



EXPERIENCIAS EN LA DETERMINACIÓN DE CLOROFILA *a* Y FEOPIGMENTOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA

Bravo-Inclán, Luis Alberto y Tomasini-Ortiz, Ana Cecilia

Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, Paseo Cuauhnáhuac 8532, C.P. 62550; Jiutepec, Morelos, México.

lubravo@tlaloc.imta.mx; atomasini@tlaloc.imta.mx.

Resumen

Desde finales de la década de los 80s, se detectó la necesidad de implementar y conocer una técnica espectrofotométrica para la correcta determinación de clorofila *a* y que complementara los numerosos estudios de eutroficación en lagos y embalses cálidos tropicales. Se obtuvieron muestras de varios embalses, con el fin de contar con una amplia gama de calidades de agua y estados tróficos; y a lo largo de cerca de treinta años, se ha tenido la experiencia de evaluar la clorofila *a*, como un parámetro clave en el establecimiento de un indicador del grado de alteración, o mejora de los cuerpos de agua. Se pretende establecer los detalles de un criterio estándar en las actividades de muestreo, preservación y transporte de la muestra, filtrado, lectura e interpretación de los valores de clorofila *a*. Entre los resultados, se observa que no existe un cambio significativo en la concentración de clorofila *a*, al variar el volumen de muestra; sin embargo, un mayor volumen filtrado da como resultado una menor concentración de feofitina. Con experiencia e información del disco de Secchi y estado trófico de un lago, se puede estimar el volumen óptimo de filtrado, el cual se recomienda que sea de 1 hora a 1 hora y quince minutos. Se deben seguir a detalle el método estándar establecido por la APHA (1989), teniendo cuidado de múltiples detalles; tales como: el no acidificar la muestra, filtrar lo más rápido posible (antes de 24 horas), entre otros.

Palabras clave: Clorofila *a*, indicador, estado trófico, método espectrofotométrico.

Introducción

Desde finales de la década de los 80s, se detectó la necesidad de implementar y conocer una técnica espectrofotométrica para la correcta determinación de clorofila *a* y que complementara los estudios de eutroficación en lagos y embalses. En 1989, se obtuvieron muestras de varios embalses, con el fin de contar con una amplia gama de calidades de agua y estados tróficos; y a lo largo de cerca de treinta años (de 1989 a 2014), se ha tenido la experiencia de evaluar la clorofila *a*, como un parámetro clave en el establecimiento de un indicador del grado de alteración, o mejora de los cuerpos de agua.

La clorofila es el pigmento fotosintético presente en todas las plantas. Los tres tipos de clorofilas que comúnmente se

encuentran en las algas planctónicas son las clorofilas *a*, *b* y *c*. La clorofila *a* (*Cl-a*) se encuentra en todos los grupos de algas y es uno de los indicadores más usados en Limnología para estimar la biomasa fitoplanctónica y el estado trófico de un cuerpo de agua (Wetzel, 1983, Axler y Owen 1994). El método puede también usarse para evaluar la salud fisiológica de las algas al examinar sus productos de degradación (esto es, los feo-pigmentos, tales como feofitina *a* y feoforbida *a*). El contenido de clorofila en los cuerpos de agua dulce es un indicador ampliamente aceptado de la calidad del agua. La *Cl-a* es dominante en todas las algas eucarióticas y en las procarióticas cianobacterias (algas verde-azules) (Carlson y Simpson, 2007)

El objetivo del presente estudio consiste en establecer los detalles analíticos de un criterio estándar en las actividades de muestreo, preservación y transporte de la muestra, filtrado, lectura e interpretación de los valores de clorofila *a*; este pigmento es un indicador importante en la evaluación de cuerpos de agua.

Metodología

Se realizó la colecta de muestras en cinco embalses y un lago (Tabla 1), con el fin de obtener una amplia gama de calidades de agua y estados tróficos. Todos los cuerpos de agua se ubican en la Mesa Central y el Eje Volcánico Transversal del país. Las presas Endhó y Requena se localizan en el estado de Hidalgo y las restantes en el estado de México.

Para cada cuerpo de agua, se estableció un punto de muestreo, con el fin de obtener parámetros ambientales (temperatura del agua, pH, oxígeno disuelto y conductividad eléctrica), lectura de disco de Secchi y una muestra de 3.5 a 4 L para la estimación de clorofila (*Cl-a*).

Toma de muestra

Se mide la profundidad del disco de Secchi; para la obtención de la muestra de *Cl-a*, se obtuvo una muestra integrada por medio del método de manguera (o con el uso de una botella Van Dorn con tomas a varias profundidades), lo que permite cubrir toda la zona eufótica (Salas y Martino, 1991; Olvera-Viascán *et al.*, 1998; Bravo-Inclán, 20024). La muestra de *Cl-a* se preserva con 5 gotas de una suspensión de carbonato de magnesio (APHA, 1989), se mantiene en hielo y lejos de la luz.



Tabla 1. Listado de 5 embalses y un lago y sus características, utilizados para el muestreo de clorofila a

Cuerpo de agua	Características
Presa Valle de Bravo (PVB)	Meso-eutrófica, con relativa alta transparencia; usos: abastecimiento de agua potable y turístico
Presa Villa Victoria (PVV)	Eutrófica, con gran cantidad de arcillas; su agua es utilizada para abastecer a la CDMX.
Presa Requena (PR)	Eutrófica, con altas variaciones en la concentración de zooplancton y con dos años de recuperación, después de la trituración de lirio acuático. Ya no recibe aguas residuales domésticas de la CDMX.
Presa Endhó (PE)	Eutrófica y con posibilidades de presentar un comportamiento explosivo de zooplancton. A finales de 1988 se erradicó casi completamente el lirio. Continúa recibiendo aguas residuales domésticas.
Presa Madín (PM)	Eutrófica, con gran cantidad de sólidos suspendidos, se usa como abastecimiento de agua potable y control de avenidas.
Lago Nabor Carrillo (LNC)	Hipereutrófica y salino, con concentraciones altas de fitoplancton; ubicado en la cuenca del Ex - lago de Texcoco.

Filtración

La muestra se filtró lo más rápido posible, el mismo día o hasta 24 horas después de su colecta. Un volumen conocido de muestra fue filtrado a través de un filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/C, de 0.7 µm) o filtro de membrana (Millipore, de 0.45 µm). A los filtros se les extrae toda la humedad posible, se doblan y se introducen en un tubo de centrifuga y se guardan en ultra congelador a -20°C ± 10°C.

Extracción

Los filtros se temperizan y se les agrega 10 mL ± 2 mL de acetona al 90% (es importante saber la cantidad exacta de acetona agregada). Se tritura el filtro durante un minuto, con la ayuda de un homogenizador de tejidos; con cuidado se baja la pulpa que quede atrapada en las aspas del equipo o en la pared del tubo de centrifuga. Las muestras se colocan de modo vertical en una gradilla, bien tapadas y se refrigeran las muestras a 4 ± 2°C en la oscuridad, por 18 ± 3 horas.

Centrifugado y Lectura de la muestra

Los extractos fueron centrifugados a 2 500 r.p.m. durante 10 minutos. Con cuidado, se trasvasa el sobrenadante a otro tubo de centrifuga de plástico de 15 mL de capacidad, de modo que se evite que se trasvase acetona con restos de la pulpa del filtro. Se midieron la absorbancia de la muestra a 664 y 760 nm antes de acidificar y a 750 y 666 nm a los 90 segundos de acidificación con 100 µL de HCl 0.1 N. Las concentraciones de Cl-a y feofitina fueron determinados espectrofotométricamente usando el procedimiento "tradicional" establecido en los Métodos Estándar (APHA, 1989). Para la lectura se usó un espectrofotómetro marca HP modelo 8452 A, con una banda espectral de 2 nm de ancho y cubeta de 1 cm de trayecto óptico.

Ahora se cuenta con seis datos para cada muestra, esto es, tres lecturas (a 664, 666 y 750 nm), tanto antes (a) como después

(d) de la acidificación. Se obtienen las lecturas corregidas al sustraer los datos de 664 y 666 nm, menos las correspondientes lecturas a 750, utilizando estos valores corregidos, se calculan las concentraciones de clorofila a (Cla) y feofitina a (Ffa) en µg/L (o mg/m³), como sigue (APHA, 1989):

$$Cla (\mu g / L) = \frac{A \times K (664a - 666d) V_{Acet}}{v f t} \quad (1)$$

$$Ffa (\mu g / L) = \frac{A \times K R 666d 664a V_{Acet}}{v f t} \quad (2)$$

Donde:

- A Coeficiente de absorción de la clorofila a = 11.0 , y
- K Tasa que expresa la corrección por la acidificación,

$$\frac{(664a/665d) \text{ clorofih a pura}}{(664a / 665d) \text{ clorofila a pura } (664a / 665d) \text{ feofitina a pura}}$$

$$\frac{1.7}{1.7 \cdot 1.0} = 2.43$$

Entonces, A x K = 26.73

Y donde:

- 664a Absorción antes de la acidificación,
- 666d Absorción después de la acidificación,
- V_{Acet} Volumen de acetona usado en la extracción, en mL,
- v f Volumen de agua filtrada, en L,
- t Trayecto óptico de la celda, igual a 1 cm,
- R Tasa máxima de 664a:665d, en la ausencia de feopigmentos (= 1.7).

Resultados

En la Tabla 2, se presentan los resultados ambientales de los 6 cuerpos de agua. Para cada embalse, se estableció un punto de muestreo, se realizaron dos muestreos por cuerpo de agua.

Tabla 2. Valores ambientales superficiales de una estación en cada cuerpo de agua.

Cuerpo de agua	Temp (°C)	pH (unid's)	O.D. (mg L-1)	C.E. (µS/cm)	Disco de Secchi (m)
PVB	27.3	6.8	7.4	113	2.20
PVV	25.4	8.7	9.9	126	1.70
PR	17.7	7.62	6.8	328	0.28
PE	23.0	7.8	2.2	1 080	0.23
PM	24.5	6.8	8.0	223	1.08
LNC	20.5	10.0	3.1	4 750	0.15

En general, la temperatura de los cuerpos de agua durante el muestreo fue arriba de 20.5°C, excepto por la presa Requena, con 17.7°C. El pH presentó dos valores ligeramente bajos, de 6.8 en las presas PVV y PM, en cambio, resaltan los valores alcalinos en la presa PVV y LNC, con 8.7 y 10.0 unidades, el valor alcalino de PVV se refleja en un valor alto en la concentración de oxígeno disuelto (igual a 9.9 mg L-1), que indica una sobre-oxigenación, provocada por una alta productividad primaria en el momento; en contraste, se detectan valores bajos de O.D. superficial en la PE y en LNC,

con 2.2 y 3.1 mg L⁻¹. Todos los cuerpos de agua presentan una conductividad eléctrica baja y media excepto por LNC, con un valor muy alto de 4 750 µS/cm. El disco de Secchi presenta lecturas medias VB (2.20 m), bajas PVV y PM (1.70 y 1.08 m), y profundidades extremadamente bajas en el resto de los embalses (de 0.28 a 0.15 m).

Se analizaron un total de 136 muestras, de las cuales 73 se obtuvieron con filtros Millipore (0.45 µ); 23 con filtros Whatman (GFA/C, de 0.9 micro) y 40 por medio de centrifugación. Se tuvo un porcentaje de muestras que, por tener valores negativos en la concentración de Cl-a (22%), tuvieron que desecharse. Resalta que al usar nitros de membrana, se obtuvo un 58% de muestras adecuadas (esto es, valores >0); no obstante, con el uso de filtros Whatman y por medio de centrifugación, se obtuvo un 100% de resultados adecuados. Además de 1989 a 2014, los resultados de estudios

Experimento A.- Se realizó un comparación de resultados de la PR, con la modificación del volumen de muestra con un ámbito de 0.34 a 0.85 mL de agua filtrada (n = 13). En la Figura 1 se presentan los resultados de Cl-a y feofitina. Se observa que las concentraciones de ambos pigmentos disminuyen ligeramente al filtrar un mayor volumen. Por la tendencia observada, se puede asumir que se obtienen mejores resultados al filtrar un mayor volumen, ya que se obtienen concentraciones más bajas de feofitina.

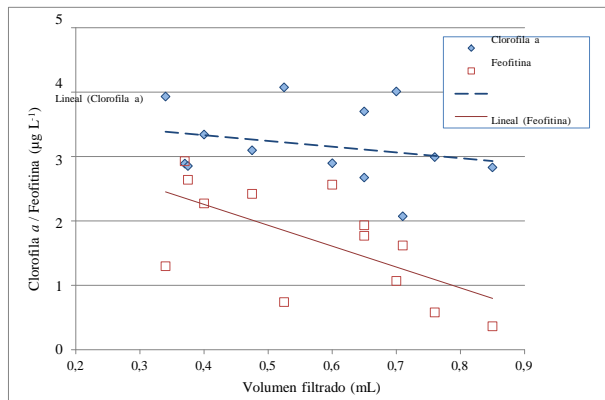


Figura 1. Resultados de clorofila a y feofitina, usando diferentes volúmenes de agua. Presa Requena, Hgo.

Experimento B.- Se efectuó un comparativo con agua de la PM con el fin de estudiar la eficiencia de dos tipos de filtros (Tabla 3).

A pesar de que se hizo el experimento en triplicado, se tuvo que descartar dos muestras para el filtro Millipore, ya que se obtuvo concentración de Cl-a negativa. Cabe resaltar que el cociente 665a/665b está comprendido en un ámbito de 1.0 a 1.7, en el que valores cercanos a 1.7 indican clorofila pura, y valores cercanos a 1.0 son de feofitina pura. Dicho cociente, por tanto, es un indicador del estado fisiológico del plancton (APHA, 1989). Se observa que los filtros valores de 665a/665b, con el máximo cociente para un filtro Whatman, el

cual obtuvo la mayor concentración de Cl-a, menor desviación estándar, y la más baja concentración de Ffa. Otro problema en contra de los filtros Millipore, es que se saturan muy rápido, ya que el tiempo de filtración fue de 2:25 horas, mientras que con los filtros Whatman fue de 1:15 horas.

Tabla 3. Comparativo de muestras filtradas con Millipore (Milli) y filtros Whatman GF/C (What) con agua de la presa Madín. Clorofila (Cl-a), feofitina (Ffa).

Tipo de filtro	n	Tam. de poro (µm)	Núm. de filtros	Vol de agua filtrada (L)	Cl-a (µg/L)	Ffa (µg/L)	665a/665b
Milli	1	0.45	1	0.35	5.3	2.9	1.45
What	3	0.7	1	0.40	6.9 ± 0.39	2.2	1.53
What	3	0.7	2	0.4	6.6 ± 0.70	4.3	1.42

Experimento C.- Se procesó muestra del LNC usando filtros Whatman, así como concentrando la muestra por medio de centrifugación, a 1 675 g ó 3 200 rpm (Tabla 4).

Resulta notorio los valores altos tanto de Cl-a como de Ffa en el LNC. Debido a la alta concentración de algas, en 1987 se tuvo que efectuar una centrifugación de 0.5 L de la muestra, ya que, con los filtros de membrana (usados en ese entonces), no era posible filtrar la cantidad de agua necesaria; esta situación impedía obtener lecturas adecuadas. Los resultados anteriores muestran que los filtros Whatman son factibles de usarse, sin embargo, los resultados por centrifugación son dos veces mayores.

Tabla 4. Comparativo de muestras filtradas con filtros Whatman GF/C (What) y agua centrifugada (Centrif.) a 3 200 rpm del Lago Nabor Carrillo. Clorofila (Cl-a), feofitina (Ffa).

Tipo de concentración	n	Núm. de filtros	Tiempo (min)	Cl-a (µg/L)	Ffa (µg/L)	665a/665b
What	1	1	---	80.2	34.9	1.49
What	3	2	---	64.5 ± 69.6	8.1	1.57
Centrif.	4	---	4	164 ± 11.6	87.4	1.46
Centrif.	4	---	6	178 ± 7.7	109.4	1.43

Como era de esperarse, en el caso de la centrifugación, se obtuvo una mayor concentración (un 7.6%) con un tiempo más prolongado, sin embargo para la centrifugación se obtienen valores altos de Ffa, así como un menor cociente 665a/665b.

Experimento D.- Con agua de la PVB se comparó la diferencia que se obtiene al poner el carbonato de magnesio tanto en el campo, como en el filtro Millipore, precisamente antes de filtrar la muestra. Los resultados indican que es más conveniente añadir la suspensión en el campo, ya que se obtuvo una mayor concentración (19.1%), un cociente 665a/665b un poco más grande (1.22, en comparación con 1.18), y una menor feofitina (14.3, contra 16.4 µg L⁻¹).

Experimento E.- En la PM se compararon doce muestras: seis filtradas con Millipore filtradas con una presión media (entre 35 y 40 cm de Hg, versus seis muestras con presión baja (<25 cm de Hg). En este segundo caso, solo se obtuvo una muestra adecuada (Cl-a = 1.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ y un coeficiente 665a/665b de 1.06); para el caso del uso de presión media, un resultado se desechó y el resto presentó valores relativamente elevados (Cl-a = 4.5 \pm 2.17 $\mu\text{g L}^{-1}$ y un coeficiente 665a/665b de 1.27)

Discusión

Existen dos temas importantes a tomar en cuenta a la hora de realizar una determinación tradicional de Cl-a: (a) La filtración adecuada y suficiente, para que se obtenga un resultado satisfactorio; y (b) El uso de un buen líquido para la extracción de los pigmentos. Es importante considerar que el volumen de muestra a tratar es variable de acuerdo con la concentración algal y la presencia de arcillas, en casos excepcionales –lagos oligotróficos o zonas costeras o de mar abierto–, se requieren filtrar hasta 2 ó 5 L (Tabla 4). Cuando se presenten dificultades de filtración se puede filtrar el volumen recomendado, si se utilizan dos filtros, en lugar de uno. En otras palabras, se puede filtrar una porción de la muestra en un filtro y continuar el resto del volumen con otro filtro, hasta completar la cantidad recomendada de la Tabla 3; no usar más de dos filtros por muestra. Además, si se usan dos filtros, considerar el uso de 11 a 12 mL de acetona al 90%.

No hay lugar a duda que se observa la ventaja de usar filtros Whatman sobre los de membrana. Además de que los filtros de fibra de vidrio (Whatman) son más económicos, éstos son preferibles ya que, en el momento de la extracción, ayudan a romper las células cuando se utilizan con un homogenizador de tejidos; además, estos filtros y no se obstruyen tan pronto, y son más eficientes en la retención de clorofila (Sheldon, 1972; Margalef, 1983; Axler y Owen, 1994; Carlson y Simpson, 2007). Los filtros de membrana se pueden moler, pero les falta una abrasividad suficiente para producir una buena extracción, por lo que sus eficiencias de extracción son menores (Carlson y Simpson, 2007).

Aunque Strickland y Parsons (1972) estiman que es recomendable utilizar entre 10 y 12 mL de acetona (APHA, 1989, recomienda 10 mL) para la extracción, se ha visto que, para cuerpos eutróficos o con exceso de arcillas, en el que se espera una pobre filtración y/o extracción (lo cual sucede con frecuencia en embalses cálido-tropicales), se debe utilizar la menor cantidad posible de acetona, esto es, de 8-9 mL, con el fin de que las lecturas iniciales a 665 nm lleguen a ser cercanas a 0.17 a 0.2 nm.

Por muchos años, una extracción con 90% de acetona con el método descrito por Lorenzen (1967) y APHA (1989), se ha considerado satisfactorio para varios autores de estudios limnológicos (Carlson y Simpson, 2007; Axler y Owen, 1994). No obstante, existen otros disolventes, por ejemplo se menciona que el metanol es superior para las clorofíceas (Margalef, 1983, Arar y Collins, 1992).

Tabla 3. Comparativo Volumen recomendado de muestra filtrada de acuerdo con el tipo de cuerpo de agua

Tipo de cuerpo de agua	Disco de Secchi 1/ (m)	Volumen de filtración recomendado 1/ (L)	Vol. de garrafón recomendado (L)
Lagos y presas eutróficos (con exceso de nutrientes, agua muy verde)	0.2 – 1.5	0.250 – 0.750	1
Lagos y presas mesotróficos (nitrógeno y fósforo con valores medios)	1.6 – 4.4	0.8 – 2.0	2
Lagos y presas oligotróficos (nitrógeno y fósforo con valores bajos)	4.5 – >15	1.5 – 2.5	3
Zona costera	5 – >10	1.5 – 2.5	3
Mar abierto	> 15	2.0 – 5.0	4.0 – 5.0

1/ Valores aproximados, varían de acuerdo a la presencia de sólidos suspendidos y la concentración algal presente.
Fuente: Adaptado de Carlson (2007).

Cabe añadir que la variabilidad de los resultados al usar la centrífuga, con diferentes tiempos o incremento del campo centrífugo, dan valores muy variados, y lejanos al procedimiento tradicional de filtrado, por lo que no se recomienda su uso. El método más simple para preservar es la congelación de las muestras. Varios autores reportan que las muestras congeladas no muestran una degradación significativa aún después de 6 meses (Carlson y Simpson, 2007).

Conclusiones

Se considera la determinación de Cl-a como la estimación más adecuada, en términos prácticos, para evaluar la biomasa algal. Se recomienda efectuar las lecturas con un espectrofotómetro que tenga un ancho de banda espectral de 1 a 2 nm; si se utiliza una banda más grande, se presenta una subestimación importante. En la medida de lo posible, tener cuidado en los factores de: volumen de filtrado y cantidad de disolvente añadido, con el fin de obtener una absorbancia en un ámbito de 0.16 a 0.8 nm en la primera lectura a 664 nm.

Si se siguen técnicas de muestreo adecuadas, así como el procedimiento delineado por APHA (2005) la evaluación de clorofila a y feofitina es una técnica “tradicional” y adecuada, que permite la evaluación consistente e histórica, de la tendencia de los datos de un cuerpo de agua a mediano y largo plazo.

Durante el filtrado, se recomienda lo siguiente (a) El tiempo recomendado de filtrado, de 50 a 1 hora 10 min; (b) La presión de filtrado recomendada es de presión media, de 35 a 40 cm de Hg. Los datos de feofitina a representan un buen índice del grado de pastoreo por zooplancton; sin embargo, se debe tener cuidado en la manipulación de la muestra, con el fin de no incrementar artificialmente dicho valor.



CONGRESO NACIONAL
AMICA
Villahermosa Tabasco

XII Congreso Regional para Norteamérica y el Caribe
Primer Simposio Interamericano de AIDIS Joven y
Primer Encuentro Internacional de Jóvenes Investigadores en Evaluación de Tecnología
Ambiental, EJITA, de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, UJAT.



Referencias

APHA (American Public Health Association) (1989). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 17ed. APHA/ American Water Work Association/Water Environment Federation. Washington, D. C. Part 10200 H.

Arar, E. J. & Collins B. J. 1992. *In Vitro determination of chlorophyll a and pheophytin a, in marine and freshwater phytoplankton by fluorescence*. U.S. Environmental Protection Agency. Office of Research and Development. Method 445.0. Version 1.1. EPA/600/R-92/121. Cincinnati, OH, USA. 14 pp.

Axler R. P. and Owen C. J. (1994). Measuring chlorophyll and phaeophytin: Whom should you believe? *Lake and Reservoir Management* **8**(2): 143-151.

Bravo-Inclán, L. (2004) Unidad didáctica para la aplicación de la NMX-AA-014-1980, cuerpos receptores - muestreo. Serie Autodidáctica en materia de normas técnicas relacionadas con la inspección y verificación, *Manual de la Serie Naranja*, Núm. 13. SEMARNAT, CNA, IMTA. Jiutepec, Mor., 50 pp.

Carlson, R. E. 2007. Estimating trophic state. *LakeLine* **7**(1): 25-28.

Carlson, R.E. and Simpson, J. (2007). *A Coordinator's Guide to Volunteer Lake Monitoring Methods*. North American Lake Management Society. 96 pp. (nota, la sección de clorofila se puede consultar en: <http://www.secchidipin.org/?s=chlorophyll>)

Lorenzen, C. J. (1967). Determination of Chlorophyll and pheo-pigments: spectrophotometric equations. *Limnology & Oceanography* **12**: 343-6.

Margalef, R. (1983). Ecología del fitoplacton. En: *Limnología*. Ed. Omega, cap. 8, Madrid, pp. 247-260.

Olvera-Viascán, V. Bravo-Inclán, L. and Sánchez-Chávez, J. (1998). Aquatic ecology and management assessment in Valle de Bravo Reservoir and its watershed. *Aquatic Ecosystem Health & Management* **1**(3-4), 277-290.

Salas, H. J. y Limón, J. G. (1986). *Memorias del tercer encuentro del proyecto regional. Desarrollo de metodologías simplificadas para la evaluación de eutroficación en lagos cálidos-tropicales*, OMS/OPS/CEPIS; SARH/CPNH. Guadalajara, Jal., pp. 1-31.

Salas, H. J. y Martino, P. (1991) A simplified phosphorus trophic state model for warm-water tropical lakes. *Water Research* **25**(3), 341-350.

Sheldon, R. W. (1972). Size separation of marine seston by membrane and glass-fiber filters. *Limnology & Oceanography* **17**: 494-8.

Stickland, J. D. H. and Parsons, T. R. (1972). A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada. Bulletin 167. 2nd Ed. Ottawa, p. 185-96.

Wetzel, R. G. (1983). *Limnology*. 2nd ed. Saunders College Publishing, 762 pp.