

PROTOCOLO DE ANÁLISIS Y CÁLCULO DE MÉTRICAS DE FITOPLANCTON EN LAGOS Y EMBALSES

CÓDIGO: MFIT- 2013
Versión 2

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



**GOBIERNO
DE ESPAÑA**

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

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.



Aviso Legal: los contenidos de esta publicación podrán ser reutilizados, citando la fuente y la fecha, en su caso, de la última actualización



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: 280-13-133-4

ACTUALIZACIÓN Y CORRECCIÓN DE ERRORES

Versión del protocolo	Fecha	Modificaciones
Versión 1	19/12/2014	Se incluye el apartado 10 Procedimiento para la combinación de métricas de fitoplancton en lagos y el apartado 11 Procedimiento para la combinación de métricas de fitoplancton en embalses
Versión 2	20/01/2016	Se corrige error en la fórmula %CIANO en el apartado 9.3. Se modifican los apartados 10 y 11, introduciendo explicaciones añadidas para la aplicación de las fórmulas para el cálculo de los RCE transformados y las tablas aplicables para la clasificación del estado ecológico en base a los RCE transformados.



INDICE

1. APLICABILIDAD	7
2. OBJETIVO.....	7
3. NORMATIVA DE REFERENCIA	7
4. EQUIPOS, REACTIVOS Y CONSERVANTES	8
4.1. EQUIPOS Y REACTIVOS PARA LA EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS.....	8
4.2. EQUIPOS Y REACTIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CLOROFILA A	8
4.3. EQUIPOS Y REACTIVOS PARA LA IDENTIFICACIÓN, RECUENTO DE CÉLULAS Y CÁLCULO DEL BIOVOLUMEN DEL FITOPLANCTON.....	9
5. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS EN LABORATORIO	10
6. PROTOCOLO ANALÍTICO DE CLOROFILA <i>a</i>	10
6.1. CONCENTRACIÓN DEL FITOPLANCTON Y EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS	10
6.2. DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DEL EXTRACTO Y CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA... 11	11
7. IDENTIFICACIÓN, RECUENTO DE CÉLULAS Y CÁLCULO DE BIOVOLUMEN DEL FITOPLANCTON	12
7.1. CALIBRACIÓN DEL EQUIPO	12
7.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	13
7.3. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA	14
7.4. RECUENTO DE CÉLULAS.....	14
7.5. CÁLCULO DEL BIOVOLUMEN	16
8. PROCESADO DE LOS DATOS	17
9. PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO DE MÉTRICAS	17
9.1. CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA A.....	18
9.2. BIOVOLUMEN TOTAL DE FITOPLANCTON	18
9.3. PORCENTAJE DE CIANOBACTERIAS (SOLO PARA EMBALSES).....	18
9.4. ÍNDICE DE GRUPOS ALGALES (IGA) (SOLO PARA EMBALSES).....	18
10. PROCEDIMIENTO PARA LA COMBINACIÓN DE MÉTRICAS DE FITOPLANCTON EN LAGOS	19
10.1. CÁLCULO DEL RATIO DE CALIDAD ECOLÓGICA (RCE)	19
10.2. TRANSFORMACIÓN DEL RCE A ESCALAS NUMÉRICAS EQUIVALENTES.....	19



10.3. COMBINACIÓN DE RCE TRANSFORMADOS PARA CLASIFICACIÓN DEL ESTADO ECOLÓGICO .20

11. PROCEDIMIENTO PARA LA COMBINACIÓN DE MÉTRICAS DE FITOPLANCTON EN EMBALSES
(*MARSP*)..... 20

11.1. CÁLCULO DEL RATIO DE CALIDAD ECOLÓGICA (RCE)20

11.2. TRANSFORMACIÓN DEL RCE A ESCALAS NUMÉRICAS EQUIVALENTES21

**11.3. COMBINACIÓN DE RCE TRANSFORMADOS PARA LA CLASIFICACIÓN DEL POTENCIAL
 ECOLÓGICO.....23**

ANEXO I: HOJA DE RESULTADOS..... 24





1. APLICABILIDAD

Este protocolo de análisis y cálculo de métricas de fitoplancton 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 explota 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 se aplica a muestras tomadas con el Protocolo de muestreo de fitoplancton en lagos y embalses (Código: M-LE-FP-2013) en las masas de agua naturales de la categoría lagos (lagos, lagunas y humedales) así como en las masas de agua artificiales o muy modificadas asimilables a lagos (incluyendo embalses) que aparecen en la Orden ARM/2656/2008, de 10 de septiembre, por la que se aprueba la Instrucción de Planificación Hidrológica (IPH), siendo aplicable al análisis en laboratorio de la concentración de clorofila *a*, identificación de taxones, recuento de células y cálculo de biovolumen para la determinación de las métricas correspondientes al elemento de calidad composición y abundancia de fitoplancton. En concreto, los procedimientos descritos comprenden el cálculo de las siguientes métricas, cuando proceda según la categoría de la masa de agua:

- Concentración de clorofila *a*.
- Biovolumen total de fitoplancton.
- Porcentaje de cianobacterias.
- Índice de Grupos Algales (IGA).

2. OBJETIVO

La Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, establece que los Estados miembros deberán poner en marcha programas de seguimiento. Estos programas deben permitir controlar y evaluar la composición y abundancia del fitoplancton.

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 analítico de fitoplancton en laboratorio y un método de cálculo de métricas 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.

Otra documentación de referencia:

- Standard ISO 10260:1992, *Water quality– Measurement of biochemical parameters – Spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration.*
- Standard Methods 10200H (APHA, 1998)¹
- UNE – EN 15204: 2007 – Guía para el recuento de fitoplancton con microscopía invertida (técnica de Utermöhl).
- *WISER Deliverable D3.1-4 Guidance document on sampling, analysis and counting standards for phytoplankton in lakes.*
- *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).*
- Protocolo de muestreo de fitoplancton en lagos y embalses (Código: M-LE-FP-2013).
- Tesoro para la clasificación del estado ecológico de las masas de agua continentales (TAXAGUA²).
- CEDEX (2010): Selección de métricas para la evaluación del estado ecológico de las masas de agua de la categoría “lagos” basadas en el elemento de calidad “composición, abundancia y biomasa de fitoplancton”, en aplicación de la Directiva Marco del Agua.

4. EQUIPOS, REACTIVOS Y CONSERVANTES

Los trabajos de laboratorio se llevarán a cabo tomando todas aquellas medidas necesarias para garantizar que se desarrollan en unas condiciones adecuadas de seguridad e higiene.

4.1. EQUIPOS Y REACTIVOS PARA LA EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS

- Equipo de filtración.
- Bomba de vacío.
- Probeta para medir el volumen filtrado.
- Filtros de microfibra de vidrio GF/F o similar.
- Tubos de centrífuga de vidrio de 15 mL con tapón de rosca y gradilla portadora.
- Solución de carbonato magnésico saturada: disolver 1 g de MgCO₃ en polvo en 100 mL de agua destilada.
- Solución de acetona (BP 56° síntesis) al 90%: mezclar 90 partes de acetona con 10 partes de agua destilada o de la solución saturada de carbonato magnésico.
- Nevera con congelador.
- Pinzas de punta roma.
- Triturador de tejidos vegetales o mejor un aparato de sonicación.
- Contenedor opaco para proteger los extractos de pigmentos de la luz ambiental.

4.2. EQUIPOS Y REACTIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CLOROFILA A

- Centrífuga refrigerada (opcional) o filtros de un solo uso resistentes a solventes orgánicos y jeringa de 10 mL de un solo uso, igualmente resistente a éstos.
- Espectrofotómetro con anchura de banda estrecha (de 0,5 a 2 nm), preferiblemente de barrido.
- Cubetas de vidrio o cuarzo con tapón esmerilado. Antes de medir, la cubeta debe ser lavada con una disolución de ácido nítrico al 20%, después lavada con agua destilada y finalmente

¹ APHA, 1998: *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 20.ª ed., Washington D.C. (EE.UU.), American Public Health Association.

² <http://www.magrama.gob.es/es/agua/temas/estado-y-calidad-de-las-aguas/aguas-superficiales/programas-seguimiento/TAXAGUA.aspx>



pasada un par de veces por la acetona utilizada como solvente de extracción. Submuestreador (Wrona et al., 1982) opcional.

- Pipeta de 5 mL de vidrio de clase A o, alternativamente, pipeta automática de 5 mL con émbolo cerámico (para evitar que sea dañada por la acetona).
- Pipetas Pasteur de vidrio de un solo uso y chupete succionador.
- Papel absorbente.

4.3. EQUIPOS Y REACTIVOS PARA LA IDENTIFICACIÓN, RECUENTO DE CÉLULAS Y CÁLCULO DEL BIOVOLUMEN DEL FITOPLANCTON

- Microscopio invertido: Debe estar equipado con un condensador de apertura numérica (AN) de 0,5 como mínimo y objetivos de bajos aumentos (4x o 10x) y de aumentos altos 20x y 40x (60x o un objetivo de inmersión 100x es recomendado para la identificación y cálculos de biovolúmenes de pequeñas especies). Los oculares x10 o x12,5 estarán equipados, uno de ellos, con un micrómetro ocular calibrado y el otro con una cuadrícula de recuento calibrada (necesaria en el caso de contar transectos). Estas piezas de los oculares no son necesarias si el microscopio está conectado a un ordenador y se dispone de un programa de análisis de imagen que permita realizar medidas. Para exámenes en detalle es aconsejable usar un microscopio equipado con contraste de fases o mejor con contraste interferencial de Nomarski.
- Cámara digital acoplada al microscopio.
- Aceite de inmersión, si se va a utilizar el objetivo de inmersión 100x.
- Cámara o cubeta de sedimentación de 10 a 100 mL de capacidad y de aproximadamente 25 mm de diámetro: 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. El tipo habitual de cámara consta de dos piezas: una columna superior y una base. Ésta última lleva una arandela enroscable y un cubreobjetos redondo del diámetro adecuado que delimitan una cámara cilíndrica de pequeña altura. Una vez que las algas han sedimentado en el fondo, la columna superior se desliza hacia un lado y se sustituye por una tapa de vidrio. Se recomienda que el grosor del fondo de la cubeta (cubreobjetos circular) no exceda los 0,17 mm.
- Pipetas variadas para el caso de que sea necesario hacer diluciones o concentraciones.
- Cilindros de sedimentación graduados para concentrar la muestra en el caso de aguas muy oligotróficas, con densidades de fitoplancton extremadamente bajas.
- Etanol (C₂H₅OH) al 96% para el lavado de las cubetas.
- Ácido acético glacial.
- Agua con lugol, a la misma concentración de la muestra (indicado en el protocolo de muestreo de fitoplancton), para realizar las diluciones necesarias.
- Formularios para anotar el recuento de las especies. Pueden 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.
- Claves de identificación de los elementos de calidad biológicos (ID-TAX³) y/o guías de identificación e iconografía adecuadas al ámbito de estudio.
- Versión más actualizada del Tesauro para la clasificación del estado ecológico de las masas de agua continentales (TAXAGUA⁴).

³<http://www.magrama.gob.es/es/agua/temas/estado-y-calidad-de-las-aguas/aguas-superficiales/programas-seguimiento/ID-TAX.aspx>

⁴<http://www.magrama.es/es/agua/temas/estado-y-calidad-de-las-aguas/aguas-superficiales/programas-seguimiento/TAXAGUA.aspx>



5. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS EN LABORATORIO

A partir de las muestras tomadas mediante el Protocolo de muestreo de fitoplancton en lagos y embalses (Código: M-LE-FP-2013) se llevarán a cabo los análisis en laboratorio correspondientes que permitan el cálculo de las métricas de estado / potencial ecológico.

Las muestras tomadas mediante el protocolo citado anteriormente son:

- Muestras para el análisis de la concentración de clorofila *a*.
- Muestras para la identificación, recuento y cálculo de biovolumen del fitoplancton.
- Muestras de red para la ayuda en la identificación del fitoplancton en el control de investigación.

A partir de estas muestras se seguirán los procedimientos analíticos descritos a continuación para obtener la información necesaria para el cálculo de las métricas aplicables a lagos y embalses.

6. PROTOCOLO ANALÍTICO DE CLOROFILA *a*

La concentración de clorofila *a* es una medida indirecta de la biomasa del fitoplancton. El procedimiento para su análisis consiste en 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)⁵, y es compatible con el Standard ISO 10260:1992, "*Water quality– Measurement of biochemical parameters – Spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration*", aunque éste último recomienda la extracción de clorofila mediante etanol.

6.1. CONCENTRACIÓN DEL FITOPLANCTON Y EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS

La alícuota destinada al análisis de clorofila obtenida a partir de la muestra integrada (Protocolo de muestreo de fitoplancton en lagos y embalses Código: M-LE-FP-2013) puede filtrarse en campo o en laboratorio.

En caso de filtrado en laboratorio éste se llevará a cabo a partir de la muestra refrigerada a 4^o C y conservada en oscuridad, durante las siguientes 24 horas al muestreo.

- Cuando la muestra se filtre en laboratorio se concentrará mediante el filtrado de un volumen suficiente de agua (normalmente entre 0,1 y 2 litros, dependiendo del estado trófico de la masa de agua), a través de un filtro de microfibras de vidrio (tipo GF/F o equivalente) y a una presión de menos de 100 mm Hg (~0,15 atm). La adición de una suspensión acuosa de carbonato magnésico al 1% aumenta la eficiencia de retención del filtro y evita la degradación de la clorofila (APHA, 1998). 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 µm.
- Posteriormente es necesario retirar el filtro del dispositivo de filtración mediante unas pinzas de punta roma. El filtro deberá quedar lo más escurrido posible. Si el filtro retiene un exceso de agua, ésta alterará el volumen final del solvente de extracción añadido y también su concentración. Tras retirar el filtro del soporte de filtración, se depositará sobre un papel de filtro blanco, seco y limpio durante unos segundos, para que por capilaridad pierda el agua sobrante. Si es necesario se repetirá la operación moviendo el filtro a una nueva posición seca del papel de filtro. Finalmente, se colocará el filtro cuidadosamente enrollado en el tubo

⁵ En aguas muy oligotróficas con muy bajo contenido en clorofila se filtrará un volumen suficiente de agua, incluso utilizando varios filtros, para que la medida sea fiable.



donde se va a realizar la extracción (normalmente un tubo de vidrio de 15 mL de capacidad, con tapón de rosca resistente a la acetona).

- En caso de filtrado en campo, el análisis se iniciará a partir de los filtros congelados a una temperatura inferior a -20°C , siempre antes de que transcurran 2-3 semanas desde el muestreo. En cualquier caso (filtrado en campo o en laboratorio), se deberá mantener el filtro congelado (-20°C), preferiblemente 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, aunque es recomendable proceder a su procesado cuanto antes.
- Para iniciar el procedimiento de extracción se añadirá al tubo con el filtro de fitoplancton 5 mL de solución de acetona 90% de manera que cubra totalmente al filtro (añadir más cantidad de acetona si fuera necesario).
- Posteriormente se realizará, como mínimo, una trituración mecánica que garantice la rotura de las células pues de lo contrario la cantidad de pigmento extraído de algunas algas de paredes robustas puede verse mermada hasta en un 50%. Dado el pequeño tamaño de algunas algas y cianobacterias (picoplancton) la mera trituración mecánica puede no ser efectiva, por lo que se recomienda complementar esta trituración con una serie de tres tratamientos de sonicación de la muestra, a intervalos de 1-2 horas tras añadir el solvente de extracción, durante los que se les aplicará ultrasonidos en un baño sonicador con agua fría y hielo picado. El tiempo de sonicación no debe exceder los 2 minutos y, tras aplicar los ultrasonidos, la muestra debe volver al congelador o nevera durante 1-2 horas. El procedimiento se completará agitando los tubos a intervalos periódicos una o dos veces entre sonicaciones.
- Finalizada la trituración o sonicación, se mantendrá la muestra en frío ($0 - 4^{\circ}\text{C}$) y en la oscuridad, al menos 12 horas pero no más de 24 horas, pues en esas condiciones podría empezar la degradación del pigmento. También puede realizarse la extracción durante al menos 24 horas en congelador a -20°C y siempre en oscuridad pero sin exceder los 2-3 días.
- Todo el proceso debe realizarse en la oscuridad o con una iluminación indirecta lo más tenue posible.

6.2. DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DEL EXTRACTO Y CUANTIFICACIÓN DE LA CLOROFILA

La determinación espectrofotométrica y cuantificación de la clorofila *a* del extracto se realizará después de que el proceso de concentración y extracción de pigmentos haya terminado. Para ello se seguirán los pasos descritos a continuación:

- Una vez concluida la extracción, y después de agitar los tubos por última vez para homogenizar su contenido, se procederá a retirar los restos grandes del filtro con ayuda de unas pinzas y seguidamente a centrifugar los tubos en una centrifugadora preferiblemente refrigerada (4°C) y en oscuridad durante 5 minutos a 3.500 rpm, o bien a filtrar el solvente a través de un filtro de un solo uso, de pequeño volumen muerto y de membrana filtrante resistente a solventes orgánicos.
- Se medirá el volumen del extracto. Es importante trabajar rápido para evitar la evaporación de la acetona y la variación del volumen del extracto.
- La medida del extracto en el espectrofotómetro debe realizarse en cubetas de vidrio o cuarzo, preferiblemente de boca esmerilada provistas del correspondiente tapón hermético, del tipo utilizado para medidas con solventes volátiles.
- La cubeta ha de lavarse con una pequeña alícuota de la muestra antes de su llenado para efectuar la lectura. Es muy importante que cuando se toma la muestra del tubo de centrifugación no se resuspenda el sedimento. Cualquier medida en la que se aprecie turbidez debida a restos del material u otros detritus no tiene validez. La espectrofotometría solo es aplicable a soluciones completamente transparentes.
- Una vez llenada la cubeta, se medirán las densidades ópticas del extracto para las longitudes de onda que requiere la fórmula señalada a continuación. Las absorbancias de las muestras se miden frente a un blanco realizado con el solvente de extracción utilizado (acetona 90 %).
- Las medidas pueden realizarse en espectrofotómetros de bandas fijas, aunque es preferible realizar un barrido entre 350 y 850 nm y de ahí extraer las absorbancias a las longitudes de



onda necesarias para el cálculo, ya que al disponer de un espectro de absorción entre 350 y 850 se podrían hacer cálculos adicionales de otros pigmentos, ajustar mejor los cálculos de corrección y calcular diversos índices pigmentarios del fitoplancton.

- Los pigmentos en extracto son muy sensibles 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 a baja temperatura en un contenedor opaco o debidamente protegidos de la luz.

Para el cálculo de la concentración de se utilizará la fórmula tricromática de Jeffrey y Humphrey (1975)⁶:

$$\text{Chl. "a"} \text{ (mg/m}^3\text{)} = \frac{[11,85 * (A664 - A750) - 1,54(A647 - A750) - 0,08 * (A630 - A750)] * v}{V * Z}$$

Dónde:

A630, A647, A664, A750 = Densidad óptica (absorbancia) medida a las longitudes de onda indicadas (en nm)

v = volumen del extracto, en mL

V = volumen de agua filtrada, en L

Z = Paso óptico de la cubeta, en cm

7. IDENTIFICACIÓN, RECUENTO DE CÉLULAS Y CÁLCULO DE BIOVOLUMEN DEL FITOPLANCTON

Para el análisis de la composición del fitoplancton se utilizará el método de Utermöhl con microscopio invertido, siguiendo la norma para el recuento de fitoplancton: UNE – EN 15204:2007 – Guía para el recuento de fitoplancton con microscopía invertida (técnica de Utermöhl) y las recomendaciones establecidas en *Deliverable D3.1-4 Guidance document on sampling, analysis and counting standards for phytoplankton in lakes (WISER)*.

El análisis cuantitativo que se describe a continuación comprende la descripción de los siguientes procedimientos:

- Calibración del equipo.
- Preparación de la muestra.
- Identificación taxonómica.
- Recuento de células.
- Cálculo de biovolúmenes.

7.1. CALIBRACIÓN DEL EQUIPO

Las operaciones señaladas a continuación para calibrar el equipo únicamente es necesario realizarlas una vez.

- Asegurarse de que el volumen de la cámara de sedimentación (las combinaciones de base y columna) tienen el volumen esperado (5, 10, 25, 50 o 100 mL). Si hay variaciones, se harán los cálculos posteriores con los volúmenes exactos. Se puede calcular el volumen pesando la cámara, incluidos el cubreobjetos y la placa de vidrio, antes y después de llenarla con agua destilada. La diferencia, en gramos, es equivalente al volumen de la cámara, en mililitros. Se repetirá 3 veces esta operación y se considerará el valor medio de los volúmenes obtenidos.
- Se calculará el área de la superficie de cada cámara, midiendo 5 veces el diámetro con la ayuda de, por ejemplo, un calibrador micrométrico.
- El micrómetro y la cuadrícula de recuento de los oculares del microscopio tienen que estar

⁶ JEFFREY, S.W. y G.F. HUMPHREY. 1975. *New spectrophotometric - equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton*. Biochem. Physiol. Pflanz 167:191-194



calibrados para cada uno de los objetivos. Se puede hacer con un portaobjetos micrométrico graduado (por ejemplo, 100 μm divididas en 10 divisiones de 10 μm cada una).

- Para cada uno de los aumentos que se va a usar, hay que calcular el área de los campos de recuento y el área de los transectos. Los campos de recuento pueden ser: todo el campo ocular, el delimitado por la cuadrícula ocular (que puede ser un cuadrado o una rejilla) o el de la pantalla del ordenador (en el caso de usar esta opción de recuento). Para calcular el área de los transectos se tendrá en cuenta el diámetro de la cámara y las dimensiones de la cuadrícula ocular o del área observada en la pantalla del ordenador (si se elige esta opción).

7.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

El siguiente procedimiento incluye la aclimatación y homogeneización de la muestra fijada con lugol, la concentración o dilución de la misma, en caso de que sea necesario, y la preparación de las submuestras que se van a observar al microscopio.

Antes de iniciar los procesos que se señalan a continuación, las diferentes partes de las cámaras de sedimentación deben estar limpias y secas. Se debe cuidar especialmente la limpieza del fondo de la cubeta. Para ello se limpiará con etanol (96%) entre dos recuentos, si fuera necesario.

Aclimatación de la muestra

Las muestras, las cubetas de sedimentación y los equipos que se vayan a utilizar deben someterse a un periodo de aclimatación a temperatura ambiente (en general de 12 horas aunque puede variar según las diferencias de temperatura y el volumen de la muestra). De este modo se limitarán las corrientes de convección y se favorecerá la distribución al azar del fitoplancton sedimentado en la muestra.

Homogeneización de la muestra

Durante el tiempo en el que las muestras están almacenadas, las partículas sedimentan en la botella y se forman agregados entre algas pequeñas y otras algas, colonias más grandes o detritus. La homogeneización de la muestra supone la resuspensión y separación de las partículas. Mediante giros horizontales y verticales de la botella durante aproximadamente dos minutos se deben mezclar suavemente las muestras a fondo.

Preparación de las muestras

- Se usará una cámara de sedimentación de un tamaño adecuado, dependiendo de la concentración del fitoplancton en la muestra (la concentración de clorofila puede servir como guía). No se recomienda utilizar cámaras de menos de 5 mL o de más de 100 mL. Para densidades de fitoplancton muy altas o muy bajas es necesario diluir o concentrar la muestra. Como regla general, hay que conseguir de 4 a 20 unidades de recuento por campo al máximo aumento (400x-1000x).
- Se llenará la cubeta de sedimentación con la muestra. Tapar la cubeta con una pieza cuadrada o circular de cristal, evitando la formación de burbujas de aire. Se colocará la cámara de sedimentación en una superficie horizontal plana evitando fuentes de calor, luz y vibración. Es necesario poner una nota al lado de la cámara con el sitio y la fecha de muestreo, así como el volumen de muestra sedimentado.
- El tiempo de sedimentación recomendado para las cámaras de 10 mL es de al menos 12 horas, para las de 25 mL, de al menos 24 horas, para las de 50 mL, al menos 48 horas y para las de 100 mL, 72 h. Hay que tener en cuenta que un tiempo de sedimentación demasiado largo (varios días) aumenta el peligro de formación de burbujas y produce alteraciones en la sedimentación.
- Después de la sedimentación, si se están utilizando cámaras de dos piezas (base y columna), se deslizará la columna hacia un lado y se reemplazará por un cubreobjetos procurando que en este proceso no se introduzcan burbujas de aire en la cámara. Se colocará la cámara suavemente en el microscopio. Las cámaras abiertas no se deben mover, ya que las algas sedimentadas se pueden desplazar.



- Se observará la cámara con un objetivo de pocos aumentos. Si no se ha conseguido una distribución uniforme, hay que preparar una nueva submuestra.
- Si se observan, con el objetivo de menos aumentos, muchos organismos flotando en la parte superior de la cámara (cianobacterias o *Botryococcus*), preparar de nuevo la muestra añadiendo de 5 a 10 gotas de ácido acético glacial directamente sobre la muestra antes de la homogeneización, o bien utilizar alguna otra técnica, de las señaladas en la norma UNE-EN 15204:2007, para solucionar este problema.

Concentración o dilución de las muestras

- En aguas con densidad de algas muy baja (aguas ultra-oligotróficas), se recomienda concentrar la muestra. Normalmente, 250 mL es suficiente. El método más utilizado consiste en dejar sedimentar la muestra en cilindros de sedimentación graduados que se mantienen a oscuras y a temperatura ambiente constante durante 3 días. Posteriormente se eliminará el agua sobrenadante hasta dejar 25 mL en el fondo del cilindro.
- En aguas con densidad de algas elevada (aguas eutróficas e hipereutróficas) donde la sedimentación de 5 mL de muestra da lugar a una concentración de fitoplancton demasiado elevada para su recuento, es necesario diluir la muestra antes de su sedimentación. Para ello se añadirá, a un volumen conocido de submuestras, la cantidad necesaria de agua con lugol. Se utilizará agua del grifo, mejor que agua destilada, para que los procesos osmóticos no afecten a la morfología celular.

7.3. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

Antes de empezar los recuentos debe hacerse un inventario de los taxones presentes explorando la muestra a varios aumentos.

La identificación de los taxones se realizará preferentemente con el apoyo de las claves y guías elaboradas por la DGA a tal efecto (ID-TAX). 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). TAXAGUA proporciona información de interés sobre las propiedades de los diferentes taxones, sinónimos, nombre aceptado actualmente, etc.

Se identificarán los taxones encontrados hasta el nivel taxonómico más preciso posible (género o especie), pero hay que tener en cuenta que es mejor identificar correctamente a un nivel superior que hacer una identificación errónea a un nivel inferior. Se codificará a las especies según el código TAXAGUA.

La muestra de fitoplancton de red recogida en el muestreo puede ayudar, si es necesario, a la identificación de algunos taxones del microplancton (>20 µm) poco abundantes en la muestra sedimentada.

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 especies en las muestras de referencia se recomienda contar con el apoyo de expertos, así como para la verificación de los taxones encontrados que susciten dudas.

7.4. RECUENTO DE CÉLULAS

Proceso de recuento

La estrategia del área de la cámara a contar depende de la composición del fitoplancton de la muestra. Siempre habrá que contar los taxones de menor tamaño a muchos aumentos, en campos elegidos al azar (ver apartado sobre calibración del equipo). Los organismos de mayor tamaño deberán ser contados en transectos, a menos aumentos. Si hay taxones de gran tamaño a veces es necesario realizar un recuento de toda la cámara, a bajos aumentos.



A la hora de hacer los recuentos hay que tener en cuenta las siguientes normas:

- Las células vacías (ej.: diatomeas, *Dinobryon*) no se contarán.
- Los organismos que presenten la propiedad nutrición heterótrofos (consultar TAXAGUA), sí se contarán, aunque no se tienen en cuenta para el cálculo de las métricas.
- Los taxones típicos del bentos, muy abundantes en aguas someras, sí se contarán.
- El picoplancton (< 2 µm) que forma colonias (ej. *Aphanothece*) sí se contará.
- El picoplancton unicelular (< 2 µm) no se contará, en tanto no se desarrollen protocolos específicos al efecto.
- Los heterocistes y acinetos de las cianobacterias nostocales deben contarse, y, si son muy abundantes, es conveniente separarlos en grupos diferentes al del resto de células.
- Para estimar el número de células por colonia o cenobio, es necesario contar el número total de células de la colonia, si se puede. Si la colonia es muy grande (ej. *Microcystis*), se estimará el número de células contando las células en un área restringida (subcolonia) a 400x o más aumentos. Luego se estimará el número de subcolonias, de tamaño similar, que existen en el campo de recuento. Finalmente se multiplicará el número de células de la subcolonia por el número de subcolonias del campo.
- Para estimar el número de células por filamento, se contarán directamente, si es posible. Si no es posible porque no se pueden diferenciar células o se están contando transectos, medir la longitud de los filamentos. Sólo se medirá la parte de los filamentos que entra dentro del campo de recuento o transecto. En el recuento por transectos, si hay muchos filamentos, se pueden contar y estimar la longitud media de los filamentos midiendo la longitud de al menos 30. Si a muchos aumentos es posible diferenciar las células (ej. *Aphanizomenon*), se calculará la media del número de células por unidad de longitud (ej. 20 µm) contando las células que hay en al menos 20 filamentos. Posteriormente se calculará el número de células contadas multiplicando el número medio de células en la unidad de longitud por la longitud de los filamentos contados. Si no es posible diferenciar células a muchos aumentos (ej. *Planktothrix*) se dará el resultado en longitud de filamentos (en µm).

Recuento por campos

Los organismos pequeños (aproximadamente < de 20 µm) se contarán a 400x o más aumentos, en campos de recuentos seleccionados al azar. El objetivo es contar de 50 a 100 campos de forma que, asumiendo la concentración de la muestra recomendada (ver en apartado 7.2, preparación de las submuestras), tras el recuento total se consigan al menos 400 organismos. Al seleccionar los campos a contar, no se mirará a través de los oculares, para asegurarse de que la selección se hace al azar.

Se aplicarán criterios estándar sobre los organismos que cruzan los campos de recuento, de forma que por ejemplo, se cuenten los individuos que toquen arriba y a la derecha pero no abajo y a la izquierda del campo o cuadrícula. En cuanto a las colonias y filamentos, se tomará como criterio no tener en cuenta las células que quedan fuera del campo de recuento.

Los resultados, para cada uno de los taxones, se expresarán en número de células (o en µm de filamento, en el caso de los filamentos en los que no se pueden diferenciar las células, como se explica en el apartado *Proceso de recuento*), por unidad de volumen de muestra, según la siguiente fórmula:

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

Donde:

- N** = número de células en la muestra (cel/mL)
- X** = número medio de células contadas por campo
- A** = área de la cámara
- v** = volumen de muestra sedimentado en la cámara
- a** = área del campo óptico o de la cuadrícula utilizada



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

Recuento por transectos

Los organismos que no se hayan contado en el recuento por campos, se contarán a 200x-250x aumentos en 2 transectos que recorran el diámetro de la cámara, independientemente del número de individuos contados.

Si se ha usado el objetivo de 100x con aceite de inmersión en el recuento anterior, se limpiará bien la base de la cámara con etanol al 96 % para poder tener una correcta visión de los organismos a aumentos inferiores.

Es conveniente utilizar la cuadrícula del ocular (o la pantalla del ordenador). Hay que aplicar un criterio para las algas que quedan cortadas por las líneas del transecto. Por ejemplo, contar las que quedan arriba (o a la derecha, si se trata de un transecto vertical) y no contar las que cortan la línea de abajo (o de la izquierda).

Los resultados, para cada uno de los taxones, se calcularán aplicando la fórmula del apartado anterior, donde "a" es el área del transecto y X el número medio de células contadas por transecto.

Recuento de la cámara completa

Cuando no se haya llegado, en el recuento por transectos, a un recuento de 40 individuos en los taxones de gran tamaño (como *Ceratium*, colonias grandes de cianobacterias, etc), se contará la cámara entera. Esto se hará a 40-100x siguiendo transectos horizontales o verticales que cubran todo el área de la cámara. Para calcular el número de células por colonia se seguirán los pasos explicados en el apartado "Proceso de recuento". Se seguirán los mismos criterios del apartado anterior para los organismos que cortan las líneas de los transectos.

Los resultados, para cada uno de los taxones, se expresarán en número de células por unidad de volumen de muestra, según la siguiente fórmula:

$$N = X * d / v$$

Donde:

N = número de células en la muestra (cel/mL)

X = número de células contadas

v = volumen de muestra sedimentado en la cámara

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

7.5. CÁLCULO DEL BIOVOLUMEN

Para facilitar el cálculo de biovolúmenes y asegurar la calidad de la información generada se han estandarizado biovolúmenes medios para algunas especies de fitoplancton. Estos valores pueden obtenerse en TAXAGUA.

Como norma general, para calcular el biovolumen se utilizará de forma preferente la información asociada a TAXAGUA. En caso de que esta información no esté disponible se podrá recurrir a las siguientes alternativas:

- Utilizar biovolúmenes de la bibliografía.
- Calcular los biovolúmenes celulares de las especies en cada masa de agua.



Para conocer el biovolumen por mL de cada especie en la muestra (expresado en mm^3/l) se multiplicará el biovolumen (estándar o calculado para cada especie) por el número de células/ml obtenido en el recuento. En el caso de los filamentos en los que no se pueden diferenciar las células (ver apartado *Proceso de recuento*) se multiplicará el área de la sección del filamento por la longitud de filamentos obtenida en el recuento.

Cálculo del biovolumen celular

Cuando resulte necesario calcular el biovolumen celular (o el área de la sección del filamento, en el caso de los filamentos en los que no se pueden diferenciar las células, como se explica en el apartado *Proceso de recuento*) se seguirán los siguientes criterios:

- Asignar a cada especie la figura geométrica indicada en TAXAGUA.
- Medir las dimensiones apropiadas.
- Aplicar la fórmula correspondiente (indicada en TAXAGUA) para calcular el biovolumen y los factores de corrección en caso de que procedan.

Las medidas de las dimensiones requeridas (longitud, anchura, diámetro) se realizarán a los aumentos apropiados, utilizando un micrómetro ocular calibrado o un programa de análisis de imagen. Se medirá como mínimo 20 individuos de cada especie. El volumen celular de cada especie se calculará como la media de los biovolúmenes individuales resultantes de aplicar las dimensiones lineales en la fórmula asociada a la figura geométrica correspondiente.

Normas a tener en cuenta:

- En las especies con esqueletos externos mucho mayores que el contenido celular (ejemplo *Dinobryon*), únicamente hay que medir el contenido orgánico (plasma) de la célula, no el esqueleto externo.
- Para estimar el biovolumen de los filamentos, se seguirá el método de recuento que se describe en el apartado anterior y, si se ha calculado el número de células, se multiplicará este número por el biovolumen celular. Si no se ha podido calcular el número de células, se calculará el área de la sección de los filamentos y se multiplicará por la longitud de filamentos calculada en el recuento.
- Los heterocistes y acinetos de las cianobacterias nostocales, si son muy abundantes y se han contado en grupos separados, han de ser medidos para estimar el biovolumen celular de cada tipo de célula.

8. PROCESADO DE LOS DATOS

Los datos de los análisis correspondientes a la muestra se incluirán en la hoja de resultados facilitada en el anexo I.

9. PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO DE MÉTRICAS

En los apartados siguientes se facilitan los procedimientos de cálculo aplicables a cada una de las métricas en lagos y embalses para la clasificación del estado / potencial ecológico de las masas de agua.

Las métricas aplicables a embalses son concentración de clorofila *a*, biovolumen total de fitoplancton, porcentaje de cianobacterias e índice de grupos algales (IGA).

Las métricas aplicables a lagos son concentración de clorofila *a* y biovolumen total de fitoplancton.

Es necesario señalar que los resultados obtenidos del análisis en laboratorio del fitoplancton consistirán en dos analíticas correspondientes a los dos muestreos realizados en el período estival, tal y como indica el protocolo de muestreo. Por tanto es necesario integrar los resultados de cálculo



de las métricas en cada muestra para dar un valor anual. Para ello se realizará la media de los valores de las métricas obtenidas en cada uno de los análisis.

9.1. CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA A

La concentración anual de clorofila *a* expresada en mg/m³, será la media de los valores de este parámetro obtenidos en los análisis llevados a cabo según el apartado 6 en las muestras recogidas en los dos muestreos anuales realizados según el protocolo de muestreo (M-LE-FP-2013).

9.2. BIOVOLUMEN TOTAL DE FITOPLANCTON

La estimación del Biovolumen total, para cada una de las muestras, se realizará integrando todos los taxones de fitoplancton identificados y analizados según el apartado 7. Para ello se llevará a cabo el sumatorio de los biovolúmenes de los taxones (BIOVOLMUES⁷) de fitoplancton determinados en la muestra y analizados de acuerdo al apartado 7. En este biovolumen no se incluirán los taxones que presentan la propiedad nutrición heterótrofa en TAXAGUA.

El biovolumen total anual (expresado en mm³/l) será la media de los valores de biovolumen total obtenidos en los análisis de los dos muestreos anuales.

9.3. PORCENTAJE DE CIANOBACTERIAS (SOLO PARA EMBALSES)

Los valores relativos al porcentaje de Cianobacterias se calcularán en función del biovolumen correspondiente a los taxones del filo Cyanobacteria de la muestra (excluidos el orden Chroococcales excepto los géneros *Microcystis* y *Woronichinia*) y el biovolumen total, según la siguiente fórmula:

$$\% \text{CIANO} = \left(\frac{\text{BVOL}_{\text{CIA}} - [\text{BVOL}_{\text{CHR}} - (\text{BVOL}_{\text{MIC}} + \text{BVOL}_{\text{WOR}})]}{\text{BVOL}_{\text{TOT}}} \right) \times 100$$

Donde:

ABREVIATURA	SIGNIFICADO	GRUPO TAXONÓMICO	SISTCODSUP TAXAGUA
BVOL _{CIA}	Biovolumen de cianobacterias	Cyanobacteria	CYA001FILO
BVOL _{CHR}	Biovolumen de Chroococcales	Chroococcales	CHR003ORDE
BVOL _{MIC}	Biovolumen de <i>Microcystis</i>	<i>Microcystis</i>	MIC003GENE
BVOL _{WOR}	Biovolumen de <i>Woronichinia</i>	<i>Woronichinia</i>	WOR001GENE
BVOL _{TOT}	Biovolumen total de fitoplancton		

El valor anual del porcentaje de cianobacterias será la media de los valores obtenidos para este parámetro en las muestras correspondientes a los dos muestreos anuales.

9.4. ÍNDICE DE GRUPOS ALGALES (IGA) (SOLO PARA EMBALSES)

Datos de partida

El cálculo del IGA (Índice de Grupos Algales, Catalán⁸ 2003) se basa en las proporciones de biovolúmenes de los distintos grupos del fitoplancton presentes en la muestra respecto al biovolumen total, que se obtienen por el procedimiento descrito en el apartado 7. En este biovolumen no se incluirán los taxones heterótrofos (consultar TAXAGUA).

El cálculo se realizará aplicando la siguiente fórmula:

⁷ Código empleado en la Base de datos de la Dirección General del Agua.

⁸ Catalán, J., M. Ventura, A. Munné & L. Godé. 2003. *Desenvolupament d'un index integral de qualitat ecològica i regionalització ambiental dels sistemes lacustres de Catalunya*. Agència Catalana del Aigua. Generalitat de Catalunya.

<http://mediambient.gencat.net/aca/ca/planificacio/directiva/treballs.jsp#D>



$$IGA = \frac{[1 + 0,1Cr + Cc + 2(Dc + Chc) + 3Vc + 4Cia]}{[1 + 2(D + Cnc) + Chnc + Dnc]}$$

Donde:

ABREVIATURA	GRUPO TAXONÓMICO	SISTCODSUP TAXAGUA
Cr	Criptófitos	CRY001FILO
Cc	Crisofíceas coloniales*	CHR001CLAS
Dc	Diatomeas coloniales*	BAC001FILO
Chc	Clorococales coloniales*	CHL002ORDE
Vc	Volvocales coloniales*	VOL001ORDE
Cia	Cianobacterias	CYA001FILO
D	Dinoflagelados	DIN001FILO
Cnc	Crisofíceas no coloniales*	CHR001CLAS
Chnc	Clorococales no coloniales*	CHL002ORDE
Dnc	Diatomeas no coloniales*	BAC001FILO

* La propiedad Colonial / no colonial se obtendrá de TAXAGUA

Cada grupo algal debe ir expresado como el porcentaje de biovolumen que representa sobre el biovolumen total de fitoplancton⁹.

El valor del IGA será la media de los valores obtenidos para este índice en las muestras recogidas en los dos muestreos anuales realizados según el protocolo de muestreo de fitoplancton (M-LE-FP-2013).

10. PROCEDIMIENTO PARA LA COMBINACIÓN DE MÉTRICAS DE FITOPLANCTON EN LAGOS

10.1. CÁLCULO DEL RATIO DE CALIDAD ECOLÓGICA (RCE)

Los valores del Ratio de Calidad Ecológica (RCE) de las métricas concentración de clorofila *a* y biovolumen total de fitoplancton se calcularán de forma inversa al procedimiento general, es decir, como la relación entre la condición de referencia (CR) y el valor de la métrica obtenido.

- Cálculo para concentración de clorofila *a* (CONCLOa):

$$RCE = \frac{(1/CONCLOa)}{(1/CR_CONCLOa)}$$

- Cálculo para biovolumen total (BVOL_{TOT}):

$$RCE = \frac{(1/BVOL_{TOT})}{(1/CR_BVOL_{TOT})}$$

Se utilizarán los valores de las Condiciones de Referencia (CR) de las métricas, para cada tipo de masa de agua, recogidos en la legislación.

10.2. TRANSFORMACIÓN DEL RCE A ESCALAS NUMÉRICAS EQUIVALENTES

Los valores de RCE obtenidos se deben transformar a escalas numéricas equivalentes para normalizarlos a una escala lineal común.

Los RCE transformados se obtendrán mediante la aplicación de la siguiente fórmula, que no es más que una interpolación lineal entre los límites de cambio de clase de estado de los Ratios de Calidad

⁹ En caso de que la suma de biovolúmenes de los grupos taxonómicos contemplados en el IGA no llegue a representar el 70% del biovolumen total de fitoplancton de la muestra, se descarta el cálculo de la métrica para la clasificación del estado ecológico.



Ecológica establecidos en condiciones de referencia para cada indicador, y los que se corresponden con una escala lineal.

$$RCE_trans = Val.trans_i + (RCE - Val_i) \times \frac{(Val.trans_s - Val.trans_i)}{Val_s - Val_i}$$

Donde:

- RCE_trans = Ratio de Calidad Ecológica transformado
- RCE = Ratio de Calidad Ecológica sin transformar
- Val.trans_i = Valor de RCE de cambio de clase de estado ecológico inferior transformado
- Val_i = Valor de RCE de cambio de clase de estado ecológico inferior sin transformar
- Val.trans_s = Valor de RCE de cambio de clase de estado ecológico superior transformado
- Val_s = Valor de RCE de cambio de clase de estado ecológico superior sin transformar

Se utilizarán para cada tipo de masa de agua los valores del Ratio de Calidad Ecológica (RCE) de las métricas recogidos en la legislación, con los que se comparará el RCE sin transformar de la muestra. Se considerará el RCE de cambio de clase de estado ecológico sin transformar inferior al RCE de la muestra, que se denomina en la fórmula como (Val_i). Los valores de RCE de cambio de clase de estado ecológico superior sin transformar (Val_s) –que constituyen el límite superior de una clase de estado ecológico- se calcularán como el valor inmediatamente inferior con 2 decimales de los valores del RCE de cambio de clase de estado ecológico inferior sin transformar, recogidos en la legislación.

Para el cálculo, se utilizarán los valores de RCE de cambio de clase de estado ecológico superior transformado (Val.trans_s) y de RCE de cambio de clase de estado ecológico inferior transformado (Val.trans_i) que figuran en la tabla siguiente.

CLASE DE ESTADO	VALORES DE RCE DE CAMBIO DE CLASE DE ESTADO ECOLÓGICO SUPERIOR TRANSFORMADO	VALORES DE RCE DE CAMBIO DE CLASE DE ESTADO ECOLÓGICO INFERIOR TRANSFORMADO
MUY BUENO	1,00	0,80
BUENO	0,79	0,60
MODERADO	0,59	0,40
DEFICIENTE	0,39	0,20
MALO	0,19	0,00

10.3. COMBINACIÓN DE RCE TRANSFORMADOS PARA LA CLASIFICACIÓN DEL ESTADO ECOLÓGICO

La combinación de los RCE transformados de los indicadores para la clasificación del estado ecológico del elemento de calidad composición, abundancia y biomasa de fitoplancton se realizará utilizando la siguiente fórmula:

$$RCE\ trans\ final = 0,75\ RCE_trans\ (CONCLOa) + 0,25\ RCE_trans\ (BVOL_{TOT})$$

El valor final de la combinación de los RCE transformados (*RCE trans final*) se utilizará para la clasificación del estado ecológico, de acuerdo a la escala de clases de estado ecológico indicada en la tabla del apartado anterior.

11. PROCEDIMIENTO PARA LA COMBINACIÓN DE MÉTRICAS DE FITOPLANCTON EN EMBALSES (MARSP)

11.1. CÁLCULO DEL RATIO DE CALIDAD ECOLÓGICA (RCE)

Los valores del Ratio de Calidad Ecológica (RCE) de las métricas concentración de clorofila *a*, biovolumen total de fitoplancton, Índice de Grupos Algales y porcentaje de cianobacterias se



calcularán de forma inversa al procedimiento general, es decir, como la relación entre los valores de máximo potencial ecológico (MPE) y el valor de la métrica obtenido.

- Cálculo para concentración de clorofila a (*CONCLOa*):

$$RCE = \frac{(1/CONCLOa)}{(1/MPE_CONCLOa)}$$

- Cálculo para biovolumen total (*BVOL_{TOT}*):

$$RCE = \frac{(1/BVOL_{TOT})}{(1/MPE_BVOL_{TOT})}$$

- Cálculo para el Índice de Grupos Algales (*IGA*):

$$RCE = \frac{(400 - IGA)}{(400 - MPE_IGA)}$$

- Cálculo para el porcentaje de cianobacterias (*%CIANO*):

$$RCE = \frac{(100 - \%CIANO)}{(100 - MPE_ \%CIANO)}$$

Si en alguna de estas transformaciones el RCE obtenido es mayor de 1, el valor de RCE que se considera es 1.

Se utilizarán, para cada tipo de masa de agua y cada métrica, los valores de Máximo Potencial Ecológico (MPE) recogidos en la legislación.

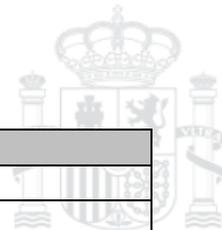
11.2. TRANSFORMACIÓN DEL RCE A ESCALAS NUMÉRICAS EQUIVALENTES

Es necesario llevar a cabo la transformación de los valores de RCE obtenidos mediante el procedimiento descrito en el apartado anterior a una escala numérica equivalente para los cuatro indicadores, de acuerdo con el siguiente procedimiento.

Las ecuaciones para llevar a cabo esta transformación varían en función del tipo de embalse y los valores de Ratio de Calidad Ecológica (RCE) de las métricas recogidos en la legislación. Son las que se indican a continuación:

Tipos 1, 2 y 3

Clorofila a	
RCE > 0,21	$RCE_{trans} = 0,5063 \times RCE + 0,4937$
RCE ≤ 0,21	$RCE_{trans} = 2,8571 \times RCE$
Biovolumen	
RCE > 0,19	$RCE_{trans} = 0,4938 \times RCE + 0,5062$
RCE ≤ 0,19	$RCE_{trans} = 3,1579 \times RCE$
% Cianobacterias	
RCE > 0,91	$RCE_{trans} = 4,4444 \times RCE - 3,4444$
RCE ≤ 0,91	$RCE_{trans} = 0,6593 \times RCE$



Índice de Grupos Algaes (IGA)	
RCE >0,9737	$RCE_{trans} = 15,234 \times RCE - 14,233$
RCE ≤ 0,9737	$RCE_{trans} = 0,6162 \times RCE$

Tipos 4 y 5

Clorofila a	
RCE >0,25	$RCE_{trans} = 0,5333 \times RCE + 0,4667$
RCE ≤ 0,25	$RCE_{trans} = 2,4 \times RCE$

Biovolumen	
RCE >0,248	$RCE_{trans} = 0,5316 \times RCE + 0,4684$
RCE ≤ 0,248	$RCE_{trans} = 2,4234 \times RCE$

% Cianobacterias	
RCE >0,647	$RCE_{trans} = 1,1318 \times RCE - 0,1318$
RCE ≤ 0,647	$RCE_{trans} = 0,928 \times RCE$

Índice de Grupos Algaes (IGA)	
RCE >0,897	$RCE_{trans} = 3,8929 \times RCE - 2,8929$
RCE ≤ 0,897	$RCE_{trans} = 0,6687 \times RCE$

Tipos 6 y 12

Clorofila a	
RCE >0,195	$RCE_{trans} = 0,497 \times RCE + 0,503$
RCE ≤ 0,195	$RCE_{trans} = 3,075 \times RCE$

Biovolumen	
RCE > 0,175	$RCE_{trans} = 0,4851 \times RCE + 0,5149$
RCE ≤ 0,175	$RCE_{trans} = 3,419 \times RCE$

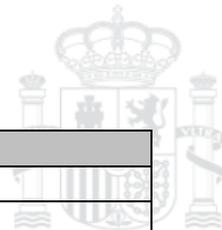
% Cianobacterias	
RCE > 0,686	$RCE_{trans} = 1,2726 \times RCE - 0,2726$
RCE ≤ 0,686	$RCE_{trans} = 0,875 \times RCE$

Índice de Grupos Algaes (IGA)	
RCE > 0,929	$RCE_{trans} = 5,6325 \times RCE - 4,6325$
RCE ≤ 0,929	$RCE_{trans} = 0,6459 \times RCE$

Tipos 7, 8, 9, 10 y 11

Clorofila a	
RCE >0,43	$RCE_{trans} = 0,7018 \times RCE + 0,2982$
RCE ≤ 0,43	$RCE_{trans} = 1,3953 \times RCE$

Biovolumen	
RCE >0,36	$RCE_{trans} = 0,625 \times RCE + 0,375$
RCE ≤ 0,36	$RCE_{trans} = 1,6667 \times RCE$



% Cianobacterias	
RCE > 0,72	$RCE_{trans} = 1,4286 \times RCE - 0,4286$
RCE ≤ 0,72	$RCE_{trans} = 0,8333 \times RCE$

Índice de Grupos Algaes (IGA)	
RCE > 0,9822	$RCE_{trans} = 22,533 \times RCE - 21,533$
RCE ≤ 0,9822	$RCE_{trans} = 0,6108 \times RCE$

Tipo 13

Clorofila a	
RCE > 0,304	$RCE_{trans} = 0,575 \times RCE + 0,425$
RCE ≤ 0,304	$RCE_{trans} = 1,9714 \times RCE$

Biovolumen	
RCE > 0,261	$RCE_{trans} = 0,541 \times RCE + 0,459$
RCE ≤ 0,261	$RCE_{trans} = 2,3023 \times RCE$

% Cianobacterias	
RCE > 0,931	$RCE_{trans} = 5,7971 \times RCE - 4,7971$
RCE ≤ 0,931	$RCE_{trans} = 0,6445 \times RCE$

Índice de Grupos Algaes (IGA)	
RCE > 0,979	$RCE_{trans} = 18,995 \times RCE - 17,995$
RCE ≤ 0,979	$RCE_{trans} = 0,6129 \times RCE$

RCE = Ratio de Calidad Ecológico

RCE_{trans} = Ratio de Calidad Ecológica transformado

Los valores de los RCE transformados se clasificarán de acuerdo a la siguiente tabla:

CLASE DE ESTADO	LÍMITES DE CAMBIO DE CLASE DE ESTADO RCE TRANSFORMADO
MUY BUENO / BUENO	0,80
BUENO / MODERADO	0,60
MODERADO / DEFICIENTE	0,40
DEFICIENTE / MALO	0,20

11.3. COMBINACIÓN DE RCE TRANSFORMADOS PARA LA CLASIFICACIÓN DEL POTENCIAL ECOLÓGICO

La combinación de los valores de las métricas transformados se realizará utilizando la siguiente fórmula:

$$MASRP = \frac{\left(\frac{RCEn(Clo) + RCEn(BV)}{2} + \frac{RCEn(IGA) + RCEn(Cia\%)}{2} \right)}{2}$$

Dicha ecuación será aplicable siempre y cuando se disponga de datos de al menos una de las métricas relativa a la biomasa y al menos una de las métricas relativa a la composición.

El valor final de la combinación de los valores de las métricas transformados (*MARS*P) se utilizará para la clasificación del estado ecológico de acuerdo a la escala de clases de estado ecológico indicada en la tabla del apartado anterior.

ANEXO I: HOJA DE RESULTADOS





MINISTERIO
DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN
Y MEDIO AMBIENTE

HOJA DE RESULTADOS: FITOPLANCTON EN LAGOS Y EMBALSES

NOMBRE DEL LABORATORIO:		CÓDIGO ENTIDAD COLABORADORA: EC - /	
ANALISTA:		FECHA DE ANÁLISIS: __/__/__	
REFERENCIAS IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA	CLAVE:	BIBLIOGRAFÍA:	
CÓDIGO MASA DE AGUA	NOMBRE DE LA MASA DE AGUA:		
CÓDIGO MUESTRA	FECHA DE MUESTREO: __/__/__		
OBSERVACIONES:			

CLOROFILA

	RESULTADOS MUESTRA
Organismo / empresa	
Analista	
Fecha análisis	
Volumen agua filtrado (l)	
Volumen extracto (ml)	
Paso óptico de cubeta (cm)	
Absorbancia a 630 nm	
Absorbancia a 647 nm	
Absorbancia a 664 nm	
Absorbancia a 750 nm	
Concentración clorofila	

FITOPLANCTON

	RESULTADOS MUESTRA
Organismo / empresa	
Analista	
Fecha análisis	
Volumen de muestra sedimentado (ml)	
Factor de dilución	
Factor de concentración	



BIOVOLUMEN (mm ³ /l)		
GRUPOS IGA	CÓDIGO TAXAGUA	RESULTADOS MUESTRA
Cianobacterias*	CYA001FILO	
Diatomeas coloniales	BAC001FILO	
Criptofitos	CRY001FILO	
Crisoficeas coloniales	CHR001CLAS	
Clorococales coloniales	CHL002ORDE	
Volvocales coloniales	VOL001ORDE	
Dinoflagelados	DIN001FILO	
Crisoficeas no coloniales	CHR001CLAS	
Clorococales no coloniales	CHL002ORDE	
Diatomeas no coloniales	BAC001FILO	
Biovolumen total		

* Excluir el orden Chroococcales excepto los géneros *Microcystis* y *Woronichinia*.
La propiedad colonial / no colonial se obtiene de TAXAGUA

RESULTADOS DE LAS VARIABLES FISICOQUÍMICAS DETERMINADAS EN LABORATORIO	
	RESULTADOS MUESTRA
Fósforo total (mg P/L)	
Nitrógeno total (mg N/L)	
Fosfatos (mg PO ₄ /L)	
Amonio total (mg NH ₄ /L)	
Nitratos (mg NO ₃ /L)	
Alcalinidad (mg CaCO ₃ /L)	

RESULTADOS DE LAS MÉTRICAS EN EL AÑO			
RESULTADOS MÉTRICAS	RESULTADOS MUESTRA 1	RESULTADOS MUESTRA 2	RESULTADO FINAL
CONCENTRACIÓN CLOROFILA			
BIOVOLUMEN TOTAL FITOPLANCTON			
INDICE DE GRUPOS ALGALES (IGA)			
PORCENTAJE DE CIANOBACTERIAS			