



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Departament de Ciències del Mar i Biologia Aplicada
Departamento de Ciencias del Mar y Biología Aplicada

***Efectos de la eutrofización en masas de agua costeras de la
provincia de Alicante***

Han intervenido en este informe:

José Luis Sánchez Lizaso (Coordinador)

Javier Aguilar Escribano

Fabio Blanco Murillo

Mercedes Varela Diaz de Tuesta

Iván Sola Maciá

Yoana del Pilar Ruso

JOSÉ LUIS SÁNCHEZ LIZASO, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático de la Universidad de Alicante CERTIFICA que el presente informe ha sido realizado bajo mi dirección.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente escrito, en Alicante a 30 de noviembre de 2020.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping strokes that form a stylized, somewhat abstract shape.

Fdo: Dr. José Luis Sánchez Lizaso

Efectos de la eutrofización en masas de agua costeras de la provincia de Alicante

1 Justificación:

Las masas de agua situadas al sur de los puertos de Alicante y Santa Pola presentan una baja calidad ambiental debido a su elevada eutrofización. El objetivo del presente proyecto de investigación aplicada es estudiar la comunidad fitoplanctónica en ambas zonas para intentar relacionarla con las entradas de nutrientes y compararla con zonas control. Por otra parte se caracterizará la composición en isótopos estables de diferentes compartimentos biológicos para ver si puede ser una herramienta que permita discriminar la influencia de las fuentes de eutrofización.

2 Introducción

La eutrofización es uno de los principales impactos asociados a las actividades humanas las cuales han tenido un gran impacto global en los sistemas costeros. Las descargas de nutrientes, modifican los ciclos biogeoquímicos en estos sistemas y la estructura de las comunidades. Las principales fuentes que influyen directamente en el proceso de eutrofización de los sistemas costeros son el crecimiento de la población humana, los cambios en los usos del suelo y el uso masivo de fertilizantes nitrogenados y fosfatados.

Las zonas litorales “semicerradas” (tipo bahías pequeñas o calas) junto a los estuarios son áreas que se caracterizan por poseer mayores tiempos de residencia y un menor hidrodinamismo, además de ser puntos de descarga de nutrientes provenientes de ríos, aguas residuales urbanas y aguas de escorrentía lo que las hace particularmente sensibles al impacto de la eutrofización. Los nutrientes que podemos encontrar de manera habitual suelen ser formas nitrogenadas y fosfatadas, formas químicas que suelen ser aprovechadas de una manera muy eficiente por los organismos autótrofos, en especial por las microalgas.

El aumento del número de habitantes en muchas áreas litorales, en especial en la época estival, provoca el incremento de los efluentes antrópicos al medio marino aumentando la entrada de nutrientes pero también se produce una variación en la calidad y las proporciones de estos compuestos, a la vez que se modifican los flujos de aparición y sus lugares de descarga, variando las condiciones ambientales del medio receptor y favoreciendo el establecimiento e implementación de ciertos procesos biológicos, como es la aparición de ciertas especies o grupos de especies formadoras de los conocidos como eventos de Proliferaciones Algales Nocivas (PAN).

El área de San Gabriel ha sufrido varios eventos de este tipo (3 registrados desde 2009 hasta 2014) (Aguilar 2016) con efectos nocivos para la fauna marina como fue la muerte de peces observada en la playa y que fueron retirados por los servicios de limpieza municipales. El organismo causante de este tipo de eventos es un dinoflagelado *Gymnodinium impudicum*, considerado un organismo nocivo por sus efectos negativos sobre la flora y la fauna marinas.

Durante largo tiempo se han usado, de forma casi exclusiva, variables físico-químicas para llevar a cabo el establecimiento de la calidad del agua, pero en la actualidad para realizar una evaluación más cercana a la realidad, las políticas de gestión y control llevan consigo una combinación de variables físico-químicas e indicadores biológicos, como es el caso del fitoplancton, para el estudio de la columna de agua.

La entrada difusa de nutrientes al medio marino provenientes de la agricultura es otro factor antrópico que puede provocar eutrofización en el medio marino. Entre la localidad de Santa Pola y la de Guardamar se localiza la desembocadura del río Segura y la antigua desembocadura del río Vinalopó que drenan la escorrentía de una amplia zona de cultivo lo que puede influir en los resultados de calidad ambiental del medio marino obtenidos con la directiva marco de agua.

Unos indicadores que han sido empleados para identificar la eutrofización han sido los isótopos estables. Los isótopos estables son nucleidos no radioactivos de un elemento, es decir, átomos de un mismo elemento que tienen distinto peso molecular pero que no sufren decaimiento radiactivo espontáneo con el paso del tiempo. Por lo tanto, la proporción de los distintos isótopos en la materia es estable si no hay un proceso químico que la altere (Fry 2006).

Con el fin de detectar estos posibles cambios, en el estudio de isótopos estables se compara la proporción isotópica de la muestra a estudiar con un estándar de referencia de forma que todas las

medidas sean comparables. En este estudio se han analizado los dos elementos cuyos isótopos estables son lo más explicativos y los más utilizados para detectar el impacto ambiental en el medio marino, el carbono y el nitrógeno. La métrica empleada comúnmente para este tipo de análisis es la notación estándar *delta* (δ) que compara la razón isotópica de la muestra con la del valor estándar (Fry 2006; Li et al. 2016):

$$\delta (\text{‰}) = [(R_{\text{muestra}}/R_{\text{estándar}})-1] \cdot 1000$$

En el caso del carbono, el isótopo C12 es el más abundante y se analiza su proporción con su isótopo C13, siendo éste último más pesado. El estándar de referencia de la proporción C13/C12 es la composición de un microfósil marino, la Belemnita Pee Dee (VPDV) (Fry 2006). Las variaciones en el medio de esta variable se relacionan con cambios en la productividad primaria o fuentes abióticas de CO₂ atmosférico.

El nitrógeno se puede encontrar más comúnmente en forma de su isótopo más ligero N14, y en menor medida como N15. El estándar de referencia (N15/N14) es la ratio presente en el nitrógeno atmosférico. Éste es el isótopo estable más empleado en estudios tanto ambientales como ecológicos al estar relacionado tanto con el nivel trófico de un organismo, como con la asimilación de compuestos nitrogenados de distintos orígenes. Esto ocurre con los fertilizantes empleados en agricultura o con las aguas de desecho de los núcleos urbanos, que suelen estar claramente enriquecidas en N15 y permiten evaluar la contaminación de un punto de vertido estudiando, por ejemplo, la proporción de isótopos de nitrógeno en el sedimento (Robinson 2001; Fry 2006).

En el medio marino, el análisis de isótopos estables (AIE) se utiliza para estudio de niveles tróficos, especies invasoras, dinámica sedimentaria, nutrientes, etc. Pero sobre todo para el análisis y la trazabilidad de contaminación química (Mancinelli & Vizzini 2015).

Los organismos analizados en este estudio son el fitoplancton como principal sumidero de nutrientes en la columna de agua, y la fanerógama marina *Posidonia oceanica* como especie bentónica endémica de gran interés ambiental y hábitat prioritario.

3 Metodología

3.1 Área de estudio:

El área de estudio se compone de 4 localidades de muestreo: San Juan y Tabarca, consideradas como CONTROLES, en donde a priori no existe ningún aporte antrópico de nutrientes conocido; y San Gabriel y Santa Pola, consideradas como áreas de IMPACTO, donde la primera es un área influenciada por el emisario de la estación EDAR (Estación Depuradora de Aguas Residuales) del Rincón de León, y la segunda es una zona impactada por contaminación difusa probablemente relacionada con el aporte de nutrientes agrícolas (figura 3.1).

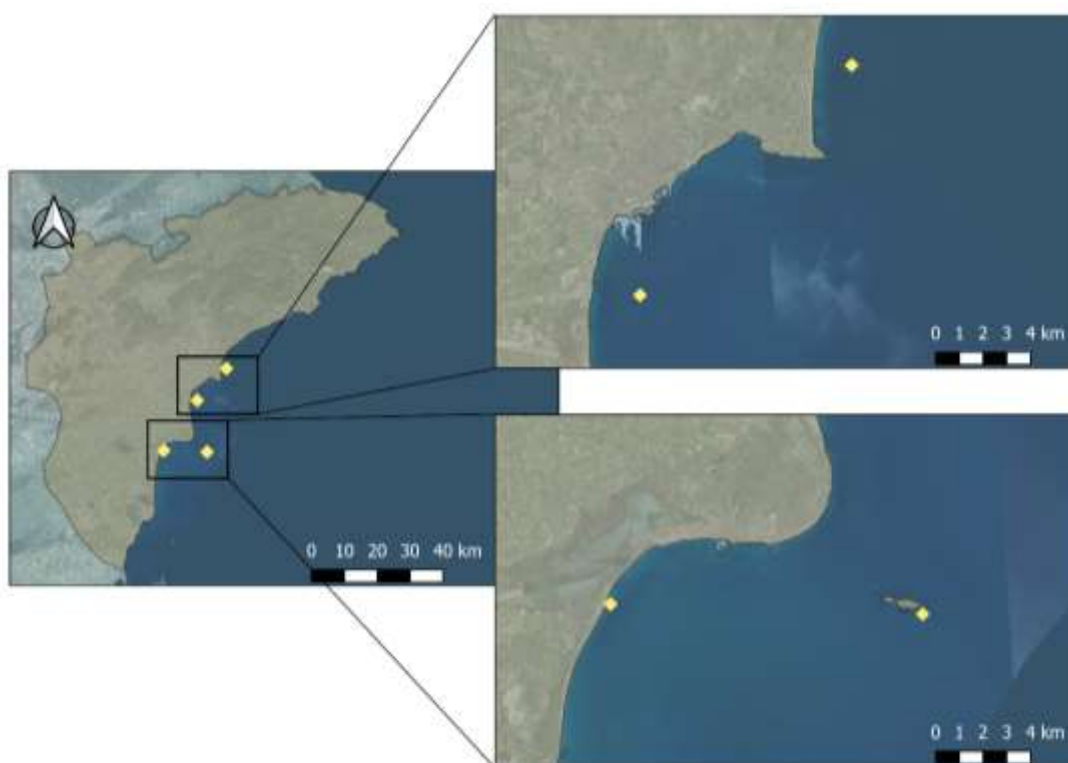


Figura 3.1: Puntos de muestreo para el AIE. San Gabriel-Campello (dcha. arriba) y Santa Pola-Tabarca (dcha. abajo).

3.2 Análisis de isótopos estables

Se han seleccionado dos compartimentos biológicos para el estudio de isótopos estables. Por una parte se ha estudiado el fitoplancton como base de la red trófica marina cuya abundancia y composición que se ven influidas por la disponibilidad de nutrientes. Por otra parte se ha estudiado *Posidonia oceanica*, un organismo bentónico de ciclo de vida mucho más largo y lento. En el caso de *Posidonia oceanica* se han estudiado dos fracciones las hojas y los rizomas. El análisis de las hojas, al tratarse de un tejido de renovación anual permite conocer la asimilación de un contaminante a lo largo del último año, aproximadamente. Por otro lado, el rizoma, al ser tejido con menor tasa de renovación, muestra las fracciones isotópicas acumuladas a lo largo de varios años.

a. *Fitoplancton*

Las muestras de fitoplancton se tomaron utilizando una red de arrastre de luz de maya de 200 μm . El arrastre para la obtención de las muestras es necesario para obtener una biomasa en peso seco suficiente para superar el umbral de detección del espectrómetro de masas y obtener la proporción de isótopos estables. En concreto, es necesario un mínimo de 15 μg de nitrógeno total para el análisis.

Una vez en el laboratorio, las muestras se filtraron con un filtro Whatman GF/F de forma que los organismos quedaran retenidos en el filtro. Después, los filtros se guardaron en la estufa 80°C 48 horas para secarlos y enviarlos a analizar (Mompeán et al. 2016).

b. *Posidonia oceanica*

En el caso de las muestras de *Posidonia oceánica*, las muestras se tomaron en los mismos puntos de muestreo de fitoplancton en Santa Pola y Tabarca, pero a una mayor distancia de costa en el caso de las estaciones de San Gabriel y Campello. Esta diferencia se debe a que la pradera de esta fanerógama marina ha sufrido una importante regresión durante los últimos años en la zona de San Gabriel y el límite superior de la pradera se encuentra a una profundidad aproximada de unos 15 metros. Por ello, estas dos estaciones se muestrearon a dicha profundidad.

En cada punto se tomaron 3 haces de *P. oceánica* de forma aleatoria y se llevaron al laboratorio donde se congelaron hasta su procesamiento. Se tomaron por un lado muestras de hoja y por otro de rizoma para analizar cada tejido por separado. En ambos casos se eliminaron los restos de epífitos presentes para evitar cualquier tipo de contaminación. Cada réplica se guardó en eppendorf con un orificio en la parte superior para su posterior liofilización. Todas las muestras se llevaron a un liofilizador durante 24 horas y después se trituraron usando nitrógeno líquido dejando la materia vegetal lo más pulverizada posible (Viana & Bode 2015). Después se guardaron las muestras en una estufa para evitar su hidratación hasta su envío para el análisis de isótopos estables.

La determinación de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ se llevó a cabo mediante combustión en un analizador FlashEA1112 (ThermoFinnigan) acoplado mediante una interfase Conflo II a un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas MAT253 (ThermoFinnigan).

Para el pesado de las muestras se emplearon cápsulas de estaño y una balanza UMX-2 (Mettler Toledo).

Para el análisis del porcentaje de nitrógeno y carbono totales en la muestra, se convirtieron en N_2 y CO_2 gas, para después producir una combustión instantánea en un tubo de cuarzo con oxidante a 1020°C en una atmósfera de helio enriquecida en oxígeno. Tras realizar una separación cromatográfica de los gases, éstos se introdujeron al espectrómetro de masas a través de una interfase.

En ambos casos los datos obtenidos fueron analizados empleando un análisis de la varianza (ANOVA) siguiendo los siguientes modelos lineales.

Fitoplancton:

$$X_{ijkln} = \mu + L_i + E_j + LE_{ij} + e_n$$

Posidonia oceanica:

$$X_{ijkln} = \mu + IC_i + T_j + ICT_{ij} + E_{l(i)} + TE_{j(l)} + e_n$$

Previo al análisis se comprobaron los requisitos de la normalidad de los datos estudiados mediante un test de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas usando el test de Bartlett (Underwood 1996).

3.3 Estudio de la comunidad fitoplanctónica

En cada estación se han tomado datos de parámetros físico-químicos (abióticos) y se han recogido muestras de agua marina para el posterior análisis de nutrientes y de parámetros biológicos como es el estudio de la comunidad fitoplanctónica.

3.3.1 Parámetros físico-químicos:

El pH, la temperatura y la conductividad se han medido in situ a una profundidad de 1 metro, mediante el uso de una sonda multiparamétrica Hanna mod HI9828 para el pH y la temperatura, y de sonda CTD modelo RBRconcerto3 para la conductividad.

La transparencia del agua se ha medido mediante el uso del disco de Secchi. Hay que indicar que debido a la baja profundidad que existe en algunas de las localidades de muestreo en algunas estaciones el disco de Secchi ha alcanzado el fondo.

Para el estudio de nutrientes se recogió una muestra mediante botella oceanográfica a una profundidad entre 0,5 y 1 metro para evitar la presencia de aceites y otros compuestos que pudiesen interferir en los posteriores análisis. En cada punto de muestreo se ha recogido 2 litros de agua de mar que se guardaban en una nevera de campaña para evitar la incidencia de la luz directa y facilitar su transporte. Una vez en el laboratorio, las muestras son filtradas mediante filtros de 0,22 micras, recogiendo un volumen entre 100 y 250 ml. Una vez realizado el filtrado, la muestra se congela hasta el momento de su análisis.

Los nutrientes analizados en este estudio han sido las principales especies nitrogenadas: nitritos, nitratos, amonio, junto con los fosfatos, el fósforo total y los silicatos. La metodología usada se basa en la determinación colorimétrica de los elementos disueltos en agua por sistema automatizado con flujo continuo segmentado (CFA) (ver anexo para más información).

3.3.2.- Comunidad de fitoplancton

Para el estudio de la comunidad de fitoplancton se recogió una muestra mediante botella oceanográfica a una profundidad de 1 metro para evitar la presencia de aceites y otros compuestos

que pudiesen interferir en los posteriores análisis. Se recogieron 200 ml de agua de mar y se almacenaron en un frasco de vidrio, guardando las muestras en una nevera de campaña para evitar así la incidencia de la luz solar y facilitar el traslado posterior al laboratorio.

Para efectuar los análisis cuantitativos de la comunidad de fitoplancton se ha seguido el método de Utermöhl, basado en la Norma UNE-EN 15204:2007: "*Calidad del agua. Guía para el recuento de fitoplancton por microscopía invertida*". La determinación e identificación de los organismos planctónicos se ha realizado mediante un microscopio óptico invertido Olympus CKX-41 con contraste de fases y equipo fotográfico.

Es importante destacar que este tipo de análisis se centra en el rango de tamaño del microplancton, es decir, la identificación está realizada sobre organismos con un tamaño entre 20 y 200 micras. La identificación de cualquier organismo con un tamaño inferior a las 20 micras es muy difícil debido a las técnicas usadas en este método y, por tanto, estos de casos serán identificados dentro del mayor grupo taxonómico, o directamente no serán incluidos en los listados. En este apartado estarían incluidos los nanoflagelados, los cuales pueden ser cuantificados, pero no identificados, apareciendo en los listados como Nanoflagelado s.d. (s.d. = sin determinar).

En todos y cada uno de los casos se considera individuo a cada célula, y de este modo, en los géneros típicamente coloniales como *Leptocylindrus* sp, *Skeletonema* sp, *Pseudo-nitzschia* sp, o *Chaetoceros* sp, se contabilizarán todos los individuos existentes en la colonia. En el caso de las cianofíceas se sigue el mismo principio, contabilizando cada individuo existente en la colonia.

Todas las especies encontradas han sido comprobadas usando distintas bases de datos, entre las que se encuentran el Registro Mundial de Especies Marinas (<http://www.marinespecies.org/>), o Algaebase (<https://www.algaebase.org/>) a fin de proporcionar una nomenclatura taxonómica actualizada de tales especies y géneros. Todas las muestras han sido analizadas por personal cualificado y especializado en análisis de fitoplancton marino, certificado por la Comisión Oceanográfica Intergubernamental (IOC-UNESCO).

En cada una de las campañas estacionales de muestreo se muestrearon tres días separados no más de 15 días entre sí para tener recogida la variabilidad temporal. Cada día se obtuvieron 4 muestras de las que se procesaron 3, guardándose la cuarta de reserva.

El muestreo de invierno previsto para marzo de 2020 no se pudo realizar por la pandemia y el muestreo de otoño de 2020 realizado en noviembre no se ha podido procesar todavía por lo que solamente se presentan los resultados de los muestreos de primavera y verano. Tampoco se han podido procesar de momento las muestras de sedimentos por el retraso en la adquisición del equipo necesario. Del mismo modo las muestras de pigmentos fotosintéticos están pendientes de análisis.

3.3.3.- Análisis de datos

Para el estudio de la estructura de la comunidad fitoplanctónica se han llevado a cabo el cálculo de diferentes índices, entre los que se encuentran el Índice de Diversidad de Shannon (H'), basado en la "Teoría de la Información", la cual mantiene que tanto la diversidad como la información en un sistema natural puede ser medida de forma similar a la información contenida en un código o mensaje. Este índice asume que los individuos se muestrean al azar a partir de una población indefinidamente grande y, además, presume que todas las especies están representadas en la muestra. Este índice es uno de los más utilizados en los análisis de carácter fitoplanctológico (UNEP/FAO/IOC), ya que es poco sensible a una identificación imprecisa y al olvido de especies representadas por pocos individuos. En este trabajo se ha usado este índice con logaritmo en base 2 (valor usado de forma común), pudiéndose utilizar cualquier otra base, aunque los resultados serán difícilmente comparables con otros trabajos. Otra característica importante de este índice es que tiene en cuenta tanto la riqueza en especies como la equitatividad de sus componentes.

Otro índice que se ha utilizado en este trabajo es el Índice de Equitatividad o de Pielou (J'). Este índice expresa la homogeneidad o heterogeneidad en la distribución de las especies en una determinada comunidad. Los valores de este índice oscilan entre 0 y 1, acercándose a la unidad cuanto más homogénea es la distribución de las especies en la biocenosis. Para el cálculo de los índices se ha realizado un análisis DIVERSE mediante el software PIMER 6+ (Clarke and Gorley, 2006).

Se ha llevado a cabo un Análisis de Componentes Principales (ACP), para ver, de una manera clara y sencilla, cuáles de las variables estudiadas ayudan a explicar la variabilidad observada respecto a las localidades muestreadas. Este tipo de análisis es apropiado cuando se trata de reducir la dimensión de una matriz de datos excesivamente grande por el número de variables que contiene,

y condensarlas en un número menor de variables ficticias (componentes) que sintetizen la mayor parte de la información (Fernández, 2009).

Para la realización del ACP se tuvieron en cuenta las variables de nutrientes: Nitritos (NO₂-), nitratos (NO₃-), amonio (NH₄⁺), fosfatos (PO₄³⁻), fósforo total (TP) y silicatos (SiO₄²⁻). Junto a estas variables abióticas se incluyeron las variables bióticas de abundancia celular y riqueza específica para cada una de las localidades en estudio y en ambas estaciones: primavera (P) y verano (V).

Adicionalmente se ha realizado un análisis de escalado multidimensional no métrico, también llamado n-MDS por sus siglas en inglés (non metric MultiDimensional Scaning). Este análisis se ha realizado usando el software PRIMER 6+ (Clarke and Gorley, 2006). Para ello a partir del cálculo de la matriz de similitud para la matriz de abundancias celulares de los diferentes taxones observados con base al coeficiente de similitud de Bray-Curtis y una transformación de los datos (Arhondistsis, 2003; Spatharis, 2007; Balkis, 2008), se calculó el agrupamiento jerárquico por grupos medios (group-average). La transformación usada en este caso ha sido la raíz cuadrada, para ajustar los datos a una aproximación normal de los mismos y ponderar la contribución de las especies raras frente a las comunes en las representaciones multivariantes (Gomis, 1992; Balkis, 2008; Nasrollahzadeh, 2008)..

Finalmente se realizó un análisis de la varianza o ANOVA para las diferentes especies de nutrientes analizadas, así como para la variable abundancia promedio, teniendo en cuenta el diseño experimental, se tomaron los factores “Estación” y “Localidad” como fijos y ortogonales, utilizando en todos los casos el siguiente modelo lineal:

$$X_{ijn} = \mu + E_i + L_j + EL_{(ij)} + e_n$$

Previo al análisis se comprobaron los requisitos de la normalidad de los datos estudiados según el test de Kolmogorov-Smirnov, y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Bartlett (Underwood 1996).

Tanto el análisis de componentes principales como el análisis ANOVA se han realizado mediante el uso del software libre RStudio (RStudio Team, 2020).

4 Resultados

4.1 Análisis de isótopos estables

4.1.1 Fitoplancton

La figura 4.1 representa el contenido en carbono y nitrógeno de las muestras de fitoplancton analizadas. Se observa un mayor contenido en nitrógeno en las estaciones impactadas, Santa Pola y San Gabriel, frente a las no impactadas (Campello y Tabarca). El porcentaje de carbono en cambio no presenta una tendencia clara ya que aunque la estación de Tabarca presenta los valores menores y la de Santa Pola los mayores, la estación de Campello presenta unos valores intermedios entre las dos estaciones impactadas. En ambos casos es significativa la interacción entre el factor impacto control y el factor estación (tabla 4.1)

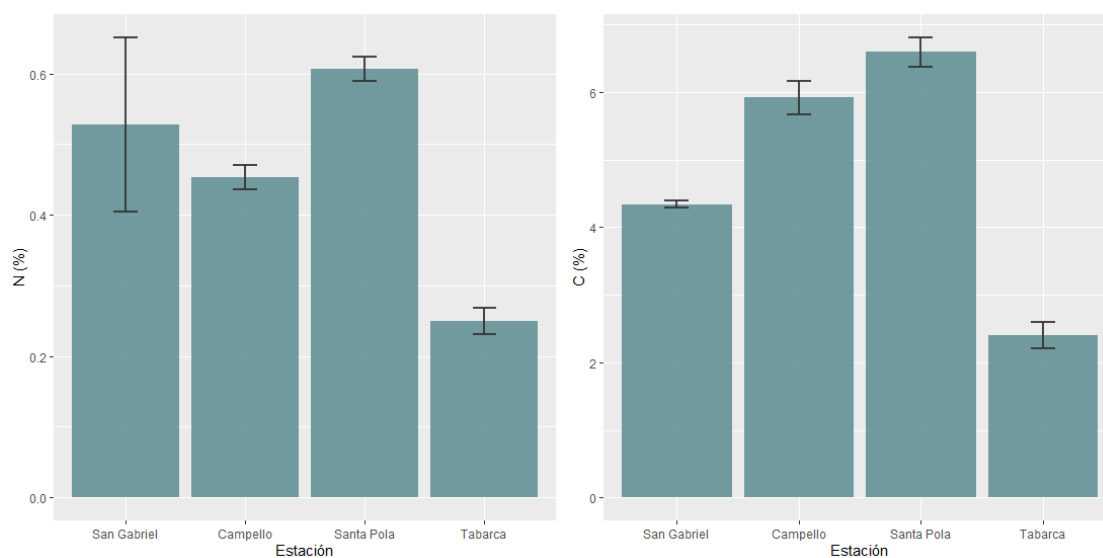


Figura 4.1: Porcentajes de nitrógeno (izda.) y carbono (dcha.) en las muestras de fitoplancton.

Tabla 4.1: Resultados del ANOVA para las muestras de fitoplancton. Valores de significancia estadística: (*) $p < 0.1$, (**) $p < 0.05$ y (***) $p < 0.01$.

Variable	Fuente de variación	G.l.	Sum. Sq	Mean Sq	F value	p value	Sign.
% Nitrógeno	IC	1	0.16333	0.16333	32.667	0.000446	***
	IC:Estacion	2	0.08333	0.04167	8.333	0.011064	**
	Residuals	8	0.04	0.005			
% Carbono	IC	1	5.333	5.333	136.2	2.65E-06	***
	IC:Estacion	2	26.433	13.217	337.4	1.88E-08	***
	Residuals	8	0.313	0.039			
$\delta^{15}\text{N}_{\text{aire}}$ (‰)	IC	1	18.25	18.253	11.233	0.01006	**
	IC:Estacion	2	31.68	15.842	9.749	0.00716	***
	Residuals	8	13	1.625			
$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰)	IC	1	1.02	1.021	102.1	7.86E-06	***
	IC:Estacion	2	36.75	18.374	1837.4	2.23E-11	***
	Residuals	8	0.08	0.01			

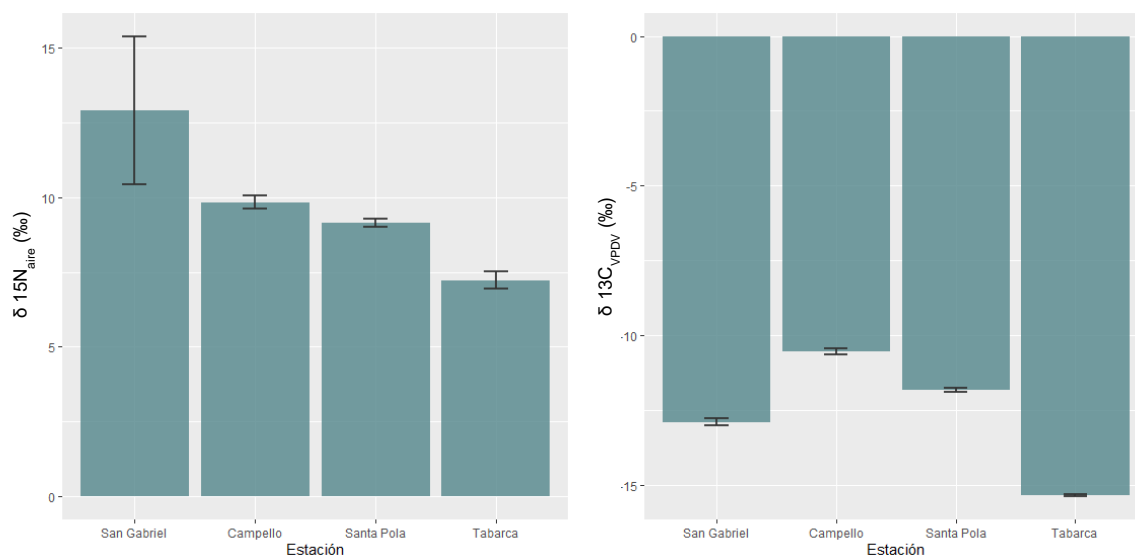


Figura 4.2: Valores obtenidos en cada estación de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ para las muestras de fitoplancton.

La huella isotópica (Figura 4.2) muestra claras diferencias entre la estación de San Gabriel, con un alto valor de $\delta^{15}\text{N}$, y el resto de muestras. Tabarca también muestra unas características muy concretas con bajos valores para ambos elementos. Las estaciones de Campello y Santa Pola presentan unas huellas isotópicas similares para ambos isótopos.

La segregación entre las diferentes estaciones se observa mejor en la figura 4.3 en las que las estaciones más alejadas son San Gabriel y Tabarca mientras que las estaciones de Campello y Santa Pola presentan posiciones intermedias.

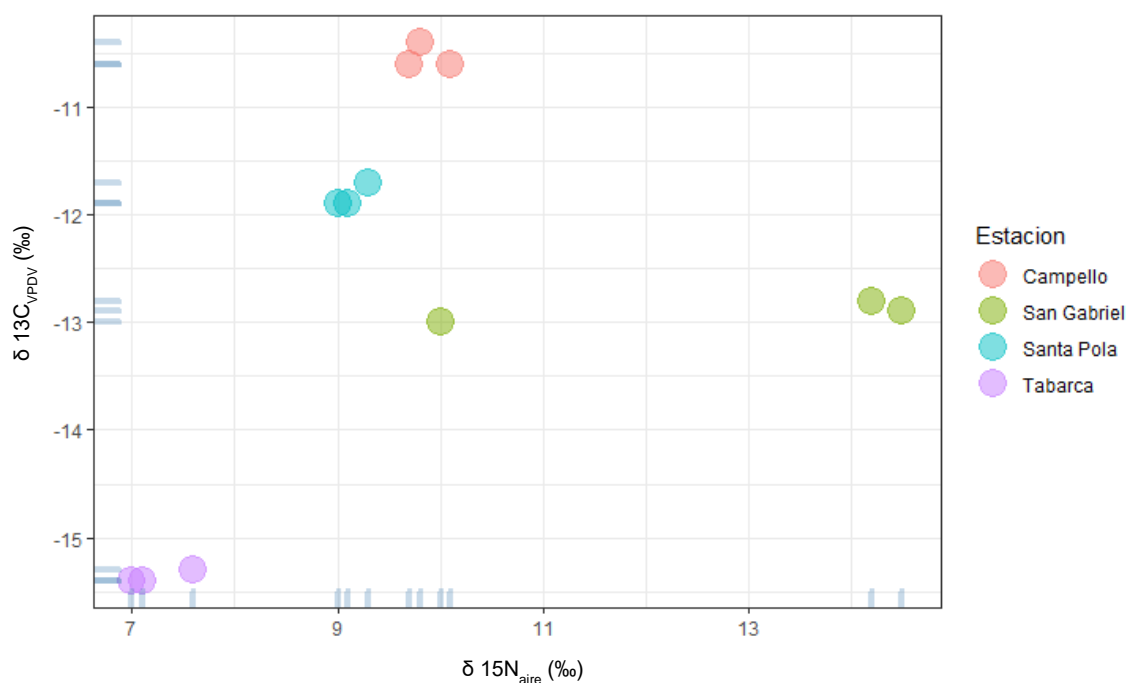


Figura 2.3: Caracterización isotópica completa de cada estación representando en cada eje los elementos analizados.

4.1.2 *Posidonia oceanica*

La proporción de nitrógeno y carbono en las muestras de *P. oceanica* mostraron valores siempre significativamente (Tabla 4.2) superiores en las muestras de rizoma en comparación con las hojas.

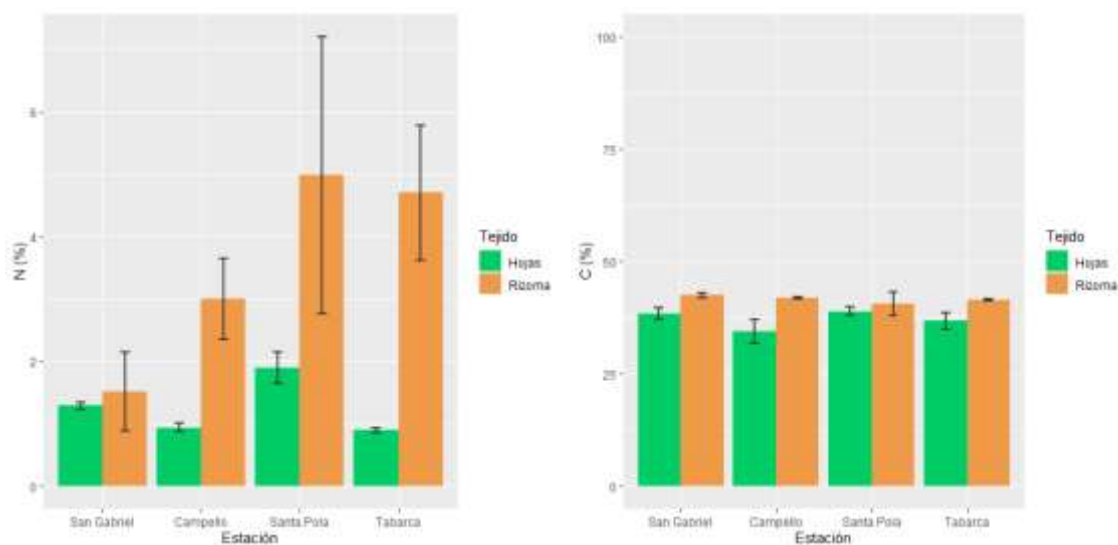


Figura 4.4: Porcentaje de carbono y nitrógeno en las muestras de *P. oceanica*.

El porcentaje de nitrógeno fue superior en las hojas de las localidades impacto en comparación con las control (Figura 4.4) aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Destacan los altos valores de este elemento en las muestras de rizoma de Santa Pola y Tabarca, siendo superiores a las de San Gabriel y Campello.

Los valores para el carbono fueron muy similares entre las muestras tomadas con valores oscilando entre 35 y 45% del peso seco total de la muestra (Figura 4.4) con valores algo más altos en los rizomas que en las hojas.

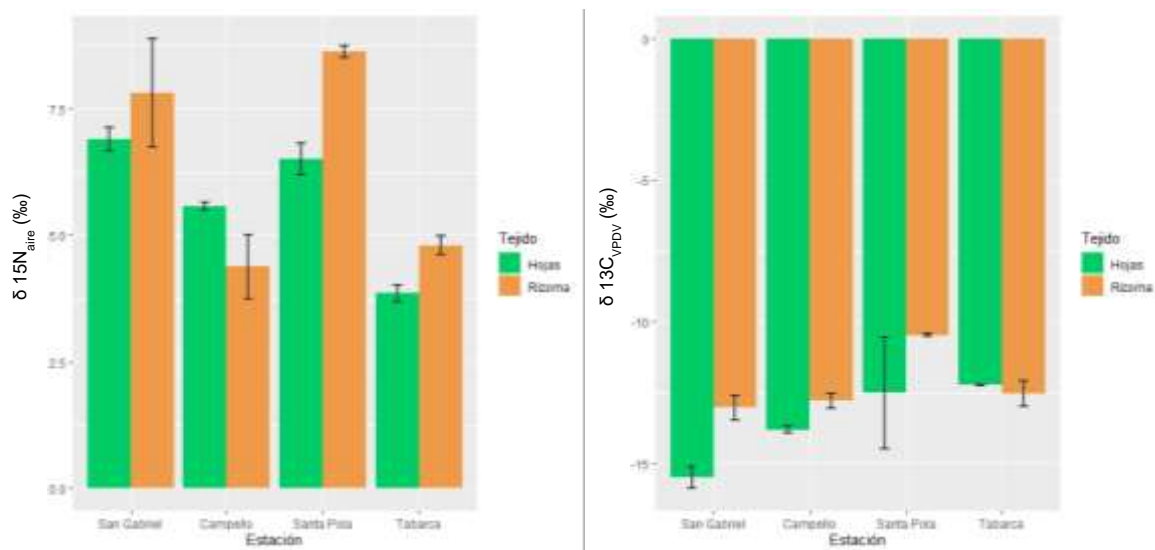


Figura 4.5: Valores obtenidos en cada estación de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ para las muestras de *P. oceanica*.

Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ fueron significativamente superiores en el rizoma, en comparación con las hojas, excepto en el caso de El Campello (figura 4.5). Se observan diferencias significativas (tabla 4.2) tanto para hojas como para rizomas en el factor Impacto-Control con niveles más altos de $\delta^{15}\text{N}$ en las localidades impactadas (figura 4.5).

En el caso del $\delta^{13}\text{C}$, no se detectaron diferencias asociadas al impacto, aunque sí a la interacción entre tipo de tejido y el impacto. Esta interacción muestra que en las estaciones impacto la proporción de $\delta^{13}\text{C}$ es significativamente más alta en las hojas que en el rizoma.

Tabla 4.1: Resultados del ANOVA para las muestras de *P. oceanica*. Valores de significancia estadística: (*) $p < 0.1$, (**) $p < 0.05$ y (***) $p < 0.01$.

Variable	Fuente de variación	G.l.	Sum. Sq	Mean Sq	F value	p value	Sign.
% Nitrógeno	IC	1	0	0	0	0.983	
	Tejido	1	31.97	31.97	35.922	1.88E-05	***
	IC:Estacion	2	14.12	7.06	7.933	0.00404	**
	IC:Tejido	1	2.34	2.34	2.633	0.12417	
	IC:Estacion:Tejido	2	8.27	4.14	4.648	0.02561	*
	Residuals	16	14.24	0.89			
% Carbono	IC	1	12.47	12.47	4.91	0.0416	*
	Tejido	1	117.48	117.48	46.253	4.26E-06	***
	IC:Estacion	2	4.3	2.15	0.847	0.4472	
	IC:Tejido	1	15.52	15.52	6.11	0.025	*
	IC:Estacion:Tejido	2	10.04	5.02	1.977	0.1709	
	Residuals	16	40.64	2.54			
$\delta^{15}\text{N}_{\text{aire}}$ (‰)	IC	1	47.88	47.88	220.16	8.99E-11	***
	Tejido	1	2.87	2.87	13.2	0.002239	**
	IC:Estacion	2	1.39	0.69	3.19	0.068263	.
	IC:Tejido	1	3.92	3.92	18.02	0.000617	***
	IC:Estacion:Tejido	2	4.39	2.19	10.09	0.001465	**

	Residuals	16	3.48	0.22			
$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}} (\text{‰})$	IC	1	0.002	0.002	0.003	0.957638	
	Tejido	1	10.14	10.14	17.712	0.000666	***
	IC:Estacion	2	25.393	12.697	22.178	2.44E-05	***
	IC:Tejido	1	5.227	5.227	9.13	0.008107	**
	IC:Estacion:Tejido	2	1.497	0.748	1.307	0.297984	
	Residuals	16	9.16	0.573			

La huella isotópica de las diferentes estaciones muestra una clara similitud entre ambas estaciones control y una mayor dispersión en cuanto a los impactos (figura 4.6). Las estaciones impacto se encuentran desplazadas hacia mayores proporciones de N15 y difieren entre ellas debido a la proporción de C13, mostrando las hojas de San Gabriel valores muy bajos, en comparación con el rizoma de Santa Pola.

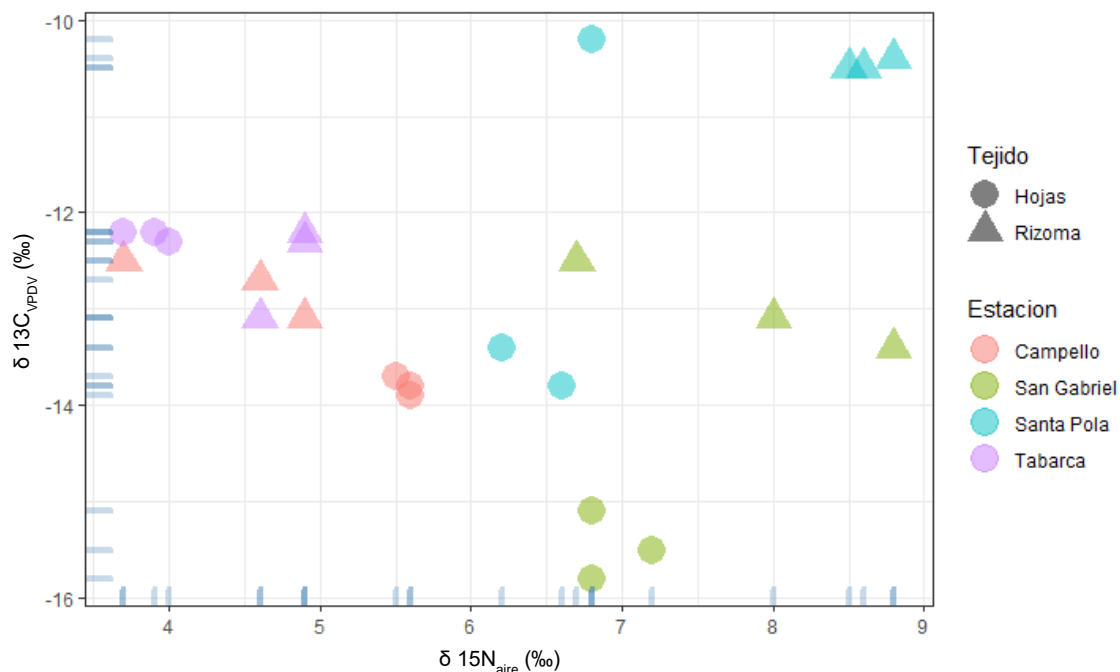


Figura 3.6: Caracterización isotópica completa de cada estación/fracción representando en cada eje los elementos analizados.

4.2 Estudio de la comunidad fitoplanctónica

4.2.1 Parámetros abióticos

La tabla 4.3 presenta los valores registrados durante los muestreos de temperatura, pH, disco de Secchi y conductividad. Merece destacarse la diferencia en la transparencia del entre estaciones. En la localidad de San Gabriel la transparencia es menor con una profundidad promedio de disco de Secchi de 1,62 m en la estación de primavera, disminuyendo hasta el 1,30 m en verano. La localidad de Santa Pola presenta la segunda menor transparencia con 4,73 m para la primavera y 2,34 m en verano.

En la localidad de El Campello, la profundidad promedio para el parámetro de la transparencia fueron de 5,25 m. En esta localidad la profundidad máxima de fondo es de 6,50 m y la mínima de 4 m. Se ha podido observar el fondo en cada uno de los puntos de muestreo de esta localidad, tanto en primavera como en verano por lo que la transparencia es mayor que la que indica la profundidad del disco de Secchi.

Por último, la localidad de Tabarca es la que presenta una mayor transparencia en sus aguas, con promedio de 7,70 m, y una visualización del fondo marino en el 100% de los muestreos realizados. En este caso, la profundidad de fondo oscila entre los 6,5 y los 10 m de profundidad.

Tabla 4.3: Valores promedio y sus desviaciones estándar de los parámetros físico-químicos.

	<i>Temp (°C)</i>		<i>pH</i>		<i>Disco de Secchi (m)</i>		<i>Conductividad (µS/cm)</i>	
	<i>Promedio</i>	<i>Desv. Est.</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desv. Est.</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desv. Est.</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desv. Est.</i>
San Gabriel								
Primavera	23,04	1,18	7,84	0,06	1,62	0,42	49.553,33	1127,22
Verano	27,80	0,98	8,13	0,03	1,30	0,27	56.176,50	1894,20
El Campello								
Primavera	22,39	0,76	7,78	0,14	5,25	1,31	49.707,50	1255,11
Verano	26,88	0,91	8,10	0,03	5,25	1,31	54.736,50	1908,76
Santa Pola								

Primavera	24,19	1,67	7,86	0,07	4,73	0,95	50.270,00	1140,93
Verano	27,69	0,95	7,99	0,05	2,34	1,80	53.224,25	3096,52
Tabarca								
Primavera	23,27	1,19	7,87	0,02	7,70	1,43	50.030,83	882,94
Verano	26,82	1,10	8,10	0,02	7,75	1,50	54.317,58	2246,80

En la figura 4.7 se puede apreciar la diferencia de transparencia (o de turbidez) existente entre las localidades de San Gabriel y Tabarca.



Figura 4.7: Turbidez en las localidades de San Gabriel (izqda.) y Tabarca (dcha.) al realizar buceo autónomo.

En la tabla 4.4 se presentan los valores de las concentraciones (en $\mu\text{moles por litro}$) obtenidas para las distintas especies de nutrientes analizadas: nitratos, nitritos, amonio, silicatos, fosfatos y fósforo total.

Tabla 4.4: Valores promedios de concentración ($\mu\text{moles/L}$), desviaciones estándar, máximos y mínimos de las diferentes especies de nutrientes analizadas.

	San Gabriel		El Campello		Santa Pola		Tabarca	
	Primavera	Verano	Primavera	Verano	Primavera	Verano	Primavera	Verano
N-NO₃⁻								
Promedio	24,90	13,73	1,41	1,57	2,27	2,09	1,38	1,20
Desv. Est.	6,79	12,77	0,20	0,37	0,86	0,44	0,19	0,26
Mínimo	15,71	1,75	1,20	1,20	1,19	1,70	1,18	0,84
Máximo	31,62	30,13	1,57	1,94	3,14	2,50	1,58	1,48
N-NO₂⁻								
Promedio	0,31	0,57	0,03	0,03	0,12	0,24	0,02	0,08
Desv. Est.	0,12	0,50	0,02	0,02	0,07	0,08	0,01	0,03
Mínimo	0,20	0,08	0,01	0,01	0,03	0,18	0,01	0,05
Máximo	0,47	1,26	0,06	0,04	0,18	0,36	0,03	0,11
N-NH₄⁺								
Promedio	3,27	1,11	1,65	0,99	0,98	0,62	2,07	0,28
Desv. Est.	1,50	0,87	1,10	0,77	0,39	0,20	0,81	0,05
Mínimo	1,36	0,11	0,77	0,35	0,54	0,44	1,26	0,22
Máximo	4,64	2,17	3,13	1,85	1,49	0,90	3,12	0,35
Si-SiO₄²⁻								
Promedio	3,75	2,15	0,48	0,45	2,11	2,28	0,41	0,36
Desv. Est.	1,10	1,46	0,15	0,17	1,22	0,30	0,08	0,13
Mínimo	3,05	0,31	0,31	0,31	0,97	1,88	0,31	0,21
Máximo	5,38	3,55	0,63	0,64	3,35	2,60	0,49	0,49
P-PO₄³⁻								
Promedio	2,10	1,46	0,06	0,08	0,08	0,08	0,02	0,02
Desv. Est.	1,52	1,25	0,05	0,06	0,04	0,02	0,01	0,00
Mínimo	0,76	0,12	0,02	0,03	0,03	0,07	0,02	0,01

Máximo	3,62	2,90	0,14	0,14	0,12	0,11	0,03	0,02
TP								
Promedio	2,50	1,91	0,26	0,27	0,40	0,25	0,36	0,22
Desv. Est.	1,62	1,21	0,10	0,10	0,41	0,02	0,03	0,06
Mínimo	1,01	0,48	0,16	0,16	0,17	0,23	0,32	0,14
Máximo	3,97	3,19	0,36	0,36	1,01	0,27	0,40	0,28

Los resultados obtenidos en el ANOVA se muestran en la tabla 4.5. Los resultados muestran como, para todas las variables estudiadas, el factor entre cuyos niveles se encuentran diferencias es localidad. Únicamente en el caso del amonio (NH_4^+), la estacionalidad tuvo una mayor contribución a las diferencias entre muestras, alcanzando valores significativamente superiores en primavera.

Para los nitratos (NO_3^-), el nitrógeno total (NT), los fosfatos (PO_4^{3-}), el fósforo total (PT) y abundancias celulares, San Gabriel mostró valores significativamente superiores al resto de estaciones. Por otro lado, en el caso de los silicatos (SiO_4^{2-}) y los nitritos (NO_2^-), San Gabriel y Santa Pola, se diferenciaron conjuntamente de las estaciones control, con valores significativamente superiores respecto a ellos.

Tabla 2.5: Resultados del ANOVA para las muestras los parámetros físico-químicos así como para la abundancia de fitoplancton. Valores de significancia estadística: (*) $p < 0.1$, (**) $p < 0.05$ y (***) $p < 0.01$.

<i>Variable</i>	<i>Fuente de variación</i>	<i>G.I.</i>	<i>Sum. Sq</i>	<i>Mean Sq</i>	<i>F value</i>	<i>p value</i>	<i>Sign.</i>
NO_3^-	Estación	1	66.2	66.2	2.519	0.1255	
	Localidad	3	1880.6	626.9	23.853	2.22e-07	***
	Estación: Localidad	3	183.6	61.2	2.328	0.0999	
	Residuales	24	630.7	26.3			
NO_2^-	Estación	1	0.0893	0.08925	2.610	0.119296	
	Localidad	3	0.8578	0.28594	8.360	0.000558	***
	Estación: Localidad	3	0.0746	0.02485	0.727	0.546082	
	Residuales	24	0.8209	0.03420			
NH_4^+	Estación	1	14.072	14.072	21.671	9.98e-05	***
	Localidad	3	8.575	2.858	4.402	0.0133	*
	Estación: Localidad	3	3.905	1.302	2.005	0.1402	

	Residuales	24	15.584	0.649			
SiO₄²⁺	Estación	1	1.11	1.106	1.772	0.196	
	Localidad	3	38.96	12.986	20.797	7.34e-07	***
	Estación: Localidad	3	4.08	1.361	2.179	0.117	
	Residuales	24	14.99	0.624			
PO₄³⁻	Estación	1	0.211	0.211	0.439	0.514	
	Localidad	3	17.886	5.962	12.384	4.3e-05	***
	Estación: Localidad	3	0.621	0.207	0.430	0.733	
	Residuales	24	11.554	0.481			
TP	Estación	1	0.401	0.401	0.746	0.396	
	Localidad	3	21.970	7.323	13.648	2.12e-05	***
	Estación: Localidad	3	0.373	0.124	0.232	0.873	
	Residuales	24	12.878	0.537			
Abundancias	Estación	1	1.83	1.826	4.329	0.0424	*
	Localidad	3	85.44	28.480	67.528	<2e-16	***
	Estación: Localidad	3	7.48	2.494	5.913	0.0015	**
	Residuales	52	21.93	0.422			

La localidad de San Gabriel es la que presenta una mayor concentración de la mayoría de las especies químicas de nutrientes analizadas. En especial, resaltan los nitratos (figura 4.8), tanto en primavera como en verano, con valores muy superiores a los observados en el resto, con un promedio de 24,90 $\mu\text{moles/L}$ para la primavera y 13,73 $\mu\text{moles/L}$ para el verano. En esta localidad tenemos los valores máximos entre réplicas de una misma localidad, con valores que superan los 15 $\mu\text{moles/L}$ de nitratos en un 75% de las réplicas analizadas y con un máximo de 31,62 $\mu\text{moles/L}$ de nitratos en la estación de primavera y de 30,13 $\mu\text{moles/L}$ de nitratos en verano. En verano destaca la amplia barra de error al existir una elevada variabilidad entre réplicas, con un valor mínimo de 1,75 $\mu\text{moles/L}$ y un máximo de 30,13 $\mu\text{moles/L}$. Esto puede ser debido al bajo hidrodinamismo presente en el área de estudio, lo que hace que la columna de agua no se homogenice de una manera rápida y óptima, y junto con el aporte constante y localizado de la EDAR del Rincón de León, hace que las concentraciones de nutrientes sean distintas en función de la distancia al punto de vertido.

Para el resto de las localidades muestreadas, tanto en primavera como en verano, en ninguno de los casos se superan los 2,3 $\mu\text{moles/L}$ de NO₃⁻ como valor promedio. Si nos fijamos en el resto de

las localidades que completan este estudio, es Santa Pola la que posee unos valores ligeramente más elevados respecto a las otras dos localidades, con valores promedio tanto para la primavera y el verano, situados entre los 2,09 y los 2,27 $\mu\text{moles/L}$ de NO_3^- , frente a los valores inferiores a 1,6 $\mu\text{moles/L}$ de NO_3^- para las localidades de El Campello y Tabarca.

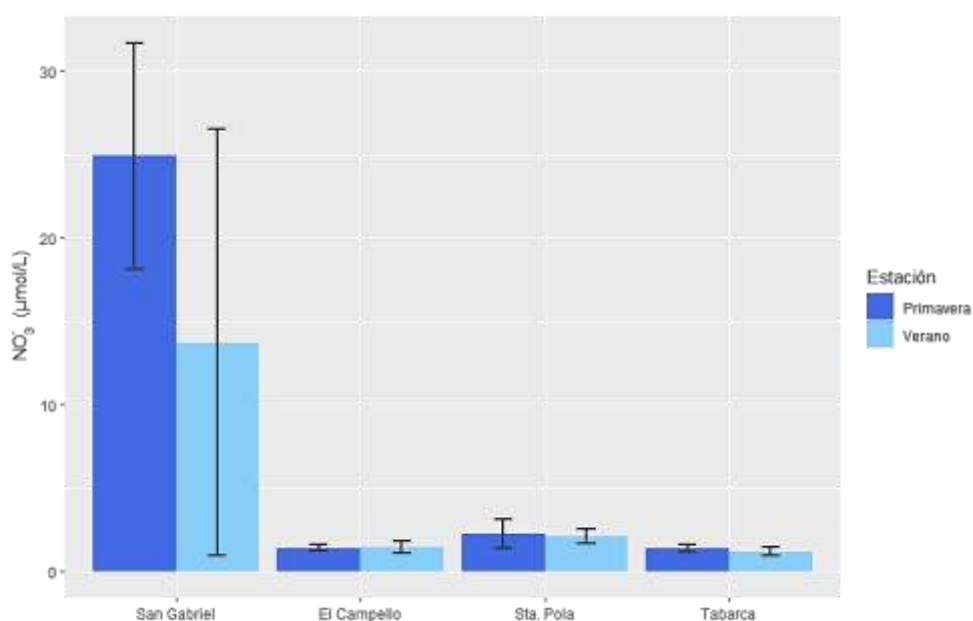


Figura 4.8: Concentraciones promedio de nitratos (NO_3^-) ($\mu\text{moles/L}$).

Los nitritos (NO_2^-), al igual que los nitratos, presentan sus máximas concentraciones en la localidad de San Gabriel (figura 4.9) pero, en este caso, las concentraciones máximas se encuentran en la época de verano. Resaltar que las concentraciones de nitritos no superan, en ningún caso, 1 $\mu\text{moles/L}$ de NO_2^- . Al igual que pasaba con los nitratos en esta localidad, existe una variabilidad entre réplicas muy grande, en especial en el verano. Santa Pola vuelve a ser la segunda localidad con unas mayores concentraciones de nitritos frente a El Campello y Tabarca, sin llegar a los valores de San Gabriel.

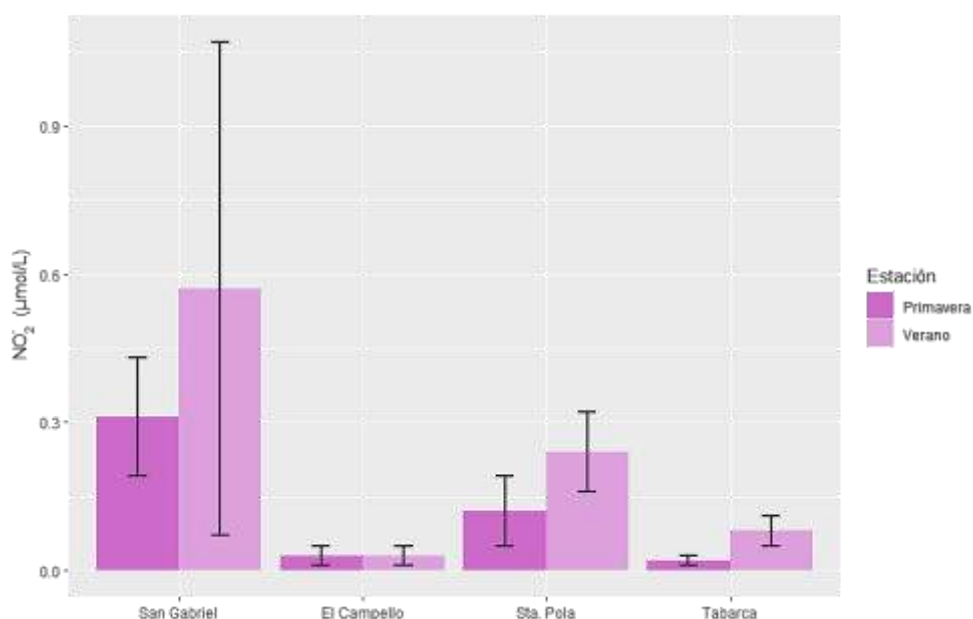


Figura 4.9: Concentraciones promedio de nitritos (NO_2^-) ($\mu\text{moles/L}$).

La última especie nitrogenada, el amonio (NH_4^+), presenta una distribución distinta a las otras dos especies ya vistas (figura 4.10). En este caso, San Gabriel sigue siendo la localidad donde se observa la mayor concentración promedio, con un valor máximo de $3,27 \mu\text{moles/L}$ en primavera. El resto de localidades también tienen sus máximos en la estación de primavera, destacando la localidad de Tabarca, la cual posee el segundo valor máximo con $2,07 \mu\text{moles/L}$ de NH_4^+ , aunque en verano esta localidad vuelve a tener el valor mínimo con $0,27 \mu\text{moles/L}$.

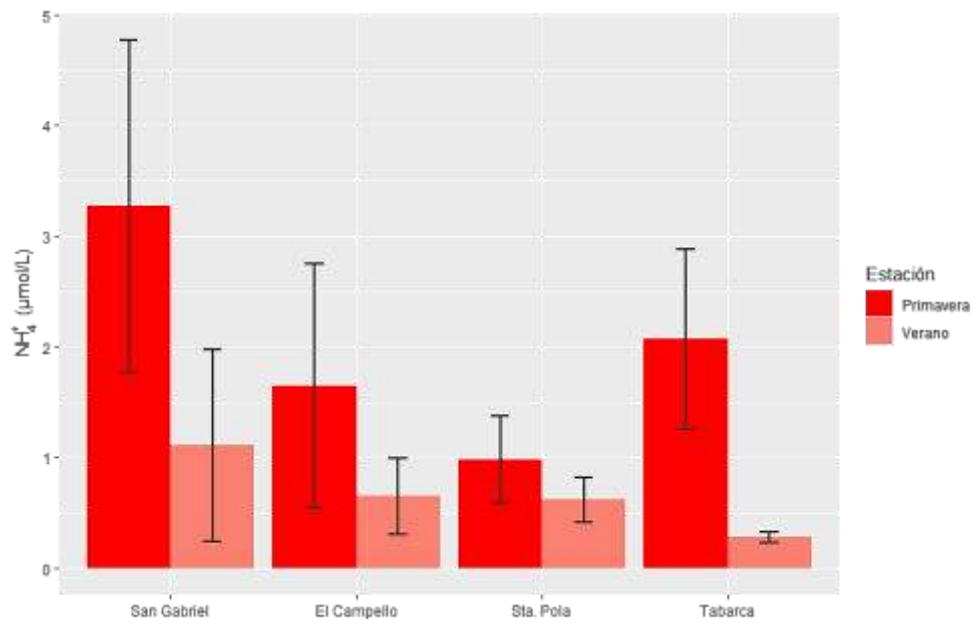


Figura 4.10: Concentraciones promedio de amonio (NH_4^+) ($\mu\text{moles/L}$).

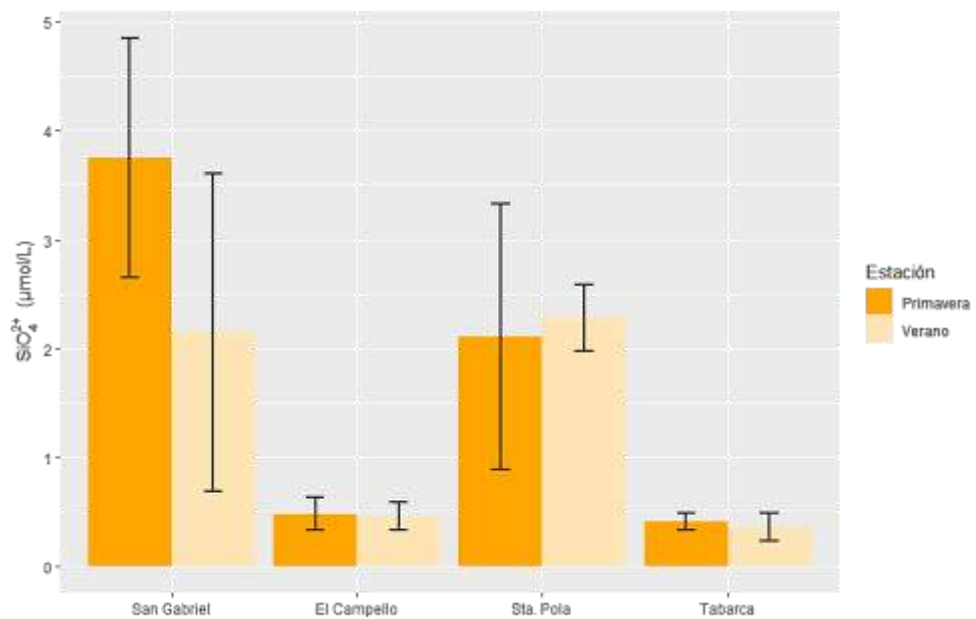


Figura 4.11: Concentraciones promedio de silicatos (SiO_4^{2-}) ($\mu\text{moles/L}$).

En el caso de los silicatos (SiO_4^{2-}) San Gabriel vuelve a mostrar los valores promedio máximos, con un valor de $3,75 \mu\text{moles/L}$ en primavera (figura 4.11). En el caso del verano, el valor obtenido es de $2,15 \mu\text{moles/L}$, muy próximo al valor obtenido por la localidad de Santa Pola, con $2,28 \mu\text{moles/L}$. En esta estación es Santa Pola la que presenta el máximo. El Campello y Tabarca, tanto para la primavera como para el verano, presentan valores promedio mínimos, estando estos valores dentro de la horquilla entre $0,36$ y $0,48 \mu\text{moles/L}$ de SiO_4^{2-} .

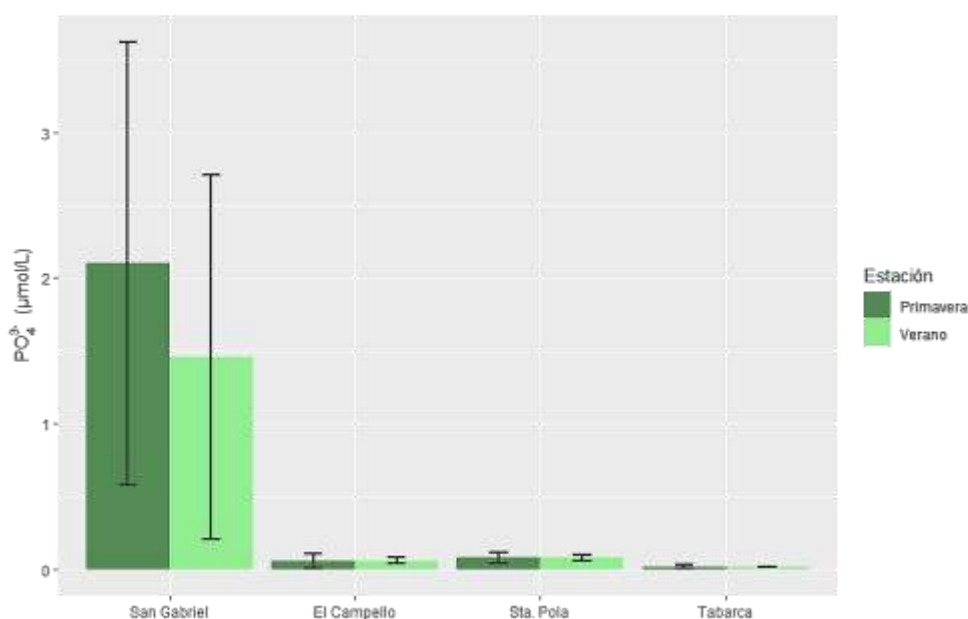


Figura 4.12: Concentraciones promedio de fosfatos (PO_4^{3-}) ($\mu\text{moles/L}$).

Para los fosfatos (PO_4^{3-}), vuelve a ser San Gabriel la localidad que posee los máximos valores, tanto para primavera como para verano, con valores de $2,50$ y $1,91 \mu\text{moles/L}$ respectivamente (figura 4.12). Las localidades de El Campello y Santa Pola poseen valores muy similares para ambas estaciones, mientras que Tabarca es la localidad con una menor concentración de esta especie química, tanto para primavera como para verano.

Por último, el fósforo total (TP) sigue la misma línea que la mayoría de los nutrientes analizados, siendo San Gabriel la localidad con las mayores concentraciones promedio (figura 4.13). En este caso, la concentración para la estación de primavera es de $2,50 \mu\text{moles/L}$ mientras que para el verano desciende ligeramente hasta los $1,91 \mu\text{moles/L}$ de TP.

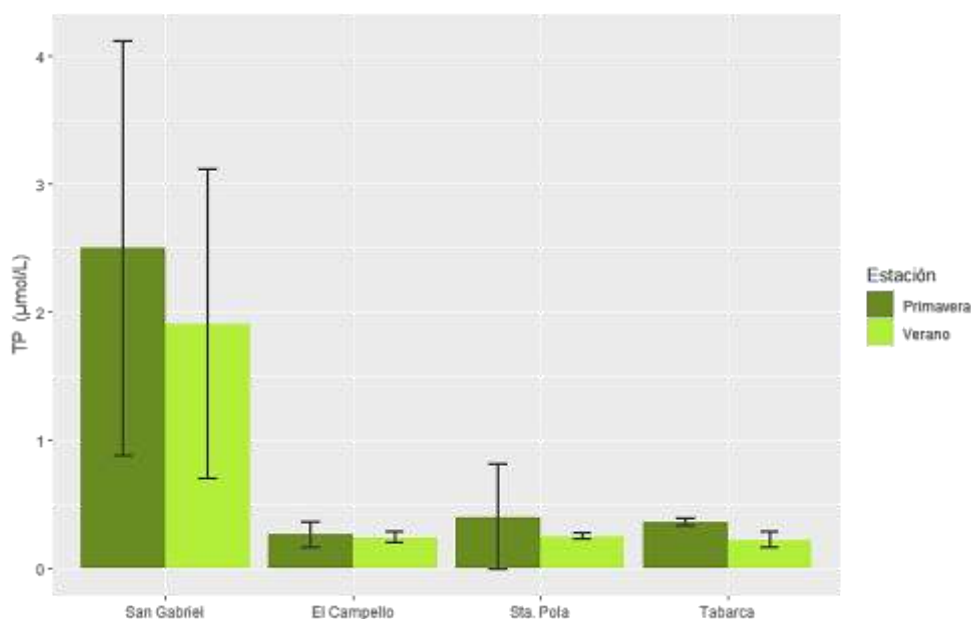


Figura 4.13: Concentraciones promedio de fósforo total (TP) (μmoles/L).

4.2.2 Comunidad fitoplanctónica

La tabla 4.6 muestra los valores de los parámetros que caracterizan la comunidad de fitoplancton: Abundancia total (en individuos por litro), Riqueza específica (número de taxones observados en cada muestra), y valores de los índices de Diversidad (bits por individuo) y Equidad. Se puede apreciar cómo la localidad de San Gabriel, muestra los máximos valores promedio de abundancias celulares, tanto en primavera como en verano, con valores superiores al millón de células por litro, destacando por encima de todos los valores el obtenido en el periodo de verano con un valor promedio de 10.730.680 células por litro. Estos valores están por encima de los valores umbrales para determinar la presencia de eventos denominados “mareas rojas”, cuyo efecto más visual es la modificación del color de la masa de agua. La masa de agua de San Gabriel tiene asociada a estos cambios de coloración del agua una presencia abundante de material particulado en suspensión, lo que contribuye a un aumento en la turbidez del agua.

Respecto al parámetro de abundancias, la localidad de Tabarca es la que presenta los valores promedio mínimos, con 67.044 células por litro en la estación de primavera y 97.648 células por litro en la de verano. Santa Pola y El Campello muestran valores similares en primavera, pero muestran diferencias en la estación de verano, donde la abundancia promedio para Santa Pola es de 170.518 células por litro mientras que El Campello posee un valor de 92.588 células por litro

Tabla 4.6: Resumen de los parámetros estructurales de las comunidades fitoplanctónicas. Valores promedios para cada localidad en función de la estación.

	<i>Abundancia (Inds/L)</i>		<i>Riqueza Específica (S) (Nº taxones)</i>	<i>Índice de Diversidad (H')</i>	<i>Índice de Equidad (J)</i>
	<i>Promedio</i>	<i>Desv. Est.</i>			
San Gabriel					
Primavera	1.002.638	750.567	103	3,59	0,54
Verano	5.365.340	4.941.705	71	1,16	0,19
El Campello					
Primavera	159.977	127.896	138	3,31	0,47
Verano	92.588	33.454	87	4,17	0,65
Santa Pola					
Primavera	160.687	85.853	110	3,79	0,56
Verano	170.518	114.239	84	3,93	0,62
Tabarca					
Primavera	67.044	24.201	117	3,97	0,58
Verano	97.648	75.984	84	3,89	0,61

En la figura 4.14 se representan las abundancias promedio para cada localidad y estación; aquí destacamos la variabilidad (barras de error) que posee la localidad de San Gabriel. Estas diferencias tan elevadas en la variabilidad en el muestreo de verano son debidas a las discrepancias existentes en las abundancias de cada réplica, con un valor mínimo de 1.186.567 células por litro y un máximo de 14.331.276 células por litro. En este muestreo de verano, el taxón dominante ha sido *Skeletonema*

costatum complex, taxón perteneciente al grupo de las diatomeas (figura 4.15). Actualmente, *Skeletonema* está compuesto por un conjunto de 11 especies (Yamada et al 2014), cuya determinación al máximo nivel taxonómico sólo puede ser llevada a cabo bajo técnicas de microscopía electrónica y técnicas moleculares.

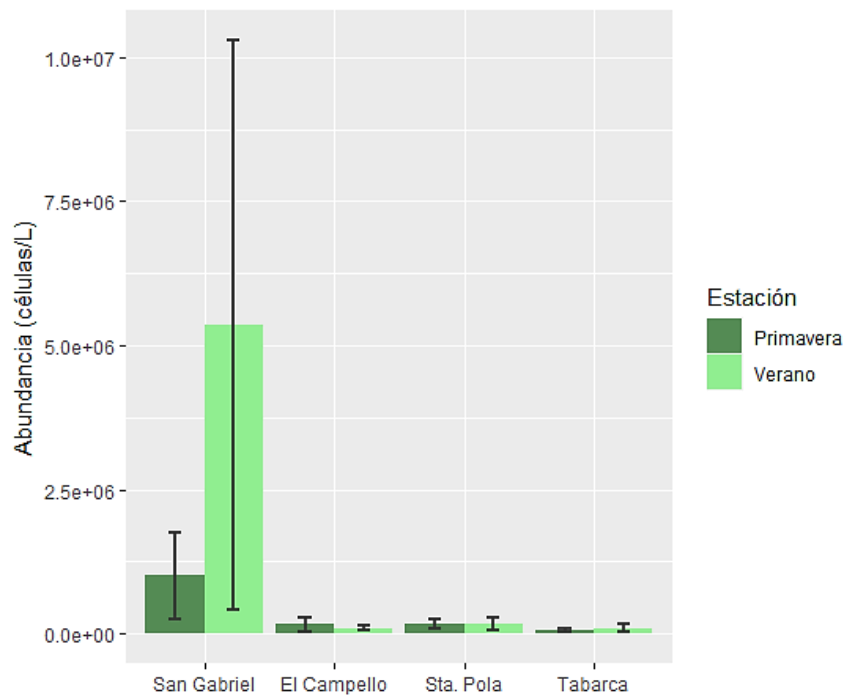


Figura 4.14: Valores de los parámetros estructurales de las comunidades fitoplanctónicas para las estaciones de primavera y verano.

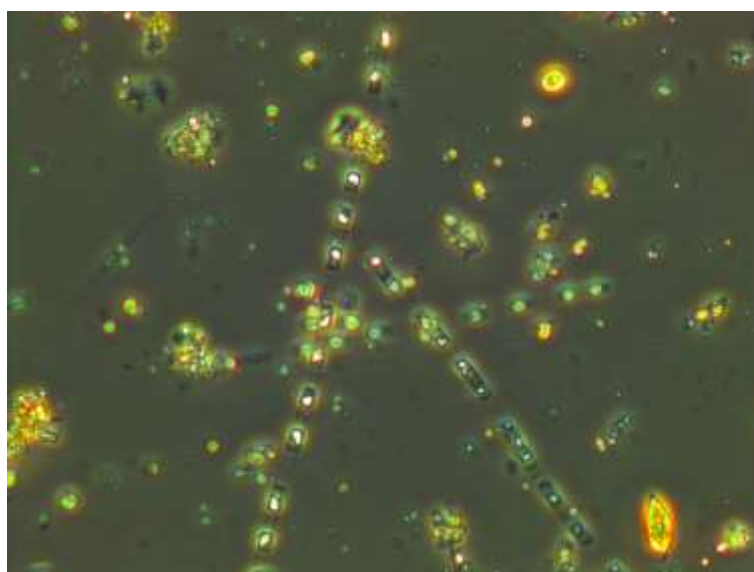


Figura 4.15: *Skeletonema costatum* complex.

Para la riqueza específica (S), San Gabriel muestra unos valores ligeramente inferiores al resto de localidades en ambas estaciones, con 103 taxones observados en la estación de primavera y 71 en la de verano (figura 4.15). El Campello, por el contrario, es la localidad con un mayor número de taxones observados en ambas estaciones muestreadas, con 138 taxones detectados en los muestreos de primavera y 87 en los muestreos de verano. Santa Pola y Tabarca presentan unos valores muy similares en este parámetro para ambas estaciones muestreadas, con máximos de 110 taxones para Santa Pola y 117 para Tabarca, y unos mínimos en verano con 84 taxones observados en ambas localidades.

El índice de Diversidad de Shannon- Wiener (H') nos muestra valores altos para las localidades de El Campello, Santa Pola y Tabarca, en ambas estaciones muestreadas: primavera y verano, con valores todos ellos por encima de los 3 bits por individuo, con valores máximos de 4,17 bits por individuo para El Campello en la estación de verano y un mínimo de 3,31 para esta misma localidad en la estación de verano (figura 4.16).

La excepción en este parámetro la encontramos en la localidad de San Gabriel, donde los valores obtenidos son de 3,59 bits por individuo para la estación de primavera, acorde con los valores del resto de localidades, pero reduciéndose drásticamente en la estación de verano, donde el valor para este índice es de 1,16 bits por individuo (figura 4.15). Este valor bajo hace referencia a la dominancia

de unos pocos taxones, en especial de la diatomea *Skeletonema costatum complex*, con un valor promedio de abundancia de 4.466.036 células por litro.

Por último, dentro de este apartado de parámetros estructurales de la comunidad, tenemos el índice de Pielou (J'), el cual nos da una visión de la dominancia o equidad de los taxones observados en los diferentes análisis realizados. Al igual que el índice de Diversidad (H'), este índice presenta valores muy similares en todas las localidades a excepción de San Gabriel, localidad que presenta el valor más bajo de todo el estudio, con un valor de 0,19 y que corresponde a la estación de verano (figura 4.16). Este valor viene causado debido a la dominancia absoluta de la diatomea *Skeletonema costatum complex*, la cual presenta un valor de representación promedio superior al 83% para la comunidad de verano, lo que la hace el taxón dominador de la comunidad por excelencia.

En el resto de localidades, los valores de este índice para la estación de primavera oscilan entre 0,47 y 0,58, mientras que en verano este los valores aumentan ligeramente hasta llegar a una horquilla entre 0,61 y 0,65. Estos valores nos indican que las comunidades están bien estructuradas, aunque existen varios taxones que poseen valores de representación superiores al resto, como pueden ser los casos del género *Pseudo-nitzschia*, *Cylindrotheca closterium*, *Merismopedia*, *Bacteriastrium delicatulum*, o los nanoflagelados.



Figura 4.16: Valores de los parámetros estructurales de las comunidades fitoplanctónicas para las estaciones de primavera y verano.

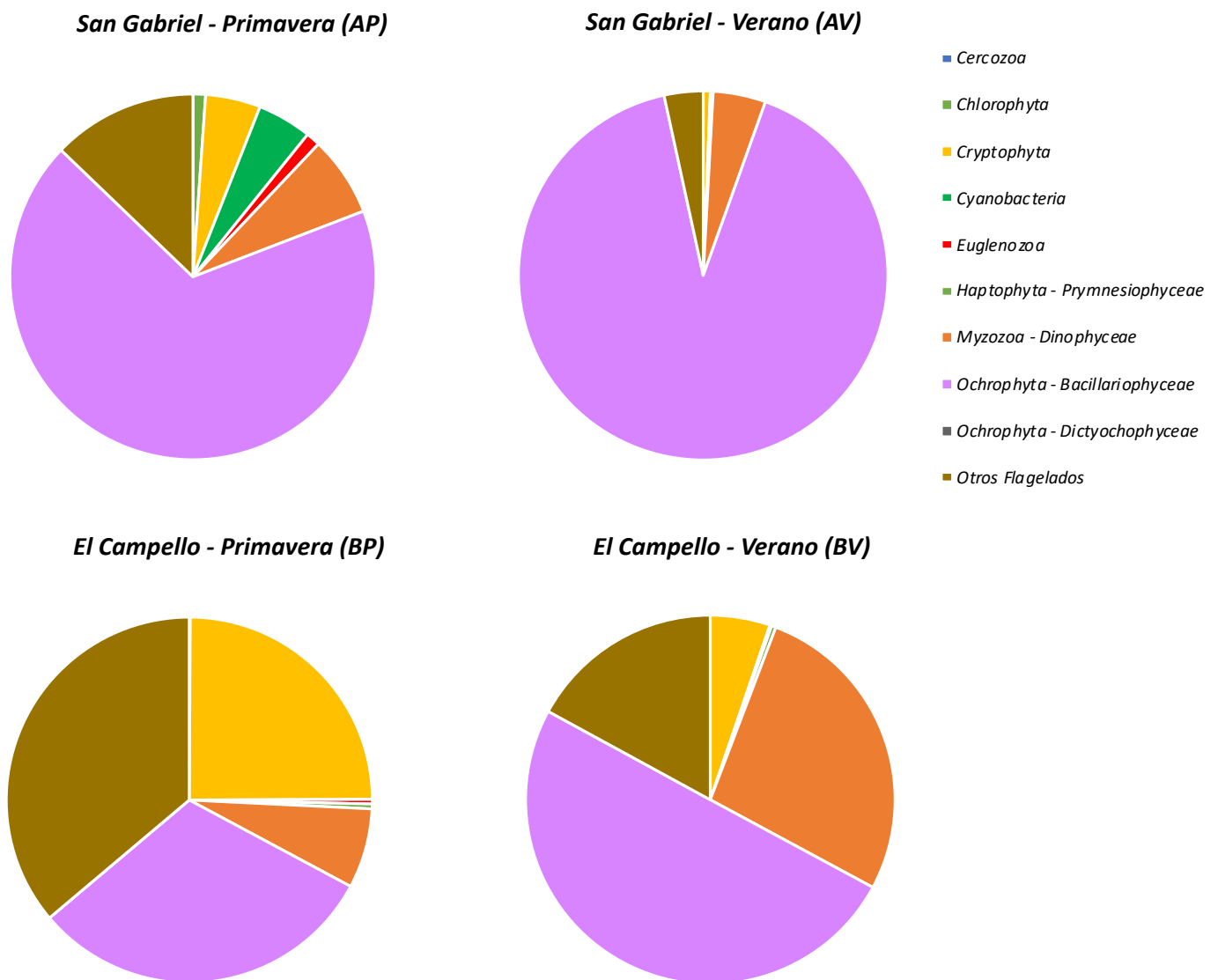


Figura 4.17: Composición de las comunidades fitoplanctónica para las localidades de San Gabriel y El Campello para las estaciones de primavera (P) y de verano (V).

En la figura 4.17 se observa como las diatomeas (Filo Ochrophyta, Clase Bacillariophyceae) dominan las comunidades San Gabriel, tanto en primavera como en verano, con valores de representación del 68% en primavera, llegando a una representación del 91,12% en la comunidad de verano. Esta dominancia casi absoluta en la estación de verano es debido a la presencia de la diatomea *Skeletonema costatum complex*, la cual llega a representar más del 83 % de la comunidad, mientras que en la estación de primavera el género dominante de este grupo fue el género *Pseudo-nitzschia*, con valores de representación próximos al 47 %.

En la localidad de El Campello las diatomeas dominan la comunidad de verano, con un 50,07 % y reducen su representación en la estación de primavera, llegando a un 31,01 %, donde los Nanoflagelados comparten la dominancia con una representación del 36,10.

Los dinoflagelados (Filo Myzozoa, Clase Dinophyceae) son un grupo habitual de las comunidades litorales y su presencia es variada; en la localidad de San Gabriel obtienen unas representaciones del 7,09 % y del 4,61 % para las estaciones de primavera y verano respectivamente. En la localidad de El Campello este grupo mantiene una representación similar a San Gabriel en la estación de primavera, con un 7,06 %, mientras que en verano esa representación asciende hasta un valor de representación de 27,11 % siendo en este caso el segundo grupo en importancia de esta comunidad.

El resto de grupos taxonómicos presentes en las comunidades de fitoplancton de San Gabriel y El Campello, como son las criptofíceas (Filo Cryptophyta), las cianobacterias (Filo Cyanobacteria) o las euglenófitas (Filo Euglenozoa) poseen valores de representación bajos, no superando en la mayoría de los casos el 3 % de representación, en especial en la localidad de San Gabriel para la estación de verano, donde estos grupos poseen representaciones testimoniales que no llegan al 1 % de representación.

En la figura 4.18 se presenta la estructura de la comunidad de fitoplancton para las localidades de Santa Pola y Tabarca, tanto para la estación de primavera como para la de verano. Destaca la comunidad existente en Santa Pola, donde las cianobacterias tienen una presencia relevante tanto en primavera como en verano con valores del 25,91 y del 37,69 % respectivamente. En Santa Pola, el género de cianobacteria con una mayor abundancia es *Merismopedia*, un género colonial con células de pequeño tamaño que llega a representar el 34,81% dentro de la comunidad de verano. Este grupo taxonómico, sin embargo, solo está presente en la localidad de Tabarca de forma testimonial con una representación inferior al 0,5 %.

Tanto en Santa Pola como en Tabarca, las diatomeas tienen un papel importante, aunque en Santa Pola comparten dominancia con las cianobacterias, mientras que en Tabarca poseen valores de representación del 40,67 % en primavera llegando al 78,65 % en la estación de verano.

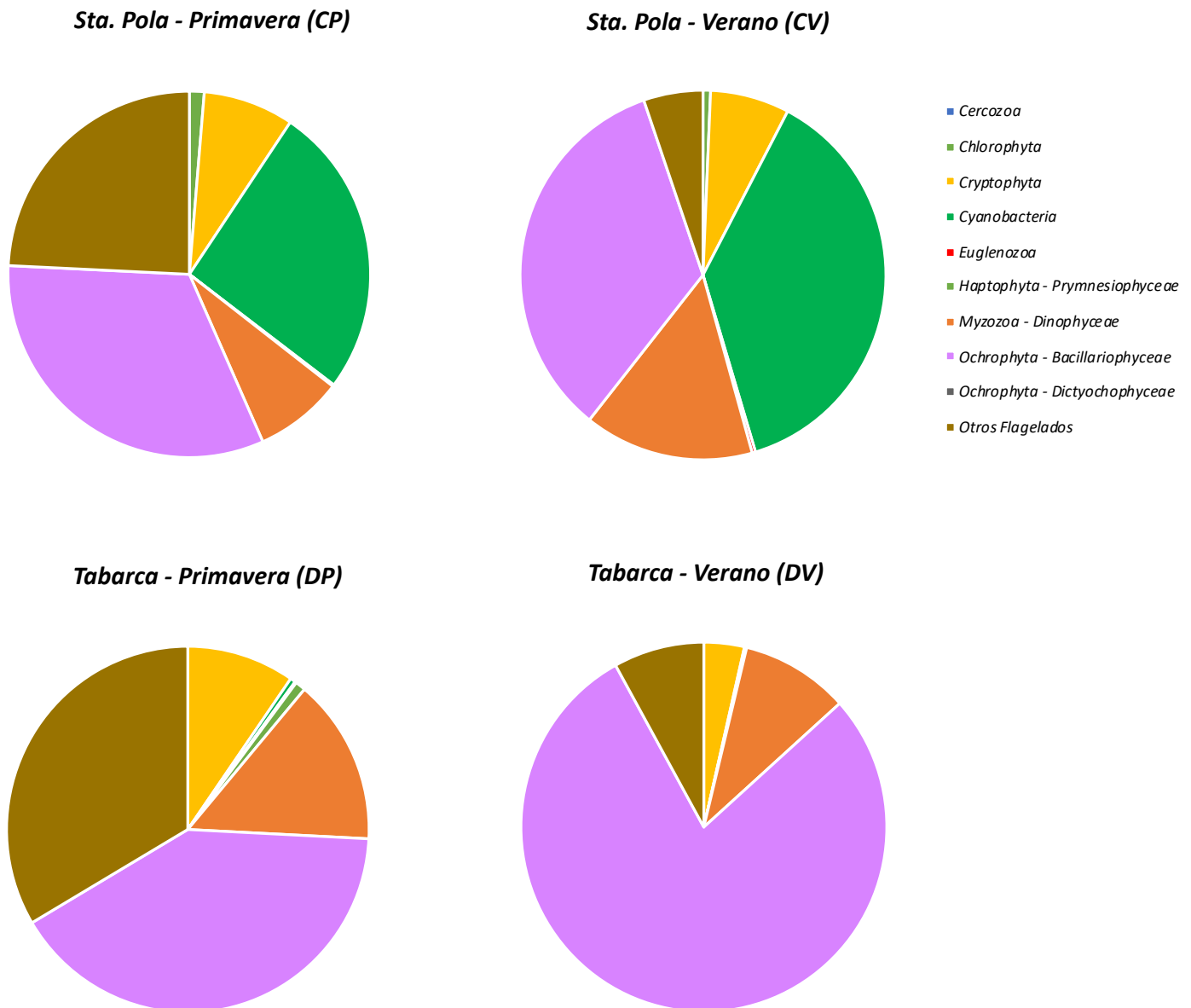


Figura 4.18: Composición de las comunidades fitoplanctónica para las localidades de San Gabriel y El Campello para las estaciones de primavera (P) y de verano (V).

Del resto de grupos taxonómicos presentes en ambas comunidades habría que destacar las criptofíceas (Filo Cryptophyta) y el grupo de los nanoflagelados, con valores de representación del primero que oscilan entre el 3,56 % y el 8,08 %, mientras que el segundo, los nanoflagelados, tienen una representación importante en las comunidades de primavera en ambas localidades, llegando a representar el 24,23 % en la comunidad de primavera de Santa Pola y el 33,52 % en Tabarca para la misma estación.

En la figura 4.19 podemos observar el análisis de componentes principales. En las dos dimensiones graficadas podemos explicar el 89,9 % (Dim 1 = 68,1 % + Dim 2 = 21,8 %) de la variabilidad existente en los datos.

En el eje X, es decir, la dimensión 1, se ve claramente como la localidad A, San Gabriel, es muy diferente del resto de localidades. Además, en esta dimensión se observa de una manera clara como todas las variables abióticas, es decir, las especies de nutrientes analizadas, están influenciando en un mayor grado a la comunidad fitoplanctónica de San Gabriel.

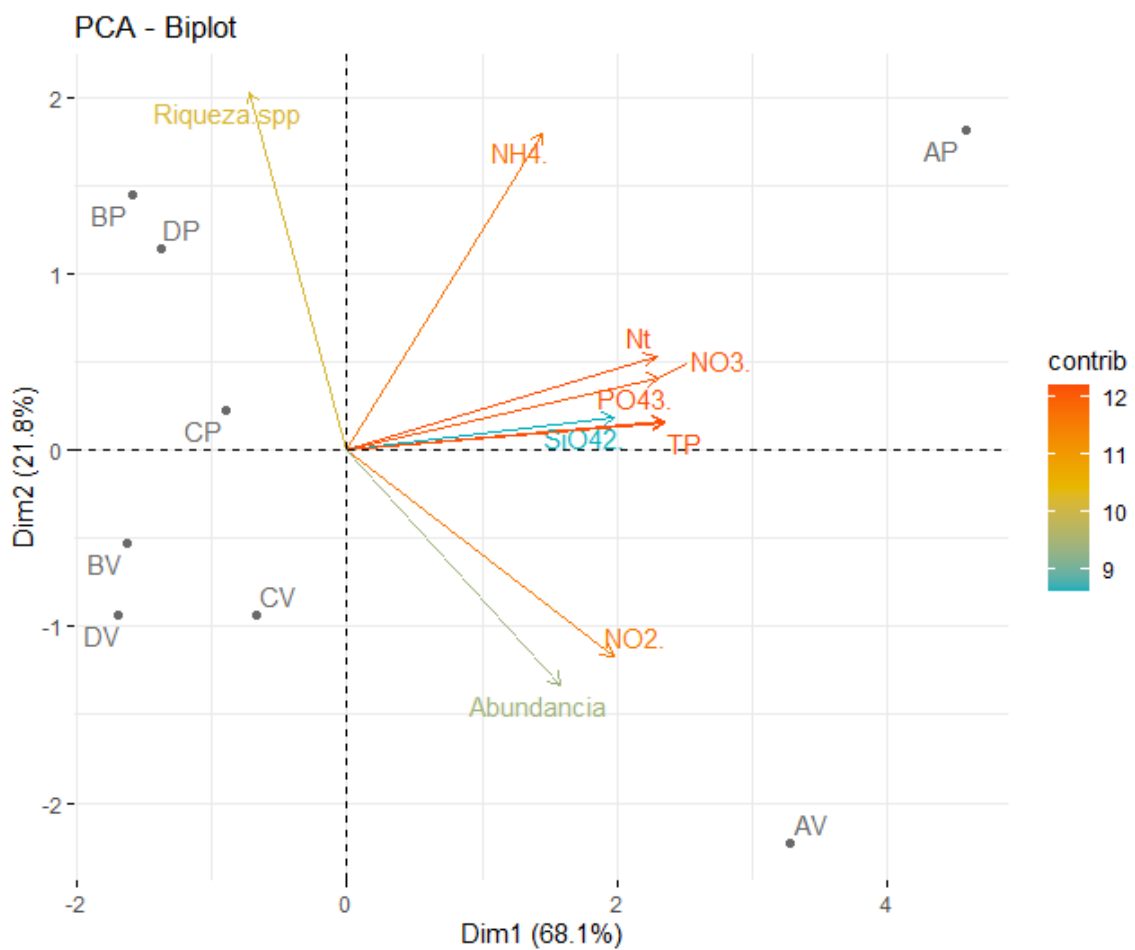


Figura 4.19: Análisis de Componentes Principales basado en los parámetros de nutrientes y los valores promedio de abundancias y riquezas específicas de cada localidad para cada una de las estaciones muestreadas.

Respecto a la dimensión 2 de este gráfico (eje Y), dentro de las variables de nutrientes, son los nitritos (NO₂⁻) los que presentan una mayor influencia sobre la comunidad fitoplanctónica de verano existente en la localidad de San Gabriel, así como es el amonio

(NH4+) el que mayor influencia tiene sobre las diferencias que puedan existir entre la comunidad de fitoplancton de San Gabriel para la estación de primavera y el resto de muestras.

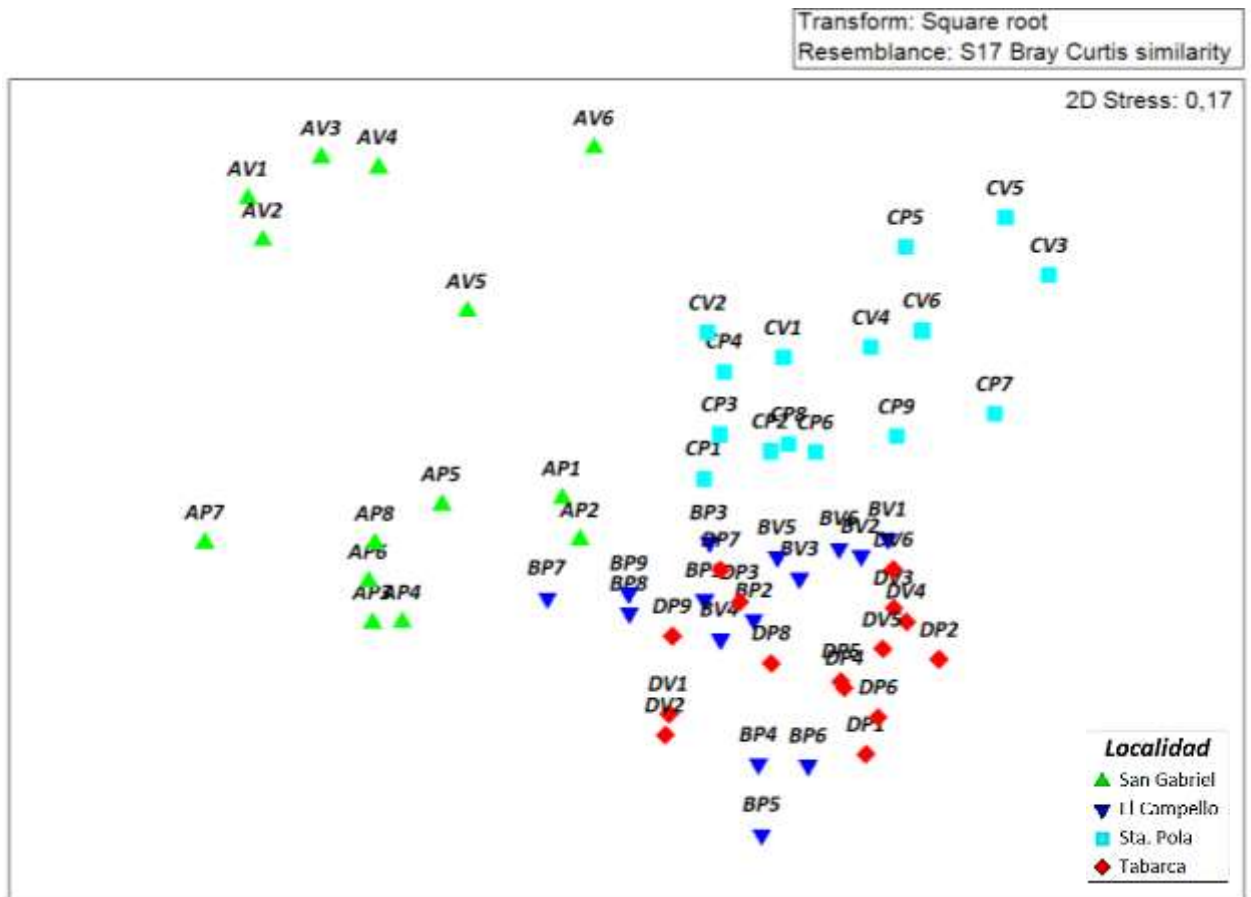


Figura 4.20: Análisis n-MDS de los valores de abundancias de cada réplica para cada localidad y para cada una de las estaciones muestreadas.

En el n-MDS (figura 4.20) se observa como las muestras poseen una distribución característica, donde las réplicas de las localidades de San Gabriel (A – icono verde) y Santa Pola (C – icono azul claro) se agrupan quedando bien separadas del resto, al igual que si nos fijamos en el factor estación, quedando bien definida la agrupación de primavera y la de verano. Por el contrario, las muestras de las localidades de El Campello (B – icono azul oscuro) y Tabarca (D – icono rojo) se agrupan de una manera más agregada sin una clara delimitación ni entre localidades ni entre estaciones.

5. Discusión

Los resultados muestran como los isótopos estables permiten detectar indicios de eutrofización sobre distintos grupos biológicos. Las localidades con mayor influencia antrópica presentan una mayor cantidad de nitrógeno que además se encuentre enriquecida con N15. Estos resultados muestran la capacidad de trazabilidad de un impacto a través de la composición isotópica (Li et al. 2016; Mancinelli and Vizzini 2015).

En el caso del fitoplancton, los resultados mostraron una clara diferencia entre San Gabriel, como la zona con mayor proporción de $\delta^{15}\text{N}$, en contraposición con Tabarca, mostrando la diferencia clara en composición con una zona sin influencia por vertidos urbanos. La rápida asimilación de nutrientes por parte del fitoplancton permite discernir la influencia de un contaminante a corto plazo, y por tanto que la influencia del vertido es medible en el momento del muestreo.

Las similitudes entre Santa Pola y el Campello en los análisis de fitoplancton pueden explicarse como medios de características litorales similares. Ambos se encuentran cercanos a una zona urbanizada y a pesar de que no existe un foco de contaminación explícito como es el caso de San Gabriel, sí pueden verse influenciados por el desarrollo antrópico de la línea de costa (Li et al. 2016). Sin embargo, esta similitud es mucho menor en los análisis sobre *P. oceanica*, indicando que la contaminación en la zona de Campello no tiende a asimilarse por los ecosistemas bentónicos y posiblemente es de carácter más puntual.

Los datos del análisis de isótopos estables en *P. oceanica* ha mostrado como el rizoma actúa como reservorio de isótopos pesados, especialmente de N15. Este hecho puede ayudar a determinar el efecto acumulativo de un vertido sobre la pradera aún sin alcanzar concentraciones puntuales excesivamente altas. Aunque claramente las estaciones impacto mostraban niveles más altos de N15, posiblemente el C13 también podría ayudar a discriminar el origen de la fuente de contaminación (Lepoint, Dauby, and Gobert 2004).

El análisis de isótopos estables es una técnica prometedora para permitir discriminar las fuentes de impacto que afectan a un determinado ecosistema, especialmente en el caso las praderas de *P. oceanica*. Tomando muestras directas de los vertidos de depuradoras, aguas del puerto, salinas, etc. se podría correlacionar la marca isotópica presente en los organismos vivos con la de esas fuentes (Anderson and Fourqurean 2003; Viana and Bode 2015). Con esa información se podría determinar qué impactos son los que realmente afectan al ecosistema y

ayudar a enfocar la gestión sobre los mismos. Las praderas de fanerógamas son ecosistemas altamente productivos y relevantes en los medios litorales, pero a su vez son vulnerables a los impactos de origen antrópico. A pesar de las medidas que se toman para su protección, éstas normalmente se basan en la evaluación de fuentes concretas de impacto en lugar de estudiar las sinergias de diversos focos de estrés. En los medios urbanos litorales pueden superponerse distintas actividades (aguas residuales, obras portuarias, agricultura, vertidos de salmuera, etc.) y es vital para una correcta gestión y protección de estos ecosistemas de pradera, el análisis conjunto de todos los estresores que coexisten en la misma zona (Griffiths, Connolly, and Brown 2020).

Existe una correlación destacable entre la aparición de especies químicas de nutrientes de carácter antrópico y la comunidad fitoplanctónica. Esta influencia directa y la rápida respuesta de este tipo de organismos, hace de la comunidad microalgal marina sea un buen bioindicador para evaluar la presencia de dichos compuestos. Todos los resultados obtenidos muestran diferencias muy importantes entre la localidad de San Gabriel y el resto de localidades estudiadas, tanto a nivel de la comunidad de fitoplancton como de la composición de especies químicas de nutrientes o la composición de isótopos estables. Estas diferencias son debidas principalmente a la presencia del emisario submarino de la EDAR del Rincón de León, el cual proporciona un aporte constante de especies químicas de nutrientes que son aprovechadas por la comunidad de fitoplancton, la cual, a su vez, se ve favorecida por las condiciones oceanográficas existentes en la zona de estudio, en especial el bajo hidrodinamismo.

La localidad de San Gabriel presenta los valores promedio máximos de abundancias celulares, tanto en primavera como en verano, con valores que oscilan entre 316.269 y 14.331.276 células por litro. En la localidad de San Gabriel existe una elevada variabilidad en el parámetro de abundancia celular entre réplicas. La variabilidad existente entre réplicas es debida al tipo de organismo dominante de la comunidad, la diatomea *Skeletonema costatum* complex, la cual se caracteriza por poseer un pequeño tamaño celular y formar cadenas con un elevado número de células. *Skeletonema costatum* complex es un taxón considerado como especie nociva por ser precursor de eventos de Proliferaciones Algales Nocivas (PANs) cuyos efectos sobre el medio marino son una elevada producción de biomasa microalgal, aumento en la turbidez en la columna de agua o cambios en la coloración de la masa de agua, o el descenso en la biodiversidad marina sobre todo en especies sésiles del fondo marino como macroalgas y fanerógamas marinas, entre otros.

En las localidades de San Gabriel, El Campello y Tabarca, el grupo taxonómico dominante de las comunidades estudiadas son las diatomeas (Filo Ochrophyta, Clase Bacillariophyceae). En la localidad de Santa Pola destaca el grupo taxonómico de las cianobacterias (Filo Cyanobacteria), con el género *Merismopedia* como representante principal de este grupo. Las cianobacterias son organismos que se adaptan mejor a ambientes con salinidades bajas y con concentraciones medias o altas de especies nitrogenadas.

Santa Pola presenta valores elevados de Nitritos (NO_2^-), tanto en primavera como en verano, lo que nos hace pensar que existe una intrusión difusa de nutrientes procedentes de los campos de cultivo y de la desembocadura del río Segura. Se entiende como necesario un estudio en profundidad en la localidad de Santa Pola, aumentando la superficie de estudio, para caracterizar todas las posibles entradas de nutrientes existentes en el área de estudio.

El análisis estacional ha revelado un comportamiento similar en todas las estaciones en cuanto a parámetros biológicos como la riqueza y la abundancia de organismos. Esto resalta la importancia de evitar la pseudorreplicación temporal al estudiar el fitoplancton, debido a que es un grupo muy sensible a los cambios ambientales y altamente dinámico, tanto en la escala espacial como en la temporal.

6. Conclusiones

Los resultados obtenidos indican un gradiente de contaminación entre las localidades estudiadas con valores máximos en San Gabriel y mínimos en Tabarca. En San Gabriel se observan valores máximos de nutrientes en la columna de agua así como en los compartimentos biológicos analizados, mayor proporción de $\delta^{15}\text{N}$, mayores abundancias de fitoplancton debido a la proliferación de algunas especies y menor riqueza y diversidad. Estos resultados se deben, sin duda, a la entrada de nutrientes que supone el vertido de la EDAR de Rincón de León en un ambiente protegido, particularmente desde la última ampliación del puerto de Alicante. La siguiente localidad en influencia antrópica es Santa Pola que, para la mayoría de parámetros relacionados con la eutrofización, ocupa el segundo lugar. En este caso la fuente de eutrofización está menos clara aunque podría deberse a la cercanía de la desembocadura del río Segura y de la antigua desembocadura del río Vinalopó que drenan nutrientes de origen agrícola. Entre las localidades consideradas controles en este estudio la estación costera de el Campello tiene una mayor influencia antrópica en comparación con la estación situada en la isla de Tabarca que es la más alejada de núcleos de población de importancia.

7. Bibliografía:

- Aguilar Escribano, Javier (2016): Episodios de Floraciones Algales Nocivas (FAN) en la bahía de Alicante (SE Península Ibérica). Presentado en la sesión de Posters del V Simposio Internacional de Ciencias del Mar. Alicante, junio 2016.
- Anderson, W. T., and J. W. Fourqurean. 2003. "Intra- and Interannual Variability in Seagrass Carbon and Nitrogen Stable Isotopes from South Florida, a Preliminary Study." *Organic Geochemistry* 34 (2): 185–94. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(02\)00161-4](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(02)00161-4).
- Arhonditsis, G., Karydis, M., Tsirtsis, G., 2003: Analysis of Phytoplankton Community Structure Using Similarity Indices: A New Methodology for Discriminating Among Eutrophication Levels in Coastal Marine Ecosystems. *Environmental Management* Vol. 31, 619-632.
- Balkis, N., 2008: Seasonal variations of microphytoplankton assemblages and environmental variables in the coastal zone of Bozcaada Island in the Aegean Sea (NE Mediterranean Sea). *Microphytoplankton and environmental variables of Bozcaada Island. Aquat Ecol.*
- Bérard-Therriault, L., Poulin, M. et Bosseé, L, (1999): Guide d'identification du phytoplankton marin de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent incluant également certains protozoaires. *publ. spéc. can. sci. halieut. aquat.* 128. 387 pp.
- Chrétiennot-Dinet, M.-J., (1990): Chlorarachniophycées, Chlorophycées, Chrysophycées, Cryptophycées, Euglenophycées, Eustigmatophycées, Prasinophycées, Prymnesiophycées, Rhodophycées et Tribophycées. *Atlas du phytoplancton marin. Vol III, 261 pp. Paris. Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique.*
- Delgado, M., Fortuño, J.M., 1991: Atlas de fitoplancton del Mar Mediterráneo. *Sci. Mar.* 55 (Supl.1): 1-133.
- Fernandez, A.M., 2009: La pesquería artesanal de Santa Pola (SE de la Península Ibérica). Identificación de tácticas de pesca y estimación de índices de abundancia. Tesis Doctoral
- Fry, Brian. 2006. *Stable Isotope Ecology* (Book). Springer. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/0-387-33745-8>.
- Gomis, C., 1992: El fitoplancton de El Campello (Provincia de Alicante). Distribución espacio-temporal. Tesis Doctoral.
- Griffiths, Laura L., Rod M. Connolly, and Christopher J. Brown. 2020. "Critical Gaps in Seagrass Protection Reveal the Need to Address Multiple Pressures and Cumulative Impacts." *Ocean and Coastal Management* 183 (April 2019). <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2019.104946>.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2020. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>; searched on 17 November 2020.
- Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (eds) 2004. *Manual on harmful marine microalgae, - Monographs on oceanographic methodology 11, UNESCO, Paris.*
- Harmful Plankton Project, 2006. *Guide to Harmful Phytoplankton: Gymnodinium aureolum* (Hulbert 1957) G. Hansen, comb. Nov. DJS Montagnes, University of Liverpool.
- Horner, R.A., 2002: *A Taxonomic Guide to Some Common Marine Phytoplankton*. Biopress Limited. pp 195.

- Intergovernmental Oceanographic Commission of ©UNESCO. 2010. Karlson, B., Cusack, C. and Bresnan, E. (editors). *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, no. 55.) (IOC/2010/MG/55), 110 pages. (English only) <http://ioc-unesco.org/hab>.
- K.R. Clarke, R.N. Gorley *PRIMER V6: User Manual/Tutorial PRIMER-E*, Plymouth (2006), p. 192
- Lepoint, Gilles, Patrick Dauby, and Sylvie Gobert. 2004. "Applications of C and N Stable Isotopes to Ecological and Environmental Studies in Seagrass Ecosystems." *Marine Pollution Bulletin* 49 (11–12): 887–91. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.07.005>.
- Li, Yuan, Haibo Zhang, Chen Tu, Chuancheng Fu, Yong Xue, and Yongming Luo. 2016. "Sources and Fate of Organic Carbon and Nitrogen from Land to Ocean: Identified by Coupling Stable Isotopes with C/N Ratio." *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 181: 114–22. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2016.08.024>.
- Mancinelli, Giorgio, and Salvatrice Vizzini. 2015. "Assessing Anthropogenic Pressures on Coastal Marine Ecosystems Using Stable CNS Isotopes: State of the Art, Knowledge Gaps, and Community-Scale Perspectives." *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 156 (1): 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2014.11.030>.
- Massuti, M., Margalef, R., 1950: *Introducción al estudio del plancton marino*. (C.S.I.C). Sec. Biología Marina.
- Mompeán, Carmen, Antonio Bode, Mikel Latasa, Bieito Fernández-Castro, Beatriz Mouriño-Carballido, and Xabier Irigoien. 2016. "The Influence of Nitrogen Inputs on Biomass and Trophic Structure of Ocean Plankton: A Study Using Biomass and Stable Isotope Size-Spectra." *Journal of Plankton Research* 38 (5): 1163–77. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbw052>.
- Nasrollahzadeh, H.S., Bin Din, Z., Foong, S.Y., Makhloogh, A., 2008: Trophic status of the Iranian Caspian Sea based on water quality parameters and phytoplankton diversity. *Continental Shelf Research* 28, 1153– 1165.
- Reguera, B., Alonso, R., Moreira, A., Méndez, S. 2011. *Guía para el diseño y puesta en marcha de un plan de seguimiento de microalgas productoras de toxinas*. COI de UNESCO y OIEA, Paris y Viena 2011. *Manuales y Guías de la COI*, 59.
- Ricard, M., 1987: *Diatomophycées*. Atlas du phytoplancton marin. Vol II, 297 pp. Paris. Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique.
- Robinson, David. 2001. "Δ15N as an Integrator of the Nitrogen Cycle." *Trends in Ecology and Evolution* 16 (3): 153–62. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)02098-X](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)02098-X).
- RStudio Team (2020). *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- Sournia, A., 1986: *Cyanophycées, dityochophycées, dinophycées et raphidophycées*. Atlas du phytoplancton marin. Vol I, 219 pp. Paris. Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique.
- Spatharis, S., Tsiirtsis, G., Danielidis, D.B., Do Chi, Tang, Mouillot, D., 2007: Effects of pulsed nutrient inputs on phytoplankton assemblage structure and blooms in an enclosed coastal area. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 73, 807-815.
- Tomas, C.R., 1997: *Identifying marine phytoplankton*. Academic Press, St. Diego.
- Underwood, A J. 1996. *Experiments in Ecology: Their Logical Design and Interpretation Using*

Analysis of Variance. Cambridge University Press.
<https://doi.org/10.1017/CBO9780511806407>.

Van Egmond HP, Van Apeldoorn ME & Speijers GJA., 2005. Biotoxinas Marinas: Estudio FAO: alimentación y nutrición. FAO.

Viana, Inés G., and Antonio Bode. 2015. "Variability in $\Delta^{15}\text{N}$ of Intertidal Brown Algae along a Salinity Gradient: Differential Impact of Nitrogen Sources." *Science of the Total Environment* 512–513: 167–76. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.019>.

WoRMS Editorial Board (2020). World Register of Marine Species. Available from <http://www.marinespecies.org> at VLIZ. Accessed 2020-11-17. doi:10.14284/170

ANEXO I

METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE NUTRIENTES

ANÁLISIS FOSFATO

Método: Se basa en una determinación colorimétrica de los orto-fosfatos disueltos en agua por sistema automatizado con flujo continuo segmentado (CFA).

Partiendo del método descrito por Murphy and Riley (1962) determina los orto-fosfatos que hay disueltos en una muestra acuosa. Determinando el color azul formado por la reacción de los orto-fosfatos, el ión molibdato y el ión antimonio, reducidos con ácido ascórbico en medio ácido pH<1. El complejo azul de fosfo-molibdeno resultante es detectado en el interior de un fotómetro a 880 nm.

Referencia: Methods of Seawater Analysis, K. Grasshoff, M. Ehrhardt, K. Kremling, second revised and extended edition, 1983

Instrumento: Autoanalizador AA3 HR fabricado por Seal Analytical. Usa una técnica analítica de flujo continuo (CFA) basada en la segmentación del flujo de muestra con la inyección de burbujas de aire inerte. Y con determinación final por colorimetría.

Control de calidad: basado en el Standard Methods y en las normas DIN / ISO Standards para determinaciones automáticas de fosfato.

Método Seal Analytical: G-175-96 Rev.11 (Multitest MT13)

ISO para CFA: 15681-12

Participación ocasional en intercalibraciones internacionales (Quasimeme).

Límite de detección del método: 0´020 µM P-PO43-

Rango mínimo de detección: 0 to 6´5 µM P-PO43-

Precisión: 0´2%

Siguiendo procedimiento EPA pt.136, app. B (realizado por Seal Analytical)

ANÁLISIS SILICATO

Método: Se basa en una determinación colorimétrica de los silicatos disueltos en agua por sistema automatizado con flujo continuo segmentado (CFA).

Partiendo del método descrito por Koroleff, F. (1971) la forma reducida silico-molibdato, en solución ácida, pasa en presencia de ácido ascórbico a azul de molibdeno. El ácido oxálico reacciona con la muestra antes de ponerla en contacto con el ácido ascórbico para minimizar las posibles interferencias provenientes de los iones fosfato y que pueda tener la muestra. Finalmente el azul de molibdeno es determinado por colorimetría a 820 nm.

Referencia: Methods of Seawater Analysis, K. Grasshoff, M. Ehrhardt, K. Kremling, second revised and extended edition, 1983

Instrumento: Autoanalizador AA3 HR fabricado por Seal Analytical. Usa una técnica analítica de flujo continuo (CFA) basada en la segmentación del flujo de muestra con la inyección de burbujas de aire inerte. Y con determinación final por colorimetría. El instrumento original se llamó Technicon, y hoy en día Seal Analytical.

Control de calidad: Basado en el Standard Methods y en las normas DIN / ISO Standards para determinaciones automáticas de silicato.

Método Seal Analytical: G-177-96 Rev.11 (Multitest MT19).

ISO para CFA: 16264

Participación ocasional en intercalibraciones internacionales (Quasimeme).

Límite de detección del método: 0´016 $\mu\text{M Si}$

Rango mínimo de detección: 0 to 8´0 $\mu\text{M Si}$

Precisión: 0´5%

Siguiendo procedimiento EPA pt.136, app. B (realizado por Seal Analytical)

ANÁLISIS NITRITO

Método: Se basa en una determinación colorimétrica de los nitritos disueltos en agua con sistema automatizado por flujo continuo segmentado (CFA).

Partiendo del método descrito por Shinn (1941) y adaptado por Bendschneider and Robinson (1952), los nitritos reaccionan, en medio ácido, con sulfanilamida formando una forma de compuesto diazo. El cual se une al NEDD dando lugar a un complejo diazo de color rojizo que es proporcional a la cantidad de nitrito de la muestra y determinada finalmente por colorimetría a 550 nm.

Referencia: Methods of Seawater Analysis, K. Grasshoff, M. Ehrhardt, K. Kremling, second revised and extended edition, 1983

Instrumento: Autoanalizador AA3 HR fabricado por Seal Analytical. Usa una técnica analítica de flujo continuo (CFA) basada en la segmentación del flujo de muestra con la inyección de burbujas de aire inerte. Y con determinación final por colorimetría. El instrumento original se llamó Technicon, y hoy en día Seal Analytical.

Control de calidad: Basado en el Standard Methods y en las normas DIN / ISO Standards para determinaciones automáticas de nitritos. Método Seal Analytical: G-173-96 Rev.10 (Multitest MT18) ISO para CFA: 13395. Participación ocasional en intercalibraciones internacionales (Quasimeme).

Límite de detección del método: 0,0015 $\mu\text{M N- NO}_2^-$

Rango mínimo de detección: 0 to 0,3 $\mu\text{M N- NO}_2^-$

Precisión: 0,2%

Siguiendo procedimiento EPA pt.136, app. B (realizado por Seal Analytical)

ANÁLISIS AMONIO

Método. Se basa en una determinación fluorimétrica del amonio disuelto en agua con sistema automatizado por flujo continuo segmentado (CFA).

Partiendo del método descrito por Kérouel and Aminot 1997 (Fluorometric determination of ammonia in sea and estuarine waters by direct segmented flow analysis. Marine

Chemistry 57: 265-275). La muestra se pone en contacto con el Orto fenil aldehído (OPA) a 75°C en presencia del tampón borato y sodio sulfito para formar especies químicas fluorescentes proporcionales a la concentración de los iones amonio. La fluorescencia de éste complejo resultante es medida excitándolo a 370nm y registrando la emisión a 460nm.

Instrumentos: Autoanalizador AA3 HR fabricado por Seal Analytical (anteriormente Technicon) y Fluorímetro FP 2020 Plus de Jasco. Usa una técnica analítica de flujo continuo (CFA) basada en la segmentación del flujo de muestra con la inyección de burbujas de aire inerte. Y con determinación final por fluorimetría.

Control de calidad: Basado en el Standard Methods y en las normas DIN / ISO Standards para determinaciones automáticas de amonio.

Método Seal Analytical: G-327-05 Rev.7 (Fluorimétrico)

Participación ocasional en intercalibraciones internacionales (Quasimeme).

Límite de detección del método: 0´003 µM N-NH₄⁺

Rango mínimo de detección: 0 to 5´0 µM N-NH₄⁺

Precisión: 0´3%

Siguiendo procedimiento EPA pt.136, app. B (realizado por Seal Analytical)

TOTAL NITRÓGENOS OXIDABLES (NO_xT)= NITRATOS (NO₃-) + NITRITOS (NO₂-)

Método. Se basa en una determinación colorimétrica de los nitratos reducidos a nitritos, con sistema automatizado por flujo continuo segmentado (CFA).

Este procedimiento automatizado, desarrollado por Grasshoff (1970), se basa en una reducción previa de los nitratos a nitritos al pasar la muestra a través de una columna reductora de cobre -cadmio. Posteriormente, los nitritos totales de la muestra reaccionan, en medio ácido, con sulfanilamida formando un compuesto diazo. Este se une al N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (NEDD) dando lugar a un complejo de color rojizo que es proporcional a la cantidad de nitrito de la muestra y determinada finalmente por colorimetría a 550 nm. La concentración de nitratos se calcula por la substracción entre las dos estimaciones: "Nitratos+nitritos" menos "Nitritos".

Referencia: Methods of Seawater Analysis, K. Grasshoff, M. Ehrhardt, K. Kremling, second revised and extended edition, 1983

Instrumento: Autoanalizador AA3 HR fabricado por Seal Analytical. Usa una técnica analítica de flujo continuo (CFA) basada en la segmentación del flujo de muestra con la inyección de burbujas de aire inerte. Y con determinación final por colorimetría. El instrumento original se llamó Technicon, y hoy en día Seal Analytical.

Control de calidad: Basado en el Standard Methods y en las normas DIN / ISO Standards para determinaciones automáticas de nitratos.

Método Seal Analytical: G-173-96 Rev.17 (Multitest MT19)

ISO para CFA: 13395

Participación ocasional en intercalibraciones internacionales (Quasimeme).

Límite de detección del método: 0,006 $\mu\text{M N -NO}_3^-$

Rango mínimo de detección: 0 to 4,0 $\mu\text{M N -NO}_3^-$

Precisión: 0,13%

Siguiendo procedimiento EPA pt.136, app. B (realizado por Seal Analytical)

FÓSFORO TOTAL (TP) POR COLORIMETRÍA Y CFA

Método: Determinación Fósforo Total (TP) colorimétrica por CFA. El método descrito por Koroleff (1977) para una digestión con UV, es adaptado por Seal Analytical a un sistema integrado de digestor con CFA (2008). Este método somete a la muestra a un proceso previo y en continuo de digestión de dos etapas en autoclave a 110°C y alta presión (0,09 MPa). En la primera etapa se añade un agente oxidante de persulfato alcalino y, en segunda etapa, se añade un ácido inorgánico. Una vez digerida el P se determinan los por colorimetría previa reacción con molibdato y reducción con ácido ascórbico, de manera que el complejo azul de molibdeno final es detectado en el interior de un fotómetro a 800 nm.

Instrumento: Autoanalizador AA3 fabricado por Seal Analytical. Usa una técnica analítica de flujo continuo (CFA) basada en la segmentación del flujo de muestra con la inyección de burbujas de aire inerte, y con determinación final por colorimetría. El instrumento original se llamó Technicon, y hoy en día Seal Analytical. Este método requiere un digestor de muestra Julabo.

Control de calidad: Basado en el Standard Methods y en las normas DIN / ISO Standards para determinaciones automáticas de Fósforo.

Método Seal Analytical: G-394-08 Rev.1

Participación ocasional en intercalibraciones internacionales (Quasimeme).

Límite de detección del método: 0,032 $\mu\text{M P}$

Rango mínimo de detección: 0 to 22,6 $\mu\text{M P}$

Precisión: 0,5%

Siguiendo procedimiento EPA pt.136, app. B (realizado por Seal Analytical)