

COMPARACIÓN DE LA ESTIMACIÓN DE LA CLOROFILA-*a* MEDIANTE LOS MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICO Y FLUOROMÉTRICO

Comparison of Spectrophotometric and Fluorometric Measurements of Chlorophyll-*a*

CARLOS RIVERA R.¹, ÁNGELA ZAPATA A.¹, GABRIEL PINILLA²,
JHON DONATO², BEATRIZ CHAPARRO³, PAOLA JIMÉNEZ¹.

¹ Departamento de Biología, Unidad de Ecología y Sistemática,
Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

² Departamento de Biología, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá.

³ Corporación Autónoma y Regional de Cundinamarca.

Presentado abril 29 de 2005, aceptado julio 21 de 2005, correcciones septiembre 6 de 2005.

RESUMEN

En cuatro ecosistemas acuáticos de montaña del altiplano Cundiboyacense, Colombia, se compararon mediante un análisis de regresión los datos de clorofila-*a* obtenidos a partir de los métodos espectrofotométrico (fórmula tricromática) y fluorométrico (método de Welschmeyer). El análisis demostró que el método espectrofotométrico sobreestimó la concentración de clorofila-*a*, pero se puede utilizar con precaución en ambientes de baja trofia. Se halló una ecuación que permite relacionar las medidas de clorofila-*a* obtenidas con las dos metodologías.

Palabras clave: Clorofila-*a*, espectrofotometría, fluorometría, humedales, ecosistemas acuáticos de montaña.

ABSTRACT

In four mountain aquatic ecosystems of altiplano Cundiboyacense, Colombia, we compared through analysis regression data set of chlorophyll-*a* obtained with spectrophotometric (trichromatic formula) and fluorometric (Welschmeyer) methods. The analysis showed that the spectrophotometric method overestimated the chlorophyll-*a* concentration, but it could be used with precaution in the lower trophic environments. An equation that relates the two chlorophyll-*a* measures was obtained.

Key words: Chlorophyll-*a*, spectrophotometry, fluorometry, wetlands, mountain aquatic ecosystems.

INTRODUCCIÓN

La concentración de clorofila-*a* se utiliza para estimar en forma indirecta la biomasa de las comunidades fitoplanctónicas, debido a que es el principal pigmento fotosintético presente en las algas (Gregor y Maršálek, 2004). La clorofila-*a* también es un indicador del grado de contaminación de los ecosistemas acuáticos y un importante índice del estado fisiológico del fitoplancton (Pinto *et al.*, 2001). Para estimar la clorofila existen diferentes métodos, procedimientos y modelos matemáticos, desarrollados con el objeto de minimizar los errores ocasionados por la presencia de otros pigmentos fotosintéticos y de algunos compuestos químicos en el agua (APHA, 1998). Los métodos cromatográficos modernos permiten la cuantificación exacta de la clorofila y todos sus derivados (HPLC); sin embargo, este tipo de tecnología es de limitado acceso en laboratorios pequeños por sus altos costos. El método espectrofotométrico puede estar fuertemente sesgado por el estado fisiológico de la clorofila, pero es muy utilizado debido a que el equipo requerido se encuentra en cualquier laboratorio de análisis de agua. Para cuantificar la clorofila, se reportan en la literatura diferentes solventes (acetona, metanol, etanol, entre otros) y procedimientos de extracción (maceración, sonicación, calentamiento y congelamiento), además de la aplicación de ecuaciones (monodi- y tricromáticas) que utilizan distintas longitudes de onda (Banderas *et al.*, 1991; Pérez *et al.*, 2002; Ramírez y Alcaráz, 2002). Algunas revisiones detalladas analizan los inconvenientes que ofrecen estos procedimientos en la exactitud de la cuantificación de la clorofila (Rowan, 1989). Dentro de los procedimientos más discutidos que pretenden determinar con mayor exactitud la cuantificación de clorofila-*a*, está la estimación de sus derivados (feopigmentos) mediante la acidificación de la muestra. En la práctica, este procedimiento conduce en muchas ocasiones, a la obtención de valores negativos de clorofila-*a* (Bührer, 1991). Las muestras que contienen sedimentos pueden presentar una variedad de pigmentos no identificados y derivados de la clorofila, por lo que la acidificación puede ser inadecuada (Rowan, 1989).

También se ha cuestionado el uso de ecuaciones y procedimientos que no requieren de acidificación, como la fórmula tricromática de Jeffrey y Humphrey (APHA, 1998), por no considerar los derivados de la clorofila (feofitinas y feoforbidos). A pesar de esto, se han empleado con algunas modificaciones en aguas donde los productos de degradación son bajos, como los lagos de montaña con baja concentración de nutrientes (Donato, 2001; Felip y Catalán, 2000). El método fluorométrico de Welschmeyer (1994) es más sensible y preciso en la cuantificación de la clorofila en relación con los métodos espectrofotométricos debido a que no se ve afectado por la presencia de feopigmentos y clorofila-*b* en la muestra. Sin embargo, este método requiere un equipo que tampoco es común en la mayor parte de los laboratorios de análisis de agua. Dada la urgencia de caracterizar nuestros ecosistemas acuáticos e interpretar funcionalmente algunas variables extensivas del fitoplancton, el objetivo de este trabajo fue analizar y comparar los datos de clorofila-*a* obtenidos con los métodos espectrofotométrico (fórmula tricromática) y método fluorométrico (Welschmeyer, 1994) en muestras de agua provenientes de cuatro ecosistemas acuáticos de montaña de Colombia.

Teniendo en cuenta lo anterior y considerando la necesidad de seguir empleando los procedimientos espectrofotométricos en Colombia, se plantearon las siguientes preguntas: ¿Los valores de clorofila-*a* obtenidos con el método espectrofotométrico con ecuación tricromática representan adecuadamente los valores de clorofila en sistemas acuáticos de montaña? ¿En qué límites de valores de clorofila y de nutrientes se puede utilizar este método?

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras se tomaron en el lago Guatavita, Colombia, (L. Guatavita), y en tres humedales del altiplano Cundiboyacense, Colombia, (H. Llano Grande, H. Briceño y H. Siberia), durante campañas realizadas entre abril y agosto de 2003 (Tabla 1). El lago de Guatavita está ubicado en el municipio de Sesquilé, presenta un diámetro de 400 m, una profundidad máxima de 30 m, es monomítico, no tiene afluentes ni efluentes superficiales, y la cuenca hace parte de una pequeña reserva forestal.

	L. Guatavita	H. Llano Grande	H. Briceño	H. Siberia
Ubicación geográfica	4°58'50" N 73°47'43" W	4°59'28" N 74°06'06" W	4°43'40" N 74°11'40" W	4°58'14" N 73°57'10" W
Municipio	Sesquilé	Tenjo	Briceño	Facatativá
Cond. ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	9,7 16%	23,9 11%	170,6 42%	658,6 53%
O ₂ (mg l ⁻¹)	6,2 12%	2,7 56%	1,4 98%	0,5 169%
NH ₄ ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	5,9 40%	44,4 123%	1471,9 249%	2508,9 60%
NT ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	22,3 95%	1747,2 166%	7632,0 137%	3883,0 73%
PRS ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	1,1 94%	0,26 40%	15,4 137%	27,6 95%
Cl. a (mg m ⁻³)	10,6	8,1	151,6	132,2
Fluorimetría	45%	144%	129%	148%
Cl. a (mg m ⁻³)	12,8	9,9	376,1	363,3
Espectrofotometría	49%	151%	230%	280%

Tabla 1. Ubicación geográfica, valores promedio y coeficiente de variación de las variables físicas, químicas y de la clorofila-*a* de los ecosistemas acuáticos estudiados. NT: nitrógeno total; O₂: oxígeno; NH₄: amonio disuelto; PRS: fósforo reactivo soluble; Cl: cloro.

El H. Llano Grande está constituido por tres pequeños cuerpos de agua (actualmente protegidos por la CAR) inmersos en una matriz agrícola en el municipio de Tenjo, Colombia. Se caracterizan por no presentar macrófitas en el espejo de agua. Dos de ellos tienen un diámetro de 50 m y una profundidad máxima que oscila entre 2 y 3 m. El tercero se caracteriza por ser muy somero (0,3-0,5 m). El H. Briceño hace parte de la zona de desborde del río Bogotá en el municipio de Briceño, Colombia, y es de propiedad privada. Presenta una amplia variedad de macrófitas y pequeños espejos de

agua, su extensión es aproximadamente de 14 ha. Este humedal exhibe una profundidad muy variable debido a que algunos sectores fueron construidos artificialmente. El H. Siberia se encuentra en la vía Siberia-Facatativá, Colombia y hace parte de la zona de desborde de un canal de aguas negras conectado con el río Bogotá; en su mayor parte se encuentra colmatado y presenta una variada composición de macrófitas. Este humedal recoge desechos industriales de la zona y se halla dentro de una compleja matriz de uso agrícola y ganadero, fragmentada por carreteras. Para este humedal, las muestras se tomaron en sitios donde la columna de agua presentó una profundidad entre 0,3 y 1 m.

Se tomaron 200 muestras para analizar la clorofila-*a*, en 172 de las cuales se cuantificó simultáneamente la concentración de fósforo reactivo soluble (PRS), nitrógeno total (NT) y amonio disuelto (NH_4), mediante los métodos propuesto por APHA (1998). El agua de los humedales se recolectó subsuperficialmente en tres puntos ubicados en la zona de aguas libres o pequeños espejos de agua entre las macrófitas. En el lago Guatavita, las muestras se tomaron en cuatro profundidades del epilimnio y una profundidad del hipolimnio en la zona central del lago. Para cuantificar la clorofila-*a* (Cl.*a*) se tomaron muestras de 2 L de agua. Las muestras del lago Guatavita se recogieron con una botella opaca horizontal, y las muestras de los humedales se extrajeron con un muestreador manual con un cabo largo. Cada muestra se almacenó en un frasco opaco y se transportó refrigerada. Posteriormente, las muestras se filtraron empleando una bomba de vacío y filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F (0,7 μm de poro). El volumen de filtración osciló entre 50 y 1.000 mL dependiendo de la saturación del filtro (Wetzel y Likens, 2000). Los filtros se maceraron con mortero de mano, y para la extracción se utilizó acetona al 90%. El extracto se almacenó en oscuridad durante 18 h a 4 °C y se centrifugó a 2.000 rpm durante 20 min. La medición espectrofotométrica de los extractos acetónicos se realizó en un equipo HP 8453E y se aplicó la ecuación de Jeffrey y Humphrey (APHA, 1998). Posteriormente, se realizó la medición fluorométrica con el método de Welschmeyer (1994) en un equipo Turner Designs 10AU calibrado con soluciones estándar de Cl.*a* de espinaca libre de clorofila b (Sigma Ref. C5753).

Para relacionar las concentraciones de Cl.*a* obtenidas con los dos métodos, se elaboraron modelos de regresión lineal simple con diferentes grupos de datos utilizando arbitrariamente la Cl.*a* medida espectrofotométricamente como una función de la Cl.*a* medida fluorométricamente. Debido a que las dos variables no presentan ecológicamente una relación de dependencia, los modelos obtenidos se analizaron a partir del coeficiente de correlación (r) y no del coeficiente de determinación. También se describió la desviación estándar del modelo (DS) y la pendiente (m) obtenida en los modelos con el fin de explicar con mayor detalle la relación de las variables. Este procedimiento se realizó siguiendo las recomendaciones generales para relacionar variables que no presentan una relación de dependencia (Hakanson y Boulín, 2002; Hakanson y Peters, 1995). Los datos presentaron una distribución cercana a la distribución de *Poisson*, por lo que se utilizó la transformación hiperbólica (*arcoseno H*) para normalizarlos (Legendre y Legendre, 2000). Para el análisis se asume que el

método fluométrico estima con mayor exactitud la $Cl.a$ (Welschmeyer, 1994). Con el fin de establecer en qué condiciones de nutrientes (NT, PRS y NH_4) los valores de $Cl.a$ estimados espectrofotométricamente son más cercanos a los valores reales del medio acuático, se desarrolló el siguiente procedimiento: 1. Se realizó un análisis de regresión entre los dos métodos ($Cl.a_{\text{espectro.}} = b + m \times Cl.a_{\text{fluorom.}}$). 2. Se calcularon los residuales de la regresión. 3. Se graficaron los residuales de esta regresión contra la concentración de nutrientes de la respectiva muestra. 4. Se establecieron la región para cada variable química como los límites superior e inferior de la concentración de nutrientes, en la cual la estimación de $Cl.a$ es adecuada y donde los residuales son siempre menores a dos DS.

RESULTADOS

La $Cl.a$ presentó un promedio de $30,1 \text{ mg m}^{-3}$ con el método fluorométrico y $66,2 \text{ mg m}^{-3}$ con el método espectrofotométrico. De las 200 muestras incluidas en el análisis, el 76% presentaron registros más altos con el método espectrofotométrico. Los valores obtenidos con el método fluorométrico oscilaron entre $0,6$ y $845,1 \text{ mg m}^{-3}$ y con el método espectrofotométrico entre $0,9$ y $4158,8 \text{ mg m}^{-3}$. Los datos promedio de $Cl.a$ para cada ecosistema se presentan en la tabla 1. Al establecer la diferencia entre los datos hallados por espectrofotometría y fluorometría, se observaron promedios de la diferencia más bajos para el H. Llano Grande ($1,8 \text{ mg m}^{-3}$) y la L. Guatavita ($2,6 \text{ mg m}^{-3}$), mientras que en los otros humedales el promedio de la diferencia fue superior a 40 mg m^{-3} . El porcentaje de diferencia absoluta con respecto al método fluorométrico fue de 66% en H. Siberia, 36% en H. Briceño, 27% en L. Guatavita y 22% en H. Llano Grande. Al calcular el porcentaje del número de muestras cuya medición de clorofila por el método espectrofotométrico presenta un valor más alto (sobrestimación) o más bajo (subestimación) que el obtenido por el método fluorométrico, se encontró que en el 100% de los datos espectrofotométricos de H. Llano Grande sobrestimaron el valor de clorofila. En L. Guatavita y H. Briceño el porcentaje de sobrestimación fue aproximadamente del 70%, mientras en H. Siberia el porcentaje de sobrestimación fue igual al de subestimación (50%).

Los modelos de regresión lineal simple (con excepción del modelo para H. Siberia), presentaron relaciones significativas con $r > 0,87$ (Tabla 2). Los humedales Llano Grande y Briceño presentaron el r más alto y el valor más bajo se obtuvo con los datos de Guatavita. El modelo desarrollado con todos los datos presentó un $r = 0,93$ (Fig. 1). Cuando se excluyeron los datos de H. Siberia la correlación del modelo se incrementó ($r = 0,96$) y la relación de las dos variables se describió mediante la ecuación:

$$\text{arcoseno } H (\log_{10} Cl.a_{\text{espectro.}}) = 0.1338 + 0.9192 \times \text{arcoseno } H (\log_{10} Cl.a_{\text{fluorom.}}) \quad (E.1)$$

La DS fue baja y no superó 0,1 en los modelos significativos. El valor más bajo se presentó en el grupo de datos de la L. Guatavita que no incluyeron las muestras del hipolimnio y en el modelo para el H. Llano Grande. El valor más alto se presentó en el mo-

delo que incluyó los datos de todos los ecosistemas. La *m* de los modelos significativos osciló entre 0,63 y 1,04. Una *m* > 1 solo se presentó en el H. Briceño (Tabla 2).

Grupo de datos incluidos	Coefficiente de correlación (r)	Desviación estándar (DS)	Pendiente (m)	n
L. Guatavita	0,900*	0,052	0,750*	155,000
Guatavita sin hipolimnio	0,870*	0,042	0,630*	127,000
H. Siberia	0,020 n.s.	0,267	0,020 n.s.	14,000
H. Briceño	0,980*	0,066	1,040*	14,000
H. Llano Grande	0,990*	0,045	0,940*	13,000
Todos	0,930*	0,097	0,870*	200,000
Todos sin H. Siberia	0,960*	0,059	0,910*	184,000

Tabla 2. Principales parámetros obtenidos en modelos de regresión lineal simple realizados entre la clorofila-a estimada mediante los métodos espectrofotométrico y fluorométrico. *: significativo con $\alpha < 0,001$. n.s.: no significativo con $\alpha > 0,05$.

El modelo realizado para establecer en qué concentraciones de nutrientes se cuantifican con mayor exactitud los valores de Cl.a estimados espectrofotométricamente presentó un $r = 0,93$ ($n = 172$; $DS = 0,1$; $p < 0,0001$). Al utilizar el procedimiento gráfico con los residuales del modelo y la concentración de nutrientes (Fig. 2), se estableció que la dispersión de los datos de Cl.a fue menor cuando el $NH_4 < 2000 \mu mol L^{-1}$, el $NT < 1400 \mu mol L^{-1}$ y el $PRS < 2,6 \mu mol L^{-1}$. Es decir, en ambientes como la L. Guatavita y el H. Llano Grande, los residuales no superaron dos veces la DS del modelo. Estas condiciones de nutrientes ocurrieron cuando la concentración de Cl.a fue generalmente $< 60 mg m^{-3}$ (este criterio se cumple en todos los casos para el H. Llano Grande y la L. Guatavita).

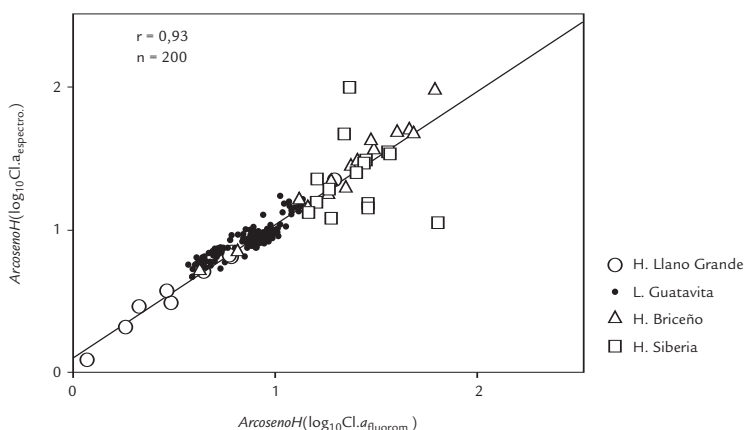


Figura 1. Correlación entre los valores de clorofila-a determinados por los métodos espectrofotométrico y fluorométrico en cuatro ecosistemas acuáticos de montaña.

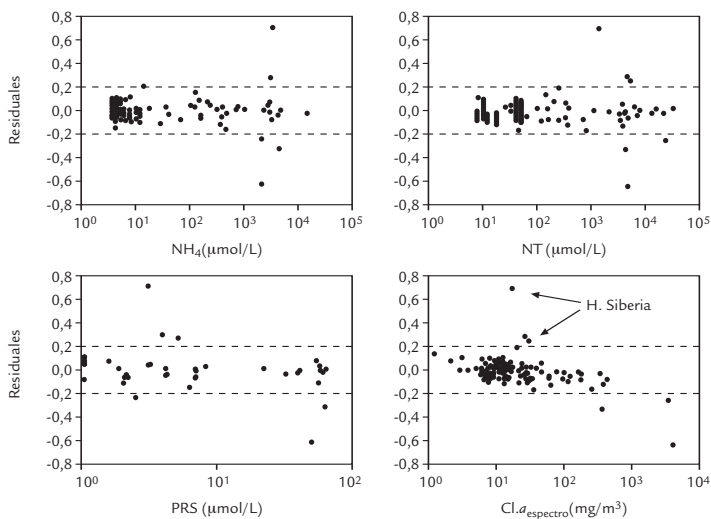


Figura 2. Análisis gráfico entre los residuales del modelo $\arcseno H (\log_{10} Cl.a_{espectro.}) = 0,1589 + 0,8789 \times \arcseno H (\log_{10} Cl.a_{fluorom.})$ ($r = 0,93$; $DS = 0,1$; $n = 172$; $p < 0,001$), y la concentración de nutrientes y clorofila-*a*. * Las líneas indican dos DS del modelo. NH_4 : amonio disuelto; NT: nitrógeno total; PRS: fósforo reactivo soluble; $Cl.a$: clorofila

DISCUSIÓN

La sobreestimación de los valores de $Cl.a$ por el método espectrofotométrico ha sido ampliamente documentada en la literatura (Rowan, 1989). Los valores de sobreestimación por la aplicación de la fórmula tricromática presentaron diferentes amplitudes, según la concentración de nutrientes del ecosistema. Aún así, no se puede descartar el uso de este método debido a que en los sistemas que tuvieron baja concentración de nutrientes, la sobreestimación fue en promedio del 27%. Este valor es bajo si se compara con valores $> 100\%$ descritos por Sartory (1985). Los modelos de regresión mostraron una tendencia a tener coeficientes de correlación altos y desviaciones estándares bajas, especialmente en sistemas acuáticos con bajas concentraciones de nutrientes, como es el caso del H. Llano Grande y de la L. Guatavita. El análisis de los modelos de regresión indicó que la tendencia de los resultados espectrofotométricos (independientemente de la sobreestimación) fue altamente coherente con los datos obtenidos por el método fluorométrico para el H. Llano Grande, la L. Guatavita y el H. Briceño. En concordancia con estos resultados, el análisis de los residuales del modelo y los valores de nutrientes señaló que en el H. Llano Grande y la L. Guatavita la estimación de $Cl.a$ fue más adecuada. En H. Briceño algunas de las muestras presentaron valores de clorofila y nutrientes por encima del límite establecido mediante el análisis de los residuales, por lo que la cuantificación por medio del método espectrofotométrico estuvo posiblemente sesgada en algunos casos.

Los H. Siberia y Briceño presentaron una alta mineralización, elevadas concentraciones de nutrientes y bajas concentraciones de oxígeno debido a la acumulación de

materia orgánica (inferido a partir de la concentración de nutrientes y observaciones de campo). En ambientes altamente enriquecidos y productivos como el de H. Siberia, la acumulación y descomposición de materia orgánica permite el aumento de algunos pigmentos que pueden interferir con la cuantificación de la Cl.*a*. Los feoforbidos y feofitinas son dos productos comunes de la degradación de la Cl.*a* que, al igual que los carotenoides, podrían interferir fuertemente con su determinación espectrofotométrica (APHA, 1998). Estos pigmentos no fueron cuantificados en este trabajo, y por esta razón solo es posible establecer que existe un factor asociado a la alta concentración de nutrientes que interfiere con el método. Si bien otros componentes orgánicos e inorgánicos pueden ser también los causantes de interferir con el método espectrofotométrico, el estudio de los pigmentos degradados merece especial atención en futuras investigaciones para establecer el papel de tales sustancias en las determinaciones de la Cl.*a*.

En el caso de la L. Guatavita, la inclusión de los datos del hipolimnio en el modelo incrementaron la DS debido a la mayor dispersión de los datos; no obstante, también se incrementó la correlación entre los dos métodos porque la amplitud en la estimación de la variable aumentó. Estos resultados sugieren que para L. Guatavita el método espectrofotométrico utilizado puede ser conveniente para describir los patrones verticales de distribución de la Cl.*a*, a pesar de los valores más sesgados hallados en el hipolimnio.

CONCLUSIONES

Los coeficientes de correlación obtenidos demostraron que los dos métodos presentan una tendencia semejante con el tipo de muestras analizadas, y que el método espectrofotométrico puede utilizarse con precaución en ecosistemas acuáticos con baja concentración de nutrientes. La pendiente de los modelos indica que en estos ecosistemas el método espectrofotométrico sobreestima la clorofila con respecto al método fluorométrico. Sin embargo, este método es útil para describir patrones espaciales y temporales, ante la dificultad de utilizar en forma rutinaria metodologías más exactas pero costosas. El método espectrofotométrico puede utilizarse en sistemas acuáticos con baja concentración de nutrientes y con concentraciones de clorofila-*a* inferiores a 60 mg m⁻³.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a la Pontificia Universidad Javeriana (Proyectos Nos. 786 y 1366), al Grupo de Limnología de la Universidad Jorge Tadeo Lozano y a la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología del Banco de la República (No. 1366) por la financiación. Al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología "Francisco José de Caldas", por su importante apoyo y financiación en el inicio de la línea de estudios de sistemas acuáticos de montaña. A la CAR-SIRAP, por su colaboración durante los muestreos. A la Empresa de Acueducto y Alcantarillado de Bogotá, por la realización de los análisis físicos y químicos de los humedales. A Ricardo Orjuela y Vladimir Páez por su colaboración en campo.

BIBLIOGRAFÍA

APHA, American Public Health Association, American Waterworks, Association (AWWA), Water Pollution Control Federation (WPCF). Standard Methods for Examination of Water and Sewage and Wastewater. 20a ed. New York; 1998.

BANDERAS A, GONZÁLEZ R, LANZA G. Limnological Aspects of a High-Mountain Lake in Mexico. *Hydrobiologia*. 1991;224:1-10.

BÜHRER H. Problems in Estimation of Pheophytine. *Verh Internat Verein Limnol*. 1991;24:1259.

DONATO J. Fitoplancton de los lagos andinos del norte de Sudamérica (Colombia). Composición y factores de distribución. *Rev. Acad. Colomb. de Cienc. Exact. Fís. Nat. Colección Jorge Álvarez Lleras No. 19*; 2001.

FELIP M, CATALAN J. The Relationship Between Phytoplankton Biovolume and Chlorophyll in a Deep Oligotrophic Lake: Decoupling in Their Spatial and Temporal Maxima. *J Plankton Res*. 2000;22(1):91-105.

GREGOR J., B. MARŠÁLEK. Freshwater Phytoplankton Quantification by Chlorophyll a: A Comparative Study of *in vitro*, *in vivo* and *in situ* Methods. *Water Res*. 2004;38:517-522.

HAKANSON L, BOULIN V. The Lake Foodweb. Leiden: Backhuys Publishers. 2002.

_____, PETERS R. Predictive Limnology. Methods for Predictive Modeling. Amsterdam: SPB Academic Publishing; 1995.

LEGENDRE P, LEGENDRE L. Numerical Ecology. Developments in Environmental Modelling, 20. 2ª ed. Amsterdam: Elsevier Science; 1998.

PÉREZ G, QUEIMALIÑOS C, MODENUTTI B. Light Climate and Plankton in the Deep Chlorophyll Máxima in North Patagonian Andean Lakes. *J. Plankton Res*. 2002;24(6):591-599.

PINTO A, VON SPERLING E, MOREIRA R. Chlorophyll-*a* Determination Via Continuous Measurement of Plankton Fluorescence: Methodology Development. *Water Res*. 2001;35(16):3977-3981.

RAMÍREZ J, ALCARÁZ H. Dinámica de la producción primaria fitoplanctónica en un sistema eutrófico tropical: Laguna del Parque Norte, Medellín, Colombia. *Caldasia*. 2002;24(2):411-423.

ROWAN K. Photosynthetic Pigments of Algae. USA: Cambridge University Press; 1989.

SARTORY D. The Determination of Algal Chlorophyllous Pigments by High Performance Liquid Chromatography and Spectrophotometry. *Water Res*. 1985;19(5):605-610.

WELSCHMEYER N. Fluorometric Analysis of Chlorophyll a in the Presence of Chlorophyll b and Pheopigments. *Limnol Oceanogr*. 1994;39(8):1985-1992.

WETZEL R, LIKENS G. Limnological Analyses. 3rd. ed. New York: Springer-Verlag; 2000.