5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 ÁREA DE ESTUDIO.

El Lago de Pátzcuaro se encuentra ubicado en el Estado de Michoacán, en la región sur del Altiplano Mexicano (19°31’ y19°42’ N, 101°32’ y 101°43’ O) a una altitud de 2, 035 msnm. Posee una superficie de 919 km^2 y se caracteriza por ser un lago tropical de alta montaña de cuenca endorreica, alimentado por manantiales y arroyos temporales superficiales durante la temporada lluviosa (Chacón, 1993; Alonso-EguíaLis y Huerto, 2005; ver figura 3).

Figura 3. Mapa del Lago de Pátzcuaro y localidades de muestreo.

Mediante una salida de prospección se seleccionaron cuatro localidades bajo el criterio de máximo a mínimo impacto y que corresponden a: 1) plantas de tratamiento de humedales (Cucuchucho y Santa Fe de la Laguna) que clasificamos de manera general con dos tipos de ambientes con capacidad de desarrollar macroinvertebrados bentónicos: a) La laguna de maduración que forma parte del proceso de depuración del agua en tratamiento y al que llamamos ambiente artificial y b) el ambiente generado por el efluente de cada humedal de tratamiento y al que denominamos ambiente natural; 2)

salida directa al lago de una descarga urbana municipal de agua sin ningún tipo de tratamiento (Tzintzuntzan); y 3) sitio natural o de menor impacto dentro del lago (Oponguio) de acuerdo a los análisis previos de Alonso-EguíaLis y Huerto (2005).

HUMEDAL ARTIFICIAL DE CUCUCHUCHO (CUC).

Esta localidad se encuentra en el municipio de Tzintzuntzan. Previo a la construcción del humedal artificial, esta localidad servía como lugar de acumulación de aguas residuales municipales por lo que las condiciones del suelo muestra una alta carga de materia orgánica y gran fangosidad lo que provoca que algunas estaciones de muestreo sean de difícil acceso. El humedal fue construido en año 2004 a una distancia de entre 10 a 50 m del lago, diseñado para darle servicio a un total de 1,300 habitantes y con un ingreso de 1 L s^{-1}.

Foto 1 a. Ambiente generado por el efluente.

Foto1 b. Laguna de maduración (Cuc4)

En la figura 4 se muestra la ubicación de las estaciones de muestreo, donde se puede observar: la salida o efluente del humedal (Cuc1), el punto intermedio entre la salida y el lago (Cuc2), la unión del escurrimiento con el lago (Cuc3) y la laguna de maduración (Cuc4).

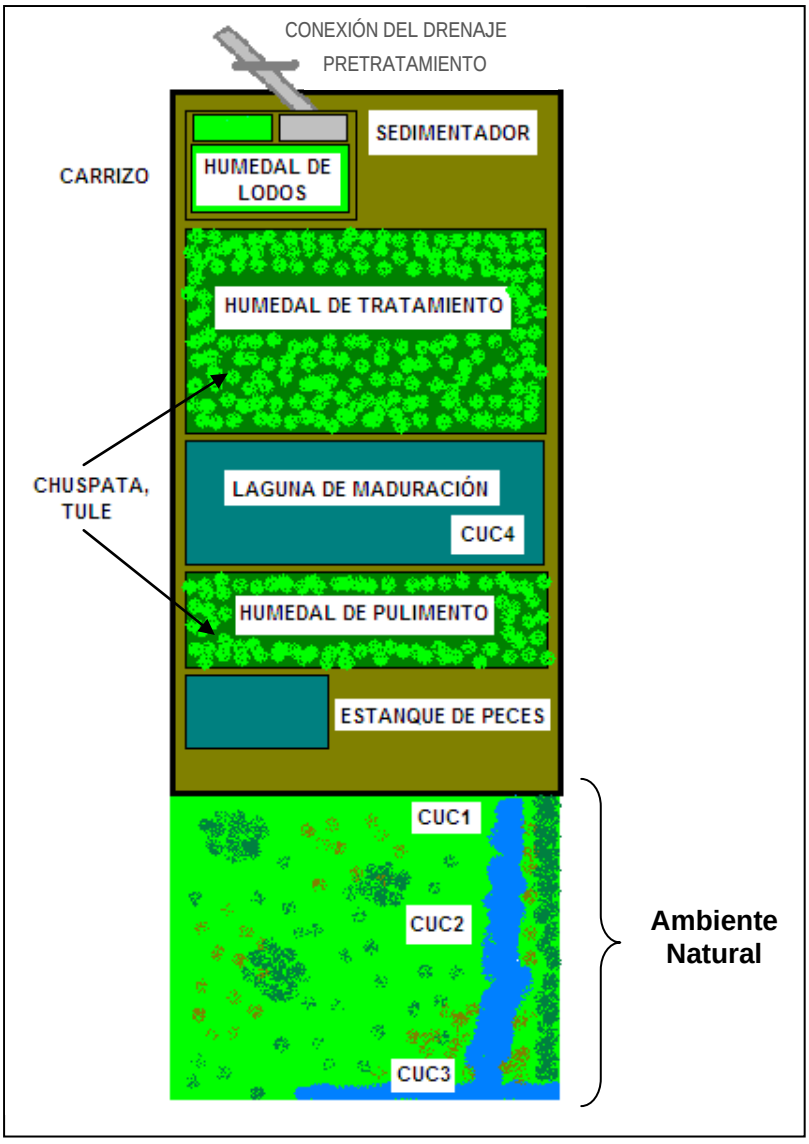

Figura 4. Humedal artificial de Cucuchucho con sus respectivos ambientes y estaciones de muestreo (tomado y modificado de Rivas y Pozo, 2004).

Las condiciones del tipo de vegetación y profundidad promedio de las estaciones de muestreo se especifican en el cuadro 3.

Cuadro 3. Características descriptivas de las estaciones de muestreo de la localidad Cucuchucho.

Estación	Tipo de vegetación	Profundidad promedio (cm)
Salida del humedal (Cuc1)	Vegetación flotante (Lentejilla) y sumergida	20
Estación intermedia (Cuc2)	Vegetación flotante (Lentejilla) y sumergida	30
Unión con el lago (Cuc3)	Vegetación emergente (*Typha sp.*) y lirio (*Eichornia crassipes*)	25
Laguna de maduración (Cuc4)	Alga adherida a la pared de la laguna	50

HUMEDAL ARTIFICIAL SANTA FE DE LA LAGUNA (SF)

Esta localidad se encuentra en el municipio de Quiroga y cuenta con una población de 4,046 habitantes (INEGI, 2005). Previo a la construcción del humedal, el uso del suelo del área cercana al lago era de tipo ganadero, mientras que en la parte lejana se practicaba la agricultura (maíz). El humedal fue construido en el año 2005 a una distancia aproximada de 10 a 50 m del lago, fue diseñado para darle servicio a un total de 2,700 habitantes (66.73% del total) y con un ingreso de 3 Ls^{-1}.

En la figura 5 se muestra la ubicación de las estaciones de muestreo, donde se puede observar: la salida del humedal (SF1), la unión del escurrimiento con el lago (SF2), la playa (SF3) y la laguna de maduración (SF4).

Foto 2 a. Ambiente generado por el efluente.

Foto 2 b. Laguna de maduración (SF4)

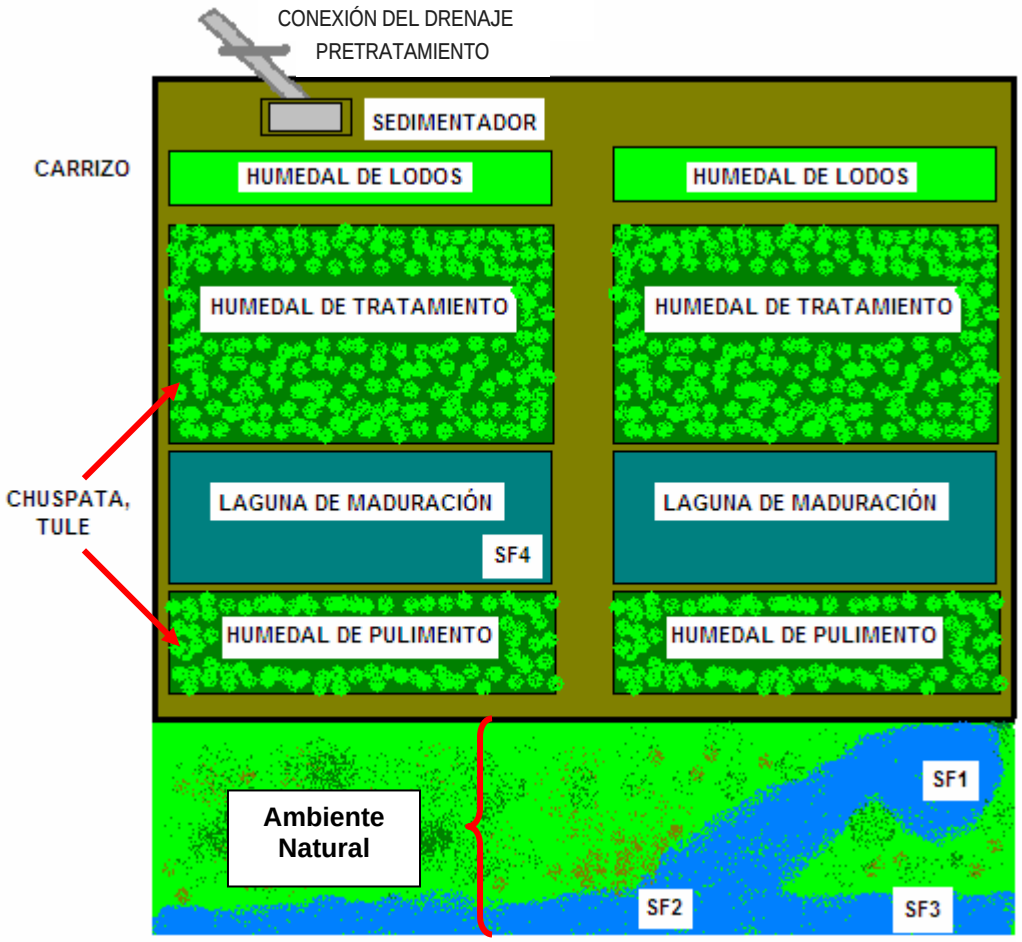

Figura 5. Humedal artificial de Santa Fe de la Laguna con sus respectivos ambientes y estaciones de muestreo (tomado y modificado de Rivas *et al.*, 2005)

Las condiciones del tipo de vegetación y profundidad de las estaciones de muestreo se especifican en el cuadro 4.

Cuadro 4. Características descriptivas de las estaciones de muestreo de la localidad Santa Fe de la Laguna.

Estación	Tipo de vegetación	Profundidad promedio (cm)
Salida del humedal (SF1)	Vegetación sumergida y emergente.	45
Unión con el lago (SF2)	Vegetación emergente (*Typha sp.*)	43
Playa (SF3)	Vegetación sumergida	29
Laguna de maduración (SF4)	Alga adherida a la pared de la laguna	50

OPONGUIO (Opo)

Esta localidad pertenece al municipio de Erongarícuaro y cuenta con 265 habitantes, lo que la hace la de menor población de todas las localidades (INEGI, 2005). La estación de muestreo se encuentra al lado de un abrevadero. Las condiciones del tipo de vegetación y profundidad de las estaciones de muestreo se especifican en el cuadro 5.

Cuadro 5. Características descriptivas de las estaciones de muestreo de la localidad Oponguio.

Estación	Tipo de vegetación	Profundidad promedio (cm)
Opo1	Vegetación sumergida y flotante.	33
Opo2	Vegetación emergente (*Scirpus sp.*) y flotante	65
Opo3	Vegetación emergente (*Typha sp.*) y lirio (*Eichornia crassipes*)	40

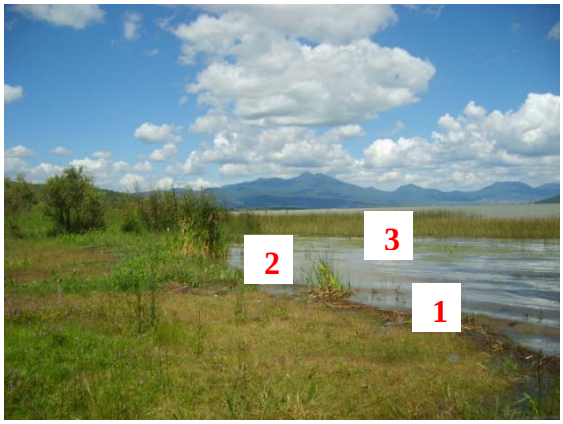

Foto 3 a. Estaciones de muestreo

Foto 3 b. Abrevadero

TZINTZUNTZAN (Tzin)

Esta localidad pertenece al municipio que lleva el mismo nombre y cuenta con 3,252 habitantes (INEGI, 2005). En la estación de muestreo existe una descarga de aguas residuales hacia un canal que desemboca en el lago, por lo que crea un ambiente muy homogéneo, razón por la cual solo se realizó un arrastre por cada salida.

Foto 4 a Descarga de agua residuales

Foto 4 b Estación de muestreo

La condición del tipo de vegetación y profundidad de la estación de muestreo se especifican en el cuadro 6.

Cuadro 6. Características descriptivas de las estaciones de muestreo de la localidad Tzintzuntzan.

Estación	Tipo de vegetación	Profundidad promedio (cm)
Canal de agua residual	Hojarasca	20

5.2 TRABAJO DE CAMPO

Para el muestro de los organismos se seleccionaron diferentes puntos bajo el criterio de un muestreo multihábitat (Barbour, 1999; Alonso-EguíaLis, 2004) que asegura las heterogeneidades ambientales del sistema y con ello una mayor representatividad biológica.

En los ambientes generados por los efluentes de los humedales artificiales (Cucuchucho y Santa Fe de la Laguna) y Oponguio se consideraron 3 estaciones de muestreo ya que existen diferentes hábitats dados por el tipo de vegetación y sustrato; mientras que en las lagunas de maduración y la localidad de Tzintzuntzan, el ambiente se mostró mucho más homogéneo (Cuadro 7)

Cuadro 7. Localización y número de estaciones de muestreo.

	Humedales de Tratamiento		**Sitio no impactado o de menor impacto**	**Salida directa de aguas residuales**
Localidades	Cucuchucho	Santa Fe de la Laguna	Oponguio	Tzintzuntzan
Coordenadas	19°35'06"N 101°37'55.8"O	19°40' 00"N 101°33'21"O	19°37'21"N 101'39'55"O	19°38'3.6"N 101°34'13.4"O
Estaciones de muestreo	4	4	3	1

Se realizaron 4 campañas de muestro en las fechas que a continuación se señalan:

1) 16 y 17 de Marzo del 2006.
2) 23 y 24 de Mayo del 2006.
3) 4 y 5 de Septiembre del 2006.
4) 4 de Marzo del 2007.

En cada estación se midieron los siguientes parámetros fisicoquímicos: Conductividad (µS cm^{-1}), Temperatura del agua (ºC), Oxígeno disuelto (mg L^{-1}), Salinidad (mg L^{-1}) y pH, que fueron tomados por un multipárametro YSI86 y un potenciómetro ORION 210A. En las localidades de Oponguio y Tzintzuntzan solo fueron tomadas en la primera y única estación respectivamente. Para la determinación de la carga de nutrientes como Nitritos (NO_2^-), Nitratos (NO_3^-), Fosfatos totales (P tot) y DBO_5, se tomaron muestras a la salida de los humedales y en las otras dos localidades en el primer sitio de muestreo; mientras que en los ambientes artificiales (laguna de maduración) no se consideró medir estas variables. Las muestras fueron tomadas según los procedimientos acreditados de calidad del laboratorio del IMTA.

El muestreo de los macroinvertebrados se trabajó bajo un esquema polietápico, dirigido y sin reemplazo (Méndez *et al*, 1990; Alonso-EguíaLis, 2004). Debido a que la mayoría de los macroinvertebrados presentan la característica de ser bentónicos fue considerado el tipo de sustrato como variable importante (Cummins, 1962), y la

presencia o ausencia de vegetación tanto sumergida como emergente o flotante, de tal forma que se abarcó taxa con distintas preferencias asociadas a sustratos como fitófilas (vegetación), psefófilas (grava), psammófilas (arena) y pelófilas (arcilla y materia orgánica) (Ward, 1992).

La captura de los organismos se llevó acabo mediante redes de cuchara de 50 x 30 cm de marco con un diámetro de abertura de malla de 0.5 mm, barriéndose un área de $1m^2$ con cada arrastre. Todo el material que se obtuvo se sumergió en alcohol etílico al 80%, para su transportación, limpieza y separación en el laboratorio.

5.3 TRABAJO DE LABORATORIO.

Las muestras de fisicoquímicos fueron analizadas en el laboratorio acreditado de la calidad del agua con la metodología del IMTA CAQAF6- 21, 28, 29 y 45, fundamentados en la NMX-AA-028, 029 y 079- SCFI-2001 y NMX-AA-099-1987.

Las muestras biológicas fueron tamizadas por una malla de tamaño del número 30, en el cual se eliminó la vegetación y piedras de gran tamaño; posteriormente se continuó con la separación de los organismos de la materia orgánica por medio de la observación en microscopio estereoscopio (ZEISS). Los organismos fueron contados e identificados taxonómicamente a nivel de género, mediante las claves de Adams y Vaughan (2004), McCafferty (1983), Merritt y Cummins (1996), Novelo-Gutiérrez (1997 a y b), Pennak (1978), Smith (2001) y Wiggins (1996) mientras que aquellos organismos en los que no fue posible la identificación a nivel de género (por falta de claves para algunos taxa como dípteros, moluscos y nemátodos) se les diferenció como morfoespecies y se les asignó un número para su diferenciación y conteo.

5.4 ANÁLISIS DE DATOS

Se describieron estadísticamente los parámetros fisicoquímicos para determinar tendencias y rangos de las concentraciones en los que se presenta la comunidad de macroinvertebrados.

Con el fin de determinar si las condiciones ambientales se están viendo afectadas por factores espacio temporal se aplicó un MANOVA de dos vías (localidad y tiempo).

Se obtuvieron las propiedades emergentes de las comunidades de macroinvertebrados como son riqueza (*S*), densidad, frecuencia, rareza (individuos con densidad relativa menor al 1%) dominancia (*D*), además del grupo funcional el cual dará una idea de la complejidad de la estructura trófica de la comunidad.

Para conocer la diversidad se calculó el Índice de Shannon-Wiener (*H'*) por ser el más empleado, éste asume que el muestreo de los individuos fue aleatorio a partir de una población indefinidamente grande y que todas las especies están representadas en la muestra; los valores obtenidos cercanos a cero indicarán baja diversidad, en cambio mientras aumenta el valor, aumenta la diversidad sin sobrepasar el valor cinco (Krebs, 1989; Alonso-EguíaLis, 2004) y el Índice de Brillouin (*HB*) ya que se basa en la no aleatoriedad de la muestra por lo que se ajusta al tipo de muestreo empleado en este trabajo (Magurran, 1989; Alonso-EguíaLis, 2004). Ambos índices se calcularon con sus respectivas equitatividades, estimados con el programa MVSP (Multivariate Statistical Package) versión 3.0.

Con la finalidad de conocer la calidad del agua a través de la comunidad se calculó el Índice Biótico de Hilsenhoff (IBH; 1988) que considera la relación de los valores de tolerancia característicos de cada taxa así como su densidad. Los valores de tolerancia para cada taxón han sido previamente establecidos y aceptados por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos y puede ser consultado en Barbour

et al (1999). Para aquellos géneros cuyos valores de tolerancia específicos no fueron encontrados, se realizó un promedio de los valores pertenecientes a la misma familia.

El valor obtenido del IBH indicará el estatus de calidad del agua y grado de contaminación orgánica del sitio de muestreo siguiendo los rangos que se indican en el cuadro 8.

Cuadro 8. Clasificación de la calidad del agua en base al Índice Biótico de Hilsenhoff (1988).

Valor de IBH	Calidad del Agua	Grado de contaminación orgánica
0.00 - 3.50	Excelente	Sin contaminación aparente
3.51 - 4.50	Muy buena	Contaminación ligera
4.51 – 5.50	Buena	Contaminación poco aparente
5.51 – 6.50	Regular	Contaminación poco significante
6.51 – 7.50	Regular pobre	Contaminación significante
7.51 – 8.50	Pobre	Contaminación muy significante
8.51 – 10.00	Muy pobre	Contaminación severa

En este estudio se realizó la comparación del valor del Índice Biótico en presencia y ausencia de la familia Corixidae, ya que ésta, además de estar presente en todos los sitios, presenta una alta tolerancia a la contaminación, por lo que se buscó conocer si la presencia o ausencia de esta familia podía modificar los valores del índice en todas las localidades.

Con objeto de evitar cualquier tipo de sesgo debido a posibles diferencias en el esfuerzo de muestreo entre los ambientes generados por los efluentes de los humedales artificiales, Oponguio y Tzintzuntzan, además de permitir una comparación estadística válida de los atributos de la comunidad, los valores de *S*, *H'* y *D* se calcularon mediante técnicas de rarefacción (Montecarlo) basadas en la teoría de la hipótesis nula, en el número de individuos (Gotelli y Colwell, 2001).

Los análisis de rarefacción se realizaron utilizando el software EcoSim V 7.72 (Gotelli y Entsminger, 2004). En este tipo de análisis, los atributos de la comunidad se estiman a medida que el tamaño de la muestra (*n*) disminuye desde un valor máximo, el cual está dado por el número total de individuos detectados (*N*) en cada sitio de estudio

(Gotelli y Colwell, 2001). Así, cada valor de *S*, *H*' y *D* se estima desde *N* hasta 1. Es importante destacar que si el valor de *N* difiere entre localidades, las comparaciones de *S*, *H*' y *D* sólo son posibles a valores de *n* iguales entre sitios. En los análisis de rarefacción, los valores de *S*, *H*' y *D* de cada localidad se estimaron 1,000 veces para cada tamaño de muestra *n*.

Todos los valores estimados de *S*, *H*' y *D* fueron representados gráficamente vs sus respectivos valores de *n* para observar variaciones a medida que el número de individuos se incrementaba; esto es lo que se conoce como curvas de rarefacción (Gotelli y Colwell, 2001). Para determinar diferencias estadísticas entre estas localidades se calcularon los intervalos 95% de confianza para cada valor de de *S*, *H*' y *D* a cada tamaño muestral *n* como: $\bar{x} \pm [(\sqrt{s^2}) * 1.96]$, $\bar{x}$ es el valor promedio de *S*, *H*' o *D* para un dado nivel de *n* y s^2 es su varianza asociada. Así, se determinó que existían diferencias significativas entre las localidades si los intervalos de confianza de *S*, *H*' o *D* a un dado valor de *n* no se solapaban.

Para conocer si las comunidades de macroinvertebrados responden diferencialmente a los ambientes estudiados se aplicó un análisis de similitud de Jaccard, el cual permite agrupar las zonas de estudio, tomando como base la presencia o ausencia de los taxa, y la proporción del elenco compartido (Magurran, 1989; Alonso-EguíaLis, 2004). Fue estimado al igual que los índices de diversidad con el programa MVSP.

Las formulas de los índices y coeficiente se encuentra en el anexo 1.