

5. METODOLOGÍA DE TOMA DE MUESTRAS Y ANÁLISIS

La metodología de toma de muestras y análisis de aguas, sedimentos y biota puede estar soportada en normas diversas, muchas de ellas editadas por organismos internacionales de reconocido prestigio, o bien se pueden utilizar procedimientos propios previa validación de los mismos por parte de la entidad actuante.

En este apartado se expone una breve reseña de los métodos utilizados para la ejecución de los trabajos incluidos en la red de control de zonas húmedas de Andalucía, que viene ejecutando la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía.

Igualmente válida puede ser cualquier otra metodología que cumpla los requerimientos comentados en el primer párrafo, siendo recomendable, además, que tanto la toma de muestras como los análisis se encuentren acreditados, como garantía de competencia técnica del organismo que realiza los trabajos.

5.1 Toma de muestras

En cada una de las estaciones de muestreo se obtuvieron muestras de agua y de sedimento, para la determinación de parámetros biológicos y físico-químicos.

Para la determinación de amonio, nitratos, nitrógeno total, fósforo total y fosfatos se extrajeron muestras de 250 mL de agua, que fueron envasadas en recipientes de vidrio topacio y conservadas con ácido sulfúrico.

Se recogió 1L de agua para la determinación de sólidos en suspensión y se almacenó en botellas de vidrio topacio. Para la determinación de clorofila a se recogió 1L de agua envasándose en una botella de polietileno.

Las muestras de sedimento para el análisis de metales y materia orgánica se almacenaron en botes tipo duquesa de 500 mL.

Para los análisis de fitoplancton se extrajeron dos tipos de muestras de agua: una de



1L fijada con solución Lugol-acético para la determinación de densidad algal (análisis cuantitativo) y otra de 250 mL fijada con formaldehído al 40% para la identificación de especies (análisis cualitativo). Esta última fue previamente filtrada, utilizándose para ello, una manga de fitoplancton con red de nylal y luz de malla de 20 micras. Ambos tipos de muestras fueron envasadas en recipientes de vidrio topacio.

Para el fitobentos el sustrato idóneo son las rocas, en segundo lugar los sustratos artificiales y en tercer lugar las macrófitas. El sedimento fino es el sustrato más inadecuado. Puesto que en los humedales lo frecuente es que el fondo se componga de sedimentos finos, muy inapropiados, se propone tanto muestrear sobre helófitos como la colocación de sustratos artificiales. El muestreo en helófitos se hará simultáneamente a la colocación de los sustratos. Esto garantiza que se disponga de muestra en caso de pérdida, deterioro o extravío del sustrato artificial. Además, servirá para comprobar qué método proporciona mejores resultados. Para ello se clava una estaca con el sustrato de colonización en el sedimento del humedal, en una zona accesible, bien iluminada, donde la profundidad no supere 1m. Transcurrido un periodo de tiempo de al menos un mes se recoge el sustrato y se extraen las algas por cepillado.

Con el zooplancton se presenta un problema adicional al del fitoplancton y es la capacidad de migración vertical que tienen las poblaciones, por lo que, para garantizar que la muestra recogida es representativa de la comunidad de zooplancton que habita la laguna, se realiza una pesca vertical siguiendo los mismos pasos que con el fitoplancton. En un bote duquesa de 150 ml se recoge un volumen de agua filtrada suficiente para cubrir la malla con el concentrado que se va a conservar en este frasco. Ésta se fija con formol puro hasta alcanzar el 4%, se procurará añadir primero unas pequeñas gotas y finalmente todo el contenido de la pipeta. La técnica utilizada para mantener la estructura del organismo impidiendo que se contraiga para su correcta identificación, es recoger la muestra con agua carbonatada (en aquellos casos que sea posible).

Las muestras de sedimentos destinadas al estudio de macroinvertebrados fueron obtenidas mediante draga tipo Eckman en aquellas lagunas donde la lámina de agua consistía de unos pocos centímetros (Lagunas interdunares de cabo Trafalgar y Laguna de La Paja) o bien se permitía el acceso a pie desde la orilla (Cola del

embalse de Arcos); y, mediante una draga van Veen para las extracciones en profundidad (resto de lagunas).

La superficie de muestreo de la draga Van Veen es de 0,05 m² y 0,023 m² para la draga Eckman. En cada una de las lagunas se tomaron tres réplicas de sedimento, que tras ser tamizadas "in situ", fueron envasadas en botes de 1L de polietileno y fijadas con formaldehído (al 10%) más colorante Rosa de Bengala.

Todas las muestras fueron preservadas en campo, refrigeradas a temperatura inferior a 4°C y enviadas inmediatamente al laboratorio en idénticas condiciones.

5.2 Métodos de análisis

Determinaciones fisicoquímicas

Determinación de pH (EPA 150.1)

La fuerza electromotriz producida en el sistema de electrodos varía linealmente con el pH. Esta relación lineal se establece comparando la fuerza electromotriz con el pH de diferentes tampones. El valor de pH de la muestra se determina por interpolación.

Determinación de conductividad (S.M. 2510 A y B) // salinidad (SM 2520 A y B)

Dos electrodos de igual superficie, mantenidos paralelos a una distancia determinada y sumergidos en una solución ofrecen una resistencia al paso de la corriente. Esta resistencia es directamente proporcional a la longitud de la columna de agua e inversamente proporcional a su sección.

La conductividad eléctrica de una muestra es la conductancia (inversa de la resistencia) de una columna de agua comprendida entre dos electrodos metálicos de un centímetro cuadrado de superficie y separados entre si un centímetro.

El valor de salinidad se calcula partir del resultado de conductividad, utilizando la Escala de Salinidad Práctica. Esta escala se realizó a partir de una solución de KCl. Una muestra de agua de mar con una conductividad a 15°C igual a la de una solución de KCL que contiene una masa de 32,4356 g en 1 kg de solución, se define como poseedora de una salinidad de 35. Indicar que el valor de salinidad así expresado es

adimensional.

Determinación de oxígeno disuelto (ITG-M-013)

La diferencia de potencial entre dos electrodos sumergidos en la muestra causada por un voltaje externo, hace que el oxígeno que pasa a través de una membrana porosa se reduzca en el cátodo; produciendo una corriente eléctrica proporcional a la presión parcial del oxígeno en ella,

Determinación de temperatura (EPA 170.1)

La temperatura en la muestra es proporcional a la variación en el valor de la resistencia de un termistor. Los valores se obtienen por interpolación.

Determinación de Transparencia (ITG-M-061)

Una muestra de agua que contiene sustancias no disueltas atenua la radiación incidente. Además las particular insolubles presentes difunden la radiación de forma desigual en todas direcciones.

Se introduce un disco de transparencia en el agua. A la profundidad de extinción de este se le denomina transparencia; siendo un método semicuantitativo de determinar la cantidad de elementos insolubles presentes.

Determinación de nitratos en muestras acuosas (EPA 353.2)



La muestra es pasada a través del sistema de flujo en el que se ha colocado una columna de reducción de cadmio con lo cual el nitrato presente en la muestra se reduce a nitrito. El nitrito, el presente originalmente en la muestra más el nitrito producido a partir del nitrato reducido, en medio ácido, provoca la reacción de diazotación con la sulfanilamida para

formar la sal de diazonio. Ésta se transforma en un producto coloreado rosa-púrpura adecuado para su cuantificación colorimétrica por reacción con el N-1-naftil-

etilendiamina-diclorhidrato. La medida de la absorbancia se realizará a 550 nm

Determinación de nitritos en muestras acuosas (EPA 353.2)

El nitrito de la muestra, en medio ácido, provoca la reacción de diazotación con la sulfanilamida para formar la sal de diazonio. Ésta se transforma en un producto coloreado rosa-púrpura adecuado para su cuantificación colorimétrica por reacción con el N-1-naftil-etilendiamina-diclorhidrato. La medida de la absorbancia se realizará a 550 nm

Determinación de fosfato en muestras acuosas (EPA 365.4)

El molibdato amónico y el tartrato de potasio-antimonio reaccionan con el ion fosfato en medio ácido para dar lugar a un complejo antimonio-fosfomolibdato. Éste, tras la reducción por el ácido ascórbico, produce un intenso color azul adecuado para su determinación fotométrica. La medida de la absorbancia se realizará a 880 nm.

Determinación de amonio en muestras acuosas (EPA 350.1)

El fenol alcalino y el hipoclorito reaccionan con amonio para formar azul de indofenol que es proporcional a la concentración de amonio. El color azul producido es intensificado con nitroprusiato sódico. La medida de la absorbancia se realizará a 630 nm

Determinación de metales en muestras acuosas (SM-3111 A Y B)

Los compuestos metálicos presentes en las muestras se reducen a estado elemental una vez aspirados en la llama de un mechero. Los átomos, en fase gaseosa, absorben radiaciones cuyas energías coinciden exactamente con las de sus transiciones electrónicas. Las líneas de absorción atómica son muy estrechas y las energías de transición son características



Los compuestos metálicos presentes en las muestras se reducen a estado elemental una vez aspirados en la llama de un mechero. Los átomos, en fase gaseosa, absorben radiaciones cuyas energías coinciden exactamente con las de sus transiciones electrónicas. Las líneas de absorción atómica son muy estrechas y las energías de transición son características

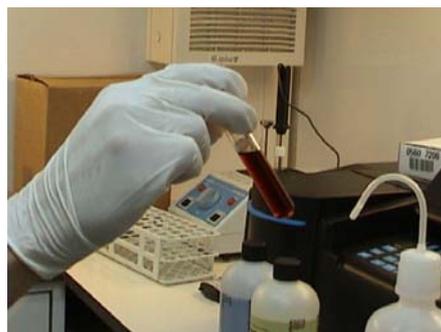
de cada elemento. Utilizando como fuente de radiación una lámpara de cátodo hueco que emite a la longitud de onda determinada, la energía absorbida en la llama es proporcional a la concentración de metal contenido en la muestra.

Determinación de nitrógeno total en muestras acuosas (ITM-M-007)

En un sistema de análisis de flujo segmentado, los compuestos orgánicos presentes en la muestra son digeridos a pH 4 mediante persulfato potásico. Los iones amonio originalmente presentes y los formados durante la digestión se convierten en nitratos mediante la oxidación por el persulfato potásico, catalizado por radiación U.V.. Finalmente el nitrato presente se determina en la muestra colorimétricamente después de su reducción a nitrito.

Determinación de fósforo total en muestras acuosas (SM 4500 P, B Y C)

El fósforo se puede presentar en combinación con materia orgánica, por lo que se puede determinar el fósforo total, por medio de una digestión previa de la muestra, produciéndose una liberación del fósforo como ortofosfato.



El ortofosfato reacciona con el molibdato amónico y el tartrato antimonílico potásico, en medio ácido, para formar un heteropoliácido de color amarillo pálido, el ácido fosfomolibdico, que se reduce a azul de molibdeno, de color intenso, por el ácido ascórbico.

Determinación de carbono orgánico total en muestras acuosas (EPA 415.1)

El principio se basa en la determinación del Carbono Orgánico Total por diferencia entre Carbono Total y Carbono Inorgánico.

$$\text{C.O.T.} = \text{C.T.} - \text{C.I.}$$

El C.I. de la muestra se determina, sometiendo la muestra a unas condiciones determinadas de acidez y temperatura, de modo que, todo el C.I. es convertido en CO₂ el cual se mide. En estas condiciones el carbono orgánico no es oxidado, y por tanto

sólo se mide carbono inorgánico.

El C.T. se mide por combustión a alta temperatura (680°C) con un catalizador de Pt. El C se oxida a CO₂ y posteriormente se mide mediante un detector de Infrarrojos no dispersivo.

Determinación de clorofila-a (SM-10200 H 1 Y 2)

Del plancton, una vez concentrado mediante filtración, se extraen los pigmentos con acetona acuosa. Se determina la densidad óptica (absorbancia) del extracto en un espectrofotómetro a 664, 647 y 630 nm. Se utiliza la lectura de absorbancia a 750 nm como corrección de turbidez.

Determinación de Sólidos Totales (ITG-M-005)

Una cierta cantidad de muestra correctamente mezclada es transferida a una cápsula de evaporación, previamente secada a 105 °C y pesada. La cápsula es sometida a proceso de evaporación. El aumento de peso sobre el de la cápsula vacía corresponde a los sólidos totales.

Determinación de Sólidos en Suspensión (UNE-EN-872)

El aumento de peso de un filtro de fibra de vidrio (Whatman GF-C) secado a 105 ± 3 °C tras la filtración de un volumen conocido de muestra, corresponde a la cantidad de sólidos en suspensión del agua filtrada.

Determinación de Sulfatos (ITG-M-053)

El ión SO₄²⁻ presente es convertido a SO₄Ba insoluble bajo condiciones controladas. Se mide la absorbancia luminosa de la suspensión con un espectrofotómetro y se determina la concentración de SO₄²⁻ por comparación de la lectura con una curva patrón.

Determinación de Carbonatos y Bicarbonatos (SM 2320 B)

Se realiza la valoración de una porción de muestra con ácido clorhídrico hasta pH 8,3 (Alcalinidad a la fenolftaleína) y pH 4,5 (Alcalinidad total). A partir de estos datos y mediante cálculos sobre una base estequiométrica, se obtienen las concentraciones

de los iones carbonatos y bicarbonatos presentes.

Determinación de Cloruros (SM 4500 Cl-B)

Una porción de muestra con un pH comprendido entre 7 y 10 und pH a la que previamente se le ha adicionado una solución indicadora de cromato potásico, se valora con nitrato de plata. En una solución neutra o ligeramente alcalina, el cromato potásico puede indicar el punto final de la titulación de Cl^- con nitrato de plata por precipitación del cloruro de plata antes de formarse el cromato de plata rojo.

Determinación de plaguicidas (ITP-M-009)

La muestra es sometida a extracción líquido-líquido con diclorometano. El extracto obtenido es concentrado a temperatura controlada bajo atmósfera de nitrógeno, transferido a hexano e inyectado posteriormente en un cromatógrafo de gases con detección por espectrometría de masas.



Determinación de metales en muestras de sedimentos (EPA 3015-3051)

La muestra de sedimento, previo secado en estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, se somete a un proceso de digestión ácida en microondas. En él se reduce la interferencia de la materia orgánica, así como convierte las distintas formas de metal asociado a las partículas a una forma (normalmente libre) en la que pueda

determinarse su concentración. La concentración del metal en el licor producto de la digestión es proporcional a la concentración de metal en el sedimento.

Determinación de materia orgánica en muestras de sedimentos (CRAFT 1991)

La muestra de sedimento, previo secado en estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, se combustiona en un horno a 550°C durante dos horas. La diferencia de peso entre la muestra seca y la combustionada es proporcional a su contenido en materia orgánica.

Determinación de nitrógeno total, nitratos, nitritos y amonio en muestras de sedimentos (UNE 77306)

Por medio de una extracción con una disolución de cloruro de calcio de muestras de sedimentos secados al aire, se extraen las diferentes fracciones de nitrógeno. Las concentraciones de nitratos, nitritos, amonio y nitrógeno total se determinan directamente en el extracto utilizando alguna de las técnicas colorimétricas descritas anteriormente.

Determinación de fósforo total y fosfatos en muestras de sedimentos (métodos oficiales de análisis MAPA)

Por medio de una extracción con una disolución de bicarbonato sódico de muestras de sedimentos secados al aire, se extraen las diferentes fracciones de nitrógeno. Las concentraciones de fosfato y fósforo total se determinan directamente en el extracto utilizando alguna de las técnicas colorimétricas descritas anteriormente.

Determinaciones biológicas

Determinación de fioplancton

La observación de muestras para análisis cualitativo se efectuó mediante el análisis de tres alícuotas por muestra, en un microscopio óptico (Nikon modelo Eclipse E600) dotado de contraste de fase, utilizando las siguientes claves: Bourrelly (1968), Prygiel J. & Coste M., (2000), John & Brook (2002) y Huber-Pestalozzi (1962) y Prescott (1978).

Para el estudio de las diatomeas se realizaron preparaciones permanentes, consistentes en oxidaciones lentas para eliminar el material orgánico de las frústulas,

y posterior montaje en Naphrax, cuyo índice de refracción aproximado es de 1.7, lo cual facilita la observación al microscopio.

El análisis cuantitativo se realizó mediante la metodología de Utermhol recomendada por Hasle (1984) utilizando un microscopio invertido Nikon, dotado con contraste de fase, observando el fitoplancton sedimentado en cámaras de 10 o 50 ml según abundancia del fitoplancton. La abundancia de especies de fitoplancton fue expresada en células por mililitro.

Determinación de fitobentos

Mediante el uso de microscopio directo a 1000 aumentos se procede a la identificación y recuento de las especies para la aplicación de los índices bióticos.

Determinación de zooplancton

Puesto que en el campo se ha obtenido un concentrado de la muestra, en el laboratorio se puede dividir la muestra en dos, una alícuota para análisis cualitativo y el resto para análisis cuantitativo.

En el primero, en un microscopio óptico (Nikon modelo Eclipse E600) se procede a identificar cuáles son las especies que aparecen en cada muestra, separando los distintos grupos que pueden aparecer y, cuando se determinan, se contabiliza el número de ejemplares de cada especie en la muestra cuantitativa para obtener datos definitivos de densidad con los que poder trabajar posteriormente.

Los análisis cualitativos son los que requieren mayor tiempo, puesto que deben aislarse organismos y realizar disecciones bajo lupa, en el caso de cladóceros y copépodos. La identificación se obtiene a partir de claves y guías que se especifican posteriormente.



Determinación de macrobentos

El análisis de la alteración de la estructura de la comunidad bentónica consiste en cuantificar el número de

especies, individuos o biomasa de la infauna presente en el sedimento, con el objeto de establecer índices directamente relacionados con el grado de estrés existente en el medio (dominancia, diversidad, etc.)

El trabajo de separación se inicia con un suave tamizado de las muestras para terminar de limpiarlas. El material retenido en el tamiz se traspasa a una bandeja de fondo blanco que sirva como contraste a los organismos teñidos de color rosa, se sitúan bajo un foco de luz y manualmente se separa cada uno de los organismos y se pre-clasifican en grandes grupos (moluscos, crustáceos, anélidos, equinodermos, sipuncúlidos y varios) con la ayuda de lentes de aumento o con lupas binoculares. Los botes de almacenaje se conservan mediante formol al 4%.

El contenido de cada tubo pre-clasificado se vierte en una placa de Petri y bajo el estereomicroscopio son clasificados y contados individualmente todos los ejemplares



hasta el nivel taxonómico establecido. Frecuentemente, para una correcta determinación, es necesario observar estructuras características de los individuos lo que conlleva realizar una preparación (en distintos medios, fijos o temporales) para estudiarla al microscopio.

Esta fase del trabajo implica un amplio conocimiento de los grupos estudiados (con demasiada frecuencia los organismos observados no se encuentran completos) y la consulta a claves taxonómicas específicas (abundante presencia de organismos juveniles que no han desarrollado las características completas de la especie).

La determinación de los taxones se efectuó mediante observación por lupa binocular y por microscopio para aquellos grupos de mayor complejidad. Esta determinación permite obtener una relación de la presencia o ausencia de distintos organismos en la zona de estudio con sus abundancias correspondientes, y esta relación se utiliza como base para la aplicación de métodos matemáticos de caracterización del área.