 57,9 mg C/mg clorofila *a*.h (figura 20 A).

En definitiva, luego de las precipitaciones y de acuerdo a Pópt/clorofila *a*, Pmáx/clorofila *a* y α, se observó un incremento de la actividad y eficiencia fotosintética. Este resultado puede relacionarse, en primera instancia, con el incremento de nutrientes provenientes de la cuenca de drenaje, en particular ortofosfatos y nitratos (figura 22). Sin embargo, este cuerpo de agua es eutrófico, es decir que se caracteriza por la abundancia de nutrientes y por lo tanto, no sería ésta una causa principal del aumento de la actividad y eficiencia fotosintética. Por otra parte como consecuencia de las precipitaciones, se produjo la disminución del cociente A_{250}/A_{365} (figura 16 D), evidenciando el incremento de sustancias húmicas de mayor peso molecular en relación a las de menor peso molecular.

Estudios realizados en cultivos de algas, fundamentalmente de diatomeas y dinoflagelados, con agregado de sustancias húmicas (Prakash y Rashid, 1968; Prakash y col., 1973; Prakash y col., 1975; Stewart y Wetzel, 1982;

Figura 22: Variación estacional de: A. nitrato —●— ; amonio —○— en µgN/l; B. ortofosfato —●— y fósforo total —○— en µg P/l.



Jones, 1990), demostraron la relación de éstas con la producción primaria. Dichos resultados se resumen como sigue:

- Las sustancias húmicas ejercen influencia sobre la producción primaria.

- Las sustancias húmicas estimulan la producción primaria hasta determinada concentración , por encima de la cual la inhiben.

- La influencia depende del peso molecular de las sustancias húmicas.

- La magnitud de la influencia depende de la especie algal presente.

Las hipótesis que se plantean alrededor de estos resultados son las siguientes:

- El efecto complejante. Esta propiedad indirectamente estimula la producción primaria debido a que provoca la quelación de elementos traza, determinando el aumento de la biodisponibilidad de los mismos, que son esenciales para el desarrollo algal (como el hierro). Esta hipótesis es compatible con el efecto inhibitorio que ocurre por encima de cierta concentración de sustancias húmicas, puesto que la alta concentración provoca la sobrequelación impidiendo la disponibilidad de iones esenciales.

- Las sustancias húmicas actuarían como agentes sensibilizantes, aumentando la permeabilidad de la membrana celular y por lo tanto incrementando la toma de nutrientes del medio circundante.

- La flexibilidad de las moléculas de sustancias húmicas (Münster, 1985) permitiría que actúen como carriers de nutrientes, iones metálicos y sustratos orgánicos en la doble capa eléctrica de la superficie celular de los organismos acuáticos.

- La producción primaria algal se encuentra limitada y/o ligada a la disponibilidad y ciclo del fósforo. Las sustancias húmicas pueden interaccionar secuestrando moléculas orgánicas conteniendo fósforo, de manera que el fósforo quedaría disponible sólo a través de hidrólisis enzimática. Esta sería la razón por la cual se observó el incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina en cultivos con agregado de sustancias húmicas. De modo que el equilibrio biótico establecido, luego del aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina, permitiría que mayor cantidad de fósforo estuviera disponible para la microflora, contribuyendo de esta manera al aumento de la producción algal.

Las hipótesis descriptas son de difícil demostración debido a los inconvenientes propios de experimentos que consisten en realizar cultivos en donde cobran importancia la composición y estado fisiológico de la comunidad algal y las interacciones entre algas y bacterias, además de los fenómenos puramente químicos. No obstante, si bien para corroborar lo observado en la Laguna de Chascomús hubiese sido necesario realizar experimentos de laboratorio, es decir incubaciones con agregado de sustancias húmicas, se puede inferir, a modo especulativo, que los aumentos de actividad y eficiencia fotosintética estuvieron asociados a los cambios cualitativos y cuantitativos de las sustancias húmicas producidos luego de las precipitaciones de fines de octubre.

En otro período de estudio que abarcó desde abril de 1988 a mayo de 1989, se realizaron relevamientos en el centro de la Laguna de Chascomús, con el objeto de estudiar nuevamente la dinámica de las sustancias húmicas en este ecosistema.

Dicho período se caracterizó por ser seco, si se tiene en cuenta que las precipitaciones registradas fueron de 616 mm,

mientras que el valor para el mismo período obtenido como promedio entre 1982 y 1987 fue de 1311 mm. De manera tal que en la figura 23 A se puede apreciar que el balance precipitación - evaporación (determinado de acuerdo a Thornwaite, 1948) fue negativo. En relación a este fenómeno, se observó la disminución de la profundidad de 3,5 metros (abril 1988) a 1,6 metros (mayo 1989) y un significativo incremento de la salinidad evidenciado por el residuo sólido total que de 0,5 alcanzó 0,9 g/l (figura 23 B).

En las aguas naturales se desarrollan una serie de equilibrios entre las especies del carbono inorgánico. Teniendo en cuenta que las aguas naturales son sistemas abiertos, en contacto con la atmósfera, los equilibrios más importantes en relación al carbono inorgánico son los siguientes considerando 25 °C, 1 atmósfera de presión y $[H_2CO_3^*] = [CO_2\ (aq)] + [H_2CO_3]$ (Stumm y Morgan, 1970):

$$CO_2\ (g) \rightleftharpoons CO_2\ (aq) \qquad pK_D = 0,75$$

$$CO_2\ (aq) + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3^* \qquad pK = 1,47$$

$$CO_2\ (aq) + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \qquad pK = 2,8$$

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+ \qquad pK = 3,5$$

$$H_2CO_3^* \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+ \qquad pK_1 = 6,3$$

$$HCO_3^- \rightleftharpoons CO_3^{2-} + H^+ \qquad pK_2 = 10,25$$

En la siguiente ecuación, en una forma simplificada, se encuentra resumida la vinculación entre estas especies:

$$2\ HCO_3^- \rightleftharpoons CO_2(g) + CO_3^{2-} + H_2O$$

Así planteado, permite visualizar con rapidez los desplazamientos del equilibrio frente a circunstancias por las que pueden atravesar las aguas naturales. En el caso de cuerpos de agua sometidos a lluvias ácidas, como los lagos ubicados en Suecia, el equilibrio se encuentra desplazado hacia la derecha, al hallarse favorecidos la eliminación de carbonato, el aumento de bicarbonato y el dióxido de carbono -que superado el límite de solubilidad- tiende a liberarse hacia la atmósfera. Otro ejemplo lo constituye el incremento de la temperatura relacionado a los ciclos estacionales, donde por disminución de la solubilidad se produce la transferencia del dióxido de carbono hacia la atmósfera, con el consecuente desplazamiento del equilibrio hacia la derecha favoreciendo la formación de carbonato. Otro fenómeno ligado a la elevación de la temperatura, es el aumento de la actividad fotosintética que provoca el consumo del dióxido de carbono, con lo cual se produce nuevamente el desplazamiento hacia la derecha en favor de la concentración de carbonato. Con dicho incremento y considerando la concentración de calcio, puede desarrollarse el equilibrio de precipitación de carbonato de calcio:

$$CaCO_3 \rightleftharpoons Ca^{2+} + CO_3^{2-} \qquad pK = 8,4 \ (25\ °C)$$

En primavera-verano del período considerado en la Laguna de Chascomús, se observó un aumento significativo de la temperatura siendo en julio de 8,8 °C y en enero de 25 °C (figura 23 B). Dicho aumento favoreció el descenso del dióxido de carbono y el incremento del carbonato y del pH (figura 23 C), alcanzando valores de 0,59 M y 8,8 respectivamente. En forma concomitante, se puede apreciar en la figura 23 C, el aumento del índice de sobresaturación correspondiente al carbonato de calcio, obtenido para cada

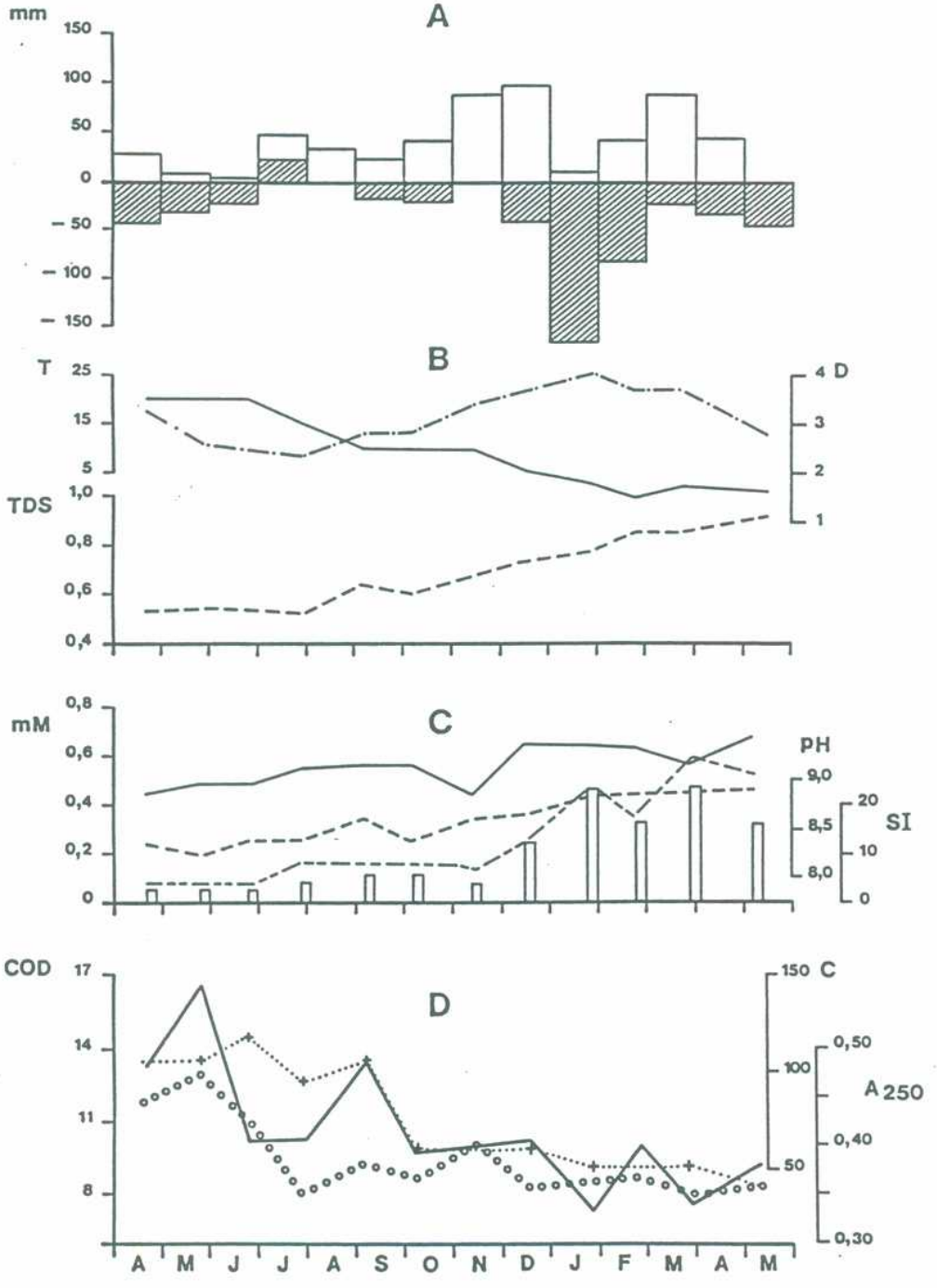
muestreo como cociente entre el producto de la concentración de carbonato, de calcio (figura 23 C) y de los coeficientes de actividad (calculados de acuerdo a la aproximación de Davies), dividido por la constante del producto de solubilidad a cada temperatura (Stumm y Morgan, 1970). El índice de un valor de 2,3 en otoño-invierno alcanzó 23,0 en primavera-verano (figura 23 C). Se han mencionado valores elevados del índice para otros cuerpos de agua, relacionando esta situación con la condición de tratarse de ambientes eutróficos e hipertróficos (Effler y Driscoll, 1985; Murphy y col., 1983). Por el contrario, Golterman y Kouwe (1980) y Golterman y Meyer (1985) han informado que la sobresaturación de carbonato de calcio depende del pH para ríos y lagos independientemente de que se trate de cuerpos de agua oligo o eutróficos. Estos autores formularon la siguiente relación:

$$IPc = A\ pH^{B}$$

Donde Ipc es el producto iónico del carbonato de calcio y A una constante que de acuerdo a los distintos cuerpos de agua, toma valores de $6,8\ 10^{-0,5}$ a $3,8\ 10^{-22}$, mientras que B es otra constante comprendida entre 4,5 y 23,8. En el caso de la Laguna de Chascomús, en dicha relación se obtuvo para A el valor de $1,7\ 10^{-31}$ y para B 25,5 (r^2 = 0,87). A pesar del bajo número de determinaciones (N = 12), estos resultados no se encuentran dentro de los rangos previstos por los autores. Por lo tanto, el pH no resultaría una variable determinante en el fenómeno de sobresaturación observado.

Otra posibilidad es relacionar el fenómeno con la presencia de materia orgánica soluble, en particular de sustancias húmicas. En tal sentido, en la figura 23 D, puede observarse un decrecimiento de la materia orgánica soluble en julio de 16,4 a 7,5 mg O_2/l, que se corresponde con la disminución de sustancias húmicas evidenciada en los datos de

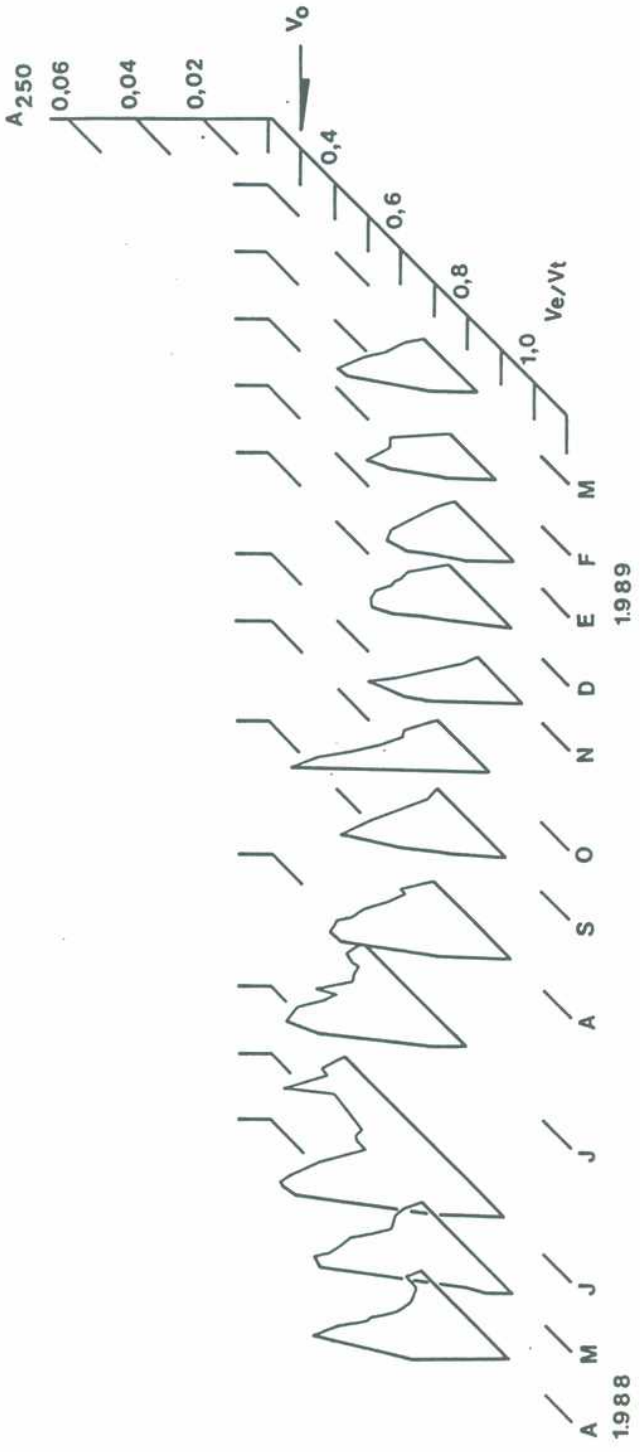
Figura 23: A. Precipitación (mm) ▭ y precipitación-evaporación ▨ ; B. Temperatura del agua, T (°C) _._._. , salinidad, S (g/l) ------, profundidad, P (m)———; C. Carbonato (mM) _-_-_- ; calcio (mM) ——— , pH ------ , índice de sobresaturación, IS ▯ ; D. Demanda química de oxígeno, DQO (mg O_2/l) ——— , absorción a 250 nm, A_{250} ooooo , unidades color, C (mg Pt/l).....+.....+ .



color de 120 a 40 mg Pt/l y de absorción a 250 nm de 0,48 a 0,34. Hecho atribuible a la asociación entre el carbonato de calcio y la materia orgánica, como fuera señalado por Otsuki y Wetzel (1973, 1974) y Stewart y Wetzel (1981a). El fenómeno puede interpretarse como la inactivación del crecimiento de los núcleos de carbonato de calcio, debido a la adsorción de sustancias orgánicas disueltas sobre la superficie. Es decir, la superficie mineral queda físicamente aislada del medio inhibiéndose el desarrollo en forma libre del equilibrio inorgánico entre el carbonato de calcio y el medio circundante (Chave, 1965; Suess, 1970; Reynolds 1978; Stewart y Wetzel, 1981a). Se explica de esta manera que el índice de sobresaturación presente valores elevados. Cabe destacar, que la asociación se produce con los cristales pequeños de carbonato de calcio según Pantin (1965). Por consiguiente se puede inferir que las sustancias húmicas en realidad no precipitan, sino que permanecen en suspensión favorecidas por la circulación vertical que normalmente tiene lugar en la laguna. Además, la asociación de sustancias húmicas con carbonato de calcio provoca como consecuencia la disminución de sustancias húmicas en solución, puesto que pasan a integrar la materia particulada y son retenidas en las membranas utilizadas en la filtración (0,45 µm de tamaño de poro).

Debido a la importancia de la forma y tamaño molecular en el comportamiento y propiedades de las sustancias húmicas en el medio natural (Stewart y Wetzel, 1982; De Haan y De Boer, 1986; Jones y col., 1988), se estudió la distribución de pesos moleculares mediante experiencias de cromatografía en gel durante todo el período de relevamiento (figura 24). Con tal motivo se utilizó gel de Sephadex G-100 con la finalidad de cubrir un amplio rango de pesos moleculares. En concordancia con los datos de demanda química de oxígeno,

Figura 24: Cromatografía en gel (Sephadex G-100) de las muestras obtenidas para cada uno de los meses de muestreo.



unidades color y absorción a 250 nm, el área de los picos decrece a medida que se aproxima la primavera-verano. Incluso en este período, que se corresponde con los de mayor índice de sobresaturación y asociación sustancias húmicas-carbonato de calcio, se incrementa el volumen de elución indicando que permanecen en solución las fracciones de menor peso molecular. A modo de conclusión se desprende la existencia de una interacción preferencial de las fracciones de mayor peso molecular con el carbonato de calcio. Stewart y Wetzel (1981b) obtuvieron resultados similares en muestras de agua de 55 lagos ubicados al sudoeste de Michigan.

La explicación de la no precipitación de carbonato de calcio y de la coprecipitación selectiva de las fracciones de peso molecular elevado respecto de los de menor peso molecular, puede interpretarse teniendo en consideración lo siguiente:

I. Partiendo de la base de que los ácidos húmicos son polímeros de mayor tamaño que los ácidos fúlvicos, se puede inferir que la interacción de estos últimos con núcleos de carbonato de calcio no alcanzaría a cubrir totalmente la superficie de los núcleos y que de producirse, debe existir la interacción de dos o más moléculas de ácido fúlvico con cada núcleo de carbonato de calcio, lo cual implica una probabilidad menor de ocurrencia. Contrariamente la molécula de ácido húmico debido a su tamaño, rodea totalmente al núcleo de carbonato de calcio provocando la estrangulación que le impide al núcleo continuar creciendo y formar carbonato de calcio insoluble.

II. Si bien por lo expresado en I, se explicaría la no precipitación del carbonato de calcio en la medida que corresponde de acuerdo al producto de solubilidad, existe aún

el interrogante acerca de la adsorción selectiva o preferencial de los ácidos húmicos respecto de los fúlvicos.

La respuesta puede hallarse si se tiene en cuenta que los ácidos húmicos son de mayor peso molecular que los fúlvicos, diferencia que los hace susceptibles de agregación y consecuente precipitación frente a cambios de pH y de concentración salina (capítulo III), indicando en definitiva, un comportamiento coloidal. Este determina una gran actividad superficial que conduce a la mayor interacción con otras partículas en suspensión.

Lo expuesto en I y II explicaría los resultados obtenidos en este período de estudio.

Los relevamientos efectuados en la Laguna de Chascomús ponen de manifiesto la influencia de los fenómenos climáticos, hidrológicos y del carbonato de calcio en el ciclo del carbono orgánico disuelto, en especial de las sustancias húmicas. Estos factores no sólo abarcan el aspecto cuantitativo sino también el cualitativo.

Los estudios realizados en 25 lagunas de la Pampa deprimida (Ringuelet y col., 1967) indicaron la presencia de carbonato cuyo rango fue de 3 a 400 mg/l y de calcio entre 8,2 y 231,8 mg/l. Por consiguiente los fenómenos observados en la Laguna de Chascomús deben ser comunes a otras lagunas existentes en la región. Desde un punto de vista limnológico, se puede manifestar que los fenómenos vinculados al ciclo del carbono, que también inciden en los ciclos de nutrientes y oligoelementos (Tsusue y Holland, 1966; Kitano y col., 1971; Okumura y Kitano, 1986; Jurinak y Griffin, 1972; Otsuki y Wetzel, 1972; Murphy y col., 1983; Küchler-Krischun y Kleiner, 1990), ejercen influencia sobre el metabolismo y evolución de estos cuerpos de agua.

Estudios realizados en el Río Samborombón

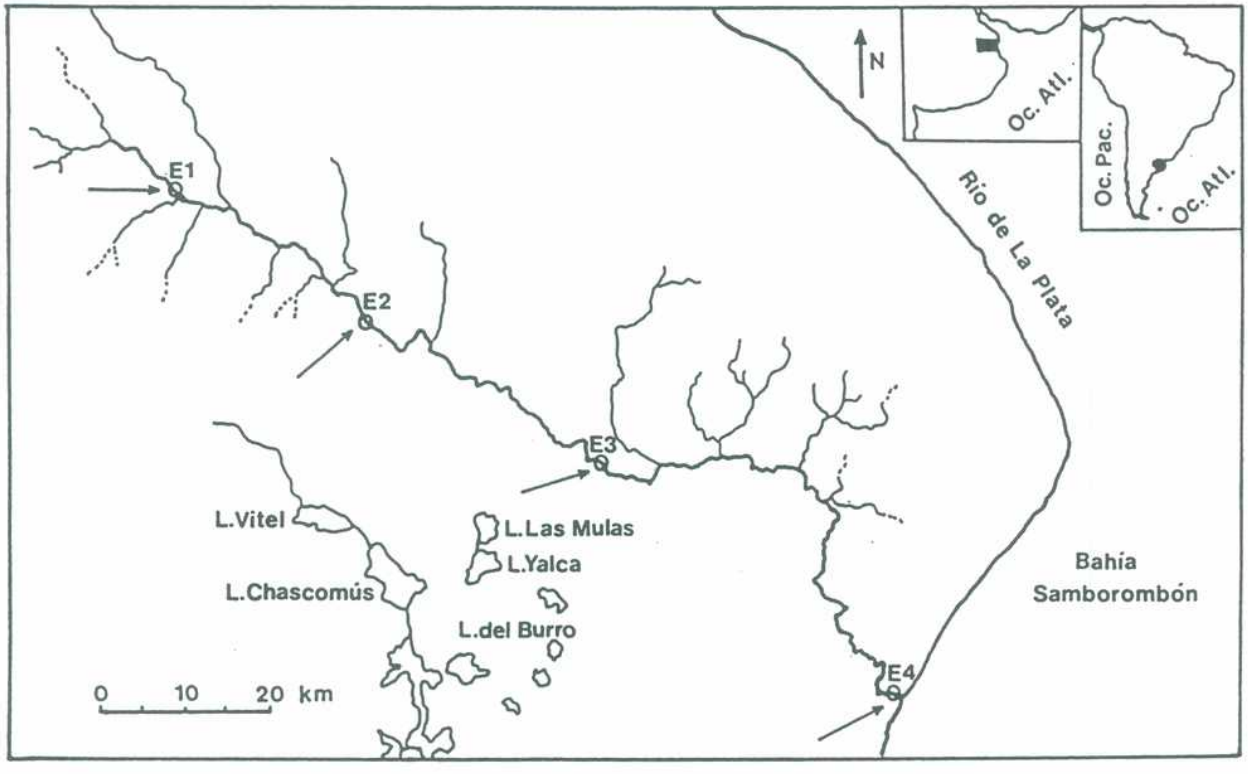
El Río Samborombón (figura 25), se encuentra ubicado en la Provincia de Buenos Aires entre 36° 15' S, 58° 30' O y 36° 45' S, 57° 30' O y su longitud es de 136 kilómetros. Los suelos de la cuenca de drenaje (alrededor de 550.000 hectáreas) son ricos en materia orgánica con elevada concentración de sustancias húmicas, motivo por el cual las aguas de este río poseen un color pardo amarillento. Es un tributario del Río de La Plata y desemboca en la bahía homónima, en la cual las aguas poseen características de ambiente marino (Urien, 1972).

El propósito del relevamiento en el Río Samborombón fue el de estudiar las sustancias húmicas en un ambiente lótico y en particular en este río, donde trabajos previos (Lavado y col., 1982; Taboada y col., 1987) indican la pérdida de sustancias húmicas por influencia de la concentración de sales en las proximidades de su desembocadura en el Río de La Plata.

En la figura 25 se pueden observar las estaciones de muestreo establecidas, que abarcaron la naciente del río, obviamente libre de toda influencia marina de la Bahía Samborombón, y otras tres estaciones relativamente equidistantes, con el fin de estudiar las posibles variaciones a lo largo del recorrido. La última de las mismas corresponde a un punto previo a la desembocadura del río en la bahía.

En la tabla 7 se presentan los datos promedio y coeficientes de variación de parámetros relacionados a la composición salina, materia orgánica soluble (evaluada en términos de demanda química de oxígeno) y sustancias húmicas (medidas en absorción a 250 nm y a 365 nm). Datos obtenidos en forma mensual a lo largo de un período de estudio que abarcó desde febrero de 1986 hasta enero de 1987.

Figura 25: Cuenca de drenaje del Río Samborombón. Las flechas señalan los puntos E1, E2, E3 y E4 de muestreo.



El coeficiente de variación ha sido incluido en el análisis de los datos, en razón de que en ambientes lóticos pueden producirse variaciones significativas, tanto a nivel espacial como temporal. En ambientes lénticos, por el contrario, el sistema está más amortiguado y los cambios súbitos existen o pueden tener lugar en zonas costeras o en las desembocaduras de los ríos y arroyos tributarios.

Del análisis de la tabla, puede apreciarse que la composición catiónica no presenta, en valores promedio, cambios apreciables entre las estaciones 1 a 3. En la estación 4, se observan aumentos para las concentraciones de sodio y potasio con valores elevados del coeficiente de variación (superando el 100%). Algo similar sucede con la composición aniónica, pues en la estación 4, se produce un incremento en los valores promedio de la proporción de cloruro y un decrecimiento en carbonato y bicarbonato, al igual que valores elevados del coeficiente de variación. Estos resultados están en correspondencia con la incidencia del Río de La Plata, que posee característica de ambiente marino, donde de acuerdo a Urien (1972), la salinidad de la Bahía Samborombón está comprendida entre 10 y 25 por mil. Por lo tanto, las mareas y otros factores hidrológicos determinan la ingresión de aguas marinas con el consecuente aumento de la proporción de cloruro de sodio en la composición salina, a la vez que explican los datos elevados del coeficiente de variación y el rango observado del residuo sólido soluble, que para la estación 4 fue de 1,4 a 2,4 g/l.

Los resultados de la demanda química de oxígeno y de la absorción a 250 y 365 nm, confirman que el río transporta concentraciones elevadas de sustancias húmicas.

Comparando las estaciones 1 a 4, se puede deducir en promedio, la disminución de ácidos húmicos que fuera señalada por Lavado y col. (1982), quienes interpretaron el fenómeno como el de una coagulación diferencial por influencia de la

Tabla 7: Parámetros químicos de las aguas del Río Samborombón. E1, E2, E3 y E4 estaciones de muestreo.

	E1		E2		E3		E4	
	VP	CV	VP	CV	VP	CV	VP	CV
pH	8,31	3	8,33	3	8,39	3	8,09	3
Na	40,0	52	39,9	59	42,6	54	46,9	82
K	0,7	26	0,6	29	0,7	31	1,9	112
Ca	1,7	51	1,8	43	1,8	46	1,7	23
Mg	4,5	67	4,5	61	4,5	75	5,5	118
Cl	28,6	58	25,9	63	27,5	68	42,2	123
SO_4	7,3	51	6,8	54	8,1	66	6,4	56
CO_3	0,3	111	0,3	95	0,3	73	0,05	186
HCO_3	7,3	22	5,9	25	5,6	19	4,9	20
RSS	3,3	26	3,1	50	3,3	50	3,7	80
DQO	27,3	27	24,1	26	22,9	34	22,0	24
A_{250}	1,03	34	0,81	27	0,81	35	0,73	30
A_{365}	0,20	11	0,16	35	0,15	45	0,13	39
% F_{250}	72,1	11	79,9	12	76,9	12	79,0	11
% F_{365}	51,3	13	59,1	25	54,3	17	56,3	18

VP valor promedio, CV coeficiente de variación.
Cationes y aniones se encuentran expresados en concentración mM.
RSS (residuo sólido soluble) en g/l.
DQO (demanda química de oxígeno) en mg O_2/l.
A_{250} es la absorción a 250 nm utilizando cubeta de 1 cm de paso de luz.
A_{365} es la absorción de luz a 365 nm utilizando cubeta de 1 cm de paso de luz.
% F_{250} es el porcentaje de ácido fúlvico obtenido en base a la absorción a 250 nm.
% F_{365} es el porcentaje de ácido fúlvico obtenido en base a la absorción a 365 nm.

concentración salina. Al gradiente salino -producto de la incidencia del Río de La Plata sobre el Río Samborombón- contribuiría la ingresión marina del período Holoceno, según Taboada y col. (1987). Sin embargo en los fenómenos de coagulación de sustancias húmicas interviene no sólo la concentración salina, sino la concentración de cada ion en particular, es decir que la composición iónica también es de importancia (Tipping y Ohnstad, 1984). Por consiguiente surgió como tema de interés, estudiar la coagulación de las sustancias húmicas en función de la concentración de cada uno de los cationes mayoritarios. Considerando datos propios y referencias específicas, se planteó la necesidad de evaluar la coagulación de los ácidos húmicos y fúlvicos separadamente. Por tal motivo se realizaron experiencias de laboratorio que se describen en la parte II del presente capítulo.

Aplicabilidad de la absorción en el UV-visible para la caracterización y evaluación de las sustancias húmicas en ambientes acuáticos

La estructura de las sustancias húmicas determina la propiedad de absorber radiación UV (por presencia de núcleos aromáticos) y en menor medida radiación visible. Esta característica ha sido ampliamente empleada para la determinación cuantitativa de las sustancias húmicas (Wilson, 1959; De Haan y col., 1982), siendo la absorción a 250 nm y 365 nm las comunmente utilizadas para tal fin. El hecho de que los ácidos húmicos precipiten a pH 1, nos permite su separación y consecuentemente la valoración de ácidos fúlvicos.

Teniendo en cuenta lo antedicho, en este capítulo se resumen los datos obtenidos para el Río Samborombón (S), Arroyo Vitel (Vi) y Laguna de Chascomús (Ce). Es decir, se ha

intentado relacionar datos de tres ambientes, en particular dos lóticos S y Vi y uno léntico Ce. Los resultados figuran en la tabla 8, donde se puede distinguir la coincidencia para ambas longitudes de onda en establecer qué muestra posee mayor proporción de ácidos fúlvicos. En este caso es Ce>Vi>S, aunque difieren en el resultado numérico debido a que la absorción por unidad de carbono a 250 nm es menor para ácidos húmicos que para ácidos fúlvicos, de acuerdo a Stewart y Wetzel (1981b). Esta diferencia en la absorción por unidad de carbono permite el empleo del cociente A_{250}/A_{365} que será menor para la muestra que presente mayor proporción de ácidos húmicos (De Haan, 1972a; De Haan y De Boer, 1987). En la tabla 8 puede observarse el cumplimiento de dicho índice, ya que el orden decreciente Ce>Vi>S, se corresponde con un aumento de la proporción de ácidos húmicos reflejado en los datos obtenidos a partir de la precipitación en medio ácido.

Además en la misma tabla, se encuentra el cociente de las absorciones calculado luego de la precipitación en medio ácido. Este cociente aumenta a causa de que solamente quedan en solución ácidos fúlvicos. Se podría suponer que en razón de que sólo quedan dichos ácidos, el índice en los tres casos debería ser el mismo, sin embargo no sucede así, probablemente debido a diferencias estructurales y/o a diferencias en los pesos moleculares que se traducen en diferencias de la absorción por unidad de carbono.

La materia orgánica disuelta, considerada en términos de demanda química de oxígeno, puede ser evaluada mediante la utilización de la absorción a determinadas longitudes de onda (Kieffer, 1981; De Haan y col., 1982), debido a la absorción específica de las sustancias húmicas que integran la mayor proporción de la misma (Münster, 1985). Dicha relación está condicionada a diferencias geográficas que introducen características particulares en la estructura y a la influencia de la calidad de agua del ambiente.

Tabla 8: Porcentaje de ácidos fúlvicos y relación A_{250}/A_{365} para los ambientes considerados. S: Río Samborombón; Vi: Arroyo Vitel; Ce: Centro de la Laguna de Chascomús.

	$\%AF_{250}$	$\%AF_{365}$	A_{250}/A_{365}	A_{250}/A_{365} (ácido)
S	65,1	44,4	5,0	7,3
Vi	88,5	69,1	7,4	9,4
Ce	94,2	82,3	9,3	10,6

En los tres casos considerados se relacionaron la demanda química de oxígeno con la absorción a 250 nm y 365 nm. En la tabla 9, se puede observar que para cada longitud de onda la regresión no es la misma para los tres ambientes, sugiriendo que la composición y estructura de las sustancias húmicas son distintas en cada caso. En la misma tabla se advierte que a 250 nm la correlación para Vi y Ce no es significativa, mientras que a 365 nm mejora para Vi y se hace muy significativa para Ce. En el caso de S es significativa para ambas longitudes de onda. Por lo tanto las correlaciones muestran, si se pretende evaluar la demanda química de oxígeno de la materia orgánica soluble a partir de datos de absorción, la necesidad de determinar los coeficientes de regresión y a la vez comprobar si la relación entre ambos parámetros es significativa para cada ambiente.

Finalmente, los resultados confirman la utilidad de la absorción en el UV-visible para establecer la proporción relativa de ácidos húmicos y ácidos fúlvicos por tratamiento con ácido a pH 1.

El cociente A_{250}/A_{365} constituye una forma sencilla y rápida para la comparación entre distintos ambientes de la proporción relativa de ácidos húmicos y ácidos fúlvicos, como

así también para el seguimiento de las fluctuaciones de la misma en un cuerpo de agua determinado.

La relación demanda química de oxígeno-absorción permite -de acuerdo al ambiente considerado y a la longitud de onda utilizada- la estimación de la materia orgánica soluble y de esta manera, evitar la determinación química que implica el desarrollo de una técnica lenta y tediosa. Al mismo tiempo y en base a los coeficientes de regresión, permite determinar el grado de similitud en la naturaleza química de las sustancias húmicas de los distintos ecosistemas.

Tabla 9: Correlación lineal entre la demanda química de oxígeno (DQO, mg O_2 consumido/l) y la absorción a 250 nm (1 cm de paso de luz) y la absorción a 365 nm (1 cm de paso de luz). a: ordenada al origen; b: pendiente; r: coeficiente de correlación; *: no significativo; **: 0.001 < P < 0,01; ***: P < 0,001. Número de determinaciones = 18. R: rangos encontrados para cada variable. S: Río Samborombón; Vi: Arroyo Vitel; Ce: Centro de la Laguna de Chascomús.

	250 nm			365 nm		
	a	b	r	a	b	r
S	9,5	17,5	0,68**	12,4	74,8	0,68**
Vi	21,7	1,0	0,04*	17,0	44,9	0,47*
Ce	10,9	7,6	0,25*	10,6	52,0	0,72***

	R-DQO	R-250	R-365
S	13,8-39,2	0,455-1,569	0,068-0,246
Vi	15,1-32,0	0,328-0,942	0,045-0,187
Ce	7,7-18,7	0,039-0,438	0,026-0,146

II. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE LAS SUSTANCIAS HUMICAS

Introducción

En esta segunda parte se describen algunas propiedades de las sustancias húmicas obtenidas mediante experimentos de laboratorio. En la primera parte se pusieron en evidencia los cambios que pueden experimentar los cuerpos de agua referidos al pH, salinidad, composición iónica, biomasa algal y producción primaria, cambios éstos originados por la acción de fenómenos climáticos e hidrológicos. Se observó a través de los relevamientos, cómo dichos cambios afectaron a las sustancias húmicas en forma cualitativa y cuantitativa. A partir de estas evidencias, se describen a continuación, los resultados obtenidos por medio de experimentos con variables controladas. Estos permiten ampliar el conocimiento acerca de las propiedades que tienen relación con el ciclo biogeoquímico de nutrientes y oligoelementos y al mismo tiempo corroborar comportamientos observados en el medio ambiente acuático.

Biodegradabilidad

Si bien es conocida la resistencia de las sustancias húmicas a la degradación biológica, en ciertos cuerpos de agua y bajo determinadas condiciones, se ha demostrado la existencia de bacterias que pueden degradar a estas sustancias. De Haan (1972b) aisló bacterias del género *Athrobacter* sp. del Lago Tjeukemeer (Holanda), las cuales crecieron en medios de cultivo con sustancias húmicas como única fuente de materia orgánica. En otro trabajo, De Haan (1977) demuestra que estas bacterias degradan ácidos fúlvicos de mayor peso molecular transformándolos en ácidos fúlvicos de menor peso molecular. De este modo, además de los fenómenos hidrológicos, también los procesos microbianos contribuirían a las fluctuaciones estacionales de la

distribución de pesos moleculares de sustancias húmicas en el Lago Tjeukemeer.

En el ejemplo recién mencionado las bacterias degradan o metabolizan directamente las sustancias húmicas. Otra posibilidad de degradación microbiana es la que tiene lugar a través del cometabolismo. Este proceso de oxidación bacteriana se denomina de esta manera debido a que consiste en la degradación del compuesto "A", que se produce si al mismo tiempo se encuentra presente otro compuesto "B". El compuesto "A" tiene la característica de ser resistente a la degradación bacteriana, mientras que el "B" es fácilmente degradable y parte de la estructura química de "A" es similar a "B". La presencia de "B" estimula el crecimiento microbiano generando enzimas que producen la oxidación de "A", que ofrece los mismos puntos de ataque que "B". Dicho proceso metabólico fue comprobado partiendo de un cultivo de *Pseudomonas* al cual se agregó agua filtrada (libre de bacterias) del Lago Tjeukemeer conteniendo ácidos fúlvicos, que se comportaron como A" y lactato que lo hizo como "B" (De Haan, 1974). De la misma manera en otra experiencia, se demuestra la existencia de cometabolismo, llevada a cabo por la microflora del agua del Lago Tjeukemeer, que degrada los ácidos fúlvicos presentes en la misma con lactato como compuesto "B" (De Haan, 1975).

Con el propósito de estudiar si las sustancias húmicas que ingresan a la Laguna de Chascomús a través de los tributarios sufren procesos de degradación bacteriana, se diseñaron experimentos (capítulo V parte experimental) consistentes en el agregado de agua del Arroyo Valdez, que posee elevada concentración de sustancias húmicas, a un volumen determinado de agua de la Laguna de Chascomús, proveniente del centro de la misma. Paralelamente, con el fin de comprobar la existencia de cometabolismo, se realizó la misma experiencia para otros tres casos, en los que se

agregaron cantidades crecientes (4, 20 y 40 mg de carbono) de lactato de sodio, citrato de sodio y glucosa respectivamente. Las incubaciones (20 °C) se prolongaron durante un mes, tomando alícuotas cada 24 horas que luego de filtradas fueron leídas a 365 nm. No se observaron cambios de absorción a lo largo de estas experiencias, indicando la no biodegradación de las sustancias húmicas y la ausencia del fenómeno de cometabolismo.

El resultado puede explicarse por la estructura de estas sustancias en particular y/o por las características de la microflora y demás condiciones del ecosistema. Por otra parte, este resultado señala que los procesos microbianos no controlan la dinámica de las sustancias húmicas, sino que la misma estaría condicionada, fundamentalmente, por fenómenos climáticos e hidrológicos.

Influencia del pH y fuerza iónica sobre la forma y el tamaño molecular

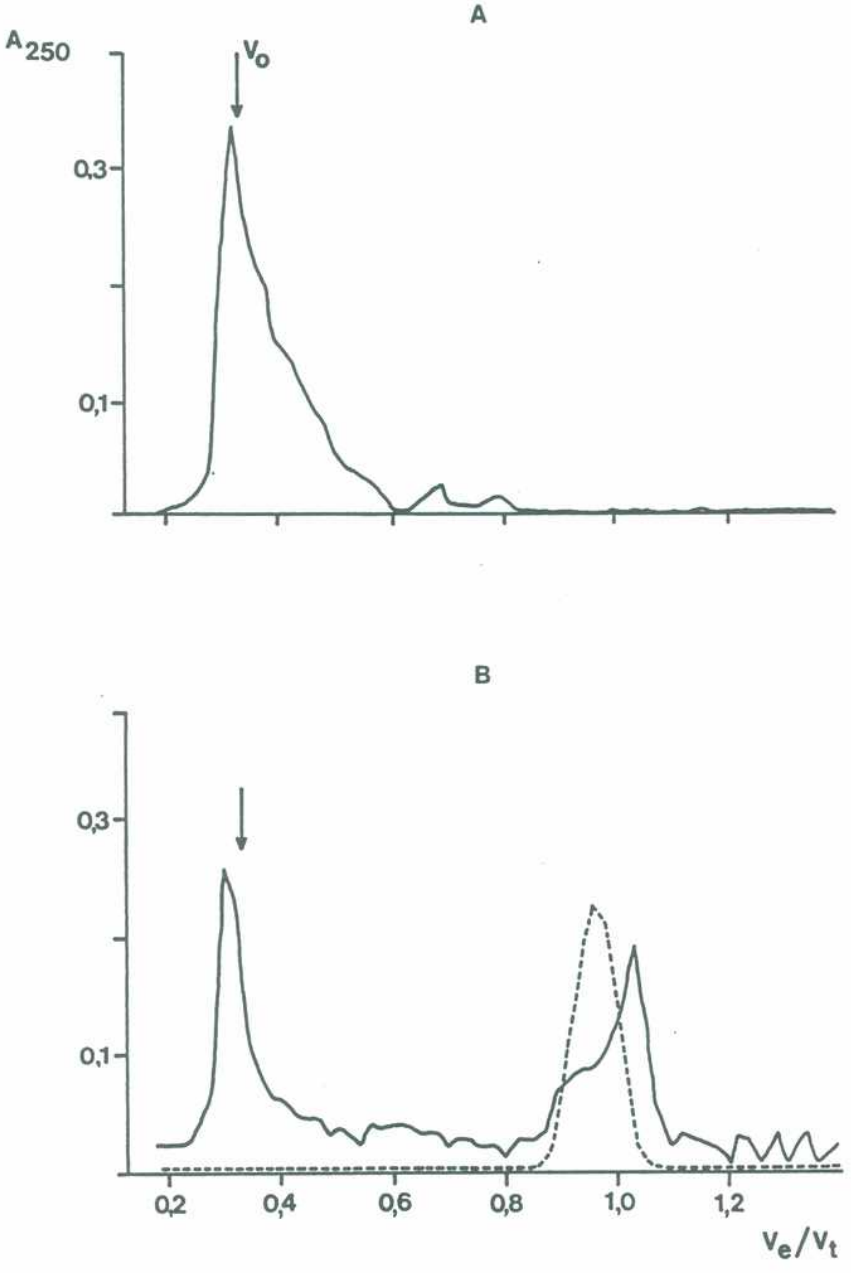
Como fuera destacado en el capítulo III, la cromatografía en gel ha constituido una técnica de gran utilidad para los estudios que involucran el seguimiento de los cambios de forma y tamaño molecular de las sustancias húmicas. Por consiguiente, a partir de los datos bibliográficos, se implementó dicha técnica para ser empleada con las sustancias húmicas provenientes de los ambientes acuáticos motivo de interés en el presente trabajo.

En primer término y con la idea de comprobar lo expresado en la literatura acerca de evitar la formación de gradientes salinos en la columna de gel, se decidió utilizar una muestra de agua proveniente de zonas de turberas (Tierra del Fuego) que, como es sabido, poseen elevada concentración de sustancias húmicas. Dicha muestra contiene baja concentración salina y su conductividad específica (61 µmho/cm) se debe

prácticamente a los grupos carboxilos y fenólicos ionizados. En la figura 26 A, se puede observar el perfil cromatográfico obtenido mediante la siembra de la muestra en una columna (73 x 2 cm) de Sephadex G-50 y siguiendo la elución a 250 nm. Este perfil se caracteriza por la presencia de un pico excluido. Seguidamente, con el objeto de observar el efecto de un gradiente salino en la columna, se procedió a agregar a la muestra cloruro de sodio hasta llevar la conductividad específica a 32.000 µmho/cm. El resultado obtenido se puede apreciar en la figura 26 B, con la existencia de un pico excluido y otro incluido que eluye inmediatamente después del cloruro de sodio. De este modo, los resultados están de acuerdo con los obtenidos por Lindqvist (1967), quien afirma que en ausencia de sales se produce la adsorción de las sustancias húmicas en el gel de Sephadex y una vez ocupados todos los sitios, sale el exceso en forma de pico excluido de las sustancias de mayor como así también de las de menor peso molecular. Si se repite la experiencia sembrando la muestra en presencia de sales, en una primera etapa se producirá nuevamente la adsorción y el exceso saldrá como pico excluido, pero a medida que se desplaza el frente salino se producirá la desorción y en consecuencia, aparecerá otro pico inmediatamente después de la salida de las sales. Razón por la cual, el mencionado autor sostiene la necesidad de evitar gradientes salinos que conducen a errores y de utilizar soluciones salinas como eluyentes. Atendiendo a estos resultados, en los sucesivos experimentos se usaron soluciones buffer de la misma fuerza iónica que la muestra.

Con el propósito de estudiar la influencia de los cambios de pH sobre el tamaño molecular, se partió de una muestra proveniente del Arroyo Valdez (figura 27) que posee una elevada concentración de sustancias húmicas. Se llevó dicha muestra a pH 3,6, se sembró en una columna (73 x 2 cm)

Figura 26: Cromatografía en gel (Sephadex G-50) de una muestra proveniente de zonas de turberas (Tierra del Fuego): A. Muestra natural; B. Muestra luego del agregado de cloruro de sodio _____ , conductividad específica ---------- . Vo = volumen de exclusión, Ve = volumen de elución y Vt = volumen total.



de Sephadex G-50, se eluyó con una solución buffer acético-acetato a ese pH y se midió la absorción a 250 nm de las fracciones obtenidas a la salida de la columna. Seguidamente se llevó otra alícuota de la muestra a pH 9,0 y se sembró en la columna bajo las mismas condiciones, utilizando como eluyente buffer Tris, tris-(hidroximetil)-amino metano, al mismo pH. Los perfiles de la figura 27 señalan que con el aumento del pH se produce la disminución de Ve (volumen de elución)/Vt (volumen total), implicando el incremento del tamaño molecular. La razón de este comportamiento puede hallarse en que a bajo pH los grupos carboxilos y fenólicos se encuentran protonados, favoreciendo la existencia de uniones puente de hidrógeno que promueven una estructura espacial de características esferoidales. Es decir, que las cadenas del polímero se encuentran plegadas ocupando el menor espacio posible. Por el contrario, a pH alcalino se produce la ionización de los grupos carboxilos e hidroxilos fenólicos, desaparecen las uniones por puente de hidrógeno y en consecuencia, se promueve la repulsión electrostática conduciendo a una estructura de tipo fibrilar, lineal o desplegada que ocupa mayor espacio. Incluso de esta manera, se posibilita la asociación con metales a través de la formación de complejos y se favorece a la vez el incremento del tamaño molecular.

Del mismo modo, se estudió la influencia de la fuerza iónica sobre el tamaño molecular, a partir de muestras del Arroyo Valdez llevadas a pH 7,0 con buffer fosfato de distinta fuerza iónica. En la figura 28 se encuentran representados el Ve/Vt de cada uno de los picos obtenidos. Se observa en un rango de 0,01 a 0,4 de fuerza iónica el incremento del Ve/Vt que implica la disminución del tamaño molecular. La explicación puede fundarse en que con el incremento de la concentración de sales, los electrolitos secuestran por competencia las moléculas de agua que se

Figura 27: Cromatografía en gel (Sephadex G-50) de la muestra del Arroyo Valdez a pH 9,0 ——— , pH 3,6 ..... .

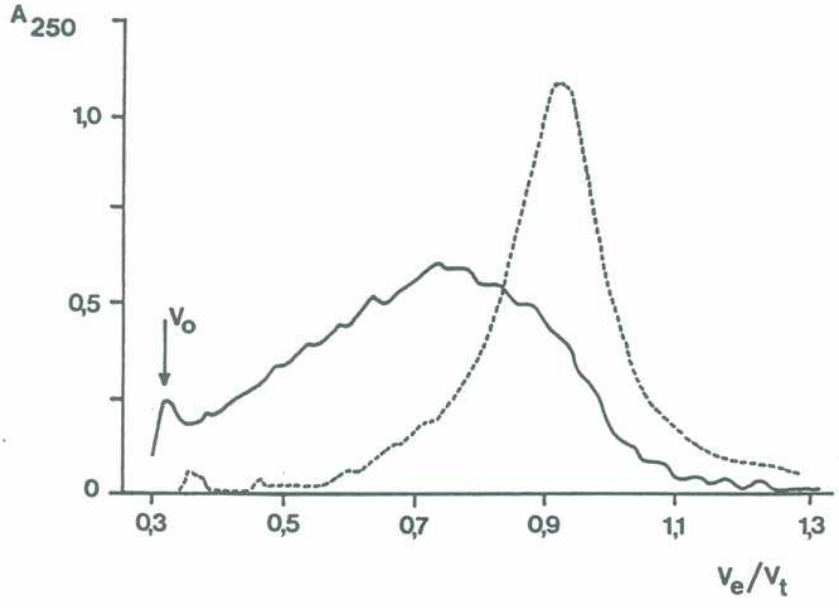
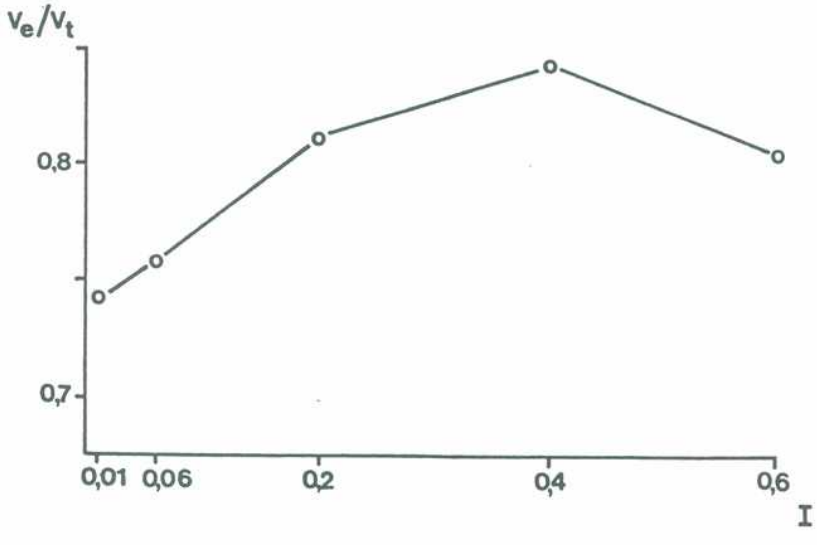


Figura 28: Relación entre Ve (volumen de elución)/Vt (volumen total) y fuerza iónica (I) a pH 7,0 de la muestra del Arroyo Valdez.



encuentran separando las cadenas del polímero, conduciendo al repliegue de las mismas, que ocupan consecuentemente menor espacio y provocando en definitiva la disminución del tamaño molecular antedicho. A fuerza iónica 0,6 se comienza a obtener el fenómeno inverso que puede relacionarse a una etapa inmediatamente anterior al fenómeno de "salting out". Es decir a fuerza iónica elevada comienza a producirse la aglomeración de las cadenas previo a la coagulación, que se traduce en un aparente aumento del tamaño molecular (Ve/Vt menor).

Se puede concluir a modo de resumen, que a pH bajo o fuerza iónica elevada las sustancias húmicas tienen menor tamaño molecular dado que la forma tiende a ser esferoidal, mientras que a pH alto o fuerza iónica baja el tamaño tiende a ser mayor debido a una disposición espacial lineal del polímero.

Influencia de la composición iónica en la coagulación de sustancias húmicas

Teniendo en cuenta lo destacado en la parte I acerca del fenómeno de coagulación de sustancias húmicas, que surge a través de los datos de relevamiento, se realizaron una serie de experimentos sobre una muestra proveniente de la estación 1 libre de influencia marina de la Bahía Samborombón (figura 25), con el objeto de estudiar la incidencia de la concentración de cada uno de los cationes mayoritarios sobre los ácidos húmicos y ácidos fúlvicos, o sea sobre las distintas fracciones que integran las sustancias húmicas presentes en el Río Samborombón.

Con tal motivo en primer lugar, se implementó una marcha tendiente a separar ambas fracciones. Dado que los experimentos a llevar a cabo exigen tener en cuenta que se trata de polímeros naturales con una determinada estructura

espacial que condiciona sus propiedades químicas, dicha marcha se caracterizó por evitar tratamientos químicos drásticos para lograr obtener ambas fracciones libres de sales. El esquema de obtención de las fracciones puede observarse en la figura 29.

Los procedimientos han consistido básicamente, en diálisis, pasaje por resina Amberlite (forma ácida) y cromatografía en gel. En un primer paso se coloca la muestra dentro de la bolsa de diálisis, con el fin de retener las fracciones de mayor peso molecular y se lava la misma con agua destilada. El lavado se continúa hasta constancia de lectura de absorción a 365 nm y hasta detectar por conductividad específica, la eliminación de sales en el interior de la bolsa.

Para retener las de menor peso molecular, se procede a realizar una diálisis inversa, colocando en una probeta provista de un agitador magnético, un litro de muestra y la bolsa de diálisis conteniendo, en este caso, agua destilada. En estas condiciones y favorecida por la agitación, se produce la difusión de las sustancias húmicas de menor peso molecular hacia el interior de la bolsa. Transcurrido determinado período de tiempo, se la retira y se conserva el contenido. Se llena nuevamente la bolsa con agua destilada y se repite este procedimiento varias veces hasta prácticamente no detectar presencia de sustancias húmicas dentro de la misma. Las fracciones así obtenidas se mezclan, se completa a un litro con agua destilada y se mide la absorción a 365 nm (Ao). Seguidamente, se concentra a vacío en rotavapor (reducción aproximadamente a la décima parte) y el concentrado se desala por pasaje en columna de Sephadex G-15. La separación de las sales se logra con buen resultado según puede apreciarse en la figura 30. El pico correspondiente a la muestra se diluye a un litro y se lee a 365 nm. Por comparación de esta lectura con Ao se deduce que una vez

Figura 29: Esquema de separación de las sustancias húmicas.

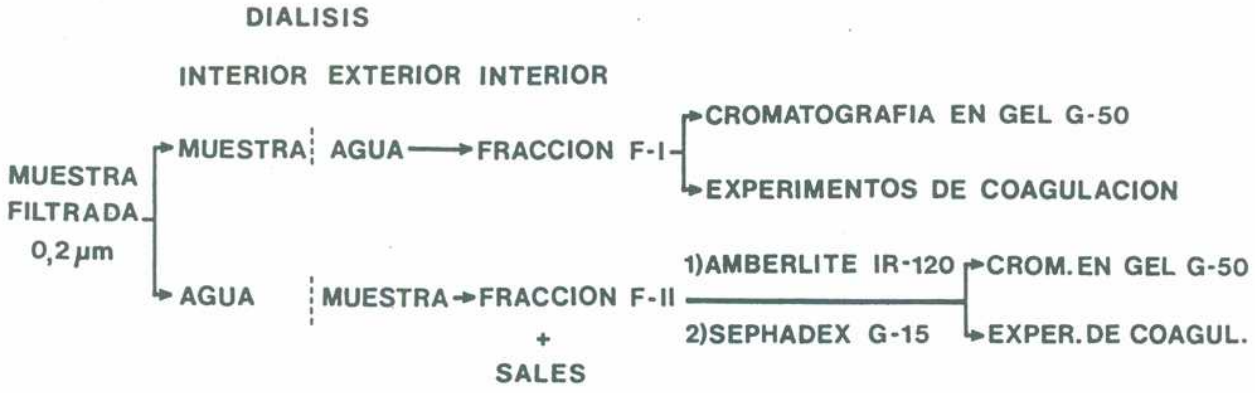
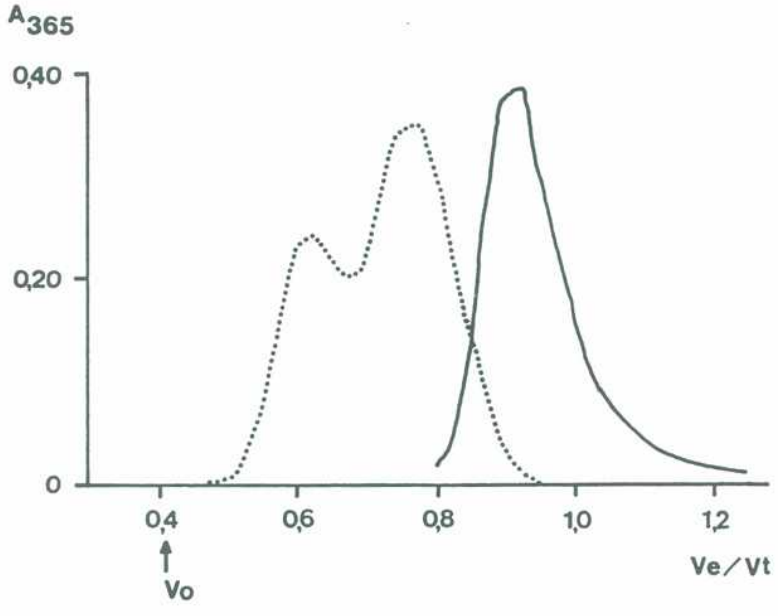


Figura 30: Cromatografía en gel (Sephadex G-15) de la fracción F-II ____ y de las sales ..... .



concluido el procedimiento, el porcentaje de recuperación es de alrededor del 80%.

En la figura 31 A se observa la cromatografía en gel de la muestra total en donde se puede apreciar que las fracciones no se encuentran resueltas. En la figura 31 B se encuentra representada la fracción de mayor peso molecular F-I, que muestra la presencia de componentes de menor peso molecular, debido probablemente a la interacción de F-I con componentes de F-II que por el procedimiento de diálisis no fue posible separar. La figura 31 C corresponde a la fracción de menor peso molecular que también muestra cierto grado de dispersión de pesos moleculares. Cabe destacar que esta cromatografía en gel se realizó utilizando buffer fosfato de la misma fuerza iónica y pH que la muestra original, obedeciendo a los detalles mencionados anteriormente. De la figura 31 se desprende que el procedimiento propuesto no resultó totalmente efectivo en la separación de las fracciones, pero este tipo de fraccionamiento evitó un tratamiento químico drástico conducente a la alteración de la estructura nativa de las sustancias. A pesar de la no efectividad del procedimiento descripto, la obtención de ambas fracciones permite un estudio preliminar acerca de la influencia de la concentración de los distintos cationes en la coagulación de las sustancias húmicas.

Los resultados obtenidos para la coagulación de F-I se encuentran resumidos en la figura 32 A, en la que se puede observar que dicha coagulación se produce aún frente a bajas concentraciones de sal y permanece en el mismo orden para altas concentraciones. Los cationes divalentes son los más efectivos para inducir la coagulación, en concordancia con lo observado por otros autores para ácidos húmicos (Eckert y Sholkovitz, 1976; Sholkovitz y Copland, 1981). Sin embargo los datos cuantitativos presentados por estos autores indicaron mayor porcentaje de coagulación, especialmente

Figura 31: Cromatografía en gel (Sephadex G-50) de las sustancias húmicas del Río Samborombón: A. Muestra total, B. Fracción F-I y C. Fracción F-II.

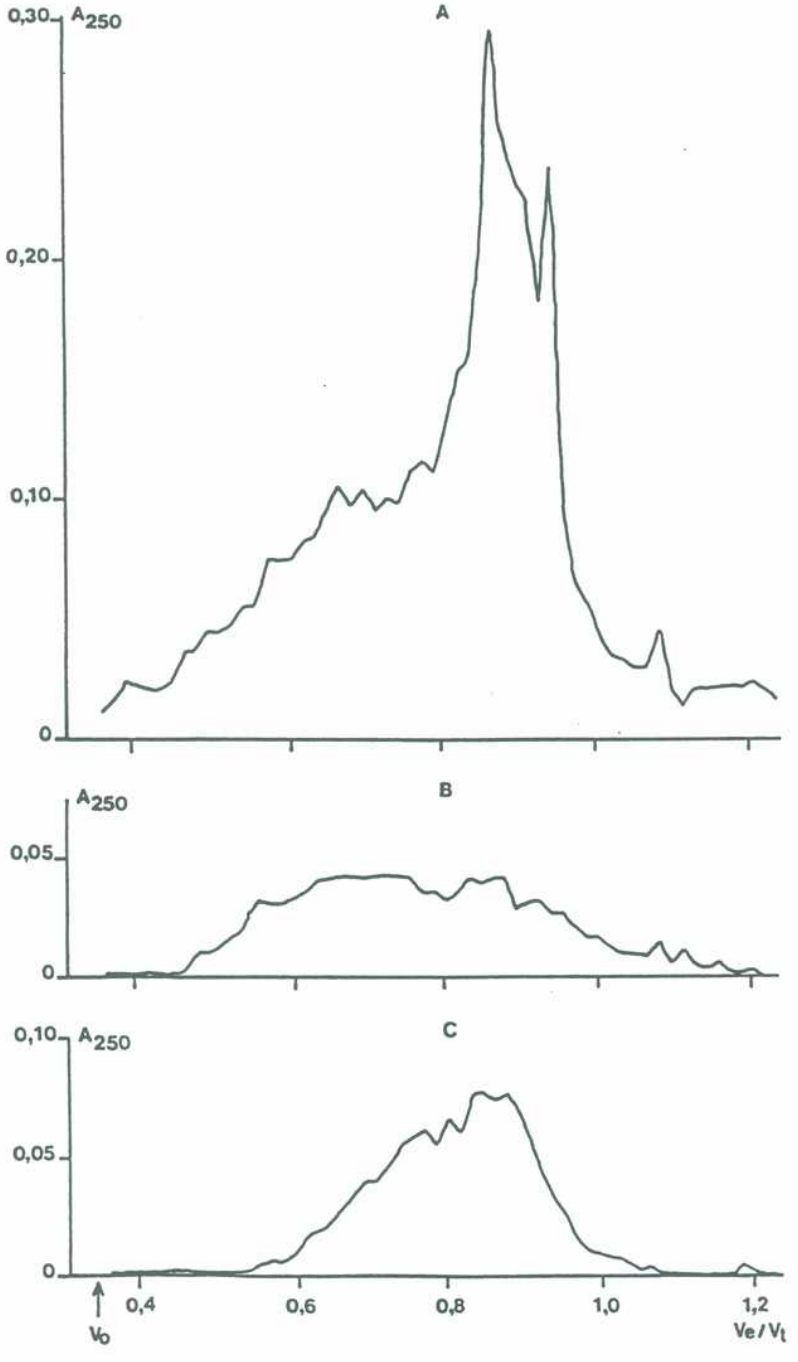
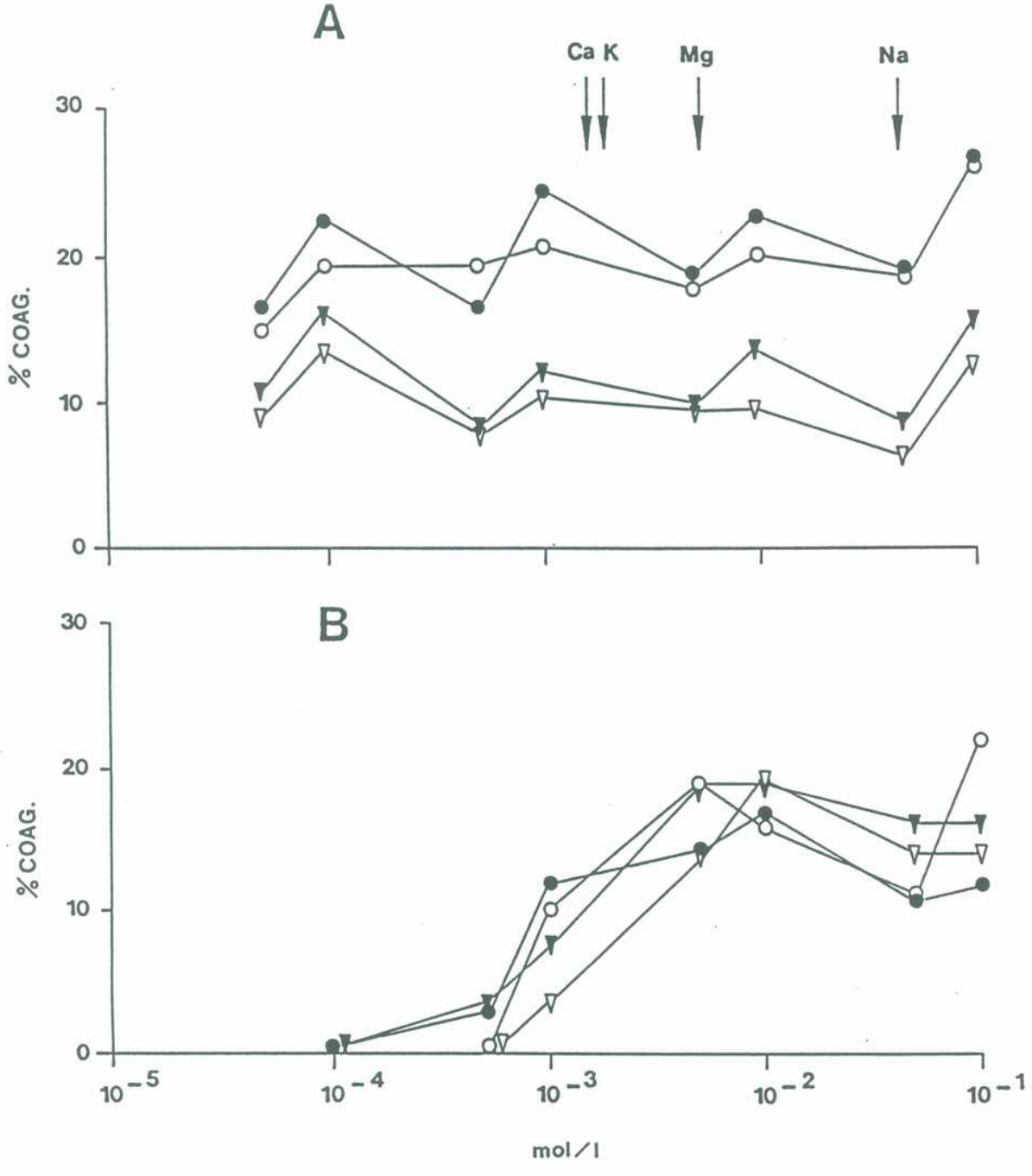


Figura 32: Porcentaje de coagulación de la fracción F-I (A) y de F-II (B) en función de los electrolitos agregados $CaCl_2$ (o), $MgCl_2$ (●), NaCl (▽), KCl (▼). Las flechas indican las concentraciones medias de cada catión naturalmente presentes en las aguas del Río Samborombón.



promovida por el calcio, que los informados en el presente trabajo.

La coagulación de la fracción F-II tiene lugar sólo a altas concentraciones de electrolitos siendo independiente de la naturaleza del catión interviniente (figura 32 B).

De acuerdo a Tipping y Ohnstad (1984), la posibilidad de coagulación no sólo existe a partir de la diferencia de pesos moleculares sino de otras características como la presencia de grupos polares que permiten la formación de complejos con la consecuente aglomeración e inestabilidad de los mismos, además de las condiciones establecidas por el medio: pH, fuerza iónica, gradiente salino, etc.

Los resultados obtenidos indican que las concentraciones de electrolitos normalmente presentes en el Río Samborombón son lo suficientemente altas como para inducir la coagulación a lo largo del río. Las fracciones de mayor peso molecular se encuentran afectadas en mayor magnitud por los cationes divalentes, presentes naturalmente en más baja concentración, que por los cationes monovalentes como el sodio que se encuentra en más alta concentración. Con respecto a las fracciones de menor peso molecular, son igualmente afectadas por iones divalentes y monovalentes. Los datos obtenidos para la estación 4 (tabla 7) que presentó la concentración de sales más elevada y la menor concentración de sustancias húmicas en relación a las otras estaciones, sugieren que la coagulación de las sustancias húmicas de mayor y menor peso molecular sería muy importante una vez que las aguas del Río Samborombón alcanzan el estuario del Río de La Plata.

Interacción entre sustancias húmicas e hidratos de carbono

El proceso de fotosíntesis (autotrofía) y el proceso de respiración (heterotrofía) son los dos procesos, desde el punto de vista trófico, fundamentales en el ciclo del carbono

en los ecosistemas acuáticos. En ambos casos, la magnitud de los mismos depende de las características del cuerpo de agua, que incluyen las condiciones climáticas, la cuenca de drenaje, la morfometría e hidrología de la cubeta, disponibilidad de nutrientes, circulación horizontal y vertical de las aguas, composición química del agua, etc. Si se pretende estimar el grado de fotosíntesis o autotrofía (producción primaria), el problema se circunscribe a medir el dióxido de carbono consumido o el oxígeno liberado. De manera inversa si se desea evaluar el nivel de heterotrofía, se podría intentar determinando el oxígeno consumido o el dióxido de carbono liberado, lo cual no se efectúa en razón de la baja sensibilidad e inconvenientes prácticos. Por tal motivo, es frecuente evaluar la capacidad heterotrófica potencial a partir del consumo de sustratos naturalmente presentes en las aguas naturales, como glucosa, acetato, glicolato, etc. Básicamente el método consiste en estudiar la velocidad de degradación de dichos sustratos, asumiendo que toda la población bacteriana actúa a través de una enzima que cumple el modelo de cinética enzimática de Michaelis-Menten. Mediante este método se obtienen como datos la velocidad máxima (Vmáx) de consumo de sustrato, la constante de afinidad enzima-sustrato (Kt), el tiempo de renovación, que es el tiempo requerido por la población para la transformación de todo el sustrato investigado (Tt) y la concentración de sustrato naturalmente presente (Sn). Los primeros en poner en práctica este modelo fueron Parsons y Strickland (1962). Posteriormente han aparecido numerosos trabajos referidos al tema con la finalidad de estimar la capacidad heterotrófica potencial, así como para utilizarla como criterio del grado de eutroficación en cuerpos de agua (Albright y Wintworth, 1973), al igual que para evaluar la incidencia de metales pesados sobre la actividad bacteriana

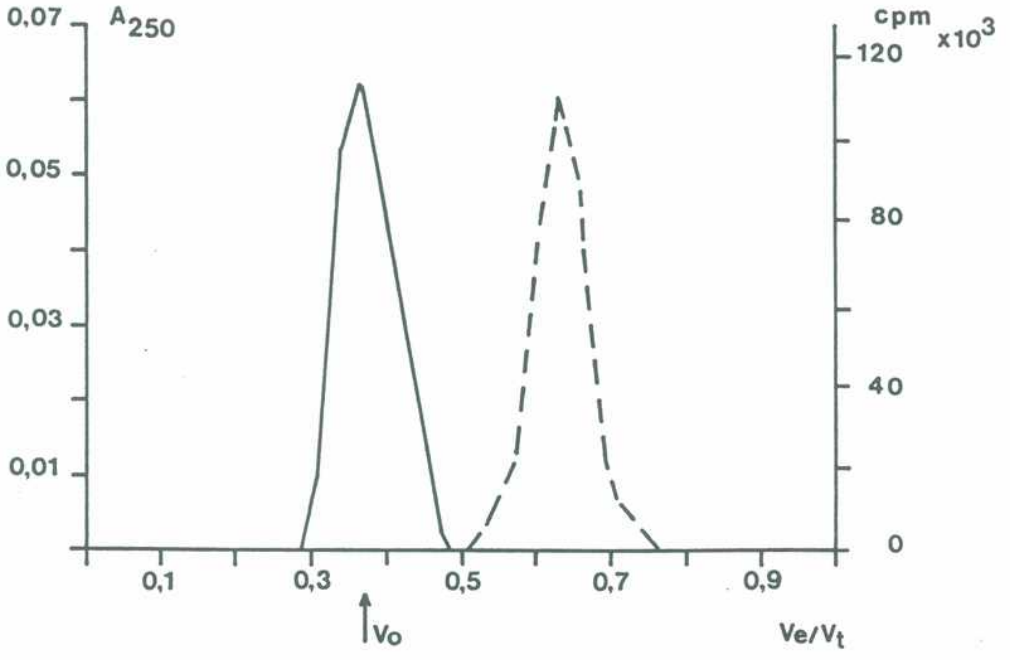
(Said y Lewis, 1991) y la degradación de contaminantes (Schmidt y Gier, 1990; Oldenhuis y col., 1991).

El desarrollo del proceso de respiración, a través de la actividad bacteriana heterotrófica, plantea como primer paso la necesidad de conocer el grado de disponibilidad de los sustratos, que se encuentra condicionado a las características de cada ecosistema. Al respecto las sustancias húmicas constituyen uno de los factores a tener en cuenta, pues poseen en su composición grupos carboxilos e hidroxilos fenólicos que permiten la existencia de interacciones por medio de fuerzas de van der Waals, dipolo-dipolo y puente de hidrógeno con otras moléculas del medio. La magnitud de estas interacciones depende de las características y concentración de las sustancias húmicas presentes (peso molecular, cantidad de grupos carboxilos e hidroxilos fenólicos) y de la naturaleza de la sustancia con la cual interacciona.

Seguidamente se considera la interacción de las sustancias húmicas provenientes de la Laguna del Burro (cuyas características limnológicas se tratan en la parte III del presente capítulo) con glucosa (sustrato normalmente existente en los cuerpos de agua). Se realizaron las experiencias por medio de la técnica de filtración por geles (detalladas en el capítulo V parte experimental), empleando buffer Tris-NaCl de pH 9,2 y fuerza iónica 0,03 iguales a la la muestra. Se adiciona al buffer azida sódica hasta una concentración final de 0,02%, de manera de lograr las condiciones de esterilidad necesarias para evitar la ingerencia de microorganismos que pudieran consumir glucosa y asegurar la obtención de resultados referidos sólo a la interacción abiótica.

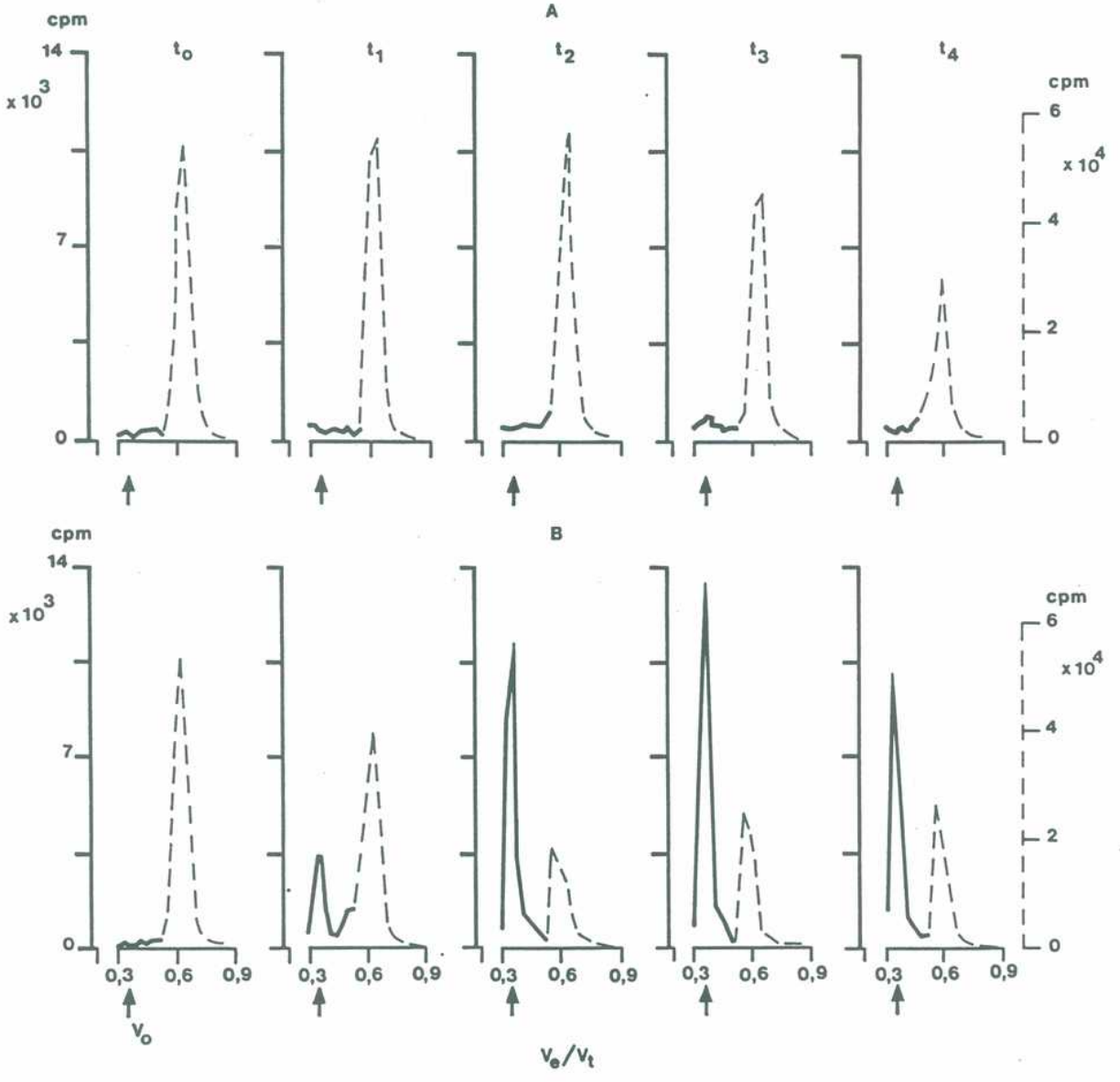
Como se puede apreciar en la figura 33, la cromatografía en gel de las sustancias húmicas de la Laguna del Burro en Sephadex G-15, dio como resultado un pico excluido.

Figura 33: Cromatografía en gel (Sephadex G-15) de las sustancias húmicas _____ y [^{14}C] glucosa - - - -.



En la misma figura se grafica la cromatografía en gel de glucosa, realizada en forma paralela utilizando glucosa marcada con ^{14}C, que presentó un pico incluido. La base del ensayo consistió en adicionar glucosa marcada a la muestra de sustancias húmicas y en estudiar la presencia de ésta en el pico excluido. Después de adicionar la glucosa marcada a la muestra se realizaron cromatografías en gel cada 24 horas durante cuatro días consecutivos, efectuando paralelamente cromatografías en gel de glucosa testigo (glucosa sin adición de muestra). Comparando la figura 34 A (correspondiente al testigo) con la figura 34 B (perteneciente a la muestra adicionada de glucosa), se comprueba la existencia de interacción, donde una fracción sale con las sustancias húmicas y el resto sale en el Ve/Vt correspondiente a la

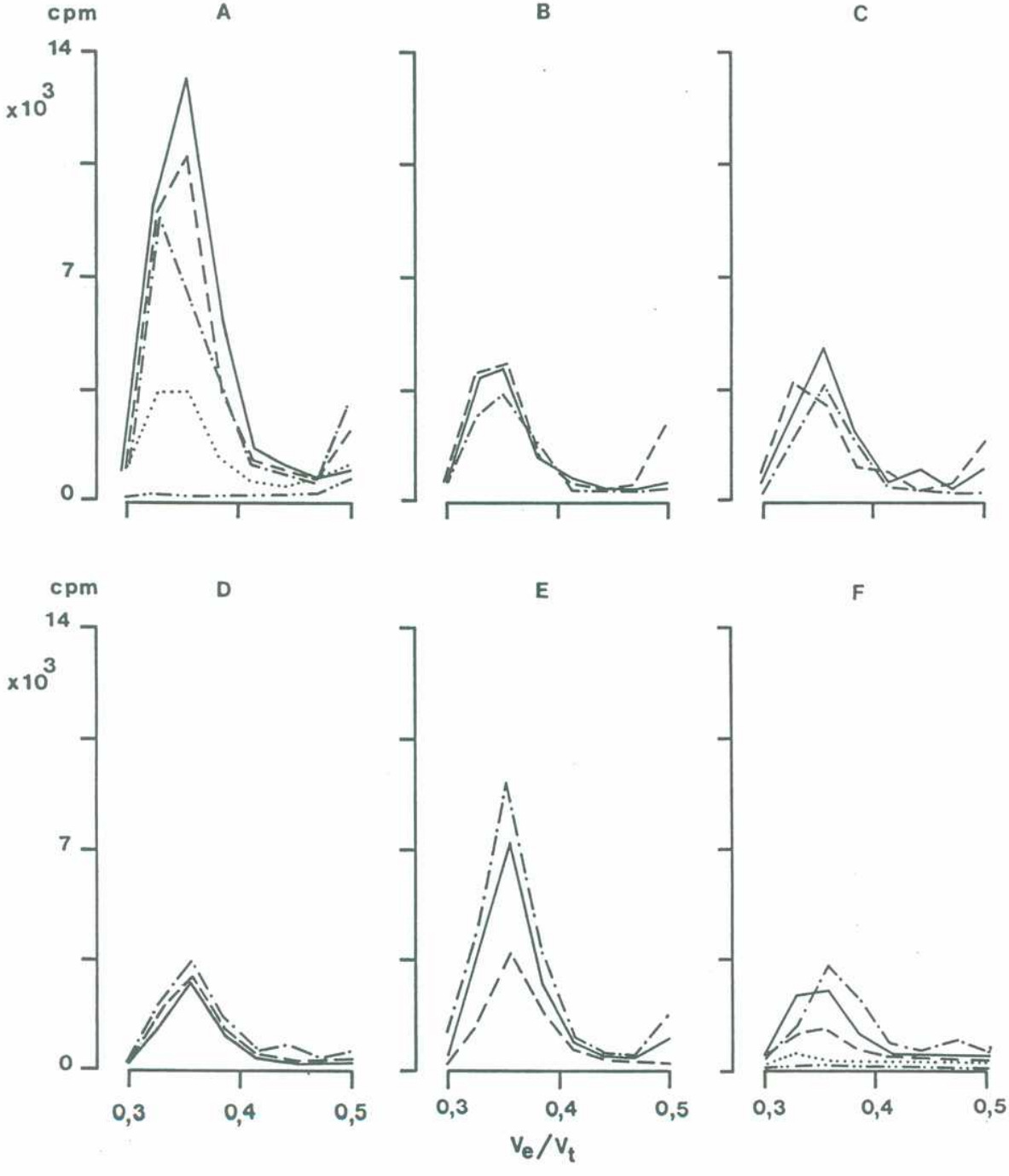
Figura 34: Cromatografía en gel (Sephadex G-15) de: A: [^{14}C] glucosa, B: sustancias húmicas + [^{14}C] glucosa. to = 0; t1 = 1 día; t2 = 2 días; t3 = 3 días; t4 = 4 días.



glucosa libre. La interacción sustancia húmica-glucosa se incrementa con los días, indicando que la glucosa se acomoda lentamente en los sitios activos del polímero. El experimento se termina a los cuatro días en razón de que, como se aprecia en la figura 34 A y 34 B, se pierde actividad debido probablemente a fenómenos de adsorción sobre las paredes del vial.

Con el objetivo de investigar si la interacción observada es de carácter reversible, en la cual se establecería un equilibrio entre sustancia húmica-glucosa y sustancia húmica y glucosa libres, se realizó un experimento consistente en agregar transcurridas las primeras 24 horas de interacción con glucosa marcada, glucosa no marcada en una concentración alrededor de 100 veces mayor. Comparando la figura 35 A y B -donde se encuentran graficados solamente los picos correspondientes a la interacción sustancia húmica-glucosa (pico excluido)- se observa que en B el área de los picos es menor, indicando un intercambio entre glucosa marcada y no marcada. A pesar de que se observa un área significativamente menor a partir del segundo día, en el tercero se mantiene en el mismo orden y podría decirse lo mismo para el cuarto, puesto que si bien es algo menor, esta disminución puede adjudicarse al problema de adsorción mencionado. La ausencia de registro de una disminución progresiva de glucosa marcada, indicaría haber alcanzado el equilibrio para el intercambio o la existencia de grupos activos diferenciales en el polímero que lograrían interactuar en una forma irreversible. Esta forma encuentra fundamento en que, de existir sitios activos iguales (con la misma posibilidad de intercambio), el desplazamiento de glucosa marcada debería haber sido mayor, teniendo en cuenta que la glucosa no marcada se encontraba superando en dos órdenes la concentración con respecto a la marcada.

Figura 35: Pico excluido de la cromatografía en gel de:
A: sustancias húmicas + [^{14}C] glucosa de t = 0 _..._..._.. ,
t = 1 ..... , t = 2 _ _ _ _ , t = 3 _____ , t = 4 días _._._. ;
B: sustancias húmicas + [^{14}C] glucosa + glucosa de
t = 2 _ _ _ _ _ _ , t = 3 _____ , t = 4 días _._._. ;
C: sustancias húmicas + [^{14}C] glucosa + galactosa, t = idem B;
D: sustancias húmicas + [^{14}C] glucosa + sacarosa, t = idem B;
E: sustancias húmicas + [^{14}C] glucosa + almidón , t = idem B;
F: sustancias húmicas + [^{14}C] glucosa a pH = 7,5, t = idem A.



Se repitió la prueba en las mismas condiciones con galactosa no marcada para observar si se producía intercambio con glucosa marcada. En la figura 35 C se encuentran los resultados que denotan un comportamiento similar al de glucosa no marcada. Por consiguiente se deduce la existencia de un intercambio de la misma magnitud, indicando que la interacción producida con glucosa es inespecífica. Al repetir el experimento empleando sacarosa no marcada (figura 35 D) se obtuvieron resultados similares, señalando cierta independencia de la interacción con el peso molecular al menos hasta ese nivel. En cambio, realizada la experiencia con el almidón soluble, se advirtió un intercambio menor (figura 35 E).

El pH de la muestra es de 9,2, en el cual los grupos carboxilos e hidroxilos fenólicos se encuentran completamente disociados. Se decidió llevar la muestra a pH 7,5 y realizar nuevamente la experiencia con glucosa marcada. A este pH, en que los grupos carboxilos e hidroxilos fenólicos se encuentran parcialmente protonados, también se observa interacción pero de menor magnitud (figura 35 F). Se verifica así la naturaleza polar de la interacción, que se halla favorecida cuando los grupos intervinientes se encuentran en el mayor grado de disociación.

Los resultados demuestran entonces la existencia de interacción entre las sustancias húmicas y los hidratos de carbono, producida por la interacción entre grupos polares que implica interacciones débiles, no específicas, hasta cierto nivel no influidas por el peso molecular del hidrato de carbono y sensibles a los cambios de pH. Esta clase de interacciones, si bien incide en el transporte y distribución de materia en los cuerpos de agua, no impide que metabolitos, como los hidratos de carbono, se encuentren biodisponibles para la microflora del medio acuático.

Interacción entre sustancias húmicas y metales pesados

Las sustancias húmicas tienen la propiedad de formar complejos tipo quelato con metales. Dicha propiedad ejerce influencia sobre la biodisponibilidad y toxicidad de los metales, afectando su ciclo biogeoquímico. En particular son muy importantes los complejos que se forman con los metales pesados provenientes de deshechos industriales, debido a su implicancia a nivel ecotoxicológico. A modo de ejemplo, estudios realizados en peces de la Laguna de Chascomús, indicaron lesiones histológicas en branquia, hígado y riñón atribuibles a metales pesados (Romano y Cueva, 1988).

A continuación se exponen los resultados relacionados con la formación de complejos entre las sustancias húmicas de la Laguna del Burro y cadmio, y entre las primeras y cromo. Existe información acerca de la presencia de estos metales como contaminantes en cuerpos de agua de nuestro país (Muse y col., 1989).

El cadmio entre otros usos, se emplea como componente en aleaciones fácilmente fusibles, como electrodo de lámparas de vapor de cadmio y celdas fotoeléctricas. Las sales se usan en fotografía, en operaciones de grabado y litografía. El cromo se utiliza como constituyente de aleaciones de acero, para recubrir vasijas, instrumentos, etc. Las sales, como el cromato de sodio y potasio, se emplean en la fabricación de algunos esmaltes, el óxido de cromo como pigmento verde y los dicromatos de sodio y potasio en el curtido del cuero, en el teñido de las fibras textiles, en la fabricación del pigmento cromato de plomo (amarillo de cromo o amarillo de Leipzig) y como oxidante en los procesos de fabricación de compuestos orgánicos. Cabe destacar que las aguas de la Laguna del Burro no presentan contaminación con estos metales, puesto que el cadmio y cromo estuvieron por debajo de 0,5 ng/l y 2 ng/l respectivamente.

El estudio se realizó mediante la técnica de cromatografía en gel de manera similar a la del análisis de la interacción con hidratos de carbono, utilizando gel de Sephadex G-15 y buffer Tris-NaCl adicionado de azida sódica al 0,02% como eluyente. Con dicho buffer se prepararon separadamente, soluciones de 10,0 mg/l de cada uno de los metales, se realizó la cromatografía en gel y en las fracciones obtenidas, se analizaron el cadmio por absorción atómica y el cromo por medición de la actividad (en la experiencia se utilizó ^{51}Cr como trazador). La cromatografía en gel dio como resultado un pico incluido correspondiente al metal libre (figura 36 A y B).

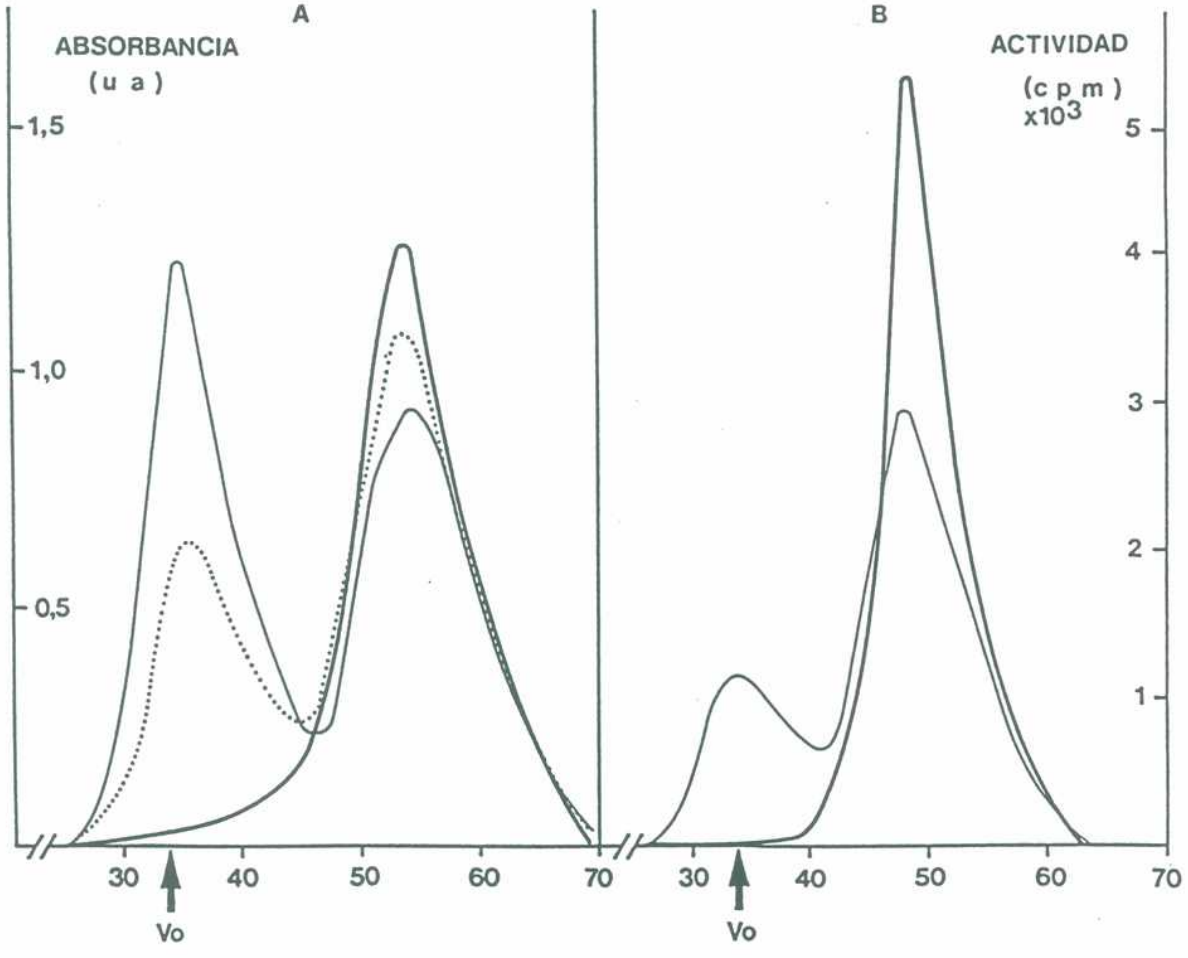
Paralelamente en lugar de emplear buffer, se preparó y realizó la cromatografía en gel con las soluciones de los correspondientes metales con la muestra de la Laguna del Burro, previamente filtrada por filtros de 0,45 µm de poro y llevada a pH ligeramente alcalino para evitar la formación de carbonatos insolubles (figura 36 A y B). Cabe recordar que la cromatografía en gel de las sustancias húmicas presentes en la laguna dio como resultado un pico excluido (figura 33). En la figura 36 A y B se observa la presencia de los metales en este pico, evidenciando la formación de complejos y aparece el exceso de metal libre como pico incluido.

En otro ensayo se comprobó que estos complejos son sensibles a la radiación UV, debido a que al someter la muestra de sustancia húmica-metal a dicha radiación, se produce la oxidación de la materia orgánica y la consecuente liberación del metal. Se demuestran ambos hechos por la disminución del área correspondiente al pico excluido y el aumento del área del pico incluido (figura 36 A).

La condición de formación de complejos con metales observada en las sustancias húmicas de la Laguna del Burro -que es común a las lagunas pampásicas en cuanto al contenido de las mismas- les otorga la posibilidad de contrarrestar,

dentro de ciertos niveles, el efecto tóxico de contaminantes metálicos frecuentes en deshechos industriales.

Figura 36: Cromatografía en gel (Sephadex G-15) de: A: cadmio ——— , sustancia húmica + cadmio ——— y sustancia húmica + cadmio luego de irradiada con luz UV ..... , B: cromo ——— y sustancia húmica + cromo ——— .



III. ESTUDIOS ESTRUCTURALES DEL ACIDO FULVICO AISLADO DE LA LAGUNA DEL BURRO

Introducción

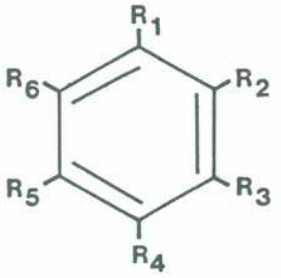
Los estudios estructurales, en particular de las sustancias húmicas, tienen importancia en razón de que es precisamente la estructura la que determina sus propiedades y función en el medio acuático. A pesar de las características comunes que comparten todas las sustancias húmicas, su estructura íntima depende de las condiciones ecológicas específicas de cada ambiente. En el estudio estructural se tropieza con la problemática de tratarse de sustancias muy complejas. Las variaciones que cada sistema plantea en la formación de estas sustancias impide la existencia de una estructura de validez universal.

En las investigaciones sobre estructura de las sustancias húmicas se ha recurrido a métodos degradativos, por reducción con sodio en medio alcalino o por oxidación con óxido de cobre en medio alcalino o permanganato en medio alcalino. En Sonnenberg y col. (1989) y Christman y col. (1989) se encuentran revisiones de los resultados obtenidos por la aplicación de estos métodos. Los principales productos de degradación para cada uno de éstos se exponen en la tabla 10.

Los métodos degradativos brindan información referida a las subunidades que integran la molécula, pero los productos obtenidos no son realmente los que están presentes en la misma. Además, dichos productos dependen de las condiciones experimentales aplicadas y no se excluye la posibilidad de la formación de "artifacts". De manera que para obtener información sobre la estructura, se debe recurrir conjuntamente a otras técnicas y procedimientos no degradativos. No obstante, los métodos degradativos permiten obtener una "impresión digital" para cada sustancia húmica, útil para determinar su origen y con fines comparativos.

Por el contrario, los métodos no degradativos proveen información sobre la estructura original, pero su utilidad es

Tabla 10: Productos obtenidos por reducción y oxidación de las sustancias húmicas.



Reducción con sodio en medio alcalino:

$R_1 = R_3 = OH$ y su metil derivado
$R_1 = R_2 = R_3 = OH$ y $R_1 = R_3 = R_5 = OH$ y sus metil derivados.
$R_1 = CH2-CH2-COOH$ $R_4 = OH$; $R_1 = CH=CH-COOH$ $R_4 = OH$ y sus metoxi y dimetoxi derivados.
$R_1 = COOH$ R_2 o R_3 o $R_4 = OH$ y su dimetoxi derivado.
$R_1 = COOH$ $R_2 = R_4 = OH$ o $R_3 = R_4 = OH$ o $R_3 = R_5 = OH$
$R_1 = COOH$ $R_2 = R_3 = R_4 = OH$ o $R_3 = R_4 = R_5 = OH$

Oxidación con óxido de cobre en medio alcalino:

$R_1 = R_2 = OH$ o $R_1 = R_3 = OH$
$R_1 = CHO$ $R_3 = CH_3$ $R_4 = OH$
$R_1 = COOH$ $R_4 = OH$ y su metoxi y dimetoxi derivado
$R_1 = COOH$ $R_3 = R_4 = OH$ o $R_3 = R_5 = OH$
$R_1 = CH2-CO-CH3$ $R_4 = OH$ y el metoxi y dimetoxi derivado.
$R_1 = CH=CH-COOH$ $R_4 = OH$

Oxidación con permanganato en medio alcalino:

$R_1 = R_2$ o $R_1 = R_3$ o $R_1 = R_4 = COOH$ y su metoxi y dimetoxi derivados
$R_1 = R_2 = R_3$ o $R_1 = R_2 = R_4$ o $R_1 = R_3 = R_5 = COOH$ y su metoxi derivados
$R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = COOH$ y su metoxi derivados
$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = COOH$ y su metoxi derivado
$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = COOH$
Acido furan di, tri y tetra carboxílico
Acido oxálico, succínico y malónico.

limitada debido a la complejidad estructural de estas moléculas. Entre estos métodos se pueden mencionar el IR y RMN. El IR permite la obtención de información sobre grupos funcionales, en especial carboxilo, éster, éter, carbonilo, quinona, cetona conjugada e hidroxilo. Los estudios se realizan sobre la sustancia tal cual, la sustancia reducida y sobre derivados metilados y acetilados (Bloom y Leenheer, 1989). Con respecto a RMN, en particular se utiliza RMN-^{13}C. A grandes rasgos, el análisis del espectro permite individualizar la zona de carbonos alifáticos (0-50 ppm), carbono unido a oxígeno o nitrógeno (50-110 ppm), carbono aromático (110-160 ppm) y carbono de carboxilo y carbonilo (160-230 ppm). En la tabla 11 se expone una síntesis de los resultados de estudios realizados por CPMAS RMN-^{13}C de ácidos húmicos y ácidos fúlvicos (Malcolm, 1989).

Otras técnicas espectroscópicas que contribuyen en los estudios estructurales son la resonancia de spin electrónico (Senesi y Steelink, 1989; Senesi, 1990a), la espectroscopía UV-visible y la fluorescencia (Bloom y Leenheer, 1989; Gitelson y col., 1990; Belin y col., 1993).

Asimismo, la aplicación de técnicas analíticas corrientes para la determinación de composición centesimal, proteínas, hidratos de carbono, carboxilo, hidroxilo fenólico, hidroxilo alcohólico, carbonilo, etc., permite complementar los estudios de la estructura de las sustancias húmicas.

Con el objeto de efectuar estudios estructurales en estas sustancias presentes en ambientes lagunares de la Provincia de Buenos Aires, se decidió comenzar con sustancias húmicas aisladas de la Laguna del Burro, ambiente carente de influencia antrópica, por cuanto no se encuentra sujeto a factores como deshechos industriales, urbanos o domésticos.

Tabla 11: Desplazamiento químico de ácido fúlvico (AF) y ácido húmico (AH) por CPMAS RMN-^{13}C.

PICO MAXIMO (ppm) AF	AH	RANGO (ppm)	ASIGNACION
		0-50	Carbono alifático saturado no sustituido.
10,15,18	10,15,16	10-20	Grupos metilos terminales.
20,21,22	19,22,24	15-50	Grupos metilenos en cadenas alquílicas.
24,25,29	25,26,48	25-50	Grupos metinos en cadenas alquílicas.
32	27,29	29-33	Carbonos metilénicos
33	30,33		$\alpha,\beta,\delta,\varepsilon$ de grupos metilos terminales.
34,35 38,39,40	35,36 37,38,40	35-50	Carbonos metilénicos de cadenas alquílicas ramificadas.
43	41	41-42	Carbono α en ácidos alifáticos.
	46	45-46	R_2NCH_3.
90	88,91	50-95	Carbono alifático unido por unión simple a un átomo de oxígeno o nitrógeno.
55	55	51-61	Esteres y éteres alifáticos; metoxi, etoxi.
60 62	60 64	57-65	Carbono en grupos CH_2OH; C_6 en polisacáridos.
68,70 73,74	68,69 70,72 78,81	65-85	Carbonos en grupos CH(OH); carbonos en anillos de polisacáridos; carbonos alifáticos unidos por puente éter.
100,101 102,103 104,107	100 103 104	90-110	Carbono unido por uniones simples a dos átomos de oxígeno; carbono anomérico en polisacáridos, acetal o cetal.
		110-160	Carbono aromático y no saturado.
115,118	115,118	110-120	Carbono aromático protonado.
120,122	120	118-122	Carbono aromático en orto a carbono aromático unido a oxígeno.
127,129,130 132,133,135	125,126 127,128,130	120-140	Carbono aromático no sustituido y sustituido con sustituyentes alquílicos.

Tabla 11: Continuación

PICO MAXIMO (ppm) AF	AH	RANGO (ppm)	ASIGNACION
145	147	140-160	Carbono aromático
148,150	148,149		sustituido por oxígeno y
155	153,155		nitrógeno; éter aromático,
			fenol, aminas aromáticas.
	168,169,170	> 160	Carbonos de carbonilo,
173,174,175	171,172,186		carboxilo, amida, éster.

Características limnológicas de la Laguna del Burro

La Laguna del Burro se encuentra situada a 34° 41' S, 57° 56' O, pertenece a la cuenca del Río Salado (figura 37) y sus parámetros morfométricos según Dangavs (1976), pueden observarse en la tabla 12. En la tabla 13 se presentan los parámetros químicos obtenidos para la Laguna del Burro al momento de la toma de muestra para los estudios estructurales. Con fines comparativos, en dicha tabla, figuran asimismo los datos químicos correspondientes a una muestra colectada el mismo día en la Laguna de Chascomús.

Las aguas de la Laguna del Burro son alcalinas y de acuerdo a la conductividad específica y residuo sólido soluble, pertenecen al rango de oligohalina, es decir con salinidad comprendida entre 0,5 y 5 g/l (Ringuelet y col. 1967). Atendiendo a los distintos iones mayoritarios, la composición iónica indica que se trata de aguas de composición clorurada-sódica, bicarbonatada, como se puede visualizar en el diagrama de Maucha (figura 38), en el cual el área de cada figura geométrica se encuentra en relación al porcentaje correspondiente a la concentración en miliequivalentes por litro de cada ion.

Estas características están de acuerdo con las obtenidas previamente por Ringuelet y col. (1967). Como se desprende del valor de alcalinidad total, dato que proviene de las concentraciones de carbonato y bicarbonato, las aguas poseen

Figura 37: Laguna del Burro y cuenca de drenaje.

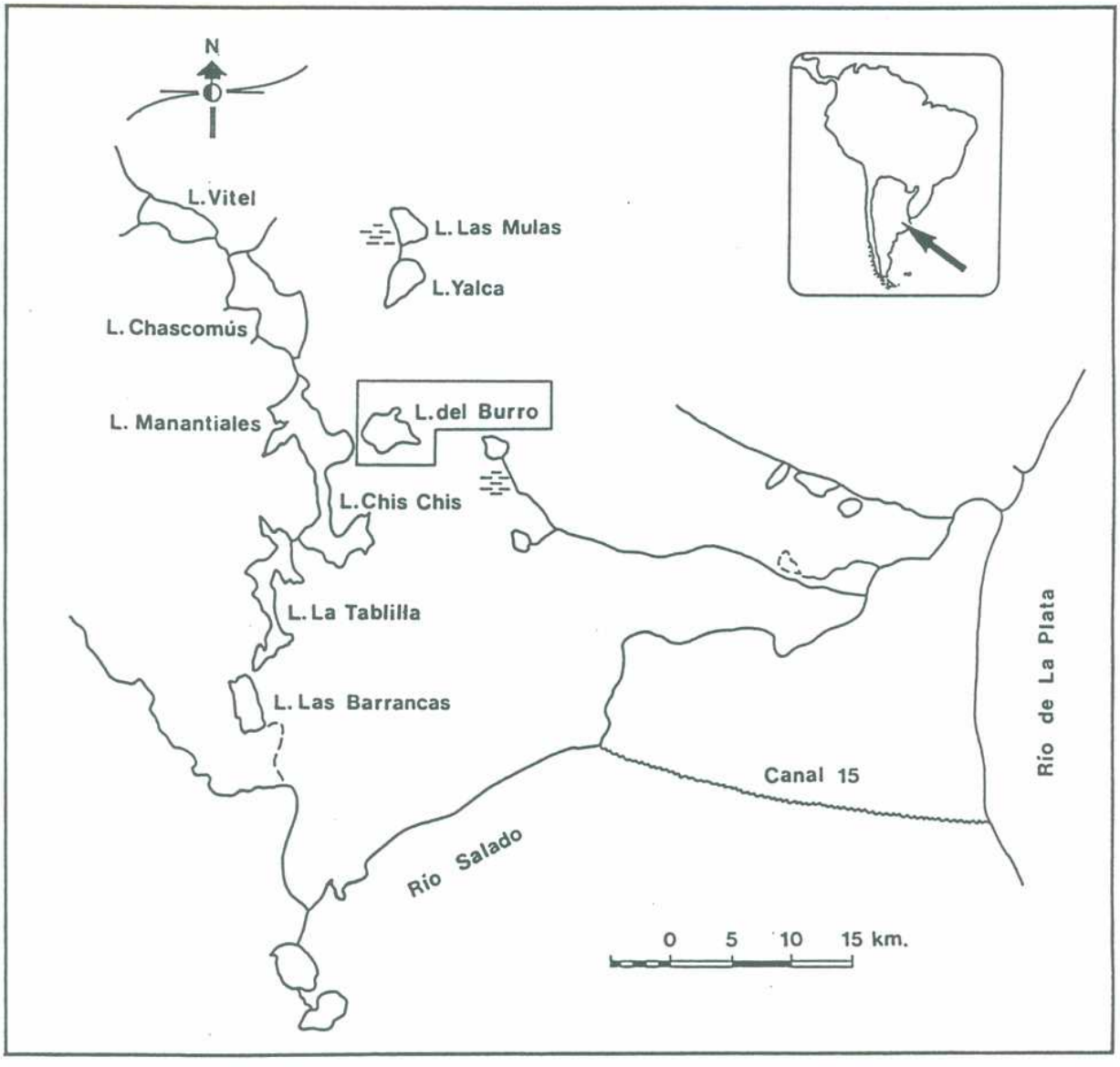


Tabla 12: Parámetros morfométricos de la Laguna del Burro.

Longitud máxima	5.510 m
Ancho máximo	3.410 m
Ancho medio	1.852 m
Perímetro o longitud de la línea de costa	17.950 m
Desarrollo de la línea de costa	1,58
Superficie	10.204.500 m^2
Volumen	18.193.085 m^3
Profundidad máxima	2,22 m
Profundidad media	1,78 m

un elevado poder buffer y considerando las concentraciones de calcio y magnesio expresadas en carbonato de calcio, se clasifican en aguas moderadamente duras, con dureza comprendida entre 100 y 150 mg $CaCO_3$/l (tabla 13). Teniendo en cuenta el valor de 12,6 del índice de sobresaturación para el carbonato de calcio (evaluado según lo descripto en la parte I del presente capítulo), las aguas se encuentran en un elevado grado de sobresaturación con la posibilidad de precipitación del mismo.

Considerando el nivel trófico, este ambiente se encuentra en un estado avanzado de eutrofía, evidenciado por el alto grado de colonización de plantas acuáticas (*Ceratophyllum*, *Miriuphyllum* y *Potamogeton*). La colonización determina mayor estancamiento de las aguas, menor posibilidad de mezcla vertical por influencia de los vientos y mayor sedimentación del material en suspensión, lo cual se refleja en la escasez de material particulado en suspensión (seston), en comparación con el valor de la Laguna de Chascomús (tabla 13). La escasa turbidez posibilita la llegada de luz hasta el

Tabla 13: Parámetros químicos de la Laguna del Burro (B) y de la Laguna de Chascomús (Ch).

	B	Ch
pH	9,2	8,85
Conductividad específica, µmho/cm (20 °C)	1200	1360
Residuo sólido soluble, g/l	0,99	1,19
Oxígeno disuelto, mg O_2/l	9,4	9,3
Porcentaje de saturación del oxígeno, %	97,4	96,4
Carbonato, mg CO_3^{2-}/l	32,2	40,3
Bicarbonato, mg HCO_3^-/l	289,7	360,7
Cloruro, mg Cl^-/l	337,5	295,7
Sulfato, mg SO_4^{2-}/l	29,6	167,9
Sodio, mg Na^+/l	260,2	351,1
Potasio, mg K^+/l	17,0	17,0
Calcio, mg Ca^{2+}/l	20,8	26,2
Magnesio, mg Mg^{2+}	18,8	17,9
Alcalinidad total, mg $CaCO_3$/l	291,2	362,9
Dureza, mg $CaCO_3$/l	129,0	139,0
Indice de sobresaturación del $CaCO_3$	12,6	18,2
Amonio, mg N/l	0,10	0,04
Nitrito, mg N/l	0,00	0,00
Nitrato, mg N/l	0,01	0,02
Nitrógeno total, mg N/l	0,73	0,12
Ortofosfato, µg P/l	0	9
Fósforo total, µg P/l	31	263
Nitrógeno total/fósforo total	23,5	0,5

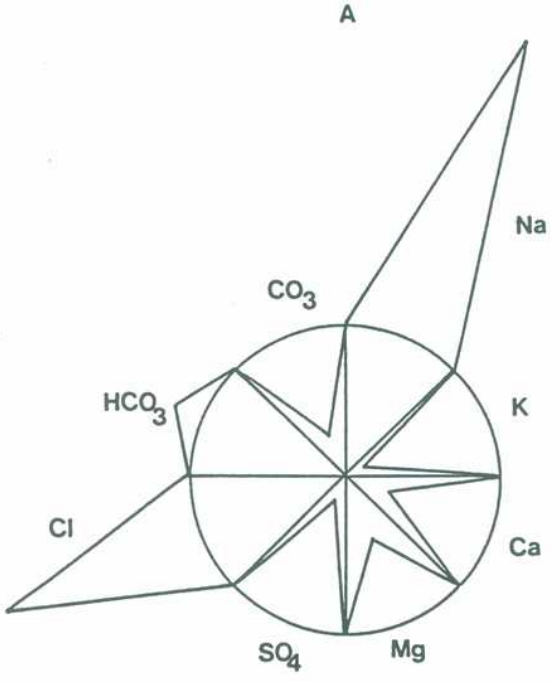
Tabla 13: Continuación.

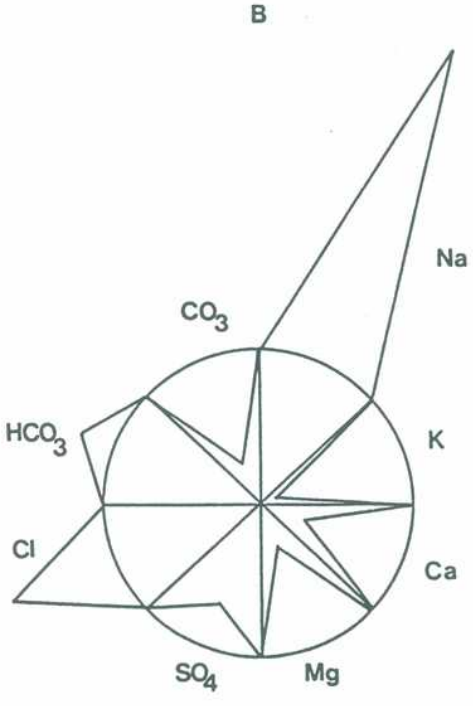
Sílice reactiva, mg SiO_2/l	2,0	1,4
Demanda química de oxígeno total, mg O_2/l	18,4	21,6
Demanda química de oxígeno filtrada, mg O_2/l	16,8	11,6
Absorción 365 nm (1 cm)	0,043	0,026
Carbono orgánico particulado, mg C/l	0,2	3,9
Seston, mg/l	1,6	38,9
Clorofila *a*	0,5	32,5
Feofitina	0,5	4,6
Producción primaria bruta (PPB), mg C/m^3.h	49,3	350,9
PPB/clorofila *a*, mg C/m^3.h.clorofila *a*	98,7	10,8

fondo, permitiendo el desarrollo de la fotosíntesis llevada a cabo por las plantas acuáticas arraigadas en el mismo, factor que favorece la elevada concentración de oxígeno disuelto al igual que de su porcentaje de saturación (tabla 13).

Comparando la Laguna del Burro con la Laguna de Chascomús, puede observarse que si bien ambas son eutróficas atendiendo a las concentraciones de nutrientes (tabla 14), la relación nitrógeno total/fósforo total indica que el nutriente limitante para la proliferación algal de la Laguna del Burro es el fósforo y para la Laguna de Chascomús el nitrógeno (tabla 15). Como se desprende de los valores de clorofila *a* expuestos en la tabla 13, el fósforo constituye un factor limitante para la proliferación algal en casos de cuerpos de agua como la Laguna del Burro. Incluso, la existencia de plantas acuáticas representa un factor de competencia por los nutrientes que desfavorece la disponibilidad de los mismos para el crecimiento algal.

Figura 38: Diagramas de Maucha A. Laguna del Burro, B. Laguna de Chascomús.





Pruebas de estas consideraciones se ponen de manifiesto con el valor de la clorofila *a* que indica un bajo nivel de biomasa algal y ubicarían a este cuerpo de agua en la categoría de oligotrófico a pesar de ser eutrófico (tabla 14). La elevada concentración de fósforo encontrada en la Laguna de Chascomús, que conduce a una baja relación nitrógeno total/fósforo total puede hallar su explicación en la influencia de deshechos urbanos, domésticos y fertilizantes agrícolas, que no posee la Laguna del Burro .

La abundante biomasa de plantas acuáticas existentes en la Laguna del Burro promueve la formación de sustancias húmicas, como consecuencia del ciclo de la materia orgánica asociado a la presencia de dichas plantas. La Laguna del Burro posee mayor concentración de sustancias húmicas que la Laguna de Chascomús, de acuerdo al dato de demanda química de oxígeno de la muestra filtrada y a la lectura a 365 nm. De la diferencia entre los datos de demanda química de oxígeno de la muestra total y filtrada, se deduce que en la Laguna del Burro prácticamente toda la materia orgánica se encuentra en forma soluble, no así en la Laguna de Chascomús (tabla 13).

En lo que concierne a la fotosíntesis, se puede distinguir que si bien en la Laguna de Chascomús hay mayor producción primaria bruta, el cociente entre ésta y la clorofila *a* es mucho menor que para la Laguna del Burro (tabla 13), implicando que para esta última la actividad fotosintética es mayor. Teniendo en cuenta las hipótesis de la relación entre sustancias húmicas y producción primaria (parte I del presente capítulo), en particular en lo concerniente al aumento de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina, no se descarta la posibilidad de que la mayor concentración de sustancias húmicas constituya un factor que contribuye al desarrollo de la mayor actividad fotosintética observada.

Las sustancias húmicas que se encuentran en la Laguna del Burro son en particular ácidos fúlvicos, pues no se observa precipitación en la muestra filtrada debida a ácidos húmicos cuando se lleva a pH 1. Hecho que está en concordancia con la formación de carbonato de calcio, puesto que de acuerdo a lo mencionado en la parte I del presente capítulo, existe una adsorción preferencial entre carbonato de calcio y ácidos húmicos conducente a la coprecipitación y remoción de estos últimos.

Tabla 14: Nivel trófico de los cuerpos de agua en relación a la concentración de nutrientes y clorofila *a*.

Nivel trófico	Nitrógeno total µg/l	Fósforo total µg/l	clorofila *a* µg/l
Oligotrófico	< 400	< 15	< 3
Mesotrófico	400 - 600	15 - 25	3 - 7
Eutrófico	600 - 1500	25 - 100	7 - 40
Hipertrófico	> 1500	> 100	> 40

De acuerdo a Forsberg y Ryding (1980).

Tabla 15: Cociente entre nitrógeno total y fósforo total y su relación con el nutriente limitante y concentración de clorofila *a*.

Nitrógeno total / Fósforo total	Nutriente limitante	clorofila *a* µg/l
> 17	P	< 20
10 - 17	N y/o P	20 - 70
< 10	N	> 70

De acuerdo a Forsberg y Ryding (1980).

Aislamiento y purificación

Una vez obtenida la muestra, la primera etapa consiste en filtrarla con el objeto de eliminar el material en suspensión mediante filtros de 0,45 µm de poro. Seguidamente en la etapa del aislamiento se desarrolla alguno de los siguientes procesos:

- *Evaporación a vacío*

Este procedimiento en general no se utiliza, debido a que las aguas poseen baja concentración (aproximadamente 1 mg/l de sustancias húmicas en aguas de color amarillento), de manera que se debería procesar grandes volúmenes con el agravante de que el solvente a evaporar es agua.

- *Extracción con solventes orgánicos*

En primer término se lleva la muestra a pH 2 para protonar los grupos carboxilos e hidroxilos fenólicos presentes en las sustancias húmicas y posteriormente se procede a su extracción. Este método puede resultar igualmente tedioso si se deben procesar grandes volúmenes de agua.

- *Intercambio iónico*

Los grupos carboxilos e hidroxilos fenólicos se encuentran disociados a pH alcalino y por lo tanto, es posible retener las sustancias húmicas por intercambio iónico mediante resinas aniónicas para liberarlas finalmente por medio de una base fuerte. Este método permite procesar grandes volúmenes de agua dependiendo de las características de la resina, de las dimensiones de la columna y de la eficiencia con que es retenida la sustancia húmica a tratar.

- *Adsorción*

Con este propósito es posible emplear varios adsorbentes inorgánicos y orgánicos (carbón activado, alúmina, sílica gel, polivinil pirrolidona, poliamida y poliestireno). En este proceso es necesario tener en cuenta que la adsorción y la desorción deben ser eficientes. Los adsorbentes que han dado buenos resultados han sido los orgánicos como las poliamidas y en especial las resinas de poliestireno (Münster, 1985): Amberlite XAD-2 (Mantoura y Riley, 1975a) y Amberlite XAD-8 (Thurman y Malcolm, 1981).

En el estudio de la adsorción de las sustancias húmicas por parte de la resina Amberlite XAD-2, Mantoura y Riley (1975a) comprueban que por debajo de pH 2,2 la adsorción comienza a ser máxima, en relación con el aumento del carácter hidrofóbico de la molécula, pues los grupos carboxilos e hidroxilos fenólicos se encuentran protonados.

En estas condiciones, la adsorción se produce siguiendo el comportamiento de la isoterma de Langmuir, donde el valor de la capacidad de adsorción es de 4,5 10^{-6} mol/g y de la constante de equilibrio de adsorción de 6,0 10^{4} mol/l. Con respecto a la entalpía, energía libre y entropía de adsorción, los valores mencionados son respectivamente -5,4 kJ/mol, -36,4 kJ/mol (21 °C) y 103 J/mol.K (21 °C). Cabe señalar, que el bajo valor de entalpía evidencia que la interacción entre la molécula de sustancia húmica y la resina es de unión hidrofóbica. Los valores de entalpía para procesos de adsorción química o de intercambio iónico con adsorbentes inorgánicos son del orden de 40 kJ/mol. Esto último explicaría la dificultad que presentan las sustancias húmicas para lograr la desorción de esos medios y la conveniencia de utilizar las resinas en estos procesos.

El aislamiento de las sustancias húmicas de la Laguna del Burro se realizó empleando la resina Amberlite XAD-2, que presentó una eficiencia de adsorción mayor del 95%. En un primer paso, la muestra filtrada (alrededor de 100 litros), se llevó a pH 2 y se pasó por la columna conteniendo dicha resina, para luego proceder a la desorción con NaOH 0,5 M. El eluido obtenido se llevó a pH 7, se concentró al vacío y se pasó por gel de Sephadex G-15, saliendo la sal sódica del ácido fúlvico como pico excluido y el cloruro de sodio, formado en la neutralización, como pico incluido. Se repitió el pasaje por gel de Sephadex G-15 del pico excluido, con el objeto de obtener el fulvato sódico purificado. Finalmente se pasó este último por resina Amberlite IR 120 (forma ácida) de manera de lograr por intercambio iónico el ácido fúlvico. La solución resultante se liofilizó y el ácido fúlvico así obtenido fue utilizado para los análisis que a continuación se detallan. En la figura 39 se muestra esquemáticamente el proceso de aislamiento y purificación descripto.

Figura 39: Esquema de aislamiento y purificación de las sustancias húmicas de la Laguna del Burro.

Muestra de agua
(100 litros)
↓
Filtración
(0,45 µm)
↓
Acidificación a pH 2
(HCl)
↓
Adsorción en resina Amberlite XAD-2
↓
Elución
(NaOH 0,5 N)
↓
Muestra concentrada
(2 litros)
↓
Neutralización
(HCl 5 N)
↓
Evaporación al vacío
↓
Aislamiento y purificación
de la sal sódica
(Sephadex G-15)
↓
Forma ácida
(Resina Amberlite IR-120, forma H^+)
↓
Liofilización

El producto obtenido homogéneo por cromatografía en geles, no precipita en medio ácido (pH = 1), lo cual implica clasificarlo como ácido fúlvico.

Composición centesimal

En la tabla 16 se encuentran los datos de composición centesimal del ácido fúlvico de la Laguna del Burro, así como ácidos fúlvicos y ácidos húmicos de otros orígenes. En promedio presentan porcentajes de carbono entre el 40 y 60%, hidrógeno entre 2,5 y 5,5%, nitrógeno entre 1,5 y 5,5% y oxígeno entre 35 y 50%.

Dado que el oxígeno integra grupos como carboxilo, hidroxilo fenólicos, éter, éster, cetona, alcohol, que otorgan polaridad a la molécula y que son en gran medida responsables de la solubilidad de estas sustancias, es de esperar que la proporción de oxígeno respecto a carbono sea mayor en el caso de los ácidos fúlvicos (solubles en todo el rango de pH) respecto a los ácidos húmicos. Por lo tanto, se puede observar en la tabla 16, que la relación O/C es mayor para ácidos fúlvicos que para húmicos de un mismo origen.

A partir de los datos de la tabla 16 puede calcularse para el ácido fúlvico aislado de la Laguna del Burro la fórmula mínima $C_{32}\ H_{41}\ N\ O_{24}$, que sugiere una estructura muy oxigenada y de alto grado de insaturación (número de insaturaciones = 13).

Contenido en hidratos de carbono

La técnica empleada fue la del fenol sulfúrico y el resultado obtenido menor que el límite de detección (1%). Motivo por el cual no se encuentran presentes hidratos de carbono en la composición del ácido fúlvico. Como fuera destacado en el capítulo I, los hidratos de carbono son importantes como precursores en caminos que involucran la síntesis de núcleos aromáticos constituyentes de las sustancias húmicas. No obstante, se ha mencionado la

Tabla 16: Composición centesimal de ácidos fúlvicos y ácidos húmicos.

	%C	%H	%N	%O	%Z	H/C	O/C
A F ac 1	46,16	4,93	1,67	45,54	1,7	1,28	0,74
A F ac 2	43,5	2,7	2,2	51,6	-	0,74	0,89
A H ac 2	50,2	3,1	1,9	44,8	-	0,74	0,67
A F su 3	49,23	5,30	3,02	41,20	9,37	1,29	0,63
A H su 3	54,52	5,32	4,37	35,17	0,69	1,17	0,48
A F se 4	38,19	3,48	1,77	55,98	-	1,09	1,10
A H se 4	57,06	3,94	3,37	35,08	-	0,83	0,46
A F se 5	43,38	4,56	5,21	43,95	-	1,26	0,76
A H se 5	49,92	6,53	6,60	35,19	-	1,57	0,53
A H se 6	51,69	6,11	4,64	36,69	-	1,42	0,53

A F = ácido fúlvico, A H = ácido húmico, ac = acuático, su = suelo, se = sedimento, %Z = porcentaje de cenizas.

1: Este trabajo.

2: Agua del Lago Celyn, Gales (Wilson y col., 1981).

3: Suelo de la Isla Dominica, Trinidad (Griffith y Schnitzer, 1976).

4: Sedimento de arroyos provenientes de South Clear Creek, Colorado, Estados Unidos (Rice y MacCarthy, 1989).

5: Sedimento del estuario de La Canche, Francia (Kalinowski y Blondeau, 1985).

6: Sedimento marino proveniente del sur de California, Estados Unidos (Nissembaum y Kaplan, 1972).

presencia de hidratos de carbono integrando la molécula de sustancia húmica en ciertos ácidos húmicos y ácidos fúlvicos de suelos (Malcolm, 1989), sedimento de estuarios (Alberts y Filip, 1989) y aguas marinas (Han y Cao, 1991).

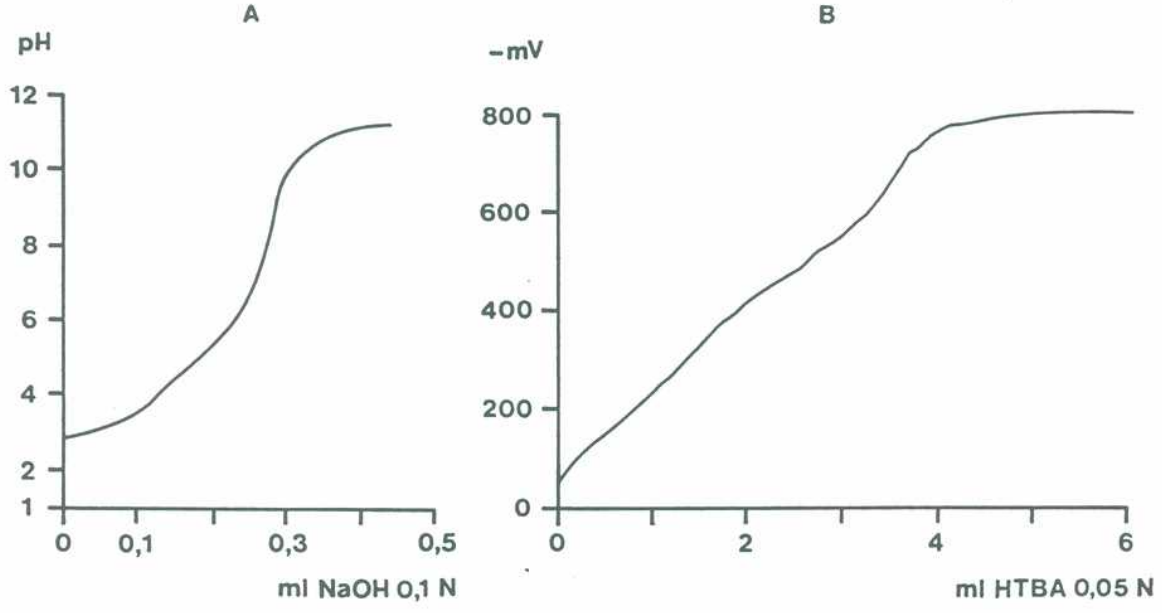
Contenido de grupos carboxilos e hidroxilos fenólicos

La presencia de estos grupos como constituyentes de las sustancias húmicas es importante fundamentalmente, por su responsabilidad e intervención en la solubilidad en medios acuosos, en la formación de complejos y en la asociación con metabolitos, propiedades éstas que ejercen gran influencia en el desarrollo de los ciclos biogeoquímicos de los cuerpos de agua.

La suma de equivalentes de carboxilos e hidroxilos fenólicos por unidad de masa se define como la acidez total. Puede ser determinada por titulación en medio acuoso, pues en este medio los carboxilos e hidroxilos no se diferencian, obteniéndose un solo punto de inflexión correspondiente a la suma de los equivalentes de ambos grupos. En la figura 40 A se muestra la curva de titulación en medio acuoso utilizando NaOH para el ácido fúlvico de la Laguna del Burro y puede observarse un solo punto de inflexión que nos permite obtener el dato de 4,9 meq/g para la acidez total.

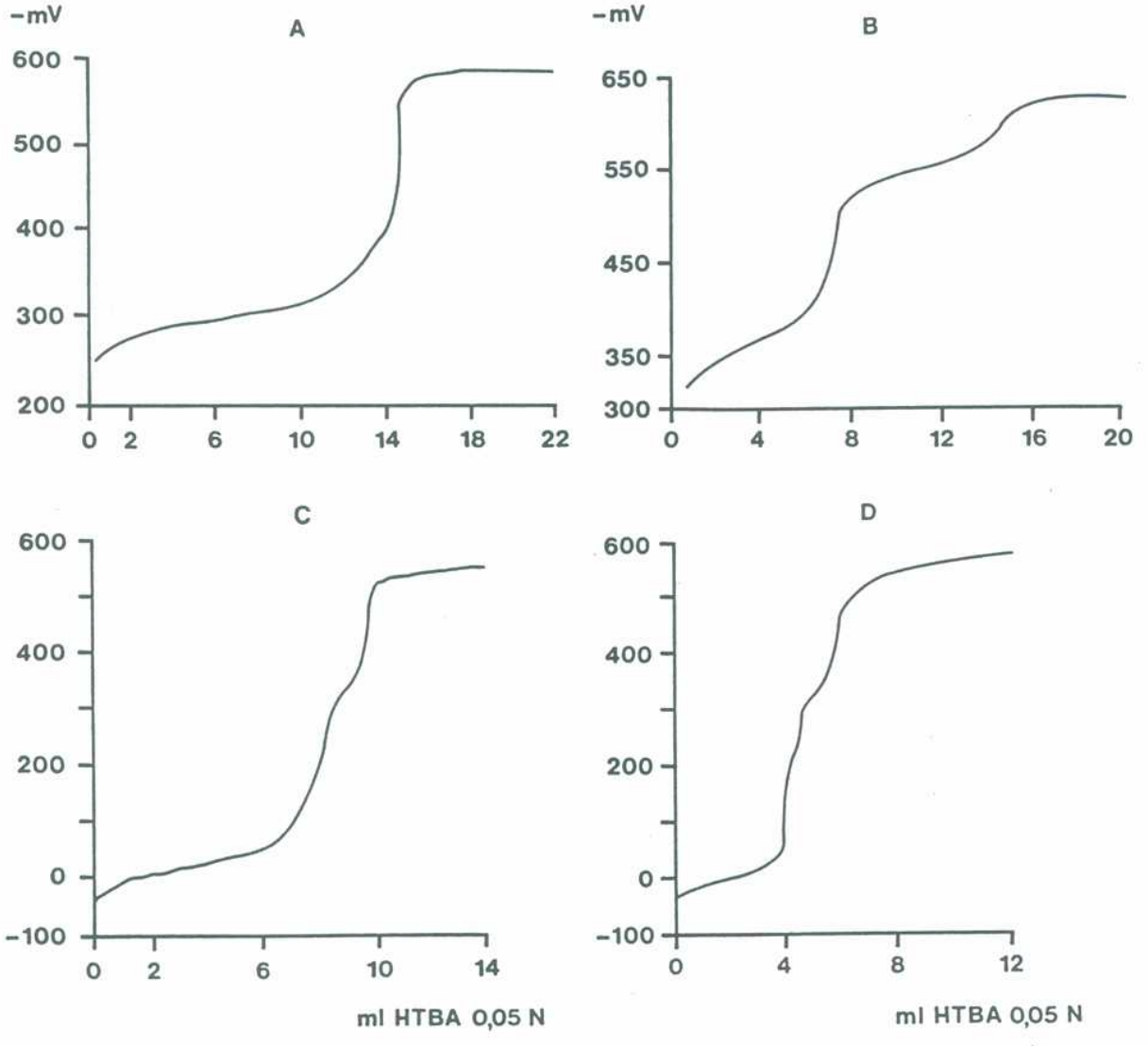
Los grupos carboxilos pueden diferenciarse de los hidroxilos fenólicos mediante titulación en medio no acuoso. Se procedió entonces a realizar la titulación disolviendo, la muestra del ácido fúlvico de la Laguna del Burro, en dimetilformamida en atmósfera de nitrógeno, empleando como base el hidróxido de tetrabutilamonio (previamente valorado contra ácido benzoico) y registrándose las variaciones de pH. En la figura 41 se presentan las curvas de titulación obtenidas para la valoración de la base y para los patrones del ácido p-hidroxibenzoico, ácido salicílico y ácido

Figura 40: Titulación ácido base del ácido fúlvico de la Laguna del Burro: A. Medio acuoso, B. Medio no acuoso (dimetilformamida). HTBA = hidróxido de tetrabutilamonio.



ftálico, las cuales permiten determinar adecuadamente los puntos de inflexión correspondientes. La curva obtenida para el ácido fúlvico (figura 40 B) muestra un ascenso paulatino del pH y no presenta un punto de inflexión tan definido como los obtenidos para los patrones. Hecho que puede explicarse por la asociación intermolecular por puente de hidrógeno existente en las sustancias húmicas (Schnitzer y Griffith, 1975) que actuaría como un impedimento para la disociación del protón del carboxilo, o atribuirse a la existencia de distintas constantes de acidez de los carboxilos presentes en la estructura del ácido fúlvico. A partir de la curva se

Figura 41: Titulación ácido base en medio no acuoso (dimetilformamida) de: A. Acido benzoico, B. Acido p-hidroxibenzoico, C. Acido salicílico y D. Acido ftálico. mV = milivolt, HTBA = hidróxido de tetrabutilamonio



obtiene un valor de 5,9 meq/g, mayor que el obtenido en la titulación en medio acuoso que fuera de 4,9 meq/g, indicando la presencia de grupos carboxilos y/o fenólicos de acidez muy débil y en consecuencia, no detectables en dicho medio.

En la tabla 17 se encuentran datos de acidez en ácidos fúlvicos y húmicos de distintos orígenes. Teniendo en cuenta que la solubilidad está relacionada con la presencia de grupos como los carboxilos e hidroxilos fenólicos -como fuera mencionado al tratar la composición centesimal- la acidez total de los ácidos fúlvicos (solubles en todo el rango de pH) es en general, mayor que la acidez de los ácidos húmicos de un mismo origen (insolubles a pH ácido). En el caso del ácido fúlvico de la Laguna del Burro no es posible su comparación con ácido húmico del mismo origen, por cuanto ese cuerpo de agua sólo posee ácido fúlvico. La acidez total del mismo es menor que para otros ácidos fúlvicos (tabla 17), pero debe considerarse que la determinación de ácidos carboxílicos en sustancias húmicas tiene cierto grado de incertidumbre debido a que los iones metálicos asociados a estos grupos pueden no ser fácilmente hidrolizables (Wilson y col., 1981). La acidez del ácido fúlvico de la Laguna del Burro se debería principalmente a grupos carboxilos, aunque no puede descartarse definitivamente la presencia de hidroxilos fenólicos. Los datos obtenidos por titulación se ven corroborados por los estudios espectroscópicos que se describen más adelante.

Estudios espectroscópicos

Espectro UV-visible

En la figura 42 se observa el espectro UV-visible del ácido fúlvico de la Laguna del Burro. La absorción se produce por debajo de 700 nm, alcanzando el máximo en la zona del UV. En esta zona la misma es debida a los grupos aromáticos, que

Tabla 17: Acidez de ácidos fúlvicos y ácidos húmicos.

	carboxilos	hidroxilos fenólicos	acidez total
	meq/g	meq/g	meq/g
A F ac 1	5,9	n s	5,9
A F ac 2	4,78	1,35	6,13
A F ac 3	8,9	2,1	11,0
A H ac 3	5,9	3,0	8,9
A F su 4	8,1	3,9	12,0
A H su 4	4,4	3,3	7,7
A F se 5	4,85	4,28	9,13
A H se 5	1,47	2,14	3,61
A F se 6	4,38	5,78	10,16
A H se 6	3,54	3,00	6,54

A F = ácido fúlvico, A H = ácido húmico, ac = acuático, su = suelo, se = sedimento, n s = no significativo.

1: El presente trabajo.

2: Agua del Río Bersbo, Suecia (Ephraim, 1989).

3: Agua del Lago Celyn, Gales (Wilson y col., 1981).

4: Promedio de 12 muestras de suelos (Schnitzer, 1975).

5: Sedimento provenientes de arroyos de South Clear Creek, Colorado, Estados Unidos (Rice y MacCarthy, 1989)

6: Sedimento del estuario de La Canche, Francia (Kalinowsky y Blondeau, 1985).

sustituidos con carboxilos e hidroxilos presentan absorción entre 210 y 240 nm produciendo transiciones electrónicas del tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$.

Por el contrario, el origen de la absorción en el visible es incierto. Las hipótesis (Bloom y Leenheer, 1989) que intentan explicar este fenómeno son las siguientes:

- Las sustancias húmicas poseen grupos cromóforos con uniones dobles conjugadas que por extensión permiten la absorción en el visible.

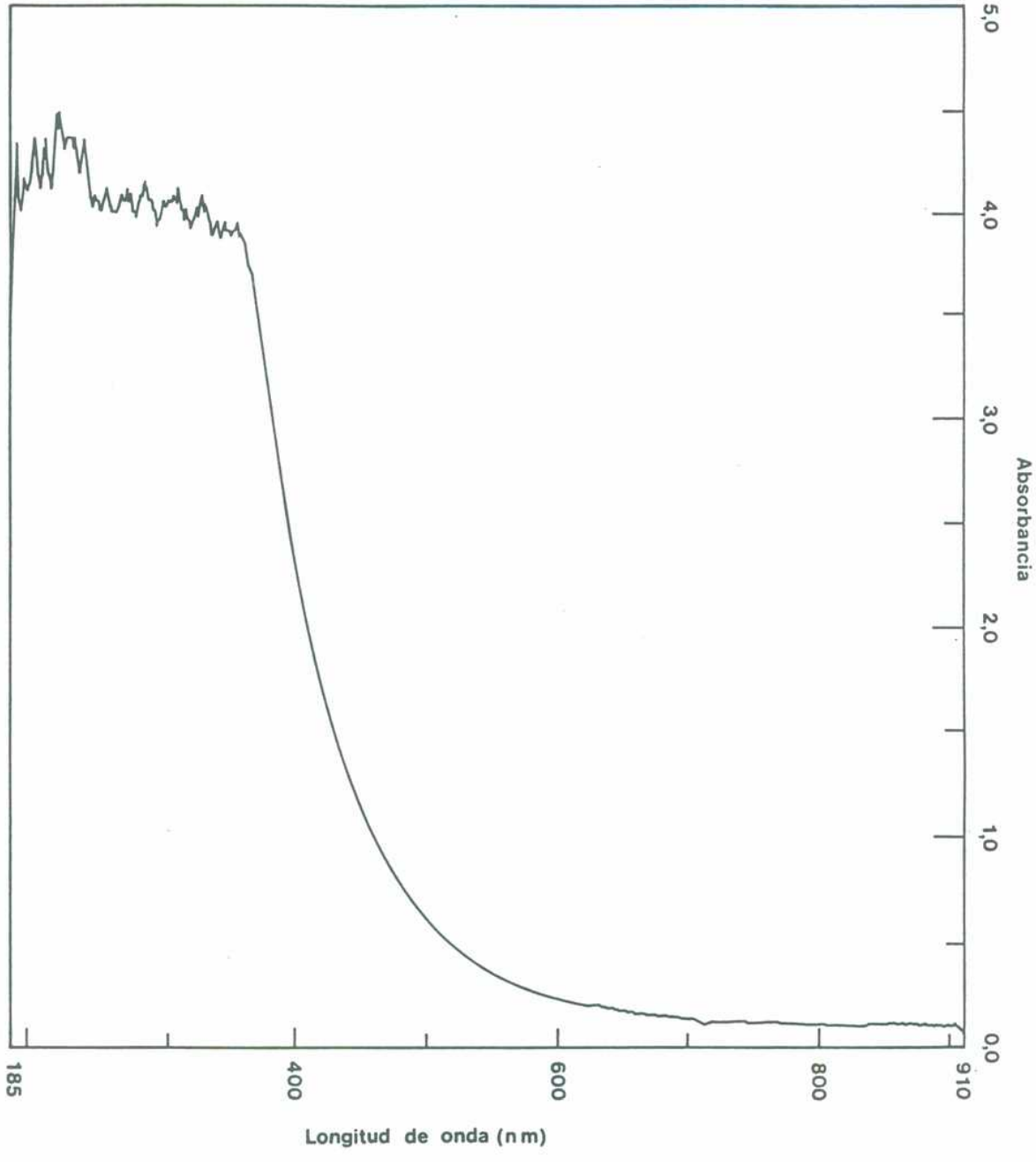
- La absorción observada en el visible no sería en realidad absorción sino dispersión de la luz. Es conocida la dispersión de la luz por parte de las macromoléculas donde, por ejemplo para un polímero monodisperso, la intensidad de la luz dispersada es inversamente proporcional a la cuarta potencia de la longitud de onda.

- La absorción en el visible se debería a un tipo de transición electrónica llamada de transferencia electrónica o transferencia de carga, que involucra la transferencia de un electrón de un grupo cromóforo a otro cromóforo, por ejemplo de un anillo aromático a un grupo carboxilo, o de un grupo cromóforo a uno no cromóforo, como en el caso de un anillo aromático a un hidroxilo.

Es probable que la absorción en el visible no se deba exclusivamente a un solo factor, sino en mayor o menor medida, a la suma de cada uno de los factores mencionados.

Cabe señalar, que la absorción en el UV-visible tiene gran utilidad por su aplicación con fines analíticos, como lo demuestra su empleo en el presente trabajo. Por otra parte, se ha comprobado empíricamente la relación entre el tamaño molecular y los índices calculados como cocientes entre

Figura 42: Espectro UV-visible del ácido fúlvico de la Laguna del Burro.

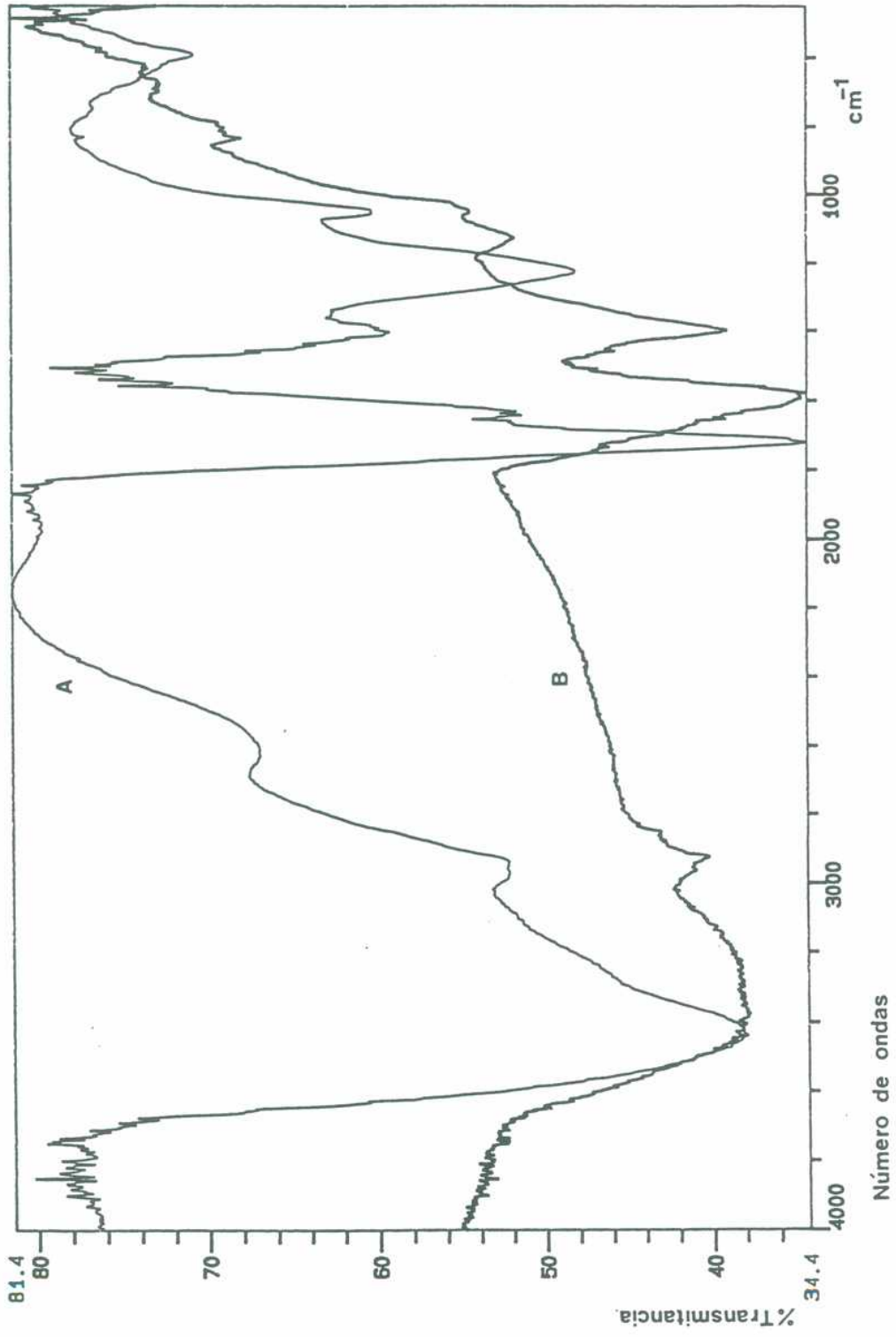


465 nm y 665 nm para suelos (Chen y col.,1977; Ghosh y Schnitzer, 1979), y 250 nm y 365 nm para aguas (De Haan, 1972a; De Haan y col., 1987). Dichos índices permiten la caracterización simple y rápida de sustancias húmicas presentes en el medio, como fuera destacado en la parte I del presente capítulo.

Espectro IR

El espectro IR del ácido fúlvico de la Laguna del Burro (figura 43 A) muestra la banda característica del O-H a 3400 cm^{-1} y la banda correspondiente a C-H alifática a 2900 cm^{-1}. En la región 2600-2400 cm^{-1}, aparece la banda de unión por puente de hidrógeno intermolecular (Schnitzer y Griffith, 1975), que corrobora los resultados obtenidos en la titulación en medio no acuoso. Dos bandas importantes en lo que respecta a sustancias húmicas son las que se observan a 1720 cm^{-1} y a 1620 cm^{-1}. La primera se debe a la absorción del carbonilo del carboxilato, que para ácidos fúlvicos en relación a húmicos es mucho más fuerte en razón del mayor contenido de grupos carboxilos. Con respecto a la segunda banda, si bien puede ser atribuible a C=C aromático, a H unido a carbono α de carboxilo, a carbonilo de cetonas conjugadas o a carbonilo de quinonas, para las sustancias húmicas se comprobó que está en relación al contenido de carboxilos, intensidad de color y peso molecular. Específicamente la intensidad de absorción de esta banda resulta inversamente proporcional al contenido de carboxilos y directamente proporcional a la intensidad de color y peso molecular. Por lo tanto para ácidos fúlvicos la intensidad será menor que para húmicos. Estas consideraciones fueron observadas por Stevenson y Goh (1971), que incluso hallaron que en ciertos ácidos húmicos, la banda a 1720 cm^{-1} era del mismo orden que a 1620 cm^{-1}. Como puede apreciarse en la figura 43 A, en el caso del ácido fúlvico de la Laguna del

Figura 43: Espectro IR de: A. Acido fúlvico de la Laguna del Burro, B. Sal sódica del ácido fúlvico de la Laguna del Burro.



Burro la intensidad a 1720 cm^{-1} es mucho mayor que la de 1620 cm^{-1}. La banda a 1400 cm^{-1} puede asignarse a la tensión del C-O de hidroxilos fenólicos, a la flexión del OH o a la flexión del C-H de los metilenos o metilos. La banda a 1230 cm^{-1} se debe a la tensión del C-O o a la flexión del O-H del carboxilato. Esta fuerte absorción, al igual que la de 1720 cm^{-1}, señalaría que el ácido fúlvico en estudio tiene concentración inusualmente alta de grupos carboxilos. De acuerdo a Stevenson y Goh (1971) ácidos fúlvicos con estas características pueden contener hasta 9 meq de carboxilos/g de sustancia húmica. La titulación del ácido fúlvico de la Laguna del Burro, indicaría una concentración de 5,9 meq/g, en razón de que la determinación de carboxilos por titulación puede dar resultados por defecto, debido a la presencia de iones metálicos unidos a los carboxilos no fácilmente hidrolizables que superaron la etapa de aislamiento y purificación.

El espectro IR de la figura 43 A, corresponde a la muestra aislada y purificada de ácido fúlvico de la Laguna del Burro y el de la figura 43 B, al espectro de la sal sódica correspondiente. En este último puede observarse, el decrecimiento de la intensidad de la banda a 3400 cm^{-1} del O-H, la desaparición de la banda a 2600-2400 cm^{-1} -que indica la eliminación de la unión por puente de hidrógeno intermolecular- y el corrimiento de la banda del carbonilo del carboxilato a 1600 cm^{-1} aproximadamente. En los espectros de sales sódicas de ácidos húmicos y fúlvicos aparecen bandas alrededor de 1390 cm^{-1} (características del ion carboxilato), que explicarían también la absorción intensa observada a 1400 cm^{-1}. Se produce además el corrimiento de la banda de 1230 cm^{-1} a 1130 cm^{-1}, que implica el reacomodamiento estructural del carboxilo debido a la formación del fulvato de sodio según Schnitzer y Griffith (1975).

Espectro RMN-^{13}C

En la figura 44 se encuentra el espectro RMN-^{13}C, obtenido para el ácido fúlvico de la Laguna del Burro, en el que se pueden reconocer las siguientes zonas:

0 - 50 ppm:

Es la zona correspondiente a los carbonos alifáticos donde pueden distinguirse los grupos metilos terminales a 10-20 ppm. Entre 25 y 35 ppm aparecen picos relacionados a la presencia de grupos metinos en cadenas de alcanos y grupos metilenos en cadenas de alcanos especialmente $\alpha, ß, \delta, \varepsilon$ a grupos terminales metilos. No se observa señal significativa correspondiente a grupos metilenos de cadenas alquílicas ramificadas. Entre 46 y 49 ppm aparece un pico definido que podría atribuirse a R_2-N-CH_3 (tabla 11), considerando que el ácido fúlvico en estudio contiene nitrógeno (tabla 15). Por otra parte, el nitrógeno determinado en el ácido fúlvico no proviene de proteínas, asociadas o contaminantes, de acuerdo al resultado negativo obtenido por ensayo de Lowry.

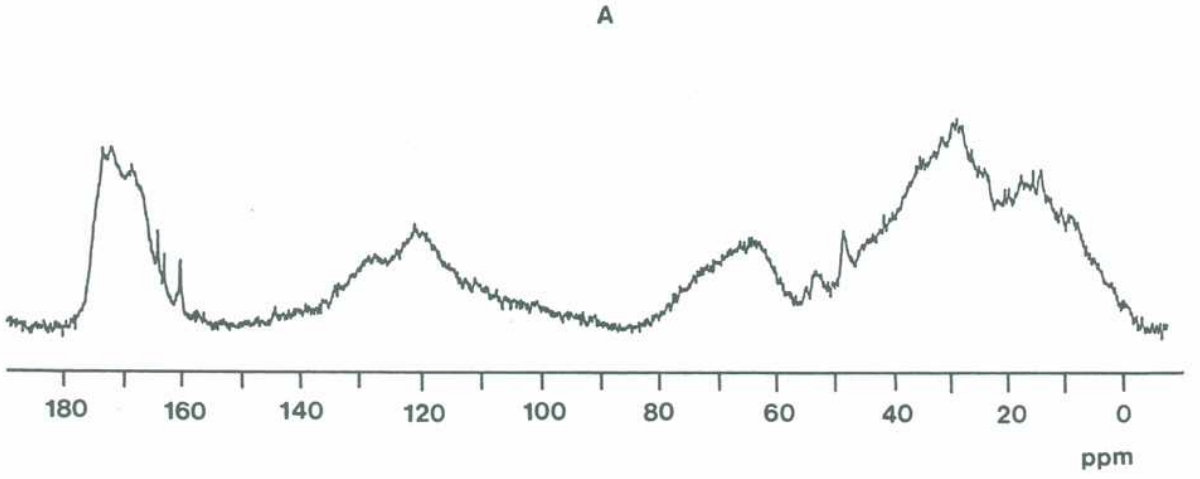
50 - 80 ppm:

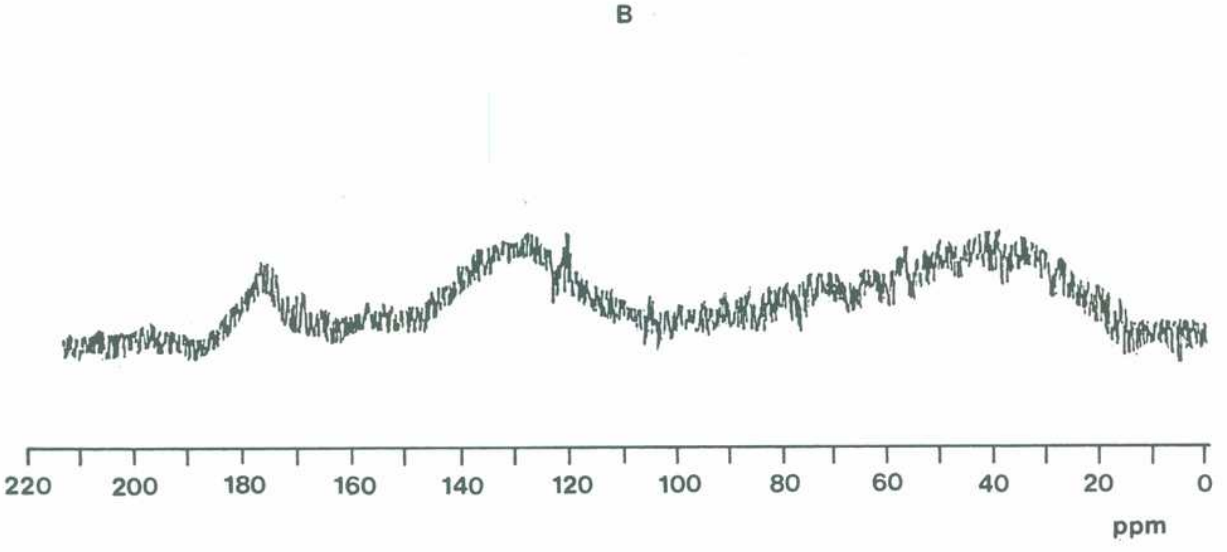
Dentro de esta zona se encuentran los carbonos alifáticos oxigenados. Entre 50 y 55 ppm se observa un pico relativamente débil que puede adjudicarse a la presencia de ésteres y éteres alifáticos, metoxi y etoxi éteres. En la zona de 55-80 ppm encontramos superpuesta la señal de carbono de CH_2-OH y de éteres alifáticos.

90 - 110 ppm:

No se observan señales claras de carbonos anoméricos de polisacáridos, en concordancia con la ausencia de hidratos de carbono evidenciada por determinación analítica (fenol-sulfúrico).

Figura 44: A. Espectro RMN-^{13}C del ácido fúlvico de la Laguna del Burro. B. Espectro del ácido húmico marca Aldrich obtenido en las mismas condiciones que el anterior.





110 - 135 ppm:

Esta es la zona de carbonos aromáticos. Aquí se encuentran superpuestos carbonos aromáticos protonados (110-120 ppm), carbono aromático unido en posición orto a carbono aromático sustituido por oxígeno (118-122 ppm) y carbono aromático sustituido y no sustituido por grupos alquílicos (120-135 ppm).

140 - 160 ppm:

No se detectan señales significativas correspondientes a carbonos aromáticos heterosustituidos (O,N). Resultado que coincide con la baja presencia de hidroxilos fenólicos observada en los estudios de titulación en medio no acuoso.

La ausencia de bandas por encima de 135 ppm indicaría la menor sustitución de los carbonos aromáticos. Dicha ausencia se observa en otros ácidos fúlvicos, en cambio los ácidos húmicos presentan bandas en esa zona aunque no muy significativas. Debe destacarse que los carbonos olefínicos pueden resonar en la región aromática. Sin embargo prácticamente no hay evidencias experimentales independientes, que indiquen la presencia de olefinas en sustancias húmicas (Wilson y col., 1981).

160 - 180 ppm:

Es la zona correspondiente a los carbonos carboxílicos.

En resumen, del examen del espectro se desprende la existencia de cuatro bandas no muy resueltas pero que claramente indican la presencia de metilos, metilenos y metinos en la zona entre 0 y 50 ppm, con un pico definido entre 46 y 49 ppm que correspondería al nitrógeno en forma de amina terciaria. Entre 50-80 ppm estarían las funciones éster, éter y alcohol, en 110-135 ppm núcleos aromáticos con sustituyentes alquílicos y finalmente grupos carboxilos entre

160-180 ppm. Estas cuatro bandas principales coinciden con las obtenidas para sustancias húmicas acuáticas presentes en otros ambientes, como puede distinguirse en la figura 45 (Wilson y col., 1981), figura 46 (Malcolm, 1989) y figura 47 (Lambert y col., 1992).

Degradación oxidativa en medio alcalino

Con el objeto de estudiar la sustitución de los núcleos aromáticos presentes en la molécula del ácido fúlvico de la Laguna del Burro, se realizó una degradación oxidativa en medio alcalino utilizando permanganato de potasio. El procedimiento consistió en someter la muestra durante 24 horas a reflujo, luego se eliminó el exceso de permanganato con bisulfito de sodio, se llevó a pH ácido y se realizaron extracciones con acetato de etilo (capítulo V parte experimental). Finalmente se analizó el extracto por gas cromatografía-espectrometría de masa y se caracterizó ftalato, el cual indicaría la presencia de anillos aromáticos o-disustituidos.

Figura 45: Espectro RMN-^{13}C de sustancias húmicas del Lago Celyn (Gales): A. Acido húmico, B. Acido fúlvico.

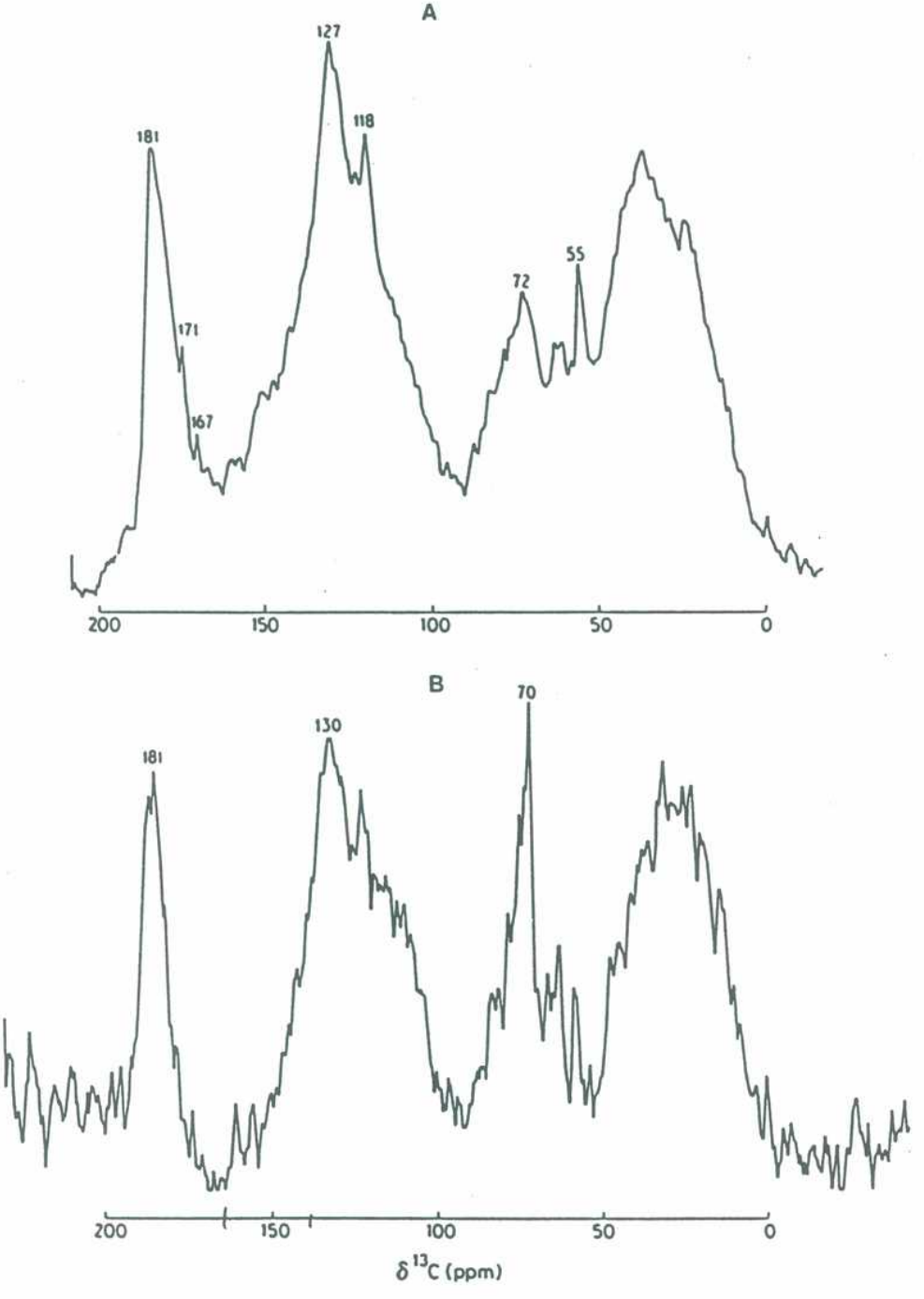


Figura 46: Espectro RMN-^{13}C de sustancias húmicas del Lago New Fork (Estados Unidos): A. Acido fúlvico, B: Acido húmico. 1. Muestra de agua del afluente del lago, 2. Muestra de agua del lago obtenida en superficie (0,75 m), 3. Muestra de agua del lago obtenida en profundidad (150 m).

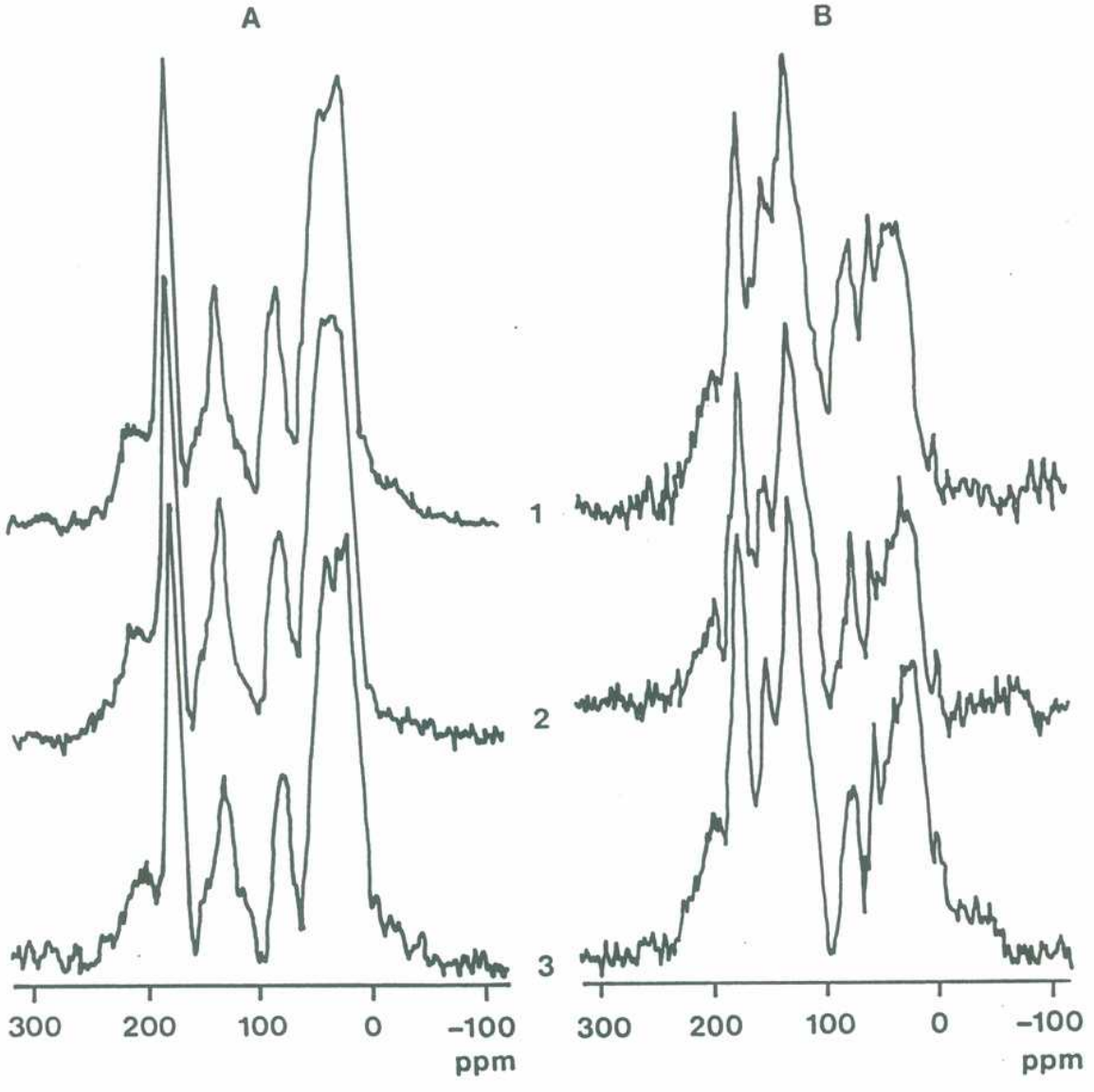
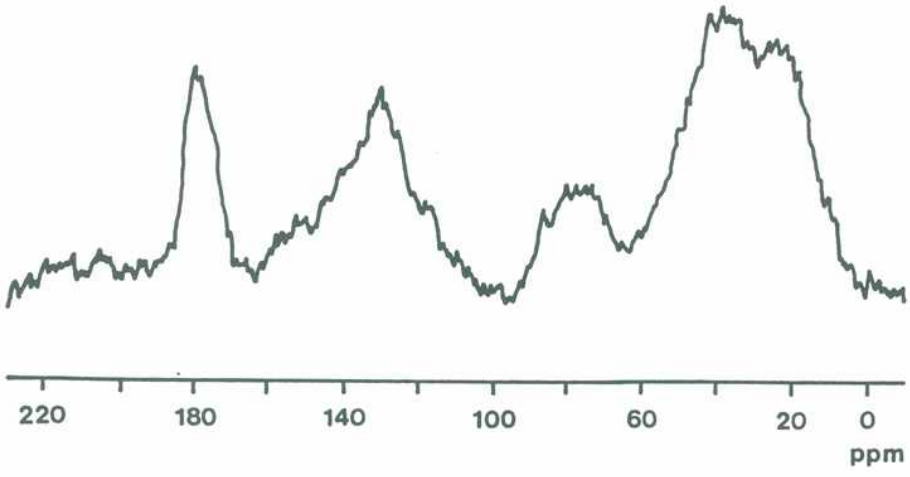
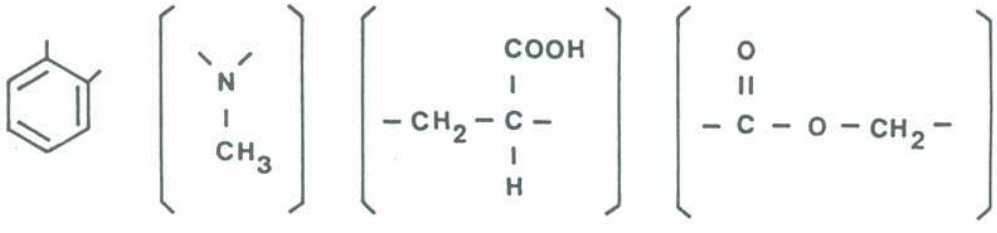


Figura 47: Espectro RMN-^{13}C de sustancias húmicas del Lago Bocholt (Alemania).



Unidades estructurales caracterizadas

A partir de los resultados obtenidos puede plantearse la presencia de las siguientes unidades estructurales en la molécula de ácido fúlvico estudiada.



Las evidencias que fundamentan estas unidades estructurales son las siguientes:

- Los datos de composición centesimal que indican una estructura altamente oxigenada.

- La presencia de bandas anchas en la zona 0-50 ppm en el espectro de RMN-^{13}C no resueltas, que indican la presencia de cadenas alifáticas cortas y/o altamente ramificadas (Wilson y col., 1981).

- El grupo funcional éster evidenciado a través del IR si se tiene en cuenta la diferencia de absorción entre 1700-1800 cm^{-1} antes y después de alcalinizar la muestra, dado que antes del tratamiento, el grupo carboxilo enmascara al éster, mientras que después de éste, se produce el corrimiento de la absorción de dicho carboxilo. Además, en el espectro RMN-^{13}C se observa la banda de los carbonos alifáticos oxigenados entre 50-80 ppm. Por otra parte, la composición centesimal plantea la presencia de grupos altamente oxigenados, de manera que, matemáticamente el cálculo favorece a la función éster como estructura integrante de la molécula.

- El nitrógeno se encuentra en baja proporción según se desprende de la composición centesimal. De acuerdo al espectro RMN-^{13}C, la presencia de una banda aislada y resuelta a 46-49 ppm, sugiere que este nitrógeno estaría en forma de amina terciaria (Malcolm, 1989).

- El espectro de absorción UV-visible indica una fuerte absorción en el UV, típica de la presencia de núcleos aromáticos. Según el espectro de RMN-^{13}C, se encuentra presente el núcleo aromático protonado y a la vez con sustituyentes alquílicos, corroborado con el ftalato obtenido por degradación, que indica la presencia de núcleos aromáticos con sustituyentes alquílicos en posición orto.

- La presencia del carboxilo se manifiesta a través del espectro IR con la banda a 1720 cm^{-1}. Se ratifica por el comportamiento seguido por esta última puesto que al

transformar el ácido fúlvico en la sal sódica, se observa el desplazamiento característico a 1600 cm^{-1} y el aumento de la banda de 1400 cm^{-1}. De acuerdo a Stevenson y Goh (1971), la absorción fuerte a 1720 cm^{-1} y a 1200 cm^{-1} indica que el ácido fúlvico tiene concentración inusualmente alta de grupos carboxilos, pudiendo alcanzar alrededor de 9 meq/g. En el ácido fúlvico en estudio la concentración es de 5,9 meq/g, que se podría considerar como concentración mínima si se tiene en cuenta que existe la posibilidad de que cierta proporción de grupos carboxilos se encuentren unidos a metales, aún después y superando la etapa de aislamiento y purificación (Wilson y col., 1981). La ausencia de otro punto de inflexión en la titulación del ácido fúlvico en medio no acuoso, indica la ausencia de grupos hidroxilos fenólicos en cantidades significativas, en concordancia con el espectro de RMN-^{13}C, que muestra la ausencia de bandas en la región 140-160 ppm.

Las unidades estructurales propuestas para sustancias húmicas acuáticas han sido descriptas por Wilson y col. (1981), Liao y col. (1982), Sonnenberg y col. (1989), Christman y col. (1989), y Malcolm (1989).

Microscopía electrónica

La microscopía electrónica ofrece la posibilidad de obtener una visión en tres dimensiones acerca de la estructura y distribución espacial de macromoléculas y polímeros como las sustancias húmicas (Visser, 1963; Dormaar, 1974; Schnitzer y Kodama, 1975; Chen y Schnitzer, 1976, 1989; Ghosh y Schnitzer, 1982; Stevenson y Schnitzer, 1982; Tan, 1985; Leppard y col. 1990).

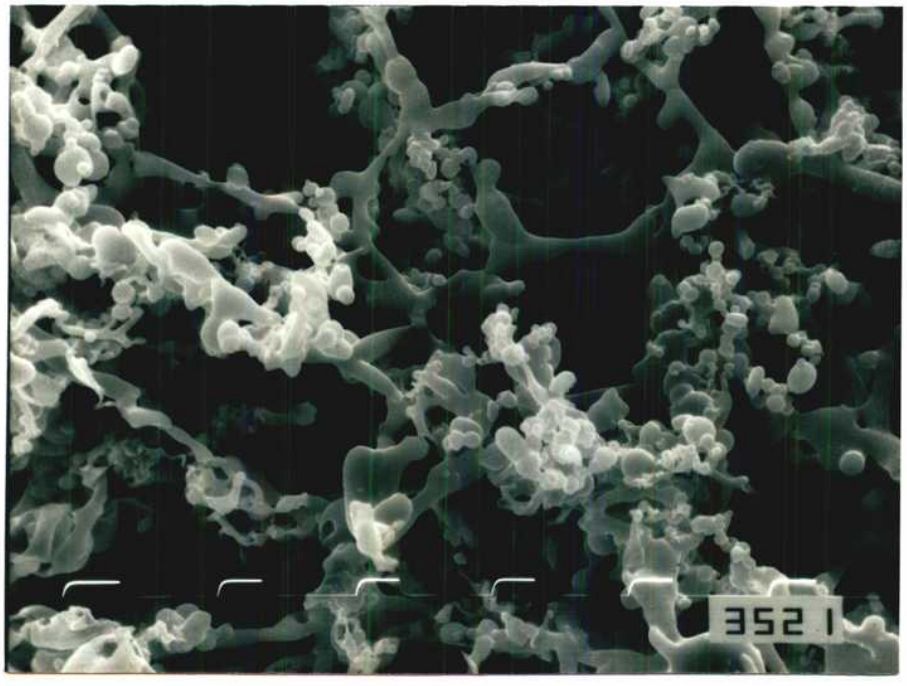
Se realizó el estudio de microscopía electrónica sobre la muestra de ácido fúlvico aislado y purificado de la Laguna

del Burro. Se partió de la solución acuosa de la muestra de pH 2,65 y paralelamente, de la muestra en solución acuosa llevada a pH 11. En ambos casos las muestras fueron liofilizadas para evitar alteraciones. Los resultados se exhiben en las fotografías 1 y 2, pudiéndose ver claramente la diferencia existente en la estructura espacial provocada por el cambio de pH. A pH ácido el polímero se orienta de manera esferoidal similar a las proteínas globulares, mientras que a pH alcalino la disposición es en forma de fibras lineales.

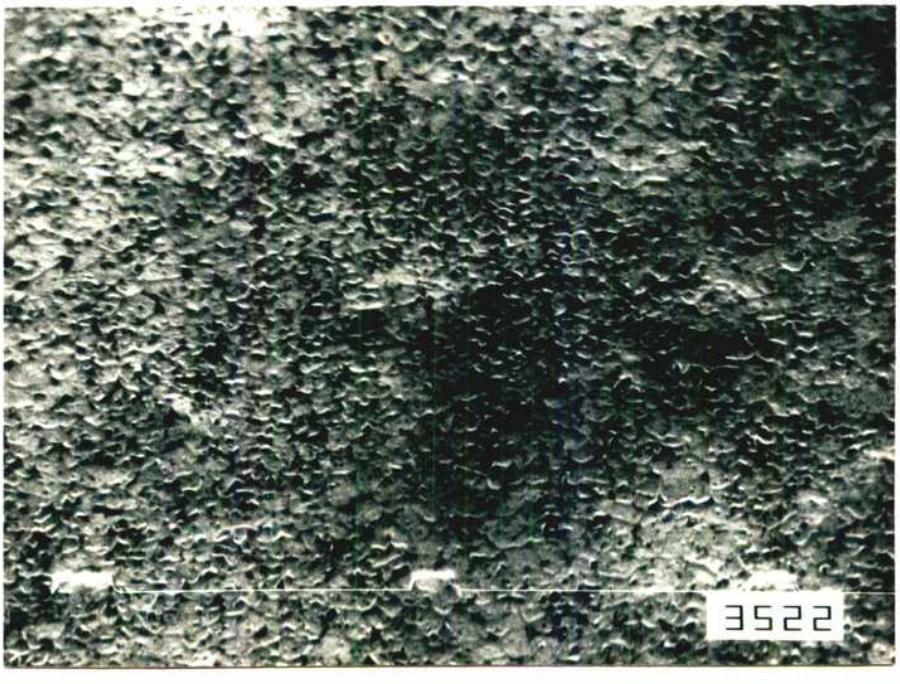
La agregación observada a pH bajo, puede ser explicada por la unión por puente de hidrógeno intermolecular (identificada en el espectro IR) y por fuerzas de van der Waals entre electrones π de moléculas adyacentes. A medida que el pH se incrementa estas fuerzas desaparecen y se ionizan los grupos carboxilos y fenólicos. Consecuentemente las partículas se separan y comienzan a repelerse electrostáticamente formando fibras alargadas. Se produce un cambio no sólo en la forma sino en el tamaño molecular, determinando que a pH ácido el tamaño sea menor, pues las cadenas del polímero se encuentran aglomeradas. Por el contrario a pH alcalino, las cadenas se estiran y al desenredarse provocan que el tamaño sea mayor.

Los resultados obtenidos coinciden con lo concluido al estudiar el comportamiento de las sustancias húmicas en función del pH por cromatografía en geles. El aumento del pH produce una disminución del Ve/Vt indicadora de un incremento del tamaño molecular, que se corresponde con el estiramiento de las cadenas observado a pH alcalino por microscopía electrónica.

Fotografía 1: Microscopía electrónica del ácido fúlvico de la Laguna del Burro a pH 2,65. Distancia entre crestas 10 µm.



Fotografía 2: Microscopía electrónica del ácido fúlvico de la Laguna del Burro a pH 11. Distancia entre crestas 10 µm.



CAPITULO V

PARTE EXPERIMENTAL

Métodos utilizados para el análisis químico de las aguas

Determinación de pH

Se utilizó un pHmetro marca Orion (701 A), calibrado con buffer pH = 4 y pH = 7, de acuerdo a instrucciones del fabricante y controlado con buffer pH = 8 y pH = 9.

Determinación de conductividad específica

Se determinó mediante un conductímetro marca Philips, controlado en el laboratorio con patrones de cloruro de potasio en un rango de 147 µmho/cm (0,001 M) a 24.820 µmho/cm (0,2 M).

Residuo sólido soluble (APHA, 1985)

En primer lugar se filtró la muestra por filtros de 0,45 µm de poro (Millipore) y luego se colocó un volumen de 50,0 ml del filtrado en un cristalizador que se llevó a estufa a 103-105°C. Se procedió a obtener el residuo por evaporación y el tratamiento se continuó hasta peso constante del mismo. El resultado se expresó en gramos por litro.

Oxígeno disuelto (APHA, 1985):

La determinación de este gas es muy útil por diversos motivos, pues brinda una rápida información relacionada con la calidad de agua, con la capacidad autodepurativa y nivel trófico del ambiente (de acuerdo a su comportamiento témporo-espacial), a la vez que permite, mediante el método de la botella clara y oscura, la evaluación de la producción primaria del fitoplancton. Existen dos métodos principales para su determinación: por electrodo específico y por

titulación iodométrica, la cual se detalla a continuación y es conocida también como método de Winkler.

Principio. En un primer paso el sulfato manganoso en medio alcalino reacciona dando hidróxido de manganeso (II) de acuerdo a la siguiente reacción:

$$Mn^{2+} + 2\ OH^- \longrightarrow Mn(OH)_2$$

El hidróxido de manganeso (II) reacciona con el oxígeno disuelto:

$$Mn(OH)_2 + \frac{1}{2}\ O_2 \longrightarrow MnO(OH)_2$$

Este último, en presencia de ioduro en exceso y en medio ácido, genera iodo en forma cuantitativa:

$$MnO(OH)_2 + 2\ I^- + 4H^+ \longrightarrow Mn^{2+} + I_2 + 3H_2O$$

Finalmente el iodo formado es titulado con una solución valorada de tiosulfato de sodio:

$$2\ S_2O_3^{2-} + I_2 \longrightarrow S_4O_6^{2-} + 2I^-$$

Reactivos. A. Solución de sulfato manganoso: se disolvieron 480 g de sulfato manganoso ($MnSO4.4H_2O$) en agua destilada y se diluyó a 1 litro.

B. Reactivo álcali-ioduro-azida: se disolvieron 700 g de hidróxido de potasio (KOH) y 150 g de ioduro de potasio (KI) en agua destilada y se diluyó a 1 litro, agregando luego 10 g de azida sódica (NaN_3) disuelta en 40 ml de agua destilada.

C. Acido sulfúrico concentrado (H_2SO_4).

D. Almidón: se disolvió 1 g de almidón soluble en 100 ml de agua destilada. Se entibió en mechero tratando de lograr

la mayor dispersión posible del almidón. Se continuó el calentamiento hasta ebullición, se retiró del mechero y dejándose enfriar se agregó alrededor de 0,2 g de ácido salicílico (que cumple la función de preservativo).

E. Solución de dicromato de potasio 0,01 N: primeramente se secó en estufa durante 2 horas, dicromato de potasio patrón primario ($K_2Cr_2O_7$) a 103-105 °C. Se pesaron 4,9032 g y se transfirieron a un matraz de 1 litro llevándose a volumen con agua destilada. La solución obtenida fue 0,1 N, por lo tanto se debió diluir al 1/10 para lograr la concentración deseada (se tomó 10,00 ml en un matraz de 100 ml y se llevó a volumen con agua destilada).

F. Solución valorada de tiosulfato de sodio 0,01 N: se tomaron 2,48 g de tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3.5H_2O$), agregándose como preservativo alrededor de 0,5 g de NaOH y se diluyeron a 1 litro con agua destilada recién hervida y enfriada. La solución así obtenida posee una normalidad aproximada a la deseada, consecuentemente debió procederse a una valoración de manera de obtener la normalidad verdadera (Nv) según el siguiente procedimiento: se tomaron 10,00 ml de E en un erlenmeyer de 125 ml, se diluyeron con aproximadamente 50 ml de agua destilada y se agregaron 2 g de KI, agitándose hasta disolución total. Inmediatamente antes de proceder a la titulación se agregó gotas de H_2SO_4 concentrado, de esta manera se produce la liberación cuantitativa de iodo que, dada su volatilidad, debió ser titulado cuanto antes con la solución de tiosulfato a valorar. Esta última se agregó desde una bureta hasta la obtención de un color paja pálido, punto en el que se adiciona 1 ml de la solución D que actúa como indicador. Se observó la formación de un color azul intenso y se continuó el agregado de tiosulfato hasta la primera desaparición del color. Con el dato del volumen gastado (Vg), se procedió al cálculo de Nv de acuerdo a:

$$Nv = \frac{0,01 \times 10,00}{Vg}$$

Procedimiento. La muestra se tomó mediante el uso de un muestreador adecuado (van Dorn) y debió ser introducida cuidadosamente con el tubo de salida del muestreador colocado en el fondo de un frasco de boca esmerilada. La misma fluyó lentamente, sin producir burbujas, desplazando el aire del interior del frasco y con el tubo de salida permanentemente sumergido en ella. Se continuó el agregado hasta rebalsar, se quitó el tubo, se acercó la tapa a la boca del frasco y se soltó permitiendo que se deslice por gravedad a la vez que el exceso de agua fue expulsado. Controlando que no se produjeran burbujas durante este proceso, se giró la tapa con el objeto de lograr el cierre hermético. Sin demora se debió proceder con el agregado de 1 ml de A y 1 ml de B (por cada 100 ml de muestra aproximadamente) para lo cual se destapó y con la punta de la pipeta introducida en la muestra se dejó fluir el reactivo por gravedad. Se volvió a tapar cuidadosamente y se mezcló por inversión varias veces. Se dejó estar hasta observar la formación de un precipitado pardo que es el correspondiente al $MnO(OH)_2$. Luego de producida la sedimentación completa se realizó el mezclado nuevamente. Una vez concluida la segunda decantación, se destapó y se agregó 1 ml de C, se volvió a tapar y se mezcló hasta la disolución completa del precipitado. Comprobada la distribución homogénea del iodo liberado, se tomaron 50,00 ml, colocándose en un erlenmeyer de 125 ml y rápidamente se agregó la solución valorada de tiosulfato hasta la formación del color paja pálido, instante en que se adicionó 1 ml de solución D produciéndose el viraje al color azul, se continuó entonces la titulación hasta la primera desaparición del mismo y finalmente se registró el volumen gastado (Vg).

Cálculo:

$$O_2 \text{ mg/l} = \frac{Vg \times Nv \times 8 \times 1000}{50{,}00 \times \frac{(Vfrasco - 2)}{Vfrasco}}$$

En el denominador figura el volumen de muestra corregido teniendo en cuenta el desplazamiento provocado por el agregado de reactivos.

Interferencias. El agregado de la azida sódica en el reactivo B (modificación de Alsterberg), tiene por objeto eliminar la interferencia debida al nitrito. La magnitud del error en la determinación depende en mucho de la muestra en particular, por ejemplo la presencia elevada de material en suspensión y materia orgánica afecta sensiblemente la precisión y exactitud del método.

Porcentaje de saturación. Contar solamente con el valor del oxígeno disuelto, no permite visualizar el grado de oxigenación del agua en estudio debido a la influencia de la temperatura en la solubilidad de este gas. Por tal motivo se hace necesario calcular el porcentaje de saturación, para el cual debe conocerse el dato de temperatura del agua en el momento de la colección y con ésta la solubilidad del oxígeno mediante tablas (Golterman, 1971; APHA, 1985). La fórmula empleada fue la siguiente:

$$\text{Porcentaje de saturación} = \frac{\text{Concentración de oxígeno en la muestra} \times 100}{\text{Solubilidad a la temperatura de la muestra}}$$

Sodio y potasio

Ambos se determinaron por fotometría de llama, utilizando un fotómetro de llama marca Enige (Industria Argentina). Según instrucciones del fabricante se realizaron las mediciones con patrones para sodio comprendidos entre 1 y 100 ppm y para potasio entre 0,1 y 10 ppm.

Calcio (APHA, 1985):

Principio. El EDTA (ácido etilendiaminotetracético) agregado a la muestra de agua se combina primero con calcio y luego con magnesio. En la determinación de calcio se lleva la muestra a pH 12-13, de manera de precipitar el magnesio como hidróxido, permitiendo que el EDTA reaccione solamente con el calcio hasta viraje del indicador (murexida).

Reactivos. A. Solución de hidróxido de sodio 1 N: se disolvieron 40 g de NaOH en 200 ml de agua cuidadosamente dado que la reacción es exotérmica, se dejó alcanzar la temperatura ambiente y finalmente se agregó agua destilada hasta 1 litro.

B. Murexida: se mezcló en un mortero 0,2 g de murexida con 100 g de NaCl, triturándose hasta que la mezcla pasó los tamices de 40-50 mallas.

C. Solución de calcio 0,02 N: se pesó 1,0000 g de carbonato de calcio patrón primario ($CaCO_3$), se colocó en un erlenmeyer de 500 ml y gota a gota, se agregó HCl 1+1 hasta disolución total. Luego se vertieron 200 ml de agua destilada llevándose a ebullición durante algunos minutos. Se dejó enfriar, se transfirieron cuantitativamente a un matraz de 1 litro y se llevó a volumen con agua destilada.

D. Solución de EDTA 0,02 N: se pesaron 3,7 g de ácido etilendiaminotetracetato disódico dihidrato, se disolvieron

en agua destilada y transfiriéndose a un matraz de 1 litro, se llevó la solución a volumen con agua destilada. La solución obtenida debió ser valorada de modo de encontrar la normalidad verdadera (Nv). Con tal fin se tomaron 10,00 ml de C, se colocaron en un erlenmeyer de 125 ml y se agregaron 50 ml de agua destilada, 2 ml de A y una punta de espátula de B. Debido a que el colorante es inestable en medio alcalino, desde una bureta se debió verter inmediatamente la solución a valorar hasta viraje del indicador, que cambió de color rosa a púrpura. Con el dato del volumen gastado (Vg) se procedió al cálculo siguiente:

$$Nv = \frac{0,02 \times 10,00}{Vg}$$

Procedimiento. Se tomaron 50,00 ml de muestra, o una alícuota conveniente diluida a 50,00 ml, se agregaron 2 ml de A, una punta de espátula de B y se tituló con D hasta viraje del indicador. Se anotó el volumen gastado (Vg) procediéndose al cálculo siguiente:

$$Ca\ mg/l = \frac{Vg \times Nv \times 20 \times 1000}{Vm}$$

Siendo Vm el volumen de muestra.

En los casos en que las muestras tuvieron elevada concentración de carbonato se hizo necesario llevarlas a neutralidad con ácido, posteriormente hervirlas durante un minuto para eliminar el dióxido de carbono, se dejaron enfriar y recién después se procedió a la titulación de calcio.

Magnesio (APHA, 1985):

Principio. Se lleva la muestra conteniendo calcio y magnesio a pH 10,0 ± 0,1 con un buffer y se agrega el indicador Negro de Eriocromo T, se produce por lo tanto el viraje a un color rojo vinoso. Bajo estas condiciones el EDTA reacciona primero con calcio y luego con magnesio hasta el viraje del indicador, pasando del color rojo vinoso a un azul intenso.

Reactivos. A. Solución buffer: se disolvió 1,179 g de EDTA y 0,780 g de sulfato de magnesio ($MgSO_4.7H_2O$) en 50 ml de agua. Se agregó esta solución a una mezcla de 16,9 g de cloruro de amonio (NH_4Cl) y 143 ml de amoníaco, finalmente se diluyó a 250 ml con agua destilada. Se agregó la sal de magnesio complejada con EDTA de manera de asegurar que una pequeña cantidad de ion magnesio esté presente para lograr un punto final adecuado.

B. Negro de Eriocromo T: se mezcló íntimamente 0,5 g del colorante con 100 g de cloruro de sodio.

C. Solución de EDTA 0,02 N: la misma solución que la descripta para calcio.

Procedimiento. Se tomó un volumen apropiado de muestra, se agregaron 2 ml de A y una punta de espátula de B e inmediatamente se procedió a la titulación. El viraje se produjo cuando la solución pasó de un tinte rojizo al azul. El volumen gastado comprende la reacción del EDTA con el calcio y magnesio, por lo tanto este último se dedujo por diferencia de la siguiente manera:

$$Mg\ mg/l = \left[\frac{Vg_1}{Vm_1} - \frac{Vg_2}{Vm_2} \right] x\ Nv\ x\ 12,2\ x\ 1000$$

Donde Vg_1 es el volumen de EDTA gastado hasta el punto final del Negro de Eriocromo T, Vm_1 el volumen de muestra usado para esta titulación, Vg_2 el volumen de EDTA gastado hasta el punto final de la murexida y Vm_2 el volumen de muestra empleado para la titulación.

En los casos en que se expresó la suma de calcio y magnesio en términos de dureza, miligramos de carbonato de calcio por litro, se realizó el cálculo de la siguiente manera:

$$\text{Dureza mg } CaCO_3/l = \frac{Vg_1 \times Nv \times 50 \times 1000}{Vm_1}$$

Carbonato y bicarbonato (APHA, 1985):

Estas dos especies resultan de suma importancia puesto que en general, definen el pH de las aguas naturales y la alcalinidad, que es la capacidad de neutralizar ácido de un agua en particular. El método utilizado se basa en una titulación con ácido valorado.

Principio. Se agrega a la muestra una solución valorada de ácido que provoca el pasaje de carbonato a bicarbonato. La conversión total ocurre al alcanzar el valor de pH igual a 8,3, produciéndose el viraje del indicador (fenolftaleína). Se continúa el agregado de ácido hasta pH 4,2, momento en que todo el bicarbonato originalmente presente en la muestra y el proveniente del carbonato, pasa a dióxido de carbono más agua con el consecuente viraje del indicador (naranja de metilo). En base a los volúmenes gastados en ambos casos se deducen las concentraciones respectivas.

Reactivos. A. Fenolftaleína: se disolvió 0,5 g de fenolftaleína en 50 ml de etanol 95%, agregándose luego 50 ml

de agua destilada y por último gotas de una solución de NaOH 0,05 N, hasta la obtención de un leve tinte rosado.

B. Naranja de metilo: se disolvió 0,05 g de naranja de metilo en 100 ml de agua destilada.

C. Carbonato de sodio 0,02 N: se secó en estufa carbonato de sodio patrón primario (Na_2CO_3) a 140 °C durante 2 horas. Se pesó 1,0600 g, se transfirió a un matraz de 1 litro, llevándose a volumen con agua destilada previamente hervida y enfriada.

D. Solución valorada de ácido sulfúrico 0,02 N: se tomó 0,56 ml de H_2SO_4 concentrado de calidad analítica y se llevó a 1 litro con agua destilada. Se tomaron 10,00 ml de C y se colocaron en un erlenmeyer de 125 ml, agregándose alrededor de 50 ml de agua destilada y 2 a 3 gotas de B. Desde una bureta, se agregó la solución de ácido a valorar hasta viraje del indicador, que ocurrió cuando el color pasó de amarillento al anaranjado. Se registró el volumen gastado (Vg) y se efectuó el cálculo siguiente:

$$Nv = \frac{10,00 \times 0,02}{Vg}$$

Procedimiento. Se agregaron 2 a 3 gotas de A, a un volumen adecuado de muestra (Vm), cuando existió carbonato se produjo un viraje instantáneo al color rosa, en cuyo caso, se agregó D mediante una bureta, hasta la desaparición del mismo y se anotó el volumen gastado (F). Seguidamente se añadieron 2 a 3 gotas de B y se continuó la titulación agregando D hasta que la solución viró de un color amarillento al anaranjado, anotándose el volumen total (T) empleado en la titulación.

Cálculos:

$$\text{Carbonato, } CO_3^{2-} \text{ mg/l} = \frac{F \times 0{,}02 \times 60 \times 1000}{Vm}$$

$$\text{Bicarbonato, } HCO_3^{-} \text{ mg/l} = \frac{(T - 2\,F) \times 0{,}02 \times 61 \times 1000}{Vm}$$

Alcalinidad

Es común expresar la concentración de carbonatos y la suma de carbonatos y bicarbonatos en términos de alcalinidad de carbonatos y alcalinidad total respectivamente. En estos casos las unidades generalmente empleadas son miliequivalentes por litro o miligramos de carbonato de calcio por litro. Por lo tanto, las expresiones son las siguientes:

$$\text{Alcalinidad carbonatos meq/l} = \frac{2\,F \times Nv \times 1000}{Vm} \quad (\times 50 = \text{mg } CaCO_3/l)$$

$$\text{Alcalinidad total meq/l} = \frac{T \times Nv \times 1000}{Vm} \quad (\times 50 = \text{mg } CaCO_3/l)$$

Interferencias: Como se trata de una reacción ácido-base, cualquier otra base presente en concentraciones elevadas interfiere (por ejemplo: boratos, fosfatos, silicatos).

Cloruro (APHA, 1962):

Principio. Se precipita cuantitativamente el cloruro con nitrato de plata valorado en presencia de cromato de potasio

como indicador. Una vez precipitado todo el cloruro, se produce la precipitación de cromato de plata de color rojo.

Reactivos. A. Solución de nitrato de plata 0,0141 N: se disolvieron 2,396 g de $AgNO_3$ en un litro de agua destilada. La normalidad verdadera (Nv) se determinó con la solución valorada de NaCl de una manera similar a los procedimientos mencionados anteriormente.

B. Solución valorada de cloruro de sodio 0,0141 N: se disolvió en agua destilada 0,8241 g de NaCl (previamente secado en estufa) y se diluyó a un litro. Esta solución contiene 0,500 mg de Cl/ml.

C. Indicador de cromato de potasio: se disolvieron 50 g de K_2CrO_4 en agua destilada. Se agregó solución de nitrato de plata hasta formar un precipitado rojo definido, se dejó reposar, se filtró y el filtrado obtenido se diluyó a un litro con agua destilada.

Procedimiento. Se agregó 1 ml de C a 25,00 ml de muestra colocados en un erlenmeyer de 125 ml, titulándose con la solución valorada de nitrato de plata hasta viraje del indicador (Vt).

Cálculo:

$$\text{mg Cl/l} = \frac{\text{Vt x Nv x 35460}}{25,00}$$

Sulfato (Tabatabai, 1974):

Principio. Se agrega una solución de cloruro de bario a la muestra conteniendo sulfato. Como consecuencia se produce la precipitación de sulfato de bario, que bajo condiciones controladas permite -por comparación con patrones de sulfato-

la determinación turbidimétrica del sulfato originalmente presente.

Reactivos. A. Solución patrón de sulfato: se pesó 1,0882 g de K_2SO_4 previamente secado en estufa, se disolvió en agua destilada y se diluyó a un litro. La solución contiene 0,600 mg SO_4/ml.

B. Solución cloruro de bario-gelatina: se disolvió 0,6 g de gelatina en 200 ml de agua destilada y se calentó hasta 60-70 °C, se dejó enfriar y se colocó en heladera (4 °C) durante 16 horas. Luego se llevó a temperatura ambiente, se agregaron 2 g de $BaCl_2.2H_2O$ y se mezcló bien.

C. Solución de ácido clorhídrico 0,5 N.

Procedimiento. En tubos de Nessler de 50 ml, se preparó una curva de patrones de concentración conveniente, blanco y muestras. Se agregó a cada uno 2 ml de C para eliminar la interferencia de carbonato, luego 1 ml de B y se agitó. Dejándose reaccionar media hora, se volvió a agitar y finalmente se leyó en el espectrofotómetro a 420 nm.

Amonio (Mackereth y col. 1978):

Principio. El amonio reacciona con fenol e hipoclorito en medio alcalino formando el azul de indofenol, reacción catalizada por nitroprusiato. La intensidad del color resultante es proporcional a la concentración de amonio presente y se mide espectrofotométricamente a 635 nm.

Reactivos. A. Agua destilada: todos los reactivos y patrones deben estar libres de amonio, condición que resulta difícil de conseguir debido a la contaminación del ambiente, especialmente en los laboratorios. Por lo tanto el agua

destilada debió pasarse previamente por resina de intercambio catiónico (Amberlite IR-120).

B. Reactivo fenol-nitroprusiato: se disolvieron 15 g de fenol (calidad analítica) y 0,015 g de nitroprusiato de sodio (1 ml de una solución acuosa de 1,5 %) en 500 ml de agua destilada. Se conservó en heladera.

C. Reactivo hipoclorito-alcalino: se disolvió 10 g de NaOH en 400 ml de agua destilada aproximadamente, se enfrió, se agregó un volumen de solución de hipoclorito que contenía 0,26 g de cloro (2,6 ml de una solución al 10 %) y se diluyó finalmente a 500 ml con agua destilada. En la preparación de este reactivo corrientemente se utiliza solución de hipoclorito comercial (lavandina), que posee alrededor de 6 % de cloro.

D. Solución patrón de amonio: se disolvieron 3,819 g de NH_4Cl (previamente secado en estufa) en agua destilada y transfiriéndose a un matraz de 1 litro se llevó a volumen con agua destilada. La solución contenía 1 mg de nitrógeno en 1 ml de solución.

Procedimiento. Se tomaron 50,00 ml de muestra previamente filtrada por filtro de 0,45 µm de poro, se agregaron 2 ml de B y 2 ml de C y se mezcló bien colocándose en un baño de agua a 25 °C durante 1 hora en ausencia de luz. En forma paralela se realizó un blanco de reactivos (utilizando 50 ml de agua destilada) y una curva de patrones con diluciones convenientes de la solución D (tratados de la misma manera que la muestra). Se leyeron las absorbancias del color resultante en un espectrofotómetro a 635 nm. Con las lecturas de los patrones, previamente sustraído el valor del blanco, se preparó una curva de calibración absorbancia en función de la concentración. Luego, con el dato de la muestra -también corregida por el blanco- se dedujo la concentración de la misma. Las concentraciones de los patrones debieron ser

elegidas de manera que las lecturas de las muestras estuvieran comprendidas dentro de dicho rango.

Interferencias. Acido sulfídrico, que puede ser removido llevando la muestra a pH 3 y burbujeando un gas inerte (nitrógeno). Aguas con mucho contenido de calcio que producen un precipitado a causa de la alcalinidad generada por los reactivos, pudiéndose evitar agregando EDTA en una cantidad que se deduce del análisis de calcio.

Nitrito (EPA, 1976):

Principio. Bajo condiciones ácidas, el nitrito reacciona con la sulfanilamida formando una sal de diazonio, que copula con la N-(1-naftil) etilendiamina para dar un compuesto de color rojizo que se lee en el espectrofotómetro a 540 nm.

Reactivos. A. Se tomaron 100 ml de agua destilada, se le agregaron 105 ml de HCl concentrado y 5 g de sulfanilamida. Se disolvió bien y lentamente se agregaron 136 g de acetato de sodio trihidrato ($CH_3COONa.3H_2O$). Finalmente se llevó la solución a 250 ml con agua destilada.

B. Se tomó 0,5 g de cloruro de N-(1-naftil) etilendiamina ($C_{12}H_{16}Cl_2N_2$) llevándose a 250 ml con agua destilada.

C. Solución patrón de nitrito: se colocó nitrito de sodio ($NaNO_2$) 24 horas en desecador, se pesaron 4,926 g y se disolvieron con agua destilada. La solución se transfirió a un matraz de 1 litro, se completó a volumen y se preservó por agregado de 2 ml de cloroformo, donde 1 ml contenía 1 mg de nitrógeno.

Procedimiento. En el momento del análisis, se mezclaron partes iguales de los reactivos A y B. Agregándose 2 ml de esta mezcla a 50 ml de muestra previamente filtrada por

filtro de 0,45 µm de poro. De la misma manera se procedió con un blanco de agua destilada y con la curva de patrones obtenida por dilución conveniente de la solución C. Se dejó reposar durante 15 minutos para permitir el total desarrollo del color y se leyó en el espectrofotómetro a 540 nm. De la curva de calibración -realizada con las absorbancias de los patrones corregidas por el blanco y sus respectivas concentraciones- se dedujo la concentración de la muestra a partir de la absorbancia de la misma (corregida por el blanco).

Interferencias. Las muestras con pH mayor de 10 deben ajustarse a pH 6 aproximadamente con HCl 1:3. La presencia de oxidantes y reductores fuertes constituyen una fuente de alteración de la concentración de nitrito.

Nitrato (EPA, 1976):

Principio. El nitrato presente en la muestra es reducido a nitrito, por medio del pasaje a través de una columna de cadmio-cobre y valorado como éste, de acuerdo a la técnica anteriormente detallada.

Reactivos. A. se mezclaron partes iguales de reactivos A y B de la técnica de nitrito.

B. Solución de cloruro de amonio-EDTA: se tomaron 18 g de NH_4Cl y 2,3 g de EDTA, se disolvieron en 80 ml de agua destilada y se llevaron a pH 8,5 con amoníaco. Posteriormente se agregó agua destilada hasta 100 ml.

C. Solución patrón de nitrato: se disolvieron 7,218 g de nitrato de potasio (KNO_3) previamente secado en estufa, en agua destilada, se transfirieron a un matraz de 1 litro y se completó a volumen con agua destilada. En la solución obtenida 1 ml contenía 1 mg de nitrógeno.

D. Columna de cadmio-cobre: se utilizó cadmio granulado (40-60 mallas), que fue lavado con HCl 6 N y posteriormente enjuagado con abundante agua destilada. Se trataron 25 g de este último con porciones sucesivas de 100 ml de sulfato de cobre al 2 % (se disolvió 20 g de $CuSO_4.5H_2O$ en 500 ml de agua destilada y se diluyó a 1 litro). En cada caso se revolvió hasta la desaparición del color azul, se dejó decantar y se repitió la operación hasta la formación de un precipitado marrón. Se lavó con agua destilada, 10 veces como mínimo, para remover todo el precipitado de cobre. El cadmio-cobre preparado se agregó a una columna de vidrio obtenida a partir de una pipeta volumétrica de 100 ml, cortada de manera de dejar un reservorio de 80-85 ml en la parte superior. Luego de armada la columna, debió ser activada mediante el pasaje de 100 ml de una solución de concentración 0,250 mg N/l (preparada a partir de C) mezclada con 4 ml de B. La velocidad de pasaje fue de 7 a 10 ml por minuto. Posteriormente la columna debió lavarse, con una solución preparada con 100 ml de agua destilada mezclados con 4 ml de B, y guardarse en esta solución manteniendo el nivel de la columna siempre por encima del cadmio-cobre para evitar la entrada de aire.

Procedimiento. Se agregaron 4 ml de B a 100 ml de muestra (o a una alícuota adecuada diluida a 100 ml) previamente filtrada por filtro de 0,45 µm de poro y después de mezclarlos se colocaron en la columna. Se procedió al pasaje por columna con flujo de 7-10 ml por minuto descartando los primeros 25 ml y recogiendo 50 ml en un tubo de Nessler. El mismo procedimiento debió realizarse con un blanco de agua destilada y patrones elegidos de concentración conveniente. Finalmente se agregaron 2 ml de solución A a la muestra, al blanco y a los patrones. Se dejaron estar por lo menos 15 minutos para el desarrollo del color y se leyeron en el

espectrofotómetro a 540 nm. Se corrigieron las lecturas por resta con el blanco y se dedujo la concentración de la muestra mediante la curva de calibración realizada con los patrones. Cabe destacar que la concentración calculada corresponde a la suma de nitrito proveniente de la reducción de nitrato y del nitrito originalmente presente en la muestra, por lo tanto la concentración de nitrato se determinó por diferencia de la concentración de nitrógeno obtenida luego de la reducción con cadmio-cobre y de la concentración de nitrógeno deducida en la determinación de nitrito.

Interferencias. Si la muestra se encuentra a pH por debajo de 5 o por encima de 9, debe llevarse a pH alrededor de 6 con amoníaco o ácido clorhídrico.

Nitrógeno total (Mackereth y col., 1978):

Principio. Se realiza una oxidación con persulfato en medio alcalino, de manera de pasar todo el nitrógeno a nitrato, que se determina de acuerdo a la técnica recién descripta. Al resultado obtenido se debe restar el nitrato originalmente presente .

Reactivos: A. Solución patrón de glicina: se pesaron 268,1 mg de glicina, se disolvió y diluyó a 100,0 ml con agua destilada. La solución preparada de esta manera contenía 0,5 mg de nitrógeno/ml.

B. Solución oxidante: se tomaron 1,5 g de NaOH y 3,4 g de $K_2S_2O_8$ y se llevaron a 50 ml con agua destilada.

C. Acido clorhídrico 4 N.

D. Reactivos de la técnica de nitrato.

Procedimiento. En erlenmeyers de 125 ml se colocaron muestras, patrones y blanco, a los que se agregó 1,5 ml de B, se tapó con algodón y se cubrió con hoja de aluminio, efectuándose después la digestión en olla a presión durante media hora. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente, se llevó a pH entre 7-8 y seguidamente se procedió de acuerdo a la técnica de nitrato.

Ortofosfato (APHA, 1985):

El ortofosfato (PO_4^{3-}) es un nutriente esencial para el crecimiento de los organismos y puede llegar a comportarse como limitante de la productividad primaria del ambiente acuático.

Principio. La técnica de análisis consiste en la reacción del ortofosfato con el molibdato de amonio en presencia del tartrato de antimonilo y potasio para formar un complejo, que se debe reducir con ácido ascórbico para dar lugar al azul de molibdeno, color proporcional a la concentración de ortofosfato.

Reactivos. A. Solución de molibdato de amonio: se disolvieron 15 g de molibdato de amonio ($Mo_7O_{24}(NH_4)_6.4H_2O$) en 500 ml de agua destilada.

B. Solución de ácido sulfúrico: cuidadosamente se agregó 140 ml de H_2SO_4 a 900 ml de agua destilada.

C. Solución de ácido ascórbico: se disolvieron 27 g de ácido ascórbico (vitamina C) en 500 ml de agua destilada. Reactivo que por su inestabilidad debió prepararse en el momento de ser usado.

D. Solución de tartrato de antimonilo y potasio: se disolvió 0,34 g de tartrato de antimonilo y potasio ($K(SbO)C_4H_4O_6.½ H_2O$) en 250 ml de agua destilada.

E. Reactivo mezcla: se mezclaron 100 ml de A con 250 ml de B, 100 ml de C y 50 ml de D. Este reactivo también debió prepararse en el momento de ser usado.

F. Solución patrón de fósforo: se disolvieron 4,3900 g de fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4) en agua destilada, se transfirió a un matraz de 1 litro y se completó a volumen. En esta solución 1 ml contenía 1 mg de fósforo.

Procedimiento. Se agregaron 5 ml de E a 50 ml de muestra (previamente filtrada por filtro de 0,45 µm de poro y llevada a pH alrededor de 7) y se dejó reposar 2-3 horas para permitir el desarrollo del color y su medición. Paralelamente se realizó un blanco con agua destilada y una curva de patrones por dilución conveniente de F. Las lecturas se efectuaron en el espectrofotómetro a 885 nm, se corrigieron por resta con el blanco y mediante la curva de calibración se evaluó la concentración de la muestra.

Fósforo total (APHA, 1985):

El cómputo del fósforo total (suma de todas las formas de fósforo: orgánico, inorgánico, soluble y particulado) puede resultar muy conveniente para evaluar el grado de aporte de las distintas fuentes a los cuerpos de agua, su relación con el grado de trofía, ciclo de este elemento, etc. Determinar sólo el ortofosfato -que es una de las formas químicas en que se presenta el fósforo- puede no ser lo suficientemente elocuente en la interpretación global de los fenómenos ligados a los nutrientes en los ambientes acuáticos.

Principio. El método se basa en la digestión de la muestra mediante un oxidante (persulfato de potasio) en medio ácido que convierte todas las formas de fósforo en ortofosfato,

para ser finalmente analizado como tal, de acuerdo a la técnica antes descripta.

Reactivos. A. Fenolftaleína: la misma que la utilizada para la determinación de carbonato.

B. Solución de ácido sulfúrico: cuidadosamente se agregó 300 ml de H_2SO_4 concentrado a 600 ml de agua destilada y luego se diluyó a 1 litro.

C. Persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$).

D. Solución de hidróxido de sodio 1 N: el mismo que el utilizado en la determinación de calcio.

Procedimiento. A 40 ml de la muestra original, llevada a pH alrededor de 7, se agregó 1 ml de B y 0,5 g de C, seguidamente se realizó la digestión mediante olla a presión durante 30 minutos. Una vez finalizada se llevó a temperatura ambiente, se agregaron 2 a 3 gotas de A y se añadió D hasta lograr un leve tinte rosado, posteriormente se completó a 50 ml con agua destilada. En estas condiciones la muestra estuvo preparada para continuar con el procedimiento de análisis de ortofosfato. Igualmente el blanco y los patrones debieron someterse al mismo tratamiento que la muestra.

Sílice reactiva (APHA, 1985):

Principio. El molibdato de amonio reacciona con la sílice y también con fosfato a un pH aproximado de 1,2 para formar el heteropoliácido. Se agrega ácido oxálico para destruir el ácido fosfomolíbdico y eliminar la interferencia del fosfato. Luego se agrega el ácido aminonaftolsulfónico que produce la reducción del ácido silicomolíbdico formando el azul de molibdeno cuyo color es proporcional a la sílice presente, finalmente se lee en el espectrofotómetro a 650 nm.

Reactivos. A. Solución patrón de sílice: se disolvieron 4,73 g de metasilicato de sodio nonahidratado ($Na_2SiO_3.9H_2O$) y se diluyó a un litro. Esta solución contenía 1 mg SiO_2/ml.

B. Solución de molibdato de amonio: se disolvieron 10 g de molibdato de amonio ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) y se diluyó a 100 ml con agua destilada.

C. Solución de ácido oxálico: se disolvieron 10 g de ácido oxálico ($C_2H_2O_4.2H_2O$) y se diluyó a 100 ml con agua destilada.

D. Agente reductor: se disolvieron 0,5 g de ácido 1-amino, 2-naftol, 4-sulfónico y 1 g de sulfito de sodio en 50 ml de agua destilada. La solución obtenida se agregó a otra conteniendo 30 g de bisulfito de sodio disueltos en 150 ml de agua destilada.

E. Acido clorhídrico 1 + 1.

Procedimiento. Se agregaron 1,0 ml de E y 2,0 ml de B a 50 ml de patrones, muestras y blanco. Se mezcló, se dejó reposar y se agregó 1,5 ml de C mezclándose nuevamente. Se esperaron dos minutos y antes de 15 minutos se agregaron 2,0 ml de D. Se mezcló y después de 5 minutos se leyó en el espectrofotómetro a 650 nm. El color permanece estable por 12 horas.

Demanda química de oxígeno (Golterman, 1971):

Principio. La técnica consiste en la oxidación de la materia orgánica mediante permanganato. El resultado se expresa como el oxígeno consumido del permanganato. Se puede analizar la muestra total o la muestra filtrada por filtros de 0,45 µm. Mediante el análisis de la muestra total se obtiene el oxígeno consumido del material particulado y soluble, mientras que el mismo análisis realizado en la muestra

filtrada, permite determinar el oxígeno consumido del material soluble.

Reactivos. A. Solución de permanganato de potasio de 0,0125 N: se pesó 0,3951 g de permanganato de potasio ($KMnO_4$) y se diluyó a un litro con agua destilada.

B. Solución de ácido oxálico 0,0125 N: se disolvió 0,788 g de ácido oxálico ($C_2O_4H_2.2H_2O$) y se diluyó a un litro con agua destilada.

C. Acido sulfúrico 1 + 3.

Procedimiento. En un erlenmeyer de 250 ml se agregaron 100 ml de muestra, 10,00 ml de A y 10 ml de C. Se sumergió el erlenmeyer en un baño de agua hirviente por 30 minutos. Seguidamente se quitó del baño y en caliente se agregó 10,00 ml de B. Finalmente el ácido oxálico remanente se tituló por retorno hasta obtener una débil coloración rosada persistente (Vt). Paralelamente se realizó un blanco con agua destilada, siendo Vb el gasto de permanganto por retorno del mismo.

Cálculo:

$$\text{mg } O_2 \text{ consumido/l} = \frac{(Vt - Vb) \times 0{,}0125 \times 8 \times 1000}{100}$$

El factor 8 es el miliequivalente del oxígeno (8 mg/meq).

Color (APHA, 1985):

Principio. El método se basa en la comparación visual del color de la muestra contra patrones preparados a partir de cloroplatinato de potasio, informando el resultado como miligramos de platino por litro o unidades color.

Reactivos. Se disolvieron 1,246 g de cloroplatinato de potasio (K_2PtCl_6) equivalente a 0,500 g de platino metálico y un gramo de cloruro cobaltoso cristalizado ($CoCl_2.6H_2O$) equivalente a 0,25 g de cobalto metálico, en agua destilada con 100 ml de HCl concentrado y se diluyeron a un litro con agua destilada.

Procedimiento. Se prepararon patrones de platino de concentración creciente en tubos de Nessler y se compararon con el color de las muestras filtradas por filtros de 0,45 µm de poro, hasta encontrar el color coincidente o deducible por interpolación entre dos patrones consecutivos.

Absorción en el UV-visible

Principio. En razón de la absorción en el UV-visible de las sustancias húmicas, se aprovecha esta propiedad tanto para seguir las variaciones de la concentración a lo largo del tiempo en un cuerpo de agua, como para seguir las corridas cromatográficas e identificar los picos de elución. En el capítulo IV, parte I, se demostró su utilidad con fines de caracterización de las sustancias húmicas y su relación con la demanda química de oxígeno.

Procedimiento. La muestra se filtró a través de filtros de 0,45 µm de poro y 47 mm de diámetro, mediante un equipo de filtración marca Sartorius. A continuación se colocó la muestra en celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz y se leyó contra agua destilada en un espectrofotómetro Jasco 7850 de doble haz.

Material particulado en suspensión (Strickland y Parsons, 1960)

Principio. Se considera material particulado en suspensión, también denominado seston, al material retenido por filtros de 0,45 µm de poro. Se determina en base a la diferencia de peso del filtro después y antes de filtrada la muestra.

Procedimiento. Se filtró un volumen adecuado de muestra a través de un filtro de fibra de vidrio Whatman GF/F de 47 mm de diámetro, previamente pesado, en un equipo de filtración marca Sartorius. Se retiró el filtro del equipo colocándose en estufa a 45-50 °C hasta peso constante. En base al volumen filtrado y al peso obtenido se calculó el material particulado en suspensión expresándose en miligramos por litro.

Carbono orgánico particulado (Strickland y Parsons, 1960)

Principio. El filtro proveniente de la determinación de seston es tratado con una solución de dicromato de potasio en medio ácido. A resultas de la reacción se produce la disminución de color de la sal de cromo, la cual se compara con la disminución de color producida por reacción del dicromato con patrones de glucosa de concentración conocida. El resultado se expresa en miligramos de carbono por litro.

Reactivos. A. Solución de dicromato de potasio: se disolvieron 4,84 g de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), previamente secado en estufa, en 20 ml de agua destilada. Cuidadosamente se agregó H_2SO_4 hasta completar un litro.

B. Patrón de glucosa: se disolvieron 7,50 g de glucosa y se diluyeron a 100 ml con agua destilada. En el momento del análisis se tomaron 10,0 ml de esta solución y se diluyeron a

un litro con agua destilada. Dicha solución contenía una concentración de 300 µg de carbono/ml.

Procedimiento. Se colocó el filtro proveniente de la determinación de seston en un tubo de Nessler de 50 ml y se agregó 10,0 ml de A. Paralelamente se midieron otros 10,0 ml de A y se colocaron en un tubo sin muestra que fue utilizado como blanco. Se llevaron la muestra y el blanco a estufa durante 30 minutos a 100-110 °C. Cumplido ese tiempo, se sacaron de la estufa, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se completaron a volumen con agua destilada. Se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro a 440 nm, calibrando el equipo en el 0 de transmitancia con el blanco y leyendo la muestra con respecto a éste. Se convirtió la lectura a absorbancia obteniéndose de este modo la absorbancia medida (Am). La misma debió ser corregida (Ac) por la presencia de cromo trivalente de acuerdo a la siguiente expresión: Ac = 1,1 x Am

Con respecto al patrón, se tomaron 4 ml de la dilución (1200 µg de carbono) y se agregaron 10,0 ml de solución oxidante. El blanco se preparó tomando 4 ml de agua destilada y 10,0 ml de A. Luego el tratamiento se continuó de la misma manera que para la muestra. A partir del dato de absorción corregida para el patrón (Ap), se calculó el factor F de la siguiente manera: F = 1200 / Ap.

Cálculo:

$$\text{mg C/l} = \frac{Ac \times F}{V}$$

Siendo V = volumen de la muestra filtrado expresada en mililitros.

Clorofila *a* y feofitina (Golterman, 1971)

Principio. La clorofila es el pigmento fotosintéticamente activo presente en la biomasa algal. Existen varios pigmentos clorofílicos pero el más importante desde el punto de vista cuantitativo es la clorofila *a*. La feofitina es el pigmento degradado de la clorofila. La determinación se basa en la extracción mediante acetona de ambos pigmentos presentes en las algas, cuyo extracto se lee en el espectrofotómetro. La feofitina absorbe a la misma longitud de onda que la clorofila *a*, de manera que para poder diferenciarla se recurre a realizar una nueva lectura en medio ácido, donde la clorofila *a* originalmente presente, se transforma en feofitina por remoción del magnesio presente en la molécula. Finalmente utilizando ambas lecturas y por tratamiento matemático, se obtienen los valores de las concentraciones respectivas.

Reactivos. A. Acetona 90%

B. Solución de ácido clorhídrico 4 N.

Procedimiento. Se filtraron volúmenes adecuados de muestra a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F de 47 mm de diámetro en un equipo de filtración Sartorius. Se llevó el filtro a un mortero y se molió con un pequeño volumen de A. La suspensión obtenida se colocó en un tubo de centrífuga y se centrifugó alrededor de 15 minutos a 1000 rpm, con la finalidad de separar las partículas o restos de filtro. El sobrenadante se llevó a un matraz de 10,0 ml y se completó a volumen con A. El extracto obtenido se colocó en la cubeta y se leyó en el espectrofotómetro a 663 nm (absorción debida a los pigmentos) y a 750 nm (absorción debida a la turbidez). Se regresó el contenido de la cubeta al matraz, se

agregó 0,1 ml de B, se mezcló y se colocó nuevamente el extracto en la cubeta, repitiéndose las lecturas a 663 nm y a 750 nm.

Cálculo:

En primer lugar las lecturas de absorción (A) se corrigieron a causa de la presencia de turbidez y se redujeron a 1 cm de paso de luz como sigue:

$$A_{663} = \frac{A - A_{750}}{\text{paso de luz}} \qquad A_{663}(a) = \frac{A(a) - A_{750}(a)}{\text{paso de luz}}$$

Los pasos para el cálculo final se realizaron de la siguiente manera:

$$\text{Aclorofila} = 2{,}43\ (A_{663} - A_{663}(a))$$

$$\text{Afeofitina} = A_{663} - \text{Aclorofila}$$

$$\mu g/l \text{ clorofila} = \frac{\text{Aclorofila} \times 1000 \times v\ (ml)}{89 \times V\ (\text{litros})}$$

$$\mu g/l \text{ feofitina} = \frac{\text{Afeofitina} \times 1000 \times v\ (ml)}{56 \times V\ (\text{litros})}$$

Donde v es el volumen del extracto, V el volumen de la muestra filtrada, 89 y 56 son los valores de los coeficientes de extinción de la clorofila *a* y feofitina respectivamente.

Producción primaria del fitoplancton

Principio. La medición se realizó por el método del oxígeno disuelto (Strickland y Parsons, 1960; Vollenweider, 1971; Golterman, 1975) empleado en producción primaria in situ y en laboratorio. In situ, se determina la producción primaria midiendo la producción de oxígeno en un intervalo de tiempo determinado, en botellas conteniendo las muestras suspendidas a distintas profundidades en la zona eufótica.

En laboratorio (incubaciones artificiales) se realizan mediciones para evaluar la producción en función de la intensidad de luz. De la curva luz-fotosíntesis, se obtiene la producción máxima (la producción a saturación de luz) y la eficiencia fotosintética α, que es la pendiente al origen en la zona de limitación de la luz dividida por la concentración de clorofila *a*.

Producción primaria in situ

Procedimiento. Teniendo en cuenta que la producción primaria bruta es la suma de la producción de materia orgánica más las pérdidas debidas a la respiración, en este método se incubó la muestra en botellas denominadas claras (en donde recibe luz) y otras llamadas oscuras (que se cubren con hojas de aluminio para impedir que la muestra reciba luz). En las botellas claras tuvo lugar el fenómeno de fotosíntesis, mientras que en las oscuras el fenómeno de respiración. La producción primaria in situ se determinó suspendiendo botellas claras y oscuras mediante un sistema de boyas a 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,7 y 1 metro de profundidad entre las 10 y las 14 horas. Una vez terminada la incubación, se procedió a realizar los análisis de oxígeno disuelto en todas las botellas. Por otra parte, a lo largo del día se determinó la

intensidad de la radiación solar mediante un fotómetro Li-Cor (Lambda Instruments).

Cálculos:

Para cada profundidad se determinó la producción primaria como sigue:

$$mg\ C/m^3 = \frac{(Ocl - Oo) \times 0,375 \times 1000}{1,2}$$

Donde Ocl es la concentración de oxígeno de la botella clara y Oo la concentración de oxígeno de la botella oscura, 0,375 el factor para pasar de miligramos de oxígeno a miligramos de carbono y 1,2 el coeficiente fotosintético que contempla que no todo el dióxido de carbono interviene exclusivamente en la síntesis de hidratos de carbono. Con los datos de cada profundidad se procedió a la integración de la columna de agua que permitió obtener el dato de mg C/m^2 en el intervalo de tiempo mencionado. Para obtener la producción diaria, el dato de producción integrado se dividió por la integral intensidad de la radiación-tiempo (lograda por medio del fotómetro) correspondiente al intervalo de tiempo entre las 10 y las 14 horas. El cociente permitió obtener un factor que multiplicado por la integral intensidad de la radiación-tiempo determinada entre el amanecer y la hora 10 y haciendo lo mismo entre las 14 horas y el anochecer, dio dos valores pertenecientes a las producciones primarias en los intervalos en que no fueron determinadas experimentalmente. En consecuencia de la suma de los tres valores, se obtuvo como resultado la producción primaria diaria (mg $C/m^2.d$).

Asimismo, se evaluó la producción primaria óptima (Pópt), definida como la máxima producción en la columna de agua, que en este caso correspondió siempre a la medida en el nivel de

0,1 metro. Dicha producción se calculó de manera similar a la producción de la columna, es decir considerando la curva intensidad de la radiación-tiempo y encontrando un factor para evaluar la producción en los intervalos no determinados experimentalmente. Finalmente el valor obtenido se dividió por el tiempo de duración del fotoperíodo (amanecer-anochecer) y el dato quedó expresado en miligramos de carbono por metro cúbico y por hora (mg $C/m^3.h$).

Producción primaria por incubación artificial

Procedimiento. La muestra representativa de la zona eufótica fue obtenida en el centro de la Laguna de Chascomús mediante un muestreador de 0,5 m de longitud colocado en posición vertical. Fue fraccionada en ocho botellas claras y una oscura. Las claras se sumergieron, colocadas en diagonal a distintas distancias, en un incubador (pecera rectangular) a la misma temperatura de la laguna. La botella oscura también fue sumergida en el mismo . El gradiente de luz se obtuvo colocando una lámpara de 500 watts en el vértice y la intensidad de luz que recibía cada botella clara fue medida mediante el fotómetro Li-Cor (Lambda Instruments). El intervalo de tiempo de incubación fue de 4 horas, al término del cual, se procedió a realizar el análisis de oxígeno disuelto.

Cálculo:

Para cada botella clara se aplicó la siguiente ecuación:

$$mg\ C/m^3.h = \frac{(Ocl-Oo) \times 0,375 \times 1000}{1,2 \times 4}$$

Siendo Oo el mismo dato para todos los cálculos de esta experiencia. Con los datos calculados se graficó la curva de producción primaria (mg $C/m^3.h$) en función de la intensidad de luz ($\mu Einst.m^{-2}.s^{-1}$) que permitió obtener la producción máxima (Pmáx) y la eficiencia fotosintética que es la pendiente inicial normalizada por unidad de clorofila *a* en la zona de limitación de la luz (α).

Biodegradabilidad

Se diseñó un experimento con el fin de determinar la biodegradabilidad de las sustancias húmicas en estudio. En tal sentido se partió de una muestra de agua proveniente del Arroyo Valdez y se agregó a la muestra procedente del centro de la Laguna de Chascomús, de manera de estudiar si la flora microbiana de la laguna era capaz de degradar las sustancias húmicas. Los detalles experimentales son los siguientes:

En un erlenmeyer de 500 ml previamente esterilizado se colocaron 200 ml de agua filtrada por filtros 0,2 µm de poro proveniente del Arroyo Valdez. En estas condiciones con la muestra libre de bacterias, se procedió a agregar 100 ml de agua de la Laguna de Chascomús filtrada por filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C, cuyo tamaño de poro retiene el material particulado y algal, pero permite el paso de bacterias. El erlenmeyer, provisto de un tapón de algodón, se sumergió en un baño de agua a 20 °C. Con la finalidad de estudiar si las sustancias húmicas podrían degradarse via cometabolismo, se procedió de la misma manera que la mencionada, agregando además en tres erlenmeyers 4, 20 y 40 mg de carbono en la forma de lactato de sodio. En otros seis erlenmeyers se procedió de la misma manera pero con glucosa y citrato de sodio respectivamente.

Las incubaciones se prolongaron a lo largo de un mes. De cada erlenmeyer se tomó una alícuota de 5 ml cada 24 horas.

Dichas alícuotas fueron filtradas por filtros de 0,2 µm de poro y leídas en el espectrofotómetro a 365 nm.

Influencia del pH y fuerza iónica sobre el tamaño molecular

Las experiencias acerca de la influencia del pH y la fuerza iónica sobre el tamaño molecular de las sustancias húmicas, se realizaron mediante la técnica de cromatografía en gel empleando gel de Sephadex G-50 (Pharmacia Fine Chemicals). Aproximadamente 15 g del gel, fueron hidratados en cada uno de los buffers usados en la experiencia y con éstos se llenó una columna de vidrio de 73 x 2 cm. El volumen de exclusión (Vo) se determinó mediante una solución de Blue Dextran (Pharmacia Fine Chemicals) disuelta en los diferentes buffers. El volumen de muestra utilizado para la siembra fue de 3 ml, se colectaron fracciones de 3 ml mediante un colector automático y fueron leídas a 250 nm.

Los buffers utilizados fueron los siguientes:

- Buffer Tris pH 9,0:

Se mezclaron 250 ml de una solución de Tris 0,2 M (24,2 g de Tris diluidos en 1000 ml de agua destilada) y 25 ml de HCl 0,2 M. La concentración final de Tris es de 0,05 M.

- Buffer ácido acético-acetato de sodio pH 3,6:

Se mezclaron 463 ml de una solución de ácido acético 0,2 M (11,55 ml de ácido acético concentrado diluidos a 1000 ml con agua destilada) y 37 ml de una solución de acetato de sodio 0,2 M (27,2 g de $C_2H_3O_2Na.3H_2O$ diluidos a 1000 ml con agua destilada).

-Buffer fosfato pH 7,0:

Se mezclaron 195 ml de una solución de fosfato diácido de sodio 0,2 M (31,2 g de $NaH_2PO_4.2H_2O$ diluidos a 1000 ml con

agua destilada) y 305 ml de una solución de fosfato monoácido de sodio 0,2 M (71,7 g de $Na_2HPO_4.12H_2O$ diluidos a 1000 ml con agua destilada) y se diluyeron a 1000 ml con agua destilada).

Influencia de la composición iónica en la coagulación de sustancias húmicas

Las técnicas que se aplicaron para estos estudios se detallan a continuación.

- *Cromatografía en gel de la muestra del Río Samborombón.*

La muestra proveniente de la estación 1, fue filtrada por filtros de 0,2 µm de poro (Sartorius), pasada por resina Amberlite IR-120 en la forma ácida y concentrada en rotavapor 10 veces. Se practicó la cromatografía sembrando 3 ml de muestra en una columna de vidrio (73 x 2 cm) conteniendo gel de Sephadex G-50 (Pharmacia Fine Chemicals) y eluida con buffer fosfato pH 7,0 preparado de la forma anteriormente descripta. Las fracciones colectadas (3 ml) fueron leídas a 250 nm.

- *Experiencias de coagulación.*

Se llevaron a cabo las experiencias con F-I y F-II, fracciones obtenidas libres de sales de acuerdo a la marcha descripta en la parte II del capítulo IV. En vasos de precipitado de 100 ml se colocaron 50 ml de cada una de las mismas y se les agregó, separadamente, cantidades crecientes de NaCl, KCl, $CaCl_2$ y $MgCl_2$, hasta obtener en cada uno de los vasos concentraciones finales de 0,5 10^{-4} M, 10^{-4} M, 0,5 10^{-3} M, 10^{-3} M, 0,5 10^{-2} M, 10^{-2} M, 0,5 10^{-1} M, 10^{-1} M. Las muestras en estas condiciones fueron mantenidas durante 72 horas a 22 °C, luego de lo cual se filtraron por filtros de 0,2 µm de poro. Se determinó la coagulación como

porcentaje entre la diferencia de la absorbancia a 365 nm de la muestra sin agregado de sales respecto de la misma muestra después de la incubación en presencia de dichas sales.

Interacción entre sustancias húmicas e hidratos de carbono

Las experiencias se efectuaron con muestra de la Laguna del Burro, previamente filtrada por filtro de 0,45 µm de poro (Millipore) y consistieron en estudiar la interacción entre las sustancias húmicas presentes en la muestra y la glucosa marcada con ^{14}C. Se realizaron mediante cromatografía en gel de Sephadex G-15 (Pharmacia Fine Chemicals) en una columna 1,6 x 24 cm, utilizando como eluyente buffer Tris 0,05 M al cual se le agregó azida sódica, hasta una concentración final de 0,02%, con el objeto de evitar la proliferación de organismos que pudieran consumir glucosa y alterar los resultados del experimento. Se ajustó el buffer a la misma fuerza iónica y pH que la muestra, para ello se agregó NaCl y HCl hasta lograr 1.200 µmho/cm de conductividad específica y pH igual a 9,2.

En lo que respecta a la glucosa marcada, se partió de una solución de actividad igual a 5 µCi/ml (ICN Radiochemicals) denominada G*.

La cromatografía en gel se realizó sembrando 1 ml de las soluciones en estudio y recogiendo fracciones de 1,0 ml en viales de centelleo, a los que se agregó 10 ml de solución centelleadora (solución de Bray). La actividad resultante se determinó en un espectrómetro de centelleo líquido Packard 1500. Se repitió la cromatografía en gel, de la misma manera, cada 24 horas durante 4 días consecutivos. Las soluciones utilizadas fueron las siguientes:

Testigo: 9,8 ml de buffer + 0,2 ml G* 1

Muestra: 9,0 ml de muestra + 0,8 ml de buffer + 0,2 ml G* 2

Las experiencias expuestas fueron repetidas empleando las soluciones testigo 1 y muestra 2 pero con buffer y muestra a pH 7,5.

Paralelamente se estudió el desplazamiento provocado por glucosa no marcada. Con tal motivo se agregó 0,8 ml de una solución de ésta, de manera que la concentración final fuera de 20 mg/l, que equivale por lo menos a dos órdenes de magnitud superior a la glucosa total (natural más marcada) presente en la solución original. Esta solución de glucosa no marcada se agregó luego de transcurrido un día de iniciada la experiencia y se continuó realizando la cromatografía en gel al segundo, tercero y cuarto día. El mismo procedimiento se llevó a cabo con soluciones de galactosa, sacarosa y almidón, en todos los casos llevando la solución final a 20 mg/l. Las soluciones quedaron preparadas como sigue:

9,0 ml de muestra + 0,8 ml de solución del hidrato de carbono respectivo (glucosa, galactosa, sacarosa, almidón) + 0,2 ml G*.

Interacción entre sustancias húmicas y metales pesados

Se analizó la interacción entre sustancias húmicas y metales pesados empleando como muestra, la extraída de la Laguna del Burro previamente filtrada por filtros de 0,45 µm de poro (Millipore) y entre los metales pesados, el cadmio y el cromo. Las separaciones entre metal libre y complejo sustancias húmicas-metal se realizaron mediante cromatografía en gel de Sephadex G-15 (Pharmacia Fine Chemicals) utilizando como eluyente el mismo buffer que el mencionado para las interacciones con hidratos de carbono. En primer término, se hicieron las corridas cromatográficas con el metal libre. Para ello se prepararon soluciones de 10 mg/l de Cd^{2+} y Cr^{3+}

en el buffer Tris. Se sembraron 2 ml de cada una de éstas separadamente en la columna y se recogieron fracciones de 2 ml. En estas fracciones, el cadmio fue analizado por absorción atómica en un equipo Shimadzu AA6501 y el cromo por medición de la actividad del ^{51}Cr, en un detector 3x3" NaI(Tl) acoplado a un analizador multicanal Canberra 35+. Seguidamente, se prepararon soluciones de la misma concentración pero utilizando muestra en lugar de buffer, produciéndose la formación del complejo sustancias húmicas-metal. Se sembraron nuevamente 2 ml en la columna y se determinaron los metales en las fracciones recogidas de acuerdo a los métodos mencionados.

Por otra parte, la muestra sustancias húmicas-cadmio colocada en celda de cuarzo fue irradiada con luz UV proveniente de una lámpara de mercurio de presión reducida durante tres horas. Posteriormente la muestra se sembró en la columna y se continuó el procedimiento como en los casos anteriores.

Composición centesimal

El análisis de composición centesimal (carbono, hidrógeno, nitrógeno y cenizas) fue determinado en la muestra de ácido fúlvico aislada y purificada (método descripto en la parte III del capítulo IV) de la Laguna del Burro. Se realizó en el Laboratorio de Unidad de Microanálisis y Métodos Físicos en Química Orgánica (UMYMFOR), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA). El oxígeno fue estimado por diferencia.

Contenido en hidratos de carbono

Se analizó el contenido de hidratos de carbono empleando el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico según la

técnica de Dubois y col. (1956). El método consistió en agregar a 0,5 ml de una solución de la muestra del ácido fúlvico de la Laguna del Burro (4 mg/100 ml), 0,5 ml de fenol 5% (p/v). Luego de agitar, se agregaron 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado y se dejó reposar durante 10 minutos. Se agitó nuevamente y dejándose 20 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 490 nm. La curva de patrones se realizó simultáneamente y fue tratada de la misma manera que la muestra, utilizando blancos de agua destilada y soluciones de glucosa preparadas a partir de un patrón de 1 mg/ml.

Contenido de grupos carboxilos e hidroxilos fenólicos

En una primera etapa se realizó la titulación en medio acuoso, que permite computar la suma de equivalentes de carboxilos e hidroxilos fenólicos debido a que en este medio no se diferencian. Para la titulación se tomaron 5,4 mg de ácido fúlvico de la Laguna del Burro, se disolvieron en agua destilada y con una micropipeta se fueron agregando volúmenes sucesivos de 20 µl de NaOH 0,1 N (f = 0,923). Después de cada agregado, se registró el pH mediante un pHmetro Orion (701 A) y de la curva obtenida se determinó el punto de inflexión, a partir del cual se calculó la acidez total.

Con el fin de determinar los equivalentes debidos a los carboxilos y separadamente los equivalentes de los hidroxilos fenólicos, se procedió a realizar titulaciones en medio no acuoso de acuerdo al procedimiento descripto por Ephraim (1989). El dispositivo utilizado, consistió en un electrodo de vidrio (indicador) y un electrodo de calomel (referencia) con cloruro de tetraetilamonio 1 M, como solución de llenado interna, colocados en un recipiente de vidrio con la solución de la muestra disuelta en dimetilformamida. Este dispositivo estuvo diseñado de manera de permitir la ejecución de la

titulación en atmósfera de nitrógeno. La base utilizada fue el hidróxido de tetrabutilamonio en 2-propanol (0,05 M), valorada contra ácido benzoico y las variaciones de pH se registraron con el pHmetro mencionado. Al mismo tiempo, de manera de probar el dispositivo, se realizaron titulaciones de ácido p-hidroxibenzoico, ácido salicílico y ácido ftálico. La titulación de la muestra se efectuó con 27,95 mg de ácido fúlvico de la Laguna del Burro.

Estudios espectroscópicos

Espectro UV-visible

El espectro UV-visible fue obtenido con una solución del ácido fúlvico de la Laguna del Burro de 1 mg/ml medido en un espectrofotómetro Jasco 7850 de doble haz.

Espectro IR

El espectro IR se realizó con la muestra de ácido fúlvico de la Laguna del Burro sobre bromuro de potasio. Paralelamente la muestra, cuya solución acuosa tiene un pH de 2,65, se llevó a pH 11 con NaOH 0,1 N, se secó a vacío y se determinó nuevamente el espectro IR en bromuro de potasio. En ambos casos los espectros fueron medidos empleando un equipo FT-IR Nicolet 510 P.

Espectro RMN-^{13}C

El espectro RMN-^{13}C se determinó sobre 100 mg de ácido fúlvico de la Laguna del Burro disueltos en 0,4 ml de una solución 1:1 de NaOH 1 N y D_2O en un espectrómetro Bruker AC-200.

Degradación oxidativa en medio alcalino

Se realizó la degradación sobre la muestra de ácido fúlvico de la Laguna del Burro con permanganato de potasio en medio alcalino. La marcha empleada se diagramó teniendo en cuenta los trabajos de Matsuda y Schnitzer (1972), Ogner (1973), y Liao y col. (1982).

Reactivos. A. solución de permanganato de potasio 5%: se disolvieron 2,5 g de permanganato de potasio ($KMnO_4$) y se llevaron a 50 ml con agua destilada.

B. Solución de bisulfito de sodio 5%: se disolvieron 2,5 g de bisulfito de sodio ($NaHSO_3$) y se llevaron a 50 ml con agua destilada.

C. Solución de hidróxido de sodio 2 N: se disolvieron 8 g de NaOH y se llevaron a 100 ml con agua destilada.

D. Solución de ácido clorhídrico 1 + 1.

Procedimiento. En un balón de 25 ml se colocaron 10 mg de ácido fúlvico de la Laguna del Burro, 2 ml de A, 1 ml de C y 15 ml de agua destilada. Se calentó a reflujo durante 24 horas, luego se dejó enfriar el balón a temperatura ambiente y después de eliminado el exceso de $KMnO_4$ con B, se agregó C hasta pH 2. A continuación se llevó la muestra a una ampolla de decantación y se procedió a la extracción con 10 ml de acetato de etilo, repitiéndose la operación 4 veces más. El agua arrastrada fue eliminada con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) y finalmente el extracto fue llevado a sequedad en rotavapor. La muestra así obtenida se analizó por gas cromatografía-espectrometría de masa en el LANAIS-EMAR de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA), utilizando una columna SPB-1. Se identificó ftalato evidenciado por la presencia del pico M^+ 166 y M^+-H_2O 148 (P.B.).

Microscopía electrónica

El estudio de microscopía electrónica se efectuó sobre la muestra de ácido fúlvico de la Laguna del Burro. Se partió de la solución acuosa de la muestra (1 mg/ml) con pH 2,65 y paralelamente, de la muestra en solución acuosa llevada a pH 11. Se tomó una gota de cada solución y se colocaron en portaobjetos. Ambas gotas fueron liofilizadas y llevadas al servicio de microscopía electrónica del Museo de Ciencias Naturales de La Plata, donde se metalizaron con oro para ser examinadas y fotografiadas. Las imágenes obtenidas se exponen en la parte II del capítulo IV.

RESUMEN

Este trabajo tuvo por objeto iniciar estudios de las sustancias húmicas de ambientes acuáticos, ubicados en la cuenca del Río Salado de la Provincia de Buenos Aires. Si bien no se sabe acabadamente el rol ecológico que cumplen estas sustancias, es conocida su incidencia en los ciclos biogeoquímicos de la materia, influenciando consecuentemente el metabolismo y evolución de los cuerpos de agua.

En él se presentan:

a) una descripción del ciclo de la materia orgánica y una clasificación de la materia orgánica existente en suelos.

b) la definición de las fracciones integrantes de las sustancias húmicas.

c) un resumen de las hipótesis sobre el origen de las sustancias húmicas.

d) una reseña de las estructuras hipotéticas propuestas para las sustancias húmicas.

e) una descripción del ciclo de la materia orgánica en las aguas naturales y un análisis acerca de la presencia de sustancias húmicas de origen alóctono y autóctono en estos ambientes.

f) la importancia del fraccionamiento de las sustancias húmicas acuáticas en estudios limnológicos y la técnica y condiciones utilizadas para tal fin.

g) una breve explicación de las propiedades de las sustancias húmicas y los fenómenos asociados a éstas en el medio acuático.

h) la influencia de las sustancias húmicas en procesos de tratamiento de aguas para consumo humano.

i) una descripción detallada y discusión de los resultados obtenidos.

I. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LAS SUSTANCIAS HUMICAS EN SU AMBIENTE NATURAL

En esta parte se llevaron a cabo relevamientos de las sustancias húmicas de la Laguna de Chascomús y se las relacionó con variables climáticas, hidrológicas y de composición química del agua, a través de dos períodos. En el primero se produjeron intensas precipitaciones que provocaron el aumento de la profundidad de la laguna, la disminución de la salinidad y la entrada de materia orgánica soluble, en particular de sustancias húmicas provenientes de la cuenca de drenaje. Dicho aporte se midió a través de la demanda química de oxígeno y de la absorción a 250 nm y a 365 nm, longitudes de onda comunmente utilizadas para el cómputo de las sustancias húmicas. La relación entre ambas absorciones se vincula con el tamaño molecular. Este hecho indicó que las sustancias húmicas que ingresaron a la laguna eran de elevado peso molecular. Paralelamente se apreció el aumento de la actividad y eficiencia de la producción primaria fitoplanctónica, que implicaría la posibilidad de que las sustancias húmicas actúen como estimulantes del proceso fotosintético.

El segundo período estudiado se caracterizó por ser seco, causando la disminución de la profundidad de la laguna, el incremento de la salinidad y la formación de carbonato de calcio. Este último produjo la adsorción y coprecipitación de las sustancias húmicas de mayor peso molecular, lo cual ha sido comprobado mediante cromatografía en geles. Se evidenció

de este modo, la influencia de los factores climáticos e hidrológicos sobre las sustancias húmicas, no sólo en el aspecto cuantitativo sino también en el cualitativo.

Otro relevamiento se realizó a lo largo del Río Samborombón. En este caso, se observó la disminución de la concentración de sustancias húmicas por influencia de la salinidad a medida que las aguas se aproximan a la Bahía de Samborombón, puesto que la misma posee características de ambiente marino.

Se verificó la utilidad de las mediciones de absorción en el visible y UV, y de la relación entre ambas (antes y después de llevar las muestras a pH 1) para la determinación del porcentaje de ácidos húmicos y ácidos fúlvicos en la Laguna de Chascomús (ambiente léntico), sus arroyos tributarios y el Río Samborombón (ambientes lóticos). Al mismo tiempo se relacionaron los datos de demanda química de oxígeno con los datos de absorción, permitiendo la caracterización y diferenciación de los ambientes en base a las correlaciones obtenidas y según el caso evitar la determinación química de la demanda química de oxígeno en mediciones de rutina, reemplazándolas por las de absorción.

II. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE LAS SUSTANCIAS HUMICAS

Se realizaron experimentos de laboratorio con la finalidad de estudiar algunas de las propiedades. En principio se efectuaron ensayos de biodegradabilidad mediante incubaciones en presencia de la flora microbiana normalmente existente en la Laguna de Chascomús. Se confirmó la no biodegradabilidad aún con agregado de sustancias como lactato, glucosa y citrato, que pueden inducir a la biodegradación a través de procesos de cometabolismo, tal como fuera registrado en otros ambientes.

Mediante cromatografía en geles, se pudo apreciar el incremento del tamaño molecular con el aumento del pH. Por el contrario, con el aumento de la fuerza iónica se comprobó la disminución del tamaño molecular.

Se diseñaron experimentos dirigidos al estudio de la influencia de la composición iónica sobre la coagulación de las sustancias húmicas del Río Samborombón. En primera instancia consistieron en separar ácidos húmicos de ácidos fúlvicos para obtenerlos libres de sales, luego se procedió a agregarles separadamente, concentraciones crecientes de calcio, magnesio, sodio y potasio. Se advirtió que los ácidos húmicos fueron más susceptibles de coagular y que los cationes divalentes producían mayor coagulación que los monovalentes, corroborando los resultados obtenidos a través de los relevamientos.

Se estudió la interacción de sustancias húmicas con hidratos de carbono mediante cromatografía en geles. Se determinó la existencia de interacción y que la misma se produce a través de puentes de hidrógeno, dipolo-dipolo y fuerzas de van der Waals, pues dicha interacción es lo suficientemente débil como para permitir la disponibilidad de los hidratos de carbono para la microflora. La naturaleza polar de la interacción se comprobó con la disminución del pH, debido a que la misma es mayor cuando los grupos carboxilos e hidroxilos fenólicos se encuentran completamente disociados.

Se analizó la formación de complejos con cadmio y cromo empleando cromatografía en geles. Se determinó dicha formación, evidenciando la importancia a nivel ecotoxicológico, debido a que la existencia de estos complejos provoca la disminución de la toxicidad de ambos metales en el medio acuático.

III. ESTUDIOS ESTRUCTURALES DEL ACIDO FULVICO AISLADO DE LA LAGUNA DEL BURRO

En primer lugar se perfeccionó el método de aislamiento y purificación de sustancias húmicas que incluyó los siguientes procedimientos: la adsorción de las mismas sobre resinas Amberlite XAD-2 en medio ácido, desorción en medio básico, ajuste a pH 7, eliminación de sales por cromatografía en geles y liofilización. Seguidamente mediante este método, se aisló y purificó el ácido fúlvico presente en la Laguna del Burro. En dicho ácido se realizaron determinaciones consistentes en: composición centesimal, contenido de hidratos de carbono, contenido en grupos carboxilos e hidroxilos fenólicos, espectroscopía UV-visible, IR, RMN-^{13}C y degradaciones en medio oxidante alcalino. El análisis de los resultados, permitió hallar las unidades estructurales fundamentales integrantes de la molécula a saber: núcleo aromático o-disustituido, ácidos carboxílicos, ésteres y el nitrógeno que estaría presente en forma de amina terciaria.

Por microscopía electrónica, de la muestra en solución acuosa del ácido fúlvico cuyo pH es de 2,65 y de la muestra en solución acuosa llevada a pH 11, se observó el cambio de la estructura espacial provocado por la variación de pH, confirmando los resultados obtenidos por cromatografía en geles.

j) una descripción de las técnicas experimentales empleadas.

Parte de este trabajo dio lugar a las siguientes publicaciones:

- "Soluble humic substances from the affluents of Chascomús Pond (Argentina)", Victor H. Conzonno and Alicia Fernández Cirelli, *Archiv für Hydrobiologie* **109**, 305-314 (1987)

- "Soluble humic substances from Chascomús Pond (Argentina). Factors influencing distribution and dynamics", Victor H. Conzonno and Alicia Fernández Cirelli, *Archiv für Hydrobiologie* **111**, 467-473 (1988).

- "Aplicabilidad de las determinaciones de absorción en el UV-visible para la caracterización de las sustancias húmicas en ambientes acuáticos", Victor H. Conzonno y Alicia Fernández Cirelli, *Ecosur* **14/15**, 1-6 (1987/8).

- "Aggregation of soluble humic substances from Río Samborombón (Provincia de Buenos Aires, Argentina)", Victor H. Conzonno and Alicia Fernández Cirelli, *Revista Brasileira de Biologia* **51**, 487-493 (1991).

- "Influencia del carbonato de calcio sobre la materia orgánica soluble en la Laguna de Chascomús", Victor H. Conzonno y Alicia Fernández Cirelli, *Biología Acuática* **15**, 68-69 (1991).

- "Cadmiun and chromiun interactions with aquatic humic substances from Argentine ponds", Victor H. Conzonno, Cecilia Di Risio, Mabel Tudino, Rosa Erra Ballsells and Alicia Fernández Cirelli, *Fresenius Environmental Bulletin* **3**, 1-5 (1994).

- "Dissolved organic matter in Chascomús Pond (Argentina). Influence of calcium carbonate on humic acid concentration", Victor H. Conzonno and Alicia Fernández Cirelli, *Hydrobiologia* 297, 55-59 (1995).

BIBLIOGRAFIA

Aho, J. y Lehto, O., *Arch. Hydrobiol.* **101**, 21 (1984).

Aiken, G. R., McKinght, D. M., Wershaw, R. L. y MacCarthy, P., *Humic substances in soil, sediment and water. Geochemistry, isolation and characterization*. John Wiley & Sons, Inc. New York, 528 pág. (1985).

Alberts, J. J. y Filip, Z., *Sci. Total Environ.* **81-82**, 353 (1989).

Albright, L. J. y Wintworth, J. W., *Environ. Pollut.* **8**, 59 (1973).

Allen, H. E., Hall, R. H. y Brisbin, T. D., *Environ. Sci. Technol.* **14**, 441 (1980).

Amy, G. L., Collins, M. R., Kuo, C. J., Chowdhury, Z. K. y Bales, R. C., en *Aquatic Humic Substances. Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. Suffet, I. H. y MacCarthy, P. (eds.), American Chemical Society. Washington DC, pág. 443 (1989).

Anderson, H. A., Bick, W., Hepburn, A. y Stewart, M., en *Humic Substances II. In Search of Structure*. Hayes, M. H. B., MacCarthy, P., Malcolm, R. L. y Swift, R. S. (eds.), John Wiley & Sons. New York, pág. 223 (1989).

APHA, *Métodos Estándar para el exámen de Aguas y Aguas de Deshecho*. Editorial Interamericana S. A. México, 609 pág. (1962).

APHA, (1985). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastes*. American Public Health Association. Washington DC, 1268 pág. (1985).

Belin, C., Quellec, C., Lamotte, M., Ewald, M. y Simon, Ph., *Environ. Technol.* **14**, 1131 (1993).

Birge, B. A. y Juday, C., *Bull. U. S. Bur. Fish.* **42**, 185 (1926).

Birge, B. A. y Juday, C., *Ecol.Monogr.* **4**, 440 (1934).

Bloom, P. R. y Leenheer, J. A., en *Humic Substances II. In Search of Structure*. Hayes, M. H. B., MacCarthy, P., Malcolm, R. L. y Swift, R. S. (eds.). John Wiley & Sons.

New York, pág. 409 (1989).

Bresnaban, W. T., Grant, C. L., Weber, J. H., *Anal. Chem.* **50**, 1675 (1978).

Brezonik, P. L., Brauner, P. A. y Stumm, W., *Water Res.* **10**, 605 (1976).

Buffle, J. A. E., *T. S. M. -l'eau* **1**, 3 (1977).

Buffle, J., Greter F. y Haerdi, W., *Anal. Chem.*, **49**, 216 (1977).

Campbell, P. G. C., Bisson, M., Cagne, R. y Tessier, A., *Analyt. Chem.* **49**, 2358 (1977).

Caron, G. y Suffet, H. L. en *Aquatic Humic Substances. Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. Suffet, I. H. y MacCarthy, P. (eds.), American Chemical Society. Washington DC, pág 117 (1989).

Carter, C. W. y Suffet, I. H., *Environ. Sci. Technol.*, **16**, 735 (1982).

Carreto, J. I., *Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP)*. Mar del Plata, comunicación personal, (1987).

Chau, Y. K., *J. Chromat. Sci.* **11**, 579 (1973).

Chave, K. E., *Science* **148**, 1723 (1965).

Chen, Y. y Schnitzer, M., *Soil Sci. Soc. Am. J.* 40, 682 (1976).

Chen, Y. y Schnitzer, M., en *Humic Substances II. In Search of Structure*. Hayes, M. H. B., MacCarthy, P., Malcolm, R. L. y Swift, R. (eds.). John Wiley & Sons, New York, pág. 621 (1989).

Chen, Y., Senesi, N. y Schnitzer, M., *Soil Sci. Soc. Am. J.* **41**, 352 (1977).

Choudhry, G. G., *Humic substances*. Gordon and Breach Sci. Publ. New York, 185 pág. (1984).

Christman, R. F. y Gjessing, E., *Aquatic and Terrestrial Humic Materials*. Ann Arbor Science, 538 pág. (1982).

Christman, R. F., Norwood, D. L., Seo, Y. y Frimmel, F. H.,

en *Humic Substances II. In Search of Structure*. Hayes, M. H. B., MacCarthy, P., Malcolm, R. L. y Swift, R. S. (eds.), John Wiley & Sons. New York, pág. 33 (1989).

Conzonno, V. H. y Claverie E. F., *Ecosur* **25/26**, 7 (1987/8).

Conzonno, V. H. y Claverie E. F., *Rev. Brasil. Biol.* **50**, 15 (1990).

Cooper, W. J., Zica, R. G., Petasne, R. G. y Fischer, A. M., en *Aquatic Humic Substances. Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. Suffet, I. H. y MacCarthy, P. (eds.), American Chemical Society. Washington DC, pág. 332 (1989).

Crosser, M. L. y Allen, H. E., *Soil Sci.* **123**, 176 (1977).

Dangavs, N. V., *Limnobios* **1**, 35 (1976).

Davey, E. W., Morgan, M. J. y Erickson, S. J., *Limnol. Oceanogr.* **18**, 993 (1973).

Davis, A. P. y Bhatnagar, V., *Chemosphere* **30**, 243 (1995).

Davis, J. A. y Leckie, J. O., *Envir. Sci. Technol.* **12**, 1309 (1978).

De Haan, H. *Freshwat. Biol.* **2**, 235 (1972a).

De Haan, H., *Verh. int. Verein. theor. angew. Limnol.* **18**, 685 (1972b).

De Haan, H., *Freshwat. Biol.* **4**, 301 (1974).

De Haan, H., en *Humic Substances. Their structure and function in the biosphere*. Povoledo, D. y Golterman, H. L. (eds.), Pudoc. Wageningen, pág. 63 (1975).

De Haan, H., *Limnol. Oceanogr.* **22**, 38 (1977).

De Haan, H. y De Boer, T., *Water Res.* **12**, 1035 (1978).

De Haan, H. y De Boer, T., *Arch. Hydrobiol.* **85**, 30 (1979).

De Haan, H., T. De Boer, H. A. Kramer y J. Voerman J., *Wat. Res.* **16**, 1047 (1982).

De Haan, H. y De Boer, T., *Freshwat. Biol.* **16**, 661 (1986).

De Haan, H. y De Boer T., *Wat. Res.* **21**, 731 (1987).

De Haan, H., Jones, R. I. y Salonen, K., *Freswat. Biol.* **17**, 453 (1987).

Dempsey, B. A., en *Aquatic Humic Substances. Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. Suffet, I. H. y MacCarthy, P. (eds.), American Chemical Society. Washington DC, pág. 409 (1989).

Deng, Y. y Stumm, W., *Appl. Geochem.* **9**, 23 (1994).

Dormaar, J. F., *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* **38**, 685 (1974).

Dragunov, S. S. (1961). en *Etude des composes humiques de sediments estuariens recents*. Kalinowski, E. (Tesis Doctoral), Universite des Sciences et Techniques de Lille Flandres. Artois, Francia, pág. 12 (1987).

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith F., *Anal. Chem.* **28**, 350 (1956).

Eckert, J. M. y Sholkovitz, E. R., *Geochim. Cosmochim. Acta* **40**, 847 (1976).

Effler, S. W. y Driscoll, C. T., *Environ. Sci. Technol.* **19**, 716 (1985).

Elder, J. F., Osborn, K. E. Goldman, C. R., *Water Res.* **10**, 783 (1976).

EPA, *U. S. Environmental Protection Agency. Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes*. Cincinnati. Ohio, 298 pág. (1976).

Ephraim, J. H., *Talanta* **36**, 379 (1989).

Ephraim, J. H. y Marinsky, J. A., *Anal. Chim. Acta* **232**, 171 (1990).

Ertel, J. R., Hedges, J. I. y Perdue, E. M., *Science* **223**, 485 (1984).

Felbeck, G. T., *Adv. Agron.* **17**, 327 (1965).

Filella, M., Buffle, J. y Leeuwen, H. P. van, *Anal. Chim. Acta* **232**, 209 (1990).

Flaig, W. (1960). en *Etude des composes humiques de sediments estuariens recents*. Kalinowski, E. (Tesis Doctoral), Universite des Sciences et Techniques de Lille Flandres. Artois, Francia, pág. 11 (1987).

Flaig, W., en *Humic Substances. Their structure and functions*

in the biosphere. Povoledo, D. y Golterman, H. L. (eds.), Pudoc. Wageningen, pág. 19 (1975).

Florence, T. M., *Analyst* **111**, 489 (1986).

Florence, T. M., Powell, H. K. J., Stauber, J. L. y Town, R. M., *Water Res.* **26**, 1187 (1992).

Forsberg, C. y Ryding, S., *Arch. Hydrobiol.* **89**, 189 (1980).

Frenguelli, J., *Publ. L.E.M.I.T.* **2**, 1 (1950).

Fu, P. L. K. y Symons, J. M., en *Aquatic Humic Substances. Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. Suffet, I. H. y MacCarthy, P. (eds.), American Chemical Society. Washington DC, pág. 797 (1989).

Fuchs, W. (1930). en *Etude des composes humiques de sediments estuariens recents*. Kalinowski, E. (Tesis Doctoral), Universite des Sciences et Techniques de Lille Flandres. Artois, Francia, pág. 11 (1987).

Gachter, R., Davis, J. S. y Mares, A., *Envir. Sci. Technol.* **12**, 1416 (1978).

Gamble, D. S., *Anal. Chem.* **54**, 727 (1986a).

Gamble, D. S., *Anal. Chem.* **54**, 732 (1986b).

Garvey, J. E., Owen, H. A. y Winner, R. W., Aquat. Toxicol. **19**, 89 (1991).

Ghassemi, M. y Christman, R. F., *Limnol. Oceanogr.* **13**, 583 (1968).

Ghosh, K. y Schnitzer, M., *J. Soil Sci.* **30**, 735 (1979).

Ghosh, K. y Schnitzer, M., *Geoderma* **28**, 53 (1982).

Giesy, J. P. Jr., Briesi, L. A. y Leversee, G. J., *Envir. Geol.* **2**, 257 (1978).

Gillespie, P. A. y Vaccaro, R. F., *Limnol. Oceanogr.* **23**, 543 (1978).

Gitelson, A. A., Garbusov, G. P., Lopatshenko, L. L., Mittenzwey, K. H., Makhotenko, A. N., Mudrogelenko, I. V., Penig, J. y Sukhorukov, B. L., *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **18**, 397 (1990).

Gjessing, E. T., *Nature* **208**, 1091 (1965).

Gjessing, E. T., en *Chemical Environment in the Aquatic Habitat*. Golterman, H. L. y Clymo, R. S. (eds.), N. V. Noord-Hollandsche Uitgevers Maatschappij. Amsterdam,.pág. 191 (1967).

Gjessing, E. T., *Schweiz. Z. Hydrol.* **33**, 592 (1971).

Griffith, S. M. y Schnitzer, M., *Soil Sci.* **122**, 191 (1976).

Groeber, P., *La Ingeniería* **49**, 371 (1945).

Golterman, H. L., *Methods for Chemical Analysis of Fresh Waters*. IBP No. 8. Blackwell Scientific Publications. Oxford, 167 pág. (1971).

Golterman, H. L., *Physiological Limnology*. Elsevier. Amsterdam, 489 pág. (1975).

Golterman, H. L. y Kouwe, F. A. en *The functioning of freshwater systems*. IBP No. 22. Le Cren, E. D. y McConnel, R. H. (eds.), Cambridge University Press. Cambridge, pág. 85 (1980).

Golterman, H. L. y Meyer, M. L., *Hydrobiologia* **126**, 11 (1985).

Goodrich, M. S., Dulak, L. H., Friedman, M. A., Lech, J. J., *Environ. Toxicol. Chem.* **10**, 509 (1991).

Guy, R. D., Chakrabarti, C. L. y Schramm, L. L., *Can. J. Chem.* **53**, 661 (1975).

Haider, K., Martin, J. P., Filip, Z. y Fustec-Mathon, E., en *Humic Substances. Their structure and functions in the biosphere*. Povoledo, D. y Golterman, H. L. (editores), Pudoc. Wageningen, pág. 71 (1975).

Han, L. y Cao, W., *Oceanol. Limnol. Sin. Haiyang Yu Huzhao* **22**, 249 (1991).

Hanck, K. W. y Dillar, J. W., *Analytica Chim. Acta* **89**, 329 (1977).

Hasset, J. P. y Milicic, E., *Environ. Sci. Technol.* **19**, 638 (1985).

Hayes, M. H. B., MacCarthy, P., Malcolm, R. L. y Swift, R. S. (1989). *Humic Substances II. In Search of Structure*. John

Wiley & Sons. New York, 764 pág. (1989).
Hoigné, J, Faust, B. C., Haag, W. R., Scully Jr., F. E. y Zepp, R. G. en *Aquatic Humic Substances. Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. Suffet, I. H. y MacCarthy, P. (eds.), American Chemical Society. Washington DC., pág. 363 (1989).
Ikan, R., Dorsey, T., Kaplan, I. R., *Anal. Chim. Acta 232*, 11 (1990).
Intartaglia, C., *División Ficología, Facultad de Ciencias Naturales* (UNLP). La Plata, comunicación personal, (1986).
Jackson, T. A., *Soil Sci.* **119**, 56 (1975).
Jodellah, A. M. y Weber Jr., W. J., *J. Am. Water Works Assoc.* **77**, 95 (1985).
Jones, R. I., *Freshwat. Biol.* **23**, 323 (1990).
Jones, R. I., Salonen, K. y De Haan, H., *Freshwat. Biol.* **19**, 357 (1988).
Jurinak, J. J. y Griffin, R. A., *Soil Sci.* **113**, 130 (1972).
Kalinowski, E. y Blondeau, R., *Vie Marine* **7**, 61 (1985).
Kalinowski, E., en *Etude des composes humiques de sediments estuariens recents.* Tesis Doctoral. Universite des Sciences et Techniques de Lille Flandres. Artois, Francia, 101 pág. (1987).
Kerr, R. A. y Quinn, J. G., *Mar. Chem.* **8**, 217 (1980).
Kieffer, L. F., *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral* **12**, 88 (1981).
Kim, J. S., Chian, E. S. K., Saunders, F. M., Perdue, E. M. y Giabbai, M. F., en *Aquatic Humic Substances. Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. Suffet, I. H. y MacCarthy, P. (eds.), American Chemical Society. Washington DC., pág 473 (1989).
Kitano, Y., Kanamori, N. y Oomori, T., *Geochim. J.* **4**, 183 (1971).
Kononova, M. M., *Soil Organic Matter.* Pergamon Press Ltd. Oxford, 450 pág. (1961).
Kononova, M. M., *Soil Organic Matter* (Segunda Edición),

Pergamon Press Ltd. Oxford, 544 pág. (1966).
Kopinke, F. D., Porschmann, J. y Stottmeister, U., *Environ. Sci. Technol.* **29**, 941 (1995).
Kruithof, J. C., van der Gaag, M. A. y van der Kooy D., en *Aquatic Humic Substances. Influence on Fate and Treatment of Pollutants.* Suffet, I. H. y MacCarthy, P. (eds.), American Chemical Society. Washington DC, pág. 663 (1989).
Küchler-Krischun, J. y Kleiner, J., *Aquat. Sci.* **52/2**, 176 (1990).
Kunkel, R. y Manaham, S. E., *Analyt. Chem.* **45**, 1465 (1973).
Lambert, J., Burba, P. y Buddrus, J., *Mag. Res. Chem.* **30**, 221 (1992).
Lara, R. y Ernst, W., *Chemosphere* **19**, 1655 (1989).
Lavado, R. S., Duymovich, O. A., Gimenez, J. E. y Alvarez, L. A., *Rev. Museo La Plata* (nueva serie). S. Geol. **76**, 97 (1982).
Leppard, G. G., Burnison, B. K., Buffle, J., *Anal. Chim. Acta* **232**, 107 (1990).
Liao, W., Christman, R. F., Johnson, J. D. y Millington, D. S., *Environ. Sci. Technol.* **16**, 403 (1982).
Lindqvist, I., *Acta Chem. Scand.* **21**, 2564 (1967).
Lund, W., Helbak, A. y Seip, H. M., *Sci. Total Environ.* **92**, 269 (1990).
Lykins Jr., B. W. y Clark. R. M., en *Aquatic Humic Substances. Influence on Fate and Treatment of Pollutants.* Suffet, I. H. y MacCarthy, P. (editores), American Chemical Society. Washington DC, pág. 597 (1989).
Lytle, C. R. y Perdue, E. M., *Environ. Sci. Technol.* **15**, 224 (1981).
Mackereth, F. J. H., Heron, J. y Talling, J. F., *Water Analysis: some revised methods for limnologists.* Freshwater Biological Association. Scientific Publication No. 36. Windermere, 120 pág. (1978).
Malcolm, R. L., en *Humic Substances II. In Search of*

Structure. Hayes, M. H. B., Mac Carthy, P., Malcolm, R. L. y Swift, R. S. (editores), John Wiley & Sons. New York, pág. 339 (1989).

Manahan, S. E. en *Aquatic Humic Substances. Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. Suffet, I. H. y MacCarthy, P. (eds.), American Chemical Society. Washington DC, pág. 83 (1989).

Mantoura, R. F. C. y Riley, J. P., *Anal. Chim. Acta* **76**, 97 (1975a).

Mantoura, R. F. C. y Riley, J. P., *Anal. Chim. Acta* **78**, 193 (1975b).

Mantoura, R. F. C., Dickson A. y Riley, J. P., *Estuar. Coast. Mar. Sci.* **6**, 387 (1978).

Margalef, R., *Limnología*. Omega. Barcelona, 1010 pág. (1983).

Matthews, J. C., Ekuta, J. E., Drake, K. D., Watson, C. F. y Benson, W. H., *Chemosphere* **30**, 1565 (1995).

Matsuda, K. y Schnitzer, M., *Soil Sci.* **114**, 185 (1972).

McCrady, J. K. y Chapman G. A., *Water Res.* **10**, 65 (1979).

McCarthy, J. F. en *Aquatic Humic Substances. Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. Suffet, I. H. y MacCarthy, P. (editores), American Chemical Society. Washington DC, pág. 263 (1989).

Morse, J. W., *Oceanography Department, Texas University*. Estados Unidos, comunicación personal (1987).

Murphy, T. P., Hall, K. J. y Yesaki, T., *Limnol. Oceanogr.* **28**, 58 (1983).

Münster, U., *Arch. Hydrobiol./Suppl.* **70**, 429 (1985).

Muse, J. O., Tudino, M. B., D'Huicque, L., Troccoli, O. E. y Carducci, C. N., *Environ. Pollut.* **58**, 303 (1989).

Nissembaum, A. y Kaplan, L. R., *Limnol. Oceanogr.* **17**, 570 (1972).

Nürnberg, H. W., *Fresenius Z. Anal. Chem.* **316**, 557 (1983).

Odegaard, H. y Thorsen, T. en *Aquatic Humic Substances. Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. Suffet, I.

H. y MacCarthy, P. (eds.), American Chemical Society. Washington DC, pág. 769 (1989).

Ogner, G., *Acta Chem. Scand.* **27**, 1601 (1973).

Ohle, W., *Verh. Internat. Ver. Limnol.* **6**, 249 (1933).

Ohle, W., *Arch. Hydrobiol.* **26**, 386, 585 (1934).

Okumura, M. y Kitano, Y., *Geochim. Cosmochim. Acta* **50**, 49 (1986).

Oldenhuis, R., Oedzes, J. Y., van der Waarde, J. J. y Janssen, D. B., *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 7 (1991).

Ortego, L. S. y Benson, W. H., *Environ. Toxicol. Chem.* **11**, 261 (1992).

Otsuki, A. y Hanya, T., *Geochim. Cosmochim. Acta* **31**, 1505 (1967).

Otsuki, A. y Wetzel, R. G., *Limnol. Oceanogr.* **17**, 763 (1972).

Otsuki, A. y Wetzel, R. G., *Limnol. Oceanogr.* **18**, 490 (1973).

Otsuki, A. y Wetzel, R. G., *Arch. Hydrobiol.* **73**, 14 (1974).

Pantin, H. M., *N. Z. J. Geol. Geophys.* **8**, 453 (1965).

Parsons, T. R. y Strickland, J. D. H., *Deep-Sea Res.* **8**, 211 (1962).

Perumal, P., *J. Ecotoxicol. Environ. Monit.* **2**, 105 (1992).

Petersson, C., Haekansson, K., Karlsson, S. y Allard, B., *Water Res.* **27**, 863 (1993).

Pirbazari, M., Ravindran, V., Wong, S. P. y Stevens, M. R., en *Aquatic Humic Substances. Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. Suffet, I. H. y MacCarthy, P. (eds.), American Chemical Society. Washington DC, pág. 549 (1989).

Platt, T. y Jassby, A. D., *J. Phycol.* **12**, 421 (1976).

Posner, A. M., *Nature* **198**, 1161 (1963).

Povoledo, D. y Golterman, H. L., *Humic Substances. Their structure and functions in the biosphere.* Pudoc. Wageningen, 368 pág. (1975).

Prakash, A. y Rashid, M. A., *Limnol. Oceanogr.* **13**, 598 (1968).

Prakash, A. M. A. Rashid y D. V. Subba Rao., *Limnol. Oceanogr.* **18**, 516 (1973).

Prakash, A., A. Jensen y M. A, Rashid., en *Humic Substances. Their structure and functions in the biosphere*. D. Povoledo and H. L. Golterman (editores.), Pudoc. Wageningen, 368 pág. (1975).

Ramamoorthy, S. y Kushner, D. J., *J. Fish. Res. Bd. Can.* **32**, 1755 (1975).

Rashid, M. A. y King, L. H., *Geochim. Cosmochim. Acta* **34**, 193 (1970).

Rashid, M. A. y Prakash, A., *J. Fish. Res. Bd. Can.* **29**, 55 (1972).

Rashid, M. A., *Geochemistry of marine humic compounds*. Springer-Verlag Inc. New York, 300 pág. (1985).

Reynolds, R. C., *Limnol. Oceanogr.* **23**, 588 (1978).

Rice, J. A. y MacCarthy, P., en *Aquatic Humic Substances. Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. Suffet, I. H. y MacCarthy, P. (editores), American Chemical Society. Washington DC, pág. 41 (1989).

Ringuelet, R. A., *Ecología Acuática Continental*. EUDEBA. Buenos Aires, 138 pág. (1962).

Ringuelet, R. A., *Physis* **76**, 65 (1968).

Ringuelet, R. A., *Physis* **82**, 55 (1972).

Ringuelet, R. A., Salibián, A., Claverie, E. F. e Ilhéro, S. M., *Physis* **74**, 201 (1967).

Romano, L. A. y Cueva, F., *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral* **19**, 135 (1988).

Rosell, R. A., *Ciencia e Investigación* **26**, 107 (1970).

Rook, J. J., *J. Am. Water Works Assoc.* **68**, 168 (1976).

Saar, R. A. y Weber, J. H., *Envir. Sci. Technol.* **14**, 877 (1980a).

Saar, R. A. y Weber, J. H., *Analyt. Chem.* **52**, 2095 (1980b).

Sabljic, A., Lara, R. y Ernst, W., *Chemosphere* **19**, 1665 (1989).

Said, W. A. y Lewis, D. L., *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1498 (1991).

Schmidt, S. K. y Gier, M. J., *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2692 (1990).

Schnitzer, M. y Khan, S. U., *Humic substances in the environment*. Marcel Dekker Inc. New York, 327 pág. (1972).

Schnitzer, M., en *Humic Substances. Their structure and function in the biosphere*. Povoledo, D. y Golterman, H. L. (eds.), Pudoc. Wageningen, pág. 293 (1975).

Schnitzer, M. y Griffith, S. M., *Can. J. Soil Sci.* **55**, 491 (1975).

Schnitzer, M. y Kodama, H., *Geoderma* **13**, 279 (1975).

Seitz, W. R., *Trends Analyt. Chem.* **1**, 79 (1981).

Senesi, N., *Anal. Chim. Acta* **232**, 51 (1990a).

Senesi, N., *Anal. Chim. Acta* **232**, 77 (1990b).

Senesi, N. y Steelink, C., en *Humic Substances II. In Search of Structure*. Hayes, M. H. B., MacCarthy, P., Malcolm, R. L. y Swift, R. S. (editores), John Wiley & Sons. New York, pág. 409 (1989).

Shapiro, J., en *Chemical Environment in the Aquatic Habitat*. Golterman, H. L. y Clymo, R. S. (Editores), N. V. Noord-Hollandsche Uitgevers Maatschappij. Amsterdam, pág. 202 (1967).

Shaw, P. J., *Limnol. Oceanogr.* **39**, 1734 (1994).

Sholkovitz, E. R., *Geochim. Cosmochim. Acta* **40**, 831 (1976).

Sholkovitz, E. R. y Copland, D., *Geochim. Cosmochim. Acta* **45**, 181 (1981).

Shuman, M. S. y Cromer, J. L., *Envir. Sci. Technol.* **13**, 543 (1979).

Shuman, M. S. y Woodward, G. P. Jr., *Envir. Sci. Technol.* **11**, 809 (1977).

Skogerboe, R. K. y Wilson, S. A., *Anal. Chem.* **53**, 228 (1981).

Sonnenberg, L. B., Johnson, J. D. y Christman, R. F., en *Aquatic Humic Substances. Influence on Fate and Treatment*

of Pollutants. Suffet, I. H. y Mac Carthy, P. (eds.), American Chemical Society. Washington DC, pág. 3 (1989).

Starodub, M. E., Wong, P. T. S., Mayfield, C. I.y Chau, Y. K., *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **44**, 1173 (1987).

Steinberg, C. y Muenster, U., en *Humic Substances in Soil, Sediment, and Water. Geochemistry, Isolation, and Characterization*. Aiken, R. G., McKnight, D., Wershaw, R. L. y MacCarthy, P (eds.), John Wiley & Sons. New York, pág. 105 (1985).

Sterritt, R. M. y Lester, J. N., *Water Res.* **18**, 1149 (1984).

Stevens, A. A., Moore, L. A. y Slocum, C. J. en *Aquatic Humic Substances. Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. Suffet, I. H. y MacCarthy, P. (editores), American Chemical Society. Washington DC, pág. 681 (1989).

Stevenson, F. J. y Goh, K. M., *Geochim. Cosmochim. Acta* 35, 471 (1971).

Stevenson, F. J., *Humus Chemistry*. John Wiley & Sons. New York, 443 pág. (1982).

Stevenson, I. L. y Schnitzer, M., *Soil Sci.* **133**, 179 (1982).

Stewart, J. A. y Wetzel, R. G. *Arch. Hydrobiol.* **92**, 265 (1981a).

Stewart, J. A. y R. G. Wetzel., *Limnol. Oceanogr.* **26**, 590 (1981b).

Stewart, J. A. y Wetzel, R. G., *Freshwat. Biol.* **12**, 369 (1982).

Strickland, J. D. H. y Parsons, T. R., *A manual of sea water analysis*. Bulletin No. 125. Fisheries Research Board of Canada. Ottawa, 185 pág. (1960).

Stumm, W. y Morgan, J. J., *Aquatic Chemistry*. John Wiley & Sons. New York, 583 pág. (1970).

Stumm, W., *Swiss Federal Institute of Technology*. Zürich, Suiza, comunicación personal (1987).

Suess, E., *Geochim. Cosmochim. Acta* **34**, 157 (1970).

Suffet, H. I. y MacCarthy, P., *Aquatic Humic Substances*.

Influence of Fate and Treatment of Pollutants. American Chemical Society. Washington DC, 864 pág. (1989).

Szilágyi, M., *Soil Sci*. **111**, 233 (1971).

Tabatabai, M. A., *Sulphur Inst. J.*, **10**, 11 (1974).

Taboada, M. A., Panuska, E. M., Lavado, R. S., Gimenez, J. E. y Duymovich, D. A., *Notas del Museo de La Plata*. Geol. **74**, 67 (1987).

Tan, K. H., *Soil Sci. Soc. Am. J.* **49**, 1185 (1985).

Thurman, E. M. y Malcolm, R. L., *Environ. Sci. Technol*. **15**, 463 (1981).

Thornthwaite, C. W., *Geograph. Rev*. **38**, 55 (1948).

Tipping, E y Onhstad, M., *Chem. Geol*. **44**, 349 (1984).

Tomita, S., *Jap. J. Limnol. Rikusuizatsu* **54**, 97 (1993).

Truitt, R. E. y Weber, J. H. *Envir. Sci. Technol*. **15**, 1204 (1981).

Tsusue, A. y Holland, H. D., *Geochim. Cosmochim. Acta*. **30**, 439 (1966).

Urien, C. M., *The Geological Society of America*, Inc. Memoir 133. (1972).

Vallentyne, J. R., *Introducción a la Limnología*. Omega. Barcelona, 169 pág. (1978).

Vik, E. A. y Eikebrokk, B., en *Aquatic Humic Substances. Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. Suffet, I. H. y MacCarthy, P. (eds.), American Chemical Society. Washington DC, pág. 385 (1989).

Visser, S. A., *Soil Sci*. **96**, 353 (1963).

Vollenweider, R. A., *A Manual of Methods for Measuring Primary Production in Aquatic Environments*. IBP No. 12. Blackell Scientific Publications. Oxford, 213 pág. (1971).

Wang, Z. D., Gamble, D. S. y Langford, C. H., *Anal. Chim. Acta* **232**, 181 (1990).

Warwick, P., Carlsen, L., Randall, A., Zhao, R. y Lassen, P. *Chem. Ecol*. **8**, 65 (1993).

Weber Jr., W. J. y Jodellah, A. M., *J. Am. Water Works Assoc.* **77**, 132 (1985).

Weber Jr., W. J. y Smith, E. H., en *Aquatic Humic Substances. Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. Suffet, I. H. y MacCarthy, P. (eds.), American Chemical Society. Washington DC, pág. 501 (1989).

Wershaw, R. L., Pinckney, D. J. y Booker, S. E., *J. Res. U. S. Geol. Sur.* **5**, 571 (1977).

Wetzel, R. G., *Limnología*. Omega. Barcelona, 679 pág. (1981).

Wilson, A. L., *J. Appl. Chem.* **9**, 501 (1959).

Wilson, M. A., Barron, P. F. y Gillam, A. H., *Geochim. Cosmochim. Acta* **45**, 1747 (1981).

Witters, H. E., Puymbroeck, S. van, Vangenechten, J. H. D., Vanderborght, O. L. J., *J. Fish. Biol.* **37**, 43 (1990).

Zhou, J. L., Rowland, S., Mantoura, R. F. C. y Braven, J., *Water Res.* **28**, 571 (1994).

Zimmer, G. Brauch, H. J. y Sontheimer, H., en *Aquatic Humic Substances. Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. Suffet, I. H. y MacCarthy, P. (editores), American Chemical Society. Washington DC, pág. 579 (1989).

INDICE

INTRODUCCION 1

CAPITULO I SUSTANCIAS HUMICAS EN SUELOS

Introducción 3

Materia orgánica en suelos 6
I. Componente biológico 7
II. Residuos y compuestos orgánicos 8
III. Sustancias húmicas 8

Hipótesis sobre la formación de sustancias húmicas 11

Estructura de las sustancias húmicas 13

CAPITULO II SUSTANCIAS HUMICAS EN AGUAS NATURALES

Introducción 21

Materia orgánica en aguas naturales 21

Sustancias húmicas presentes en ambientes acuáticos 23

CAPITULO III AISLAMIENTO Y PROPIEDADES DE LAS SUSTANCIAS HUMICAS

Introducción 27

Fraccionamiento de Sustancias Húmicas 27

Propiedades de las Sustancias Húmicas 35

Influencia de las Sustancias Húmicas en procesos de tratamiento de aguas para consumo humano 44

CAPITULO IV DESCRIPCION Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Introducción 48

Terminología y definiciones 49

I. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LAS SUSTANCIAS HUMICAS EN SU AMBIENTE NATURAL

Introducción 53

Estudios realizados en la Laguna de Chascomús 54

Estudios realizados en el Río Samborombón 83

Aplicabilidad de la absorción en el UV-visible para la caracterización y evaluación de las sustancias húmicas en ambientes acuáticos 87

II. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE LAS SUSTANCIAS HUMICAS

Introducción 91

Biodegradabilidad 91

Influencia del pH y fuerza iónica sobre la forma y el tamaño molecular 93

Influencia de la composición iónica en la coagulación de sustancias húmicas 98

Interacción entre sustancias húmicas e hidratos de carbono 104

Interacción entre sustancias húmicas y metales pesados 112

III. ESTUDIOS ESTRUCTURALES DEL ACIDO FULVICO AISLADO DE LA LAGUNA DEL BURRO

Introducción 115

Características limnológicas de la Laguna del Burro 119

Aislamiento y purificación 127

Composición centesimal 131

Contenido en hidratos de carbono 131

Contenido de grupos carboxilos e hidroxilos fenólicos 133

Estudios espectroscópicos 136
- Espectro UV-visible 136
- Espectro IR 140
- Espectro RMN-^{13}C 143

Degradación oxidativa en medio alcalino 146

Unidades estructurales caracterizadas 149

Microscopía electrónica 151

CAPITULO V PARTE EXPERIMENTAL

Métodos utilizados para el análisis químico de las aguas 154

- Determinación de pH 154
- Determinación de conductividad específica 154
- Residuo sólido soluble 154
- Oxígeno disuelto 154
- Sodio y potasio 159
- Calcio 159
- Magnesio 161
- Carbonato y bicarbonato 162
- Alcalinidad 164
- Cloruro 164
- Sulfato 165
- Amonio 166
- Nitrito 168
- Nitrato 169
- Nitrógeno total 171
- Ortofosfato 172
- Fósforo total 173
- Sílice reactiva 174
- Demanda química de oxígeno 175
- Color 176

Absorción en el UV-visible 177

Material particulado en suspensión 178

Carbono orgánico particulado 178

Clorofila *a* y feofitina 180

Producción primaria del fitoplancton 182

Biodegradabilidad 185

Influencia del pH y fuerza iónica sobre el tamaño molecular 186

Influencia de la composición iónica en la coagulación de sustancias húmicas 187

Interacción entre sustancias húmicas e hidratos de carbono 188

Interacción entre sustancias húmicas y metales pesados 189

Composición centesimal 190

Contenido en hidratos de carbono 190

Contenido de grupos carboxilos e hidroxilos fenólicos 191

Estudios espectroscópicos 192
- Espectro UV-visible 192
- Espectro IR 192
- Espectro RMN-^{13}C 192

Degradación oxidativa en medio alcalino 193

Microscopía electrónica 194

RESUMEN 195

BIBLIOGRAFIA 202

INDICE 217