

Aspectos ecológicos y metodológicos del muestreo, identificación y cuantificación de cianobacterias y microalgas eucariotas

Julio Ricardo Moreno. Cesar Dante Medina. Virginia Helena Albarracín.

Facultad de Ciencias Naturales e IML. Universidad Nacional de Tucumán. Miguel Lillo 205-4000.
San Miguel de Tucumán. Argentina.

Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas de Lagunas Andinas LIMLA. Planta Piloto de Procesos
Industriales Microbiológicos PROIMI-CONICET. Av. Belgrano y Pje. Caseros 4000.
San Miguel de Tucumán. Argentina.

julio_m@live.com.ar cesardantemedina@yahoo.com.ar virginia@proimi.org.ar

Resumen: mediante el muestreo de un cuerpo de agua, empleando red de plancton, obtendremos muestras de cianobacterias y microalgas eucariotas. Una vez realizada la identificación taxonómica, se realizarán análisis cualitativos y cuantitativos de los mismos para determinar la riqueza y abundancia de especies presentes. Finalmente, con parte de las muestras colectadas, extraeremos y cuantificaremos los pigmentos fotosintéticos para comparar los resultados obtenidos con los del análisis cuantitativo.

Palabras clave: Muestreo. Identificación. Cuantificación. Plancton. Fitoplancton. Cianobacterias. Microalgas. Clorophytas. Euglenophytas. Dinophytas. Bacillariophytas. Riqueza. Abundancia. Biomasa. Clorofila. Carotenoides.

INTRODUCCIÓN

Las algas son un grupo polifilético de organismos fotótrofos oxigénicos, auxotróficos o facultativamente heterótrofos, restringidos a ambientes húmedos por la ausencia de mecanismos de protección contra la desecación. Algunos autores incluyen dentro de esta denominación tanto a organismos procariontes como eucariotas. Al tratarse de un grupo sumamente heterogéneo es difícil resaltar características generales del grupo, por lo cual lo más objetivo es realizar estudios específicos para cada grupo.

MUESTREO

Las microalgas constituyen un grupo muy amplio y heterogéneo, por lo tanto la metodología de muestreo es diversa, debiendo ser específica para cada objetivo planteado. Así, el tipo de muestreo empleado se realiza de acuerdo al tipo de comunidad de microalgas que se quiera estudiar (Alvear *et al*, 1995). Por ejemplo, si el objetivo de la

investigación es describir las especies presentes en el agua superficial de un lago, es decir, la comunidad planctónica, se utilizarán redes de plancton seleccionando las estaciones de muestreo de acuerdo a la morfometría del cuerpo de agua. Esta recolección de muestras se realizará en el mismo lugar que la toma de muestras físico-químicas u otras muestras biológicas. Además, si el tipo de estudio es cualitativo, el muestreo se efectuará sin tener en cuenta el volumen de agua. Por lo tanto, el microbiólogo utiliza técnicas que permiten obtener una muestra representativa del ambiente (Tabla 1).

Tipo de Ambiente	Nº de muestras/Tipo	Tipo de Comunidad	Procedimiento
Ambientes lentos.	Cualitativa: Muestra discreta de superficie o a determinada profundidad.	Microplancton (>20 µm).	Toma de muestra discreta a 30 cm por debajo de la superficie y filtrarla con la red de plancton.
		Nanoplancton (2-20 µm).	Fijar las muestra para conservarlas.
		Picoplancton (0,2-2 µm).	Sin fijar para la observación de celular vivas y determinación de concentración de pigmentos fotosintéticos.
	Cuantitativa: Muestra a una profundidad discreta.		Toma de muestra integral del cuerpo de agua con una botella esterilizada y con volumen conocido. Fijar las muestras con formaldehído al 4% Conservarlas al resguardo de la luz.

Tabla 1. Parámetros de muestreo.

Es común encontrar componentes del fitobentos al hacer colecta de muestras del plancton. Esto ocurre debido a que existe cierto equilibrio dinámico entre la región planctónica respecto de la bentónica y viceversa y diferentes grupos de algas pueden ocupar ambas regiones indistintamente en periodos variables a lo largo de su ciclo de vida. En la figura 1, se muestra esta interacción dinámica esquematizada en un ambiente hipotético, donde inicialmente debemos diferenciar dos zonas principales, la región planctónica y la región bentónica. En **A** se observan las algas epífitas (**e**), formas filamentosas y unicelulares, presentes sobre algas macrófitas (**m**). Las algas filamentosas pueden desprenderse para formar masas de plancton en el techo de la columna de agua, que posteriormente mediante procesos reproductivos pueden fragmentarse y parte de la descendencia retomar una ubicación bentónica mientras el resto continua integrando el plancton. En **B**, algas bentónicas, se separan del sustrato. Esto puede darse posiblemente por acción de las corrientes de agua que debilitan el anclaje al sustrato o simplemente puede tratarse de células especializadas de resistencia o colonias que presentan mecanismos de flotación y se incorporan a la zona planctónica. En **C** algas típicamente unicelulares presentes dentro de un biofilm, originado por medio de su matriz mucilaginosa donde se pueden incorporar otros microorganismos, se liberan y pueden trasladarse con ayuda de las corrientes de agua y al retornar a un sustrato iniciar la formación de un nuevo biofilm o pasar a formar parte del plancton. Finalmente en **D** se observa que el crecimiento prolongado de algas filamentosas puede formar una densa

capa denominada perifiton. Las algas filamentosas están típicamente ligadas a superficies sólidas como rocas, y se propagan vegetativamente por fragmentación de sus talos.

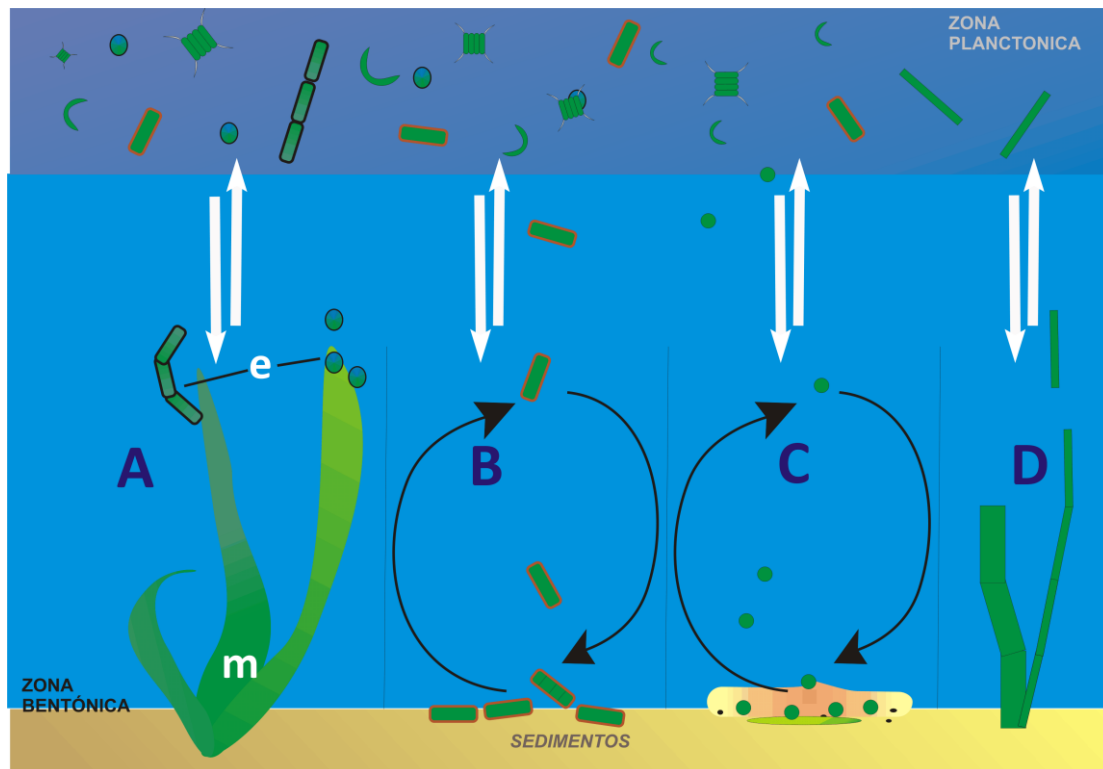


Figura 1. Interacción dinámica plancton-bentos en un ambiente hipotético.

IDENTIFICACIÓN

Para la identificación de las microalgas se utiliza un microscopio óptico y una guía de identificación e iconografías que nos guiarán en las características observables. No obstante, es imprescindible la guía de un profesional con experiencia para una buena determinación taxonómica.

De acuerdo a cada grupo taxonómico para una correcta determinación es necesario procesar a las muestras previamente fijadas. Por ejemplo, como la clasificación de las diatomeas se basa en la estructura de sus frústulos es necesario hacer una limpieza de la materia orgánica (el procedimiento a realizar se explica en las Actividades). Existen técnicas de tinción que ayudan a determinar la presencia de sustancias características de cada grupo taxonómico. Por ejemplo, se puede determinar presencia de almidón intraplástico (sustancia de reserva característica de las algas verdes), y la determinación de núcleo por tinción con carmín acético no solo sirve para diferenciar en primera instancia algas eucariotas de las procariotas, sino también presencia de células multinucleadas (carácter de valor taxonómico).

CUANTIFICACIÓN

El análisis cuantitativo del fitoplancton consiste en realizar un inventario de los taxones y un recuento de los individuos presentes de cada taxón. La estrategia para el recuento dependerá de los objetivos a conseguir, y especialmente del nivel taxonómico es decir, especie o género. Se recomienda realizar previamente un análisis cualitativo de la muestra, antes de iniciar el recuento para confeccionar una lista de los taxones presentes y una visión general de la densidad de microalgas. Existen dos estrategias alternativas para el recuento:

- Recuento de un número de campos ópticos del microscopio seleccionados al azar.
- Recuento de toda la cámara o cubeta de sedimentación (Figura 2).

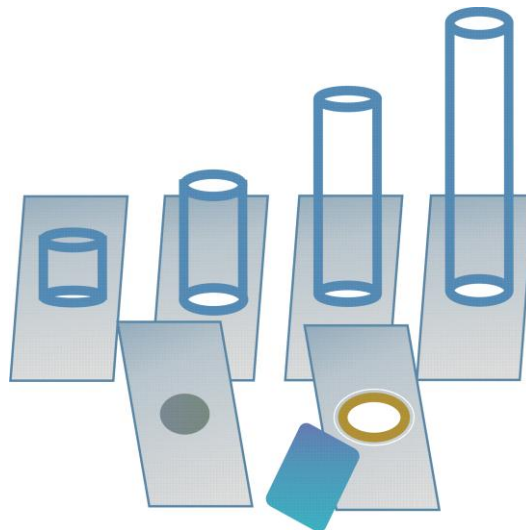


Figura 2. Cámaras de sedimentación de Utermöhl.

El recuento de microalgas nos proporciona un dato representativo de la estructura de la comunidad fitoplanctónica, es decir: la concentración de células expresada en individuos por mililitros (Células / mL). También nos permite graficar la proporción de cada taxón en el total de la comunidad (Figura 3).

En base al recuento podemos aplicar un índice para calcular la biodiversidad; por ejemplo el Índice de Shannon-Weaver (D):

$$D = \sum_{i=1}^S p_i \times \log_2(p_i)$$

Donde:

D: Índice de diversidad de Shannon.

S: Número de especies en la muestra.

p_i : abundancia relativa de i^{th} taxa en la muestra.

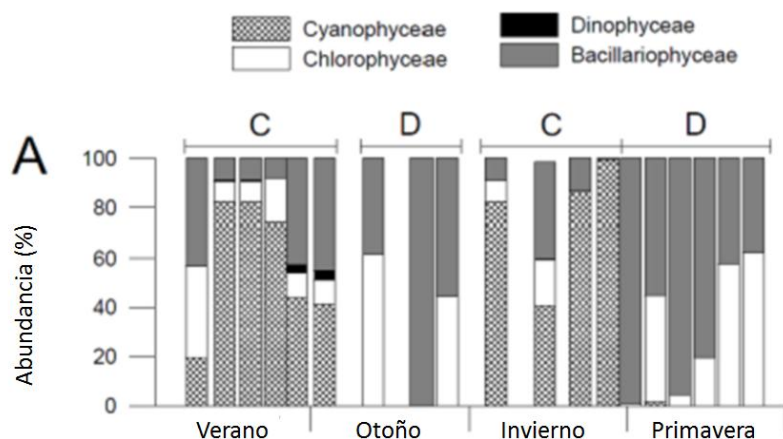


Figura 3. Ejemplo de abundancias relativas de Cianobacterias y Microalgas, y su variación estacionaria. Tomado de Goncalves *et al* 2011.

ASPECTOS ECOLOGICOS

El gran interés y motivo por lo que las microalgas son intensamente objeto de investigación es que son los principales productores primarios. La producción primaria depende del proceso fotosintético llevado a cabo por los organismos autótrofos que en los ecosistemas acuáticos incluye al fitoplancton, fitobentos y macroalgas.

ASPECTOS METODOLOGICOS

Técnicas de medición de la producción fitoplanctónica

Existen varias técnicas para medir la producción primaria fitoplanctónica. La mayoría de las técnicas para medir el proceso fotosintético tales como la producción de carbohidratos o la liberación de oxígeno se enumeran a continuación.

- Incorporación de radiocarbono.
- Producción de oxígeno.
- Carbono 13.
- Estimación desde sensores remotos.
- Fluorescencia natural a 683 nm.
- Medición de pulso de fluorescencia.

OBJETIVOS

- **Realizar un muestreo cualitativo** de microalgas a partir de un cuerpo de agua mediante red de plancton.

- **Realizar un muestreo cuantitativo** para el conteo de algas previa sedimentación.
- **Observación e identificación** de microalgas a partir de muestras vivas o fijadas con tinciones simples que permitan diferenciar algunas estructuras especiales (por ejemplo: vainas, núcleos, plastos).
- **Realización de limpieza de frústulos** de diatomeas, para la diferenciación de estructuras de importancia taxonómica.
- **Calculo de la diversidad** aplicando el índice de Shannon-Weaver.
- **Aislamiento de pigmentos fotosintéticos** y cuantificación de biomasa fitoplanctónica a partir de cultivos puros y muestras de cuerpos de agua dulce.

ACTIVIDADES

Muestreo

Elaborar una planilla de muestreo indicando los datos necesarios a registrar. Considere el sitio de muestreo y método a elegir dependiendo de los objetivos y tenga en cuenta que debe ubicarse cerca del sitio de muestreo fisicoquímico.

Identificación

- Aplicar las claves e iconografías para la identificación.
- Emplee coloraciones para diferenciar entre los grupos taxonómicos. (Azul de metileno para diferenciar vaina y capsula de carácter mucilaginoso en cianobacterias. Lugol para determinar presencia de clorofila intraplastidial en Chlorophytas. Para determinar la presencia de núcleo o diferenciar células o artículos multinucleados seguir el protocolo de tinción con Carmín Acético).
- Lavado de frústulo para la clasificación de las Diatomeas (Fig. 4). Las Diatomeas (Bacillariophyceae) son microalgas caracterizadas, entre otras cosas, por la presencia de una pared celular formada por un frústulo silíceo bivalvo unido por fibras de exopolisacáridos. En la identificación taxonómica se emplea como principal carácter la morfología, ornamentaciones y demás detalles presentes en el frústulo. Para poder diferenciar correctamente dichas estructuras es necesario "limpiar" el frústulo para observar con mayor claridad cada detalle, por lo cual se elimina el sedimento asociado y el contenido orgánico de las células. Para realizar el lavado de pared silíceo algal deben seguir las siguientes indicaciones adaptadas del trabajo de Ohtsuka, T, *et al* 2006:

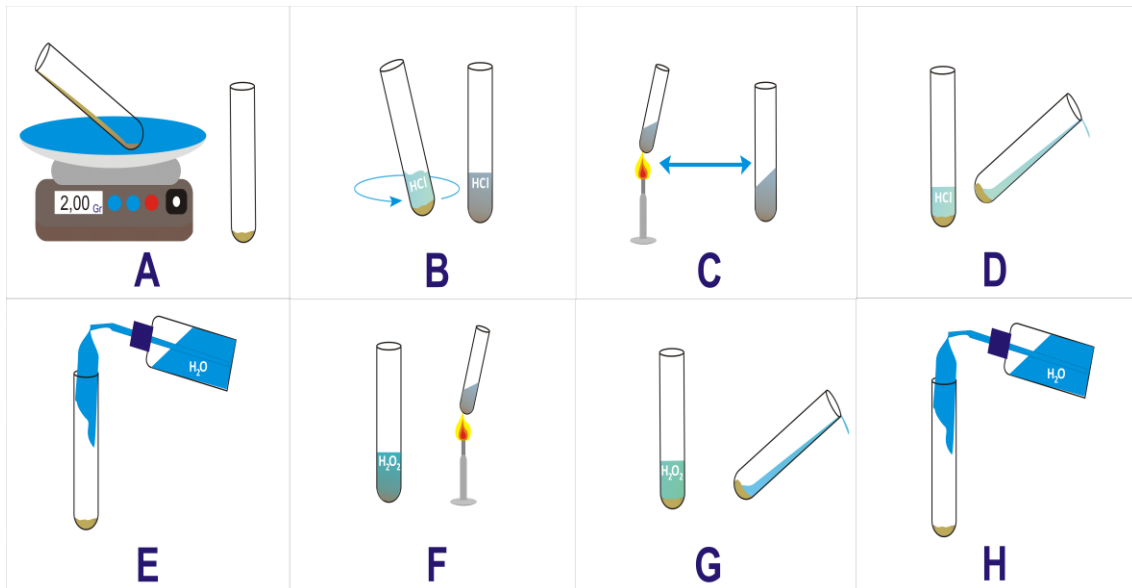


Figura 4. Representación esquemática del lavado de frústulo.

- Tomar 2 g de la muestra y colocarla en un tubo de ensayos preferentemente con tapa hermética (Fig. 4 A).
- Suspendir la muestra en 1 ml de HCl 1N y homogeneizar (Fig. 4 B).
- Exponer el tubo de ensayos al calor del mechero por 30 segundos, y dejar enfriar 10 segundos - repetir 5 veces (Fig. 4 C).
- Dejar sedimentar 10 minutos y eliminar cuidadosamente el HCl (Fig. 4 D).
- Enjuagar al menos 3 veces con agua destilada (Fig. 4 E).
- Añadir 5 ml de peróxido de hidrógeno al 20% y exponer al calor del mechero por 30 segundos, y dejar enfriar 10 segundos - repetir 5 veces (Fig. 4 F).
- Dejar sedimentar 5 minutos y eliminar cuidadosamente el peróxido de hidrógeno. (Fig. 4 G).
- Enjuagar con agua destilada repetidamente. (Fig. 4 H). Observar al MO a una magnificación de 40x y luego a 100x.

Cuantificación

Para el conteo de organismos es necesario corroborar la distribución al azar de las células independientemente del método a utilizar. En general se puede contar un número mínimo de células en un área de la cámara que puede ser variable o bien contar células en un área fija (por ejemplo, la mitad de la cámara, o un número constante de transectas

o campos). En cualquier caso es necesario ser consistente para el conjunto de muestras que se van a contar.

A continuación se enumeran las distintas formas de conteo para muestras con alta densidad:

- Enjuagar con agua destilada repetidamente. (Fig. 4 H). Observar al MO a una magnificación de 40x y luego a 100x.
- En una alícuota de muestra observada en porta-objetos convencional (sin cámaras).
- Utilizando cámaras que contienen un volumen conocido siendo las más apropiadas para fitoplancton: a) Palmer-Maloney, b) Sedgwick-Rafter, c) Neubauer (Fig. 5) y d) Petroff-Hauser. Para esta práctica emplearemos cámaras de Neubauer y Sedgwick-Rafter.

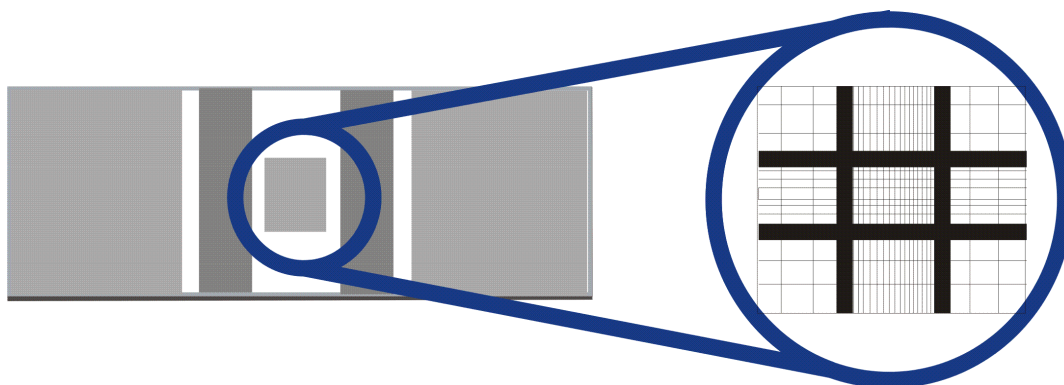


Figura 5. Esquema de la cámara de recuento celular de Neubauer.

Para muestras con baja densidad los métodos son:

- Filtración.
- Centrifugación.
- Sedimentación.

Cuantificación con cámara de Neubauer

La cámara de Neubauer puede tener una o dos cuadrículas, en nuestro recuento (Fig. 6) emplearemos una cámara de una sola cuadrícula (cuadrícula simple).

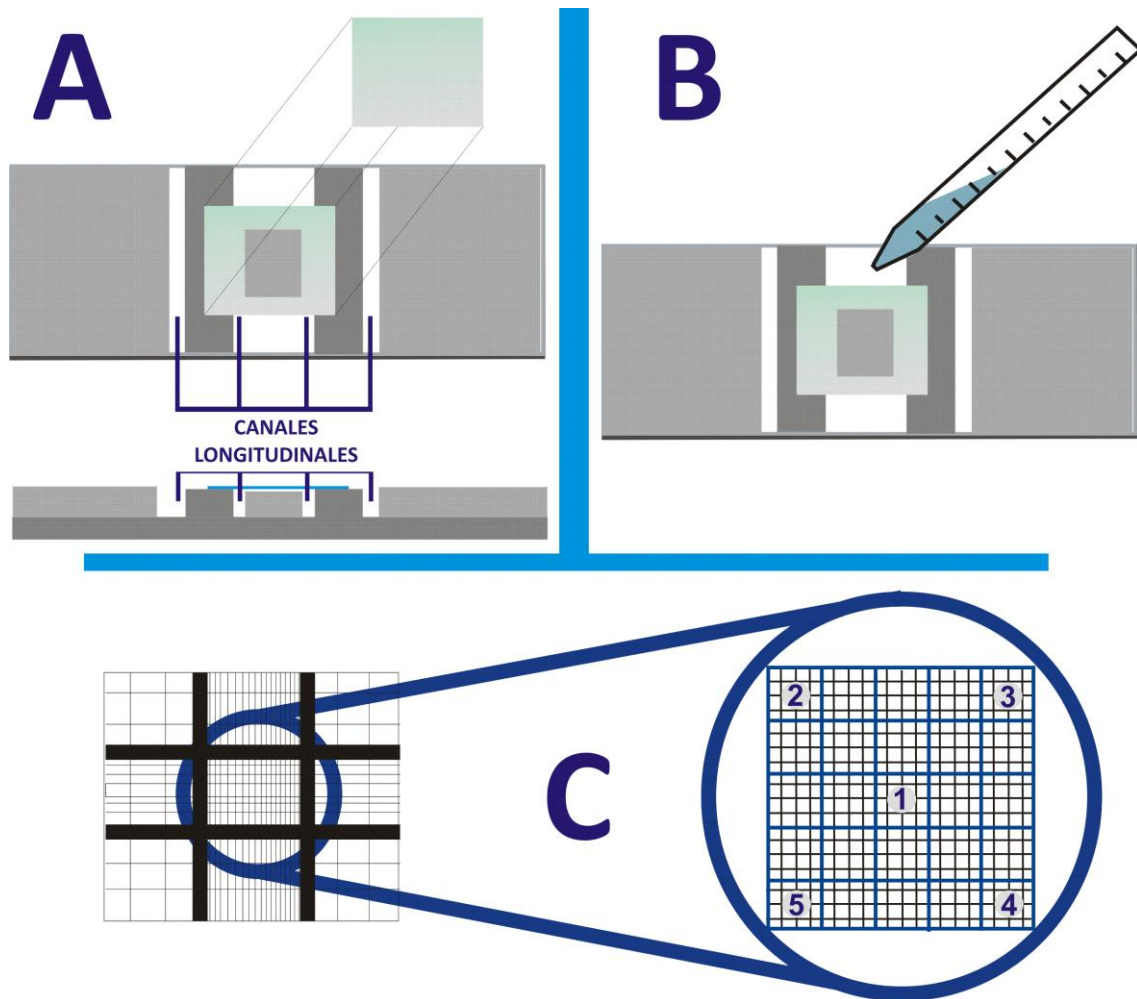


Figura 6. Procedimiento de cuantificación de fitoplancton con cámara de Neubauer de cuadrícula simple.

Los pasos a seguir para la cuantificación de la muestra natural o del cultivo puro algal son los siguientes:

- Colocar el cubre objetos sobre la cuadrícula de la cámara de Neubauer (Fig. 6 A).
- Llenar la cámara de Neubauer colocando la punta de la pipeta en la ranura ubicada entre el cubre objetos y la superficie de la cuadrícula (Fig. 6 B); dejar reposar la muestra 2 minutos.
- Observar al Microscopio óptico a una magnificación de 40X y apreciar el rayado de líneas brillantes que marcan el cuadrante central y los cuatro cuadrantes exteriores (Fig. 6 C). Cada célula algal se diferenciará como un punto color verde oscuro sobre el fondo amarillo. Se debe contar cada punto en cada uno de los cinco cuadrantes, luego sumar el resultado para obtener el número de células por mL.

- En algunos casos la densidad de células es tan alta que se requieren de métodos de dilución para realizar el recuento por este método, en este caso, luego de sumar el resultado obtenido, se debe multiplicar por el factor de dilución (ejemplo: si a una muestra de 100 ml la diluimos 5 en 100, el factor de dilución será de 20).

Cuantificación con cámara de Sedgwick-Rafter

La cámara de conteo Sedgwick- Rafter cuenta las células en una celda de conteo estándar, diseñada para contar plancton en un microscopio compuesto o en un microscopio invertido. Consiste en un marco de cerámica rectangular de una capacidad volumétrica de 1 ml. Posee un grabado de 1000 cuadrados y está cubierto por un cubreobjetos espeso. Procedimiento (Fig. 7):

- Extraer una muestra de la suspensión de microalgas empleando una pipeta graduada. Llenar lentamente la cámara de Sedgwick-Rafter, girando la parte posterior del cubreobjetos (Fig. 7 A).
- Dejar reposar cinco minutos para permitir que las células se depositen en el fondo de la cámara y examinar a una magnificación inicial de 20X y luego 40X con un microscopio óptico convencional.
- Antes de iniciar el recuento, observar detenidamente toda la extensión de la cámara para identificar las principales especies presentes en la muestra. Compruebe que los organismos se dispersan al azar a través del área de conteo y no se encuentran restringidos a una región en particular.
- Al iniciar el recuento, seleccione una cuadrícula al azar y cuente todas las células individuales dentro de la plaza; sólo considere en el conteo aquellos organismos cercanos o superpuestos a las caras A y B-B-D de la plaza, excluyendo a los que se encuentran en contacto con las caras B-C y C-D (Fig. 7 B).
- Las cuadrículas adicionales a contar deben ser seleccionadas sobre una base objetiva, sin cualquier sesgo hacia los contenidos. Para ello, se corren cinco lugares hacia la derecha desde la plaza 1 (plaza inicial) y se continúa el conteo en la nueva plaza (plaza 2). Repita el proceso como se indica en la figura 7C.
- Como alternativa, en lugar de un intervalo fijo de cinco cuadrantes, se puede utilizar números aleatorios para determinar el espaciamiento entre los cuadrantes. McAlice *et al* 1971 demostró que en un recuento de 30 cuadrantes se puede, determinar entre el 90 y el 95% de las especies presentes en una muestra.

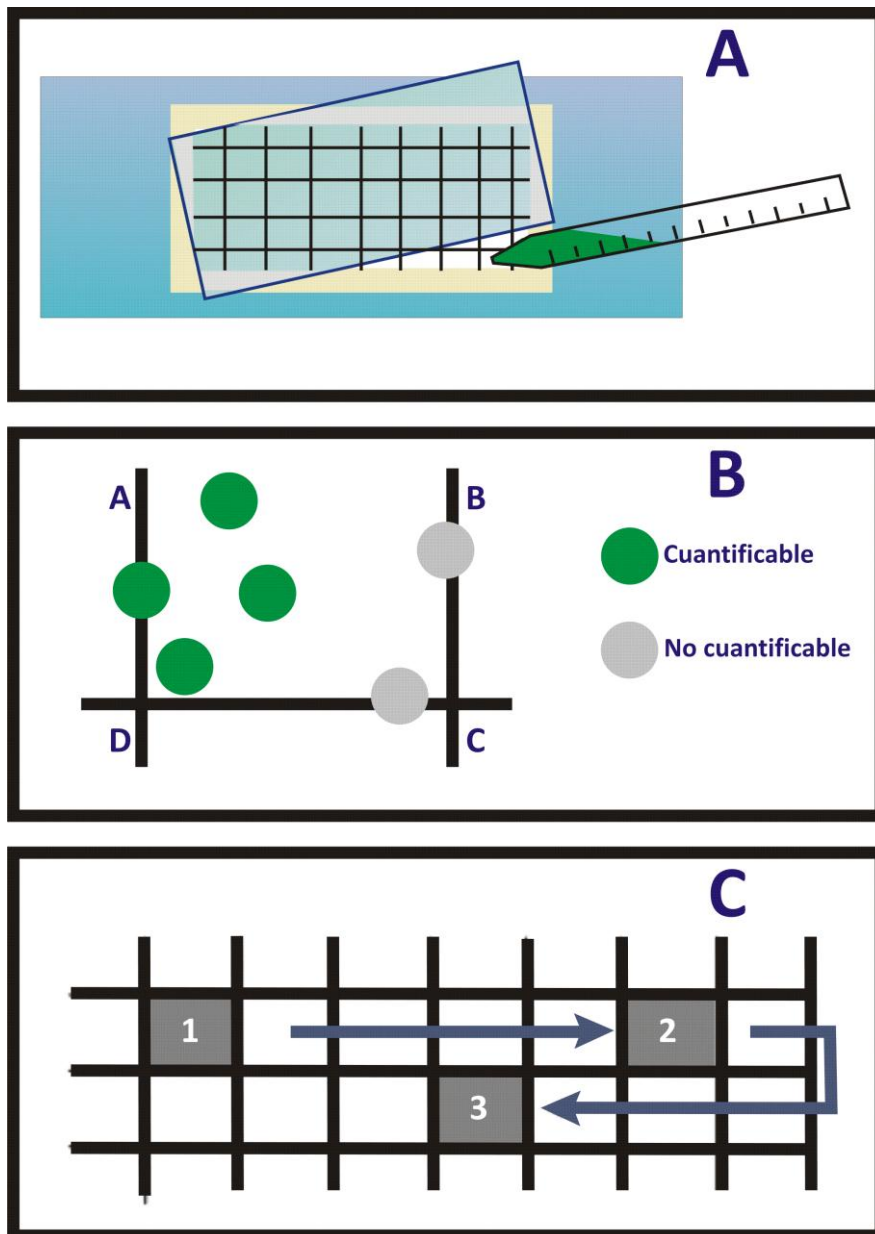


Figura 7. Procedimiento de cuantificación de fitoplancton con cámara de Sedwick-Rafter.

- Para el cálculo de la población (T) entre las especies cuantificadas en la cámara de Sedwick-Rafter utilizamos la fórmula $T = 1000 \cdot (C) / 10 \cdot (N)$, donde C es el número de organismos cuantificados en N (número de plazas). T se expresa como el número de organismos (células o colonias) presentes en 1 mL de la muestra. En el caso de las algas filamentosas y los agregados celulares se tendrán en cuenta consideraciones particulares en el momento del recuento siguiendo la guía del docente.

Calculo de biodiversidad

En base a los datos de la Tabla 2 calcular la biodiversidad D.

Especies	Nº de Individuos de cada especie	Proporción de cada especie	Logaritmo natural de la proporción de c/especie	Pi x log2 (pi)
<i>Anabaena sp.</i>	50			
<i>Microcoleus sp.</i>	80			
<i>Microcystis sp.</i>	30			
<i>Chroococcus sp.</i>	50			
<i>Eudorina sp.</i>	20			
<i>Scenedesmus sp.</i>	10			
<i>Cosmarium sp.</i>	20			
<i>Ceratium sp.</i>	25			
<i>Euglena sp.</i>	30			
<i>Phacus sp.</i>	10			
<i>Aulacoseira sp.</i>	20			
<i>Cyclotella sp.</i>	25			
<i>Cocconeis sp.</i>	30			
<i>Navicula sp.</i>	50			
<i>Pinnularia sp.</i>	30			
<i>Nitzschia sp.</i>	25			
<i>Gomphonema sp.</i>	20			
Total:				D=

Tabla 2. Cálculo de diversidad a partir del índice de Shannon (D).

Aislamiento de pigmentos fotosintéticos

Para aislar los pigmentos fotosintéticos de las comunidades algales seleccionadas emplearemos metanol como solvente. Luego con los resultados obtenidos cuantificaremos la biomasa fitoplanctónica. Procedimiento:

- Filtrar 200 ml de agua o cultivo puro utilizando los filtros de 0.5 µm.
- Colocar el filtro en un tubo falcón de 15 ml y agregar 5ml de metanol al 100%. Tapar el tubo con papel aluminio y colocar a -20°C, durante 1 h.
- Centrifugar las muestras a 1.288 g, se reservan los sobrenadantes.
- Leer los espectros de absorción de las distintas muestras entre 250 y 750 nm en un espectrofotómetro.
- Medir fluorescencia de la clorofila en un fluorómetro y antes y después de acidificar la muestra con HCl 1N.

- Calcular la concentración de clorofila mediante la siguiente fórmula y estimar la biomasa fitoplanctónica en la muestra: $C_a (\mu\text{g.l}^{-1}) = F_s \cdot (r/r-1) \times (R_b - R_a) \times (\text{Vol solvente}/\text{Vol de muestra})$, donde:

- ✓ C_a Concentración de clorofila expresada en $\mu\text{g.l}^{-1}$.
- ✓ F_s (Factor de respuesta para la sensibilidad del equipo)= C_s/R_s .
- ✓ C_s : Concentración de clorofila estándar utilizada para calibrar el equipo.
- ✓ R_s : Fluorescencia del blanco.
- ✓ r = Fluorescencia de la solución estándar pura de clorofila antes de acidificar.
- ✓ Fluorescencia de la solución de clorofila pura después de acidificar.
- ✓ R_b : Fluorescencia de la muestra sin acidificar.
- ✓ R_a : Fluorescencia de la muestra acidificada.
- ✓ Vol Solvente: ml de metanol en los que se hizo la extracción.
- ✓ Vol de muestra: ml de cultivo filtrados para hacer la extracción.

Determinación diferencial de biomasa por HPLC

Para analizar los componentes de la comunidad fitoplanctónica a partir de la biomasa total (Fig. 8), los pigmentos fotosintéticos de las comunidades algales seleccionadas deben separarse y cuantificarse para establecer la biomasa de cada especie presente. Este diagnostico puede lograrse mediante HPLC con el posterior análisis de los datos mediante una matriz de factorización, para lo cual se emplea el programa CHEMTAX (Fig. 9).

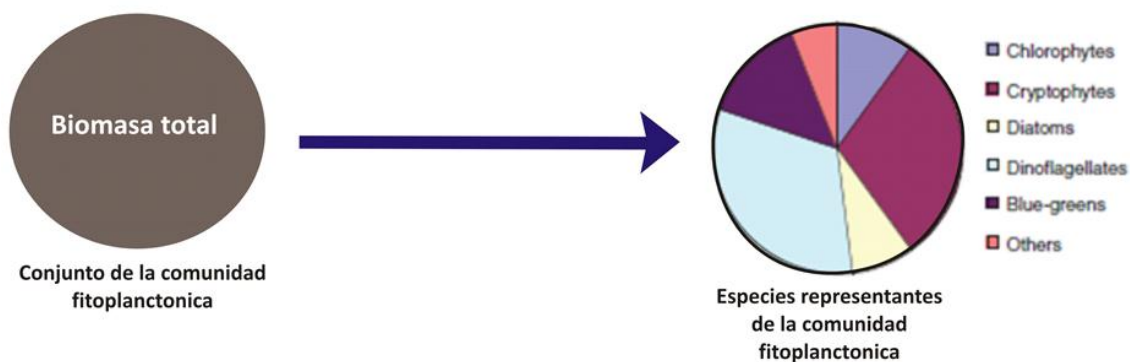


Figura 8. Diferenciación de la biomasa total.

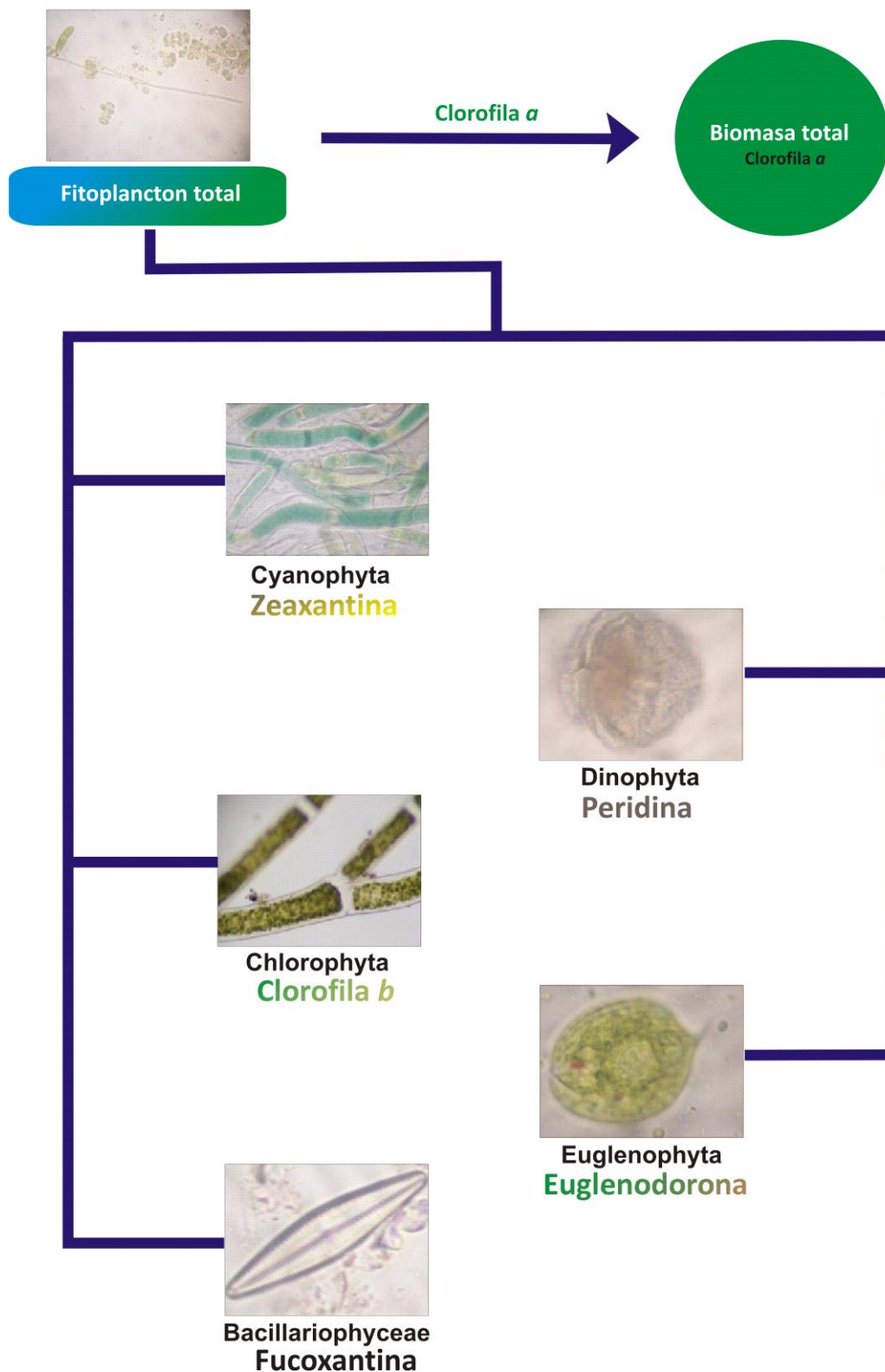


Figura 9. Esquema del diagnostico por HPLC empleando el programa CHEMTAX que permite evaluar la composición de algas de una muestra, basado en la diferenciación de pigmentos determinantes de cada grupo de algas. Adaptado de Paerl *et al* 2005.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvear, K. & Romo, H. 1995. *Manual de Métodos Ficológicos*. Universidad de Concepción. Chile. 579pp.
- Goncalves, R.J., Villafañe, V.E., Medina, C.D., Barbieri, E.S. & Helbling, W.E. 2011. Plankton dynamics and photosynthesis responses in a eutrophic lake on Patagonia (Argentina): influence of grazer abundance and UVR. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 39(1): 117-130.
- McAlicee, B.J., 1971. Phytoplankton sampling with the Sedgwick-Rafter cell. *Limnology and Oceanography*. 16: 19-28.
- Ohtsuka, T., Kudoh, S., Imura, S. & Ohtani, O. 2006. Diatoms composing benthic microbial mats in freshwater lakes of Skarvsnes ice-free area, East Antarctica. *Polar Bioscience*, 20: 113-130.
- Paerl, H.W., Dyble, J. & Pinckney, J.L. 2005. *Using microalgal indicators to assess human and climate-induced ecological change in estuaries*. In Bortone, S.A. Ed Estuarine Indicators. Boca Raton, FL, CRC Press. 145-174pp.

BIBLIOGRAFÍA DE CONSULTA

- Bourrelly, P. 1972. *Les Algues d'eau douce. Initiation a la systématique. Les algues vertes*. I Ed. N. Boubée & Cie. Paris. 572p.
- Bourrelly, P. 1981. *Les Algues d'eau douce. Initiation a la systématique. Les algues jaunes et brunes. Chrysophycées, Phéophycées, Xanthophycées et Diatomées*. II Ed. N. Boubée & Cie. Paris. 517p.
- Bourrelly, P. 1985. *Les Algues d'eau douce. Initiation a la systématique. Les algues bleues et rouges. Les Eugléniens, Peridiniens et Cryptomonadines*. Ed. N. Boubée & Cie. Paris. 606p.
- Bellinger, E.G. & Sigeo, D.C. 2010. *Freshwater Algae: Identification and use as bioindicators*. NJ. Wiley-Blackwell.
- Canter Lund, H. & Lund J.W.G. 1995. *Freshwater Algae, their microscopic world explored*. Bioprees Ltd., The Orchard, Clangage Road Bristol. 306pp.
- Cox, E.J., 1996. *Identification of Freshwater Diatoms from Live Material*. 1st Edn., Chapman and Hall, London, 158p.

- Graham, L.E. & Wilcox, L.W. 2000. *Algae*. Prentice Hall, Upper Saddle River, New York. 640p.
- Helbling, E.W., Farías, M.E., Fernández Zenoff, M. & Villafañe, V.E. 2006. In Situ responses of phytoplankton from the subtropical lake La Angostura (Tucumán, Argentina) in relation to solar ultraviolet radiation exposure and mixing conditions. *Hydrobiología*, 559: 123-134.
- Helbling, E.W., Pérez, D.E., Medina, C.D., Laguna, M.G. & Villafañe, E.V. 2010. Phytoplankton distribution and photosynthesis dynamics in the Chubut River estuary (Patagonia, Argentina) throughout tidal cycles. *Limnology and Oceanography*, 55: 55-65.
- Round, F.E., Crawford, R.M. & Mann, D.G. 1990. *The Diatoms: Biology and Morphology of the genera*. Cambridge University Press, Cambridge. 758p.
- Van den Hoek, C. 1978. *Einführung in die Phycologie*. Verlag Stuttgart. 481pp.
- Van den Hoek, C., Mann, D.G. & Jahns., H.M. 1998. *Algae: An introduction to Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge. 627pp.

Recibido: 15 julio 2012.

Aceptado: 9 octubre 2012.