

**PROTOCOLO DE MUESTREO, ANÁLISIS Y EVALUACIÓN DEL  
FITOPLANCTON EN MASAS DE AGUA DE TRANSICIÓN Y  
COSTERAS**

**Abril de 2021**

**Agencia Vasca del Agua / Uraren Euskal Agentzia**

**Código: TW\_CW\_FITOPLANCTON\_URA\_V\_3.0**





## 1 OBJETO

---

Este documento pertenece a una serie de protocolos de muestreo, laboratorio y cálculo de índices y métricas para su utilización en el seguimiento del estado de las masas de agua presentes en la Demarcación Hidrográfica del Cantábrico Oriental y en la clasificación de su estado ecológico o potencial ecológico en cumplimiento de la normativa vigente.

El Real Decreto 817/2015, en sus artículos 12 y 13, incluye la composición, abundancia y biomasa del fitoplancton entre los elementos de calidad biológicos para la clasificación del estado o potencial ecológico, para las masas de agua de la categoría aguas de transición y de la categoría aguas costeras.

En el anexo III del Real Decreto 817/2015 se indica que los métodos empleados para controlar los parámetros de cada tipo serán conformes a las normas internacionales enumeradas en la sección 1.3.6 del anexo V de la Directiva 2000/60/CE, en la medida en que se refieran al control, o a cualesquiera otras normas nacionales o internacionales que garanticen el suministro de información de calidad y comparabilidad científicas equivalentes en cumplimiento de lo establecido en la Directiva 2014/101/UE.

El objeto de este documento es garantizar el cumplimiento de los requisitos establecidos por la Directiva 2000/60/CE (Directiva Marco del Agua, en adelante DMA), mediante el establecimiento de un protocolo que incluye:

- La metodología de adquisición de datos de diferentes parámetros, en masas de agua de transición y costeras, para el estudio del elemento de calidad 'fitoplancton'.
- Un sistema de evaluación del elemento de calidad 'fitoplancton' para la clasificación del estado/potencial ecológico en masas de agua de transición y costeras, acorde con las definiciones normativas del anexo V de la DMA.

## 2 ALCANCE

---

Este protocolo resulta de aplicación a los tipos de masas de agua de transición y costeras definidos en la Demarcación Hidrográfica del Cantábrico Oriental (Real Decreto 1/2016): AT-T08, Estuario atlántico intermareal con dominancia del río sobre el estuario; AT-T09, Estuario atlántico intermareal con dominancia marina; AT-T10, Estuario atlántico submareal; y AC-T12, Aguas costeras atlánticas del Cantábrico Oriental expuestas sin afloramiento.

En el ejercicio de intercalibración europeo del grupo geográfico del Atlántico Nororiental (Decisión de la Comisión de 12 de febrero de 2018), en lo que se refiere al fitoplancton, solo se pudo intercalibrar la clorofila-a, estableciéndose los límites de cambio de clase de este parámetro indicativo de biomasa para los estados muy bueno/bueno y bueno/moderado. Sin embargo, no se pudo intercalibrar ningún índice basado en abundancia celular o en composición taxonómica del fitoplancton.



El Real Decreto 817/2015 estableció el indicador Blooms<sup>1</sup>, aplicable tanto de manera individual, como integrado en dos índices multimétricos: SPT (“*Spanish Phytoplankton Tool*”) para aguas costeras y SPTT-2 (“*Spanish Phytoplankton Tool-Transitional*”, versión 2”) para aguas de transición. Sin embargo, este protocolo se orienta a la evaluación del elemento de calidad ‘fitoplancton’ en base al único parámetro que finalmente fue posible intercalibrar para los tipos aquí citados (percentil 90 de clorofila-a).

Este protocolo también describe la metodología de adquisición de datos de abundancia y composición, ya que estos parámetros pueden servir de apoyo a la hora de interpretar los resultados de la evaluación. Con ello, se modifican versiones previas<sup>2 y 3</sup>.

### 3 NORMATIVA DE REFERENCIA

---

- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- Directiva 2014/101/UE de la Comisión, de 30 de octubre de 2014, que modifica la Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. Diario Oficial de la Unión Europea, L311: 32-35.
- Real Decreto Legislativo 1/2001 por el que se aprueba el Texto refundido de la Ley de Aguas.
- Real Decreto 907/2007, de 6 de julio, por el que se aprueba el Reglamento de Planificación Hidrológica.
- Real Decreto 817/2015, de 11 de septiembre, por el que se establecen los criterios de seguimiento y evaluación del estado de las aguas superficiales y las normas de calidad ambiental.
- Real Decreto 1/2016, de 8 de enero, por el que se aprueba la revisión de los Planes Hidrológicos de las demarcaciones hidrográficas del Cantábrico Occidental, Guadalquivir, Ceuta, Melilla, Segura y Júcar, y de la parte española de las demarcaciones hidrográficas del Cantábrico Oriental, Miño-Sil, Duero, Tajo, Guediana y Ebro.

---

<sup>1</sup> El Real Decreto 817/2015 incluyó entre los indicadores aplicables a los tipos de aguas de transición y costeras presentes en la Demarcación Hidrográfica del Cantábrico Oriental las floraciones planctónicas. Este indicador emplea datos de abundancia y composición taxonómica de un periodo de seis años, determinándose el porcentaje de muestras donde un taxón cualquiera supera un determinado umbral de células por litro (750000 para aguas de transición y 400000 para aguas costeras).

<sup>2</sup> URA 2014. Protocolo de muestreo, análisis y evaluación del fitoplancton en masas de agua de transición y costeras (Código: TW\_CW\_FITOPLANCTON\_URA\_V\_1.0).

<sup>3</sup> URA 2015. Protocolo de muestreo, análisis y evaluación del fitoplancton en masas de agua de transición y costeras (Código: TW\_CW\_FITOPLANCTON\_URA\_V\_2.0).



- Decisión de la Comisión de 12 de febrero de 2018 por la que se fijan, de conformidad con la Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, los valores de las clasificaciones de los sistemas de seguimiento de los Estados miembros a raíz del ejercicio de intercalibración, y por la que se deroga la Decisión 2013/480/UE. Diario Oficial de la Unión Europea, L47: 1-91. Decisión notificada con el número C(2018) 696.

#### **4 RELEVANCIA DEL INDICADOR**

---

El fitoplancton está compuesto por microorganismos unicelulares que responden a los cambios ambientales, en particular, al aporte de nutrientes y a la disponibilidad de luz. Los nutrientes, en concentración y proporción adecuada, son esenciales para las comunidades de fitoplancton y estas forman la base de las redes tróficas en muchos ecosistemas acuáticos, especialmente en el medio marino. Sin embargo, un aporte excesivo de nutrientes puede resultar perjudicial para el funcionamiento de los ecosistemas, proceso que se denomina 'eutrofización' y que puede repercutir en los usos del agua.

Uno de los primeros síntomas de eutrofización es el incremento de la biomasa del fitoplancton que, en una fase posterior del proceso, puede derivar en un déficit de oxígeno en el agua y, eventualmente, en mortalidad de flora y fauna marina. En este sentido, la clorofila se considera una variable de gran utilidad para estimar la biomasa fitoplanctónica, y como indicador de impacto por enriquecimiento en nutrientes en medios que no se encuentran limitados por luz. Por otra parte, el proceso de eutrofización puede alterar la composición de las comunidades fitoplanctónicas, incrementando la abundancia de ciertas especies, lo que puede derivar en efectos negativos si son tóxicas o menos aptas para los niveles tróficos superiores.

Los vertidos de aguas residuales urbanas son una de las fuentes más importantes de contaminación por nutrientes en Europa, especialmente de compuestos de nitrógeno y de fósforo. También son importantes, en algunas zonas, el aporte difuso de dichos compuestos que resulta de las actividades agrícolas y ganaderas. Por ello, el fitoplancton constituye un elemento de evaluación relevante para la aplicación de otras directivas europeas, además de la 2000/60/CE (p.ej., Directiva 91/271/CEE, Directiva 91/676/CEE, Directiva 2008/56/CE).

#### **5 CLOROFILA-A**

---

El Real Decreto 817/2015 establece que para los tipos de aguas de transición y costeras presentes en la Demarcación Hidrográfica del Cantábrico Oriental un indicador del elemento de calidad 'fitoplancton' es el percentil 90 de concentración de clorofila-a ( $\mu\text{g/L}$ ) (P90 Chl-a).

A continuación, se detalla el procedimiento para la obtención de datos de clorofila-a, así como el método de evaluación basado en P90 Chl-a.



## 5.1 PROTOCOLO DE MUESTREO

---

El material necesario para el muestreo es el siguiente:

- CTD (sonda de Conductividad, Temperatura y Profundidad) con un sensor de fluorescencia (solo para aguas costeras y estuarios profundos).
- Embarcación, en caso necesario según el acceso a la masa de agua (y equipada con grúa y cable si se emplea CTD).
- Balde de plástico.
- Embudo de plástico.
- Garrafas de plástico.
- Lápiz y rotuladores indelebles.
- Estadillo de campo (véase Anexo I).
- Sistemas de Posicionamiento Global (GPS).
- Equipos de protección individual: guantes, botas de seguridad, etc.

Todo el material que vaya a estar en contacto con las muestras tiene que estar limpio y seco. Para ello, los recipientes se aclaran con agua y se secan antes de su almacenamiento para su uso posterior. El secado debe ser rápido para evitar crecimientos de fitoplancton en su interior.

El **número de puntos de muestreo** en cada masa debe ser acorde al tamaño de la masa y reflejar la heterogeneidad dentro de la masa (p. ej., en aguas de transición, grados salinidad; ubicación de presiones relevantes).

Los datos referentes a la toma de muestras se anotan en una **ficha de campo** (Anexo I), en la que se recogen los siguientes aspectos: identificación y localización de la estación (coordenadas), profundidad de la estación, fecha y hora de la toma de la muestra, equipo utilizado para el muestreo, condiciones meteorológicas y de oleaje, personas presentes en el muestreo, y otras circunstancias que puedan facilitar la interpretación de resultados: riadas, presencia de detritos, irisaciones, etc.

La **frecuencia y época de muestreo** para la determinación de clorofila-a será al menos trimestral-estacional obteniendo así muestras en el periodo de mezcla de la columna de agua (invierno), de estratificación parcial (primavera y otoño) y de máxima estratificación (verano).

En el caso de aguas de transición se toman dos muestras en el mismo día, una en pleamar y otra en bajamar. En aguas costeras no se tiene en cuenta el estado de la marea.

Esta estrategia de muestreo trata de cubrir un mínimo de la variabilidad anual que presentan de forma natural las poblaciones fitoplanctónicas en los mares costeros templados, y que está íntimamente ligada a la hidrografía de estos sistemas, es decir, al grado de estratificación y al grado de influencia marina y fluvial.

Para la medida de la concentración de **clorofila-a** la muestra de agua se toma entre la superficie y aproximadamente 1 m de profundidad, mediante un balde de plástico.



La determinación de clorofila-a mediante CTD resulta útil en aguas costeras y estuarios profundos, ya que permite la realización del perfil vertical completo, incluyendo el valor de superficie (0-1 m). Este método de adquisición de datos se basa en la medición de la fluorescencia 'in situ' y su transformación a unidades de clorofila-a. El CTD se calibra una vez al año con muestras naturales, para lo cual se recoge agua a diferentes profundidades en la cual se determina la concentración de clorofila-a en laboratorio mediante el método descrito más adelante en este protocolo.

Las muestras de agua destinadas a la determinación de la clorofila-a no necesitan de **pretratamiento**.

El transporte de las muestras desde el campo hasta su procesado en el laboratorio se realiza en garrafas de plástico a temperatura ambiente, lo más rápidamente posible (el mismo día o al día siguiente), tomando las medidas necesarias para evitar su exposición a altas temperaturas o luz directa.

## 5.2 PROTOCOLO DE ANÁLISIS

---

El equipamiento requerido para la determinación de clorofila-a incluye:

- Sistema de filtración equipado con un matraz kitasatos de 2 L de capacidad, embudo y portafiltros de 47 mm.
- Filtros Whatman GF/C 47mm.
- Pinzas de punta plana para manipular filtros.
- Bomba de vacío.
- Acetona al 90%.
- Dispensador automático o pipeta para volúmenes de acetona de 10 mL.
- Probetas de plástico de 1 L y 500 mL.
- Estadillo.
- Tubos de ensayo de vidrio, opacos, con tapón a rosca hermético.
- Centrífuga.
- Espectrofotómetro UV/VIS.
- Cubetas de cuarzo de 1 cm de camino óptico: una, para la medida de la absorbancia del extracto y otra, para la del blanco.

En las muestras recogidas según el Apartado 5.1 de este documento la determinación de la concentración de clorofila-a en laboratorio se realiza mediante el método tricromático de Jeffrey y Humphrey<sup>4</sup>, método espectrofotométrico recomendado por SCOR-UNESCO<sup>5</sup>. El procedimiento de ensayo implica los siguientes pasos:

---

<sup>4</sup> Jeffrey S.W., Humphrey G.F., 1975. New spectrophotometric equations for determining Chlorophyll a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie Pflanzen*, 167: 191-194

<sup>5</sup> Lorenzen C.J., Jeffrey S.W., 1980. Determination of chlorophyll in seawater. *UNESCO Technical Papers in Marine Science*, 35.



#### **a) Filtración de agua de mar**

- Se prepara una torre de filtración (kitasatos, embudo y portafiltros) donde se coloca un filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/C) de 47mm de diámetro. La torre de filtración se conecta a una bomba de vacío con el fin de que el agua de mar depositada en el embudo atraviese el filtro y pase al kitasatos.
- Se toman submuestras de agua de volumen conocido con una probeta, procurando que sean homogéneas, esto es, evitando que quede material sedimentado en el fondo de la garrafa. Para ello, previamente hay que aplicar un movimiento suave a la garrafa.
- Se filtra agua de mar hasta que el filtro presente color, evitando una presión excesiva o un tiempo de filtración muy largo. El volumen filtrado varía según la cantidad de material en suspensión que presente el medio. Normalmente es suficiente con 2 litros para las aguas costeras y 1 litro, o bastante menos, para las de transición. El volumen total de agua que ha pasado por el filtro se apunta en un estadillo.

#### **b) Extracción de pigmentos**

- El filtro se recoge con una pinza y se deposita en un tubo de ensayo opaco, al cual se añaden inmediatamente 10 mL de acetona al 90%. El tubo se cierra herméticamente.
- La muestra se mantiene en refrigeración y oscuridad entre 24 y 48 horas.
- En caso de no realizar la extracción de los pigmentos de forma inmediata al filtrado de la muestra, es necesario conservar los filtros envueltos en papel aluminio a temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , o en nitrógeno líquido.

#### **c) Lectura de la absorbancia del extracto**

- Tras 24-48 h de extracción en frío, los tubos se dejan a temperatura ambiente unos 30 minutos.
- Se agitan las muestras para obtener una muestra homogénea.
- Para clarificar el extracto, se centrifugan los tubos durante 15 minutos a 4000 rpm.
- Se mide la absorbancia del extracto a las siguientes longitudes de onda: 664, 647 y 630 nm. Para ello, se deposita una cantidad del sobrenadante en una cubeta de cuarzo que se lee en un espectrofotómetro UV/VIS. Es importante que las muestras que se vayan a leer estén a temperatura ambiente para que la cubeta no se empañe y se obtengan resultados erróneos. Debe evitarse en todos los pasos que reciban luz intensa. Para el manejo del espectrofotómetro se sigue el manual de instrucción técnica del mismo.
- Las cubetas de lectura se limpian después de cada sesión de medida con agua del grifo, pasándolas finalmente con agua Milli-Q y dejándolas secar al aire. Es conveniente cada



cierto tiempo hacer una limpieza de las cubetas con ácido nítrico diluido al 10%, aclarando después con abundante agua del grifo y finalmente con agua Milli-Q.

#### d) Procesamiento de los datos

Para determinar la **concentración de la clorofila-a** se aplica la fórmula de Jeffrey y Humphrey<sup>4</sup>:

$$\text{Chl-a} = ((11,85 \cdot E664) - (1,54 \cdot E647) - (0,08 \cdot E630)) \cdot v \cdot V^{-1}$$

Donde E664 es la absorbancia medida a una longitud de onda de 664 nm; E647 es la absorbancia medida a una longitud de onda de 647 nm; E630 es la absorbancia medida a una longitud de onda de 630 nm; v es el volumen (mL) de acetona en el tubo; y V es el volumen (L) de agua de mar filtrada.

### 5.3 SISTEMA DE EVALUACIÓN

Los **límites de clase entre estados ecológicos** para P90 Chl-a en aguas de transición y costeras de la Demarcación Hidrográfica del Cantábrico Oriental según lo indicado en el Real Decreto 817/2015 y derivado del resultado del ejercicio de intercalibración (Decisión de la Comisión de 12 de febrero de 2018) se presentan en la Tabla 1.

Tipo	Tramo Salinidad (UPS)	Unidades	Condición de referencia/	Límites de cambio de clase de estado			
				muy bueno/ bueno	bueno/ moderado	moderado/ deficiente	deficiente/ malo
AC-T12	Euhalino mar (>34,4)	µg L-1	1,00	1,50	3,00	4,50	6,00
		RCE		>0,67	>0,33	>0,22	>0,17
AT-T08, AT-T09, AT-T10	Euhalino estuárico (>30 y ≤34,4)	µg L-1	1,30	1,95	3,90	5,85	7,80
		RCE		>0,67	>0,33	>0,22	>0,17
	Polihalino (>18 y ≤30)	µg L-1	2,20	3,30	6,60	9,90	13,20
		RCE		>0,67	>0,33	>0,22	>0,17
	Mesohalino (>5 y ≤18)	µg L-1	3,40	5,10	10,20	15,30	20,40
		RCE		>0,67	>0,33	>0,22	>0,17
Oligohalino (≤5)	µg L-1	4,40	6,60	13,20	19,80	26,40	
	RCE		>0,67	>0,33	>0,22	>0,17	

Tabla 1 Condiciones de referencia y límites de clase del percentil 90 de la clorofila-a para masas de agua de transición y costeras de la Demarcación Hidrográfica del Cantábrico Oriental.

La evaluación del estado biológico del 'fitoplancton' a partir de la concentración de clorofila-a **a escala de estación de muestreo** implica:

- Asociación a tramo salino mediante el sistema de Venice<sup>6</sup> para lo que se utiliza el valor de la mediana de salinidad (percentil 50) derivado de una amplia serie de datos.
- Cálculo de la métrica (P90 Chl-a) a partir de datos de Chl-a de periodos de seis años, que comprenden el año al cual corresponde la evaluación y los cinco años previos. Incluyen exclusivamente cuatro campañas trimestrales (invierno, primavera, verano y otoño). Por

<sup>6</sup> Venice system (1959). The final resolution of the symposium on the classification of brackish waters. Archo Oceanogr. Limnol., 11 (suppl): 243-248.





lo tanto, se emplean 24 datos en aguas costeras y 48 datos en aguas de transición. El número de decimales de los valores de la métrica (P90 Chl-a) para cada estación de muestreo se ajusta a dos.

- Cálculo del Ratio de Calidad Ecológica (RCE), que en este caso equivale al cociente entre el valor de referencia asociado a la tipología a la que pertenece la estación de muestreo objeto de evaluación (Tabla 1) y el valor observado en la métrica P90 Chl-a. Los valores del RCE se expresan con tres decimales.

La evaluación del estado biológico del 'fitoplancton' a partir del percentil 90 de la concentración de clorofila-a a **escala de masa de agua (naturales o muy modificadas)** implica:

- Asignación de representatividad espacial de las estaciones de muestreo dentro de la masa de agua (porcentaje de la superficie). Como ejemplo, la representatividad de cada estación de la “Red de seguimiento del estado de las aguas de transición y costeras en la Comunidad Autónoma del País Vasco” en masas de agua de la Demarcación Hidrográfica del Cantábrico Oriental se indica en el Anexo II, Tabla 6 y Tabla 7)
- Cálculo del valor medio del percentil 90 de la concentración de clorofila-a en la masa de agua, ponderado según el porcentaje de la superficie que representan las estaciones de muestreo. Se utilizan todos los decimales resultantes de las operaciones de cálculo de los valores de la métrica (P90 Chl-a) a escala de masa de agua.
- Cálculo de la condición de referencia media de la masa de agua, ponderada según la representatividad de los diferentes tramos salinos presentes en la masa de agua.
- Cálculo del RCE a escala de masa de agua a partir de los dos cálculos anteriores y calificación de su estado, basados en P90 Chl-a y aplicando los límites de la Tabla 1. Los valores del RCE se expresan con tres decimales.

		%	Percentil 90 Chl-a ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )		RCE (Ref/Obs)	Estado
			Referencia	Observado		
Estación	L-B10	25	1,00	1,27	0,787	Muy bueno
	L-B20	25	1,00	0,91	1,099	Muy bueno
	L-N10	25	1,00	2,46	0,407	Bueno
	L-N20	25	1,00	1,19	0,840	Muy Bueno
Masa de agua	Cantabria -Matxitxako	100	1 = (0,25x1,00)+(0,25x1,00)+ (0,25x1,00)+(0,25x1,00)	1,4575= (0,25x1,27)+(0,25x0,91)+ (0,25x2,46)+(0,25x1,19)	0,686	Muy Bueno

Tabla 2 Ejemplo de cálculo del Estado Ecológico para el 'fitoplancton' en una masa de agua costera, mediante el P90 Chl-a.

Cuando no se disponga de información sobre clorofila-a para todas las estaciones de una misma masa de agua en el periodo de 6 años, no se recomienda realizar esta evaluación a escala de masa de agua, ya que no permitiría apreciar adecuadamente su evolución temporal.



Si se realiza la evaluación con un menor número de estaciones, se debe asumir una menor precisión en la evaluación y debe realizarse recalculando la representatividad espacial de las estaciones empleadas.

En lo referente a las masas de agua muy modificadas, se requiere el cálculo del Potencial Ecológico y, para ello, se aplicará la misma metodología y límites de clase que en las masas de agua naturales (Tabla 3).

Estación	%	Percentil 90 Chl-a ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )		RCE (Ref/Obs)	Potencial	
		Referencia	Observado			
Estación	E-N10	38	4,40	4,58	0,961	Máximo
	E-N15	31	2,20	4,44	0,495	Bueno
	E-N17	31	2,20	3,60	0,611	Bueno
Masa de agua	Nerbio/ Nervión Interior Transición	100	$3,036 = (0,38 \times 4,40) + (0,31 \times 2,20) + (0,31 \times 2,20)$	$4,2328 = (0,38 \times 4,58) + (0,31 \times 4,44) + (0,31 \times 3,60)$	0,717	Máximo

Tabla 3 Ejemplo de cálculo del Potencial Ecológico para el 'fitoplancton' en una masa de agua muy modificada, mediante el P90 Chl-a.

## 6 ABUNDANCIA Y COMPOSICIÓN DEL FITOPLANCTON

Los datos de abundancia celular y composición taxonómica son necesarios para el cálculo del indicador Blooms<sup>1</sup> y de los índices SPT y SPTT-2, todos los cuales fueron incluidos en Real Decreto 817/2015. Sin embargo, estos, al no estar intercalibrados, no se consideran acordes con los requerimientos de la DMA y, por lo tanto, no se manejan en la evaluación del elemento de calidad fitoplancton.

Únicamente se mantienen en este protocolo los métodos de adquisición de datos de abundancia y composición del fitoplancton, como reflejo de versiones previas, y porque estos parámetros pueden aportar información complementaria a la evaluación realizada a partir de la clorofila-a.

### 6.1 PROTOCOLO DE MUESTREO

Para la toma de muestras se sigue la norma EN 15972:2011<sup>7</sup>. Todo el material que vaya a estar en contacto con las muestras tiene que estar limpio y seco. Para ello, los recipientes se aclaran con agua y se secan antes de su almacenamiento para su uso posterior. El secado debe ser rápido para evitar crecimientos de fitoplancton en su interior.

El material necesario para el muestreo es el siguiente:

- Embarcación, en caso necesario según el acceso a la masa de agua.
- Balde de plástico.
- Embudo de plástico.

<sup>7</sup> EN 15972:2011 'Water Quality Guidance on quantitative and qualitative investigations of marine phytoplankton'.



- Frascos de vidrio (125 mL) con tapón a rosca.
- Solución de Lugol ácido, que se prepara con antelación en el laboratorio. Para ello, se disuelven en 200 mL de agua destilada: 20 g de yoduro de potasio (KI), 10 g de yodo (I<sub>2</sub>) y 20 g de ácido acético concentrado. La solución se conserva durante varios meses si se mantiene en condiciones de oscuridad y refrigeración.
- Pipetas Pasteur.
- Neveras portátiles y acumuladores de frío.
- Lápiz y rotuladores indelebles.
- Estadillo de campo (véase Anexo I).
- GPS.
- Equipos de protección individual: guantes, botas de seguridad, etc.

El **número de puntos de muestreo** y su frecuencia de muestreo puede variar en función de las necesidades del estudio (por ejemplo, si comienzan a percibirse incumplimientos de objetivos de calidad que reflejen posibles problemas de eutrofización).

En aguas de transición el muestreo sólo se realizará en primavera y verano; y en pleamar, minimizando así la recogida de material detrítico que interfiere con las técnicas de microscopía empleadas para la caracterización de la comunidad fitoplanctónica. En aguas costeras el muestreo coincidirá con el de la clorofila y, por tanto, será estacional y sin tener en cuenta la marea.

Las muestras de agua para la determinación de la **abundancia y composición taxonómica** se depositan en frascos de vidrio, que no se rellenan totalmente, ya que es necesario cierto espacio para facilitar posteriormente el mezclado antes de la toma de una submuestra para su análisis.

El **pretratamiento** implica el fijado en campo, es decir, a cada muestra de agua de 125 mL se le añaden con una pipeta Pasteur 0,5 mL de la solución de Lugol ácido. Asegurarse que el frasco ha quedado bien cerrado y voltearlo con cuidado para que se mezcle, no agitarlo (esto es importante porque si se introduce aire se degradará la muestra).

Las muestras se transportan en condiciones de oscuridad y temperatura inferior a 20°C, protegidas del hielo. Para ello se utilizan neveras portátiles (con acumuladores de frío, si el muestreo coincide con días muy cálidos).

El tiempo desde la toma de muestra hasta su análisis debe ser siempre inferior a 12 meses, e idealmente no superior a 3 meses. Durante este tiempo los frascos deben mantenerse bien cerrados, en condiciones de oscuridad y refrigeración a 4°C.

Todos los recipientes utilizados para las muestras se identifican con una etiqueta adhesiva en la que aparecen los siguientes datos: Código de la estación de muestreo; Fecha de muestreo; Variable objeto de muestreo; Agente de conservación utilizado.



## 6.2 PROTOCOLO DE ANÁLISIS

---

Los equipos y conservantes requeridos para el análisis de la composición taxonómica y abundancia celular son:

- Placas de sedimentación tipo Hydrobios.
- Columnas de sedimentación de 100, 50 y 10 mL.
- Bases y cubres específicos para el montaje.
- Equipamiento de microscopía óptica invertida, con contraste de fase.
- Ficha de identificación de laboratorio que permita como producto final establecer un listado taxonómico con los taxones presentes en la muestra y sus abundancias.
- Guías de identificación especializadas <sup>(8,9,10)</sup>.

En las muestras recogidas según el Apartado 6.1 de este documento la identificación taxonómica y el recuento de la abundancia celular del fitoplancton se realiza mediante el método de Utermöhl<sup>11</sup> siguiendo las recomendaciones que figuran en las normas EN 15204:2006<sup>12</sup> y EN 15972:2011<sup>7</sup> para las técnicas de análisis cuantitativo.

Este método implica la utilización de cámaras de sedimentación donde se introduce una alícuota de agua y, por gravedad al cabo de un tiempo determinado, las células de fitoplancton quedan depositadas en la placa del fondo de manera aleatoria. El análisis cuantitativo de la muestra que queda recogida en la base de la cámara se realiza mediante microscopio invertido<sup>13</sup>.

Se debe tender a la identificación a nivel de género o especie. Cuando ello no es posible, se clasifica en grandes grupos (diatomeas, dinoflagelados, ciliados, clorofitas, haptofitas, criptofitas, euglenofitas, pequeñas formas flageladas, etc.) o en niveles jerárquicos inferiores (orden o familia). Para comprobar los nombres científicos actualmente aceptados y evitar la utilización de sinónimos se consulta el Registro Europeo de Especies Marinas ([www.marbef.org/data](http://www.marbef.org/data)) y el de AlgaeBase ([www.algaebase.org](http://www.algaebase.org)).

Se contabilizan las células de cada taxón, incluso en el caso de que sean organismos coloniales (p. ej., cadenas de diatomeas). La mayoría de los organismos se cuentan a 400

---

<sup>8</sup> Dodge J.D., 1982. Marine Dinoflagellates of the British Isles. Her Majesty's Stationery Office, London. 303 pp.

<sup>9</sup> Tomas C.R. (Ed.) 1993. Marine Phytoplankton. A Guide to Naked Flagellates and Coccolithophorids. Academic Press, San Diego.

<sup>10</sup> Bérard-Therriault L., Poulin M., Boseé L., 1999. Guide d'identification du phytoplancton marin de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent incluant également certains protozoaires. Publication spéciale canadienne des sciences halieutiques et aquatiques, 128: 387 pp.

<sup>11</sup> Utermöhl H. 1958. Zur vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. Mitteilungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie, 9: 1-38.

<sup>12</sup> EN 15204:2006 "Water quality Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique).

<sup>13</sup> Edler L., Elbrächter M., 2010. The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. En: B. Karlson, C. Cusack, E. Bresnan (Eds.). Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. IOC Manuals and Guides, 55: 13-22. Paris, UNESCO.



aumentos, recorriendo al menos 2 cm de la placa (80 campos de visión). Este esfuerzo normalmente implica la obtención de un número de entre 50 y 100 células de los taxones más comunes. Los especímenes de tamaño grande (>30  $\mu\text{m}$ , aproximadamente) o los que son muy poco abundantes se cuentan a 100 o 200 aumentos, recorriendo toda la placa o, al menos, 40 campos.

Para obtener los datos de densidad (número de células por litro) de cada taxón individual se aplica la siguiente fórmula:  $\text{Células L}^{-1} = V \cdot N \cdot 5,31 \cdot S^{-1}$ , donde V es un factor dependiente del volumen sedimentado (Tabla 4), N es el número de células contadas, 5,31 es una constante que corresponde al área de la superficie de la placa y S es la superficie observada, que depende del transecto y los aumentos (Tabla 5).

Vol. Sedimentado (mL)	V
3	333,3
5	200
10	100
50	20
100	10

Tabla 4 Valor del factor V en función del volumen de muestra sedimentado.

Superficie observada (S)				
Aumentos	1 cm	2 cm	4 cm	6 cm
x100	0,1	0,2	0,4	0,6
x200	0,05	0,1	0,2	0,3
X400	0,025	0,05	0,1	0,15

Tabla 5 Valor de S (superficie observada) en función de la longitud del transecto realizado y los aumentos empleados.



## Anexo I. FICHA DE CAMPO

<b>Proyecto:</b>		<b>Fecha:</b>				
<b>Zona de muestreo:</b>		<b>Embarcación:</b>				
<b>Personal:</b>		<b>Viento:</b>				
		<b>Ola:</b>				
<b>Trabajo realizado:</b>						
<b>Datos de muestreo</b>						
<b>Código Estación</b>	<b>Localización</b>	<b>Lat. (N)/Long. (W)</b>	<b>Hora</b>	<b>Sonda (m)</b>	<b>Tª aire (°C)</b>	<b>Observaciones</b>
<b>Notas:</b>						



## Anexo II. INFORMACIÓN DETALLADA SOBRE ESTACIONES Y MASAS DE AGUA DEL PAÍS VASCO

Código Tipología	Nombre Masa de agua	Código Estación	Nombre Estación	Tramo	Representatividad (%)
AT-T08	Deba Transición	E-D10	Deba (puente)	Mesohalino	46
		E-D5	Deba (campo de fútbol)	Oligohalino	54
	Urumea Transición	E-UR10	Donostia (puente de Santa Catalina)	Mesohalino	64
		E-UR5	Donostia (Loiola)	Oligohalino	36
AT-T09	Artibai Transición	E-A10	Ondarroa (embarcadero)	Polihalino	85
		E-A5	Ondarroa (Errenteria)	Oligohalino	15
	Barbadun Transición	E-M10	Pobeña (puente)	Polihalino	94
		E-M5	Muskiz (Petronor)	Mesohalino	60
	Butroe Transición	E-B10	Plentzia (puerto)	Polihalino	68
		E-B5	Plentzia (Abanico)	Mesohalino	16
		E-B7	Plentzia (campo de fútbol)	Polihalino	16
	Lea Transición	E-L10	Lekeitio (molino)	Polihalino	90
		E-L5	Lekeitio (astillero)	Mesohalino	10
	Oka Exterior Transición	E-OK10	Murueta (astillero)	Polihalino	45
		E-OK20	Sukarrieta (Txatxarramendi)	Euhalino	55
	Oka Interior Transición	E-OK5	Gernika (salida de la depuradora)	Oligohalino	100
	Oria Transición	E-O10	Orio (puente de la autopista)	Polihalino	37
		E-O5	Orio (rampa)	Mesohalino	63
Urola Transición	E-U10	Zumaia (puente Narrondo)	Polihalino	66	
	E-U5	Zumaia (Bedua)	Oligohalino	12	
	E-U8	Zumaia (puente del ferrocarril)	Mesohalino	22	
AT-T10	Bidasoa Transición	E-BI10	Hondarribia (Amute)	Mesohalino	22
		E-BI20	Hondarribia (Txingudi)	Polihalino	45
		E-BI5	Irún (Behobia)	Oligohalino	33
	Nerbioi/ Nervión Exterior Transición	E-N20	Abra Interior	Euhalino	20
		E-N30	Abra Exterior	Euhalino	80
	Nerbioi/ Nervión Interior Transición	E-N10	Bilbao (puente de Deusto)	Mesohalino	38
		E-N15	Barakaldo (puente de Rontegi)	Polihalino	31
		E-N17	Leioa (Lamiako)	Polihalino	31
		E-OI10	Lezo	Euhalino	48
	Oiartzun Transición	E-OI15	Pasaia de San Pedro (Dársena de Herrera)	Euhalino	15
E-OI20		Pasaia (San Pedro)	Euhalino	37	

Tabla 6 Aguas de transición de la Demarcación Hidrográfica del Cantábrico Oriental: tramo salino al que se adscriben las estaciones de muestreo de la *Red de seguimiento del estado de las aguas de transición y costeras en la Comunidad Autónoma del País Vasco* para la evaluación del 'fitoplancton' y porcentaje que representan de la superficie total de la masa de agua.



Código Tipología	Nombre Masa de agua	Código Estación	Nombre Estación	Representatividad (%)
AC-T12	Cantabria-Matxitxako	L-B10	Litoral de Gorliz (cabo Villano)	25
		L-B20	Litoral de Bakio	25
		L-N10	Litoral del Abra (frente al superpuerto)	25
		L-N20	Litoral de Sopelana	25
	Getaria-Higer	L-BI10	Litoral de Hondarribia	18
		L-O10	Litoral de Orio	21
		L-O20	Litoral de Getaria	25
		L-OI10	Litoral de Pasaia	18
	Matxitxako-Getaria	L-OI20	Litoral de Pasaia (Asabaratza)	18
		L-A10	Litoral de Ondarroa	13
		L-D10	Litoral de Deba	12
		L-L10	Litoral de Elantxobe (Kai Arri)	20
		L-L20	Litoral de Lekeitio	20
		L-OK10	Litoral de Mundaka	20
	Mompás-Pasaia	L-U10	Litoral de Zumaia	15
		L-UR20	Litoral de Mompás	100

Tabla 7 Aguas costeras de la Demarcación Hidrográfica del Cantábrico Oriental: estaciones de muestreo de la *Red de seguimiento del estado de las aguas de transición y costeras en la Comunidad Autónoma del País Vasco* para la evaluación del 'fitoplancton' y porcentaje que representan de la superficie total de la masa de agua.