

Metodología para el establecimiento el Estado Ecológico según la Directiva MARCO del Agua

Protocolos de muestreo y análisis para

FITOPLANKTON



OCTUBRE 2005



MINISTERIO
DE MEDIO AMBIENTE

CONFEDERACIÓN
HIDROGRÁFICA
DEL EBRO

Metodología para el establecimiento el Estado Ecológico según la Directiva MARCO del Agua

Protocolos de muestreo y análisis para



Este protocolo ha sido realizado por la **Confederación Hidrográfica del Ebro** con la asistencia técnica de **URS** y la colaboración de:

Eduardo Vicente. Universidad de Valencia
Caridad de Hoyos. CEDEX

Pedro Sánchez. Universidad de Granada
Jaume Cambra. Universidad de Barcelona

INTRODUCCIÓN	5
PARTE I: GENERALIDADES	
1. DEFINICIONES	9
2. VALOR INDICADOR DE LOS MACRÓFITOS	9
3. SISTEMAS INDICADORES EXISTENTES	9
3.1. Uso de las especies y de las comunidades como métricas	9
3.2. Uso de los grupos de algas e índices como métricas	10
3.3. Métricas basadas en la biomasa	10
4. PROPUESTA DE MÉTRICAS PARA LA DEMARCACIÓN DEL EBRO	11
5. DIRECTRICES PARA EL CONTROL DE VIGILANCIA Y CONTROL OPERATIVO EN BASE AL FITOPLANCTON	12
5.1. Selección de las estaciones de control	13
5.1.1. Red de referencia	13
5.1.2. Control de vigilancia	13
5.1.3. Control operativo	13
5.2. Frecuencia de muestreo	14
PARTE II: PROTOCOLOS	
6. INTRODUCCIÓN	17
7. MUESTREO DEL FITOPLANCTON	17
7.1. Equipos y reactivos	17
7.1.1. Equipos	17
7.1.2. Reactivos fijadores	17
7.2. Procedimientos de muestreo	18
7.2.1. Directrices para la selección de estaciones de muestreo y para la toma de muestras	18
7.2.2. Periodos de muestreo y frecuencia	20
7.2.3. Directrices para la toma de muestras	21
7.2.4. Datos y/o muestras complementarias al muestreo de fitoplancton	21
7.3. Conservación y etiquetado de las muestras	22
7.3.1. Técnicas de conservación	22
7.3.2. Etiquetado	22
8. RECUENTO E IDENTIFICACIÓN DE FITOPLANCTON (MÉTODO UTERMÖHL)	22
8.1. Equipo de laboratorio	22
8.2. Pretratamiento de la muestra	22
8.2.1. Aclimatación de la muestra	22
8.2.2. Homogeneización de la muestra	22
8.2.3. Preparación de submuestras	23
8.2.4. Concentración y dilución	23
8.2.5. Número de algas por campo	23

8.3. Proceso de recuento	23
8.3.1. Recuento por campos	23
8.3.2. Recuento de la cámara completa	24
8.3.3. Cálculo de la concentración de fitoplancton	24
8.3.4. Cálculo del biovolumen	24
8.3.5. Recuentos de picoplancton	25
8.4. Identificación	25
9. ANÁLISIS DE PIGMENTOS (CLOROFILA “A”)	25
9.1. Equipos y reactivos	25
9.1.1. Equipos y reactivos para la extracción de pigmentos	25
9.1.2. Equipos y reactivos para la determinación de la clorofila	25
9.2. Extracción de pigmentos	25
9.3. Determinación de la clorofila por espectrofotometría	27
9.4. Determinación de otros pigmentos por espectrofotometría	27
9.5. Determinación de pigmentos por técnicas de cromatografía	27
9.6. Confirmación de los resultados	27
10. PROTOCOLO PARA CONTROL DE CALIDAD	27
10.1. Directrices para el control de la calidad en la toma y conservación de las muestras	28
10.2. Directrices para el control de la calidad en el análisis de las muestras	28
10.3. Directrices para el control de calidad en el tratamiento de los datos	28
GLOSARIO Y BIBLIOGRAFÍA	29
APÉNDICE	37

INTRODUCCIÓN

La aplicación de la Directiva 2000/60/CE (Directiva Marco del Agua, DMA) y especialmente el desarrollo del Anexo V requiere la identificación de los elementos de calidad biológica, parámetros y métricas que permitan establecer el estado ecológico.

La Confederación Hidrográfica del Ebro (CHE) ha abordado esta tarea a partir de la realización de las siguientes tareas:

- Selección de los elementos de calidad biológica, parámetros y métricas¹ más adecuados para establecer el estado ecológico en ríos y lagos.
- Identificación de directrices relativas a los elementos de calidad biológica y parámetros seleccionados que faciliten el diseño de las redes de control de vigilancia y control operativo².
- Elaboración de los protocolos de muestreo, identificación y cálculo de métricas.

Los elementos de calidad biológica inicialmente considerados para las categorías de ríos y lagos, de acuerdo con la DMA, son los siguientes:

ELEMENTOS DE CALIDAD BIOLÓGICA (AP. I. I. ANEXO V)	RÍOS	LAGOS
Composición, abundancia y biomasa del fitoplancton	–	■
Composición y abundancia de la flora acuática	■	■
Composición y abundancia de la fauna bentónica de invertebrados	■	■
Composición, abundancia y estructura de edades de la fauna íctica	■	■

Se considera prioritario que la elección de los parámetros y métricas de los elementos de calidad biológica y los procedimientos metodológicos para su aplicación surjan de los estudios que la comunidad científica ha realizado o está desarrollando en las cuencas ibéricas y del resto de Europa, y reflejen las directrices de los estándares europeos existentes (normas y pre-normas elaboradas por la Comisión Europea de Normalización). Con esto se persigue que los trabajos que se presentan sean reflejo de las tendencias metodológicas más recientes y de mayor seguimiento, y que su futura aplicación facilite la comparación de los resultados y el aprovechamiento (siempre que sea posible) de los datos históricos.

Como punto de partida la Confederación organizó unos Seminarios dedicados a: fitoplancton, fitobentos (microalgas), macrófitos, invertebrados bentónicos y peces. El objetivo de los seminarios fue la puesta en común de experiencias que permitieran avanzar en la definición de los grupos taxonómicos a considerar como parte de los elementos de calidad biológica para el establecimiento del estado ecológico, y la determinación de los métodos de muestreo y análisis más adecuados.

Este documento está dedicado al fitoplancton. Los contenidos incluyen las opiniones y datos recogidos durante la reunión de trabajo mantenida el 5 de noviembre de 2004, entre los expertos Eduardo Vicente (Dept. Ecología y Microbiología, Universidad de Valencia), Caridad de Hoyos (Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas, CEDEX), Pedro Sánchez (Dept. de Botánica e Instituto del Agua, Universidad de Granada), y Jaume Cambra (Dep. Biología Vegetal, Univ. de Barcelona), y técnicos de la CHE (C. Durán y M. Pardos) y de URS (G. González, C. Coletto y I. Miró).

¹ En el documento se adoptan los siguientes términos y definiciones extraídos de la DMA y de las Guías de monitorización/*Monitoring guides* y ECOSTAT:

- Elementos de calidad biológica: incluye fitobentos, macrófitos, fitoplancton, fauna de invertebrados y peces.
- Parámetros: descriptores de los elementos de calidad biológica (composición, abundancia, presencia de taxones sensibles, etc...).
- Métricas: resultados de las mediciones de los parámetros (nº de taxones, diversidad de Shannon, % de taxones dominantes, diferentes índices, concentración de clorofila, índice de pigmentos, etc.)

² Los controles de vigilancia y operativos son requeridos por la DMA (art. 1.3.1 y 1.3.2) para conocer el estado inicial de las masas de agua y completar la evaluación de impacto, y como medidas de seguimiento temporal que permitan establecer los cambios a largo plazo debidos a condiciones naturales o por actividades antropogénicas (*control de vigilancia*), así como para determinar el estado de las masas de agua que se considere que no pueden cumplir sus objetivos medioambientales y para evaluar los cambios en el estado de dichas masas como resultado de los programas de medidas (*control operativo*).

La información obtenida en el Seminario se ha completado con datos obtenidos de fuentes bibliográficas cuyas referencias se indican en la memoria. La información se presenta según lo siguiente:

GENERALIDADES

- Definiciones
 - Valor indicador del fitoplancton ante las presiones fisicoquímicas e hidromorfológicas.
 - Métricas existentes.
- Propuesta de métricas y métodos de medida para la cuenca del Ebro.
- Directrices para el control de vigilancia y control operativo relativos al fitoplancton.
 - Selección de los puntos de control.
 - Frecuencia de muestreo.

PROTOCOLOS

- Muestreo del fitoplancton.
- Recuento e identificación (Utermöhl).
- Análisis de pigmentos (Clorofila “a”)
- Control de la calidad.

PARTE I. Generalidades

1. DEFINICIONES Y OBJETIVOS

Se define como fitoplancton la comunidad de microorganismos, en su mayoría fotosintéticos, (microalgas, cianobacterias, flagelados heterótrofos y otros grupos sin clorofila) que vive suspendida en la masa de agua.

Este documento tiene como objetivo identificar métricas para el establecimiento del estado ecológico de los lagos y embalses de la cuenca del Ebro, basados en el fitoplancton, en aplicación de la Directiva 2000/60, así como establecer las directrices metodológicas para las operaciones de muestreo y análisis.

2. VALOR INDICADOR DEL FITOPLANCTON

La composición y abundancia del fitoplancton en lagos y embalses depende de los siguientes factores:

- Condiciones físicas e hidrológicas: luz, temperatura, turbulencia/estabilidad del agua, tiempo de residencia del agua y tasa de sedimentación del plancton³.
- Composición química del agua: nutrientes y materia orgánica, mineralización (compuestos de proporcionalidad constante) y pH, oligoelementos, etc..
- Factores biológicos:
 - Depredación por parte de filtradores planctófagos (zooplancton y peces) y relaciones entre especies (efectos alelopáticos y toxicidad inducida por algunas especies).
 - Parasitismo fúngico. Infecciones por parte de hongos y cromistas heterótrofos flagelados capaces de reducir densas poblaciones fitoplactónicas.

El fitoplancton se ha usado ampliamente como indicador del estado trófico de las masas de agua y existe abundante bibliografía que incluye métodos de muestreo y análisis. En España existe un conocimiento suficiente del fitoplancton, en especial para los embalses.

En el marco de la aplicación de la DMA, en la demarcación del Ebro, el fitoplancton es adecuado para la detección y seguimiento de las **presiones fisicoquímicas** relacionadas con:

- Contaminación térmica.
- Cambios en la mineralización del agua (y en la composición de los iones mayoritarios disueltos).
- Eutrofización (concentraciones de nitrógeno y fósforo, y en ocasiones de sílice y otros cationes como el hierro).
- Contaminación orgánica (soluble y particulada).

El fitoplancton es indicador de las **presiones hidromorfológicas** que determinan cambios en la tasa de renovación de lagos y embalses.

3. SISTEMAS INDICADORES EXISTENTES

La DMA requiere identificar la composición del fitoplancton y su abundancia. No obstante, el nivel de identificación taxonómica no está establecido y éste es uno de los aspectos a determinar “*a priori*”.

El análisis del fitoplancton incluye:

- Identificación taxonómica.
- Recuentos.
- Cálculo de biovolúmenes.
- Análisis de pigmentos (en general Clorofila “a” y otros pigmentos o sus derivados cuando tengan capacidad como indicadores).

En los estudios del fitoplancton existen los siguientes enfoques:

1. Estudio de las especies y de las comunidades características.
2. Ponderación de los diferentes grupos (índices).
3. Análisis de parámetros relacionados con su biomasa (concentración de pigmentos, biovolumen).

3.1. USO DE LAS ESPECIES Y DE LAS COMUNIDADES COMO MÉTRICAS

El estudio de las comunidades del fitoplancton, a través de las asociaciones de especies (*algal assemblages*), constituye una de las líneas metodológicas a seguir para la caracterización de los diferentes tipos de lagos y embalses, y para la obtención de métricas para evaluar su estado ecológico. El modo de identificar las asociaciones de especies consiste en obtener inventarios (especies y/o géneros) de los tipos de lagos o embalses, y analizar los patrones de variación de la composición de las especies por medio de técnicas estadísticas (por ejemplo análisis de componentes principales). Posteriormente podrán elaborarse índices de comunidades para cada tipo de lago o embalse⁴.

Para iniciar esta línea de trabajo se requiere un buen número de inventarios y recopilar información sobre la relación de las especies o asociaciones y la calidad del agua (James y Evison, 1979; y otros). En el caso de los embalses españoles, existe un conocimiento suficiente sobre las asociaciones de especies del fitoplancton, recogido en los trabajos de investigación de Planas 1975, Margalef *et al.* 1976; 1982, Sabater y Nolla 1990, Riera 1993, Dasí *et al.*, 1998; y en estudios realizados por el CEDEX (algunos publicados en De Hoyos *et al.*, 2004 y Negro y De Hoyos, 2005) y por la Confederación Hidrográfica del Ebro. En el caso de los lagos hay estudios completos para algunos, si bien falta información para muchos.

La línea de trabajo indicada requerirá de un periodo relativamente largo hasta obtener las métricas específicas para los tipos de lagos y embalses. Durante este

³ El tiempo de residencia del agua en el sistema tiene gran importancia en la composición específica y abundancia del fitoplancton, puesto que está relacionado con la tasa de exportación del plancton.

⁴ Por ejemplo siguiendo el método que se usó para el índice CEE de diatomeas y mediante el programa OMNIDIA o utilizando la propuesta de clasificación funcional del fitoplancton (Reynolds *et al.*, 2002).

lapso pueden aplicarse índices existentes. Éstos están basados en los valores de sensibilidad de las especies, ponderados por un valor indicador; y se refieren principalmente al grado trófico (índices tróficos) o al contenido en materia orgánica (saprobios). Entre éstos destacan el índice SLA (Sládecek, 1983) y Wegl (1985) en Alemania.

Otra posibilidad sería explorar la utilización de las diatomeas fitoplanctónicas, exclusivamente para determinar el grado trófico, y utilizar para esto el programa OMNIDIA, calculando los índices Van Damm y Sládecek. También es posible que otros grupos (por ejemplo las criptofíceas) sean de utilidad en el futuro, cuando avancen los estudios.

3.2. USO DE LOS GRUPOS DE ALGAS E ÍNDICES COMO MÉTRICAS

Se obtienen recuentos para los principales grupos de algas, y se formulan índices basados en las abundancias relativas y en el valor indicador de cada grupo. Algunos ejemplos son:

- **Índice trófico planctónico** (Barbe et al., 1990). Responde a la siguiente fórmula:

$$ITP = \text{Pr omedio} (B * \sum Qi * Aj) - 5$$

Qi = puntuación de calidad biológica asignada a los grupos del fitoplancton (varía de 1 a 7)

Aj = Abundancia relativa (%) de los grupos (varía de 0 a 5)

B = Biomasa del fitoplancton a partir de la Clorofila "a" (varía entre 1 y 5)

Se ha propuesto como uno de los indicadores del estado ecológico de los humedales del País Vasco.

Existe una modificación de este índice que se está utilizando actualmente en Francia, y que responde mejor que el original. El índice modificado (Barbe et al., 2003) no incluye la clorofila y las puntuaciones asignadas a los grupos del fitoplancton han variado. La fórmula del índice es la siguiente:

$$IPL = \sum (Qi * Aj)$$

- **Índice de Hörnström** (1981). Responde a la siguiente expresión:

$$IL = \sum (f * Is) / \sum f$$

I_L = Índice trófico del lago

f = Frecuencia de la especie (recuento)

I_s = Índice trófico de la especie

- **Índice SLA** (Sládecek, 1983). Se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$SLA = \sum_{i=1}^n h * g * S / \sum_{i=1}^n g * h$$

h = Abundancia de la especie i

g = Valor indicador de la especie i

S = Valor de sensibilidad de la especie i

- **Porcentaje de cianobacterias**

En general, el predominio de las cianobacterias es indicador de eutrofia, pero esto no es generalizable a todos los embalses, ni especialmente a todos los lagos. No obstante en algunos tipos de masas de aguas, el seguimiento de la abundancia de las cianobacterias puede ser útil; además tiene un interés adicional dado que algunas especies de cianobacterias poseen cepas tóxicas.

- **Frecuencia e intensidad de floraciones**

Se analiza la presencia e intensidad de floraciones de cianobacterias y/o algas clorococcales coloniales o filamentosas, ya que en medios eutróficos éstas suelen ser frecuentes y de gran intensidad (afectan a gran parte de la masa de agua). En ECOFRAME⁵ utilizan el siguiente esquema para su clasificación:

- No se aprecian natas o agregados y no hay dominancia (<95%) de filamentos o colonias de cianobacterias o clorococcales.
- Misma situación que a) pero se detectan de forma puntual o intermitente formaciones de superficie de cianobacterias.
- Dominan los filamentos o colonias de cianobacterias (>95%), floraciones evidentes y/o frecuentes.

3.3. MÉTRICAS BASADAS EN LA BIOMASA

La biomasa del fitoplancton se determina a partir de los recuentos (células/ml), biovolumen (mm³/L), e indirectamente a través de la concentración de clorofila. Existen procedimientos estandarizados para la obtención de estas métricas; y además se han desarrollado nuevas técnicas basadas en la fluorocitometría de flujo y nuevas generaciones de contadores de partículas (contadores laser) que pueden ser de utilidad para el establecimiento del número y biomasa algal.

- **Recuentos en células/ml.** Esta estandarizado su procedimiento y es un parámetro habitual en los estudios de fitoplancton (ver capítulo 8).
- **Biovolumen.** Es una técnica más costosa pero que también se está usando en estudios de embalses (ver apartado 8.3.4). Pueden existir desviaciones en los resultados derivadas de los cálculos. Los rangos de biovolumen observados en un estudio de 37 embalses españoles son los siguientes (De Hoyos, comunicación personal):

⁵ ECOFRAME: Propuesta metodológica para la determinación del estado ecológico en lagos someros. Ver Moss et al., (2003).

	Biovolumen (mm ³ /L)	Nº Embalses	Porcentaje
OLIGOTRÓFICO	<1	17	46%
MESOTRÓFICO	1 - 2,5	8	22%
EUTRÓFICO	> 2,5	12	32%

El rango de biovolumen medido en los embalses es de 0,07 – 40,5 mm³/L. Los límites de los niveles tróficos indicados en la tabla son una media de los rangos considerados por 7 autores diferentes, recogidos en Willén (2000).

Existen índices de grupos algales basados en proporciones de biovolúmenes. Entre éstos se señalan los siguientes:

$$- I_{ga} = 1 + 0,1 * Cr + Cc + 2 * (Dc + Chc) + 3 * Vc + 4 * Cia / 1 + 2 * (D + Cnc) + Chnc + Dnc$$

D: Dinoflagelados; *Cnc*: crisófitos no coloniales; *Chnc*: clorococles no coloniales; *Dnc*: diatomeas no coloniales; *Cr*: criptófitos; *Cc*: crisófitos coloniales; *Dc*: diatomeas coloniales; *Chc*: clorococles coloniales; *Vc*: volvocales coloniales

Se ha propuesto como uno de los indicadores del estado ecológico de los lagos de montaña y cársticos de Cataluña (Agencia Catalana de l'Aigua, 2003).

– Índice de Brettum (1989)

$$IT = \sum (v * I_s) / \sum v$$

I_t = Índice para un nivel trófico determinado

f = Biovolumen de la especie

I_s = Índice trófico de la especie para un cierto nivel trófico

• **Concentración de clorofila.** Generalmente se analiza la clorofila “a” (ver capítulo 9). Los rangos establecidos por el sistema de clasificación trófica de la OCDE (1982) son los de la siguiente tabla:

	CLOROFILA “a” µg/L	
	Promedio anual	Máximo anual
ULTRA-OLIGOTRÓFICO	<1,0	<2,5
OLIGOTRÓFICO	<2,5	<8,0
MESOTRÓFICO	2,5-8	8-25
EUTRÓFICO	8 - 25	25-75
HIPEREUTRÓFICO	>25	>75

Estos valores corresponden a clorofila de superficie, no obstante también se consideran básicamente válidos para las concentraciones medias en la capa fótica (procedentes de muestras integradas las cuales se consideran actualmente más representativas que las muestras de superficie).

También pueden obtenerse perfiles con una sonda fluorimétrica. Éstos permiten estimar las concentraciones de los grupos principales del fitoplancton (cianobacterias, clorófitos, criptófitos y diatomeas)⁶, y su distribución en la columna de agua, a partir de la fluorescencia que emiten los pigmentos fotosintéticos, como respuesta a la excitación con luz de diferentes longitudes de onda.

En todos los casos, el establecimiento de la posición de las poblaciones algales en las diferentes profundidades del perfil vertical es muy recomendable para la correcta evaluación del nivel trófico y de las especies fitoplanctónicas indicadoras.

4. PROPUESTA DE MÉTRICAS PARA LA DEMARCACIÓN DEL EBRO

El fitoplancton se considera un elemento de calidad principal para el establecimiento del estado ecológico de los lagos y del potencial ecológico de los embalses de la demarcación del Ebro. En los ríos el fitobentos es un indicador más apropiado que el fitoplancton (ausente o poco desarrollado en los tramos altos de los ríos).

El procedimiento de trabajo para la identificación de métricas del fitoplancton se esquematiza en la figura de la página 12.

Las tareas a realizar son las siguientes:

- Recopilar la información existente en los trabajos realizados por la Confederación Hidrográfica del Ebro, las Comunidades Autónomas y por los centros de investigación (Universidades, CSIC).

- Realizar muestreos en las masas de agua de referencia y en las sometidas a diferentes grados de alteración fisicoquímica (e hidromorfológica), con objeto de conocer la composición del fitoplancton y su abundancia. Se recomienda obtener:

- Inventarios completos del fitoplancton (nivel de especie en las masas de referencia).

- Valores de abundancia de los taxones, y de los grupos principales (células/ml y/o biovolúmenes).

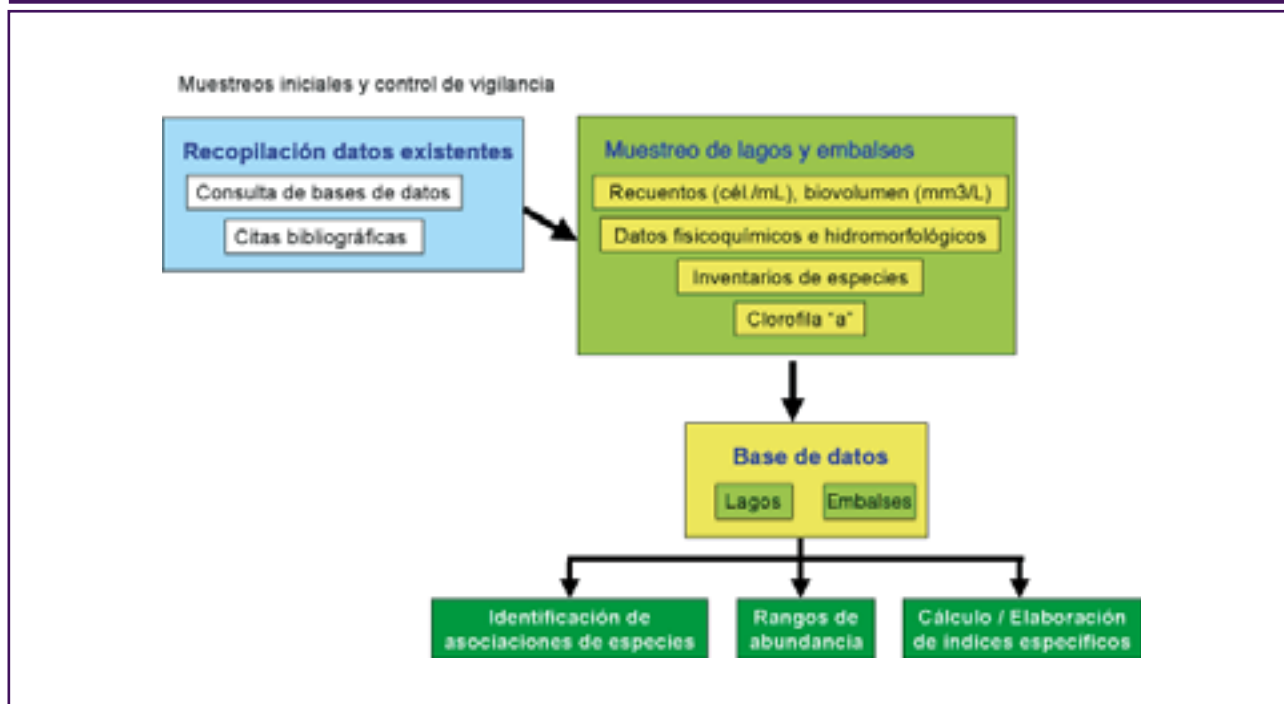
- Concentración de clorofila “a” (y de otros indicadores pigmentarios del plancton).

- Datos hidromorfológicos y fisicoquímicos relevantes (temperatura, profundidad del disco de Secchi, espesor de la capa fótica, coeficiente de extinción de la luz en epilimnion, metalimnion e hipolimnion, turbidez, tasa de renovación del agua, conductividad, alcalinidad, pH, potencial Redox, compuestos de proporcionalidad constante, nutrientes, oxígeno disuelto).

El procedimiento de muestreo y análisis recomendado se presenta en la parte II de este documento y está basado en metodologías estandarizadas y de amplia utilización.

⁶ Los tipos de pigmentos que presentan estos grupos de algas son: sólo clorofila “a” las cianobacterias, clorofila “a” y “b” los clorófitos, clorofila “a” y “c” las diatomeas y criptófitos.

PLANIFICACIÓN DE LOS TRABAJOS CON EL ELEMENTO DE CALIDAD FITOPLANCTON PARA LA DEMARCACIÓN DEL EBRO



- Analizar los datos obtenidos en las masas de referencia e identificar las asociaciones de especies (*algal assemblages*), los rangos de abundancia y biomasa, y los valores de otras métricas analizadas (índices), constituyendo éstos las condiciones de referencia para el tipo representado por la masa de referencia. Esto requerirá el uso de métodos estadísticos.
- Identificar, en las masas sometidas a presiones, la composición y abundancia del fitoplancton (floraciones, especies con cepas tóxicas,...).
- Recopilar la información existente y consultar con expertos para la identificación de las condiciones de referencia para los tipos que carezcan de masas de agua de referencia.

Se considera de gran importancia que los datos obtenidos se incorporen en una base de datos que responda a los requerimientos de la DMA. El tipo de datos a incluir sería:

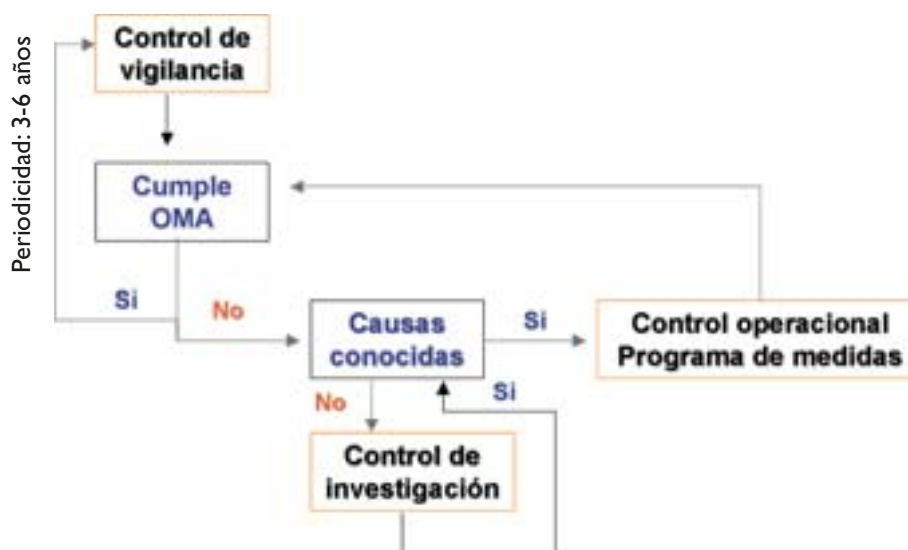
- Nombre de la especie / grupo taxonómico.
- Categoría de masa en la que se encuentra: Lago, embalse, aguas de transición.
- Tipo de la masa (según la tipificación realizada para cumplimentar la DMA).
- Masa de referencia / No referencia.
- Localización geográfica (coordenadas).
- Recuento individual y total del fitoplancton.
- Tipo de muestra de la que procede (puntual, integrada, red vertical u horizontal; en todos los casos se indicará la profundidad en el perfil vertical).
- Otros datos asociados al fitoplancton (concentración de clorofila "a" y otros pigmentos indicadores).

- Datos fisicoquímicos: transparencia (profundidad del disco de *Secchi*), espesor de la capa fótica, coeficiente de extinción de la luz en epilimnion, metalimnion e hipolimnion, turbidez, temperatura, conductividad, alcalinidad, pH, compuestos de proporcionalidad constante, nutrientes, oxígeno disuelto.
- Datos hidromorfológicos: superficie y profundidad de la masa de agua, tasa de renovación, etc.
- Datos biológicos (zooplancton, porcentaje de cobertura de los macrófitos sumergidos y/o helófitos, peces).

Hasta disponer de los resultados de los estudios del fitoplancton, se pueden realizar evaluaciones basadas en métricas sencillas como la concentración de clorofila, los porcentajes de los grupos principales del fitoplancton, y, en embalses, la frecuencia e intensidad de las floraciones de cianobacterias, así como aplicar índices descritos en la bibliografía.

5. DIRECTRICES PARA EL CONTROL DE VIGILANCIA Y CONTROL OPERATIVO EN BASE AL FITOPLANCTON

La DMA establece la puesta en marcha de programas de seguimiento que permitan el diagnóstico y el seguimiento del estado ecológico de las masas de agua. Estos programas se indican en el diagrama adjunto:



Los objetivos de las redes de control de vigilancia y control operativo se indican en el cuadro inferior (según Anexo V apartados I.3.1. y I.3.2.).

En los apartados siguientes se indican las directrices a considerar para el uso del elemento de calidad biológica fitoplancton en las redes de control de vigilancia y control operativo.

5.1. SELECCIÓN DE LAS ESTACIONES DE CONTROL

5.1.1. Red de referencia

Se seleccionarán lagos de referencia teniendo en cuenta los datos sobre las presiones e impactos. Para los embalses (masas fuertemente modificadas) se puede adoptar, como criterio del potencial ecológico, que no se supere un determinado nivel del estado trófico, que variará en los diferentes tipos de embalses, o podrá ser específico para un embalse concreto.

5.1.2. Control de vigilancia

La red de control de vigilancia deberá estar integrada por suficientes masas de agua representativas de las condiciones de la demarcación tanto en términos naturales como de las presiones e impactos identificados.

En la demarcación del Ebro se han identificado 92 masas de agua de la categoría lago. De éstas sólo un tipo (alta montaña septentrional, dimíctico, aguas ácidas) agrupa un número considerable de lagos (58), mientras que el resto de tipos están representados por 1 a 7 lagos. Por esta razón se recomienda estudiar el fitoplancton de todos los lagos (34) que pertenecen a los diferentes tipos (excepto montaña) y añadir a éstos una selección del grupo de lagos de montaña (seleccionados en función de sus características morfométricas, geología e influencia antrópica).

Entre los embalses hay 51 identificados como masas de agua fuertemente modificadas, y existen datos sobre el fitoplancton para la mayoría. Se requerirá completar diagnósticos en todos los embalses en la fase inicial de creación de la red de vigilancia y realizar una selección para incluir en la red de vigilancia en fases posteriores.

En el protocolo que se presenta en la Parte II de la memoria se indican las directrices para seleccionar las estaciones de muestreo y el número de muestras (apartado 7.2.1).

5.1.3. Control operativo

Los puntos de control operativo deben cubrir todas las masas identificadas en riesgo de no cumplir los objetivos medioambientales. No obstante no se requiere el

CONTROL DE VIGILANCIA	CONTROL OPERATIVO
<ul style="list-style-type: none"> – Completar y aprobar el procedimiento de evaluación de impacto (análisis de presiones e impactos). – Contribuir al diseño eficaz de los futuros programas de vigilancia. – Evaluar los cambios a largo plazo en las condiciones naturales. – Evaluar los cambios a largo plazo resultantes de actividad antropogénica muy extendida. 	<ul style="list-style-type: none"> – Establecer el estado de las masas identificadas en riesgo de no cumplimiento de los objetivos medioambientales. – Evaluar los cambios que se produzcan en las aguas indicadas, como resultado de los programas de medidas.

análisis de todos los parámetros indicadores de los elementos de calidad que indica la DMA, sino aquellos más sensibles a las presiones a las que está sujeta la masa.

El indicador fitoplancton se considera especialmente adecuado para evaluar impactos a corto plazo derivados de la eutrofización y de la contaminación orgánica, así como de las presiones hidromorfológicas que produzcan variaciones de la tasa de renovación del agua. En el apartado 7.2.1 se indican las directrices para la selección de las estaciones de muestreo.

5.2. FRECUENCIA DE MUESTREO

Periodo de muestreo

La variabilidad temporal del fitoplancton es acusada, y su composición y abundancia responde a los patrones de variación de la iluminación (intensidad y fotoperiodo), turbulencia del agua, tasa de renovación del agua, temperatura, mineralización, pH y concentración de nutrientes a lo largo del año. En estudios de investigación, los seguimientos con periodicidad mensual permiten alcanzar un nivel de descripción bastante adecuado, si bien la frecuencia correcta sería quincenal o incluso semanal (Reynolds, 1984, 1990). Esta frecuencia de muestreo está

fuera de alcance en el ámbito de la implementación de la DMA. En la guía “Monitoring”⁷ se recomienda muestrear el fitoplancton al menos dos veces al año; no obstante una buena caracterización del fitoplancton requeriría 4-6 muestreos al año, con una repartición temporal que refleje la estacionalidad⁸.

En el apartado 7.2.2 se indican los periodos del año óptimos para el muestreo del fitoplancton en los tipos de lagos y embalses.

Frecuencia de los controles de vigilancia y operativo

Según la DMA se debe realizar un control de vigilancia durante un periodo de un año dentro del periodo que abarque el plan de cuenca (6 años). No obstante en las primeras etapas de reconocimiento de la demarcación y durante los tres primeros años de funcionamiento de la red de control (2006 –2008) puede requerirse una mayor frecuencia de muestreo (se recomienda bianual dadas las variaciones debidas a la climatología mediterránea).

La frecuencia de muestreo en el control operativo podrá ser más corta (4 veces al año con algún muestreo adicional en el periodo de primavera a otoño), pero esto se ajustará a cada caso específico.

⁷ *Guidance on monitoring for the Water Framework Directive*. Working Group 2.7. Final Version 23 January 2003.

⁸ Indicación de Eduardo Vicente.

PARTE II. Protocolos

En las páginas siguientes se incluye un procedimiento destinado al uso del fitoplancton como elemento de calidad biológica para el establecimiento del estado ecológico en lagos y embalses. El objetivo es facilitar la obtención de inventarios comparables que permitan la identificación de las “asociaciones de especies” y los rangos de abundancia y biomasa característicos de los tipos de lagos y embalses.

6. INTRODUCCIÓN

Este protocolo establece una metodología para el muestreo y análisis del fitoplancton de lagos y embalses, dirigida al establecimiento del estado ecológico o potencial ecológico según las directrices de la Directiva 2000/60/CE. Su elaboración se ha basado en los contenidos de la reunión de trabajo efectuada en la Confederación Hidrográfica del Ebro, en la información contenida en los textos de la bibliografía, y en el documento CEN/TC230/WG2/TG/N83 *Water Quality. Standard for the routine analysis of phytoplankton abundance and composition using inverted microscopy* (Utermöhl technique), con fecha de 1-05-2005.

El protocolo abarca los siguientes temas:

- Muestreo del fitoplancton.
- Equipos.
- Técnicas de toma de muestras.
- Conservación /pretratamiento de las muestras.
- Técnicas de análisis.
- Técnicas de recuento y medida de biovolúmenes.
- Método para el análisis de pigmentos.
- Control de calidad.

7. MUESTREO DEL FITOPLANCTON

Se presentan las directrices metodológicas para la toma de muestras de fitoplancton y de clorofila “a”, en las aguas someras y profundas de lagos y embalses de la cuenca del Ebro.

7.1. EQUIPOS Y REACTIVOS

7.1.1. Equipos

- Protección personal.
- Botas o vadeadores de pescador.
- Guantes de látex.
- Chaleco salvavidas (muestreo desde embarcación).
- Recolección de muestras:
- Botellas de vidrio (125- 150 ml) (para fitoplancton). Se recomienda que la botella sea transparente de color ámbar; así se protege la muestra de la luz y se puede apreciar el color para controlar la decoloración debida a la sublimación del conservante (muestras con Lugol) (ver apartado 7.1.2.).
- Viales de vidrio o plástico con tapón hermético (para fitoplancton de red).
- Botellas opacas de plástico (2 L) (clorofila) y otra botellería en plástico de calidad con cierres herméticos para las muestras de agua (análisis químicos).
- Botella hidrográfica (muestras discretas en profundidad).
- Tubo flexible de plástico lastrado de longitud pre-determinada (muestras integradas) o tubo rígido de hasta 2 m (muestras integradas en aguas someras).
- Red de nyal® o nylon de 20 µm de luz de poro (para muestras con red de arrastre horizontal o ver-

tical); en lagos de montaña y aguas ultraoligotróficas pueden requerirse redes de 10-15 µm de poro (y realizarse diversos arrastres preferiblemente verticales) para obtener unas concentraciones de células adecuadas).

- Disco de Secchi y radiómetro (preferiblemente espectrorradiómetro).
- Fluorímetro.
- Sonda multiparamétrica con sensores de temperatura, turbidez, conductividad, pH y oxígeno disuelto.
- Aparato de localización geográfica (GPS).
- Equipo de filtración para filtrar en el campo la muestra destinada al análisis de pigmentos.
- Equipo de congelación con nitrógeno líquido o similar (nieve carbónica) para la conservación del filtrado para el análisis de pigmentos, o bien otros fijadores o conservantes (acetona, etanol,...) dependiendo del método de extracción a usar.
- Bolígrafo o rotulador permanente (o cualquier otro método para etiquetar las muestras). Si se usan etiquetas, estas deben ser resistentes a la humedad.
- Instrumentos adicionales para muestreos en barco:
- Barca adecuada para las condiciones locales con el equipo de seguridad apropiado.

7.1.2. Reactivos fijadores

Se usan: Solución de Lugol (mezcla de yoduro potásico y yodo) y formaldehído. Los métodos de aplicación se presentan en el apartado 7.3.

- Solución de Lugol para periodos de conservación cortos (unos pocos meses, en la oscuridad). En la norma CEN/TC230/WG2/TG3 se incluyen dos formulaciones:
 - Solución ácida de Lugol (Willén, 1962). Dissolver 100 g de KI (yoduro potásico) en 1 litro de agua desmineralizada; añadir 50 g de cristales de yodo y agitar hasta que se disuelvan; añadir 100 g de ácido glacial acético; decantar la solución antes de su uso para eliminar los posibles precipitados.
 - Solución alcalina de Lugol (Utermöhl 1958 modificada). Se prepara como la anterior, sólo que, en lugar del ácido glacial acético, se añaden 100 g de acetato de sodio (CH₃COO-Na).
- El líquido resultante ha de estar fuertemente coloreado. Conservar en un recipiente hermético y protegido de la luz para minimizar su sublimación. Añadir de 0,5-1 ml de Lugol iodado por cada 100 ml de muestra hasta obtener un color miel (la cantidad a añadir dependerá siempre del contenido de materia orgánica u otros reductores en la muestra).
- El Lugol se degrada por foto-oxidación, luego las muestras se deben conservar a oscuras, y hay que controlar periódicamente la pérdida de color de la muestra, añadiendo más reactivo si se requiere.
- Formaldehído (HCHO) al 2-4% vv neutralizado y filtrado. Es algo agresivo con algunas estructuras celulares, no obstante es adecuado para la conserva-

ción permanente de las muestras. Dada la naturaleza tóxica de esta sustancia, en caso de utilización se deben tomar precauciones (trabajar en un ambiente bien ventilado, usar guantes y recipientes herméticos).

7.2. PROCEDIMIENTOS DE MUESTREO

7.2.1. Directrices para la selección de estaciones de muestreo y para la toma de muestras

La selección de las estaciones de muestreo tendrá en cuenta aspectos como la morfometría de la cubeta, profundidad, entrada y salida de flujos, cobertura de vegetación acuática, vertidos puntuales, usos etc. La recogida

de muestras de fitoplancton se realizará preferiblemente en los mismos puntos en los que se tomen muestras fisicoquímicas y otras muestras biológicas, para tener la máxima información posible. En los lagos y embalses profundos es muy importante conocer la estructura vertical para localizar las discontinuidades e interfaces fisicoquímicas y biológicas, y las zonas de mayor densidad de organismos. Dependiendo del tipo de lagos y/o embalses, y de los recursos disponibles se pueden plantear diferentes estrategias de muestreo:

a) Muestreo de masas de agua vadeables y no vadeables poco profundas

En lagos vadeables (<1,5 m de profundidad) y no vadeables poco profundos (<5 m) se recomienda:

TIPO DE LAGO	Nº DE MUESTRAS/TIPO	PROCEDIMIENTO
Lagos vadeables y no vadeables de <5 m profundidad	Muestras discretas de superficie o integradas (si la profundidad >1-2 m), en varias estaciones de la masa de agua.	<ul style="list-style-type: none"> – Tomar las muestras discretas de superficie en el propio recipiente, unos 25-30 cm por debajo de la superficie. – Tomar la muestra integrada entre la superficie y 3 m de profundidad (con un tubo flexible) y añadir una muestra tomada cerca del fondo (4-5 m).

Número de muestras:

Variable según la superficie y morfología de la masa de agua, y según los recursos disponibles. En general entre 1-3 (lagos pequeños, <50 ha) y 3 -5 (lagos grandes, >50 ha).

MASAS DE AGUA VADEABLES Y NO VADEABLES POCO PROFUNDAS



Lagos <50 Ha

X muestras de superficie o integradas en la columna de agua.



Lagos >50 Ha

X muestras de superficie o integradas en la columna de agua en algunos puntos.

b) Masas de agua profundas

Para lagos profundos y embalses se seleccionará preferentemente un punto en la zona de máxima profundidad y se obtendrán varias muestras en el perfil vertical o una muestra integrada procedentes de la capa trofogé-

nica (y si es posible otras de los niveles metalimnéticos e hipolimnéticos¹); si la masa de agua está estratificada, la obtención de suficientes muestras discretas en el perfil permite obtener una información más detallada del fitoplancton que por medio de una muestra integrada.

TIPO DE LAGO	Nº DE MUESTRAS/TIPO	PROCEDIMIENTO
Lagos de >5 m profundidad Embalses	Opción I Varias muestras discretas distribuidas en el perfil. En general: – superficie – profundidad Disco de Secchi – 2,5 veces Disco de Secchi Pueden incluirse muestras adicionales relacionadas con clinas o gradientes observados en los perfiles realizados con sonda fluorimétrica (máximos algales) o de turbidez (acúmulos de material particulado o corrientes profundas de densidad) (1).	– Realizar un perfil de temperatura, conductividad, turbidez, pH, potencial redox y oxígeno disuelto para identificar el patrón de estratificación. Medir la profundidad del Disco de Secchi y la penetración de la luz (espectrorradiómetro). – Tomar las muestras de los diferentes niveles con botella hidrográfica. – Alternativamente es recomendable realizar un perfil con el fluorímetro (usar 4 sensores fluorimétricos: clorofila a, ficocianina, ficoeritrina y CDOM) y planear el muestreo según las lecturas obtenidas.

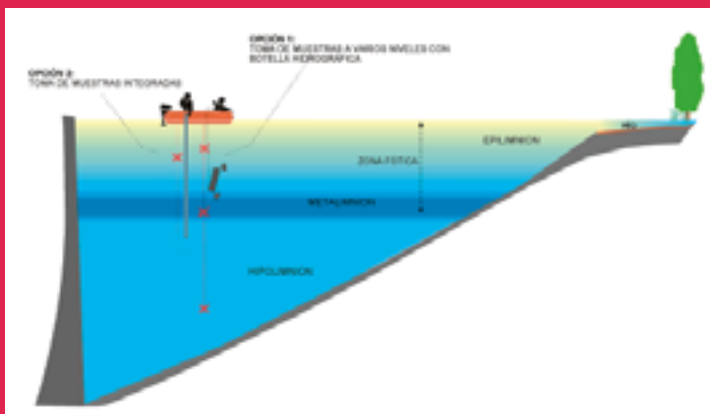
(1) Los niveles de importancia para el análisis del fitoplancton en los lagos y embalses estratificados son: epilimnion, interfase epilimnion-metalimnion, máximo metalimnético de oxígeno, metalimnion profundo, interfase entre el metalimnion e hipolimnion (picoplancton APC), hipolimnion e hipolimnion profundo (bacterias fotosintéticas).

Nº de muestras /perfil: Mínimo 3 y hasta 5-6.

TIPO DE LAGO	Nº DE MUESTRAS/TIPO	PROCEDIMIENTO
Lagos de >5 m profundidad Embalses	Opción II Muestra integrada entre la superficie y una profundidad previamente prefijada; ésta puede ser la correspondiente a la capa trofogénica (2,5 x profundidad del Disco de Secchi) (profundidad en la que se mide el 1% de la luz incidente). Esta opción solo es aceptable en masas de agua no muy profundas, y para perfiles bastante homogéneos; en caso contrario se pierde detalle en la información y se dejan sin estudiar las aguas profundas.	– Realizar un perfil de temperatura, conductividad, turbidez y oxígeno disuelto para identificar el patrón de estratificación. – Medir la profundidad del Disco de Secchi y realizar perfiles con fluorímetro. – Tomar la muestra integrada mediante un tubo de de plástico 20 mm de diámetro convenientemente lastrado, y de longitud prefijada. Alternativamente, se pueden mezclar volúmenes iguales de muestras tomadas con botella hidrográfica en diferentes niveles.

Nº de muestras: 1 ó 2 (si se integran las aguas más profundas)

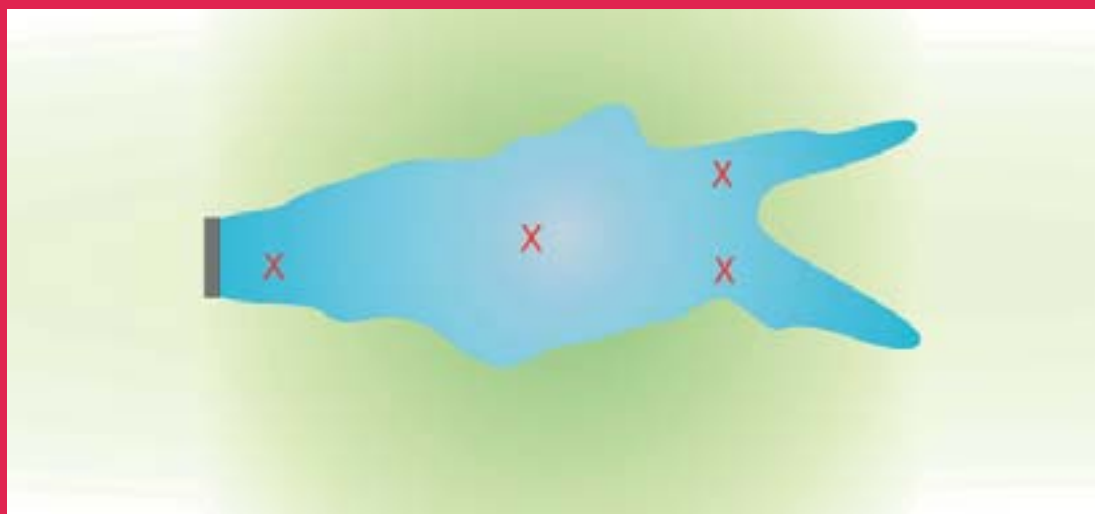
MASAS DE AGUA PROFUNDAS



Niveles de interés para el muestreo del fitopláncton:

- Epilimnion
- Interfase Epilimnion-Metalimnion
- Máximo metalimnético de oxígeno
- Metalimnion profundo
- Interfase Metalimnion-Hipolimnion
- Hipolimnion profundo

MASAS DE AGUA PROFUNDAS Y EXTENSAS



X toma de muestras integradas

En lagos de montaña profundos de difícil acceso con embarcación, se considera aceptable tomar la muestra de superficie desde la orilla, utilizando pértigas que permitan adentrar la botella y recoger plancton representativo, y no afectado en su composición por las comunidades litorales y/o bentónicas; no obstante siempre que sea posible es preferible el muestreo desde embarcación neumática.

c) Muestreo en masas de agua profundas y extensas

En embalses y lagos extensos y con brazos se fijará un punto de muestreo en la zona de la presa (máxima profundidad) y otros puntos de muestreo repartidos en zonas medias y colas. Esto es importante en embalses de largo recorrido, o con varios brazos principales, en los

que las características de la masa de agua pueden variar entre la presa y la cola (o colas).

Nº de muestras: entre 3 y 6 por punto de muestreo, o bien 1-2 muestras integradas por punto de muestreo (una de la zona trofogénica y otra de las aguas más profundas).

7.2.2. Periodos de muestreo y frecuencia

Según lo acordado en la reunión de expertos, los muestreos se ajustarán a lo indicado en la siguiente tabla.

Si por razones de limitación de recursos se tiene que realizar un solo muestreo por año, los periodos más significativos son:

TIPO DE LAGO	Nº MUESTREOS/ AÑO SEGUIMIENTO	Invierno	Primavera	Verano	Otoño
Alta montaña septentrional (aguas ácidas y aguas alcalinas)	2-3		■	■	■
Primavera (después deshielo) y verano; muestra adicional en otoño					
Cársticos hipogénicos pequeños (<50 ha) y grandes (>50 ha)	4-5	■	■	■	■
Invierno, inicio primavera, primavera-verano y final verano; final otoño, adicional					
Sedimentarios permanentes (profundo no salino, somero no salino y profundo salino)	3-4		■	■	■
Primavera (mayo), verano y otro periodo escogido a juicio de experto según lago					
Sedimentarios temporales (no salinos y salinos)	2-3		■	■	
Primavera (inicio) y primavera-verano (antes de secarse); final invierno o al poco tiempo de volver a llenarse					
EMBALSE	4-5	■	■	■	■

■ muestreo preferente ■ muestreo adicional recomendado

- final del verano para los lagos de alta montaña
- primavera - verano para los lagos cársticos y embalses
- primavera para los lagos sedimentarios (inicio para los temporales, y final para los permanentes).

7.2.3. Directrices para la toma de muestras

Tradicionalmente el fitoplancton se recoge a partir de muestras de agua tomadas en la superficie y en diferentes profundidades (o bien se compone una muestra integrada). No obstante en estas muestras no aparecen suficientemente representadas las algas de mayor tamaño (las cuales suponen una biomasa importante), para las que se realiza un muestreo complementario con red.

Muestras para la identificación y recuento del fitoplancton

- Tomar la muestra directamente y sin filtrar en una botella transparente o color topacio (esto permite controlar el estado de conservación y la presencia de agregados). No llenar la botella totalmente sino hasta un 90% para permitir la homogeneización posterior de la muestra.
- Muestras discretas e integradas. Las muestras de superficie se recogerán con el propio recipiente a 25-30 cm por debajo de la superficie. Las muestras de profundidad se tomarán con una botella hidrográfica (0,5 m de longitud), la cual se desciende hasta la profundidad deseada y se cierra mediante un mensajero. Las muestras integradas se tomarán mediante un tubo de plástico flexible de 20 mm de diámetro lastrado en uno de sus extremos. El tubo se sumerge, se tapa el extremo superior y se sube; cuando está arriba el extremo inferior se vacía en un recipiente. Este método presenta algunas dificultades cuando la longitud de muestreo es variable. De forma alternativa se pueden tomar muestras en diferentes profundidades con la botella hidrográfica y proceder a mezclar todas ellas para componer una muestra integrada (hay que asegurar que se mezclan volúmenes iguales). En lagos muy someros se puede tomar la muestra integrada mediante un tubo rígido de metacrilato de 3-5 cm de diámetro y 0,5-2 m de longitud (dependiendo de la profundidad del lago).
- Almacenar la muestra a oscuras inmediatamente; mantener en frío si se va a examinar “in vivo” o bien añadir un conservante si no se va a examinar en poco tiempo (ver apartado 7.3). Si no es posible almacenar las muestras en oscuridad, es preferible usar una botella de vidrio topacio.

Muestras obtenidas con red

- Se utiliza una red de 20 μm de luz de malla (en aguas ultraoligotróficas de lagos de montaña puede requerirse una malla 10 μm de poro; de igual modo en aguas muy eutróficas puede utilizarse una malla de 35

μm), la cual se arrastra en el seno del agua, horizontal o verticalmente (preferiblemente esta última opción), hasta conseguir un filtrado visible. Estas muestras son cualitativas y permiten la obtención de un inventario de taxones que complementa el obtenido en las muestras de botella. No obstante, se puede estandarizar el muestreo de forma que los resultados sean semicuantitativos (clases de abundancia o porcentaje de abundancia de las diferentes especies). Esto se realiza mediante la estima del caudal filtrado, o bien realizando recorridos horizontales y /o verticales de longitud prefijada; por ejemplo pesca vertical desde el fondo o la correspondiente al perfil de la zona trofógena (2,5 veces el Disco de Secchi)⁹.

- El filtrado se introduce en un recipiente de vidrio o plástico y se mantiene en frío o bien se añade un conservante (ver apartado 7.3.1).

Muestras para el análisis de pigmentos (Clorofila “a” y otros)

- Recoger un volumen de agua suficiente (de 0,5-2L) en los puntos de toma de muestras (superficie, niveles en el perfil), y llenar recipientes opacos.
- Mantener la muestra en frío hasta su filtrado.
- Filtrar la muestra siguiendo el procedimiento que se indica en el apartado 9.

7.2.4. Datos y/o muestras complementarias al muestreo de fitoplancton

La interpretación de los resultados del estudio del fitoplancton: inventarios, recuentos y biomasa (clorofila “a”), puede requerir disponer de los siguientes datos tomados en los puntos de muestreo:

- Coordenadas UTM de la estación de muestreo y profundidad a la que corresponde la muestra (en metros).
- Profundidad del Disco de Secchi.
- Color del agua medido en cubeta de 5 cm en el espectrofotómetro.
- Aspecto del agua (presencia de natas, espumas, acumulaciones de algas,...).
- Perfiles de temperatura, turbidez, conductividad, pH, potencial redox y oxígeno disuelto.
- Perfiles con sonda fluorimétrica.
- Nutrientes: fósforo soluble, fósforo total, nitrato, nitrito, amonio, nitrógeno total, y sílice.
- Otros parámetros complementarios: alcalinidad, calcio, iones mayoritarios de la mineralización, materias en suspensión, hierro, manganeso, entre otros. También es interesante medir la materia orgánica cromogénica disuelta (CDOM) por análisis espectrofluorimétrico múltiple que permite determinar la concentración y los tipos de CDOM (Reynolds, 2003, Stedmon y Markager, 2005).

⁹ Durante la estratificación se recomienda hacer capturas en el epilimnion, metalimnion, mediante el uso de redes especiales de cierre controlado (E.Vicente com.per.).

7.3. CONSERVACIÓN Y ETIQUETADO DE LAS MUESTRAS

7.3.1. Técnicas de conservación

Las muestras de fitoplancton se deben someter lo antes posible a uno de los siguientes métodos de conservación.

7.3.1.1 Muestras en vivo

Mantener las muestras vivas a oscuras y en nevera, entre 4 y 10°C. Proceder a enfriarlas paulatinamente para evitar daños en las células. Si la muestra contiene una elevada densidad de organismos y/o materia orgánica es conveniente diluir la muestra con agua del propio lugar, antes de guardarla. El tiempo máximo de conservación es de 12 horas.

7.3.1.2 Muestras con conservantes

Los conservantes más utilizados son una solución de Lugol (a razón de 0,5 ml por 100 ml de muestra) y el formaldehído (2-4%) (ver apartado 7.1.2). Todas las muestras fijadas se conservarán protegidas de la luz y en lugar fresco (<15°C).

7.3.2. Etiquetado

Todas las muestras y preparaciones deben estar convenientemente etiquetadas de forma que se identifique un código de la muestra, un código de su procedencia (localización), fecha de recolección, fijador utilizado y persona o entidad a cargo de la recolección e identificación. El código de la muestra servirá de enlace en la base de datos. Es importante indicar el tipo de muestra y el método de recolección (por ejemplo: Discreta/Botella hidrográfica/10 m de profundidad; o bien Integrada entre 0 y 15 m, tubo; etc.). Se usará un rotulador resistente al agua.

8. RECUENTO E IDENTIFICACIÓN DE FITOPLANCTON (MÉTODO UTERMÖHL)

En este apartado se establece un método para la identificación y recuento de las especies de fitoplancton presentes en las muestras de lagos y embalses. La elaboración del procedimiento se ha basado en:

- Norma CEN TC 230/WG 2/TG 3/N83 (documento de 11-05-2004), que a su vez, está basado en la técnica descrita por Utermöhl (1958).
- Información obtenida durante el seminario y de la bibliografía.

El procedimiento incluye directrices metodológicas para:

- Identificar el equipo de laboratorio necesario
- Preparar las muestras para su examen en el microscopio óptico invertido
- Identificar los taxones y realizar los recuentos

- Aplicar métodos estadísticos para optimizar el recuento
- Registrar los datos y muestras.

8.1. EQUIPO DE LABORATORIO

- *Microscopio invertido*: Debe estar equipado con un condensador de apertura numérica (NA) de 0,5 como mínimo y objetivos con AN de 0.9 o más. Es recomendable utilizar el objetivo de inmersión de x100 con AN de 1,3. Los oculares x10 o x12,5, estarán equipados con un micrómetro calibrado (uno de ellos) y con una retícula de recuento calibrada (el otro). Para exámenes en detalle es aconsejable usar un microscopio equipado con contraste de fases o con contraste interferencial de Nomarski.
- *Cámara digital* acoplada al microscopio.
- *Cámara o cubeta de sedimentación*: consiste en una columna vertical con una base a través de la cual el contenido puede ser observado con el microscopio invertido. La columna, de volumen variable según el tipo de lago, se llena de muestra y las partículas sedimentan en el fondo de la cámara. La cubeta está formada por dos piezas, una columna superior y una base formada por una arandela enroscable y un cubreobjetos redondo del diámetro adecuado. Se recomienda que el grosor del fondo de la cubeta no exceda 0.2 mm.
- *Formularios* para anotar el recuento de las especies. Puede contener una lista de taxones con espacios donde anotar el recuento; también puede usarse un programa de ordenador preparado para la entrada directa de datos.
- *Guías de identificación e iconografías*: adecuadas al ámbito de estudio.

En ocasiones es conveniente el uso de técnicas de microscopía electrónica de barrido (MEB) o de transmisión (MET) para llegar a una correcta clasificación de las especies. No obstante ni los equipos necesarios ni la técnica se detallan en este procedimiento.

8.2. PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA

8.2.1. Aclimatación de la muestra

Someter las muestras, cubetas de sedimentación y equipos a usar a un periodo de aclimatación a temperatura ambiente (en general de 12 horas pero puede variar según las diferencias de temperatura y el volumen de la muestra). De este modo se limitan las corrientes de convección y se favorece la distribución al azar del fitoplancton sedimentado en la muestra.

8.2.2. Homogeneización de la muestra

Durante el tiempo de almacenaje, las partículas sedimentan en la botella y se forman agregados entre algas

pequeñas y otras algas o colonias más grandes o con detritus. La homogenización de la muestra supone la resuspensión y separación de las partículas. Esto puede hacerse manualmente o preferiblemente con un dispositivo de mezcla. Para estandarizar en lo posible la homogenización manual se recomienda que la manipulación la realice una sola persona, combinando giros horizontales y verticales de la botella durante 1 a 3 minutos.

8.2.3. Preparación de submuestras

- Llenar la cubeta de sedimentación con la muestra. El volumen de muestra depende de la densidad de fitoplancton, no obstante como la cubeta se ha de llenar en su totalidad, en algunos casos habrá que añadir agua filtrada (a través de 0,45 µm de poro).
- Tapar la cubeta con una pieza cuadrada o circular de cristal, evitando la formación de burbujas de aire.
- Mantener las cubetas de sedimentación durante 1-2 días en un lugar sin luz solar directa, a temperatura ambiente constante, y evitar posibles vibraciones. Durante este proceso la muestra debe situarse sobre una superficie (mesa, poyata) bien nivelada, de modo que la sedimentación se produzca de forma homogénea sobre toda la placa.
- El tiempo de sedimentación recomendado es de 1-4 horas por centímetro de columna de sedimentación, para las muestras fijadas con Lugol.
- Si se observan algas con vesículas de gas que evitan su sedimentación, se puede provocar su rotura introduciendo la muestra en una jeringa y aumentando la presión interior (tapando el orificio de salida y apretando el pistón). En todo caso, las cianobacterias flotantes vacuoladas pueden cuantificarse por otros métodos (por filtración sobre membrana y tinción con DAPI¹⁰).
- La cubeta de sedimentación se tiene que limpiar entre usos, con agua y detergente o aclararse con etanol (90%), alcohol desnaturalizado comercial, isopropanol o acetona, y aclararse finalmente con agua destilada. Cuidar especialmente la limpieza del fondo de la cubeta.

8.2.4. Concentración y dilución

- En aguas con densidad de algas muy baja (aguas ultra-oligotróficas), se recomienda concentrar la muestra. El método más utilizado consiste en dejar sedimentar la muestra en la propia botella o en cilindros de sedimentación graduados. El cilindro o la botella, se mantienen a oscuras y a temperatura ambiente constante. Algunos organismos, pueden quedar adheridos a las paredes; para evitar esto, periódicamente se gira el cilindro o la botella un cuarto de vuelta rápidamente sobre su eje. La extracción del agua sobrenadante se realiza, introduciendo una pipeta Pasteur unida a una bomba

de vacío. El volumen del cilindro de sedimentación, puede variar en función de la cantidad de muestra que se desee sedimentar; (para aguas muy oligotróficas pueden usarse cilindros de 1 ó 2 L de capacidad).

- En aguas con densidad de algas elevada (aguas eutróficas e hipereutróficas), se recomienda diluir la muestra. Para obtener una distribución adecuada de partículas en la cubeta de sedimentación se recomienda extraer una pequeña cantidad de muestra (inversamente proporcional al diámetro de la cubeta) y añadir agua destilada filtrada en la proporción requerida según la densidad de algas y lugol (en una concentración similar a la que se usó para fijar la muestra).

8.2.5. Número de algas por campo

El número final de algas por campo óptico del microscopio debería ser óptimo para permitir la correcta identificación de las especies y facilitar el recuento. Esto depende de la densidad de algas en la submuestra, del tamaño relativo de las algas y de las partículas que no son algas. Se recomienda realizar evaluaciones con diferentes densidades hasta optimizar el procedimiento.

8.3. PROCESO DE RECUESTO

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 (especie, género,...).

Se recomienda realizar una visualización previa de la muestra, antes de iniciar el recuento, con la finalidad de confeccionar una lista de los taxones presentes en la muestra, y tener una visión general de la densidad de algas.

Existen dos estrategias alternativas para el recuento:

- Recuento de un número de campos ópticos del microscopio seleccionados al azar.
- Recuento de toda la cubeta de sedimentación.

8.3.1. Recuento por campos

Para contar por campos, la cuadrícula del ocular debe ser un campo cuadrado o una rejilla, no obstante también se puede contar todo el campo del microscopio y referir el resultado a la superficie del campo para el aumento utilizado.

Se procede a contar un número determinado de campos ópticos elegidos al azar. El número de campos o de algas son función del nivel de precisión (D) requerido y del límite de detección.

Cuando se cuenta con cuadrícula, hay que aplicar criterios estándar sobre los organismos que cruzan las líneas, de forma que por ejemplo, se cuenten los individuos que toquen arriba y a la derecha pero no abajo y

¹⁰ DAPI: 4', 6-Diamidino-2-fenilindol

$$\text{Nivel de precisión } (D) = 1/x * [\sqrt{(s^2/n)}] = 1/x * \sqrt{(x/n)} = 1/\sqrt{(n*x)} = 1/\sqrt{(\sum x)}$$

donde:

n = número de campos contados

x = número medio de objetos por campo

s = número total de objetos contados

Ejemplo: si se requiere una precisión del 5% en la estimación del número medio de objetos por campo, el número de objetos a contar será: $\sum = (1/0,05)^2 = 400$

Límite de detección = Concentración mínima de un taxón para la cual se puede detectar con una probabilidad del 99%.

Se calcula según la distribución de Poisson:

$$P(x>0) = 1 - e^{-\mu}$$

donde μ es la media del estadístico de Poisson,

Para $P = 0.99 \rightarrow n_{det} = 4,61 \cdot f_{total} / (V \cdot f_{cont})$ donde:

n_{det} = número de algas en la muestra

f_{total} = número de campos de la cubeta de sedimentación

f_{cont} = número de campos contados

V = volumen de muestra en la cubeta

a la izquierda del recuadro. En cuanto a las colonias, se toma como criterio no tener en cuenta las células que quedan fuera de la cuadrícula. En el caso de filamentos en los que no se distingue la separación entre células, se cuentan éstos y puede estimarse su longitud media (por medio de una escala micrométrica).

Una técnica para estandarizar el recuento consiste en contar campos al azar hasta completar un total de 500 algas, habiendo contado al menos 100 campos.

8.3.2. Recuento de la cámara completa

Este método es apropiado cuando la densidad de algas es baja, o bien se realiza el recuento de una especie poco representada, o que tiene un tamaño grande.

En este caso, en la rejilla de uno de los oculares, habrá una cuadrícula, compuesta por dos líneas paralelas horizontales dentro del ocular, formando un transecto (también es recomendado disponer de otra línea vertical en el centro). El método consiste en ir moviendo la cámara de arriba-abajo e izquierda-derecha, y viceversa, a la vez que se cuentan los individuos que queden entre las dos líneas de la rejilla del ocular; los objetos solo se cuentan cuando se encuentran entre las líneas.

8.3.3. Cálculo de la concentración de fitoplancton

Los números de algas contados (células) se convierten en una concentración por unidad de volumen de muestra, según lo siguiente:

$$N = X * [(A * d) / (a * v)]$$

donde:

N = número de células en la muestra (cell/ml),

X = número medio de células por campo (o número total de células de la cámara),

A = área de la cámara,

v = volumen de muestra sedimentado en la cámara,

a = área del campo óptico o de la cuadrícula y

d = factor de dilución o de concentración de la muestra (en caso de que se halla diluido o concentrado según la densidad de algas).

Si el recuento se realiza sobre colonias o filamentos, para expresar el valor en **cel/ml**, debe hallarse un número medio de células por colonia/filamento, y multiplicar éste por el número de colonias/filamentos. En el caso de que las células sean difíciles de diferenciar dentro de la colonia (p.e. *Oscillatoria*) el número de células se puede aproximar según el tamaño de la célula.

8.3.4. Cálculo del biovolumen

La abundancia de las algas expresada como biovolumen (mm³/L) permite una mejor comparación con la concentración de clorofila "a" (la cual se usa habitualmente como indicador de la biomasa del fitoplancton). La relación entre la concentración de clorofila "a" y los recuentos expresados en células/ml puede tener desviaciones importantes, a consecuencia del tamaño de las células. No obstante el cálculo del biovolumen de las especies también puede incorporar errores de importancia. Una estrategia de recuento puede ser la de calcular sólo los biovolúmenes de las especies que más contribuyen al biovolumen total. En cualquier caso, estos problemas se resuelven, en la actualidad, mediante la aplicación de técnicas de análisis de imagen, utilizando como base recuentos digitalizados.

Para la determinación del biovolumen se utiliza el método de Rott que consiste en medir como mínimo 20 individuos de cada especie, la cual se asimila a una forma geométrica que responda a su forma; entonces se calcula el volumen de cada especie, según la fórmula para la figura geométrica escogida y, finalmente, se multiplica el volumen por el número de células/ml obtenido en el recuento.

8.3.5. Recuentos de picoplancton

El picoplancton integrado por pequeñas cianobacterias, microalgas autótrofas y heterótrofas, pequeños flagelados (verdes e incoloros) y el bacterioplancton (incluidas las bacterias fotosintéticas), escapan por su pequeño tamaño al recuento por el método de Utermöhl. No obstante, el picoplancton tiene gran importancia ecológica y funcional en los ecosistemas acuáticos.

Para cuantificar el picoplancton hay que acudir a técnicas de filtración sobre membranas de policarbonatos (negras) de 0,2 μm de poro. Tras la filtración de las células se procede a teñirlas con un fluorocromo apropiado (el más utilizado es el DAPI¹¹) y después se observan los filtros por epifluorescencia con varias bandas de excitación – emisión. Los resultados óptimos se obtienen con fotomicroscopía de epifluorescencia o por las técnicas de microscopía confocal. Para el establecimiento del número y biomasa de este grupo también resulta útil apoyarse en la fluorocitometría de flujo.

8.4. IDENTIFICACIÓN

La identificación de los taxones se realiza mediante el apoyo de claves y guías. En la bibliografía se presenta una relación de las referencias más importantes. Es importante comprobar las descripciones escritas de las especies (no sólo comparar con dibujos o fotos) y tener en cuenta la información ecológica (distribución, hábitat, requerimientos,...). Se recomienda realizar dibujos y fotografías, de utilidad como colección de referencia.

El trabajo de identificación y recuento sólo puede realizarlo personal especializado (con entrenamiento de varios años). Para la identificación de las muestras de referencia se recomienda contar con el apoyo de expertos.

9. ANÁLISIS DE PIGMENTOS (CLOROFILA “A”)

La concentración de clorofila “a” es una medida indirecta de la biomasa del fitoplancton. El procedimiento para su análisis incluye la concentración del fitoplancton, la extracción de los pigmentos con una solución acuosa de acetona (90%) y la determinación de la densidad óptica (absorbancia) del extracto por medio de un espectrofotómetro. El procedimiento que se describe está basado en *Standard Methods 10200 H* (APHA, 1998)¹².

9.1. EQUIPOS Y REACTIVOS

9.1.1. Equipos y reactivos para la extracción de pigmentos

- Equipo de filtración.
- Bomba de vacío.
- Filtros de microfibras de vidrio de 0,4-0,6 μm de poro (por ejemplo Whatman GF/F).
- Solución de carbonato magnésico saturada (se disuelve 1 g de MgCO_3 en polvo en 100 ml de agua destilada).
- Solución de acetona 90% (mezclar 90 partes de acetona con 10 partes de la solución saturada de carbonato magnésico).

9.1.2. Equipos y reactivos para la determinación de la clorofila

- Triturador de tejidos vegetales o aparato de sonicación.
- Centrifugadora clínica y tubos de centrifuga de 15 ml (opcional).
- Espectrofotómetro, con banda estrecha (0,5 a 20 nm; por lo general de 2 nm).
- Cubetas con recorridos de 1, 5 y 10 cm.
- Pipetas (0,1 y 5 ml).

9.2. EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS

• Concentrar la muestra mediante el filtrado de un volumen suficiente de agua a través de un filtro de microfibras de vidrio (GF/F). La adición de una suspensión acuosa de carbonato magnésico (ver apartado 9.1.1.) aumenta la eficiencia de retención del filtro y evita la degradación de la clorofila (APHA 1998). Realizar el filtrado de la muestra lo antes posible. Si hay que conservar la muestra usar botellas opacas y mantenerla en frío (alrededor de 4°C).

- Mantener el filtro congelado (-20 °C), preferentemente en el mismo tubo donde se realizará posteriormente la extracción, y protegido de la luz. El filtro se puede conservar así hasta 2-3 semanas.
- Añadir al tubo con el filtro de fitoplancton una cantidad aproximada de 5 ml de solución de acetona y mantener en frío (0 – 4 °C) y en la oscuridad, al menos 12-24 horas. Acelerar la extracción mediante la trituración mecánica del filtro o bien por sonicación suave para romper las células. Si se añade dimetilsulfóxido a la solución de acetona (1:1) se favorece la extracción sobre todo cuando dominan algas de paredes gruesas¹³. Durante la extracción puede agitarse el tubo un par de veces. También puede hacerse la extracción a -20 °C durante 2-3 días.

¹¹ DAPI: 4', 6-Diamidino-2-fenilindol

¹² En agua muy oligotróficas con muy bajo contenido en clorofila puede requerirse el uso de otro método más sensible que el fotométrico, basado por ejemplo en medidas fluorimétricas del extracto.

¹³ Propuesta de Eduardo Vicente.

DIATOMEAS Y DINOFÍCEAS



Fragilaria crotonensis y *Ceratium hirundinella*



Asterionella sp.



Peridiniopsis polonicum



CLOROFÍCEAS



Pediatrum boryanum

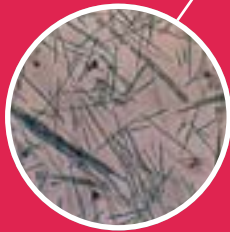


Pandorina sp.

CIANOBACTERIAS



Planktothrix rubescens



Aphanizomenon flosaquae



Microcystis sp.



Anabaena sp.

- Finalizada la extracción filtrar el solvente a través de otro filtro de microfibra de vidrio o bien centrifugar (5-10 minutos a 3.000 rpm). Medir el volumen del extracto (en general 5 ml)¹⁴. Es importante trabajar rápido para evitar la evaporación de la acetona y la variación del volumen del extracto. El extracto es muy sensible a la luz por lo que hay que realizar este proceso, así como la lectura espectrofotométrica con la luz de la habitación muy atenuada, y mantener los tubos en una caja negra o debidamente protegidos de la luz.

9.3. DETERMINACIÓN DE LA CLOROFILA POR ESPECTROFOTOMETRÍA

Llenar la cubeta del espectrofotómetro y medir las densidades ópticas del extracto clarificado (éste debe ser completamente transparente) para las longitudes de onda que requiera la fórmula de cálculo elegida. Entre éstas una de las más utilizadas es la fórmula de Jeffrey y Humphrey (1975).

9.4. DETERMINACIÓN DE OTROS PIGMENTOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA

De forma complementaria puede hacerse un espectro completo del extracto entre 350 y 850 nm de longitud de onda, para evidenciar la presencia de otros pigmentos como bacterioclorofilas, carotenos, etc., así como para calcular los índices de Margalef (A665/A430) y de Moss (A665/A410).

La realización de un espectro “in vivo” del filtrado sobre filtro GF/F aporta información sobre la proporción entre clorofilas y ficobilinas, y permite caracterizar las diferentes bacterioclorofilas.

9.5. DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS POR TÉCNICAS DE CROMATOGRAFÍA

En estudios de detalle, en los que se requiera la separación e identificación de las clases de clorofilas y sus derivados (feofitina y otros feopigmentos), así como de ciertos carotenos indicadores de grupos algales o condiciones ambientales, deberán usarse técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*).

9.6. CONFIRMACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de la concentración de la clorofila y los recuentos algales deben cruzarse entre sí, y éstos con los datos de campo disponibles (valores de las lecturas con las sondas de fluorescencia y por la espectrorradiometría) para analizar su coherencia.

10. PROTOCOLO PARA CONTROL DE CALIDAD

La implementación de la Directiva 2000/60/CE requiere que los métodos que se utilicen en el establecimiento del estado ecológico procedan de metodologías estandarizadas (ISO, CEN, o de organismos nacionales de estandarización), que los laboratorios dispongan de programas de aseguramiento de la calidad (EN ISO 17025) y participen regularmente en ejercicios de intercalibración (*Proficiency testing programmes*).

La toma de muestras de fitoplancton y de pigmentos así como los trabajos de análisis se realizarán teniendo en cuenta procedimientos de aseguramiento de la calidad, cuyas directrices se indican en los siguientes apartados.

$$\text{Chl.}^{\text{a}} \text{ (}\mu\text{g/L)} = \frac{[1,85^*(A_{664} - A_{750}) - 1,54 (A_{647} - A_{750}) - 0,08^*(A_{630} - A_{750})]^*v}{V}$$

donde:

A₆₃₀, A₆₄₇, A₆₆₄, A₇₅₀ = Densidad óptica medida a las longitudes de onda indicadas (en nm), en una cubeta de paso óptico de 1 cm

v = volumen en ml del extracto

V = volumen de agua filtrada (en L)

¹⁴ Hay que considerar el volumen del solvente añadido más el volumen de agua que retiene el filtro que contiene el fitoplancton (este último volumen depende del tipo y tamaño del filtro utilizado).

10.1. DIRECTRICES PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD EN LA TOMA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Objetivo: Realizar el trabajo de campo y evaluaciones según los procedimientos estándar previamente definidos.

- | | |
|----------------|--|
| Medidas | <ul style="list-style-type: none"> • Preparar una hoja directriz que resuma de forma clara y didáctica las tareas y procedimientos a desarrollar en el trabajo de campo. • Documentar los trabajos y usar hojas de campo previamente preparadas. Indicar la localización de las estaciones de muestreo (coordenadas GPS y profundidad, tipo de muestra (discreta o integrada) y demás datos de interés (profundidad del Disco de Secchi, y otros datos fisicoquímicos que deben ser totalmente fiables). • Si se filtra en el campo para el análisis de pigmentos incluir un estadillo que permita anotar el volumen filtrado y las condiciones de conservación de los filtrados y/o extractos (temperatura, protección de la luz, etc.). |
|----------------|--|

Objetivo: Asegurar la correcta conservación de las muestras para el análisis de pigmentos (o los extractos) y las muestras de fitoplancton fijadas con Lugol.

- | | |
|----------------|--|
| Medidas | <ul style="list-style-type: none"> • Si se filtra en el campo para el análisis de pigmentos asegurar que los extractos se mantienen a la temperatura adecuada. • Comprobar el grado de foto-oxidación del Lugol de forma periódica y añadir más conservante en caso necesario. |
|----------------|--|

10.2. DIRECTRICES PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD EN EL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Objetivo: Asegurar que se siguen rigurosamente los procedimientos de análisis de las muestras.

- | | |
|----------------|---|
| Medidas | <ul style="list-style-type: none"> • Redactar los métodos a usar en el laboratorio de forma clara incluyendo todos los pasos a seguir, e indicar las fuentes de error y los límites de confianza. • Realizar entrenamientos al personal en la aplicación concreta de cada procedimiento o uso de equipos. |
|----------------|---|

Objetivo: Realizar pruebas internas de control de calidad.

- | | |
|----------------|--|
| Medidas | <ul style="list-style-type: none"> • Calibrar los equipos y los métodos de forma regular. • Analizar réplicas de los recuentos para una o varias muestras representativas (en general 5-10% de las muestras). El análisis lo realizará otro técnico cualificado. Se confrontarán los resultados y se identificarán las diferencias en los resultados. • Incluir los resultados de los recuentos en hojas de cálculo y verificar la ausencia de errores (repasso por otro operador). |
|----------------|--|

Objetivo: Realizar pruebas externas de control de calidad.

- | | |
|----------------|---|
| Medidas | <ul style="list-style-type: none"> • Realizar auditorías externas y enviar muestras duplicadas para recuento a un laboratorio externo, a ser posible a un experto en la taxonomía y recuento del fitoplancton. • Participar en pruebas de intercalibración. |
|----------------|---|

10.3. DIRECTRICES PARA EL CONTROL DE CALIDAD EN EL TRATAMIENTO DE LOS DATOS

Objetivo: Control del manejo de datos y análisis de los resultados.

- | | |
|----------------|--|
| Medidas | <ul style="list-style-type: none"> • Todos los datos de un muestreo específico se deben identificar de forma individual, en la base de datos por medio de códigos. • La documentación de campo y laboratorio (muestras, estadillos, fotos) se guardará durante un periodo no inferior a 5-6 años. • Los datos en formato electrónico deberán incluir identificación de su origen (autores, fechas, etc...) y referencias para ampliar la información. • Todos los resultados de las medidas efectuadas en el campo (perfiles con sondas multiparamétricas y fluorimétricas) y de los análisis de laboratorio (recuentos por la técnica de Utermöhl u otras técnicas, biovolumen, concentración de clorofila y otros pigmentos) se confrontarán para identificar el grado de correspondencia. |
|----------------|--|

GLOSARIO Y BIBLIOGRAFÍA

GLOSARIO

- Apertura numérica (AN):** Es la diferencia entre el índice de refracción del medio entre el objetivo y objeto multiplicado por el seno de la mitad del ángulo de la luz incidente. Indica la medida de la resolución de un objetivo de microscopio o de un sistema óptico.
- Asociaciones de algas (*Algal assemblages*):** Asociaciones de cianobacterias y algas del plancton que tienden a repetirse en un tipo de masa de agua, en determinadas épocas del año o condiciones ambientales.
- Biovolumen:** Expresión del volumen total que ocupa la biomasa algal, obtenido como el sumatorio de los volúmenes de todas las células que aparecen en el recuento, asimiladas a formas geométricas de fácil cubicación, o bien obtenido por técnicas de análisis de imagen, citometría u otras similares.
- Botella hidrográfica:** Dispositivo que permite tomar muestras de agua a la profundidad deseada.
- Campo de recuento:** Área delimitada (cuadrícula o rejilla) en el campo de visión del microscopio que se usa para el recuento. Puede ser también todo el campo óptico del microscopio (sin utilizar cuadrícula).
- Capa fótica:** Masa de agua comprendida entre la superficie y la profundidad a la que llega el 1% de la radiación incidente. Esta capa es equivalente a la zona trofogénica.
- Carotenoides:** Pigmentos fotosintéticos que reúnen los carotenos y las xantofilas. Consisten en cadenas alifáticas que presentan los máximos de absorción de la luz en la banda de 400 a 550 nm.
- Cianobacterias:** Bacterias que llevan a cabo la fotosíntesis oxigénica¹⁵ (aparato fotosintético organizado en los fotosistemas PSI y PIS), gracias a que poseen pigmentos fotosintéticos (clorofila **a**, beta caroteno y ficobilinas). Se las conoce también como cianoprocarriotas y anteriormente como cianofíceas.
- Clorofilas:** Pigmentos fotosintéticos. Moléculas complejas derivados de la porfina y que contienen magnesio; tienen dos máximos de absorción de la luz hacia 430 y 665 nm. Existen diferentes tipos, de los que la clorofila **a** se encuentra en todos los organismos fotosintetizadores, excepto en las bacterias fotosintéticas. Éstas tienen un pigmento equivalente, las bacterioclorofilas de las que también hay varios tipos.
- Condiciones de referencia:** Para cualquier masa de agua, las condiciones de referencia del tipo al que pertenece son un estado ecológico, en el presente o en el pasado, donde los valores de los elementos hidromorfológicos, fisicoquímicos y biológicos corresponden a los que existen en ausencia de alteraciones antropogénicas o de muy escasa importancia (según Guía REFCOND, 2003).
- Cromatografía:** Técnica analítica que permite separar los componentes de una mezcla química según su tiempo de retención en la columna cromatográfica del sistema.
- Disco de Secchi:** Es un disco de 25 cm de diámetro, con cuatro sectores blancos y negros (diseño original) que se utiliza para medir la transparencia del agua, y a partir de este dato calcular el coeficiente de extinción y la penetración de la luz en las masas de agua. El disco se sumerge verticalmente en el agua hasta que se deja de ver. La distancia recorrida por el disco se denomina profundidad del Disco de Secchi (D). Se considera que este valor multiplicado por 2,5 es el espesor de la capa fótica (1% de la intensidad de la luz incidente), si bien este coeficiente puede variar según las características del agua (es recomendable calibrar este valor con ayuda de un medidor de luz).
- DMA:** Directiva Marco del Agua, Directiva 2000/60/CE. Establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- ECOFRAME:** Propuesta metodológica para la determinación del estado ecológico en lagos someros. Ver Moss et al (2003).
- Estado ecológico:** En el marco de aplicación de la DMA, se define como una expresión de la calidad de la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos asociados a las aguas superficiales.
- Eutrofización:** Aumento del número de algas y otros productores primarios como resultado del enriquecimiento de las masas de agua por nutrientes, de origen natural o antropogénico.
- Espectrofotometría:** Método de análisis óptico basado en la medida de las densidades ópticas de una sustancia para diferentes longitudes de onda.
- Feofitina:** Es un producto de degradación de la clorofila tras perder ésta el átomo de magnesio.
- Ficobilinas:** Pigmentos fotosintéticos accesorios. Constituidas por proteínas solubles en agua; tienen máximos de absorción de la luz en la banda de 500 a 660 nm. Las principales son: ficocianina, ficoeritrina y aloficocianina.
- Fitobentos:** Organismos fototróficos que viven asociados a cualquier sustrato del fondo de los ecosistemas acuáticos. Incluye cianobacterias, algas microscópicas (microalgas), macroalgas y macrófitos.
- Fitoplancton:** Comunidad de microorganismos fotosintéticos (microalgas eucariotas y cianobacterias) que vive suspendida en la masa de agua.
- Floraciones:** Crecimiento masivo de las poblaciones de algas y cianobacterias que aumentan considerablemente la turbidez del agua y confieren a ésta coloraciones muy llamativas (verde, verde-azulada, rojiza, dorada, marrón).

Fluorimetría: Referido al análisis de pigmentos de las algas, es una técnica que permite su identificación, a partir de su fluorescencia.

Fluorocromo: Sustancia que tiene la propiedad de emitir un fotón de una longitud de onda determinada cuando es excitada por un fotón incidente de una longitud de onda más energética que la que emite.

Límite de detección: En este documento se aplica al número mínimo de un taxón o grupo de organismos en la muestra cuya presencia puede detectarse con una probabilidad del 99%.

Macrófitos: Vegetales acuáticos visibles a simple vista, entre las que se encuentran plantas vasculares (cormófitos), briófitos y macroalgas (algas caráceas y de otros grupos).

Microscopio confocal: Es un microscopio óptico en el que la muestra se ilumina por barrido con uno o más láseres monocromáticos (generalmente azul, verde y rojo) y un diafragma de objetivo que selecciona únicamente la luz procedente del plano focal (o sea la luz enfocada). La imagen de cada punto se incorpora a un registro digital a partir del que se obtiene la imagen del campo del microscopio. De esta manera, la imagen de la muestra desglosada en planos focales de grosor predeterminado, se va incorporando al registro digital, del que puede construirse una imagen tridimensional. Este microscopio permite obtener imágenes por reflexión y también el estudio de muestras con marcaje fluorescente, haciendo secciones ópticas de

las mismas y obteniéndose una imagen tridimensional computerizada.

Microscopio invertido: Microscopio óptico que presenta los objetivos situados bajo la platina, y la fuente de iluminación en posición superior; se usa para la determinación y recuento del fitoplancton.

Muestra integrada: En el documento se aplica a muestras de agua obtenidas de mezclar volúmenes equivalentes de agua procedente de diferentes puntos de la superficie o del perfil batimétrico de la masa de agua.

Ocular micrométrico: Ocular del microscopio dotado de una escala métrica, que permite obtener medidas absolutas de los objetos de la preparación. La relación entre cada división del micrométrico y el tamaño real del objeto dependerá del aumento del microscopio, por lo que es necesario calcular previamente a su uso, el coeficiente micrométrico del conjunto microscopio-ocular micrométrico para cada combinación de aumento.

Picoplancton: Fracción del fitoplancton constituida por organismos de tamaño inferior a 2 μm .

Poisson (distribución de): Similar a la distribución normal pero truncada en la izquierda cerca de la media. Describe la probabilidad de hechos al azar en espacio tiempo; en este protocolo se aplica a la distribución de células algales en la muestra.

Taxón: Categoría taxonómica, por ejemplo familia, género o especie.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Agencia Catalana de l'Aigua (2003). *Desenvolupament d'un índex integral de qualitat ecològica i regionalització ambiental dels sistemes lacustres de Catalunya*. Centre d'estudis Avançats de Banes (CSIC), 88 pàgs.
- Agencia Catalana de l'Aigua (2003). *Caracterització i propostes d'estudi dels embassaments catalans segons la Directiva 2000/60/CE del Parlament Europeu*. Universitat de Barcelona –Grup de Recerca en Ecologia Aquàtica Continental. Departament d'Ecologia- y Universitat de Girona- Institut d'Ecologia Aquàtica i Dept. Ciències Ambientals-, 212 pàgs.
- Alvarez Cobelas, M., Reynolds, C.S., Sánchez Castillo, P. y J. Kristiansen (1998). *Phytoplankton and Trophic Gradients*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Andreu Moliner, E. y A. Camacho González (2002). *Recomendaciones para la toma de muestras de agua, biota y sedimentos en humedales Ramsar*. Ministerio de Medio Ambiente. Dirección general de Conservación de la Naturaleza.
- APHA (1998). *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. 20th edition.
- Barbe, J., Lavergne, E., Rofes, G. Lascombe, M., Rivas, Bernard, CH., y J. De Benedittis (1990). *Diagnose rapide des plans d'eau*. Informations Techniques du CEMA-GREF, 79: 1-8.
- Barbe, J. M. Lafont, L.Mallet, J. Mouthon, M. Philippe y V.Vey (2003). *Actualisation de la méthode de diagnose rapide des plans d'eau. Analyse critique des indices de qualité des lacs et propositions d'indices de fonctionnement de l'écosystème lacustre*. Cemagref. Agence de l'Eau.
- Boehme J.E. et al. (2004). Examining CDOM fluorescent variability using principal component analysis: seasonal and regional modeling of three-dimensional fluorescence in the Gulf of Mexico. *Mar.Chem.* 89 :3-14.
- Brettum, P. (1989). Alger som indikatorer pa vannkvalitet i norske innsjoer. *Planteplankton*. NIVA Report, 111 pp.
- Camacho, A., García –Pichel F., Vicente E. y R.W. Castenholz (1996). Adaptation to sulfide and to the underwater light field in three cyanobacterial isolates from Lake Arcas (Spain). *FEMS Microbiology Ecology* 21: 293-301.
- Camacho A., Vicente, E. y M.R. Miracle (2000). Ecology of a deep-living *Oscillatoria* (=Planktothrix) population in the sulphide-rich waters of a Spanish karstic lake. *Arch. Hydrobiol.* 148 (3): 335-355.
- Camacho A., Vicente, E. y M.R. Miracle (2001). Ecology of *Cryptomonas* at the chemocline of a karstic sulfate-rich lake. *Mar. Freshwater Res* 52: 805-815.
- Camacho, A., Vicente, E., García-Gil, L.J., Miracle, M.R., Sendra, M.D., Vila X. y C.M. Borrego (2002). Factor determining changes in the abundance and distribution of micro-, nano-, and picoplanktonic phototrophs in Lake El Tobar (Central Spain) (2002). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 28: 613-619.
- Camacho, A., Wurtsbaugh, W.A., Miracle, M.A., Armegol X. y E. Vicente (2003). Nitrogen limitation of phytoplankton in a Spanish karst lake with a deep chlorophyll maximum: a nutrient enrichment bioassay approach. *Journal of Plankton Research*, 25 (4): 397-404.
- Camacho A., Picazo A., Miracle, M.R. y E. Vicente (2003). Spatial distribution and temporal dynamics of picocyanobacteria in a meromictic karstic lake. *Algological Studies* 109: 171-184.
- Camacho A., Miracle, M.R. y E. Vicente (2003). Which factors determine the abundance and distribution of picocyanobacteria in inland waters?. A comparison among different types of lakes and ponds. *Arch. Hydrobiol.* 157 (3): 321-338.
- Cammack et al (2004). Fluorescent dissolved organic matter in lakes. Relationships with heterotrophic metabolism. *Limnol. Oceanogr.* 49(6): 2034-2045.
- Catalan, J. (1991). The relationships between the functional anatomy of lakes and primary production. In: J. Ros and N. Prat (eds) *Homage to Margalef, or why there is such pleasure in studying nature*. *Oecologia Aquatica* 10: 77-95.
- Catalan, J., E. Ballesteros, L. Camarero, M. Felip y E. Gacia (1992). Limnology in the Pyrenean lakes. *Limnetica* 8: 27-38.
- CEN. European Committee for Standardization. 2004 /TC 230. *Water Quality. Standard for the routine analysis of phytoplankton abundance and composition using inverted microscopy (Utermöhl technique)*, 1-38 pp.
- Coble P.G., Green, S.A., Blough N.V. y R.B. Gagosian (1990). Characterization of dissolved organic matter in the Black Sea by fluorescence spectroscopy. *Nature* 348: 432-435.
- Coble P.G. (1996). Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Mar. Chem* 51: 325-346.
- Coble P.G. et al. (1998). Distribution and optical properties of CDOM in the Arabian Sea during the 1995 Southwest Monsoon. *Deep-Sea., Part 2*: 2195-2223.
- Dasí M.J., M.R. Miracle, A. Camacho, J.M. Soria y E. Vicente (1998). Summer phytoplankton assemblages across trophic gradients in hard-waters reservoirs. *Hydrobiologia* 369/370: 27-43.
- De Hoyos, C., A.I. Negro y J.J. Aldasoro. 2004. Cyanobacteria distribution and abundance in the Spanish water reservoirs during thermal stratification. *Limnetica* 23(1-2): 119-132.
- García-Gil L.J., Vicente E., Camacho A., Borrego, C.M., Vila X., Cristina X.P. y J. Rodríguez González (1999). *Aquatic Microbial Ecology* 20: 299-303.
- Gasol J.M. y P.A. del Giorgio (2000). Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Scientia Marina* 64: 197-224.

- Gobierno Vasco (2004). Metodología para la determinación del estado ecológico en los humedades interiores de la CAPV.
- Harris, G.P. (1986). *Phytoplankton Ecology. Structure, Function and Fluctuation*. Chapman and Hall, Cambridge.
- Heinonen, P. 1980. Quantity and composition of phytoplankton in Finnish inland waters. *Publications of the Water Research Institute*, 37: 1-91.
- Hörnström, E. (1981). Trophic characterization of lakes by means of qualitative phytoplankton analysis. *Limnologica* (Berlin) 13: 249-261.
- Hötzel G y R. Croome (1999). *A Phytoplankton Methods Manual for Australian Freshwaters*. Land and Water resources and Development Corporation.
- Hoyos C. de, A.I. Negro y J. Avilés. (2003). Las cianobacterias en los embalses españoles. situación actual. *Ingeniería Civil CEDEX* 129.
- James S. y L. Evison Eds. (1979). *Biological Indicators of Water Quality*. London.
- Jeffrey, S.W., y G.F. Humphrey (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 y c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 167: 191-194.
- Kruk, C., Mazzeo, N., Lacerot, G. y C.S. Reynolds (2002). Classification schemes for phytoplankton: a local validation of a functional approach to the analysis of species temporal replacement. *Journal of Plankton Research* 24(9): 901-912.
- Lorenzen, M.W. (1980). Use of chlorophyll-Secchi disk relationships. *Limnol. Oceanogr.*, 25(2): 371-372.
- Margalef, R., Planas D., Armengol J., Vidal A., Prat N., Guisset A., Toja J. y M. Estrada (1976). *Limnología de los embalses españoles*. Dirección General de Obras Hidráulicas. Ministerio de Obras Públicas. Publicación nº 123. Madrid.
- Margalef, R., Mir M. y M. Estrada (1982). Phytoplankton composition and distribution as an expresión of properties of reservoirs. *Canadian Water Resources Journal* 7: 26-50.
- Margalef R. (1983). *Limnología*. Omega. Barcelona.
- Miracle M.R., Dasi, M.J. y E. Vicente (1998). Forced phytoplankton vertical migrations due to lake water "whiting". *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 26: 1749-1754.
- Morata, S.M., Camacho A., Miracle, M.R. y E. Vicente (2003). Asociaciones fitoplanctónicas y su periodicidad en un lago marcadamente estratificado. *Limnetica* 22 (3-4): 35-52.
- Moss B et al. (y 48 autores más) (2003). The determination of ecological status in shallow lakes – a tested system (ECOFRAME) for implementation of the European Water Framework Directive. *Aquatic conservation: marine and freshwater ecosystems*, 13:507-549.
- Moss, B. et al (y 20 autores más) (2004). Continental-scale patterns of nutrient and fish effects on shallow lakes: síntesis of a pan-European mesocosm experiment. *Freshwater Biology* 49: 1633-1649.
- Noges P. et al. (y 26 autores más) (2003). Factors controlling hydrochemical and trophic state variables in 86 shallow lakes in Europe. *Hydrobiologia* 505-509: 51-58.
- Noppe K. y J. Prygiel (1999). Phytoplankton as an eutrophication indicator for the main watercourses of the Artois-Picardie water basin (France). In Prygiel J., Whitton B.A., Bukowska, J. (eds). *Use of Algae for Monitoring Rivers III*, p.1994-205.
- Negro, A.I. y C. De Hoyos. (2005). Relationships between diatoms and the environment in Spanish reservoirs. *Limnetica* 23 (1-2): 119-132.
- OCDE (1982). *Eutrophication of waters. Monitoring, assessment and control*. OCDE, Paris, 154 pp.
- Ortiz, R., Huck, V, Armengol J., Cambra J. y L. Ector (en prensa). Distribución longitudinal et composición florística des diatomées planctoniques du lac de barrage de Sau (Catalogne). Universitat de Barcelona y Centre de Recherche Public Gabriel Lippmann.
- Rodrigo M.A., Camacho A., Vicente E. y M.R. Miracle (1999). Microstratified vertical distribution and migration of phototrophic microorganisms during a diel cycle in lake Arcas-2 (Spain). *Arch. Hydrobiol.* 145(4): 497-512.
- Rodrigo M.A., Vicente E. y M.R. Miracle (2000). The role of light and concentration gradients in the vertical stratification and seasonal development of phototrophic bacteria in a meromictic lake. *Arch. Hydrobiol.* 148(4):533-548.
- Parlamento Europeo de la Unión Europea (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for the Community action in the field of water policy. *Off. J. Eur. Comm.* 327: 1-72.
- Planas D. (1975). Distribution and productivity of the phytoplankton in Spanish reservoirs. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 19: 1860-1870.
- Reynolds, C.S. (1984). *The ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Reynolds, C.S. (1990): Temporal scales of variability in pelagic environments and the response of phytoplankton. *Freshwater Biology* 23: 25-53.
- Reynolds, C.S., Huszar, V., Kruk, C. Naselli-Flores L. y S. Melo (2002). Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 24(5): 417-428.
- Reynolds (2003). Rapid and direct determination of tryptophan in water using synchronous fluorescence spectroscopy. *Water Research* 37: 3055-3060.
- Riera, J.L., Martí E. y J.A. Morguí (1991). Changes in the trophic state of Spanish reservoirs during the last sixteen years. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 24: 1367-1370.
- Riera J.L. (1993). *Limnología regional de los embalses españoles*. Relaciones entre nutrientes, seston y fitoplancton. Universidad de Barcelona. Tesis Doctoral.
- Riera, J.L. y J. Armengol (1995). Relationships between seston composition and water transparency in Spanish

- reservoirs. *Internationale Revue del gesamten Hydrobiologie*, 80: 1-14.
- Riera, J.L., Martí E., Morgui J.A., Sabater F. y J. Peñuelas (1995). Respiratory electron transport system (ETS) activity in Spanish reservoirs: relations with nutrients and seston. *Journal of Plankton Research*, 17:513-530.
- Riolobos, P., Alvarez Cobelas, M., Rojo., Rodrigo, M.A., Ortega Mayagoitia, E. y S. Cirujano (2002). Técnicas habituales de análisis físicos, químicos y biológicos. Real Jardín Botánico. Madrid.
- Rojo V. y M. Álvarez-Cobelas (2003). Are there steady-state phytoplankton assemblages in the field?. *Hydrobiologia* 502: 3-12.
- Romo, S., Miracle M.R., Villena M.J., Rueda, J., Ferriol, C. y E. Vicente (2004). Mesocosm experiments on nutrient and fish effects on shallow lake food webs in a Mediterranean climate. *Freshwater Biology* 49: 1593- 1607.
- Rott, E. (1980). Some results from phytoplankton counting intercalibrations. *Schweiz. Z. Hydrol.* 43/1. Birkhause Verlag Basel.
- Rull, V. Vegas, T. y J. Navarro (1984). Extinción de la luz en los embalses españoles. Relaciones con la concentración de clorofila y las partículas en suspensión. *Oecologia Aquatica* 7: 25-36.
- Sabater, S. y J. Nolla (1991). Distributions patterns of phytoplankton in Spanish reservoirs: First results and comparison after fifteen years. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 24: 1371-1375.
- Sládeček, V. (1973). System of water quality from the Biological point of view. *Arch. Hydrobiol.*, 7: 1-218.
- Smith, V.H. y J. Shapiro (1981). Chlorophyll-phosphorus relations in individual lakes: An empirical and theoretical analysis. *Limnol. Oceanogr.* 27: 1101-1112.
- Stedmon C.A. y S. Markager (2005). Resolving the variability in dissolved organic matter fluorescence in a temperate estuary and its catchment using PARAFAC analysis. *Limnol. Oceanogr.* 50(2): 686-697.
- Stephen, D. et al (y 24 autores más) (2004). Continental-scale patterns of nutrient and fish effects on shallow lakes: síntesis of a pan-European mesocosm experiment. *Freshwater Biology* 49: 1517-1524.
- U.S. Environmental Protection Agency. *Monitoring and Assessing Water Quality. Lake and Reservoir Bioassessment and Biocriteria*.
- Utermöhl, H. (1958). Zur Vervollkommnung der quantitative Phytoplankton-Methodik. *Mitt. Int. Ver. Limnol.*, 9: 1-38.
- Van Dam H. (1994). A coded checklist and ecological indicators values of freshwater diatoms from the Netherlands. *Netherlands journal of Aquatic Ecology* 28(1): 117-133.
- Van de Bund, W.J. et al. (y 25 autores más). Responses of phytoplankton to fish predation and nutrient loading in shallow lakes: a pan-European mesocosm experiment. *Freshwater Biology* 49: 1608-1618.
- Vicente E., Camacho, A., Sendra, M.D., Sanchis D., Soria J.M., Dasí, M.J. y M.R. Miracle (2000). Limnological management of the Amadorio Reservoir (Spain) during an extremely dry summer. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 27: 2298-2302.
- Wegl, R. (1983). Index für die Limnosaprobität. *Wasser und Abwasser* 26: 1-175.
- Wetzel, R.G. (1983). *Limnology*. Saunders.
- Willén E., Hajdu S. y Y. Pejler (1990). Summer Phytoplankton in 73 Nutrient-poor Swedish Lakes. Classification, Ordination, and Choice of long-term Monitoring Objects. *Limnologica* (Berlin) 20(2): 217-227.
- Willén, E. (2000). Phytoplankton water quality assessment- an indicator concept. In: *Hydrological and limnological aspects of lake monitoring* 58-80. In Heinonen, G. Ziglio y A. Van der Beken (eds), Wiley y Sons. LTD.

BIBLIOGRAFÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL FITOPLANCTON

Cyanophyta (cianobacterias)

- Anagnostidis, K. y J. Komárek (1988). Modern approach to the classification system of cyanophytes 3-Oscillatoriales. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 80 (1-4): 327-472.
- Bourrelly, P. (1985). *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique*. Tome III. Les algues bleues et rouges, les Eugléniens, Peridiniens et Cryptomonadines. N. Boubée y Cie. Paris, 606 pp.
- Geitler, L. (1932). *Cyanophyceae*. In: Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz 14. Leipzig: Akad. Verlag.
- Komárek, J. (1999). *Übersicht der planktischen Blaualgen (Cyanobakterien) im Einzugsgebiet der Elbe. Internationale kommission zum Schutz der Elbe*. Magdeburg. 54 pp., 134 fig.
- Komárek, J. y K. Anagnostidis (1989). Modern approach to the classification system of cyanophytes 4-Nostocales. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 82 (3): 247-345.
- Komárek, J. y K. Anagnostidis (1999). *Cyanoprokaryota: Chroococcales*. In Ettl, H., G. Gärtner, H. Heynig y D. Mollenhauer (eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 19, I Teil. Gustav Fischer. Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm. 548 pp.

Chlorophyta (algas verdes)

- Bourrelly, P. (1988). *Les Algues d'eau douce. Initiation à la systématique*. Tome I: Algues vertes. Compléments à la 1^{re}, 2^e et 3^e édition. N. Boubée et Cie. Paris, 182 pp.
- Bourrelly, P. (1990). *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique*. Tome I. Les algues vertes. N. Boubée et Cie. Paris, 572 pp.
- Coesel, P. F. M. (1979a). Desmids of the broads area of N.W.-Overijssel (The Netherlands) I. *Acta Bot. Neerl.*, 28 (4/5): 257-279.
- Coesel, P. F. M. (1979b). Desmids of the broads area of N.W.-Overijssel (The Netherlands) II. *Acta Bot. Neerl.*, 28 (6): 385-423.
- Ettl, H. (1983). *Chlorophyta I, Phytomonadina*. In Ettl, H., J. Gerloff, H. Heynig y D. Mollenhauer (eds.): Süß-

- wasserflora von Mitteleuropa. Band 9. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart-New York, 807 pp.
- Ettl, H. y G. Gärtner (1988). *Chlorophyta II. Tetrasporales, Chlorococcales, Gloeodendrales*. In Ettl, H., J. Gerloff, H. Heynig y D. Mollenhauer (eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 10. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart-New York, 436 pp.
- Förster, K. (1982). *Conjugatophyceae, Zygnematales und Desmidiaceae (excl. Zygnemataceae)*. In Huber-Pestalozzi, G. (ed.): Das Phytoplankton des Süßwassers. 8 Teil. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. Stuttgart, 541 pp.
- Fott, B. (1972). *Chlorophyceae (Grünalgen), Ordnung: Tetrasporales*. In Huber-Pestalozzi, G. (ed.): Das Phytoplankton des Süßwassers. 6 Teil. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. Stuttgart, 116 pp., 47 tafeln.
- Komárek, T. y B. Fott (1983). *Chlorophyceae (Grünalgen), Ordnung: Chlorococcales*. In Huber-Pestalozzi, G. (ed.): Das Phytoplankton des Süßwassers. Systematik und Biologie. 7 Teil. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. Stuttgart, 1044 pp.
- Lenzenweger, R. (1996). *Desmidiaceenflora von Österreich. Teil 1*. In: Kies, L. y R. Schnetter (eds). Bibliotheca Phycologica. Band 101. Berlin-Stuttgart, 162 pp.
- Lenzenweger, R. (1997). *Desmidiaceenflora von Österreich. Teil 2*. In: Kies, L. y R. Schnetter (eds). Bibliotheca Phycologica. Band 102. Berlin-Stuttgart, 216 pp.
- Lenzenweger, R. (1999). *Desmidiaceenflora von Österreich. Teil 3*. In: Kies, L. y R. Schnetter (eds). Bibliotheca Phycologica. Band 104. Berlin-Stuttgart, 218 pp.
- Ružicka, J. (1977). *Die Desmidiaceen Mitteleuropas*. Band 1. Lieferung 1. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. Stuttgart. pp. 1-291.
- Ružicka, J. (1981). *Die Desmidiaceen Mitteleuropas*. Band 1. Lieferung 2. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. Stuttgart. pp 293-736.
- West, W. y G. S. West (1971a). *A monograph of the British Desmidiaceae*. Vol. IV. Johnson Reprint Corporation. New York-London.
- West, W. y G. S. West (1971b). *A monograph of the British Desmidiaceae*. Vol. V. Johnson Reprint Corporation. New York-London.
- Bacillariophyta (diatomeas)**
- Carter, J. R. (1981). A taxonomic study of diatoms from standing freshwaters in Shetland. *Nova Hedwigia* 33: 513-629.
- Foged, N. (1971). Diatoms found in a bottom sediment sample from a small deep lake on the Northern Slope, Alaska. *Nova Hedwigia* 21: 923-1035, 23 pls.
- Krammer, K y H. Lange-Bertalot (1991a). *Bacillariophyceae: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae*. In Ettl, H., J. Gerloff, H. Heynig y D. Mollenhauer (eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2, 3 Teil. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart-Jena, 576 pp.
- Krammer, K y H. Lange-Bertalot (1991b). *Bacillariophyceae: Achnantheaceae, Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolatae) und Gomphonema Gesamtliteraturverzeichnis* Teil 1-4. In Ettl, H., G. Gärtner, J. Gerloff, H. Heynig y D. Mollenhauer (eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2, 4 Teil. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart, Jena, 436 pp.
- Krammer, K y H. Lange-Bertalot (1997a). *Bacillariophyceae: Naviculaceae*. In Ettl, H., J. Gerloff, H. Heynig y D. Mollenhauer (eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2, 1 Teil. Gustav Fischer. Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm, 876 pp.
- Krammer, K y H. Lange-Bertalot (1997b). *Bacillariophyceae: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae*. In Ettl, H., J. Gerloff, H. Heynig y D. Mollenhauer (eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2, 2 Teil. Gustav Fischer. Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm, 610 pp.
- Krammer, K y H. Lange-Bertalot (2000). *Bacillariophyceae: English and French translation of the keys*. In Büdel, B., G. Gärtner, L. Krienitz y G. M. Lokhorst (eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa. Vol. 2, part 5. Engl. transl.: N. Bate y A. Podzorksi. French transl.: J. Bukowska, M. Michel y J. Prygiel. Spektrum Akademischer Verlag GmbH. Heidelberg-Berlin. 310 pp.
- Chrysophyta, Xanthophyta y Haptophyta**
- Bourrelly, P. (1981). *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique*. Tome II. Les algues jaunes et brunes. Chrysophycées, Phéophycées, Xanthophycées et Diatomées. N. Boubée et Cie. Paris. 517 pp.
- Ettl, H. (1978). *Xanthophyceae*. In Ettl, H., J. Gerloff y H. Heynig (eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 3, 1 Teil. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart-New York, 530 pp.
- Kristiansen, J. y H. R. Preisig (Eds.) (2001). *Encyclopedia of Chrysophyte genera*. Bibliotheca Phycologica, Band 110. J. Cramer. Berlin-Stuttgart, 260 pp.
- Starmach, K. (1985). *Chrysophyceae und Haptophyceae*. In Ettl, H., J. Gerloff, H. Heynig y D. Mollenhauer (eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 1. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart, 515 pp.
- Cryptophyta, Dinophyta y Euglenophyta**
- Anton, A. y H. C. Duthie (1981). Use of cluster analysis in the systematics of the algal genus *Cryptomonas*. *Can. J. Bot.* 59: 992-1002.
- Bourrelly, P. (1985). *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique*. Tome III. Les algues bleues et rouges, les Eugléniens, Peridiniens et Cryptomonadines. N. Boubée y Cie. Paris, 606 pp.
- Fott, B. (1968). *Cryptophyceae, Chloromonadophyceae, Dinophyceae*. In Huber-Pestalozzi, G. (ed.): Das Phytoplankton des Süßwassers. Systematik und Biologie. 3 Teil.. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. Stuttgart.
- Huber-Pestalozzi, G. (1955). *Euglenophyceen*. In Huber-Pestalozzi, G. (ed.): Das Phytoplankton des Süßwassers. Systematik und Biologie. 4 Teil.. Stuttgart: E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. Stuttgart.
- Javornický, P. (2003). Taxonomic notes on some freshwater planktonic Cryptophyceae based on light microscopy. *Hydrobiologia* 502: 271-283.

APÉNDICE

Confederación Hidrográfica del Ebro. Comisaría de Aguas

Paseo Sagasta 24-28 • 50071 Zaragoza • Tel. 976 711 000 • Fax 976 214 596 • E-mail: che_calidad@chebro.es