

**SOLUCIÓN FIJADORA ALTERNATIVA AL USO DEL FORMALDEHIDO PARA
LA PRESERVACIÓN DE MUESTRAS FITOPLANCTONICAS Y PERIFITON
ALGAL**

BIOL. JORGE ENRIQUE GALEANO REDONDO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
ESPECIALIZACIÓN EN INGENIERÍA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2015**

**SOLUCIÓN FIJADORA ALTERNATIVA AL USO DEL FORMALDEHIDO PARA
LA PRESERVACIÓN DE MUESTRAS FITOPLANCTONICAS Y PERIFITON
ALGAL**

BIOL. JORGE ENRIQUE GALEANO REDONDO

**MONOGRAFIA DE TRABAJO DE GRADO REALIZADO EN LA MODALIDAD DE
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN INGENIERIA AMBIENTAL**

**Director
ING. ESP. RICHARD DIAZ GUERRERO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
ESPECIALIZACIÓN EN INGENIERÍA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2015**

La responsabilidad ética, legal y científica de las ideas, conceptos y resultados del proyecto serán del autor.

Este trabajo debe citarse de la siguiente manera:

GALEANO J.R. 2015. **“SOLUCIÓN FIJADORA ALTERNATIVA AL USO DEL FORMALDEHIDO PARA LA PRESERVACIÓN DE MUESTRAS FITOPLANCTONICAS Y PERIFITON ALGAL”** UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER, COLOMBIA.

***A los psicólogos investigadores de campo y laboratorio,
Los cuales realizarán actividades de preservación de muestras
Más seguras para su salud, en el ámbito laboral.***

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

Al Creador por darnos la oportunidad de existir y brindarnos el entendimiento para tratar de comprender el don de la vida.

La Universidad Industrial de Santander por brindarme la oportunidad de participar en este curso y compartir conocimientos valiosos con magníficos docentes del área ambiental.

Al laboratorio de Consultorías Ambientales MCS, por su apoyo en la ejecución de este proyecto, en especial a los laboratorios de Hidrobiología y fisicoquímica por su ayuda para realizar los ensayos y análisis de las soluciones fijadoras.

Ing. Esp. Richard Díaz Guerrero, Director de este proyecto por su colaboración para la elaboración de esta propuesta.

CONTENIDO

INTRODUCCION.....	15
1. GENERALIDADES	17
1.1. OBJETIVO GENERAL.....	17
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
2.1. MARCO REFERENCIAL.....	19
3. METODOLOGIA	21
4. MARCO CONCEPTUAL	22
4.1. PERIFITON.....	22
4.2 FITOPLANCTON.....	23
4.3 VALOR INDICADOR DEL PERIFITON.....	23
4.4 VALOR INDICADOR DEL FITOPLANCTON.....	24
4.5 CLASIFICACION DEL FITOPLANCTON.....	24
4.5.1 División Bacillariophyta.....	25
4.5.2 División Clorophyta.....	26
4.5.3 División Cyanophyta.....	27
4.5.4 División Euglenophyta	28
5. REVISION BIBLIOGRAFICA DE PROTOCOLOS ESTUDIO DE PERIFITON	31
5.1 REACTIVOS FIJADORES.....	31
5.2 PREPARACIÓN SOLUCIÓN TAMPONADA DE FORMALDEHIDO (HCHO) AL 4% V/V.	32
6. REVISION BIBLIOGRAFICA DE PROTOCOLOS PARA EL ESTUDIO DE FITOPLANCTON	34
6.1. REACTIVOS FIJADORES.	34
7. RESULTADOS	38
7.1. ANÁLISIS CUALITATIVO DE FITOPLANCTON.....	38
7.2. ANÁLISIS CUALITATIVO DE PERIFITON.	41
BIBLIOGRAFIA.....	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Réplicas de muestra de fitoplancton fijadas con Solucion Transeau y Lugol	37
Tabla 2. Abundancias de morfoespecies fitoplanctonicas identificadas en muestras fijadas con solución Transeau durante 4 semanas.....	38
Tabla 3. Abundancias de morfoespecies fitoplanctonicas identificadas en muestras fijadas con solución Transeau durante 4 semanas.....	39
Tabla 4. Réplicas de muestra de perifiton algal fijadas con Solución Transeau y Lugol..	40
Tabla 5 . Abundancias de morfoespecies perifiticas identificadas en muestras fijadas con solución Transeau durante 4 semanas	41
Tabla 6. Abundancias de morfoespecies fitoplanctonicas identificadas en muestras fijadas con solución Transeau durante 4 semanas.....	42

ÍNDICE DE FOTOS

Foto 5.1 Perifiton adherido a un tronco	21
Foto 5.2 Eutrofización de un cuerpo de agua	22
Foto 5.3 Microalgas al microscopio	22
Foto 5.4 <i>Navicula Sp.</i>	24
Foto 5.5 <i>Micrasteria Sp.</i>	25
Foto 5.6 <i>Anabaena Sp.</i>	26
Foto 5.7 <i>Euglena Sp.</i>	27

GLOSARIO

Aerótopos: Vacuolas de gas que ayudan en la flotación.

Bioindicador: especie en particular, que demuestra la existencia de ciertas condiciones en el medio, cuya presencia y abundancia señalan algún proceso o estado del sistema en el cual habita, mientras que su ausencia es la consecuencia de la alteración de tales condiciones.

Biovolumen: porcentaje en volumen de materia orgánica.

Cosmopolita: organismo que se encuentra en cualquier región del mundo.

Cocolitóforos: Los cocolitóforos son algas unicelulares, protistas fitoplanctónicos pertenecientes al filo Haptophyta. Se distinguen por placas distintivas de carbonato cálcico de propósito desconocido denominados cocolitos, que son microfósiles importantes.

División: Categoría taxonómica que está entre el reino y la clase.

Eutrofización: producción excesiva de materia orgánica en un cuerpo de agua debido a una gran abundancia de nutrientes.

Epifíticas: Algas que crecen sobre superficies vegetales.

Epilíticas: Algas que crecen sobre superficies rocosas.

Fijación: proceso fisicoquímico por el cual se mantiene a las estructuras orgánicas en el estado más parecido al que poseían en vida.

Filogenéticos: relaciones evolutivas entre diferentes grupos de organismos a partir de la distribución de los caracteres primitivos y derivados en cada taxón

Fitoplancton: Comunidad de microorganismos, en su mayoría fotosintéticos, (microalgas, cianobacterias, flagelados heterótrofos y otros grupos sin clorofila) que vive suspendida en la masa de agua.

Fitobentos: Organismos fototróficos que viven asociados a cualquier sustrato del fondo de los ecosistemas acuáticos. Incluye cianobacterias, algas microscópicas (microalgas), macroalgas y macrófitos.

Formaldehido: compuesto químico orgánico del grupo de los aldehídos altamente volátil y tóxico, de fórmula $H_2C=O$.

Glutaraldehído: Compuesto químico de la familia de los aldehídos que se usa principalmente como desinfectante de equipos médicos y odontológicos así como de laboratorio.

Perifiton: Comunidad microbiótica que vive sobre sustratos sumergidos de diferente naturaleza (sustratos duros, vegetación viva o muerta, etc.).

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

Placa Sedgwick–Rafter: Cámaras de recuento para partículas y microorganismos en 1 ml de agua u otros líquidos transparentes.

Lugol: disolución de yodo molecular I_2 y yoduro potásico KI en agua destilada.

Salud Ocupacional: disciplina que trata de la prevención de las lesiones y enfermedades causadas por las condiciones de trabajo, y de la protección y promoción de la salud de los trabajadores.

TITULO: SOLUCIÓN FIJADORA ALTERNATIVA AL USO DEL FORMALDEHIDO PARA LA PRESERVACIÓN DE MUESTRAS FITOPLANCTONICAS Y PERIFITON ALGAL

Autor:

GALEANO J.R.

Palabras Claves: Microalgas, solución fijadora, Formaldehido, Lugol, salud ocupacional.

En los estudios ambientales existen tareas, actividades y procesos con riesgos muy diversos. Como resultado de esta complejidad, el profesional que desarrolla su trabajo en éste ámbito se expone a diferentes agentes químicos, de forma directa o indirecta, a lo largo de su vida. En el campo de la bioindicación de la calidad de agua, se hace necesaria la colecta de muestras y posterior análisis en laboratorio para la identificación de los organismos de interés, este procedimiento requiere la preservación de los tejidos de dichos organismos con reactivos químicos como el etanol y el formaldehido, este último presenta riesgo carcinógeno, para los profesionales encargados de fijar las muestras y analizarlas. La exposición con el agente químico se presenta principalmente vía aérea, ya que la sustancia es muy volátil, depositándose fácilmente en las vías respiratorias superiores¹. Por esa razón se propone la posibilidad de emplear solución de Lugol, como un tipo de fijador que sustituya el uso del formaldehido en las actividades de colecta y análisis de comunidades planctónicas, manteniendo la viabilidad de conservación de los tejidos de los organismos analizados, para periodos de preservación cortos. Las actividades de análisis para esta propuesta de proyecto, se llevaron a cabo -en el laboratorio de hidrobiología de la Empresa MCS Consultoría y Monitoreo Ambiental.

1. Agentes químicos en el ámbito sanitario Escuela Nacional de Medicina del Trabajo (ENMT) Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Ciencias e Innovación, Madrid 2010. Pascual del Rio.

** Escuela de Ingeniería Química. Especialización en Ingeniería Ambiental. Director Ingeniero Richard Díaz Guerrero

TITLE: FIXATIVE SOLUTION ALTERNATIVE TO USING FORMALDEHYDE FOR THE PRESERVATION PHYTOPLANKTON AND PERIPHYTON SAMPLES

Author:

GALEANO J.R.

Key Words: microalgae, fixative solution, Formaldehyde, Lugol, Occupational health.

In environmental studies exist tasks activities and processes with very different risks, as a result of this the professional who develop the work in this area, are exposed directly or indirectly to a different chemicals throughout their careers. In the field of bio-indication of water quality, It is necessary the sample collection and further analysis in the laboratory for the identification of organisms of interest, the procedure requires preservation of this organisms tissues with chemical reagents such as ethanol and formaldehyde, considered carcinogen and the professionals responsible for fixing and analyzing samples are exposed to the chemical mainly by air because the substance is highly volatile and is easily deposited in the respiratory tract mainly in the upper¹. Therefore the possibility of using lugol solution is proposed. This one could be used as a fixative solution replacing the use formaldehyde in the activities of collection and analysis of planktonic and periphytic communities, maintaining the viability of conservation of the organism tissues analyzed for short periods. The analysis of preservation was made in the laboratory of MCS Consultoría y Monitoreo Ambiental.

1. Agentes químicos en el ámbito sanitario Escuela Nacional de Medicina del Trabajo (ENMT) Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Ciencias e Innovación, Madrid 2010. Pascual del Rio.

** Chemical Enginner School. Enviromental Enginner Especialist. Director: Ing. Richard Díaz

INTRODUCCION

A través de esta publicación se quiere ofrecer una alternativa viable como medida preventiva frente al riesgo asociado a la exposición de agente químico formaldehído, presente en el entorno laboral del personal de campo y laboratorio, relacionado con la colecta y análisis de parámetros hidrobiológicos, formados por muchos grupos de organismos asociados y relacionados de acuerdo a características biológicas comunes y que son particulares de los diferentes hábitats acuáticos como indicadores de la calidad del agua en una región o lugar determinado.

Entre estas comunidades las de mayor relevancia ecológica corresponden al fitoplancton, zooplancton, macroinvertebrados acuáticos, plantas acuáticas y peces. Estas comunidades hidrobiológicas, como las más representativas, son utilizadas como indicadores de calidad en diversos estudios ambientales. Dada la relativa facilidad para recolectar muestras de cada una de ellas empleando metodologías estandarizadas, son usadas tanto en estudios ambientales como para investigación; estos parámetros se convierten en instrumentos muy útiles de medición en impactos ambientales.

El protocolo para establecer una metodología para el muestreo y análisis del fitoplancton presente en cuerpos de agua, pueden ser adoptado de diferentes fuentes bibliográficas a opción de los participantes de los diferentes grupos de investigación. Por ejemplo para la Confederación Hidrográfica del Ebro su elaboración metodológica se ha basado en los contenidos de la reunión de trabajo y la información contenida en los textos de la bibliografía, y en el documento CEN/TC230/WG2/TG/N83 Water Quality. Standard for the routine analysis of phytoplankton abundance and composition using inverted microscopy (Utermöhl technique).

Los laboratorios ambientales en Colombia están en la capacidad de elaborar su metodología de muestreo y análisis de parámetros hidrobiológicos de acuerdo a estándares internacionales y por lo general estos estandarizan para la fijación de muestras planctónicas la utilización de solución Transeau (Formaldehído + Etanol + agua), por su alta eficiencia en la preservación de tejidos por largo tiempo.

Sin embargo durante muchos años se ha subestimado el potencial lesivo del formaldehído, lo que propició una posición de tolerancia y aceptación al tiempo que se mantenía una prolongada controversia sobre su efecto carcinógeno que finalmente la ciencia concluyó proporcionando suficientes evidencias. Basado en ellas, numerosos países han legislado para proteger a trabajadores de la exposición de este agente carcinógeno¹¹. Por esta razón se plantea la posibilidad de emplear otro tipo de fijador que sustituya el uso del formaldehído en las actividades de colecta y análisis de comunidades planctónicas (microalgas)

manteniendo la viabilidad y la conservación de los tejidos de los organismos analizados para periodos de conservación cortos.

1. GENERALIDADES

1.1. Objetivo General

Plantear la utilización de una solución fijadora alternativa, en este caso lugol, al uso del formaldehído, para la preservación de muestras fitoplanctónicas y perifiton algal en un laboratorio de consultoría ambiental.

1.2. Objetivos específicos

- Recopilar información técnica de fuentes bibliográficas nacionales e internacionales de los protocolos de muestreo y análisis para microalgas.
- Comparar las ventajas y desventajas de los fijadores empleados en los muestreos y análisis de microalgas.
- Realizar pruebas comparativas con muestras de fitoplancton y perifiton, empleando soluciones de Lugol y Formaldehído.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los estudios ambientales que se realizan en campo y laboratorio existen múltiples actividades y procesos con riesgos muy diversos, el profesional que desarrolla su trabajo en éste ámbito se expone a diferentes agentes químicos, de forma directa o indirecta, a lo largo de su vida profesional. En el campo de la bio-indicación de la calidad de agua de fuentes naturales, se hace necesaria la colecta de muestras y posterior análisis en laboratorio para la identificación de los organismos de interés. Este procedimiento requiere la preservación de los tejidos de dichos organismos con reactivos químicos como el etanol y el formaldehído. Este último presenta riesgo carcinógeno. Se han realizado numerosos estudios sobre la aparición de cáncer en trabajadores expuestos a formaldehído, uno de los más importantes, muestra un aumento en los cánceres nasofaríngeos (aunque en un bajo número de casos) en un grupo de 167 trabajadores americanos empleados en las fábricas de producción de formaldehído durante 30 años¹.

La relación entre la exposición al formaldehído y la aparición de estos cánceres se ha confirmado por otros estudios en humanos y por la observación de tumores nasales en ratas expuestas. Los tumores se han observado a partir de 5 - 6 ppm en la rata y los datos experimentales indican que la aparición secundaria de irritación crónica debida al formaldehído, donde se observan los primeros signos a 2 ppm. La capacidad del formaldehído de unirse al ADN y dañar el material genético parece igualmente intervenir en el proceso. Basándose en estos datos, en el año 2004, The International Agency for Research on Cancer (IARC) clasificó el formaldehído en el grupo 1 de los agentes cancerígenos¹.

En el medio laboral los profesionales encargados de fijar las muestras y analizarlas, presentan exposición al agente químico, principalmente por vía aérea, ya que la sustancia es muy volátil y se deposita fácilmente en las vías respiratorias, principalmente en las superiores. Al utilizarse en disolución acuosa, también existe riesgo por contacto¹. Se producen exposiciones al contaminante con más frecuencia en los laboratorios donde se desarrollan tareas tales como trasvases del formaldehído, dosificaciones, lavados de material y otras manipulaciones con las disoluciones. Por otra parte, desde los recipientes o contenedores de conservación de las muestras es muy frecuente que se produzcan escapes de vapores que afectan las áreas o salas dedicadas al uso de este químico; especialmente si se recogen lotes de muestras de gran tamaño.

Por esta razón se planteó la posibilidad de emplear otro tipo de fijador que sustituya el uso del formaldehído en las actividades de colecta y análisis de comunidades planctónicas (microalgas) manteniendo la viabilidad y la conservación de los tejidos de los organismos analizados para periodos de conservación cortos.

2.1. MARCO REFERENCIAL

Se han realizado numerosos estudios sobre la aparición de cáncer en trabajadores expuestos a formaldehído. Uno de los más importantes, muestra un aumento de los cánceres nasofaríngeos en un grupo de trabajadores americanos empleados en las fábricas de producción de formaldehído durante 30 años¹. La relación entre la exposición al formaldehído y la aparición de estos cánceres se ha confirmado por otros estudios en humanos y por la observación de tumores nasales en ratas expuestas. Los tumores se han observado a partir de 5 - 6 ppm en la rata y los datos experimentales indican que la aparición es secundaria a la irritación crónica debida al formaldehído, donde se observan los primeros signos a 2 ppm. La capacidad del formaldehído de unirse al ADN y dañar el material genético parece igualmente intervenir en el proceso. Basándose en estos datos, en el año 2004, The International Agency for Research on Cancer (IARC)¹ clasificó el formaldehído en el grupo 1 de los agentes cancerígenos¹.

En la Unión Europea, el formaldehído está clasificado como cancerígeno de categoría 3, por este motivo no es de aplicación la directiva relativa a la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes carcinógenos o mutágenicos durante el trabajo (2004/37/CE)¹, directiva transpuesta al derecho español a través del Real Decreto 665/1997.

En el LIBRO BLANCO de 2009, Córdoba y colaboradores alertaron del riesgo del formol y de las medidas de prevención necesarias. En ese estudio se insistió en la necesaria concienciación de los profesionales expuestos y se propuso avanzar hacia la eliminación o limitación progresiva del formol en los servicios de anatomía patológica mediante el uso de los posibles sustitutos disponibles.

En Paraguay se realizó una técnica modificada para la evaluación de fitoplancton como indicador de calidad de agua del año 2010, donde todas las muestras colectadas fueron previamente fijadas in situ con 1% de Lugol+Ácido Acético al 70%, dicho proceso respondía a concentrar el plancton en el tubo de Ütermohl de 25 ml que, luego de 24 horas se procede a la observación, cuantificación de fitoplancton y determinación de la calidad de agua²⁶.

En la publicación Metodología para el Establecimiento del Estado Ecológico Según la Directiva Marco del Agua en la Confederación hidrográfica del Ebro del año 2005²¹ plantea en su sección de reactivos fijadores Solución de Lugol (mezcla de yoduro potásico y yodo) y formaldehído. La Solución de Lugol para periodos de conservación cortos (unos pocos meses, en la oscuridad).

En la norma CEN/TC230/WG2/TG3 se incluyen dos formulaciones; Solución ácida de Lugol²³ y Solución alcalina de Lugol¹⁸. Para el Formaldehído neutralizado y filtrado es adecuado para la conservación permanente de las muestras, pero la

Confederación hidrográfica del Ebro del año 2005²¹ sugiere que dada la naturaleza tóxica de esta sustancia, en caso de utilización se deben tomar precauciones.

3. METODOLOGIA

Se recopiló información de los fijadores que actualmente se utilizan en ficología de diferentes fuentes de reconocido prestigio, así como las medidas preventivas que se muestran más eficaces en la actualidad para evitar los riesgos asociados a la exposición del formaldehído.

Se realizaron pruebas cualitativas en laboratorio en un periodo no mayor a treinta (30) días, se colectaron y analizaron muestras de fitoplancton y perifiton algal, haciendo un registro cuantitativo de número de organismos/mililitro y comparativo del estado de las estructuras morfológicas de los mismos, fijadas con las diferentes soluciones preservantes. Para este fin se realizó lo siguiente:

Para la obtención de muestras de fitoplancton se filtraron 100 litros de agua de una fuente rica en microalgas, con una red cónica, de un diámetro de boca de 50 cm, diámetro de poro de 23 micras y colector con filtro de 23 micras. Las muestras colectadas se guardaron en recipientes plásticos de 250 ml de capacidad, color ambar, previamente rotulados y fijados con las soluciones a estudiar.

Para la obtención de muestras de perifiton algal se colocó un cuadrante con un área conocida sobre un sustrato en zonas sumergidas (rocas, troncos, hojas, cantos rodados o estructuras construidas por el hombre) y se realizó un frotis sobre la zona demarcada por el cuadrante el cual se ubicó en la parte superior de los sustratos. Las muestras colectadas se guardaron en recipientes plásticos de 50 ml de capacidad, color ámbar, previamente rotulados y fijados con las soluciones a estudiar.

El análisis de la microalgas se realizó teniendo en cuenta caracteres morfológicos, niveles de organización, claves especializadas e iconografías propuestas por; (8), (9), (14). Para este análisis se tomaron alícuotas de 1 ml de la muestra y analizadas en placa Sedgwick–Rafter, siguiendo la metodología propuesta según la Directiva Marco del Agua (2005)²¹.

El análisis de los resultados se realizó con estadística, teniendo en cuenta la diversidad y abundancia presente en cada muestra observada

4. MARCO CONCEPTUAL

4.1. PERIFITON

EL perifiton se define como una comunidad compleja de microbiota (algas, bacterias, hongos, animales, detritos orgánicos e inorgánicos) adherida a un sustrato que puede ser orgánico o inorgánico, vivo o muerto²⁰. La importancia que se le atribuye al perifiton en los ecosistemas acuáticos radica en su producción de metabolitos orgánicos que alimentan diversos organismos; su contribución con más del 70% de la materia orgánica a la productividad total, sus altas tasas de reciclaje; su posibilidad de proporcionar abrigo y alimento a varios tipos de organismos, principalmente peces; su alta tasa de productividad primaria y su papel como mejor indicador biológico que el fitoplancton¹⁵.

Este documento se enfoca en el fitobento o microalgas bentónicas las cuales se consideran útiles para evaluar la calidad del agua ya que responden al aumento de nutrientes (Principalmente P y N) en los sistemas acuáticos, mediante cambios en su composición que, en algunos casos, suponen la disminución en la diversidad, y el aumento de la biomasa; de forma que cuando la masas de agua se eutrofiza los sustratos aparecen recubiertos de capas verdes o pardas de algas²¹.



Fuente: Autoría propia, 2015.

Foto 0.1 Perifiton adherido a un tronco

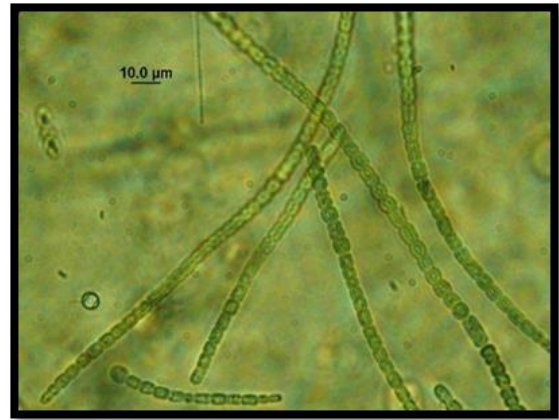
4.2 FITOPLANCTON.

Comunidad de microorganismos fotosintéticos (microalgas eucariotas y cianobacterias) que vive suspendida en la masa de agua. Productor primario asociado a la columna de agua donde la disponibilidad de luz es mayor, su crecimiento está limitado por la disponibilidad de luz o bien por la disponibilidad de nutrientes.



Fuente: Autoría propia, 2015.

Foto 0.2 Eutrofización de un cuerpo de agua



Fuente: Autoría propia, 2015.

Foto 0.3 Microalgas al microscopio

Se encuentra en la base de la cadena alimentaria de los ecosistemas acuáticos, ya que sirve de alimento a organismos mayores; es decir realiza la parte principal de la producción primaria en los ambientes acuáticos, sobre todos los animales marinos. Es el responsable original de la presencia de oxígeno (O_2) en la atmósfera. La fotosíntesis oxigénica apareció evolutivamente con las cianobacterias, antepasadas además de los plastos de las algas eucarióticas. Durante casi 2.000 millones de años, hasta el desarrollo de las plantas terrestres, la fotosíntesis estuvo prácticamente restringida a los mares.

4.3 VALOR INDICADOR DEL PERIFITON

El perifiton es un componente de las comunidades bióticas acuáticas, su estudio es importante tanto desde la perspectiva ecológica, para comprender el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos, como desde el punto de vista ambiental, pues su composición y estructura pueden servir como indicadores de la calidad del agua y de procesos que como la contaminación puedan estar

afectando a los ecosistemas, es un componente fundamental de las comunidades bióticas acuáticas donde juega un papel importante en los procesos de transferencia de energía, materia e información a través de las cadenas tróficas¹⁵.

4.4 VALOR INDICADOR DEL FITOPLANCTON.

El fitoplancton se ha usado ampliamente como indicador del estado trófico de las masas de agua y existe abundante bibliografía que incluye métodos de muestreo y análisis¹³. Responde rápidamente a los cambios ambientales por su ciclo de vida corto. Estos cambios alteran la estructura de sus comunidades, repercute en el interés socioeconómico del sistema acuático en tiempos relativamente cortos, sobre todo por su papel de productores primarios.

Algunas algas microscópicas muestran una distribución amplia, otras ciertas preferencias ambientales con alta frecuencia de taxón en aguas fuertemente contaminadas, lo que sugiere su tolerancia o preferencia por algún compuesto químico o bioquímico. Si algún taxón se reconoce como cosmopolita diferenciado, puede evidenciarse cualquier cambio físico o químico en las masas de agua al ocurrir una alteración por contaminantes²⁴. Este bioindicador es adecuado para la detección y seguimiento de las presiones fisicoquímicas al medio relacionadas con: contaminación térmica, cambios en la mineralización del agua y en la composición de los iones mayoritarios disueltos, eutrofización; concentraciones de nitrógeno y fósforo, y en ocasiones de sílice y otros cationes como el hierro, además de contaminación orgánica¹³.

4.5 CLASIFICACION DEL FITOPLANCTON

El fitoplancton incluye características típicas muy diversas que difieren en su estructura morfológica, desde el picoplancton, hasta largos filamentos y colonias multicelulares. Por esta razón, se ha intentado agrupar estos organismos a partir de características estructurales y funcionales. Estos criterios de clasificación incluyen el tamaño, la forma, las características fisiológicas y estrategias adaptativas, así como la aparición temporal y distribución, teniendo en cuenta a su vez las unidades taxonómicas²¹. El término microalga no tiene ningún valor taxonómico, incluye microorganismos algales con clorofila y otros pigmentos fotosintéticos y para su clasificación sistemática implica la consideración de una serie de criterios.

Existen tres tipos básicos de sistemas de clasificación en biología: artificiales, la natural y filogenético. Los sistemas artificiales consideran los caracteres, independientemente de su origen y sin preocuparse por las posibles afinidades y

parentesco entre los individuos clasificados. La identificación rápida e inequívoca es el objetivo de estos sistemas, que nunca se preocupan por los escenarios de convergencia y los posibles paralelismos que ocurrieron durante la evolución de las especies²². Los sistemas naturales tienen en cuenta toda la información disponible en cuanto especies, incluyendo morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, genéticas y citológicas²² y los sistemas filogenéticos son los más cercanos al ideal, ya que los taxones se organizan en él, según su diferente grado de ascendencia y descendencia²². Entre los grupos de microalgas ampliamente distribuidos y de mayor importancia indicadora en aguas continentales se encuentran las siguientes Divisiones:

4.5.1 División *Bacillariophyta*

Comúnmente llamadas diatomeas son algas microscópicas, unicelulares y eucariotas, compuestas en un 60% de sílice (SiO₂), ya que la célula se encuentra protegida por un caparazón silicio llamado frústulo que le confiere gran dureza y resistencia.



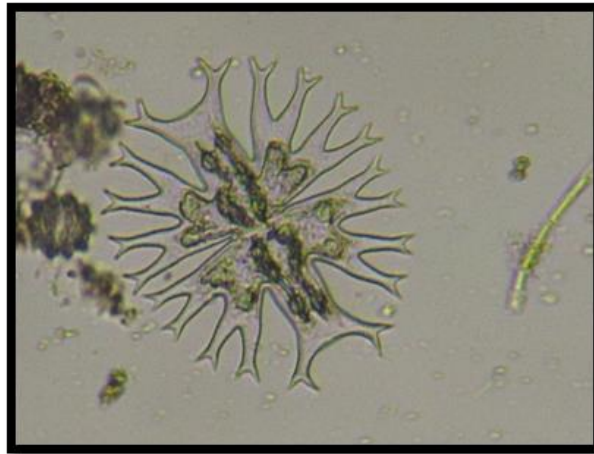
Fuente: Autoría propia, 2015.

Foto 0.4 *Navicula Sp*

El frústulo se compone de dos mitades que encajan entre sí, llamadas tecas, la superior (epiteca) es siempre mayor y envuelve parcialmente a la inferior (hipoteca). Cada teca está formada por una valva (respectivamente epi-e hipovalva) y un cíngulo (epi- e hipocíngulo). En la valva se desarrollan toda una serie de ornamentaciones que permiten la identificación taxonómica. Longitudinalmente, en muchas especies la valva está atravesada por un delgado surco llamado rafe, que atraviesa la teca hasta el protoplasto³.

4.5.2 División *Clorophyta*

En esta División se agrupan las comúnmente conocidas como algas verdes, las cuales dominan los ambientes dulceacuícolas, pero que también se encuentran en ambientes marinos.



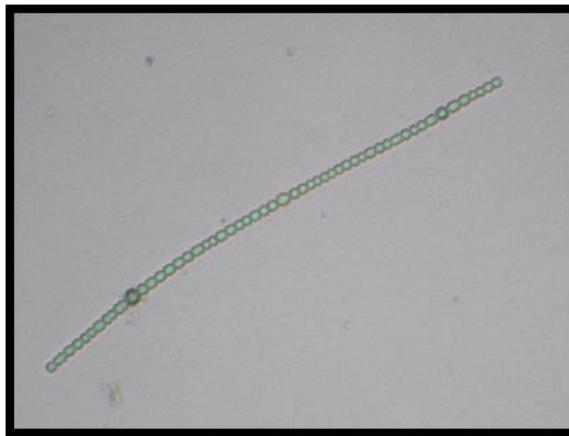
Fuente: Autoría propia, 1415.
Foto 0.5 *Micrasterias Sp*

Desde el punto de vista vegetativo presentan todos los niveles de organización y en lo que se refiere a la reproducción, exhiben la mayor variedad de ciclos vitales y de formas de reproducción que ninguna otra División. Este grupo de algas es considerado como los predecesores de las plantas terrestres debido a su situación en la línea evolutiva que conduce hacia éstas¹³.

4.5.3 División Cyanophyta

Las Cyanobacteria, Cyanophyta, Cyanoprokaryota o algas verde azules son organismos procariotas, autótrofos, que realizan fotosíntesis con liberación de oxígeno al igual que las plantas superiores. Se encuentran entre los seres vivos más primitivos cuyo origen se estima en unos 3500 millones de años, desde el surgimiento de la vida en la tierra¹⁰. Presentan adaptaciones a los ambientes más inverosímiles lo que conlleva la adquisición de nuevas capacidades que les permitan sobrevivir en condiciones hostiles como: sistema de fijación de nitrógeno atmosférico, presencia de toxinas para repeler ataques de los depredadores.

Comprende formas unicelulares, coloniales o filamentosas, provistas o no de una vaina mucilaginosa, muchas de ellas presentan vesículas de gas o aerótopos, que les permiten regular su profundidad en la columna de agua y un mejor acceso a la disponibilidad de luz y nutrientes¹⁰.



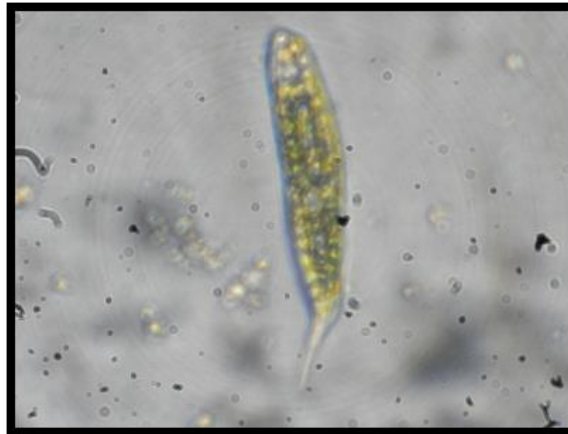
Fuente: Autoría propia, 2015.

Foto 0.6 *Anabaena Sp.*

En los últimos años, este grupo se ha destacado especialmente por los problemas que causan en los ambientes acuáticos y en los sistemas de abastecimiento de agua potable, por la alteración de las características organolépticas, cambios de olor y sabor y especialmente por la producción de toxinas (cianotoxinas)¹⁰. Las floraciones o blooms de Cyanobacteria toxígenas afectan la calidad del agua, los recursos pesqueros, animales y la salud humana. Además, alteran el equilibrio acuático y las cadenas tróficas, producen excesiva biomasa, inhiben la capacidad fotosintética de otras algas por el sombreado, producen toxinas, sabor y olor desagradable.

4.5.4 División *Euglenophyta*

Las Euglenophyta son los organismos más cercanos a las algas verdes y se les considera como protistas con cloroplastos capturados, sus plastos sólo tienen clorofila a y b acompañada de xantofila entre ellas se encuentran dos conocidas de los clorofitos como lo son la astaxantina y neoxantina; agregándole anteraxantina que es exclusiva de los Euglenophyta. Presentan una película externa que les confiere plasticidad y uno o 2 flagelos que se insertan en la faringe, en la porción anterior.



Fuente: Autoría propia, 2015.

Foto 0.7 *Euglena Sp*

Aunque no son muy comunes ni abundantes, suelen ser indicadoras de contaminación⁴. Son organismos comunes, de distribución cosmopolita, casi exclusivamente de aguas dulces, también se encuentran en el suelo y en barros salobres.

4.6 FIJACION DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Fijar un tejido es preservar sus características morfológicas y moleculares lo más parecidas posibles a las que poseía en estado vivo, es como hacer una fotografía del tejido vivo y poder observarla, tras cierto tratamiento, con el microscopio²⁸. Así, los fijadores deben proteger frente a ataques bacterianos, evitar autólisis, insolubilizar elementos solubles que se quieren estudiar, evitar distorsiones y retracciones tisulares, penetrar y modificar el tejido para poder llevar a cabo tinciones específicas posteriores, si es necesario²⁸.

No existe un fijador universal, ni un método de fijación único, incluso podemos usar varios fijadores secuencialmente según nuestras necesidades. La elección depende de las características fijadoras que necesitemos. En cualquier caso, hay características de los fijadores que tenemos que tener en cuenta antes de su uso:

Velocidad de fijación, esta característica no dependen de la velocidad de difusión sino de las propiedades químicas del fijador y condiciona el tiempo que debe permanecer el tejido en contacto con el fijador²⁸. La Osmosis y pH es importante tenerla en cuenta para evitar cambios de volumen en las células, producidas por una osmolaridad del fijador diferente a la del tejido. Por tanto, hay que equilibrar la osmolaridad de las soluciones fijadoras y la de los tejidos a fijar²⁸.

4.6.1 METODOS DE FIJACION

Existen diferentes formas de fijar los tejidos, dependiendo del tipo de fijador, de la estructura a fijar y de lo que queremos observar. Los métodos de fijación se pueden clasificar en dos tipos: físicos y químicos²⁸. Los fijadores físicos están basados en una congelación muy rápida del tejido, en la aplicación de calor o microondas²⁸. Se utilizan cuando los fijadores químicos alteran las estructuras de la muestra que queremos observar, o cuando necesitamos una fijación muy rápida²⁸. La congelación rápida es un buen método de preservación de las características moleculares y es conveniente que sea rápida puesto que se impide la formación de grandes cristales de hielo que nos destruirían la estructura del tejido.

Los métodos químicos utilizan soluciones acuosas compuestas por moléculas fijadoras que establecen puentes entre las moléculas celulares, manteniéndolas en sus lugares originales e impidiendo su degradación. Hay dos métodos de fijación con fijadores líquidos: inmersión y perfusión²⁸. En cualquier caso el fijador debe entrar en contacto con el tejido lo más rápidamente posible.

4.6.2 FIJADORES

Solo trataremos aquellos que consideramos de uso común para la observación de microalgas al microscopio, es decir, aquellos que mejor preserven la estructura celular.

Alcohol etílico $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$. Fija por deshidratación y se usa entre el 70 y 90 %. Es un buen compuesto para preservar moléculas, como ciertas enzimas, propiedades antigénicas, glucógeno, pigmentos y para las extensiones citológicas. Debido a que deshidrata, a la vez que fija, se puede usar también como un conservante de las muestras. Tiene inconvenientes como el endurecimiento y la retracción de los tejidos. Carece de efecto mordiente²⁸.

Ácido acético CH_3COOH . Su proceso de fijación consiste en cambiar el estado coloidal de proteínas. Se utiliza una concentración que varía entre el 1 y el 5 %. Es el fijador ideal para ácidos nucleicos y nucleoproteínas. Como inconvenientes cabe destacar la destrucción de las mitocondrias y mala fijación de membranas y citoplasma. Se suele usar en combinación con otros fijadores

Ácido pícrico $C_6H_2OH(NO_2)_3$. La fijación la produce porque sales del tipo picrato coagulan con las proteínas de los tejidos. Se suele usar el 2% de una solución saturada de ácido pícrico. Preserva bien la estructura celular, no produce retracciones cuando el tiempo de fijación es óptimo, preserva bien glucógeno y lípidos. Es un buen fijador para tinciones generales puesto que favorece la unión de los colorantes. Hay que eliminarlo completamente antes de proceder a la inclusión en ceras como la parafina. Se suele usar combinado con otros fijadores.

Formaldehido $CH_2=O$. Actúa mediante la formación de puentes entre las moléculas tisulares. Se utiliza a concentraciones próximas al 4 %. Es un fijador ampliamente usado por la buena preservación del tejido, actúa como conservante, produce poca retracción tisular, es un buen fijador para lípidos, es compatible con la mayoría de las tinciones histológicas, incluidas las de inmunocitoquímica e hibridación de ácidos ribonucleicos.

Glutaraldehido. Forma puentes entre las moléculas de los tejidos. Se usa a una proporción de entre el 0,5 y el 3 %. Tiene una alta capacidad para preservar la estructura celular, por lo que es el fijador de referencia para observación de ultraestructuras celulares con el microscopio electrónico. Se usa en soluciones tamponadas isotónicas.

5. REVISION BIBLIOGRAFICA DE PROTOCOLOS PARA EL ESTUDIO DE PERIFITON

Este trabajo tratara los Métodos actualmente aceptados en Estados Unidos y Europa para el monitoreo y análisis de perifiton, específicamente lo que respecta a la preservación de muestras.

Marco Normativo Europeo.

Los procedimientos de muestreo y análisis están estandarizados por las siguientes normas y prenormas Europeas **European Committee for Standardization 2003, 2014:**

CEN/TC 230 EN 13946:2003. Water Quality. Guidance Standard for routine sampling and pre-treatment of benthic diatoms from rivers¹³ y PREN 14407: February 2004. Water quality. Guidance standard for the identification, enumeration, and interpretation of benthic diatom samples from running waters¹³.

Esta dos normas están ahora incluidas en la legislación española como Normas Españolas (AENOR 2004 – 2005)¹³. El procedimiento establece un método para el muestreo de las diatomeas epiliticas y epifíticas utilizadas para evaluar la calidad del agua de ríos y lagos. La elaboración del procedimiento está basado en los documentos: CEN/TC 230 EN 13946:2003; Protocolo de la Agencia Catalana del Agua para la evaluación de la calidad biológica de los ríos mediante diatomeas (2003); Protocolo para la recolección de muestras de diatomeas bentónicas en humedales continentales¹³.

El procedimiento incluye directrices metodológicas para; identificar el equipo de muestreo requerido, seleccionar los puntos de muestreo en ríos y lagos, seleccionar el sustrato a muestrear, recoger la muestra en los sustratos y conservación de la muestra, el cual es el punto que abordaremos en este documento.

5.1 REACTIVOS FIJADORES.

Los reactivos fijadores son necesarios para detener la división celular de las diatomeas y la descomposición de la materia orgánica, no es necesario añadir un conservante si la muestra se procesa pocas horas después de su recogida siempre que esta se conserve en frío (4°C) y a oscuras; la muestra también se puede ultracongelar. En caso de conservar la muestra este protocolo recomienda usar formaldehído tamponado o etanol, especialmente para periodos de conservación de largo tiempo, las muestras en formaldehído pueden conservarse

durante meses o años, siendo recomendable añadir más conservante en periodos de conservación superiores a 6 mes - 1 año¹³.

5.2 PREPARACIÓN SOLUCIÓN TAMPONADA DE FORMALDEHIDO (HCHO) AL 4% V/V.

Diluir una solución stock de formaldehido al 4% en una solución tamponada pH7 (la solución tamponada se requiere para prevenir la disolución de los frustulos) entre los tampones más indicados se encuentra HEPES (N-2- Hidroximetil piperazina-n'2 – ácido sulfónico), borato y hexametileno – tetramina. Se recomienda una solución final entre el 1% y el 4% (v/v) la cantidad necesaria dependerá de la cantidad de materia organica presente en la muestra¹³.

Nota: Dada la naturaleza toxica de esta sustancia, en caso de utilización se deben tomar precauciones (trabajar en un ambiente bien ventilado, usar guantes). Puede utilizarse para este propósito **Etanol al 70% (C₂H₅OH)**¹³.

Marco Normativo Americano.

Los procedimientos de muestreo y análisis, al igual que, en las normas Europeas están establecido para el muestreo de Diatomeas y estandarizados por las siguientes asociaciones Norte Americanas; APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Assiation), WPCF (Water Pollution Control Federation) y se encuentra publicados en Standard Methods Edición 22 (2012), SM 10300.

La sección 10300B incluye criterios metodológicos para; seleccionar la estación de muestreo en ríos, lagos, embalses y estanques, colecta de muestra ya sea en sustrato natural o artificial y conservación de la muestra, cabe anotar que el procedimiento para conservación de muestras de perifiton invita a ver la sección 10200B relacionado con la fijación de fitoplancton y la sección 10300C incluye criterios para el análisis de las muestras teniendo en cuenta; conteo de organismo en placa Sedgwick–Rafter, método de conteo en microscopio invertido, conteo de especies de Diatomea, tinción de muestras y conteo, biovolumen, peso seco y análisis de clorofila y feofitina. La sección 10300B incluye criterios para análisis de productividad primaria tales como; acumulación de biomasa, medida de productividad por el método de oxígeno entre otros. Por otra parte esta es la metodología adoptada por el laboratorio que y el procedimiento de conservación de la muestra es el punto que abordaremos en este documento.

Preservar las muestras de identificación y conteo en **formalina neutralizada al 5%, Lugol de yodo, o mertiolato. El Gluteraldehido (2 a 5%)** es un excelente

conservante ya que no es agresivo con la membrana celular. Coloque las diapositivas de análisis de clorofila en acetona o metanol en el campo o recoger y congelar con triclorotrifluoroetano (o alternativa) o CO₂. Para análisis de clorofila preservar en acetona o metanol en campo o congelar con triclorotrifluoroetano (alternativa) o CO₂.

6. REVISION BIBLIOGRAFICA DE PROTOCOLOS PARA EL ESTUDIO DE FITOPLANCTON

Este trabajo tratara los Métodos actualmente aceptados en Estados Unidos y Europa para el monitoreo y análisis de fitoplancton y específicamente lo que respecta a la preservación de muestras.

Marco Normativo Europeo.

Los procedimientos se han basado en los contenidos de la reunión de trabajo efectuada en la Confederación Hidrográfica del Ebro y en el documento CEN/TC230/WG2/TG/N83 Water Quality. Standard for the routine analysis of phytoplankton abundance and composition using inverted microscopy (Utermöhl technique), con fecha de 2005.

El protocolo abarca los siguientes temas; Equipos, técnicas de toma de muestras, conservación y pretratamiento de las muestras. También tiene en cuenta técnicas de recuento, medida de biovolúmenes y método para el análisis de pigmentos. En este documento trataremos lo concerniente a conservación de la muestra.

6.1 REACTIVOS FIJADORES.

Este protocolo plantea dos alternativas: Solución de Lugol y formaldehído.

Solución de Lugol; para periodos de conservación cortos, unos pocos meses, en la oscuridad. En la norma CEN/TC230/WG2/TG3 se incluyen dos formulaciones.

- **Solución ácida de Lugol** (Willén, 1962). Disolver 100 g de yoduro potásico en 1 litro de agua desmineralizada; añadir 50 g de cristales de yodo y agitar hasta que se disuelvan; añadir 100 g de ácido glacial acético.
- **Solución alcalina de Lugol** (Utermöhl 1958 modificada). Se prepara como la anterior, sólo que, en lugar del ácido glacial acético, se añaden 100 g de acetato de sodio (CH₃COO-Na).

Formaldehído (HCHO) al 2-4% v/v neutralizado y filtrado; es algo agresivo con algunas estructuras celulares, no obstante es adecuado para la conservación permanente de las muestras.

Nota: Dada la naturaleza tóxica de esta sustancia, en caso de utilización se deben tomar precauciones trabajar en un ambiente bien ventilado, usar guantes y recipientes herméticos.

➤ **Marco Normativo Americano**

Los procedimientos están basados en los textos de la APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association), WPCF (Water Pollution Control Federation), y se encuentran publicados en el Standard Methods edición 22 (2012) SM 10200. Esta sección trata los protocolos de muestreo de fitoplancton y zooplancton, los cuales presentan la definición de estas comunidades y su importancia como indicador de la calidad del agua.

La sección SM 10200 B. ilustra técnicas para la colecta de muestras teniendo en cuenta consideraciones generales como; definición de los objetivos de los muestreos, selección de los sitios de muestreos, la relación de estas comunidades biológicas con las diferentes dinámicas de los cuerpos de aguas donde estas se presentan y coleccionar volúmenes de muestras variados dependiendo de la densidad de microorganismos que se presenten por ejemplo; Si se espera que las densidades de fitoplancton sean baja (aguas oligotróficas), se recoge una muestra mayor a 1 litro, en aguas con mayor abundancias (aguas eutróficas) se recoge una muestra entre 0,1 litros a 1 litro y como seleccionar un tamaño de malla apropiado para concentrar cuidadosamente los diferentes tamaños celulares típico del sistema acuático en estudio.

Esta sección también abarca los procedimientos de almacenamiento de las muestras (tema central y enfoque de este documento) el cual plantea el tipo de recipiente adecuado para tal fin y su etiquetado y sugiere la utilización de la conservación de muestras con solución de Lugol para el conteo de fitoplancton y la conservación con soluciones ácidas cuando se realicen análisis de clorofila y otros pigmentos. Las Soluciones de glutaraldehído y Lugol son los más comúnmente utilizadas, otros incluyen formalina, mertiolato y fijador "M3". Además, la adición de unos pocos cristales de sulfato de cobre a cualquier solución de conservante ayuda a mantener el color de las algas. Alerta sobre el riesgo químico de los conservantes y sugiere consultar las hojas de seguridad de los reactivos antes de trabajar con cualquier conservante haciendo énfasis en que el glutaraldehído y la formalina, en particular, se deben utilizar en un área bien ventilada o campana de flujo laminar

Solución de Lugol: se puede utilizar para la mayoría de los organismos flagelado, tiñe los organismos que almacenan almidón (especialmente Chlorophyta y criptofitas) y fija la mayoría de las cianobacterias. Desafortunadamente, la solución de Lugol ácida disuelve los cocolitos de los cocolitóforos (que son comunes en las

aguas estuarinas y marinas), en agua dulce las crisófitas y algunas colonias de cianobacterias (especialmente *Microcystis* y *Aphanizomenon*) se desintegran, y las muestras deben ser fijadas de 6 a 12 meses, debido a su volatilidad.

Para conservar las muestras con solución de Lugol, añadir 0,3 ml de solución Lugol a 100 ml de muestra y almacenar en la oscuridad. Para el almacenamiento a largo plazo, añadir 0,7 ml de solución Lugol a 100 ml de muestra. La muestra debe ser similar a un té suave. Si la solución de Lugol no se puede volver a agregar cada 6 a 12 meses, añadir formalina tamponada a un mínimo de concentración final de 2,5% después de 1 h (sin embargo, la formalina tiende a distorsionar muchas células). Alternativamente, el glutaraldehído puede ser añadido a una concentración final de 0,25 a 0,5%, lo que resulta en una menor distorsión de la célula.

Para preparar la solución de Lugol se adicionan 20 g de yoduro de potasio (KI) y 10 g de cristales de yodo en 200 ml de agua destilada que contengan ácido acético glacial 20 ml (24). La modificación de Utermöhl (25) de la solución de Lugol resulta una solución neutra o ligeramente alcalina, se prepara modificando la solución de Lugol, adicionando 10 g KI y 5 g de cristales de yodo en 20 ml de agua destilada, a continuación, se añade 50 ml de agua destilada en la que previamente se ha disuelto 5 g de acetato de sodio anhidro. Esto preserva cocolitóforos (que son más comunes en las aguas marinas), pero es menos eficaz para otros flagelados.

Glutaraldehído: El glutaraldehído es del mismo grupo químico de la formalina, pero a una concentración mucho más baja (0,25 a 0,5% frente a la concentración final de 3 a 4%). Glutaraldehído también causa daño mínimo en las estructuras de la muestra, tiende a preservar la estructura de las colonia de algas, las muestras pueden durar varios años sin degradarse (la formalina puede formar cristales después de 15 Años) Preservar las muestras mediante la adición de glutaraldehído neutralizado para dar una concentración final de 0,25 a 0,5%. Si la muestra es extremadamente densa utilizar una concentración máxima de 1% de glutaraldehído.

Se recomienda utilizar botellas de color ámbar u opacas de modo que se puede utilizar en análisis de autofluorescencia. Cuando una muestra conservada ha sido sacudida después de un tiempo de reacción adecuado (aproximadamente 1 h), la muestra debe desarrollar efervescencia temporal en la superficie. Una vez que se conserva con glutaraldehído, reducir la exposición directa a la luz. Cuando la

concentración de glutaraldehído sea mayor o igual al 25% trabajar en campana de gases y en un lugar bien ventilado.

Formol: Para preservar muestras con formalina, añadir 40 ml de formalina tamponada [20 g de borato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_4$) 1 L 37% de formaldehído] para 1 L de la muestra inmediatamente después de la recogida. Al igual que con glutaraldehído, en soluciones concentrada de formaldehído trabajar en campana de gases químicos y en un área bien ventilada. En las colecciones marinas y estuarinas, ajustar el pH a al menos 7,5 con borato de sodio para muestras que contienen coccolitóforos (26).

Merthiolate: Para preservar muestras con merthiolate, agregar 36 ml solución de merthiolate a 1 L de muestra y almacenarse en la oscuridad. Preparar la solución de merthiolate disolviendo 1,0 g merthiolate, 1,5 g de borato de sodio y una solución de 1,0 ml Lugol en 1 litro de agua destilada. Las muestras fijadas no son estériles, pero se pueden mantenerse de manera efectiva por 1 año, el cual después de ese tiempo debe añadirse formalina o glutaraldehído.

Fijador "M3": preparar disolviendo 5 g de KI, 10 g de yodo, 50 ml ácido acético glacial, y 250 ml de formalina en 1 L de agua destilada (disolver el yoduro en una pequeña cantidad de agua para ayudar en la solución de yodo). Añadir 20 ml de fijador a 1 L de muestra y almacenar en la oscuridad.

La mayoría de los conservantes distorsionan y alteran ciertas células, (27) especialmente aquellos con estructuras delicadas (por ejemplo, Euglena, Cryptomonas, Synura, Chromulina y Mallomonas). La solución de glutaraldehído generalmente es menos perjudicial para tales fitoflagelados, aunque todos los conservantes crean un cierto nivel de preservación. Para familiarizarse con especímenes vivos y las distorsiones causadas por la preservación, utilice material de colección de referencia de las casas de suministros biológicos, trabajar ampliamente con material vivo, y consultar a los compañeros de trabajo con experiencia. Rigor taxonómico sobre proyectos a largo plazo es fundamental. Documentar la base para la identificación cuidado, asegurándose de que la variación morfológica se describe con claridad y que las referencias de identificación sean acordes con los datos.

7. RESULTADOS

7.1 ANÁLISIS CUALITATIVO DE FITOPLANCTON.

Se analizaron en laboratorio 20 muestras de fitoplancton previamente colectadas y preservadas con dos soluciones fijadoras diferentes (solución Transeau y solución ácida de Lugol), estas fueron sometidas a dos tratamientos de la siguiente manera ; 10 muestras de fitoplancton fijadas con solución Transeau (códigos de muestras RTF) y 10 fijadas con solución de Lugol (Códigos de muestras RLF). Ver Tabla 1.

Tabla 1 Réplicas de muestra de fitoplancton fijadas con Solución Transeau y Lugol

Réplicas Muestras de Fitoplancton										
Solución Transeau	RTF1	RTF2	RTF3	RTF4	RTF5	RTF6	RTF7	RTF8	RTF9	RTF10
Solución de Lugol	RLF1	RLF2	RFL3	RFL4	RFL4	RFL6	RFL7	RFL8	RFL9	RFL10

RTF: Replica Transeau Fitoplancton **RLF:** Replica Lugol Fitoplancton

Se realizó la identificación taxonómica a nivel de género de cada una de las réplicas fijadas con solución transeau, en estas se encontraron las siguientes Morfoespecies; ***Euglena Sp.***, ***Pediastrum Sp.***, ***Phacus Sp.***, ***Scenedesmus Sp.***, ***Surirella Sp.*** Adicionalmente se realizó la cuantificación de los individuos/ml de cada morfoespecie, este seguimiento se realizó semanalmente durante 30 días y los resultados se pueden apreciar en la Tabla 2.

Las réplicas fijadas con solución Lugol también se les realizó la identificación taxonómica a nivel de género de cada una de las, en estas al igual que en las muestras fijadas con solución Transeau se encontraron las siguientes Morfoespecies; ***Euglena Sp.***, ***Pediastrum Sp.***, ***Phacus Sp.***, ***Scenedesmus Sp.***, ***Surirella Sp.*** Adicionalmente se realizó la cuantificación de los individuos/ml de cada morfoespecie, este seguimiento se realizó semanalmente durante 30 días y los resultados se ilustran en la Tabla 3.

Tabla 2 Abundancias de morfoespecies fitoplanctonicas identificadas en muestras fijadas con solución Transeau durante 4 semanas.

Semanas	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4	
Morfoespecies	Individuos/MI		Individuos/ mL		Indiiduos/ mL		Individuos /mL	
Euglena Sp.	RTF1 15	RTF6 17	RTF1 13	RTF6 18	RTF1 19	RTF6 12	RTF1 18	RTF6 11
	RTF2 14	RTF7 21	RTF2 16	RTF7 20	RTF2 11	RTF7 17	RTF2 13	RTF7 16
	RTF3 19	RTF 8 11	RTF3 17	RTF 8 14	RTF3 14	RTF 8 17	RTF3 12	RTF 8 18
	RTF4 19	RTF 9 20	RTF4 18	RTF 9 17	RTF4 16	RTF 9 22	RTF4 21	RTF 9 17
	RTF 5 23	RTF10 18	RTF 5 21	RTF10 19	RTF 5 17	RTF10 19	RTF 5 19	RTF10 20
Pediastrum Sp.	RTF1 3	RTF 5	RTF1 3	RTF6 4	RTF1 3	RTF6 5	RTF1 3	RTF6 4
	RTF2 4	RTF7 4	RTF2 4	RTF7 3	RTF2 0	RTF7 5	RTF2 3	RTF7 3
	RTF3 4	RTF 8 3	RTF3 3	RTF 8 6	RTF3 3	RTF 8 2	RTF3 3	RTF 8 4
	RTF4 6	RTF 9 2	RTF4 2	RTF 9 5	RTF4 2	RTF9 3	RTF4 2	RTF 9 5
	RTF 5 4	RTF10 0	RTF 5 2	RTF10 4	RTF 5 5	RTF10 2	RTF 5 0	RTF10 3
Phacus Sp.	RTF1 1	RTF6 2	RTF1 0	RTF6 1	RTF1 1	RTF6 2	RTF1 1	RTF6 2
	RTF2 2	RTF7 0	RTF2 1	RTF7 1	RTF2 2	RTF7 1	RTF2 2	RTF7 1
	RTF3 0	RTF 8 1	RTF3 2	RTF 8 3	RTF3 1	RTF 8 1	RTF3 1	RTF 8 2
	RTF4 0	RTF 9 2	RTF4 1	RTF 9 2	RTF4 1	RTF 9 2	RTF4 2	RTF 9 1
	RTF 5 2	RTF10 1	RTF 5 2	RTF10 0	RTF 5 0	RTF10 1	RTF 5 1	RTF10 1
Scenedesmus Sp.	RTF1 10	RTF6 8	RTF1 8	RTF6 9	RTF1 7	RTF6 8	RTF1 0	RTF6 8
	RTF2 8	RTF7 11	RTF2 9	RTF7 10	RTF2 9	RTF7 8	RTF2 9	RTF7 9
	RTF3 10	RTF 8 11	RTF3 9	RTF 8 11	RTF3 7	RTF 8 9	RTF3 10	RTF 8 8
	RTF4 9	RTF 9 7	RTF4 8	RTF 9 10	RTF4 9	RTF 9 9	RTF4 8	RTF 9 9
	RTF 5 11	RTF10 8	RTF 5 9	RTF10 9	RTF 5 8	RTF10 10	RTF 5 8	RTF10 9
Surirella Sp.	RTF1 21	RTF6 23	RTF1 20	RTF6 20	RTF1 21	RTF6 19	RTF1 19	RTF6 20
	RTF2 19	RTF7 22	RTF2 21	RTF7 21	RTF2 20	RTF7 18	RTF2 22	RTF7 21
	RTF3 20	RTF 8 22	RTF3 22	RTF 8 21	RTF3 21	RTF 8 22	RTF3 19	RTF 8 20
	RTF4 21	RTF 9 22	RTF4 20	RTF 9 20	RTF4 22	RTF 9 21	RTF4 23	RTF 9 21
	RTF 5 20	RTF10 21	RTF 5 19	RTF10 20	RTF 5 22	RTF10 19	RTF 5 20	RTF10 22

Tabla 3 Abundancias de morfoespecies Fitoplanctonicas identificadas en muestras fijadas con solución Transeau durante 4 semanas.

Semanas	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4	
Morfoespecies	Individuos/mL		Individuos/ mL		Indiuiduos/ mL		Individuos /mL	
Euglena Sp.	RLF1 15	RLF6 16	RLF1 12	RLF6 17	RLF1 19	RLF6 12	RLF1 18	RLF6 11
	RLF2 13	RLF7 22	RLF2 18	RLF7 19	RLF2 11	RLF7 17	RLF2 13	RLF7 16
	RLF3 14	RLF 8 17	RLF3 17	RLF 8 15	RLF3 14	RLF 8 17	RLF3 17	RLF 8 18
	RLF4 18	RLF 9 22	RLF4 18	RLF 9 16	RLF4 16	RLF 9 22	RLF4 19	RLF 9 21
	RLF 5 22	RLF10 190	RLF 5 21	RLF10 18	RLF 5 17	RLF10 20	RLF 5 17	RLF10 22
Pediastrum Sp.	RLF1 5	RLF 5	RLF1 4	RLF6 0	RLF1 5	RLF6 5	RLF1 1	RLF6 4
	RLF2 4	RLF7 4	RLF2 5	RLF7 2	RLF2 4	RLF7 3	RLF2 2	RLF7 2
	RLF3 4	RLF 8 4	RLF3 3	RLF 8 5	RLF3 4	RLF 8 1	RLF3 4	RLF 8 4
	RLF4 5	RLF 9 3	RLF4 4	RLF 9 3	RLF4 3	RLF9 4	RLF4 3	RLF 9 4
	RLF 5 5	RLF10 2	RLF 5 4	RLF10 4	RLF 5 4	RLF10 3	RLF 5 2	RLF10 2
Phacus Sp.	RLF1 2	RLF6 2	RLF1 0	RLF6 2	RLF1 2	RLF6 1	RLF1 2	RLF6 2
	RLF2 1	RLF7 1	RLF2 2	RLF7 2	RLF2 1	RLF7 3	RLF2 1	RLF7 2
	RLF3 1	RLF 8 2	RLF3 1	RLF 8 3	RLF3 2	RLF 8 2	RLF3 1	RLF 8 2
	RLF4 0	RLF 9 2	RLF4 1	RLF 9 2	RLF4 1	RLF 9 0	RLF4 1	RLF 9 1
	RLF 5 2	RLF10 1	RLF 5 2	RLF10 2	RLF 5 2	RLF10 1	RLF 5 2	RLF10 0
Scenedesmus Sp.	RLF1 9	RLF6 9	RLF1 7	RLF6 8	RLF1 9	RLF6 9	RLF1 8	RLF6 8
	RLF2 6	RLF7 12	RLF2 8	RLF7 9	RLF2 8	RLF7 9	RLF2 9	RLF7 9
	RLF3 11	RLF 8 10	RLF3 10	RTF 8 11	RLF3 10	RLF 8 8	RLF3 10	RLF 8 8
	RLF4 10	RLF 9 8	RLF4 9	RLF 9 10	RLF4 10	RLF 9 11	RLF4 8	RLF 9 9
	RLF 5 10	RLF10 9	RLF 5 10	RLF10 12	RLF 5 11	RLF10 9	RLF 5 8	RLF10 9
Surirella Sp.	RLF1 24	RLF6 22	RLF1 20	RLF6 19	RLF1 21	RLF6 19	RLF1 19	RLF6 20
	RLF2 21	RLF7 21	RLF2 21	RLF7 21	RLF2 20	RLF7 18	RLF2 22	RLF7 21
	RLF3 19	RLF 8 22	RLF3 23	RLF 8 22	RLF3 19	RLF 8 20	RLF3 19	RLF 8 19
	RLF4 20	RLF 9 22	RLF4 21	RLF 9 23	RLF4 22	RLF 9 21	RLF4 22	RLF 9 20
	RLF 5 21	RLF10 23	RLF 5 20	RLF10 21	RLF 5 21	RLF10 19	RLF 5 21	RLF10 20

7.2 ANÁLISIS CUALITATIVO DE PERIFITON.

Se realizó el análisis de 20 muestras de perifiton algal, previamente colectadas y preservadas con dos soluciones fijadoras diferentes (solución Transeau y solución acida de Lugol) a las cuales se les realizaron dos tratamientos; 10 muestras de perifiton fijadas con solución Transeau (Código de muestras RTP) y 10 fijadas con solución de Lugol (Código de muestras RLP), ver Tabla 4.

Tabla 4 Réplicas de muestra de perifiton algal fijadas con Solución Transeau y Lugol.

Réplicas Muestras de Perifiton Algal										
Solución Transeau	RTP1	RTP2	RTP3	RTP4	RTP 5	RTP6	RTP 7	RTP 8	RTP 9	RTP10
Solución de Lugol	RLP 1	RLP 2	RLP 3	RLP4	RLP4	RLP6	RLP 7	RLP 8	RLP 9	RLP 10

RTP: Replica Transeau Perifiton

RTL: Replica Lugol Perifiton

Se realizó la identificación taxonómica a nivel de género de cada una de las réplicas fijadas con solución Lugol, se encontraron las siguientes Morfoespecies; ***Closterium Sp.***, ***Eunotia Sp.***, ***Nitzschia Sp.***, ***Synedra Sp.*** Adicionalmente se realizó la cuantificación de los individuos/ml de cada morfoespecie, este seguimiento se realizó semanalmente durante 30 días y los resultados se ilustran en la

Tabla 5. Abundancias de morfoespecies perifíticas identificadas en muestras fijadas con solución Transeau durante 4 semanas.

Semanas	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4	
Morfoespecies	Individuos/mL		Individuos/ mL		Individuos/ mL		Individuos /mL	
Closterium Sp.	RTP1 38	RTP6 40	RTP1 37	RTP6 36	RTP1 39	RTP6 37	RTP1 36	RTP6 38
	RTP2 37	RTP7 37	RTP2 38	RTP7 39	RTP2 36	RTP7 38	RTP2 37	RTP7 38
	RTP3 40	RTP 8 36	RTP3 42	RTP 8 40	RTP3 41	RTP 8 38	RTP3 36	RTP 8 38
	RTP4 42	RTP 9 35	RTP4 38	RTP 9 37	RTP4 36	RTP 9 37	RTP4 38	RTP 9 37
	RTP5 39	RTP10 38	RTP 5 41	RTP10 39	RTP 5 37	RTP10 39	RTP 5 39	RTP10 40
Eunotia Sp.	RTP1 63	RTP6 62	RTP1 68	RTP6 61	RTP1 68	RTP6 65	RTP1 63	RTP6 60
	RTP2 68	RTP7 66	RTP2 64	RTP7 63	RTP2 66	RTP7 70	RTP2 65	RTP7 63
	RTP3 64	RTP 8 59	RTP3 63	RTP 8 68	RTP 3 71	RTP 8 61	RTP3 67	RTP 8 62
	RTP4 65	RTP 9 66	RTP4 63	RTP 9 65	RTP 4 64	RTP 9 63	RTP 4 64	RTP 9 63
	RTP 5 65	RTF10 67	RTP 5 71	RTP10 68	RTP 5 66	RTP10 69	RTP 5 58	RTP10 61
Nitzschia Sp.	RTP1 48	RTP6 51	RTP1 49	RTP6 53	RTP1 52	RTP6 54	RTP1 51	RTP6 37
	RTP2 52	RTP7 49	RTP2 47	RTP7 49	RTP2 46	RTP7 46	RTP2 43	RTP7 38
	RTP3 51	RTP 8 47	RTP3 53	RTP 8 43	RTP3 57	RTP 8 44	RTP3 38	RTP 8 43
	RTP4 55	RTP 9 44	RTP4 46	RTP 9 41	RTP4 52	RTP 9 43	RTP4 48	RTP 9 41
	RTP 5 48	RTP10 47	RTP 5 49	RTP10 48	RTP 5 46	RTP10 49	RTP 5 45	RTP10 44
Synedra Sp.	RTP1 22	RTP6 24	RTP1 26	RTP6 29	RTP1 25	RTP6 23	RTP1 22	RTP6 23
	RTP2 23	RTP7 24	RTP2 28	RTP7 26	RTP2 25	RTP7 24	RTP2 22	RTP7 24
	RTP3 26	RTP 8 22	RTP3 29	RTP 8 27	RTP3 26	RTP 8 21	RTP3 23	RTP 8 25
	RTP4 22	RTP 9 25	RTP4 27	RTP 9 25	RTP4 23	RTP 9 22	RTP4 21	RTP 9 25
	RTP 5 27	RTP10 27	RTP 5 24	RTP10 25	RTP 5 23	RTP10 22	RTP 5 21	RTP10 23

Tabla 6. Abundancias de morfoespecies perifíticas identificadas en muestras fijadas con solución Lugol durante 4 semanas.

Semanas	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4	
Morfoespecies	Individuos/mL		Individuos/ mL		Indiuiduos/ mL		Individuos /mL	
Closterium Sp.	RLP1 39	RLP6 37	RLP1 38	RLP6 36	RLP1 33	RLP6 32	RLP1 36	RLP6 35
	RLP2 38	RLP7 37	RLP2 36	RLP7 37	RLP2 35	RLP7 34	RLP2 35	RLP7 36
	RLP3 36	RLP 8 34	RLP3 34	RLP 8 36	RLP3 34	RLP 8 35	RLP3 36	RLP 8 35
	RLP4 34	RLP 9 35	RLP4 36	RLP 9 34	RLP4 32	RLP 9 34	RLP4 36	RLP 9 34
	RLP 5 37	RLP10 36	RLP 5 32	RLP10 37	RLP 5 35	RLP10 32	RLP 5 32	RLP10 35
Eunotia Sp.	RLP1 61	RLP 59	RLP1 62	RLP6 63	RLP1 61	RLP6 60	RLP1 62	RLP6 59
	RLP2 58	RLP7 62	RLP2 57	RLP7 62	RLP2 56	RLP7 54	RLP2 55	RLP7 57
	RLP3 66	RLP 8 61	RLP3 35	RLP 8 34	RLP3 35	RLP 8 34	RLP3 34	RLP 8 34
	RLP4 5	RLP 9 3	RLP4 4	RLP 9 3	RLP4 3	RLP9 4	RLP4 3	RLP 9 4
	RLP 5 5	RLP10 2	RLP 5 4	RLP10 4	RLP 5 4	RLP10 3	RLP 5 2	RLP10 2
Nitzschia Sp.	RLP1 2	RLP6 2	RLP1 0	RLP6 2	RLP1 2	RLP6 1	RLP1 2	RLP6 2
	RLP2 1	RLP7 1	RLP2 2	RLP7 2	RLP2 1	RLP7 3	RLP2 1	RLP7 2
	RLP3 1	RLP 8 2	RLP3 1	RLP 8 3	RLP3 2	RLP 8 2	RLP3 1	RLP 8 2
	RLP4 0	RLP 9 2	RLP4 1	RLP 9 2	RLP4 1	RLP 9 0	RLP4 1	RLP 9 1
	RLP 5 2	RLP10 1	RLP 5 2	RLP10 2	RLP 5 2	RLP10 1	RLP 5 2	RLP10 0
Synedra Sp.	RLP1 21	RLP6 24	RLP1 7	RLP6 8	RLP1 9	RLP6 9	RLP1 8	RLP6 8
	RLP2 23	RLP7 25	RLP2 8	RLP7 9	RLP2 8	RLP7 9	RLP2 9	RLP7 9
	RLP3 22	RLP 8 10	RLP3 10	RLP 8 11	RLP3 10	RLP 8 8	RLP3 10	RLP 8 8
	RLF4 24	RLF 9 8	RLF4 9	RLF 9 10	RLF4 10	RLF 9 11	RLF4 8	RLF 9 9
	RLF 5 23	RLF10 9	RLF 5 10	RLF10 12	RLF 5 11	RLF10 9	RLF 5 8	RLF10 9

BIBLIOGRAFIA

1. Agentes químicos en el ámbito sanitario Escuela Nacional de Medicina del Trabajo (ENMT) Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Ciencias e Innovación, Madrid 2010. Pascual del Rio.
2. Anatomía Patológica en España, 235-250. Sociedad Española de Anatomía Patológica, Madrid.
3. Álvarez-Blanco, I. 2008a. Análisis de calidad de las aguas de los ríos de la cuenca hidrográfica del Duero utilizando índices diatomológicos. Tesis de licenciatura. Universidad de León, León, 146 pp.
4. Conforti, V. 1991. Taxonomic study of the Euglenophyta of a highly polluted river of Argentina. *Nova Hedwigia* 53 (1-2): 73-98
5. Córdoba Iturriagagoitia A, Eguaras Mendiri F: Prevención de Riesgos Laborales. Libro Blanco 2009 de la Anatomía Patológica en España, 235-250. Sociedad Española de Anatomía Patológica, Madrid.
6. CEN. European Committee for Standardization. 2004 /TC 230. Water Quality. Standard for the routine analysis of phytoplankton abundance and composition using inverted microscopy (Utermöhl technique), 1-38 pp.
7. Crispino L.M.B. & Sant. Anna C.L. 2006. Cianobacterias marinhas bentônicas de ilhas costeiras do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasil. Bot.*, V.29, n.4, p.639-656, oct-dic.
8. Edmondson, W.T., ed. 1959. *Freshwater Biology*, 2nd ed. John Wiley and Sons, New York, N.Y.
9. Fredrick, J. F., Ed., *Origins and Evolution of Eukaryotic Intracellular Organelles*, The New York Academy of Sciences, New York, 1981.
10. Giannuzzi, L., A. Colombi, T. Pruyas, A. Aun, M. Rujana, M. Falcione & J. Zubieta 2009. Cianobacterias y cianotoxinas: identificación, toxicología monitoreo y evaluación de riesgo. *Corrientes, Moglia Impresiones*: 238pp.

11. Giménez Mas José Antonio y varios: Alternativas al formol como fijador de piezas y tejidos anatómicos. Libro Blanco de la Anatomía Patológica en España suplemento 2011, p. 101 - 140 Sociedad Española de Anatomía Patológica, Madrid.
12. Kamada, D., Méndez, M.S., Rolón, M.; Vega, M.C., y Rojas de Arias, A. Técnica modificada para la evaluación de fitoplancton como indicador de calidad de agua. Primer Congreso Paraguayo sobre Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible y Novena Jornada de Biología del Paraguay, 28 al 30 de julio, Asunción, Paraguay.
13. Metodología para el establecimiento del Estado Ecológico según la Directiva Marco del Agua. Protocolos de muestreo y análisis para fitoplancton. 2005. Ministerio de Medio Ambiente. Confederación Hidrográfica del Ebro. Comisaría de Aguas. Zaragoza.
14. Moreira, J.A. (1988) Productividade Primária do Periphyton em viveiros destinados a piscicultura. Dissertação do Mestrado, Univ. Federal de Bahia, Brasil. 250 p.
15. Montoya-Moreno, Y. y N. Aguirre. 2013. Estado del arte del conocimiento sobre perifiton en Colombia. Revista Hidrobiológica 18(3): pp. 91-117.
16. Phytoplankton abundance and composition using inverted microscopy (Utermöhl technique), 1-38 pp.
17. Silva, L.H. 1999. fitoplâncton de um reservatário eutrífico (lago monte alegre), ribeirão preto, sã paulo, brasil. Laboratorio de Ficologia, Departamento de Botânica, Museu Nacional, UFRJ, Quinta da Boa Vista, CEP 20940-040, S.º Crist.v.o, RJ.
18. Utermöhl, H. (1958). Zur Vervollkommnung der quantitative Phytoplankton Methodik Mitt.Int.
19. Metodología para el establecimiento del Estado Ecológico según la Directiva Marco del Agua. Protocolos de muestreo y análisis para fitobentos (Microalgas Bentónicas). 2005. Ministerio de Medio Ambiente. Confederación Hidrográfica del Ebro. Comisaría de Aguas. Zaragoza.

20. Paerl, H.W. 1984. An evaluation of freeze fixation as a phytoplankton preservation method for microautoradiography. *Limnol. Oceanog.* 29:417.
21. Salmaso, N., y Padisák, J. (2007). Morpho-functional groups and phytoplankton development in two deep lakes (lake Garda, Italy and lake Stechlin, Germany). *Hydrobiologia*, 578(1): 97-112.
22. Sant'anna, C. L., Zanini L. H y Azevedo. M. T. 2004. Cyanophyceae Cyanobacteria. En: Carlos E. de M. Bicudo, Mariângela Menezes (Ed). *Gêneros De Algas De Águas Continentais Do Brasil Chave Para Identificação E Descrições Segunda Edição*. Rima. São Carlos pág.19- 82.
23. Utermohl, H. 1958. Zur Vervollkommung der quantitativen phytoplankton Methodik. *Mitt. Int. Ver. Limnol.* No. 9.
24. Vázquez G., Castro G., González I., Pérez R., y Castro T. 2006. Bioindicadores como herramientas para determinar la calidad del agua.
25. Weber, C.I. 1968. The preservation of phytoplankton grab samples. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* 87:70.
26. Wetzel, R.G. (ed.) 1983 periphyton of aquatic ecosystem. B.V. Junk, The Hague, Holanda. 346 p.
27. Willén T (1962) Studies on the phytoplankton of some lakes connected with or recently isolated from the Baltic. *Oikos* 13: 169-199
28. Molist, P., Pombal, M.A., y Megias. M. 2011. Atlas de Histología Vegetal y Animal. Técnicas Histológicas Depto. de Biología Funcional y Ciencias de la Salud Facultad de Biología Universidad de Vigo. Pontevedra. Pag. 1-16