

# **PROTOCOLO DE MUESTREO DE FITOPLANCTON EN LAGOS Y EMBALSES**

**CÓDIGO: M-LE-FP-2013**

Aprobado por instrucción del Secretario de Estado de Medio Ambiente de fecha 22 de noviembre de 2013



Este documento pertenece a una serie de protocolos de muestreo, laboratorio y cálculo de índices y métricas para su utilización en los programas de seguimiento del estado de las masas de agua continentales (ríos, lagos y embalses) y en la clasificación del estado ecológico.

Las especificaciones de estos documentos deberán ser tenidas en cuenta por los Organismos de cuenca en la explotación de las redes oficiales de seguimiento del estado y potencial ecológico en las masas de agua superficiales continentales, bien directamente o a través de contratos de servicios. Estos protocolos están sujetos a los cambios que se consideren necesarios en virtud del progreso científico de la materia.



**MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE**

**Edita:**

© Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente  
Secretaría General Técnica  
Centro de Publicaciones

Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado:  
<http://publicacionesoficiales.boe.es/>

NIPO: 770-11-309-5



# INDICE

1.	APLICABILIDAD .....	5
2.	OBJETIVO .....	5
3.	NORMATIVA DE REFERENCIA.....	5
4.	EQUIPOS, REACTIVOS Y CONSERVANTES.....	6
4.1.	TRABAJO DE CAMPO .....	6
5.	DETERMINACIÓN DEL NÚMERO Y LOCALIZACIÓN DE PUNTOS DE MUESTREO .....	8
6.	DETERMINACIÓN DEL NÚMERO Y TIPO DE MUESTRAS POR PUNTO DE MUESTREO.....	8
7.	FRECUENCIAS Y ÉPOCA DE MUESTREO .....	9
8.	PROCEDIMIENTO DE MUESTREO .....	10
8.1.	TOMA DE MUESTRAS .....	10
8.2.	VOLUMEN NECESARIO PARA CADA ANÁLISIS .....	11
8.2.1.	FILTRADO EN CAMPO DE LA MUESTRA DESTINADA AL ANÁLISIS DE PIGMENTOS.....	11
8.3.	MUESTREOS ADICIONALES. MUESTREO CUALITATIVO DE FITOPLANCTON CON RED.....	12
8.4.	CONSERVACIÓN, ETIQUETADO Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS .....	12
9.	PROCESADO DE LOS DATOS.....	13
	ANEXO I: HOJA DE CAMPO PARA MUESTREO .....	15





## 1. APLICABILIDAD

Este protocolo de muestreo es de obligada aplicación en la explotación de las redes oficiales de evaluación del estado / potencial ecológico en cumplimiento de la Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, que explotan las Confederaciones Hidrográficas (CCHH), bien directamente o a través de contratos de servicios.

Las estaciones en las que se utilizará este protocolo son las pertenecientes al programa de control de vigilancia, programa de control operativo, programa de control de investigación y redes de referencia.

Este protocolo corresponde al muestreo de las masas de agua de la categoría lagos (lagos, lagunas y humedales naturales), así como a las masas de agua artificiales o muy modificadas asimilables a lagos que aparecen en la Orden ARM/2656/2008, de 10 de septiembre, por la que se aprueba la Instrucción de Planificación Hidrológica, siendo aplicable para la obtención de muestras para la determinación y el cálculo de los siguientes indicadores de evaluación del estado ecológico o del potencial ecológico para el elemento de calidad fitoplancton:

- Concentración de clorofila-a.
- Biovolumen total.
- Índice de grupos algales – IGA.
- Porcentaje de biovolumen de cianobacterias.

Asimismo se podrá aplicar este protocolo de muestreo para obtener información para el cálculo de otras métricas correspondientes al elemento de calidad fitoplancton que no se encuentren en la citada Orden Ministerial.

## 2. OBJETIVO

La Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, establece que los Estados miembros deberán poner en marcha programas de seguimiento que permitan controlar y evaluar la composición, abundancia y biomasa de las comunidades fitoplanctónicas.

La Directiva Marco del Agua establece que los métodos empleados para controlar los indicadores de evaluación de los elementos de calidad biológicos serán conformes a las normas internacionales o nacionales que garanticen el suministro de información de calidad y comparabilidad científica equivalentes.

Por lo tanto, el objetivo de este protocolo es establecer un método de muestreo de fitoplancton que garantice el cumplimiento de los requisitos mencionados anteriormente.

## 3. NORMATIVA DE REFERENCIA

La normativa de referencia de este protocolo es la que se enumera a continuación:

- 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.
- RD Legislativo 1/2001 por el que se aprueba el Texto Refundido de la Ley de Aguas.
- RD 907/2007 por el que se aprueba el Reglamento de Planificación Hidrológica.
- Orden MAM/3207/2006 por la que se aprueba la ITC-MMA EECC–1/06 Instrucción técnica complementaria sobre determinaciones químicas y microbiológicas para el análisis de las aguas.
- Orden ARM/2656/2008 por la que se aprueba la Instrucción de Planificación Hidrológica.



- Orden MAM/985/2006 por la que se desarrolla el régimen jurídico de las entidades colaboradoras de la administración hidráulica en materia de control y vigilancia de calidad de las aguas y de gestión de los vertidos al dominio público hidráulico.

Éste protocolo se ha redactado teniendo en cuenta las siguientes normas:

- UNE - EN 15204:2007 – Guía para el recuento de fitoplancton con microscopía invertida (técnica de Utermöhl).
- UNE - EN 14996:2007 – Guía para el aseguramiento de la calidad de las evaluaciones biológicas y ecológicas en el medio ambiente acuático.
- Draft proposal of “Water quality – Phytoplankton biovolume determination by microscopic measurement of cell dimensions” (CEN TC 230 / WG 2 / TG 3/N116 30/03/2008).
- Draft proposal for “Water Quality - Guidance on quantitative and qualitative sampling of phytoplankton from inland waters” (CEN TC 230 / WG 2 / TG 3/ N118 15/04/2008).
- UNE - EN 5667-1:2007 – Parte 1: Guía para el diseño de los programas de muestreo y técnicas de muestreo.
- UNE - EN 7027:2001: - Determinación de la turbidez.
- UNE - EN 25814:1992 – Calidad del agua. Determinación del oxígeno disuelto. Método electroquímico. (ISO 5814:1990).
- UNE - EN 27888:1993 - Calidad del agua. Determinación de la conductividad eléctrica (ISO 7888:1985).
- ISO 10523:2008. Water quality - Determination of pH.

Asimismo se ha considerado la metodología aceptada por la comunidad científica internacional para la siguiente medición:

- Perfil fluorimétrico de clorofila-a

#### **4. EQUIPOS, REACTIVOS Y CONSERVANTES**

##### **4.1. TRABAJO DE CAMPO**

###### **Equipos y material para la recolección de muestras**

- Botellas de vidrio de 125 - 250 ml traslúcidas y de color ámbar, para proteger las muestras de fitoplancton de la luz.
- Botellas opacas de plástico (2 L) para contener las muestras para la determinación de la concentración de clorofila-a y otros recipientes con cierres herméticos adecuados para contener las muestras de agua para análisis químicos. El material y los recipientes para análisis químicos deberán estar previamente lavados con ácido sulfúrico 1N y aclarados tres veces con agua destilada.
- Botella hidrográfica para la toma de muestras discretas.
- Para la toma de muestras integradas se podrá utilizar alternativamente:
  - botella hidrográfica para la composición de muestras integradas a partir de muestras discretas.
  - muestreadores integradores.
  - tubo flexible de silicona lastrado de longitud predeterminada y entre 2 – 2,5 cm de diámetro.
- Para el programa de investigación además se utilizará:
  - Red de nailon (manga de plancton) de 20  $\mu\text{m}$  de luz de poro para las muestras cualitativas con red.
  - Viales de vidrio o plástico con tapón hermético.



- Disco de Secchi (DS).
- Sonda multiparamétrica con sensores de profundidad, temperatura, conductividad, pH y oxígeno disuelto.
- Sonda fluorimétrica para la determinación de la concentración de clorofila-a en el perfil vertical.
- Ecosonda manual para determinar el punto de máxima profundidad.
- Contenedor para la homogenización de muestras discretas para componer la muestra integrada, cuando éstas se tomen con botella hidrográfica.
- Neveras portátiles para transporte de la muestra.
- Bolígrafo o rotulador permanente (o cualquier otro método para etiquetar las muestras). Si se usan etiquetas, éstas deben ser resistentes a la humedad.
- Barca y equipo adicional para la navegación o el vadeo, adecuados para las condiciones locales, con el equipo de seguridad apropiado.

En caso de filtrado en campo de las muestras para el análisis de clorofila-a (apartado 8.2.1.) será además necesario el siguiente equipo:

- Equipo de filtración. Este equipo estará compuesto de portafiltros (reutilizables, tipo “swinnex”) para filtros de 47 mm de diámetro y jeringa adaptable. Alternativamente podrá utilizarse un equipo de filtración con kitasatos, embudo y soporte para filtros de 47 mm de diámetro y bomba de vacío manual o eléctrica adaptable al kitasatos. Todo el equipo deberá lavarse con agua destilada antes de filtrar una nueva muestra.
- Filtros de microfibras de vidrio, de 47 mm de diámetro, con capacidad para retener todas las partículas de tamaño superior a 0,7  $\mu\text{m}$ .
- Probeta para la medición del volumen de muestra a filtrar.
- Pinzas de punta roma para la manipulación de los filtros.
- Tubos de vidrio con tapón de rosca para depositar los filtros una vez filtrada la muestra.
- Equipo de congelación (temperatura inferior a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) para la conservación del filtro para el análisis de clorofila-a.

#### **Equipos y material complementario**

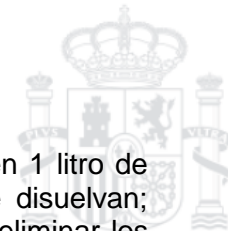
- Protocolo de muestreo.
- Hoja de campo.
- Libreta de campo.
- Fundas impermeables para las fichas de campo.
- Cámara digital.
- Teléfono móvil.
- Cartografía adecuada.
- GPS.

Todo el material utilizado en campo deberá estar convenientemente limpio y desinfectado para evitar el transporte y la dispersión de propágulos o individuos de especies invasoras, siguiendo los protocolos establecidos por el Organismo de cuenca competente.

#### **Reactivos fijadores (conservantes)**

Las muestras para el recuento de fitoplancton (cuantitativas) y las muestras cualitativas tomadas con red (control de investigación) se fijarán con solución de Lugol (mezcla de yoduro potásico y yodo), tal como se especifica en el apartado 8.4.

Para la preparación de la solución de Lugol, en la norma EN 15204 (2007) se incluyen dos formulaciones:



- Solución ácida de Lugol (Willén, 1962). Disolver 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 acético glacial; decantar la solución antes de su uso para eliminar los posibles precipitados. Esta solución se utilizará para las muestras de fitoplancton procedentes de masas de agua con  $\text{pH} < 7$ .
- Solución alcalina de Lugol (Utermöhl, 1958 modificada). Se prepara como la anterior, excepto que, en lugar del ácido acético glacial, se añaden 100 g de acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{COO-Na}$ ). Esta solución se utilizará para las muestras de fitoplancton procedentes de masas de agua con  $\text{pH} \geq 7$ .

El líquido resultante debe estar fuertemente coloreado y debe conservarse en un recipiente hermético de vidrio y protegido de la luz para minimizar su sublimación.

## 5. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO Y LOCALIZACIÓN DE PUNTOS DE MUESTREO

Se seleccionará siempre un punto de muestreo localizado en la vertical de la parte más profunda de la masa de agua y se evitarán las muestras litorales salvo razón específica que lo justifique (nunca sustituyendo al punto de muestreo de la zona más profunda).

En el caso de embalses el punto de muestreo se ubicará suficientemente separado de la presa para quedar aguas arriba de la ataguía.

La recogida de muestras para los análisis físico-químicos se realizará en el mismo punto en el que se tomen muestras para la determinación de fitoplancton.

## 6. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO Y TIPO DE MUESTRAS POR PUNTO DE MUESTREO

En el punto de muestreo se realizará, previamente al muestreo de fitoplancton, un perfil vertical con el fin de determinar la profundidad a la que se encuentra la termoclina (en su caso) y, por tanto, si la masa de agua se encuentra estratificada o no.

En el perfil vertical se determinarán las siguientes variables:

- Temperatura del agua ( $^{\circ}\text{C}$ ).
- Conductividad eléctrica a  $20^{\circ}\text{C}$  ( $\mu\text{S/cm}$ ).
- Oxígeno disuelto (concentración y saturación) ( $\text{mg O}_2 / \text{L}$  y  $\% \text{ sat O}_2$ ).
- $\text{pH}$  (ud  $\text{pH}$ ).
- Perfil fluorimétrico de la concentración de clorofila-a ( $\text{mg/m}^3$  clorofila - a).

El número de determinaciones de las variables incluidas en el perfil será función de la profundidad máxima de la masa de agua:

- Profundidad máxima  $< 10$  m: al menos cada medio metro.
- Profundidad máxima  $\geq 10$  m: al menos cada metro.

También se determinará la profundidad de visión del Disco de Secchi (DS).

El número y tipo de muestras dependerá de las características de la masa de agua, según el siguiente criterio:

- **Lagos y embalses de profundidad máxima  $\leq 3$  m y humedales:** se tomará una muestra integrada de la columna de agua desde la superficie hasta unos 20-30 cm del fondo, evitando acercarse excesivamente al sedimento o a la cobertura de macrófitos.
- **Lagos y embalses de profundidad máxima  $> 3$  m, no estratificados:** se tomará una muestra integrada desde la superficie hasta la profundidad correspondiente a 2,5 DS (2,5





veces la profundidad de visión del Disco de Secchi). Cuando la profundidad del lago o embalse sea inferior a 2,5 DS se tomará una muestra integrada de toda la columna de agua desde la superficie hasta unos 20-30 cm del fondo, evitando acercarse al sedimento o a la cobertura de macrófitos.

- **Lagos y embalses de profundidad máxima > 3 m, estratificados:** se presentan dos posibilidades, una para el control de vigilancia, operativo y de referencia, y otra para el control de investigación.
  - **Control de vigilancia, operativo y redes de referencia:** se realizará del mismo modo que para los no estratificados.
  - **Control de investigación:** en los casos en los que resulte oportuno un control de investigación se procederá igual que en el control de vigilancia, y además se tomarán muestras discretas en las profundidades en las que la sonda fluorimétrica detecte picos de clorofila-a, donde las concentraciones sean al menos 10 veces superiores a las detectadas a 1 metro de profundidad.

## 7. FRECUENCIAS Y ÉPOCA DE MUESTREO

La frecuencia intraanual y la época del año en la que se tomarán las muestras dependerá de las características de la masa de agua:

- **Lagos de profundidad máxima > 3 m y permanentes (tipos 1-4, 6-10, 12, 14-15 y 22) y embalses de cualquier profundidad.** Se realizarán dos muestreos al año a lo largo del periodo de posible estratificación estival, el primero aproximadamente en la primera mitad del periodo estival, en torno al mes de julio; y el segundo en la segunda mitad del periodo estival, en el mes de septiembre. Estas fechas de muestreo serán también aplicables, para los lagos y embalses con estas características hidromorfológicas, en el caso de que la masa de agua no se estratifique.
- **Lagos y humedales someros de profundidad máxima  $\leq$  3 m y permanentes (tipos 11, 16, 18, 20, 27-29 y los que presenten hidroperiodo permanente de los tipos 24-26).** Se realizarán dos muestreos al año, el primero aproximadamente a mitad de primavera, y el segundo en torno a la mitad del periodo estival.
- **Lagos y humedales temporales (tipos 5, 13, 17, 19, 21, 23, 30 y los que presenten hidroperiodo temporal de los tipos 24-26).** Se realizarán dos muestreos durante el hidroperiodo, el primero, al menos, un mes después del comienzo del llenado y se retrasará hasta finales del invierno, siempre que sea posible, mientras que el segundo se realizará en torno a la mitad de primavera, antes de que se inicie el periodo de desecación estival. En el caso de masas de agua con hidroperiodo más efímero, los dos muestreos se distribuirán de forma equitativa a lo largo del hidroperiodo, con criterios similares a los del resto de masas de agua temporales, a menos que el hidroperiodo sea demasiado corto, en cuyo caso se realizará un único muestreo.

En casos excepcionales, que deberán ser justificados, se podría alterar la época de muestreo para, por ejemplo, hacerlo coincidir con las fases de inicio y de máxima estabilidad de la estratificación de la masa de agua, que en el caso de los embalses puede depender del criterio de explotación. En cualquier caso, se deberá motivar la variación en la época de muestreo a la entrega de resultados.

Cuando en la masa de agua se den situaciones tales que dos muestreos anuales sean insuficientes (ej. frecuentes floraciones algales masivas, masas de agua estratégicas), se podrá aumentar el número de muestreos por año hasta cuatro. El aumento del número de toma de muestras por año deberá ser justificado a la entrega de resultados.

No se podrá realizar el muestreo cuando haya habido aportes excepcionales de sólidos en suspensión que afecten de forma significativa a la turbidez del agua. Se debe esperar a que las



condiciones de turbidez por partículas en suspensión inorgánicas en la masa de agua vuelvan a la normalidad.

El control de investigación tendrá unas frecuencias variables en cada estación de muestreo según su problemática específica.

## 8. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO

Se tomará una muestra integrada y una o varias discretas cuando corresponda, según se indica en el apartado 6. De éstas se extraerán alícuotas para realizar los análisis correspondientes a:

- Concentración de clorofila-*a*.
- Identificación, recuento y determinación del biovolumen de fitoplancton.

Además, de cada una de las muestras (integradas y discretas), se medirán in situ pH y conductividad, y como análisis complementarios, se tomarán alícuotas para realizar los siguientes análisis:

- Fósforo total (mg P/L).
- Nitrógeno total (mg N/L).
- Fosfatos (mg PO<sub>4</sub>/L).
- Amonio total (mg NH<sub>4</sub> /L).
- Nitratos (mg NO<sub>3</sub>/L).
- Alcalinidad (mg CaCO<sub>3</sub> /L).

Las muestras para los análisis de fosfatos, amonio total y nitratos se filtrarán a través de un filtro de microfibra de vidrio (como el descrito en el apartado 4.1.) inmediatamente después de su recogida y se depositarán, una vez filtrados, en los recipientes correspondientes.

Se rellenará la hoja de campo del anexo I de este protocolo.

### 8.1. TOMA DE MUESTRAS

Las muestras discretas, correspondientes a cada profundidad de la columna de agua, se obtienen mediante una botella hidrográfica que se sumerge a la profundidad deseada y se cierra mediante mensajero.

En el caso de muestras integradas, las submuestras tomadas a cada una de las profundidades se integran finalmente en una única muestra. Las submuestras tomadas deben cubrir de manera equidistante la columna de agua muestreada, dependiendo del espesor de la capa fótica:

- Zona fótica ( $2,5 \cdot DS$ ) < 10 m: la equidistancia no deberá ser mayor de 1 metro.
- Zona fótica ( $2,5 \cdot DS$ )  $\geq$  10 m: la equidistancia no deberá ser mayor de 2 metros.

Se deberán tomar volúmenes iguales a cada una de las profundidades y homogenizarlos bien, pero de manera suave, en un recipiente de mezcla, para dar lugar a la muestra integrada de la que luego se toman las alícuotas mediante un recipiente adecuado, manteniendo bien la mezcla. Al igual que cualquier utensilio usado en la toma de muestras, tanto el recipiente de mezcla como el dispensador deberán estar bien limpios, de manera que no aporten ningún tipo de contaminación a la muestra.

Alternativamente se podrán utilizar muestreadores integradores homologados por normas internacionales, o bien un tubo de silicona, en cuyo caso deberá prestarse atención para que la caída del tubo por la columna de agua sea vertical y para conseguir una buena limpieza del mismo. Cuando se utilice el tubo de silicona, éste debe ser de longitud adecuada para la masa de agua y con un diámetro exterior de entre 2-2,5 cm. El tubo debe disponer de un lastre en uno de los extremos para que la caída del tubo por la columna de agua sea vertical y será almacenado limpio y seco entre



los distintos muestreos, y no deberá ser usado para otro propósito que para muestrear fitoplancton u otros parámetros acompañantes.

En función de las características del sistema el procedimiento de muestreo, acorde con el apartado 6, será el siguiente:

- **Lagos y embalses someros de profundidad máxima  $\leq 3$  m y húmedales:** Se podrá utilizar la botella hidrográfica para tomar muestras discretas a diferentes profundidades que finalmente se homogenizarán en una única muestra integrada. Alternativamente, también podrá usarse un muestreador integrador, o bien un tubo flexible de 2-2,5 cm de diámetro exterior y longitud adecuada a la profundidad de la masa de agua.
- **Lagos y embalses de profundidad máxima  $> 3$  m, no estratificados:** Se utilizará la botella hidrográfica para tomar muestras discretas a diferentes profundidades, que finalmente se homogenizarán en una única muestra integrada, o bien un muestreador integrador.
- **Lagos y embalses de profundidad máxima  $> 3$  m, estratificados:**
  - **Control de vigilancia, operativo y de redes de referencia:** Se utilizará la botella hidrográfica para tomar muestras discretas a diferentes profundidades, que finalmente se homogenizarán en una única muestra integrada, o bien un muestreador integrador.
  - **Control de investigación:** Se utilizará la botella hidrográfica para tomar muestras discretas a diferentes profundidades, las cuales finalmente se homogenizarán en una única muestra integrada, o bien un muestreador integrador. Además se tomarán muestras discretas con botella hidrográfica a las profundidades de la columna de agua donde la sonda fluorimétrica haya detectado picos de clorofila-a (apartado 6).

## 8.2. VOLUMEN NECESARIO PARA CADA ANÁLISIS

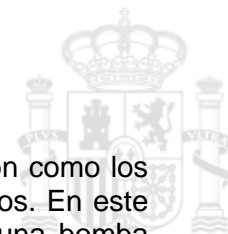
De la muestra integrada, y de las discretas cuando corresponda, se extraerán las siguientes alícuotas:

- Para el análisis de clorofila-a: recoger un volumen de agua suficiente que oscila de 1 a 2L. Guardar la muestra en recipientes opacos y refrigerada (4°C) hasta el momento del análisis. Cuando la muestra se filtre in situ se seguirá el procedimiento señalado en el apartado 8.2.1.
- Para identificación y recuento de fitoplancton: recoger un volumen de agua de entre 125 ml y 250 ml. Guardar, una vez fijada (apartado 8.4), en recipientes traslúcidos de vidrio de color ámbar, en lugar fresco y protegido de la luz. En cuanto a la muestra cualitativa tomada con red (apartado 8.3), se guardará en el vial correspondiente el volumen en el que haya quedado recogido el contenido del copo de la manga de plancton. Una vez fijada (apartado 8.4), se guardará en las mismas condiciones, resguardándola de la luz y las altas temperaturas.
- Para los análisis químicos: tomar el volumen que indiquen las respectivas normas nacionales o internacionales.

### 8.2.1. FILTRADO EN CAMPO DE LA MUESTRA DESTINADA AL ANÁLISIS DE PIGMENTOS

En el caso de que el transporte al laboratorio de la muestra de agua no pueda realizarse en el mismo día y su procesado antes de 24 horas, es conveniente realizar in situ el filtrado de la muestra para análisis de pigmentos fotosintéticos (clorofila-a), y preservar congelado el filtro que contiene la muestra recogida.

Existen diversos tipos de dispositivos que pueden ser utilizados para el filtrado in situ de la muestra, que están descritos en el apartado 4.1. El más sencillo corresponde a portafiltros portátiles, tipo "swinnex", en los que se puede colocar el filtro de microfibras de vidrio y, mediante una jeringa, ir filtrando la muestra hasta que el filtro comience a estar saturado y tome un marcado color verde o amarillento. La adición de muestra a la jeringa debe hacerse con una probeta, de manera que se pueda medir exactamente el volumen filtrado, el cual debe anotarse convenientemente.



Alternativamente al “swinnex” y la jeringa se pueden utilizar sistemas clásicos de filtración como los utilizados en laboratorio, con un matraz kitasatos y un embudo de filtración con portafiltros. En este caso la fuerza de succión debe ser realizada por una bomba de vacío manual o por una bomba mecánica accionada por batería, si no se dispone de toma de corriente.

Los filtros utilizados para la filtración deben ser de microfibras de vidrio de 47 mm de diámetro, con capacidad para retener todas las partículas de tamaño superior a 0,7  $\mu\text{m}$ , tal como se especifica en el apartado 4.1. Los portafiltros deberán ser, consecuentemente, los adecuados para ese diámetro de filtro.

### **8.3. MUESTREOS ADICIONALES. MUESTREO CUALITATIVO DE FITOPLANCTON CON RED**

En el control de investigación, para ayudar en la identificación del fitoplancton se realizará además un muestreo cualitativo de fitoplancton con red, utilizando una manga de plancton de 20  $\mu\text{m}$  de luz de malla. La red se arrastra en el seno del agua, verticalmente si la profundidad lo permite o si no horizontalmente, hasta conseguir un filtrado visible. El volumen en el que haya quedado recogido el contenido del copo de la manga de plancton se guardará en un vial de vidrio o plástico con tapón hermético y se fijará la muestra con lugol.

Esta muestra no tiene como objeto la obtención de un inventario de taxones, sino simplemente proporcionar material adicional para la identificación de estos en campañas de muestreo del programa de control de investigación.

### **8.4. CONSERVACIÓN, ETIQUETADO Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS**

Todas las muestras y preparaciones deben estar convenientemente etiquetadas de forma que se identifiquen mediante un código. Se usará un rotulador resistente al agua.

Para la conservación y transporte de las muestras se seguirá el siguiente procedimiento.

#### **Muestras para análisis de clorofila-a**

Las muestras se refrigerarán a 4°C y se mantendrán en oscuridad hasta el momento del filtrado, en el caso de que las muestras puedan filtrarse en el laboratorio antes de 24 horas.

Si no fuese posible respetar este plazo, el filtrado de la muestra se realizará in situ, tal y como describe el apartado 8.2.1, en cuyo caso el filtro deberá congelarse para su traslado al laboratorio, manteniéndose congelado hasta el momento de añadir el solvente. El sistema de congelación deberá garantizar en todo momento la conservación a una temperatura inferior a -20°C. Esto podrá conseguirse de diversas formas, tanto mediante el uso de congeladores portátiles autónomos o instalados en vehículos con compartimento isoterma, o en recipientes con aislamiento térmico conteniendo nieve carbónica, o en nitrógeno líquido usando contenedores homologados. No será válido para la congelación el uso de hielo, que tan sólo resulta útil para la refrigeración de la muestra previamente a su filtrado.

#### **Muestras para identificación y recuento de fitoplancton**

Para la fijación de estas muestras se utilizará una solución de Lugol preparado tal y como se describe en el apartado 4.2. Para ello se añade de 0,5 a 1 ml de Lugol 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, siendo necesaria una mayor cantidad a mayor presencia de éstos). El Lugol se evapora y se degrada por foto-oxidación, por tanto las muestras se deben conservar en lugar fresco y a oscuras. Hay que controlar periódicamente la pérdida de color de la muestra, añadiendo más conservante si se requiere, siendo preferible la determinación de las muestras en un plazo inferior a 6 meses para evitar su degradación.



### **Muestras para analítica de variables químicas**

Las muestras destinadas a la analítica de las variables químicas se refrigerarán a 4°C y se preservarán de la luz y, en su caso, se añadirá en cada una el conservante o reactivo adecuado y se realizará el procesado que corresponda siguiendo lo que indiquen las respectivas normas nacionales o internacionales.

### **Muestras discretas tomadas en máximos profundos**

En el control de investigación, cuando se hayan tomado muestras discretas en las profundidades donde se hayan detectado máximos profundos de clorofila *a*, deberán conservarse igual que las muestras para identificación y recuento de fitoplancton y se analizarán según el protocolo de análisis y cálculo de métricas de fitoplancton.

## **9. PROCESADO DE LOS DATOS**

Como resultado de los trabajos realizados en campo el responsable del muestreo deberá consignar la información generada en la hoja de campo del anexo I. Esta información deberá entregarse en formato en electrónico al organismo de cuenca pertinente.



## **ANEXO I: HOJA DE CAMPO PARA MUESTREO**







MINISTERIO  
DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN  
Y MEDIO AMBIENTE

HOJA DE CAMPO: FITOPLANCTON EN LAGOS Y EMBALSES

**DATOS IDENTIFICATIVOS DEL MUESTREO**

NOMBRE DE LA MASA DE AGUA:		TIPO:	CÓDIGO DE LA MASA DE AGUA:	
CÓDIGO DEL PUNTO DE MUESTREO:	CÓORDENADAS X/Y (ETRS 89):		HUSO:	
ORGANISMO/EMPRESA:				
MUESTREADOR:		Programa	Vigilancia:	
CÓDIGO MUESTRA:	Nº DE BOTES:		Operativo:	
FECHA:    /    /	Hora inicio:    :		Investigación:	
	Hora fin:       :		Referencia:	
CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA:		<input type="checkbox"/> Lugol <input type="checkbox"/> Otro (indicar):		
Descripción de acceso y localización del tramo:				

**CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS**

pH (unidades):	Oxígeno disuelto (mg O <sub>2</sub> /l):
Temperatura del agua (°C):	% Saturación O <sub>2</sub> :
Conductividad eléctrica a 20°C (µS/cm):	Profundidad del Disco Secchi (m):
Observaciones:	

**CARACTERÍSTICAS HIDROMORFOLÓGICAS**

Profundidad máxima (m)	Longitud máxima (m)
Superficie (ha)	Nivel del agua respecto a la escala (m)
Perímetro (km)	Profundidad termoclina
Estratificación (Sí/No)	Presencia de blooms (Sí/No)

**MUESTREO**

Código PM	Coordenadas			Tipo de muestra (Integrada / discreta)	Profundidad máxima columna de agua (m)	Profundidad fin (m)	Filtro In situ Clorofila a (Sí/No)	Recogida de alícuotas (Sí/No)
	UTM X	UTM Y	Huso					

