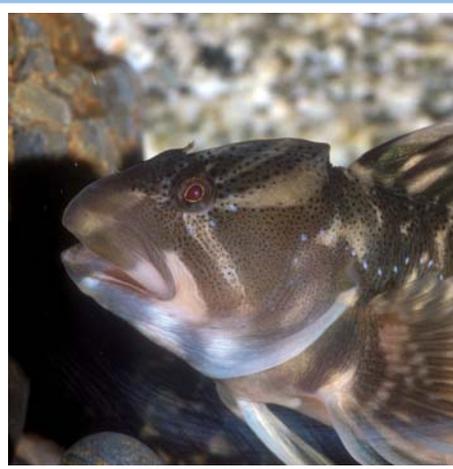
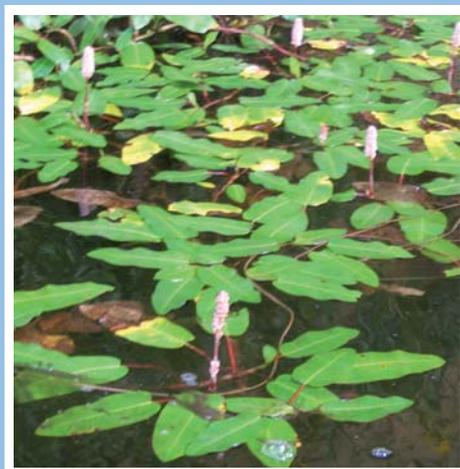
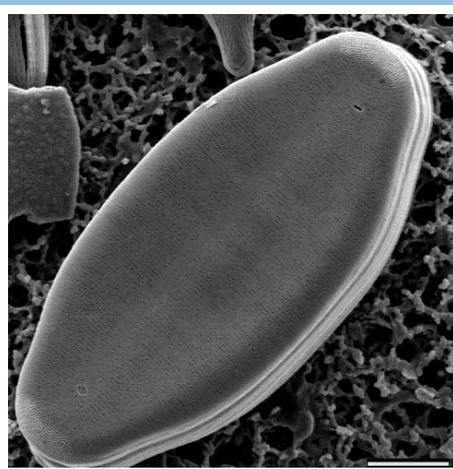


Metodología para el establecimiento del estado ecológico según la directiva marco del agua en la Confederación Hidrográfica del Ebro

Protocolos de muestreo y análisis para:
Fitoplancton
Fitobentos (Microalgas Bentónicas)
Macrófitos
Invertebrados Bentónicos
Ictiofauna



MINISTERIO
DE MEDIO AMBIENTE

Este protocolo ha sido realizado por la Confederación Hidrográfica del Ebro con la dirección y coordinación de Concha Durán y Miriam Pardos y la asistencia técnica de URS. En la elaboración de los protocolos de muestreo y análisis han colaborado:

Protocolos de muestreo y análisis para Fitoplancton

Eduardo Vicente. Universidad de Valencia
Caridad de Hoyos. CEDEX
Pedro Sánchez. Universidad de Granada
Jaume Cambra. Universidad de Barcelona

Protocolos de muestreo y análisis para Fitobentos

Jaume Cambra. Universidad de Barcelona
Luc Ector. Centre de Recherche Public Gabriel Lippmann
Sergi Sabater. Universidad de Girona

Protocolos de muestreo y análisis para Macrófitos

Santos Cirujano. Real Jardín Botánico. Madrid
Jaume Cambra. Universidad de Barcelona
Cesar Gutiérrez. Consultor. Sant Celoni. Barcelona

Protocolos de muestreo y análisis para Invertebrados bentónicos

Javier Alba - Tercedor. Universidad de Granada
Isabel Pardo. Universidad de Vigo
Narcís Prat. Universidad de Barcelona
Ana Pujante. Red Control S.L. Valencia

Protocolos de muestreo y análisis para Ictiofauna

Adolfo Sostoa. Universidad de Barcelona
Diego García de Jalón. E.T.S. Ingenieros de Montes. Madrid
Emili García-Berthou. Universidad de Girona

Edición y supervisión: M^a Jesús de la Fuente Álvaro



METODOLOGÍA PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL ESTADO ECOLÓGICO SEGÚN LA DIRECTIVA MARCO DEL AGUA EN LA CONFEDERACIÓN HIDROGRÁFICA DEL EBRO

PROTOCOLOS DE MUESTREO Y ANÁLISIS PARA

FITOPLANCTON

FITOBENTOS (microalgas bentónicas)

MACROFITOS

INVERTEBRADOS BENTÓNICOS

ICTIOFAUNA

Presentación

La Directiva Marco del Agua que se aprobó en diciembre del año 2000, establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas, representando un antes y un después en la política europea en la materia. Por primera vez se establecen unos objetivos de protección de los recursos hídricos que no sólo se centran en los aspectos físico químicos, si no que se considera el ecosistema en su conjunto, siendo igual de importantes los elementos de calidad físico químicos que los elementos de calidad biológicos.

El objeto de la Directiva Marco del Agua es establecer un marco para la protección de las aguas superficiales continentales, las aguas de transición, las aguas costeras y las aguas subterráneas, que prevenga todo deterioro adicional y proteja y mejore el estado de los ecosistemas acuáticos, promueva un uso sostenible del agua, aumente la protección y mejora del medio acuático, garantice la reducción progresiva de la contaminación del agua subterránea y evite nuevas contaminaciones y, contribuya a paliar los efectos de las inundaciones y sequías.

En el año 2015, los Estados miembros deberán alcanzar el buen estado de todas las masas de agua. Para poder lograr este objetivo es necesario conocer primero una serie de aspectos de la Demarcación Hidrográfica, como sus características físicas y geográficas, la repercusión que la actividad humana ejerce sobre las masas de agua y los aspectos económicos relacionados con el uso del agua. A partir de esta información se realizará un control del estado de las masas de agua, que será comparable con otros Estados miembros, y que permitirá la puesta en marcha de programas de medidas en las masas de agua donde sea necesario.

La Directiva Marco del Agua es una directiva pionera en cuanto a la protección de las aguas, ya que nunca antes se habían considerado elementos de calidad biológicos para evaluar la situación en que se encuentran las masas de agua. Así lo refleja la directiva al establecer que el estado de una masa de agua depende tanto del estado químico, como del ecológico. Una masa de agua superficial estará en buen estado sólo si al menos, su estado químico y ecológico son buenos. En su anexo V la directiva define el sistema para clasificar el estado de las masas de agua, y en concreto para las aguas superficiales establece los indicadores físico – químicos, hidromorfológicos y biológicos, que han de considerarse para la clasificación del estado ecológico.

Los indicadores biológicos que considera son flora acuática (fitoplancton, fitobentos y macrófitos), fauna invertebrada bentónica y fauna ictiológica.

Para facilitar una metodología básica para el establecimiento del estado ecológico, en ríos y lagos, se llevaron a cabo, la Confederación Hidrográfica del Ebro, una serie de seminarios en los que participaron expertos en cada uno de los elementos de calidad biológicos, dando como resultado un protocolo de muestreo y análisis para cada uno de ellos.

Con el propósito de unificar criterios y facilitar el cumplimiento de las obligaciones que la Directiva Marco del Agua establece, el Ministerio de Medio Ambiente presenta esta publicación, que pretende ser un instrumento que facilite a las Demarcaciones Hidrográficas el establecimiento del estado ecológico.

Jaime Palop Piqueras
Director General del Agua.

Índice

Presentación	5
Introducción	19
CAPÍTULO 1: Protocolos de muestreo y análisis para fitoplancton	23
Parte 1:	25
1. Definiciones y objetivos	27
2. Valor indicador del fitoplancton	27
3. Sistemas indicadores existentes	27
3.1. Uso de las especies y de las comunidades como métricas	28
3.2. Uso de los grupos de algas e índices como métricas	28
3.3. Métricas basadas en la biomasa	29
4. Propuesta de métricas para la demarcación del Ebro	30
Parte 2:	33
5. Introducción	35
6. Muestreo del fitoplancton	35
6.1. Equipos y reactivos	35
6.1.1. Equipos	35
6.1.2. Reactivos fijadores	36
6.2. Procedimientos de muestreo	36
6.2.1. Directrices para la selección de estaciones de muestreo y para la toma de muestras	36
6.2.2. Periodos de muestreo y frecuencia	39
6.2.3. Directrices para la toma de muestras	39
6.2.4. Datos y/o muestras complementarias al muestreo de fitoplancton	40
6.3. Conservación y etiquetado de las muestras	40
2.3.1. Técnicas de conservación	40
6.3.1.1. Muestras en vivo	41
6.3.1.2. Muestras con conservantes	41
6.3.2. Etiquetado	41
7. Recuento e identificación de fitoplancton (método utermöhl)	41
7.1. Equipo de laboratorio	41
7.2. Pretratamiento de la muestra	42
7.2.1. Aclimatación de la muestra	42
7.2.2. Homogeneización de la muestra	42
7.2.3. Preparación de submuestras	42
7.2.4. Concentración y dilución	42
7.2.5. Número de algas por campo	42
7.3. Proceso de recuento	43
7.3.1. Recuento por campos	43
7.3.2. Recuento de la cámara completa	44
7.3.3. Cálculo de la concentración de fitoplancton	44
7.3.4. Cálculo del biovolumen	44
7.3.5. Recuentos de picoplancton	44
7.4. Identificación	45
8. Análisis de pigmentos (clorofila 'a')	46
8.1. Equipos y reactivos	46

8.1.1. Equipos y reactivos para la extracción de pigmentos	46
8.1.2. Equipos y reactivos para la determinación de la clorofila	46
8.2. Extracción de pigmentos	46
8.3. Determinación de la clorofila por espectrofotometría	47
8.4. Determinación de otros pigmentos por espectrofotometría	47
8.5. Determinación de pigmentos por técnicas de cromatografía	47
8.6. Confirmación de los resultados	47
9. Protocolo para control de calidad	47
9.1. Directrices para el control de la calidad en la toma y conservación de las muestras	48
9.2. Directrices para el control de la calidad en el análisis de las muestras	48
9.3. Directrices para el control de calidad en el tratamiento de los datos	49
10. Bibliografía General	51
11. Bibliografía para la identificación del fitoplancton	55
12. Apéndice	59

CAPÍTULO 2: Protocolos de muestreo y análisis para fitobentos (microalgas bentónicas)

63

Parte 1: 65

1. Definiciones y objetivos	67
2. Valor indicador de las microalgas bentónicas	67
3. Métricas basadas en microalgas bentónicas	68
3.1. Índices de diatomeas	68
3.2. Métricas basadas en otros grupos de algas	69
3.3. Métricas basadas en la biomasa	69
4. Propuesta de métricas para la cuenca del Ebro	69
4.1. Ríos	69
4.2. Lagos	70

Parte 2: 71

5. Procedimiento para el muestreo de diatomeas bentónicas	73
5.1. Introducción	73
5.2. Equipos y reactivos	73
5.2.1. Equipos de muestreo	73
5.2.2. Reactivos fijadores	73
5.3. Procedimiento de muestreo	74
5.3.1. Selección del punto de muestreo	74
5.3.2. Selección del sustrato	74
5.3.3. Directrices para la toma de la muestra	74
5.3.3.1. Procedimiento para la toma de las muestras en ríos	75
5.3.3.2. Procedimiento para la toma de muestras en lagos y zonas húmedas	76
5.3.4. Conservación y etiquetaje de las muestras	77
6. Pre-tratamiento de muestras de diatomeas bentónicas	77
6.1. Introducción	77
6.2. Material de laboratorio	77
6.2.1. Equipos	77
6.2.2. Reactivos	78
6.2.2.1. Reactivos para limpiar diatomeas	78
6.2.2.2. Reactivos para preparaciones permanentes	78
6.3. Tratamiento previo a la observación microscópica	78
6.3.1. Concentración de las muestras	78
6.3.2. Limpieza de las diatomeas	78

6.3.3. Elaboración de preparaciones permanentes	79
7. Identificación y recuento de diatomeas bentónicas	80
7.1. Introducción	80
7.2. Material de laboratorio	80
7.3. Protocolo de identificación, recuento e interpretación de diatomeas	80
7.3.1. Aspectos preliminares a la identificación	80
7.3.1.1. Nivel taxonómico de identificación	80
7.3.1.2. Determinación de la unidad de recuento	81
7.3.1.3. Determinación del tamaño de la muestra	81
7.3.1.4. Preparación del microscopio	81
7.3.1.5. Tratamiento de valvas rotas y diatomeas no identificadas	81
7.3.2. Procedimiento analítico	82
7.3.3. Registros de datos, preparaciones y muestras	82
8. Control de la calidad en el muestreo, tratamiento e identificación de diatomeas	82
8.1. Introducción	82
8.2. Directrices para asegurar la calidad durante el muestreo	83
8.3. Directrices para asegurar la calidad en los trabajos de laboratorio	84
8.4. Directrices para asegurar la calidad en el tratamiento de datos	84
9. Bibliografía	85
10. Apéndice	89

CAPÍTULO 3: Protocolos de muestreo y análisis para macrófitos

97

Parte 1:	99
1. Definiciones	101
2. Valor indicador de los macrófitos	101
3. Sistemas indicadores existentes	103
4. Propuesta de métricas para la demarcación del Ebro	106
Parte 2:	109
5. Introducción	111
6. Equipos y reactivos	111
6.1. Equipos de muestreo	111
6.2. Reactivos fijadores	112
7. Procedimiento de muestreo en lagos	112
7.1. Selección del punto de muestreo	112
7.2. Directrices para la toma de muestras	112
7.3. Datos y/o muestras complementarios al muestreo de los macrófitos en lagos	113
8. Procedimiento de muestreo en ríos	114
8.1. Selección de la estación de muestreo	114
8.2. Directrices para la toma de muestras	114
8.3. Datos y/o muestras complementarios al muestreo de los macrófitos en ríos	116
9. Selección del periodo de muestreo y frecuencia	116
9.1. Periodo de muestreo	116
9.2. Frecuencia de muestreo en los controles de vigilancia y operativos	117
10. Directrices para la cuantificación de los macrófitos	117
11. Conservación y etiquetado de las muestras	118
11.1. Técnicas de conservación	118
11.2. Etiquetado	118

12. Identificación de muestras y tratamiento de los resultados	118
12.1. Equipos de laboratorio	118
12.2. Identificación de los macrófitos	119
12.3. Tratamiento de los resultados	119
13. Control de la calidad en el muestreo, tratamiento e identificación de macrófitos	120
13.1. Introducción	120
13.2. Directrices para el control de la calidad	120
14. Bibliografía	121
15. Apéndice	125

CAPÍTULO 4 : Protocolos de muestreo y análisis para invertebrados bentónicos

131

Parte 1: 133

1. Definiciones y objetivos	135
2. Valor indicador de los invertebrados bentónicos	135
3. Métricas y métodos de evaluación basados en los invertebrados bentónicos	135
3.1. Ríos	136
3.1.1. Índices bióticos	136
3.1.2. Índices de diversidad	137
3.1.3. Método de clasificación y predicción RIVPACS	137
3.1.4. Método de la EPA (barbour et al. 1999)	137
3.1.5. Método AQEM	138
3.2. Lagos y humedales	138
4. Propuesta de métricas para la demarcación del Ebro	139
4.1. Ríos	139
4.1.1. Método IBMWP (protocolo guadalmed modificado)	140
4.1.2. Método de evaluación con multimétricos	141
4.2. Lagos y humedales	142

Parte 2: 143

5. Protocolo ibmwp	145
5.1. Introducción	145
5.2. Equipos y reactivos	145
5.3. Procedimientos de muestreo	145
5.3.1. Selección y caracterización de las estaciones de muestreo	145
5.3.2. Selección de los hábitats	145
5.3.3. Directrices para la toma de muestras	145
5.3.3.1. Ríos vadeables	145
5.3.3.2. Ríos profundos (no vadeables)	147
5.3.4. Limpieza de las muestras en el campo	147
5.4. Conservación y etiquetado de las muestras	148
5.5. Tratamiento de la muestra en el laboratorio	148
5.6. Cálculo de métricas	149
6. Protocolo de evaluación de los invertebrados bentónicos de ríos con multimétricos	149
6.1. Introducción	149
6.2. Equipos y reactivos	149
6.3. Procedimientos de muestreo	149
6.3.2. Caracterización de la estación de muestreo	150
6.3.3. Directrices para la toma de muestras	151
6.3.4. Limpieza de las muestras en el campo	152
6.4. Conservación y etiquetado de las muestras	152

6.5. Tratamiento de muestras en el laboratorio	152
6.6. Cálculo de métricas	153
7. Modificación del protocolo IBMWP con muestreo basado en la evaluación con multimétricos	154
8. Protocolo para invertebrados bentónicos de lagos	155
8.1. Introducción	155
8.2. Equipos y reactivos	155
8.3. Proccimiento de muestreo	155
8.3.1. Selección y caracterización de las estaciones de muestreo	155
8.3.2. Directrices para la toma de muestras	155
8.3.2.1. Muestreo con salabre ("dipping")	155
8.3.2.2. Muestreo en vegetación sumergida (método de Kornijow y Kairesalo)	156
8.3.3. Limpieza de las muestras en el campo	156
8.4. Conservación y etiquetado de las muestras	157
8.5. Tratamiento de las muestras en el laboratorio	157
8.6. Cálculo de métricas	157
9. Protocolo general para el muestreo y manipulación de invertebrados bentónicos	157
9.1. Introducción	157
9.2. Equipos	157
9.2.1. Equipos de muestreo de invertebrados en ríos y lagos	157
9.2.2. Equipos para el tratamiento de muestras en el laboratorio	159
9.3. Conservantes	159
9.4. Etiquetado de las muestras	160
9.5. Transporte de las muestras	160
9.6. Tratamiento de las muestras e identificación de los invertebrados bentónicos	160
10. Protocolo para control de calidad	161
10.1. Directrices para el control de la calidad en la toma y conservación de las muestras	162
10.2. Directrices para el control de la calidad en el laboratorio	163
10.3. Directrices para el control de la calidad en el tratamiento de los datos	163
11. Bibliografía general	165
12. Bibliografía para la identificación de los invertebrados bentónicos	169
13. Apéndice	175

CAPÍTULO 5: Protocolos de muestreo y análisis para ictiofauna

179

Parte 1:	181
1. Objetivos	183
2. Valor indicador de los peces	183
La ictiofauna también es sensible a las presiones fisicoquímicas que produzcan:	183
3. Sistemas indicadores existentes	184
3.1. Antecedentes en la cuenca del Ebro	184
3.2. Métricas e índices existentes	186
3.2.1. Métricas usadas en los estudios de ictiofauna	186
3.2.1.1. Métricas basadas en la composición	186
3.2.1.2. Métricas basadas en la abundancia	186
3.2.1.3. Métricas basadas en aspectos biométricos	186
3.2.1.4. Métricas basadas en el estado sanitario	187
3.2.2. Índices y métodos estandarizados para el estudio de la ictiofauna	187
3.2.2.1. Índices de similaridad	187
3.2.2.2. Índices de integridad biótica	187
3.2.2.3. European fish index (EFI) y proyecto FAME	190
4. Propuesta de métricas para la demarcación del Ebro	190

5. Introducción	195
6. Equipos y reactivos	195
6.1. Equipos de muestreo	195
6.2. Productos para anestesia, conservación y desinfección	196
6.2.1. Anestésicos	196
6.2.2. Conservantes	196
6.2.3. Desinfectantes de los equipos	197
7. Procedimiento de muestreo mediante pesca eléctrica	197
7.1. Base metodológica de la pesca eléctrica	197
7.2. Selección de la estación de muestreo y del área de captura	198
7.3. Procedimientos de pesca eléctrica	198
7.3.1. Pesca eléctrica en aguas vadeables	198
7.3.2. Pesca eléctrica desde embarcación	200
7.4. Medidas de seguridad específicas de los procedimientos de pesca eléctrica	201
8. Procedimiento de muestreo con redes y otras artes de pesca	201
8.1. Tipos de redes y artes de pesca	201
8.2. Selección de las estaciones de muestreo	202
8.3. Directrices para la pesca con redes	203
9. Identificación, recuento y medidas biométricas	204
9.1. Identificación	204
9.2. Recuento y medidas biométricas	204
9.3. Determinación de la edad de los ejemplares	204
10. Conservación y etiquetado de las muestras	205
10.1. Técnicas de conservación	205
10.2. Etiquetado	205
11. Selección del periodo de muestreo y frecuencia	206
11.1. Periodo de muestreo	206
11.2. Frecuencia de muestreo en los controles de vigilancia y operativos	206
12. Tratamiento de los resultados	207
13. Control de la calidad en el muestreo, tratamiento e identificación de ictiofauna	207
13.1. Introducción	207
13.2. Directrices para el control de la calidad	208
14. Bibliografía general	209
15. Bibliografía para la identificación de los invertebrados bentónicos	212
16. Apéndice	213

CAPÍTULO 6: Directrices para el control de vigilancia y control operativo en lo referido al los indicadores de calidad

1. Directrices para el control de vigilancia y control operativo en lo referido a los indicadores de calidad	221
1.1. Selección de las estaciones de control	221
1.1.1. Red de referencia	221
1.1.2. Control de vigilancia	222
1.1.3. Control operativo	223
1.2. Frecuencia de muestreo	223

Índice de Tablas

Tabla 1.1.: Rangos de biovolumen.....	29
Tabla 1.2.: Sistema de clasificación trófico de la OCDE (1982)	30
Tabla 1.3.: Muestreo de masas de agua vadeable y no vadeable poco profundas	36
Tabla 1.4.: Muestreo de masas de agua profundas – opción 1.....	37
Tabla 1.5.: Muestreo de masas de agua profundas – opción 2.....	38
Tabla 1.6.: Periodos de muestreo y frecuencia	39
Tabla 1.7.: Realizar el trabajo de campo y evaluaciones según los procedimientos estándar previamente definidos.....	48
Tabla 1.8.: Asegurar la correcta conservación de las muestras para el análisis de los pigmentos (o los extractos) y las muestras de fitoplancton fijadas con lugol	48
Tabla 1.9.: Asegurar que se sigan rigurosamente los procedimientos de análisis de las muestras	48
Tabla 1.10.: Realizar pruebas internas de control de calidad	48
Tabla 1.11.: Realizar pruebas externas de control de calidad	48
Tabla 1.12.: Control del manejo de datos y análisis de los resultados	49
Tabla 2.1.: Métricas basadas en las microalgas bentónicas	69
Tabla 2.2.: Realizar los trabajos de campo y evaluar según los procedimientos estándar.....	83
Tabla 2.3.: Asegurar que se sigan rigurosamente los procedimientos de pre-tratamiento de las muestras	84
Tabla 2.4.: Asegurar la correcta identificación de las microalgas (diatomeas) y la fiabilidad de los recuentos.....	84
Tabla 2.5.: Control del manejo de datos y análisis de los resultados	84
Tabla 3.1.: Métricas y métodos para la determinación del estado ecológico de ríos en base a los macrófitos	104
Tabla 3.2.: Métricas y métodos para la determinación del estado ecológico de lagos y humedales	105
Tabla 3.3.: Datos a recopilar en los puntos de muestreo de macrófitos	113
Tabla 3.4.: Datos complementarios en el muestreo de macrófitos en ríos	116
Tabla 3.5.: Periodos recomendados para el muestreo de macrófitos en lagos	116
Tabla 3.6.: Periodos recomendados para el muestreo de macrófitos en ríos	117
Tabla 3.7.: Escala de abundancia de macrófitos	117
Tabla 3.8.: Asegurar la correcta identificación de las especies de macrófitos	120
Tabla 3.9.: Realizar el trabajo de campo y evaluaciones según los procedimientos estándar previamente definidos.....	120
Tabla 3.10.: Control de manejo de datos y de los análisis de resultados	120
Tabla 4.1.: Categorías de calidad del Índice QAELS	139
Tabla 4.2.: Categorías de calidad del Índice IBMWP	140
Tabla 4.3.: Adaptación de las categorías de calidad del Índice IBMWP ala Confederación Hidrográfica del Ebro	140
Tabla 4.4.: Tipos de hábitats	150
Tabla 4.5.: Ejemplo de distribución de hábitats	151
Tabla 4.6.: Directrices de muestreo para cada tipo de hábitat.....	151
Tabla 4.7.: Métricas aplicables para un nivel de identificación de familia.....	154
Tabla 4.8.: Modificación del protocolo IBMWP con muestreo basado en la evaluación con multimétricos	154
Tabla 4.9.: Tipos de redes	158
Tabla 4.10.: Tamaños de redes recomendados en las guías EN 27828: 1994 y EN 28265: 1994	159
Tabla 4.11.: Realización del trabajo de campo y evaluació según los procedimientos estándar	162
Tabla 4.12.: Asegurar la correcta identificación de los taxones en el campo	162
Tabla 4.13.: Asegurar la correcta identificación de las muestras en el campo	162
Tabla 4.14.: asegurar que no se contaminan las muestras ni los sistemas acuáticos	163

Tabla 4.15.: Verificar los resultados del muestreo de los equipos de trabajo.....	163
Tabla 4.16.: Asegurar la correcta identificación de los diferentes taxones.....	163
Tabla 4.17.: Correcta manipulación de las muestras y organismos	163
Tabla 4.18.: Control de la manejo de datos y análisis de los resultados	163
Tabla 5.1.: Listado de especies de peces autóctonos presentes en la demarcación del Ebro (según Doadrio, 2001 y Doadrio y Madeira, 2004; Caiola y Sostoa com.per.) (no se incluye el Delta del Ebro).....	184
Tabla 5.2.: Listado de especies de peces exóticos presentes en la demarcación del Ebro(según Doadrio, 2001 y Carol et al. 2003) (no se incluye el Delta del Ebro).	185
Tabla 5.3.: Listado de especies migradoras consideradas continentales presentes en la cuenca del Ebro(según Doadrio, 2001) (no se incluye el Delta del Ebro).	185
Tabla 5.4.: Métricas significativas del IBICAT y las puntuaciones obtenidas.....	189
Tabla 5.5.: Métricas a determinar en el RFAI	189
Tabla 5.6.: Periodos recomendados para el muestreo de peces en ríos	206
Tabla 5.7.: Periodos recomendados para el muestreo de peces en lagos.....	206
Tabla 5.8.: Asegurar la comparación de los resultados de la pesca eléctrica, en sucesivos muestreos	208
Tabla 5.9.: Realizar el trabajo de campo y evaluaciones según los procedimientos estándar previamente definidos.....	208
Tabla 5.10.: Control del manejo de datos y análisis de los resultados	208
Tabla 6.1.: Objetivos de las redes de control de vigilancia y control operativo	221
Tabla 6.2.: Periodos y frecuencia de muestreo en los controles de vigilancia y operativo	224
Tabla 6.3.: Periodos y frecuencia de muestreo en los controles de vigilancia y operativo (continuación).....	225
Tabla 6.4.: Periodos de muestreo recomendados para invertebrados bentónicos en ríos.....	225
Tabla 6.5.: Periodos de muestreo recomendados para invertebrados bentónicos en ríos.....	225

Índice de Figuras

Figura 1.1.: Planificación de los trabajos con el elemento de calidad fitoplancton para la demarcación del Ebro.....	31
Figura 1.2.: Masas de agua vadeables y no vadeables poco profundas.....	37
Figura 1.3.: Muestreo de masas de agua profundas.....	38
Figura 1.4.: Muestreo de masas de agua profundas y extensas	38
Figura 3.1.: Tipos de <i>hidrófitos</i> (según Den Hartog y Segal, 1964; in Cirujano y Medina, 2002)	102
Figura 3.2.: Planificación de los trabajos con el elemento de calidad macrófitos para la demarcación del Ebro	106
Figura 3.3.: Transectos en lagos vadeables (profundidad < 1.5 m).....	112
Figura 3.4.: Transectos en lagos profundos	113
Figura 4.1.: Desarrollo de los Índices Bióticos más extendidos en Europa	136
Figura 4.2.: Método de evaluación con multimétricos	141
Figura 4.3.: Tipología de hábitats a muestrear para la aplicación del índice IBMWP: 1: zonas lólicas; 2: zonas leníticas; 3; vegetación acuática emergida; 4: arena, grava o fango; 5: macrófitos o macroalgas.....	146
Figura 4.4.: Red de mano estándar accFBA.....	151
Figura 4.5.: Muestreo con salabre.....	155
Figura 4.6.: Muestreo en vegetación sumergida	156
Figura 5.1.: Esquema simplificado del dendrograma (distancia Euclídea al cuadrado y método de vinculación de Ward) representando grupos de estaciones de muestreo, en base a la presencia histórica de los peces.....	188
Figura 5.2.: Planificación de los trabajos con el elemento de calidad ictiofauna para los ríos de la demarcación del Ebro.....	191
Figura 6.1.: Programas de seguimiento de la Directiva 2000/60/CE	221

Índice de Fotografías

Fotografía 1.1.: Diatomeas y Dinofíceas	45
Fotografía 1.2.: Clorofíceas	45
Fotografía 1.3.: Cianobacterias	45
Fotografía 2.1.: <i>Cyclotella menighiniana</i> (Propiedad de Juan Alcober).....	67
Fotografía 2.2.: <i>Navicula gregaria</i> (Propiedad de C. Bouillon y L.Ector).....	70
Fotografía 2.3.: <i>Encyonema caespitosun</i> (Propiedad de C. Bouillon y L. Ector).....	75
Fotografía 2.4.: Toma de muestras de <i>diatomeas bentónicas</i> (Propiedad de Jaume Cambra)	77
Fotografía 2.5.: Pretratamiento de la muestra de <i>diatomeas bentónicas</i> (Propiedad de Jaume Cambra).....	79
Fotografía 2.6.: <i>Melosira varians</i> (Propiedad de Juan Alcober).....	81
Fotografía 2.7.: <i>Diatoma vulgare</i> (Propiedad de Juan Alcober).....	81
Fotografía 2.8.: <i>Cymbella excisa</i> (Propiedad de C. Bouillon y L. Ector)	82
Fotografía 2.9.: Identificación de las diatomeas y cálculo de índices (Propiedad de Jaume Cambra y Juan Alcober).....	83
Fotografía 3.1.: Lemma sobre pies de <i>Myriophyllum</i> y <i>Cerathofillum</i> (Propiedad de URS)	101
Fotografía 3.2.: Lemma sobre pies de <i>Myriophyllum</i> y <i>Cerathofillum</i> (Propiedad de URS)	101
Fotografía 3.3.: <i>Chara vulgaris</i> (Propiedad de URS y Red Control)	104
Fotografía 3.4.: <i>Potamogeton</i> (Propiedad de Red Control).....	106
Fotografía 3.5.: Toma de muestras de <i>macrófitos</i> mediante rastrillo (Propiedad de URS).....	114
Fotografía 3.6.: (Propiedad de URS)	115
Fotografía 3.7.: <i>Potamogeton crispus</i> (Propiedad de URS).....	115
Fotografía 3.8.: <i>Potamogeton pectinatus</i> (Propiedad de URS)	115
Fotografía 3.9.: <i>Potamogeton pectinatus</i> (Propiedad de URS)	115
Fotografía 3.10.: <i>Eichornia crasipes</i> (Propiedad de URS)	119
Fotografía 3.11.: <i>Nuphar luteum</i> (Propiedad de Red Control)	119
Fotografía 4.1.: Técnicas de muestreo de <i>invertebrados bentónicos</i> . Método del IBMWP (Propiedad de Javier Alba Tercedor)	147
Fotografía 4.2.: Técnica de muestreo con kicks para la evaluación con multimétricos (Propiedad de URS)	152
Fotografía 4.3.: Tratamiento de muestras e identificación de <i>invertebrados bentónicos</i> (Propiedad de URS).....	161
Fotografía 5.1.: <i>Salmo trutta*</i> (Propiedad de URS).....	184
Fotografía 5.2.: <i>Salaria fluviatilis</i> (Propiedad de URS).....	185
Fotografía 5.3.: <i>Cobitis paludica</i> (Propiedad de URS).....	187
Fotografía 5.4.: <i>Phoxinus phoxinus</i> (Propiedad de URS).....	188
Fotografía 5.5.: <i>Barbus graellsii</i> (Propiedad de URS).....	191
Fotografía 5.6.: <i>Caruassius auratus</i> (Propiedad de URS)	195
Fotografía 5.7.: <i>Scardinius erythrophthalmus</i> (Propiedad de URS)	196
Fotografía 5.8.: <i>Alburnus alburnus</i> (Propiedad de URS)	197
Fotografía 5.9.: Muestreo de peces con pesca eléctrica en aguas vadeables (Propiedad de URS)	199
Fotografía 5.10.: <i>Ameiurus melas</i> (Propiedad de URS).....	200
Figura 5.11.: <i>Sander lucioperca</i> (Propiedad de URS).....	202
Fotografía 5.12.: Muestreo de peces en lagos y embalses (Propiedad de URS y E. Gracia Berthou).....	203
Fotografía 5.13.: <i>Lepomis gibbosus</i> (Propiedad de URS).....	205
Fotografía 5.14.: <i>Micropterus salmoides</i> (Propiedad de URS)	205
Fotografía 5.15.: <i>Gambusia holbrooki</i> (Propiedad de URS)	205
Fotografía 5.16.: <i>Exos lucius</i> (Propiedad de URS).....	206

Fotografía 5.17.: <i>Rutilus rutilus</i> (Propiedad de URS)	207
Fotografía 6.1.: <i>Navicula antonii</i> (Propiedad de URS).....	221
Fotografía 6.2.: <i>Chondrostoma arcasii</i> (Propiedad de URS).....	222
Fotografía 6.3.: <i>Chondrostoma miegii</i> (Propiedad de URS)	222
Fotografía 6.4.: <i>Barbus haasi</i> (Propiedad de URS)	223
Fotografía 6.5.: <i>Tinca tinca</i> (Propiedad de URS).....	223
Fotografía 6.6.: <i>Cerathophyllum demersum</i> (Propiedad de URS)	224

INTRODUCCIÓN

La aplicación de la Directiva 2000/60/CE (Directiva Marco del Agua, DMA) y especialmente el desarrollo del Anexo V requieren la identificación de los elementos de calidad biológica, parámetros y métricas que permitan establecer el estado ecológico.

La Confederación Hidrográfica del Ebro (CHE) ha abordado esta tarea a partir de la realización de las siguientes tareas:

- Selección de los elementos de calidad biológica, parámetros y métricas¹ más adecuados para establecer el estado ecológico en ríos y lagos.
- Identificación de directrices relativas a los elementos de calidad biológica y parámetros seleccionados que faciliten el diseño de las redes de control de vigilancia y control operativo².
- Elaboración de los protocolos de muestreo, identificación y cálculo de métricas.

Los elementos de calidad biológica inicialmente considerados para las categorías de ríos y lagos, de acuerdo con la DMA, son los siguientes:

Elementos de calidad biológica (Ap. 1.1. Anexo V)	Ríos	Lagos
Composición, abundancia y biomasa del fitoplancton	-	■
Composición y abundancia de la flora acuática	■	■
Composición y abundancia de la fauna bentónica de invertebrados	■	■
Composición, abundancia y estructura de edades de la fauna íctica	■	■

Se considera prioritario que la elección de los parámetros y métricas de los elementos de calidad biológica y los procedimientos metodológicos para su aplicación surjan de los estudios que la comunidad científica ha realizado o está desarrollando en las cuencas ibéricas y del resto de Europa, y reflejen las directrices de los estándares europeos existentes (normas y pre-normas elaboradas por la Comisión Europea de Normalización). Con esto se persigue que los trabajos que se presentan sean reflejo de las tendencias metodológicas más recientes y de mayor seguimiento, y que su futura aplicación facilite la comparación de los resultados y el aprovechamiento (siempre que sea posible) de los datos históricos.

Como punto de partida la Confederación organizó unos Seminarios dedicados a: fitoplancton, fitobentos (microalgas), macrófitos, invertebrados bentónicos y peces. El objetivo de los seminarios fue la puesta en común de experiencias que permitieran avanzar en la definición de los grupos taxonómicos a considerar como parte de los elementos de calidad biológica para el establecimiento del estado ecológico, y la determinación de los métodos de muestreo y análisis más adecuados.

El primer capítulo está dedicado al fitoplancton. Los contenidos incluyen las opiniones y datos recogidos durante la reunión de trabajo mantenida el 5 de noviembre de 2004, entre los expertos Eduardo Vicente (Dept. Ecología y Microbiología, Universidad de Valencia), Caridad de Hoyos (Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas, CEDEX), Pedro Sánchez (Dept. de Botánica e Instituto del Agua, Universidad de Granada), y Jaume Cambra (Dep. Biología Vegetal, Univ. de Barcelona), y técnicos de la CHE (C. Durán y M. Pardos) y de URS (G. González, C. Coletto y I. Miró).

El segundo capítulo está dedicado al fitobentos constituido por microalgas, especialmente diatomeas. Los contenidos incluyen las opiniones y datos recogidos durante la reunión de trabajo mantenida el 22 de octubre de 2004, entre los expertos Jaume Cambra (Dep. Biología Vegetal, Univ. de Barcelona), Luc Ector (Centre de Recherche Public-Gabriel Lippmann; Luxembourg) y Sergi Sabater (Institut d'Ecologia Aquàtica, Univ. de Girona), y técnicos de la CHE (C. Durán y M. Pardos), del Ministerio de Medio Ambiente (J. Ruza y A. Corrochano) y de URS (M. Alonso, G. González e I. Miró).

¹ En el documento se adoptan los siguientes términos y definiciones extraídos de la DMA y de las Guías de monitorización/ Monitoring guides y ECOSTAT:

- Elementos de calidad biológica: incluye fitobentos, macrófitos, fitoplancton, fauna de invertebrados y peces.
- Parámetros: descriptores de los elementos de calidad biológica (composición, abundancia, presencia de taxones sensibles, etc...).
- Métricas: resultados de las mediciones de los parámetros (nº taxones, diversidad de Shannon, %taxones dominantes, diferentes índices, concentración de clorofila, índice de pigmentos, etc...)

² Los controles de vigilancia y operativos son requeridos por la Directiva 2000/60/CE (Anexo V apartado. 1.3.1 y 1.3.2) para conocer el estado inicial de las masas de agua y completar la evaluación de impacto, y como medidas de seguimiento temporal que permitan establecer los cambios a largo plazo debidos a condiciones naturales o por actividades antropogénicas (control de vigilancia), así como para determinar el estado de las masas de agua que se considere que no pueden cumplir sus objetivos medioambientales y para evaluar los cambios en el estado de dichas masas como resultado de los programas de medidas (control operativo).

El tercer capítulo está dedicado al fitobentos constituido por macrófitos, especialmente hidrófitos. Los contenidos incluyen las opiniones y datos recogidos durante la reunión de trabajo mantenida el 10 de diciembre de 2004, entre los expertos Santos Cirujano (Real Jardín Botánico. CSIC. Madrid), Jaume Cambra (Dep. Biología Vegetal. Univ. de Barcelona), y César Gutiérrez (Consultor. Sant Celoni. Barcelona), y técnicos de la CHE (V. Sancho Tello, C. Durán y M. Pardos), del Ministerio de Medio Ambiente (A. Corrochano), del CEDEX (M. Toro) y de URS (M. Alonso, G. González e I. Moral).

El cuarto capítulo está dedicado al zoobentos constituido por los invertebrados acuáticos, visibles a simple vista, que habitan los sustratos sumergidos de ríos y lagos. Los contenidos incluyen las opiniones y datos recogidos durante la reunión de trabajo mantenida el 12 de noviembre de 2004, entre los expertos Javier Alba-Tercedor (Dep. Biología Animal y Ecología. Univ. de Granada), Isabel Pardo (Área de Ecología. Facultad de Ciencias. Univ. de Vigo, Narcís Prat (Dep. Ecología. Univ. de Barcelona), Ana Pujante (Red Control S.L. Valencia), y técnicos de la CHE (L. Pinilla, V. Sancho-Tello, C. Durán, M. Pardos y J. Escoz), del Ministerio de Medio Ambiente (J. Ruza y A. Corrochano), del CEDEX (M. Toro) y de URS (M. Alonso, G. González y M. Real).

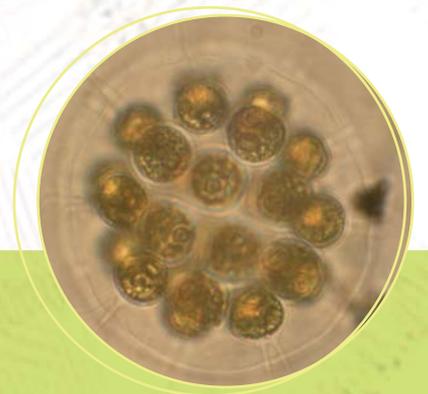
El quinto capítulo está dedicado a la ictiofauna de ríos, lagos y embalses. Los contenidos incluyen las opiniones y datos recogidos durante la reunión de trabajo mantenida el 19 de noviembre de 2004, entre los expertos Adolfo Sostoa (Departamento de Biología Animal. Universidad de Barcelona), Diego García de Jalón (E.T.S. Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid) y Emili García-Berthou (Institut d'Ecologia Aquàtica. Universidad de Girona) y técnicos de la CHE (V. Sancho-Tello, C. Durán y M. Pardos), del Ministerio de Medio Ambiente (J. Ruza, A. Corrochano), de la Universidad de Barcelona (N. Caiola) y de URS (M. Alonso, G. González y X. Julià).

La información obtenida en cada Seminario se ha completado con datos obtenidos de fuentes bibliográficas cuyas referencias se indican en la bibliografía de cada capítulo.

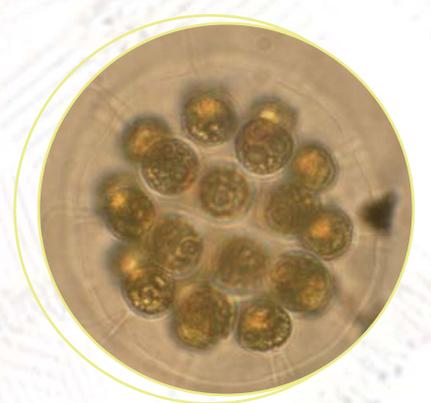


Capítulo 1:

■ Protocolos de muestreo y análisis para fitoplancton



Parte 1:
Generalidades



1. DEFINICIONES Y OBJETIVOS

Se define como fitoplancton la comunidad de microorganismos, en su mayoría fotosintéticos, (microalgas, cianobacterias, flagelados heterótrofos y otros grupos sin clorofila) que vive suspendida en la masa de agua.

Este documento tiene como objetivo identificar métricas para el establecimiento del estado ecológico de los lagos y embalses de la cuenca del Ebro, basados en el fitoplancton, en aplicación de la Directiva 2000/60/CE, así como establecer las directrices metodológicas para las operaciones de muestreo y análisis.

2. VALOR INDICADOR DEL FITOPLANCTON

La composición y abundancia del fitoplancton en lagos y embalses depende de los siguientes factores:

- Condiciones físicas e hidrológicas: luz, temperatura, turbulencia/estabilidad del agua, tiempo de residencia del agua y tasa de sedimentación del plancton¹.
- Composición química del agua: nutrientes y materia orgánica, mineralización (compuestos de proporcionalidad constante) y pH, oligoelementos, etc...
- Factores biológicos:
 - Depredación por parte de filtradores planctófagos (zooplancton y peces) y relaciones entre especies (efectos alelopáticos y toxicidad inducida por algunas especies).
 - Parasitismo fúngico. Infecciones por parte de hongos y cromistas heterótrofos flagelados capaces de reducir densas poblaciones fitoplactónicas.

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 análisis. En España existe un conocimiento suficiente del fitoplancton, en especial para los embalses.

En el marco de la aplicación de la DMA, en la demarcación del Ebro, el fitoplancton es adecuado para la detección y seguimiento de las **presiones fisicoquímicas** 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).
- contaminación orgánica (soluble y particulada).

El fitoplancton es indicador de las **presiones hidromorfológicas** que determinan cambios en la tasa de renovación de lagos y embalses.

3. SISTEMAS INDICADORES EXISTENTES

La DMA requiere identificar la composición del fitoplancton y su abundancia. No obstante, el nivel de identificación taxonómica no está establecido y éste es uno de los aspectos a determinar "*a priori*".

El análisis del fitoplancton incluye:

- Identificación taxonómica.
- Recuentos.
- Cálculo de biovolúmenes.
- Análisis de pigmentos (en general Clorofila "a" y otros pigmentos o sus derivados cuando tengan capacidad como indicadores).

¹ El tiempo de residencia del agua en el sistema tiene gran importancia en la composición específica y abundancia del fitoplancton, puesto que está relacionado con la tasa de exportación del plancton.

En los estudios del fitoplancton existen los siguientes enfoques:

- 1) Estudio de las especies y de las comunidades características.
- 2) Ponderación de los diferentes grupos (índices).
- 3) Análisis de parámetros relacionados con su biomasa (concentración de pigmentos, biovolumen).

3.1. USO DE LAS ESPECIES Y DE LAS COMUNIDADES COMO MÉTRICAS

El estudio de las comunidades del fitoplancton, a través de las asociaciones de especies (*algal assemblages*), constituye una de las líneas metodológicas a seguir para la caracterización de los diferentes tipos de lagos y embalses, y para la obtención de métricas para evaluar su estado ecológico. El modo de identificar las asociaciones de especies consiste en obtener inventarios (especies y/o géneros) de los tipos de lagos o embalses, y analizar los patrones de variación de la composición de las especies por medio de técnicas estadísticas (por ejemplo análisis de componentes principales). Posteriormente podrán elaborarse índices de comunidades para cada tipo de lago o embalse².

Para iniciar esta línea de trabajo se requiere un buen número de inventarios y recopilar información sobre la relación de las especies o asociaciones y la calidad del agua (James y Evison, 1979; y otros). En el caso de los embalses españoles, existe un conocimiento suficiente sobre las asociaciones de especies del fitoplancton, recogido en los trabajos de investigación de Planas 1975, Margalef *et al.* 1976; 1982, Sabater y Nolla 1990, Riera 1993, Dasí *et al.* 1998; y en estudios realizados por el CEDEX (algunos publicados en De Hoyos *et al.*, 2004 y Negro y De Hoyos, 2005) y por la Confederación Hidrográfica del Ebro. En el caso de los lagos hay estudios completos para algunos, si bien falta información para muchos.

La línea de trabajo indicada requerirá de un periodo relativamente largo hasta obtener las métricas específicas para los tipos de lagos y embalses. Durante este lapso pueden aplicarse índices existentes. Éstos están basados en los valores de sensibilidad de las especies, ponderados por un valor indicador; y se refieren principalmente al grado trófico (índices tróficos) o al contenido en materia orgánica (saprobios). Entre éstos destacan el índice SLA (Sládecek, 1983) y Wegl (1985) en Alemania.

Otra posibilidad sería explorar la utilización de las diatomeas fitoplanctónicas, exclusivamente para determinar el grado trófico, y utilizar para esto el programa OMNIDIA, calculando los índices Van Damm y Sládecek. También es posible que otros grupos (por ejemplo las criptofíceas) sean de utilidad en el futuro, cuando avancen los estudios.

3.2. USO DE LOS GRUPOS DE ALGAS E ÍNDICES COMO MÉTRICAS

Se obtienen recuentos para los principales grupos de algas, y se formulan índices basados en las abundancias relativas y en el valor indicador de cada grupo. Algunos ejemplos son:

- **Índice trófico planctónico** (Barbe *et al.*, 1990). Responde a la siguiente fórmula:

$$ITP = \text{promedio}(B \times \sum Qi \times Aj) - 5$$

Qi = puntuación de calidad biológica asignada a los grupos del fitoplancton (varía de 1 a 7)

Aj = Abundancia relativa (%) de los grupos (varía de 0 a 5)

B = Biomasa del fitoplancton a partir de la Clorofila "a" (varía entre 1 y 5).

Se ha propuesto como uno de los indicadores del estado ecológico de los humedales del País Vasco.

Existe una modificación de este índice que se está utilizando actualmente en Francia, y que responde mejor que el original. El índice modificado (Barbe *et al.*, 2003) no incluye la clorofila y las puntuaciones asignadas a los grupos del fitoplancton han variado. La fórmula del índice es la siguiente:

$$IPL = \sum (Qi \times Aj)$$

² Por ejemplo siguiendo el método que se usó para el índice CEE de diatomeas y mediante el programa OMNIDIA o utilizando la propuesta de clasificación funcional del fitoplancton (Reynolds *et al.*, 2002).

- **Índice de Hörnström** (1981). Responde a la siguiente expresión:

$$IL = \sum (f \times Is) \div \sum f$$

IL = Índice trófico del lago
 f = Frecuencia de la especie (recuento)
 IS = Índice trófico de la especie

- **Índice SLA** (Sládecek, 1983). Se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$SLA = \sum_{i=1}^n h \times g \times S \div \sum_{i=1}^n g \times h$$

h = Abundancia de la especie i
 g = Valor indicador de la especie i
 S = Valor de sensibilidad de la especie i

- Porcentaje de cianobacterias

En general, el predominio de las cianobacterias es indicador de eutrofia, pero esto no es generalizable a todos los embalses, ni especialmente a todos los lagos. No obstante en algunos tipos de masas de aguas, el seguimiento de la abundancia de las cianobacterias puede ser útil; además tiene un interés adicional dado que algunas especies de cianobacterias poseen cepas tóxicas.

- Frecuencia e intensidad de floraciones

Se analiza la presencia e intensidad de floraciones de cianobacterias y/o algas clorococcales coloniales o filamentosas, ya que en medios eutróficos éstas suelen ser frecuentes y de gran intensidad (afectan a gran parte de la masa de agua). En ECOFRAME³ utilizan el siguiente esquema para su clasificación:

- a) No se aprecian natas o agregados y no hay dominancia (<95%) de filamentos o colonias de cianobacterias o clorococcales.
- b) Misma situación que a) pero se detectan de forma puntual o intermitente formaciones de superficie de cianobacterias.
- c) Dominan los filamentos o colonias de cianobacterias (>95%), floraciones evidentes y/o frecuentes.

3.3. MÉTRICAS BASADAS EN LA BIOMASA

La biomasa del fitoplancton se determina a partir de los recuentos (células/ml), biovolumen (mm³/L), e indirectamente a través de la concentración de clorofila. Existen procedimientos estandarizados para la obtención de estas métricas; y además se han desarrollado nuevas técnicas basadas en la fluorocitometría de flujo y nuevas generaciones de contadores de partículas (contadores laser) que pueden ser de utilidad para el establecimiento del número y biomasa algal.

- **Recuentos en células/ml.** Esta estandarizado su procedimiento y es un parámetro habitual en los estudios de fitoplancton (ver apartado 7).
- **Biovolumen.** Es una técnica más costosa pero que también se está usando en estudios de embalses (ver apartado 7.3.4). Pueden existir desviaciones en los resultados derivadas de los cálculos. Los rangos de biovolumen observados en un estudio de 37 embalses españoles son los siguientes (De Hoyos, comunicación personal):

	Oligotrófico	Mesotrófico	Eutrófico
Biovolumen (mm³/L)	<1	1 – 2,5	> 2,5
Nº embalses	17	8	12
Porcentaje	46%	22%	32%

Tabla 1.1.: Rangos de biovolumen

³ ECOFRAME: Propuesta metodológica para la determinación del estado ecológico en lagos someros. Ver Moss et al (2003).

El rango de biovolumen medido en los embalses es de 0,07 – 40,5 mm³/L. Los límites de los niveles tróficos indicados en la tabla son una media de los rangos considerados por 7 autores diferentes, recogidos en Willén (2000).

Existen índices de grupos algales basados en proporciones de biovolúmenes. Entre éstos se señalan los siguientes:

✓ $Iga = 1 + 0,1 \times Cr + Cc + 2 \times (Dc + Chc) + 3 \times Vc + 4 \times Cia \div 1 + 2 \times (D + Cnc) + Chnc + Dnc$

D: Dinoflagelados; Cnc: crisófitos no coloniales; Chnc: clorococales no coloniales; Dnc: diatomeas no coloniales; Cr: criptófitos; Cc: crisófitos coloniales; Dc: diatomeas coloniales; Chc: clorococales coloniales; Vc: volvocales coloniales

Se ha propuesto como uno de los indicadores del estado ecológico de los lagos de montaña y cársticos de Cataluña (Agencia Catalana de l'Aigua, 2003).

✓ Índice de Brettum (1989)

$$IT = \sum (v \times I_s) \div \sum v$$

I_T = Índice para un nivel trófico determinado

v = Biovolumen de la especie

I_s = Índice trófico de la especie para un cierto nivel trófico

- **Concentración de clorofila.** Generalmente se analiza la clorofila "a" (ver capítulo 8). Los rangos establecidos por el sistema de clasificación trófica de la OCDE (1982) son:

Clorofila 'a' µg/L	Ultra-oligotrófico	Oligotrófico	Mesotrófico	Eutrófico	Hipereutrófico
Promedio anual	< 1,0	<2,5	2,5 -8	8 - 25	>25
Máximo anual	< 2,5	<8,0	8 - 25	25-75	>75

Tabla 1.2.: Sistema de clasificación trófico de la OCDE (1982)

Estos valores corresponden a clorofila de superficie, no obstante también se consideran básicamente válidos para las concentraciones medias en la capa fótica (procedentes de muestras integradas las cuales se consideran actualmente más representativas que las muestras de superficie).

También pueden obtenerse perfiles con una sonda fluorimétrica. Éstos permiten estimar las concentraciones de los grupos principales del fitoplancton (cianobacterias, clorófitos, criptófitos y diatomeas)⁴, y su distribución en la columna de agua, a partir de la fluorescencia que emiten los pigmentos fotosintéticos, como respuesta a la excitación con luz de diferentes longitudes de onda.

En todos los casos, el establecimiento de la posición de las poblaciones algales en las diferentes profundidades del perfil vertical es muy recomendable para la correcta evaluación del nivel trófico y de las especies fitoplanctónicas indicadoras.

4. PROPUESTA DE MÉTRICAS PARA LA DEMARCACIÓN DEL EBRO

El fitoplancton se considera un elemento de calidad principal para el establecimiento del estado ecológico de los lagos y del potencial ecológico de los embalses de la demarcación del Ebro. En los ríos el fitobentos es un indicador más apropiado que el fitoplancton (ausente o poco desarrollado en los tramos altos de los ríos).

⁴ Los tipos de pigmentos que presentan estos grupos de algas son: sólo clorofila "a" las cianobacterias, clorofila "a" y "b" los clorófitos, clorofila "a" y "c" las diatomeas y criptófitos.

El procedimiento de trabajo para la identificación de métricas del fitoplancton se esquematiza en la siguiente figura:

Planificación de trabajos con el elemento de calidad fitoplancton para la demarcación del Ebro

Muestras iniciales y control de vigilancia

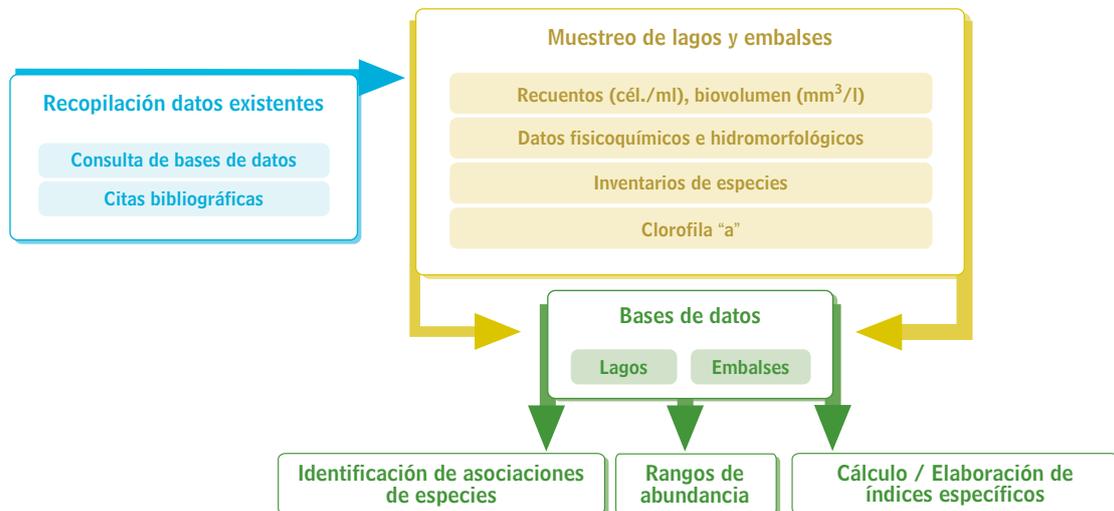


Figura 1.1.: Planificación de los trabajos con el elemento de calidad fitoplancton para la demarcación del Ebro

Las tareas a realizar son las siguientes:

- Recopilar la información existente en los trabajos realizados por la Confederación Hidrográfica del Ebro, las Comunidades Autónomas y por los centros de investigación (Universidades, CSIC).
- Realizar muestreos en las masas de agua de referencia y en las sometidas a diferentes grados de alteración fisicoquímica (e hidromorfológica), con objeto de conocer la composición del fitoplancton y su abundancia. Se recomienda obtener:
 - Inventarios completos del fitoplancton (nivel de especie en las masas de referencia).
 - Valores de abundancia de los taxones, y de los grupos principales (células/ml y/o biovolúmenes).
 - Concentración de clorofila "a" (y de otros indicadores pigmentarios del plancton).
 - Datos hidromorfológicos y fisicoquímicos relevantes (temperatura, profundidad del disco de *Secchi*, espesor de la capa fótica, coeficiente de extinción de la luz en epilimnion, metalimnion e hipolimnion, turbidez, tasa de renovación del agua, conductividad, alcalinidad, pH, potencial Redox, compuestos de proporcionalidad constante, nutrientes, oxígeno disuelto).

El procedimiento de muestreo y análisis recomendado se presenta en la parte II de este documento y está basado en metodologías estandarizadas y de amplia utilización.

- Analizar los datos obtenidos en las masas de referencia e identificar las asociaciones de especies (*algal assemblages*), los rangos de abundancia y biomasa, y los valores de otras métricas analizadas (índices), constituyendo éstos las condiciones de referencia para el tipo representado por la masa de referencia. Esto requerirá el uso de métodos estadísticos.
- Identificar, en las masas sometidas a presiones, la composición y abundancia del fitoplancton (floraciones, especies con cepas tóxicas,...).
- Recopilar la información existente y consultar con expertos para la identificación de las condiciones de referencia para los tipos que carezcan de masas de agua de referencia.

Se considera de gran importancia que los datos obtenidos se incorporen en una base de datos que responda a los requerimientos de la DMA. El tipo de datos a incluir sería:

- Nombre de la especie / grupo taxonómico.
- Categoría de masa en la que se encuentra: Lago, embalse, aguas de transición.
- Tipo de la masa (según la tipificación realizada para cumplimentar la DMA).
- Masa de referencia / No referencia.

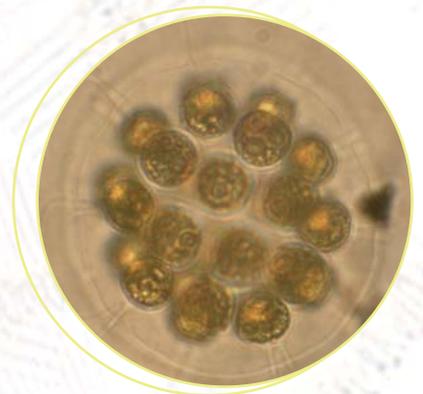
- Localización geográfica (coordenadas).
- Recuento individual y total del fitoplancton.
- Tipo de muestra de la que procede (puntual, integrada, red vertical u horizontal; en todos los casos se indicará la profundidad en el perfil vertical).
- Otros datos asociados al fitoplancton (concentración de clorofila "a" y otros pigmentos indicadores).
- Datos fisicoquímicos: transparencia (profundidad del disco de *Secchi*), espesor de la capa fótica, coeficiente de extinción de la luz en epilimnion, metalimnion e hipolimnion, turbidez, temperatura, conductividad, alcalinidad, pH, compuestos de proporcionalidad constante, nutrientes, oxígeno disuelto.
- Datos hidromorfológicos: superficie y profundidad de la masa de agua, tasa de renovación, etc.
- Datos biológicos (zooplancton, porcentaje de cobertura de los macrófitos sumergidos y/o helófitos, peces).

Hasta disponer de los resultados de los estudios del fitoplancton, se pueden realizar evaluaciones basadas en métricas sencillas como la concentración de clorofila, los porcentajes de los grupos principales del fitoplancton, y, en embalses, la frecuencia e intensidad de las floraciones de cianobacterias, así como aplicar índices descritos en la bibliografía.



Parte 2:
■ Protocolos

En las páginas siguientes se incluye un procedimiento destinado al uso del fitoplancton como elemento de calidad biológica para el establecimiento del estado ecológico en lagos y embalses. El objetivo es facilitar la obtención de inventarios comparables que permitan la identificación de las “asociaciones de especies” y los rangos de abundancia y biomasa característicos de los tipos de lagos y embalses.



5. INTRODUCCIÓN

Este protocolo establece una metodología para el muestreo y análisis del fitoplancton de lagos y embalses, dirigida al establecimiento del estado ecológico o potencial ecológico según las directrices de la Directiva 2000/60/CE. Su elaboración se ha basado en los contenidos de la reunión de trabajo efectuada en la Confederación Hidrográfica del Ebro, en 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), con fecha de 1-05-2005.

El protocolo abarca los siguientes temas:

- Muestreo del fitoplancton:
 - Equipos.
 - Técnicas de toma de muestras.
 - Conservación /pretratamiento de las muestras.
- Técnicas de análisis:
 - Técnicas de recuento y medida de biovolúmenes.
 - Método para el análisis de pigmentos.
- Control de calidad.

6. MUESTREO DEL FITOPLANCTON

Se presentan las directrices metodológicas para la toma de muestras de fitoplancton y de clorofila “a”, en las aguas someras y profundas de lagos y embalses de la cuenca del Ebro.

6.1. EQUIPOS Y REACTIVOS

6.1.1. Equipos

- Protección personal:
 - Botas o vadeadores de pescador.
 - Guantes de látex.
 - Chaleco salvavidas (muestreo desde embarcación).
- Recolección de muestras:
 - Botellas de vidrio (125- 150 ml) (para fitoplancton). Se recomienda que la botella sea transparente de color ámbar; así se protege la muestra de la luz y se puede apreciar el color para controlar la decoloración debida a la sublimación del conservante (muestras con Lugol) (ver apartado 6.1.2.).
 - Viales de vidrio o plástico con tapón hermético (para fitoplancton de red).
 - Botellas opacas de plástico (2 L) (clorofila) y otra botellería en plástico de calidad con cierres herméticos para las muestras de agua (análisis químicos).
 - Botella hidrográfica (muestras discretas en profundidad).
 - Tubo flexible de plástico lastrado de longitud predeterminada (muestras integradas) o tubo rígido de hasta 2 m (muestras integradas en aguas someras).
 - Red de nytal® o nylon de 20 µm de luz de poro (para muestras con red de arrastre horizontal o vertical); en lagos de montaña y aguas ultraoligotróficas pueden requerirse redes de 10-15 µm de poro (y realizarse diversos arrastres preferiblemente verticales) para obtener unas concentraciones de células adecuadas.
 - Disco de *Secchi* y radiómetro (preferiblemente espectrorradiómetro).
 - Fluorímetro.
 - Sonda multiparamétrica con sensores de temperatura, turbidez, conductividad, pH y oxígeno disuelto.

- Aparato de localización geográfica (GPS).
- Equipo de filtración para filtrar en el campo la muestra destinada al análisis de pigmentos.
- Equipo de congelación con nitrógeno líquido o similar (nieve carbónica) para la conservación del filtrado para el análisis de pigmentos, o bien otros fijadores o conservantes (acetona, etanol,...) dependiendo del método de extracción a usar.
- Bolígrafo o rotulador permanente (o cualquier otro método para etiquetar las muestras). Si se usan etiquetas, estas deben ser resistentes a la humedad.
- Instrumentos adicionales para muestreos en barco:
- Barca adecuada para las condiciones locales con el equipo de seguridad apropiado.

6.1.2. Reactivos fijadores

Se usan: Solución de Lugol (mezcla de yoduro potásico y yodo) y formaldehído. Los métodos de aplicación se presentan en el apartado 6.3.

- 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 KI (yoduro potásico) en 1 litro de agua desmineralizada; añadir 50 g de cristales de yodo y agitar hasta que se disuelvan; añadir 100 g de ácido glacial acético; decantar la solución antes de su uso para eliminar los posibles precipitados.
 - 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).

El líquido resultante ha de estar fuertemente coloreado. Conservar en un recipiente hermético y protegido de la luz para minimizar su sublimación. Añadir de 0,5-1 ml de Lugol iodado por cada 100 ml de muestra hasta obtener un color miel (la cantidad a añadir dependerá siempre del contenido de materia orgánica u otros reductores en la muestra). El Lugol se degrada por foto-oxidación, luego las muestras se deben conservar a oscuras, y hay que controlar periódicamente la pérdida de color de la muestra, añadiendo más reactivo si se requiere.

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

6.2. PROCEDIMIENTOS DE MUESTREO

6.2.1. Directrices para la selección de estaciones de muestreo y para la toma de muestras

La selección de las estaciones de muestreo tendrá en cuenta aspectos como la morfometría de la cubeta, profundidad, entrada y salida de flujos, cobertura de vegetación acuática, vertidos puntuales, usos etc. La recogida de muestras de fitoplancton se realizará preferiblemente en los mismos puntos en los que se tomen muestras fisicoquímicas y otras muestras biológicas, para tener la máxima información posible. En los lagos y embalses profundos es muy importante conocer la estructura vertical para localizar las discontinuidades e interfases fisicoquímicas y biológicas, y las zonas de mayor densidad de organismos. Dependiendo del tipo de lagos y/o embalses, y de los recursos disponibles se pueden plantear diferentes estrategias de muestreo:

- a) Muestreo de masas de agua vadeables y no vadeables poco profundas:

En lagos vadeables (<1,5 m de profundidad) y no vadeables poco profundos (<5 m) se recomienda:

Tipo de lago	Número de muestras / tipo	Procedimiento
Lagos vadeables y no vadeables de <5 m profundidad.	Muestras discretas de superficie o integradas (si la profundidad >1-2 m), en varias estaciones de la masa de agua.	<ul style="list-style-type: none"> ● Tomar las muestras discretas de superficie en el propio recipiente, unos 25-30 cm por debajo de la superficie. ● Tomar la muestra integrada entre la superficie y 3 m de profundidad (con un tubo flexible) y añadir una muestra tomada cerca del fondo (4-5 m).

Tabla 1.3.: Muestreo de masas de agua vadeable y no vadeable poco profundas

Número de muestras: Variable según la superficie y morfología de la masa de agua, y según los recursos disponibles. En general entre 1-3 (lagos pequeños, <50 ha) y 3-5 (lagos grandes, >50 ha).

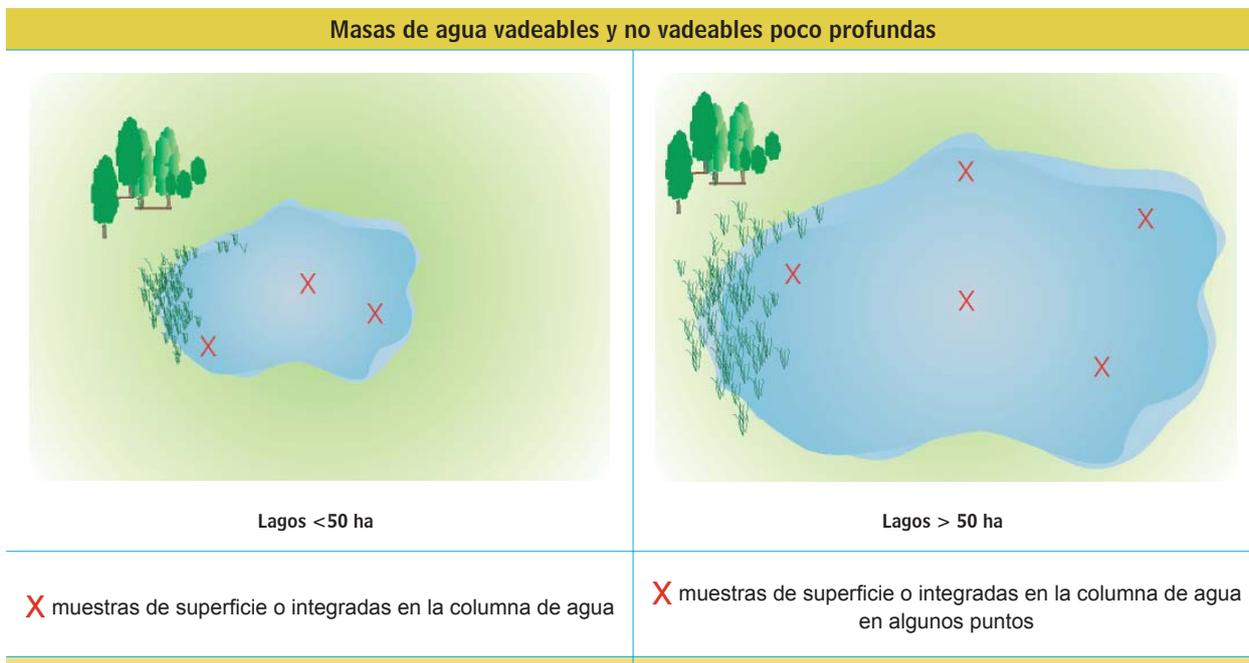


Figura 1.2.: Masas de agua vadeables y no vadeables poco profundas

b) Muestreo de masas de agua profundas:

Para lagos profundos y embalses se seleccionará preferentemente un punto en la zona de máxima profundidad y se obtendrán varias muestras en el perfil vertical o una muestra integrada procedentes de la capa trofogénica (y si es posible otras de los niveles metalimnéticos e hipolimnéticos1); si la masa de agua está estratificada, la obtención de suficientes muestras discretas en el perfil permite obtener una información más detallada del fitoplancton que por medio de una muestra integrada.

Tipo de lago	Número de muestras / tipo	Procedimiento
Lagos de >5m profundidad Embalses	<p>Opción 1: Varias muestras discretas distribuidas en el perfil. En general:</p> <ul style="list-style-type: none"> superficie profundidad Disco de <i>Secchi</i>, 2,5 veces Disco de <i>Secchi</i> <p>Pueden incluirse muestras adicionales relacionadas con clinas o gradientes observados en los perfiles realizados con sonda fluorimétrica (máximos algales) o de turbidez (acúmulos de material particulado o corrientes profundas de densidad) (a).</p>	<ul style="list-style-type: none"> Realizar un perfil de temperatura, conductividad, turbidez, pH, potencial redox y oxígeno disuelto para identificar el patrón de estratificación. Medir la profundidad del Disco de <i>Secchi</i> y la penetración de la luz (espectrorradiómetro). Tomar las muestras de los diferentes niveles con botella hidrográfica. Alternativamente es recomendable realizar un perfil con el fluorímetro (usar 4 sensores fluorimétricos: clorofila a, ficocianina, ficoeritrina y CDOM) y planear el muestreo según las lecturas obtenidas.

(a). Los niveles de importancia para el análisis del fitoplancton en los lagos y embalses estratificados son: epilimnion, interfase epilimnion-metalimnion, máximo metalimnético de oxígeno, metalimnion profundo, interfase entre el metalimnion e hipolimnion (picoplancton APC), hipolimnion e hipolimnion profundo (bacterias fotosintéticas).

Tabla 1.4.: Muestreo de masas de agua profundas – opción 1

Nº de muestras /perfil: Mínimo 3 y hasta 5-6.

Tipo de lago	Número de muestras / tipo	Procedimiento
Lagos de >5 m profundidad Embalses	<p>Opción 2: Muestra integrada entre la superficie y una profundidad previamente prefijada; ésta puede ser la correspondiente a la capa trofógena (2,5 x profundidad del Disco de Secchi) (profundidad en la que se mide el 1% de la luz incidente).</p> <p>Esta opción solo es aceptable en masas de agua no muy profundas, y para perfiles bastante homogéneos; en caso contrario se pierde detalle en la información y se dejan sin estudiar las aguas profundas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Realizar un perfil de temperatura, conductividad, turbidez y oxígeno disuelto para identificar el patrón de estratificación. Medir la profundidad del Disco de Secchi y realizar perfiles con fluorímetro. Tomar la muestra integrada mediante un tubo de de plástico 20 mm de diámetro convenientemente lastrado, y de longitud prefijada. Alternativamente, se pueden mezclar volúmenes iguales de muestras tomadas con botella hidrográfica en diferentes niveles.

Tabla 1.5.: Muestreo de masas de agua profundas – opción 2

Nº de muestras: 1 ó 2 (si se integran las aguas más profundas)

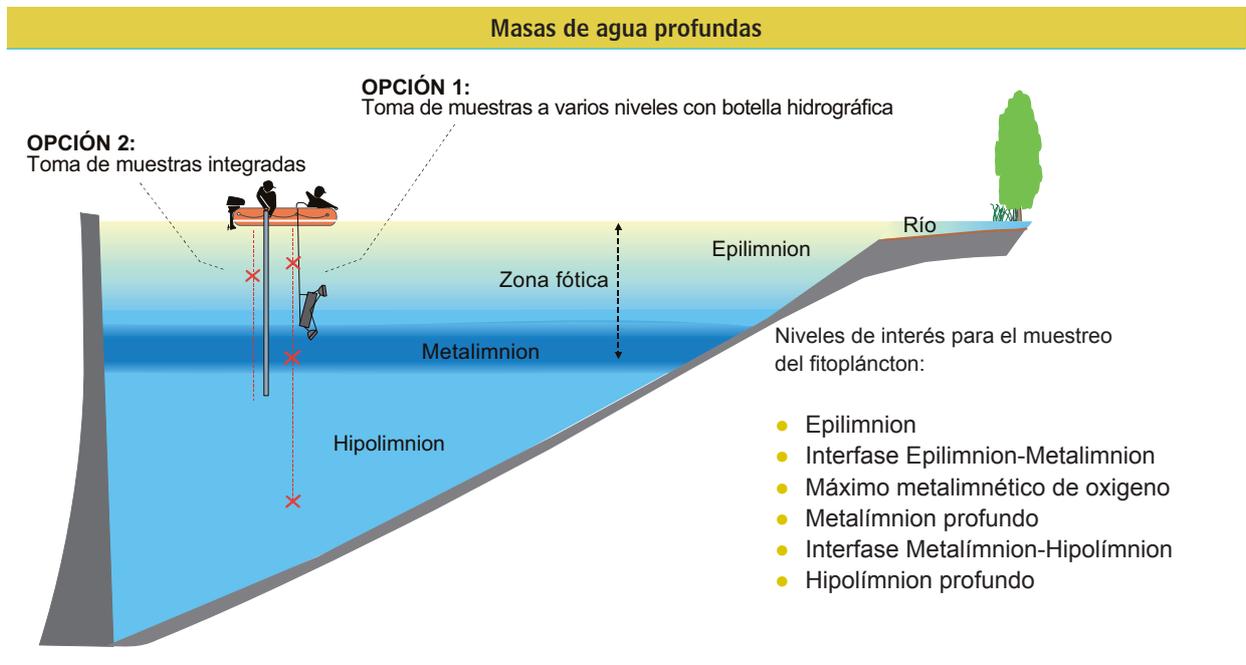


Figura 1.3.: Muestreo de masas de agua profundas

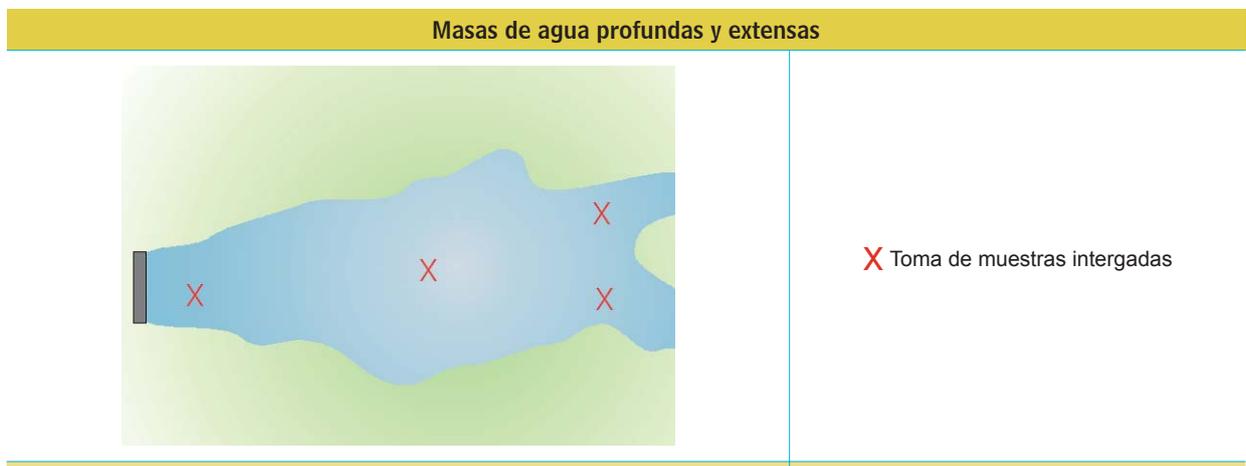


Figura 1.4.: Muestreo de masas de agua profundas y extensas

En lagos de montaña profundos de difícil acceso con embarcación, se considera aceptable tomar la muestra de superficie desde la orilla, utilizando pértigas que permitan adentrar la botella y recoger plancton representativo, y no afectado en su composición por las comunidades litorales y/o bentónicas; no obstante siempre que sea posible es preferible el muestreo desde embarcación neumática.

c) Muestreo en masas de agua profundas y extensas:

En embalses y lagos extensos y con brazos se fijará un punto de muestreo en la zona de la presa (máxima profundidad) y otros puntos de muestreo repartidos en zonas medias y colas. Esto es importante en embalses de largo recorrido, o con varios brazos principales, en los que las características de la masa de agua pueden variar entre la presa y la cola (o colas).

Nº de muestras: entre 3 y 6 por punto de muestreo, o bien 1-2 muestras integradas por punto de muestreo (una de la zona trofógena y otra de las aguas más profundas).

6.2.2. Periodos de muestreo y frecuencia

Según lo acordado en la reunión de expertos, los muestreos se ajustarán a lo indicado en la siguiente tabla:

Tipos de lagos	Nº muestreos/ año seguimiento	Invierno	Primavera	Verano	Otoño
Alta montaña septentrional (aguas ácidas y aguas alcalinas)	2-3		■	■	■
primavera (después deshielo) y verano; muestra adicional otoño					
Cársticos hipogénicos pequeños (<50ha) y grandes (>50ha)	4-5	■	■	■	■ ■
invierno, inicio primavera, primavera-verano y final verano; final otoño, adicional					
Sedimentarios permanentes (profundo no salino, somero no salino y profundo salino)	3-4	■	■	■	■
primavera (mayo), verano y otro periodo escogido a juicio de experto según lago					
Sedimentarios temporales (no salinos y salinos)	2-3	■	■ ■		
primavera (inicio) y primavera - verano (antes de secarse); final invierno al poco tiempo de volver a llenarse					
Embalses	4-5	■	■ ■	■	■

■ muestreo preferente ■ muestreo adicional recomendado

Tabla 1.6.: Periodos de muestreo y frecuencia

Si por razones de limitación de recursos se tiene que realizar un solo muestreo por año los periodos más significativos son:

- final del verano para los lagos de alta montaña.
- primavera - verano para los lagos cársticos y embalses.
- primavera para los lagos sedimentarios (inicio para los temporales, y final para los permanentes).

6.2.3. Directrices para la toma de muestras

Tradicionalmente el fitoplancton se recoge a partir de muestras de agua tomadas en la superficie y en diferentes profundidades (o bien se compone una muestra integrada). No obstante en estas muestras no aparecen suficientemente representadas las algas de mayor tamaño (las cuales suponen una biomasa importante), para las que se realiza un muestreo complementario con red.

Muestras para la identificación y recuento del fitoplancton

- Tomar la muestra directamente y sin filtrar en una botella transparente o color topacio (esto permite controlar el estado de conservación y la presencia de agregados). No llenar la botella totalmente sino hasta un 90% para permitir la homogeneización posterior de la muestra.
- Muestras discretas e integradas. Las muestras de superficie se recogerán con el propio recipiente a 25-30 cm por debajo de la superficie. Las muestras de profundidad se tomarán con una botella hidrográfica (0,5 m de longitud), la cual se desciende hasta la profundidad deseada y se cierra mediante un mensajero.

Las muestras integradas se tomarán mediante un tubo de plástico flexible de 20 mm de diámetro lastrado en uno de sus extremos. El tubo se sumerge, se tapa el extremo superior y se sube; cuando está arriba el extremo inferior se vacía en un recipiente. Este método presenta algunas dificultades cuando la longitud de muestreo es variable. De forma alternativa se pueden tomar muestras en diferentes profundidades con la botella hidrográfica y proceder a mezclar todas ellas para componer una muestra integrada (hay que asegurar que se mezclan volúmenes iguales). En lagos muy someros se puede tomar la muestra integrada mediante un tubo rígido de metacrilato de 3-5 cm de diámetro y 0,5-2 m de longitud (dependiendo de la profundidad del lago).

- Almacenar la muestra a oscuras inmediatamente; mantener en frío si se va a examinar “in vivo” o bien añadir un conservante si no se va a examinar en poco tiempo (ver apartado 6.3). Si no es posible almacenar las muestras en oscuridad, es preferible usar una botella de vidrio topacio.

Muestras obtenidas con red

- Se utiliza una red de 20 μm de luz de malla (en aguas ultraoligotróficas de lagos de montaña puede requerirse una malla 10 μm de poro; de igual modo en aguas muy eutróficas puede utilizarse una malla de 35 μm), la cual se arrastra en el seno del agua, horizontal o verticalmente (preferiblemente esta última opción), hasta conseguir un filtrado visible. Estas muestras son cualitativas y permiten la obtención de un inventario de taxones que complementa el obtenido en las muestras de botella. No obstante, se puede estandarizar el muestreo de forma que los resultados sean semicuantitativos (clases de abundancia o porcentaje de abundancia de las diferentes especies). Esto se realiza mediante la estima del caudal filtrado, o bien realizando recorridos horizontales y /o verticales de longitud prefijada; por ejemplo pesca vertical desde el fondo o la correspondiente al perfil de la zona trofógena (2,5 veces el Disco de Secchi)⁵.
- El filtrado se introduce en un recipiente de vidrio o plástico y se mantiene en frío o bien se añade un conservante (ver apartado 6.3.1).

Muestras para el análisis de pigmentos (Clorofila “a” y otros)

- Recoger un volumen de agua suficiente (de 0,5-2L) en los puntos de toma de muestras (superficie, niveles en el perfil), y llenar recipientes opacos.
- Mantener la muestra en frío hasta su filtrado.
- Filtrar la muestra siguiendo el procedimiento que se indica en el apartado 8.

6.2.4. Datos y/o muestras complementarias al muestreo de fitoplancton

La interpretación de los resultados del estudio del fitoplancton: inventarios, recuentos y biomasa (clorofila “a”), puede requerir disponer de los siguientes datos tomados en los puntos de muestreo:

- Coordenadas UTM de la estación de muestreo y profundidad a la que corresponde la muestra (en metros).
- Profundidad del Disco de Secchi.
- Color del agua medido en cubeta de 5 cm en el espectrofotómetro.
- Aspecto del agua (presencia de natas, espumas, acumulaciones de algas,...).
- Perfiles de temperatura, turbidez, conductividad, pH, potencial redox y oxígeno disuelto.
- Perfiles con sonda fluorimétrica.
- Nutrientes: fósforo soluble, fósforo total, nitrato, nitrito, amonio, nitrógeno total, y sílice.
- Otros parámetros complementarios: alcalinidad, calcio, iones mayoritarios de la mineralización, materias en suspensión, hierro, manganeso, entre otros. También es interesante medir la materia orgánica cromogénica disuelta (CDOM) por análisis espectrofluorimétrico múltiple que permite determinar la concentración y los tipos de CDOM (Reynolds, 2003, Stedmon y Markager, 2005).

6.3. CONSERVACIÓN Y ETIQUETADO DE LAS MUESTRAS

2.3.1. Técnicas de conservación

Las muestras de fitoplancton se deben someter lo antes posible a uno de los siguientes métodos de conservación.

⁵ Durante la estratificación se recomienda hacer capturas en el epilimnion, metalimnion e hipolimnion, mediante el uso de redes especiales de cierre controlado (E. Vicente com. per.).

6.3.1.1. Muestras en vivo

Mantener las muestras vivas a oscuras y en nevera, entre 4 y 10°C. Proceder a enfriarlas paulatinamente para evitar daños en las células. Si la muestra contiene una elevada densidad de organismos y/o materia orgánica es conveniente diluir la muestra con agua del propio lugar, antes de guardarla. El tiempo máximo de conservación es de 12 horas.

6.3.1.2. Muestras con conservantes

Los conservantes más utilizados son una solución de Lugol (a razón de 0,5 ml por 100 ml de muestra) y el formaldehído (2-4%) (Ver apartado 6.1.2). Todas las muestras fijadas se conservarán protegidas de la luz y en lugar fresco (<15°C).

6.3.2. Etiquetado

Todas las muestras y preparaciones deben estar convenientemente etiquetadas de forma que se identifique un código de la muestra, un código de su procedencia (localización), fecha de recolección, fijador utilizado y persona o entidad a cargo de la recolección e identificación. El código de la muestra servirá de enlace en la base de datos. Es importante indicar el tipo de muestra y el método de recolección (por ejemplo: Discreta/Botella hidrográfica/10 m de profundidad; o bien Integrada entre 0 y 15 m, tubo; etc.). Se usará un rotulador resistente al agua.

7. RECUENTO E IDENTIFICACIÓN DE FITOPLANCTON (MÉTODO UTERMÖHL)

En este apartado se establece un método para la identificación y recuento de las especies de fitoplancton presentes en las muestras de lagos y embalses. La elaboración del procedimiento se ha basado en:

- Norma CEN TC 230/WG 2/TG 3/N83 (documento de 11-05-2004), que a su vez, está basado en la técnica descrita por Utermöhl (1958).
- Información obtenida durante el seminario y de la bibliografía.

El procedimiento incluye directrices metodológicas para:

- Identificar el equipo de laboratorio necesario.
- Preparar las muestras para su examen en el microscopio óptico invertido.
- Identificar los taxones y realizar los recuentos.
- Aplicar métodos estadísticos para optimizar el recuento.
- Registrar los datos y muestras.

7.1. EQUIPO DE LABORATORIO

- *Microscopio invertido*: Debe estar equipado con un condensador de apertura numérica (NA) de 0,5 como mínimo y objetivos con AN de 0.9 o más. Es recomendable utilizar el objetivo de inmersión de x100 con AN de 1,3. Los oculares x10 o x12,5, estarán equipados con un micrómetro calibrado (uno de ellos) y con una retícula de recuento calibrada (el otro). Para exámenes en detalle es aconsejable usar un microscopio equipado con contraste de fases o con contraste interferencial de Nomarski.
- *Cámara digital* acoplada al microscopio.
- *Cámara o cubeta de sedimentación*: consiste en una columna vertical con una base a través de la cual el contenido puede ser observado con el microscopio invertido. La columna, de volumen variable según el tipo de lago, se llena de muestra y las partículas sedimentan en el fondo de la cámara. La cubeta está formada por dos piezas, una columna superior y una base formada por una arandela enroscable y un cubreobjetos redondo del diámetro adecuado. Se recomienda que el grosor del fondo de la cubeta no exceda 0.2 mm.
- *Formularios* para anotar el recuento de las especies. Puede contener una lista de taxones con espacios donde anotar el recuento; también puede usarse un programa de ordenador preparado para la entrada directa de datos.
- *Guías de identificación e iconografías*: adecuadas al ámbito de estudio.

En ocasiones es conveniente el uso de técnicas de microscopía electrónica de barrido (MEB) o de transmisión (MET) para llegar a una correcta clasificación de las especies. No obstante ni los equipos necesarios ni la técnica se detallan en este procedimiento.

7.2. PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA

7.2.1. Aclimatación de la muestra

Someter las muestras, cubetas de sedimentación y equipos a usar a un periodo de aclimatación a temperatura ambiente (en general de 12 horas pero, puede variar según las diferencias de temperatura y el volumen de la muestra). De este modo se limitan las corrientes de convección y se favorece la distribución al azar del fitoplancton sedimentado en la muestra.

7.2.2. Homogeneización de la muestra

Durante el tiempo de almacenaje, las partículas sedimentan en la botella y se forman agregados entre algas pequeñas y otras algas o colonias más grandes o con detritus. La homogeneización de la muestra supone la resuspensión y separación de las partículas. Esto puede hacerse manualmente o preferiblemente con un dispositivo de mezcla. Para estandarizar en lo posible la homogeneización manual se recomienda que la manipulación la realice una sola persona, combinando giros horizontales y verticales de la botella durante 1 a 3 minutos.

7.2.3. Preparación de submuestras

- Llenar la cubeta de sedimentación con la muestra. El volumen de muestra depende de la densidad de fitoplancton, no obstante como la cubeta se ha de llenar en su totalidad, en algunos casos habrá que añadir agua filtrada (a través de 0,45 µm de poro).
- Tapar la cubeta con una pieza cuadrada o circular de cristal, evitando la formación de burbujas de aire.
- Mantener las cubetas de sedimentación durante 1-2 días en un lugar sin luz solar directa, a temperatura ambiente constante, y evitar posibles vibraciones. Durante este proceso la muestra debe situarse sobre una superficie (mesa, poyata) bien nivelada, de modo que la sedimentación se produzca de forma homogénea sobre toda la placa.
- El tiempo de sedimentación recomendado es de 1-4 horas por centímetro de columna de sedimentación, para las muestras fijadas con Lugol.
- Si se observan algas con vesículas de gas que evitan su sedimentación, se puede provocar su rotura introduciendo la muestra en una jeringa y aumentando la presión interior (tapando el orificio de salida y apretando el pistón). En todo caso, las cianobacterias flotantes vacuoladas pueden cuantificarse por otros métodos (por filtración sobre membrana y tinción con DAPI⁶).
- La cubeta de sedimentación se tiene que limpiar entre usos, con agua y detergente o aclararse con etanol (90%), alcohol desnaturalizado comercial, isopropanol o acetona, y aclararse finalmente con agua destilada. Cuidar especialmente la limpieza del fondo de la cubeta.

7.2.4. Concentración y dilución

- En aguas con densidad de algas muy baja (aguas ultra-oligotróficas), se recomienda concentrar la muestra. El método más utilizado consiste en dejar sedimentar la muestra en la propia botella o en cilindros de sedimentación graduados. El cilindro o la botella, se mantienen a oscuras y a temperatura ambiente constante. Algunos organismos, pueden quedar adheridos a las paredes; para evitar esto, periódicamente se gira el cilindro o la botella un cuarto de vuelta rápidamente sobre su eje. La extracción del agua sobrenadante se realiza, introduciendo una pipeta Pasteur unida a una bomba de vacío. El volumen del cilindro de sedimentación, puede variar en función de la cantidad de muestra que se desee sedimentar, (para aguas muy oligotróficas pueden usarse cilindros de 1 ó 2 L de capacidad).
- En aguas con densidad de algas elevada (aguas eutróficas e hipereutróficas), se recomienda diluir la muestra. Para obtener una distribución adecuada de partículas en la cubeta de sedimentación se recomienda extraer una pequeña cantidad de muestra (inversamente proporcional al diámetro de la cubeta) y añadir agua destilada filtrada en la proporción requerida según la densidad de algas y lugol (en una concentración similar a la que se usó para fijar la muestra).

7.2.5. Número de algas por campo

El número final de algas por campo óptico del microscopio debería ser óptimo para permitir la correcta identificación de las especies y facilitar el recuento. Esto depende de la densidad de algas en la submuestra, del tamaño relativo de las algas y de las partículas que no son algas. Se recomienda realizar evaluaciones con diferentes densidades hasta optimizar el procedimiento.

⁶ DAPI: 4', 6-Diamidino-2-fenilindol

7.3. PROCESO DE RECuento

El análisis cuantitativo del fitoplancton, consiste en realizar un inventario de los taxones y un recuento de los individuos presentes de cada taxón. La estrategia para el recuento dependerá de los objetivos a conseguir, y especialmente del nivel taxonómico (especie, género,...).

Se recomienda realizar una visualización previa de la muestra, antes de iniciar el recuento, con la finalidad de confeccionar una lista de los taxones presentes en la muestra, y tener una visión general de la densidad de algas.

Existen dos estrategias alternativas para el recuento:

- Recuento de un número de campos ópticos del microscopio seleccionados al azar.
- Recuento de toda la cubeta de sedimentación.

7.3.1. Recuento por campos

Para contar por campos, la cuadrícula del ocular debe ser un campo cuadrado o una rejilla, no obstante también se puede contar todo el campo del microscopio y referir el resultado a la superficie del campo para el aumento utilizado.

Se procede a contar un número determinado de campos ópticos elegidos al azar. El número de campos o de algas son función del nivel de precisión (D) requerido y del límite de detección.

Nivel de Precisión

$$(D) = 1 \div x \times [\sqrt{(s^2 \div n)}] = 1 \div x \times [\sqrt{(x \div n)}] = 1 \div \sqrt{(n \times x)} = 1 \div \sqrt{(\sum x)}$$

Donde:

n = número de campos contados;

x = número medio de objetos por campo

s = número total de objetos contados

Ejemplo: si se requiere una precisión del 5% en la estimación del número medio de objetos por campo, el número de objetos a contar será: $\sum x = (1/0,05)^2 = 400$

Límite de detección = Concentración mínima de un taxón para la cual se puede detectar con una probabilidad del 99%. Se calcula según la distribución de Poisson:

$$P(x > 0) = 1 - e^{-\mu}$$

donde μ es la media del estadístico de Poisson,

$$\text{Para } P = 0.99 \rightarrow n_{\text{det}} = 4,61 \cdot f_{\text{total}} / (V \cdot f_{\text{cont}}) \text{ donde}$$

n_{det} = número de algas en la muestra

f_{total} = número de campos de la cubeta de sedimentación

f_{cont} = número de campos contados

V = volumen de muestra en la cubeta

Cuando se cuenta con cuadrícula, hay que aplicar criterios estándar sobre los organismos que cruzan las líneas, de forma que por ejemplo, se cuenten los individuos que toquen arriba y a la derecha pero no abajo y a la izquierda del recuadro. En cuanto a las colonias, se toma como criterio no tener en cuenta las células que quedan fuera de la cuadrícula. En el caso de filamentos en los que no se distingue la separación entre células, se cuentan éstos y puede estimarse su longitud media (por medio de una escala micrométrica).

Una técnica para estandarizar el recuento consiste en contar campos al azar hasta completar un total de 500 algas, habiendo contado al menos 100 campos.

7.3.2. Recuento de la cámara completa

Este método es apropiado cuando la densidad de algas es baja, o bien se realiza el recuento de una especie poco representada, o que tiene un tamaño grande.

En este caso, en la rejilla de uno de los oculares, habrá una cuadrícula, compuesta por dos líneas paralelas horizontales dentro del ocular, formando un transecto (también es recomendado disponer de otra línea vertical en el centro). El método consiste en ir moviendo la cámara de arriba-abajo e izquierda-derecha, y viceversa, a la vez que se cuentan los individuos que queden entre las dos líneas de la rejilla del ocular; los objetos solo se cuentan cuando se encuentran entre las líneas.

7.3.3. Cálculo de la concentración de fitoplancton

Los números de algas contados (células) se convierten en una concentración por unidad de volumen de muestra, según lo siguiente:

$$N = X \times [(a \times d) \div (a \times v)]$$

donde:

- N** = número de células en la muestra (cel/ml),
- X** = número medio de células por campo (o número total de células de la cámara),
- A** = área de la cámara,
- v** = volumen de muestra sedimentado en la cámara,
- a** = área del campo óptico o de la cuadrícula y
- d** = factor de dilución o de concentración de la muestra (en caso de que se halla diluido o concentrado según la densidad de algas).

Si el recuento se realiza sobre colonias o filamentos, para expresar el valor en **cel/ml**, debe hallarse un número medio de células por colonia/filamento, y multiplicar éste por el número de colonias/filamentos. En el caso de que las células sean difíciles de diferenciar dentro de la colonia (p.e. *Oscillatoria*) el número de células se puede aproximar según el tamaño de la célula.

7.3.4. Cálculo del biovolumen

La abundancia de las algas expresada como biovolumen (mm³/L) permite una mejor comparación con la concentración de clorofila "a" (la cual se usa habitualmente como indicador de la biomasa del fitoplancton). La relación entre la concentración de clorofila "a" y los recuentos expresados en células/ml puede tener desviaciones importantes, a consecuencia del tamaño de las células. No obstante el cálculo del biovolumen de las especies también puede incorporar errores de importancia. Una estrategia de recuento puede ser la de calcular sólo los biovolúmenes de las especies que más contribuyen al biovolumen total. En cualquier caso, estos problemas se resuelven, en la actualidad, mediante la aplicación de técnicas de análisis de imagen, utilizando como base recuentos digitalizados.

Para la determinación del biovolumen se utiliza el método de Rott que consiste en medir como mínimo 20 individuos de cada especie, la cual se asimila a una forma geométrica que responda a su forma; entonces se calcula el volumen de cada especie, según la fórmula para la figura geométrica escogida y, finalmente, se multiplica el volumen por el número de células/ml obtenido en el recuento.

7.3.5. Recuentos de picoplancton

El picoplancton integrado por pequeñas cianobacterias, microalgas autótrofas y heterótrofas, pequeños flagelados (verdes e incoloros) y el bacterioplancton (incluidas las bacterias fotosintéticas), escapan por su pequeño tamaño al recuento por el método de Utermöhl. No obstante, el picoplancton tiene gran importancia ecológica y funcional en los ecosistemas acuáticos.

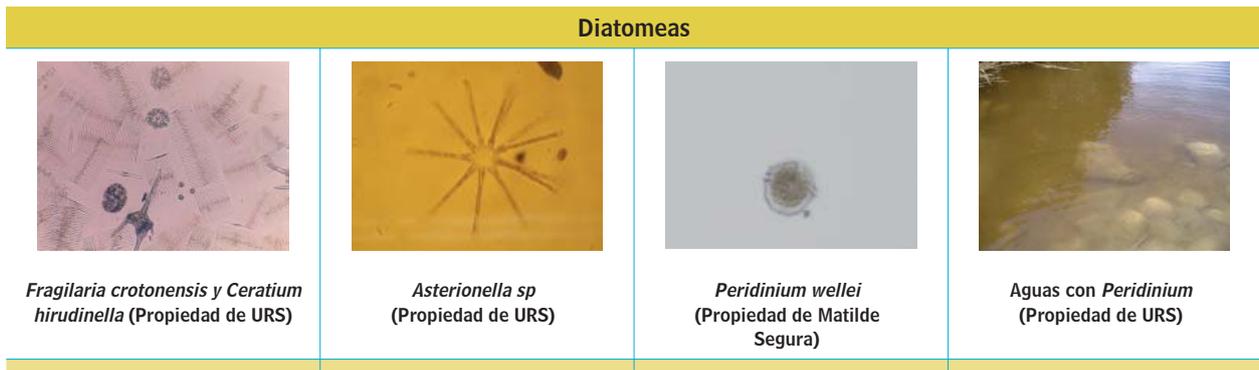
Para cuantificar el picoplancton hay que acudir a técnicas de filtración sobre membranas de policarbonatos (negras) de 0,2 µm de poro. Tras la filtración de las células se procede a teñirlas con un fluorocromo apropiado (el más utilizado es el DAPI⁷) y después se observan los filtros por epifluorescencia con varias bandas de excitación – emisión. Los resultados óptimos se obtienen con fotomicroscopía de epifluorescencia o por las técnicas de microscopía confocal. Para el establecimiento del número y biomasa de este grupo también resulta útil apoyarse en la fluorocitometría de flujo.

⁷ DAPI: 4', 6 -Diamidino-2-fenilindol

7.4. IDENTIFICACIÓN

La identificación de los taxones se realiza mediante el apoyo de claves y guías. En la bibliografía se presenta una relación de las referencias más importantes. Es importante comprobar las descripciones escritas de las especies (no sólo comparar con dibujos o fotos) y tener en cuenta la información ecológica (distribución, hábitat, requerimientos,...). Se recomienda realizar dibujos y fotografías, de utilidad como colección de referencia.

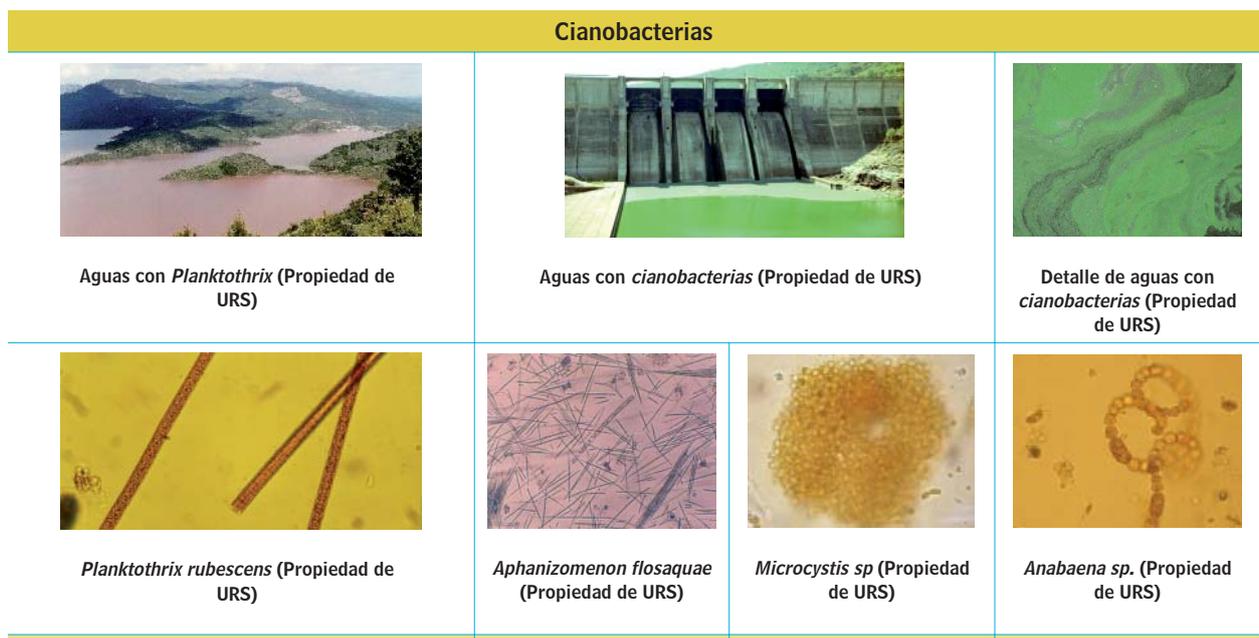
El trabajo de identificación y recuento sólo puede realizarlo personal especializado (con entrenamiento de varios años). Para la identificación de las muestras de referencia se recomienda contar con el apoyo de expertos.



Fotografía 1.1.: Diatomeas y Dinofíceas



Fotografía 1.2.: Clorofíceas



Fotografía 1.3.: Cianobacterias

8. ANÁLISIS DE PIGMENTOS (CLOROFILA 'A')

La concentración de clorofila "a" es una medida indirecta de la biomasa del fitoplancton. El procedimiento para su análisis incluye la concentración del fitoplancton, la extracción de los pigmentos con una solución acuosa de acetona (90%) y la determinación de la densidad óptica (absorbancia) del extracto por medio de un espectrofotómetro. El procedimiento que se describe está basado en *Standard Methods* 10200 H (APHA, 1998)⁸.

8.1. EQUIPOS Y REACTIVOS

8.1.1. Equipos y reactivos para la extracción de pigmentos

- Equipo de filtración.
- Bomba de vacío.
- Filtros de microfibras de vidrio de 0,4-0,6 µm de poro (por ejemplo Whatman GF/F).
- Solución de carbonato magnésico saturada (se disuelve 1 g de MgCO₃ en polvo en 100 ml de agua destilada).
- Solución de acetona 90% (mezclar 90 partes de acetona con 10 partes de la solución saturada de carbonato magnésico).

8.1.2. Equipos y reactivos para la determinación de la clorofila

- Triturador de tejidos vegetales o aparato de sonicación.
- Centrifugadora clínica y tubos de centrífuga de 15 ml (opcional).
- Espectrofotómetro, con banda estrecha (0,5 a 20 nm; por lo general de 2 nm).
- Cubetas con recorridos de 1, 5 y 10 cm.
- Pipetas (0,1 y 5 ml).

8.2. EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS

- Concentrar la muestra mediante el filtrado de un volumen suficiente de agua a través de un filtro de microfibras de vidrio (GF/F). La adición de una suspensión acuosa de carbonato magnésico (ver apartado 8.1.1.) aumenta la eficiencia de retención del filtro y evita la degradación de la clorofila (APHA 1998). Realizar el filtrado de la muestra lo antes posible. Si hay que conservar la muestra usar botellas opacas y mantenerla en frío (alrededor de 4°C).
- Mantener el filtro congelado (-20 °C), preferentemente en el mismo tubo donde se realizará posteriormente la extracción, y protegido de la luz. El filtro se puede conservar así hasta 2-3 semanas.
- Añadir al tubo con el filtro de fitoplancton una cantidad aproximada de 5 ml de solución de acetona y mantener en frío (0 – 4 °C) y en la oscuridad, al menos 12-24 horas. Acelerar la extracción mediante la trituración mecánica del filtro o bien por sonicación suave para romper las células. Si se añade dimetilsulfóxido a la solución de acetona (1:1) se favorece la extracción sobre todo cuando dominan algas de paredes gruesas⁹. Durante la extracción puede agitarse el tubo un par de veces. También puede hacerse la extracción a -20 °C durante 2-3 días.
- Finalizada la extracción filtrar el solvente a través de otro filtro de microfibras de vidrio o bien centrifugar (5-10 minutos a 3.000 rpm). Medir el volumen del extracto (en general 5 ml)¹⁰. Es importante trabajar rápido para evitar la evaporación de la acetona y la variación del volumen del extracto. El extracto es muy sensible a la luz por lo que hay que realizar este proceso, así como la lectura espectrofotométrica con la luz de la habitación muy atenuada, y mantener los tubos en una caja negra o debidamente protegidos de la luz.

⁸ En agua muy oligotrófica con muy bajo contenido en clorofila puede requerirse el uso de otro método más sensible que el fotométrico, basado por ejemplo en medidas fluorimétricas del extracto.

⁹ Propuesta de Eduardo Vicente.

¹⁰ Hay que considerar el volumen del solvente añadido más el volumen de agua que retiene el filtro que contiene el fitoplancton (este último volumen depende del tipo y tamaño del filtro utilizado).

8.3. DETERMINACIÓN DE LA CLOROFILA POR ESPECTROFOTOMETRÍA

Llenar la cubeta del espectrofotómetro y medir las densidades ópticas del extracto clarificado (éste debe ser completamente transparente) para las longitudes de onda que requiera la fórmula de cálculo elegida. Entre éstas una de las más utilizadas es la fórmula de Jeffrey y Humphrey (1975):

$$Chl. "a" (\mu g \div L) = \frac{[11,85 \times (A664 - A750) - 1,54(A647 - A750) - 0,08 \times (A630 - A750)] \times v}{V}$$

donde:

A630, A647, A664, A750: Densidad óptica medida a las longitudes de onda indicadas (en nm), en una cubeta de paso óptico de 1 cm.

v: volumen en ml del extracto

V: volumen de agua filtrada (en L).

8.4. DETERMINACIÓN DE OTROS PIGMENTOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA

De forma complementaria puede hacerse un espectro completo del extracto entre 350 y 850 nm de longitud de onda, para evidenciar la presencia de otros pigmentos como bacterioclorofilas, carotenos, etc., así como para calcular los índices de Margalef (A665/A430) y de Moss (A665/A410).

La realización de un espectro "in vivo" del filtrado sobre filtro GF/F aporta información sobre la proporción entre clorofilas y ficobilinas, y permite caracterizar las diferentes bacterioclorofilas.

8.5. DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS POR TÉCNICAS DE CROMATOGRAFÍA

En estudios de detalle, en los que se requiera la separación e identificación de las clases de clorofilas y sus derivados (feofitina y otros feopigmentos), así como de ciertos carotenos indicadores de grupos algales o condiciones ambientales, deberán usarse técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*).

8.6. CONFIRMACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de la concentración de la clorofila y los recuentos algales deben cruzarse entre sí, y éstos con los datos de campo disponibles (valores de las lecturas con las sondas de fluorescencia y por la espectrorradiometría) para analizar su coherencia.

9. PROTOCOLO PARA CONTROL DE CALIDAD

La implementación de la Directiva 2000/60/CE requiere que los métodos que se utilicen en el establecimiento del estado ecológico procedan de metodologías estandarizadas (ISO, CEN, o de organismos nacionales de estandarización), que los laboratorios dispongan de programas de aseguramiento de la calidad (EN ISO 17025) y participen regularmente en ejercicios de intercalibración (*Proficiency testing programmes*).

La toma de muestras de fitoplancton y de pigmentos así como los trabajos de análisis se realizarán teniendo en cuenta procedimientos de aseguramiento de la calidad, cuyas directrices se indican en los siguientes apartados.

9.1. DIRECTRICES PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD EN LA TOMA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Objetivo: Realizar el trabajo de campo y evaluaciones según los procedimientos estándar previamente definidos.	
Medidas	<ul style="list-style-type: none"> Preparar una hoja directriz que resuma de forma clara y didáctica las tareas y procedimientos a desarrollar en el trabajo de campo. Documentar los trabajos y usar hojas de campo previamente preparadas. Indicar la localización de las estaciones de muestreo (coordenadas GPS y profundidad, tipo de muestra (discreta o integrada) y demás datos de interés (profundidad del Disco de Secchi, y otros datos fisicoquímicos que deben ser totalmente fiables). Si se filtra en el campo para el análisis de pigmentos incluir un estadillo que permita anotar el volumen filtrado y las condiciones de conservación de los filtrados y/o extractos (temperatura, protección de la luz, etc.).

Tabla 1.7.: Realizar el trabajo de campo y evaluaciones según los procedimientos estándar previamente definidos

Objetivo: Asegurar la correcta conservación de las muestras para el análisis de pigmentos (o los extractos) y las muestras de fitoplancton fijadas con Lugol.	
Medidas	<ul style="list-style-type: none"> Si se filtra en el campo para el análisis de pigmentos asegurar que los extractos se mantienen a la temperatura adecuada. Comprobar el grado de foto-oxidación del Lugol de forma periódica y añadir más conservante en caso necesario.

Tabla 1.8.: Asegurar la correcta conservación de la muestras para el análisis de los pigmentos (o los extractos) y las muestras de fitoplancton fijadas con lugol

9.2. DIRECTRICES PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD EN EL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Objetivo: Asegurar que se siguen rigurosamente los procedimientos de análisis de las muestras	
Medidas	<ul style="list-style-type: none"> Redactar los métodos a usar en el laboratorio de forma clara incluyendo todos los pasos a seguir, e indicar las fuentes de error y los límites de confianza. Realizar entrenamientos al personal en la aplicación concreta de cada procedimiento o uso de equipos.

Tabla 1.9.: Asegurar que se siguen rigurosamente los procedimientos de análisis de las muestras

Objetivo: Realizar pruebas internas de control de calidad	
Medidas	<ul style="list-style-type: none"> Calibrar los equipos y los métodos de forma regular. Analizar réplicas de los recuentos para una o varias muestras representativas (en general 5-10% de las muestras). El análisis lo realizará otro técnico cualificado. Se confrontarán los resultados y se identificarán las diferencias en los resultados. Incluir los resultados de los recuentos en hojas de cálculo y verificar la ausencia de errores (repasso por otro operador).

Tabla 1.10.: Realizar pruebas internas de control de calidad

Objetivo: Realizar pruebas externas de control de calidad	
Medidas	<ul style="list-style-type: none"> Realizar auditorías externas y enviar muestras duplicadas para recuento a un laboratorio externo, a ser posible a un experto en la taxonomía y recuento del fitoplancton. Participar en pruebas de intercalibración.

Tabla 1.11.: Realizar pruebas externas de control de calidad

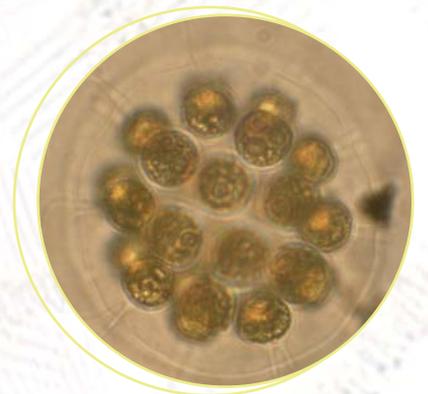
9.3. DIRECTRICES PARA EL CONTROL DE CALIDAD EN EL TRATAMIENTO DE LOS DATOS

Objetivo: Control del manejo de datos y análisis de los resultados.	
Medidas	<ul style="list-style-type: none"> • Todos los datos de un muestreo específico se deben identificar de forma individual, en la base de datos por medio de códigos.
	<ul style="list-style-type: none"> • La documentación de campo y laboratorio (muestras, estadillos, fotos) se guardará durante un periodo no inferior a 5-6 años.
	<ul style="list-style-type: none"> • Los datos en formato electrónico deberán incluir identificación de su origen (autores, fechas, etc...) y referencias para ampliar la información. • Todos los resultados de las medidas efectuadas en el campo (perfiles con sondas multiparamétricas y fluorimétricas) y de los análisis de laboratorio (recuentos por la técnica de Utermöhl u otras técnicas, biovolumen, concentración de clorofila y otros pigmentos) se confrontarán para identificar el grado de correspondencia.

Tabla 1.12.: Control del manejo de datos y análisis de los resultados



Bibliografía:



10. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- **Agencia Catalana de l'Aigua** (2003). *Desenvolupament d'un índex integral de qualitat ecològica i regionalització ambiental dels sistemes lacustres de Catalunya*. Centre d'estudis Avançats de Banes (CSIC), 88 pàgs.
- **Agencia Catalana de l'Aigua** (2003). *Caracterització i propostes d'estudi dels embassaments catalans segons la Directiva 2000/60/CE del Parlament Europeu*. Universitat de Barcelona –Grup de Recerca en Ecologia Aquàtica Continental. Departament d'Ecologia- y Universitat de Girona- Institut d'Ecologia Aquàtica i Dept. Ciències Ambientals-, 212 pàgs.
- **Alvarez Cobelas, M., Reynolds, C.S., Sánchez Castillo, P. y J. Kristiansen** (1998). *Phytoplankton and Trophic Gradients*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- **Andreu Moliner, E. y A. Camacho González** (2002). *Recomendaciones para la toma de muestras de agua, biota y sedimentos en humedales Ramsar*. Ministerio de Medio Ambiente. Dirección general de Conservación de la Naturaleza.
- **APHA** (1998). *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. 20th edition.
- **Barbe, J., Lavergne, E., Rofes, G. Lascombe, M., Rivas, Bornard, CH., y J. De Benedittis** (1990). *Diagnose rapide des plans d'eau*. Informations Techniques du CEMAGREF, 79: 1-8.
- **Barbe, J. M. Lafont, L.Mallet, J. Mouthon, M. Philippe y V. Vey** (2003). *Actualisation de la méthode de diagnose rapide des plans d'eau. Analyse critique des indices de qualité des lacs et propositions d'indices de fonctionnement de l'écosystème lacustre*. Cemagref. Agence de l'Eau.
- **Boehme J.E. et al.** (2004). Examining CDOM fluorescent variability using principal component analysis : seasonal and regional modeling of three-dimensional fluorescence in the Gulf of Mexico. *Mar.Chem.* 89 :3-14.
- **Brettum, P.** (1989). Alger som indikatorer pa vannkvalitet i norske innsjoer. Planteplankton. NIVA Report, 111 pp.
- **Camacho, A., García –Pichel F., Vicente E. y R.W. Castenholz** (1996). Adaptation to sulfide and to the underwater light field in three cyanobacterial isolates from Lake Arcas (Spain). *FEMS Microbiology Ecology* 21: 293-301.
- **Camacho A., Vicente, E. y M.R. Miracle** (2000). Ecology of a deep-living *Oscillatoria* (= *Planktothrix*) population in the sulphide-rich waters of a Spanish karstic lake. *Arch. Hydrobiol.* 148 (3): 335-355.
- **Camacho A., Vicente, E. y M.R. Miracle** (2001). Ecology of *Cryptomonas* at the chemocline of a karstic sulfate-rich lake. *Mar. Freshwater Res* 52: 805-815.
- **Camacho, A., Vicente, E., García-Gil, L.J., Miracle, M.R., Sendra, M.D., Vila X. y C.M. Borrego** (2002). Factor determining changes in the abundance and distribution of micro-, nano-, and picoplacktonic phototrophs in Lake El Tobar (Central Spain) (2002). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 28: 613-619.
- **Camacho, A., Wurtsbaugh, W.A., Miracle, M.A., Armegol X. y E. Vicente** (2003). Nitrogen limitation of phytoplankton in a Spanish karst lake with a deep chlorophyll maximum: a nutrient enrichment bioassay approach. *Journal of Plankton Research*, 25 (4): 397-404.
- **Camacho A., Picazo A., Miracle, M.R. y E. Vicente** (2003). Spatial distribution and temporal dynamics of picocyanobacteria in a meromictic karstic lake. *Algological Studies* 109: 171-184.
- **Camacho A., Miracle, M.R. y E. Vicente** (2003). Which factors determine the abundance and distribution of picocyanobacteria in inland waters?. A comparison among different types of lakes and ponds. *Arch. Hydrobiol.* 157 (3): 321-338.
- **Cammack et al** (2004). Fluorescent dissolved organic matter in lakes. Relationships with heterotrophic metabolism. *Limnol. Oceanogr.* 49(6): 2034-2045.
- **Catalan, J.** (1991). The relationships between the functional anatomy of lakes and primary production. In: J. Ros and N. Prat (eds) *Homage to Margalef, or why there is such pleasure in studying nature*. *Oecologia Aquatica* 10: 77-95.
- **Catalan, J., E. Ballesteros, L. Camarero, M. Felip y E. Gacia** (1992). Limnology in the Pyrenean lakes. *Limnetica* 8: 27-38.
- **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.
- **Coble P.G., Green, S.A., Blough N.V. y R.B. Gagosian** (1990). Characterization of dissolved organic matter in the Black Sea by fluorescence spectroscopy. *Nature* 348: 432-435.
- **Coble P.G.** (1996). Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Mar. Chem* 51: 325-346.
- **Coble P.G. et al.** (1998). Distribution and optical properties of CDOM in the Arabian Sea during the 1995 Southwest Monzón. *Deep-Sea., Part 2*: 2195-2223.
- **Dasí M.J., M.R. Miracle, A. Camacho, J.M. Soria y E. Vicente** (1998). Summer phytoplankton assemblages across trophic gradients in hard-waters reservoirs. *Hydrobiologia* 369/370: 27-43.
- **De Hoyos, C., A.I. Negro y J.J. Aldasoro.** 2004. Cyanobacteria distribution and abundance in the Spanish water reservoirs during thermal stratification. *Limnetica* 23(1-2): 119-132.
- **García-Gil L.J., Vicente E., Camacho A., Borrego, C.M., Vila X., Cristina X.P. y J. Rodríguez González** (1999). *Aquatic Microbial Ecology* 20: 299-303.
- **Gasol J.M. y P.A. del Giorgio** (2000). Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Scientia Marina* 64: 197-224.

- **Gobierno Vasco** (2004). Metodología para la determinación del estado ecológico en los humedades interiores de la CAPV.
- **Harris, G.P.** (1986). *Phytoplankton Ecology. Structure, Function and Fluctuation*. Chapman and Hall, Cambridge.
- **Heinonen, P.** 1980. Quantity and composition of phytoplankton in Finnish inland waters. *Publications of the Water Research Institute*, 37: 1-91.
- **Hörnström, E.** (1981). Trophic characterization of lakes by means of qualitative phytoplankton analysis. *Limnologica* (Berlin) 13: 249-261.
- **Hötzel G y R. Croome** (1999). *A Phytoplankton Methods Manual for Australian Freshwaters*. Land and Water resources and Development Corporation.
- **Hoyos C. de, A.I. Negro y J. Avilés.** (2003). Las cianobacterias en los embalses españoles. situación actual. *Ingeniería Civil* CEDEX 129.
- **James S. y L. Evison Eds.** (1979). *Biological Indicators of Water Quality*. London.
- **Jeffrey, S.W., y G.F. Humphrey** (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 y c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 167: 191-194.
- **Kruk, C., Mazzeo, N., Lacerot, G. y C.S. Reynolds** (2002). Classification schemes for phytoplankton: a local validation of a functional approach to the analysis of species temporal replacement. *Journal of Plankton Research* 24(9): 901-912.
- **Lorenzen, M.W.** (1980). Use of chlorophyll-Secchi disk relationships. *Limnol. Oceanogr.*, 25(2): 371-372.
- **Margalef, R., Planas D., Armengol J., Vidal A., Prat N., Guisset A., Toja J. y M. Estrada** (1976). *Limnología de los embalses españoles*. Dirección General de Obras Hidráulicas. Ministerio de Obras Públicas. Publicación nº 123. Madrid.
- **Margalef, R., Mir M. y M. Estrada** (1982). Phytoplankton composition and distribution as an expresión of properties of reservoirs. *Canadian Water Resources Journal* 7: 26-50.
- **Margalef R.** (1983). *Limnología*. Omega. Barcelona.
- **Miracle M.R., Dasi, M.J. y E. Vicente** (1998). Forced phytoplankton vertical migrations due to lake water “whiting”. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 26: 1749-1754.
- **Morata, S.M., Camacho A., Miracle, M.R. y E. Vicente** (2003). Asociaciones fitoplanctónicas y su periodicidad en un lago marcadamente estratificado. *Limnetica* 22 (3-4): 35-52.
- **Moss B et al. (y 48 autores más)** (2003). The determination of ecological status in shallow lakes – a tested system (ECOFRAME) for implementation of the European Water Framework Directive. *Aquatic conservation: marine and freshwater ecosystems*, 13:507-549.
- **Moss, B. et al (y 20 autores más)** (2004). Continental-scale patterns of nutrient and fish effects on shallow lakes: síntesis of a pan-European mesocosm experiment. *Freshwater Biology* 49: 1633-1649.
- **Noges P. et al. (y 26 autores más)** (2003). Factors controlling hydrochemical and trophic state variables in 86 shallow lakes in Europe. *Hydrobiologia* 505-509: 51-58.
- **Noppe K. y J. Prygiel** (1999). Phytoplankton as an eutrophication indicator for the main watercourses of the Artois-Picardie water basin (France). In Prygiel J., Whitton B.A., Bukowska, J. (eds). *Use of Algae for Monitoring Rivers III*, p.1994-205.
- **Negro, A.I. y C. De Hoyos.** (2005). Relationships between diatoms and the environment in Spanish reservoirs. *Limnetica* 23 (1-2): 119-132.
- **OCDE** (1982). *Eutrophication of waters. Monitoring, assessment and control*. OCDE, Paris, 154 pp.
- **Ortiz, R., Huck, V, Armengol J., Cambra J. y L.Ector** (en prensa). Distribution longitudinale et composition floristique des diatomées planctoniques du lac de barrage de Sau (Catalogne). Universitat de Barcelona y Centre de Recherche Public Gabriel Lippmann.
- **Rodrigo M.A., Camacho A., Vicente E. y M.R. Miracle** (1999). Microstratified vertical distribution and migration of phototrophic microorganisms during a diel cycle in lake Arcas-2 (Spain). *Arch. Hydrobiol.* 145(4): 497-512.
- **Rodrigo M.A., Vicente E. y M.R. Miracle** (2000). The role of light and concentration gradients in the vertical stratification and seasonal development of phototrophic bacteria in a meromictic lake. *Arch. Hydrobiol.* 148(4):533-548.
- **Parlamento Europeo de la Unión Europea** (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for the Community action in the field of water policy. *Off. J. Eur.Comm.* 327: 1-72.
- **Planas D.** (1975). Distribution and productivity of the phytoplankton in Spanish reservoirs. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 19: 1860-1870.
- **Reynolds, C.S.** (1984). *The ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge University Press. Cambridge.
- **Reynolds, C.S.** (1990): Temporal scales of variability in pelagic environments and the response of phytoplankton. *Freshwater Biology* 23: 25-53.
- **Reynolds, C.S., Huszar, V., Kruk, C. Naselli-Flores L. y S. Melo** (2002). Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 24(5): 417-428.
- **Reynolds** (2003). Rapid and direct determination of tryptophan in water using synchronous fluorescence spectroscopy. *Water Research* 37: 3055-3060.
- **Riera, J.L., Martí E. y J.A. Morguá** (1991). Changes in the trophic state of Spanish reservoirs during the last sixteen years. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 24:1367-1370.

- **Riera J.L.** (1993). Limnología regional de los embalses españoles. Relaciones entre nutrientes, seston y fitoplancton. Universidad de Barcelona. Tesis Doctoral.
- **Riera, J.L. y J. Armengol** (1995). Relationships between seston composition and water transparency in spanish reservoirs. *Internationale Revue del gesamten Hydrobiologie*, 80: 1-14.
- **Riera, J.L., Martí E., Morgui J.A., Sabater F. y J. Peñuelas** (1995). Respiratory electron transport system (ETS) activity in Spanish reservoirs: relations with nutrients and seston. *Journal of Plankton Research*, 17:513-530.
- **Riolobos, P., Alvarez Cobelas, M., Rojo., Rodrigo, M.A., Ortega Mayagoitia, E. y S. Cirujano** (2002). Técnicas habituales de análisis físicos, químicos y biológicos. Real Jardín Botánico. Madrid.
- **Rojo V. y M. Álvarez-Cobelas** (2003). Are there steady-state phytoplankton assemblages in the field?. *Hydrobiologia* 502: 3-12.
- **Romo, S., Miracle M.R., Villena M.J., Rueda, J., Ferriol, C. y E. Vicente** (2004). Mesocosm experiments on nutrient and fish effects on shallow lake food webs in a Mediterranean climate. *Freshwater Biology* 49: 1593- 1607.
- **Rott, E.** (1980). Some results from phytoplankton counting intercalibrations. *Schweiz. Z. Hydrol.* 43/1. Birkhause Verlag Basel.
- **Rull, V. Vegas, T. y J. Navarro** (1984). Extinción de la luz en los embalses españoles. Relaciones con la concentración de clorofila y las partículas en suspensión. *Oecologia Aquatica* 7: 25-36.
- **Sabater, S. y J. Nolla** (1991). Distributions patterns of phytoplankton in Spanish reservoirs: First results and comparison after fifteen years. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 24: 1371-1375.
- **Sládeček, V.** (1973). System of water quality from the Biological point of view. *Arch. Hydrobiol.*, 7: 1-218.
- **Smith, V.H. y J. Shapiro** (1981). Chlorophyll-phosphorus relations in individual lakes: An empirical and theoretical analysis. *Limnol. Oceanogr.* 27: 1101-1112.
- **Stedmon C.A. y S. Markager** (2005). Resolving the variability in dissolved organic matter fluorescence in a temperate estuary and its catchment using PARAFAC analysis. *Limnol.Oceanogr.* 50(2): 686-697.
- **Stephen, D. et al (y 24 autores más)** (2004). Continental-scale patterns of nutrient and fish effects on shallow lakes: síntesis of a pan-European mesocosm experiment. *Freshwater Biology* 49: 1517-1524.
- **U.S. Environmental Protection Agency.** *Monitoring and Assessing Water Quality. Lake and Reservoir Bioassessment and Biocriteria.*
- **Utermöhl, H.** (1958). Zur Vervollkommnung der quantitative Phytoplankton-Methodik. *Mitt.Int.Ver.Limnol.*, 9: 1-38.
- **Van Dam H.** (1994). A coded checklist and ecological indicators values of freshwater diatoms from the Netherlands. *Netherlands journal of Aquatic Ecology* 28(1): 117-133.
- **Van de Bund, W.J. et al. (y 25 autores más)**. Responses of phytoplankton to fish predation and nutrient loading in shallow lakes: a pan-European mesocosm experiment. *Freshwater Biology* 49: 1608-1618.
- **Vicente E., Camacho, A., Sendra, M.D., Sanchis D., Soria J.M., Dasí, M.J. y M.R. Miracle** (2000). Limnological management of the Amadorio Reservoir (Spain) during an extremely dry summer. *Verh. Internat. Verein.Limnol.*, 27: 2298-2302.
- **Wegl, R.** (1983). Index für die Limnosaprobität. *Wasser und Abwasser* 26: 1-175.
- **Wetzel, R.G.** (1983). *Limnology*. Saunders.
- **Willén E., Hajdu S. y Y. Pejler** (1990). Summer Phytoplankton in 73 Nutrient-poor Swedish Lakes. Classification, Ordination, and Choice of long-term Monitoring Objects. *Limnologica* (Berlin) 20(2): 217-227.
- **Willén, E.** (2000). Phytoplankton water quality assessment- an indicator concept. In: *Hydrological and limnological aspects of lake monitoring* 58-80. In Heinonen, G. Ziglio y A. Van der Beken (eds), Wiley y Sons. LTD.

11. BIBLIOGRAFÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL FITOPLANCTON

Cyanophyta (cianobacterias)

- **Anagnostidis, K. y J. Komárek** (1988). Modern approach to the classification system of cyanophytes 3-Oscillatoriales. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 80 (1-4): 327-472.
- **Bourrelly, P.** (1985). *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique*. Tome III. Les algues bleues et rouges, les Eugléniens, Peridiniens et Cryptomonadines. N. Boubée y Cie. Paris, 606 pp.
- **Geitler, L.** (1932). *Cyanophyceae*. In: Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz 14. Leipzig: Akad. Verlag.
- **Komárek, J.** (1999). *Übersicht der planktischen Blaualgen (Cyanobakterien) im Einzugsgebiet der Elbe. Internationale kommission zum Schutz der Elbe*. Magdeburg. 54 pp., 134 fig.
- **Komárek, J. y K. Anagnostidis** (1989). Modern approach to the classification system of cyanophytes 4-Nostocales. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 82 (3): 247-345.

- **Komárek, J. y K. Anagnostidis** (1999). *Cyanoprokaryota: Chroococcales*. In Ettl, H., G. Gärtner, H. Heynig y D. Mollenhauer (eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 19, 1 Teil. Gustav Fischer. Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm. 548 pp.

Chlorophyta (algas verdes)

- **Bourelly, P.** (1988). *Les Algues d'eau douce. Initiation à la systématique*. Tome I: Algues vertes. Compléments à la 1^{re}, 2^e et 3^e édition. N. Boubée et Cie. Paris, 182 pp.
- **Bourelly, P.** (1990). *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique*. Tome I. Les algues vertes. N. Boubée et Cie. Paris, 572 pp.
- **Coesel, P. F. M.** (1979a). Desmids of the broads area of N.W.-Overijssel (The Netherlands) I. *Acta Bot. Neerl.*, 28 (4/5): 257-279.
- **Coesel, P. F. M.** (1979b). Desmids of the broads area of N.W.-Overijssel (The Netherlands) II. *Acta Bot. Neerl.*, 28 (6): 385-423.
- **Ettl, H.** (1983). *Chlorophyta I, Phytomonadina*. In Ettl, H., J. Gerloff, H. Heynig y D. Mollenhauer (eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 9. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart-New York, 807 pp.
- **Ettl, H. y G. Gärtner** (1988). *Chlorophyta II. Tetrasporales, Chlorococcales, Gloeodendrales*. In Ettl, H., J. Gerloff, H. Heynig y D. Mollenhauer (eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 10. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart-New York, 436 pp.
- **Förster, K.** (1982). *Conjugatophyceae, Zygnematales und Desmidiaceae (excl. Zygnemataceae)*. In Huber-Pestalozzi, G. (ed.): Das Phytoplankton des Süßwassers. 8 Teil. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. Stuttgart, 541 pp.
- **Fott, B.** (1972). *Chlorophyceae (Grünalgen), Ordnung: Tetrasporales*. In Huber-Pestalozzi, G. (ed.): Das Phytoplankton des Süßwassers. 6 Teil. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. Stuttgart, 116 pp., 47 tafeln.
- **Komárek, T. y B. Fott** (1983). *Chlorophyceae (Grünalgen), Ordnung: Chlorococcales*. In Huber-Pestalozzi, G. (ed.): Das Phytoplankton des Süßwassers. Systematik und Biologie. 7 Teil. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. Stuttgart, 1044 pp.
- **Lenzenweger, R.** (1996). *Desmidiaceenflora von Österreich*. Teil 1. In: Kies, L. y R. Schnetter (eds). Bibliotheca Phycologica. Band 101. Berlin-Stuttgart, 162 pp.
- **Lenzenweger, R.** (1997). *Desmidiaceenflora von Österreich*. Teil 2. In: Kies, L. y R. Schnetter (eds). Bibliotheca Phycologica. Band 102. Berlin-Stuttgart, 216 pp.
- **Lenzenweger, R.** (1999). *Desmidiaceenflora von Österreich*. Teil 3. In: Kies, L. y R. Schnetter (eds). Bibliotheca Phycologica. Band 104. Berlin-Stuttgart, 218 pp.
- **Růžička, J.** (1977). *Die Desmidiaceen Mitteleuropas*. Band 1. Lieferung 1. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. Stuttgart. pp. 1-291.
- **Růžička, J.** (1981). *Die Desmidiaceen Mitteleuropas*. Band 1. Lieferung 2. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. Stuttgart. pp 293-736.
- **West, W. y G. S. West** (1971a). *A monograph of the British Desmidiaceae*. Vol. IV. Johnson Reprint Corporation. New York-London.
- **West, W. y G. S. West** (1971b). *A monograph of the British Desmidiaceae*. Vol. V. Johnson Reprint Corporation. New York-London.

Bacillariophyta (diatomeas)

- **Carter, J. R.** (1981). A taxonomic study of diatoms from standing freshwaters in Shetland. *Nova Hedwigia* 33: 513-629.
- **Foged, N.** (1971). Diatoms found in a bottom sediment sample from a small deep lake on the Northern Slope, Alaska. *Nova Hedwigia* 21: 923-1035, 23 pls.
- **Krammer, K y H. Lange-Bertalot** (1991a). *Bacillariophyceae: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae*. In Ettl, H., J. Gerloff, H. Heynig y D. Mollenhauer (eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2, 3 Teil. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart-Jena, 576 pp.
- **Krammer, K y H. Lange-Bertalot** (1991b). *Bacillariophyceae: Achnantheaceae, Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolatae) und Gomphonema Gesamtliteraturverzeichnis Teil 1-4*. In Ettl, H., G. Gärtner, J. Gerloff, H. Heynig y D. Mollenhauer (eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2, 4 Teil. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart, Jena, 436 pp.
- **Krammer, K y H. Lange-Bertalot** (1997a). *Bacillariophyceae: Naviculaceae*. In Ettl, H., J. Gerloff, H. Heynig y D. Mollenhauer (eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2, 1 Teil. Gustav Fischer. Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm, 876 pp.
- **Krammer, K y H. Lange-Bertalot** (1997b). *Bacillariophyceae: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae*. In Ettl, H., J. Gerloff, H. Heynig y D. Mollenhauer (eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2, 2 Teil. Gustav Fischer. Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm, 610 pp.
- **Krammer, K y H. Lange-Bertalot** (2000). *Bacillariophyceae: English and French translation of the keys*. In Büdel, B., G. Gärtner, L. Krienitz y G. M. Lokhorst (eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa. Vol. 2, part 5. Engl. transl.: N. Bate y A.

Podzorski. French transl.: J. Bukowska, M. Michel y J. Prygiel. Spektrum Akademischer Verlag GmbH. Heidelberg-Berlin. 310 pp.

Chrysophyta, Xanthophyta y Haptophyta

- **Bourelly, P.** (1981). *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique*. Tome II. Les algues jaunes et brunes. Chrysophycées, Phéophycées, Xanthophycées et Diatomées. N. Boubée et Cie. Paris. 517 pp.
- **Ettl, H.** (1978). *Xanthophyceae*. In Ettl, H., J. Gerloff y H. Heynig (eds.): *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Band 3, 1 Teil. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart-New York, 530 pp.
- **Kristiansen, J. y H. R. Preisig (Eds.)** (2001). *Encyclopedia of Chrysophyte genera*. Bibliotheca Phycologica, Band 110. J. Cramer. Berlin-Stuttgart, 260 pp.
- **Starmach, K.** (1985). *Chrysophyceae und Haptophyceae*. In Ettl, H., J. Gerloff, H. Heynig y D. Mollenhauer (eds.): *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Band 1. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart, 515 pp.

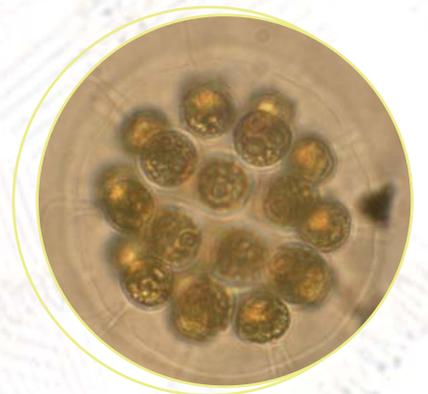
Cryptophyta, Dinophyta y Euglenophyta

- **Anton, A. y H. C. Duthie** (1981). Use of cluster analysis in the systematics of the algal genus *Cryptomonas*. *Can. J. Bot.* 59: 992-1002.
- **Bourelly, P.** (1985). *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique*. Tome III. Les algues bleues et rouges, les Eugléniens, Peridiniens et Cryptomonadines. N. Boubée y Cie. Paris, 606 pp.
- **Fott, B.** (1968). *Cryptophyceae, Chloromonadophyceae, Dinophyceae*. In Huber-Pestalozzi, G. (ed.): *Das Phytoplankton des Süßwassers. Systematik und Biologie*. 3 Teil.. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. Stuttgart.
- **Huber-Pestalozzi, G.** (1955). *Euglenophyceen*. In Huber-Pestalozzi, G. (ed.): *Das Phytoplankton des Süßwassers. Systematik und Biologie*. 4 Teil.. Stuttgart: E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. Stuttgart.
- **Javornický, P.** (2003). Taxonomic notes on some freshwater planktonic Cryptophyceae based on light microscopy. *Hydrobiologia* 502: 271-283.



Apéndice:

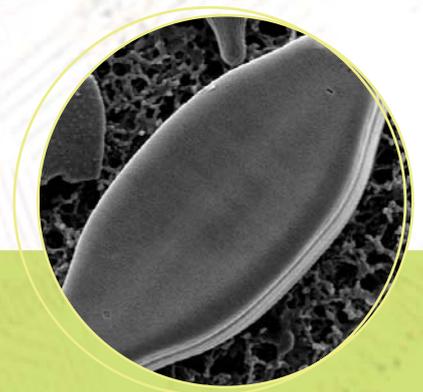
■ Hoja de toma de muestras de fitoplancton



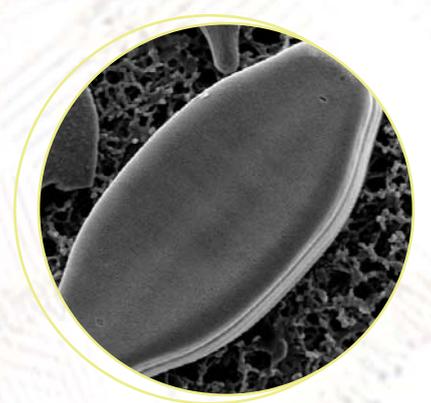


Capítulo 2:

■ Protocolos de muestreo y análisis para fitobentos (microalgas bentónicas)



Parte 1:
Generalidades



1. DEFINICIONES Y OBJETIVOS

El término fitobentos se refiere a los organismos autótrofos que viven asociados a cualquier sustrato del fondo en los ecosistemas acuáticos, e incluye cianobacterias, algas microscópicas (microalgas), macroalgas y macrófitos.

El término *perifiton* describe a la comunidad microbiótica que vive sobre sustratos sumergidos de diferente naturaleza (sustratos duros, vegetación acuática viva y muerta,...); e incluye microalgas, bacterias, hongos y protozoos. Diferentes grupos de algas forman parte del perifiton (diatomeas, clorofíceas, etc.), así como las cianobacterias.

Los términos *epifiton*, *epifiton* y *epipelon* se refieren a los sustratos que colonizan las algas, que son sustratos pétreos, vegetación acuática y sedimento, respectivamente.

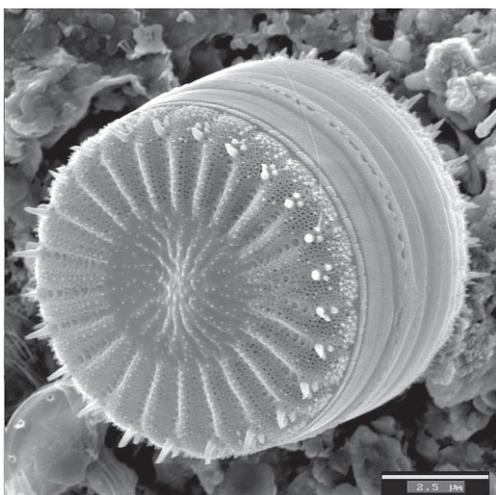
Este documento está dedicado a las microalgas bentónicas de aguas corrientes y de lagos y tiene como objetivo identificar y proponer métricas para el establecimiento del estado ecológico de las aguas fluyentes y estancadas de la cuenca del Ebro, en aplicación de la Directiva 2000/60/CE, y especificar las directrices metodológicas para el muestreo y análisis de las microalgas bentónicas.

2. VALOR INDICADOR DE LAS MICROALGAS BENTÓNICAS

El uso de microalgas bentónicas para evaluar la calidad del agua es una práctica habitual en muchos países europeos, y existe abundante bibliografía sobre su capacidad bioindicadora. No obstante la inmensa mayoría de los estudios realizados se refieren a diatomeas, y existe mucha menos información sobre los restantes grupos de algas. Asimismo los ríos han sido objeto preferente de estudio, mientras que en los lagos el uso de las microalgas bentónicas como bioindicadores es más reciente.

En el marco de la aplicación de la DMA, las microalgas se consideran útiles para la detección y seguimiento de las presiones debidas a:

- Eutrofización
- Incrementos de materia orgánica
- Salinidad
- Acidificación



Fotografía 2.1.: *Cyclotella menighiniana*
(Propiedad de Juan Alcober)

La mayoría de las microalgas son productores primarios y como tales responden a las variaciones de los nutrientes (especialmente del fósforo) en el agua; algunas pueden comportarse como organismos heterotróficos en aguas con aumentos de materia orgánica. Las comunidades de microalgas bentónicas responden al aumento de nutrientes (principalmente P y N) en el agua, mediante cambios en su composición que, en algunos casos, suponen la disminución de la diversidad, y el aumento de la biomasa; de forma que cuando la masa de agua se eutrofiza los sustratos aparecen recubiertos de pátinas verdes o pardas de algas.

Respecto a la acidificación, ésta no es problema en la mayor parte de las cuencas ibéricas cuyas aguas están tamponadas.

Las microalgas bentónicas son poco sensibles a las presiones hidromorfológicas (alteraciones del régimen hidrológico, continuidad del río y condiciones morfológicas del lecho), por lo que no se recomienda su uso para la detección de dichas presiones. Los macrófitos, dentro de los vegetales, son mejores indicadores de las alteraciones hidromorfológicas.

3. MÉTRICAS BASADAS EN MICROALGAS BENTÓNICAS

3.1. ÍNDICES DE DIATOMEAS

Las diatomeas son el grupo más diverso de las microalgas bentónicas; suelen constituir el 80-90% de la comunidad del perifiton. Son cosmopolitas y sus requerimientos ecológicos son conocidos para muchas de sus especies, y son los mismos en diferentes regiones geográficas. Tienen como ventaja adicional la buena manipulación y conservación de las muestras, lo que se debe, en parte, al esqueleto de sílice – el frústulo – de elevada resistencia y cuyas características morfológicas son la base de la identificación de las especies. Los frústulos que están formados por dos valvas, se acumulan en los sedimentos lacustres y pueden ser analizados en estudios paleolimnológicos.

En los ríos ibéricos los factores más relevantes que afectan a la composición y abundancia de las diatomeas son los nutrientes (principalmente P y N) y la salinidad. Otros factores como la luz, la temperatura, el pH, la velocidad de la corriente y la naturaleza del sustrato pueden también causar variaciones en las comunidades de diatomeas.

Los procedimientos de muestreo y análisis están estandarizados por las siguientes normas y pre-normas europeas (*European Committee for Standardization, 2003, 2004*):

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

Estas dos normas están ahora incluidas en la legislación española como Normas Españolas (AENOR 2004, 2005).

Existe una amplia variedad de índices de diatomeas (Ector & Rimet, 2005), diseñados por diferentes autores (IPS, CEMAGREF 1986; IBD, Prygiel y Coste, 1998; CEE, H. Lange-Bertalot, 1979; LMI, Leclercq y Maquet, 1987; SLA, Sládecek, 1973; EPI-D, Dell'Uomo, 2004; ROTT, Rott *et al.*, 1997, 1999, 2003). Todos suelen basarse en combinaciones entre la abundancia relativa y el grado de sensibilidad (tolerancia) de un grupo de taxones seleccionados (en general especies). Prygiel *et al.* (1999), Whitton y Rott (1996) y Whitton *et al.* (1991) describen y evalúan muchos de los índices utilizados actualmente. Muchos de estos se han desarrollado para usarlos en un área geográfica concreta aunque comprobaciones posteriores han demostrado que algunos tienen una validez más amplia.

En Francia, las Agencias del Agua y el CEMAGREF de Burdeos han elaborado un programa informático (OMNIDIA) que permite el cálculo de un número elevado de índices. Este programa está sometido a sucesivas actualizaciones que permiten la incorporación de nuevas especies y nuevos índices.

Antes de utilizar un índice por primera vez en un área, es necesario hacer una evaluación previa del índice. Esta evaluación debería de considerar la información autoecológica de los taxones, así como las condiciones fisicoquímicas del lugar concreto. Es importante que los taxones dominantes presentes en la región estén también representados en el índice.

La correcta aplicación de los índices requiere de la participación de un técnico entrenado en la identificación taxonómica de las diatomeas. Entre los índices más usados se encuentran los siguientes, los cuales se han aplicado en la cuenca del Ebro:

- Índice IPS (Índice de Polusensibilidad Específica): Se calcula sobre la base de las medias ponderadas de los valores de sensibilidad a la contaminación (S_j), Valor indicador de contaminación (V_j) y Abundancia relativa de la especie j :

$$IPS = \frac{\sum A_j \times S_j \times V_j}{\sum A_j \times V_j}$$

- Índice IBD (Índice Biológico de Diatomeas) (AFNOR 2000): Basado en un número reducido de taxones (250) para los que se conoce su grado de tolerancia (7 grupos de calidad). Su sensibilidad es menor que el anterior en los ríos cuya composición de diatomeas no incluya parte de las especies del índice.
- Índice CEE (Descy y Coste, 1990): Combina, en una tabla de doble entrada, grupos de especies con diferente tolerancia a la contaminación, en relación con su distribución a lo largo de los ríos.

Los índices de diatomeas se aplican normalmente en ríos, no obstante recientemente se está analizado su posible utilización en lagos (Seele et al, 2000; Kitner y Poulícková, 2003; Blanco et al. 2004, 2005) con resultados favorables. Como ejemplo cabe citar la aplicación de los índices IPS e IBD en muestras de perifiton tomadas sobre tallos de helófitos sumergidos (*Scirpus lacustris* y *Typha latifolia*) en lagos someros de la provincia de León (Blanco et al. 2004). Los resultados muestran una buena correlación entre los resultados de los índices y el estado trófico de los lagos.

En lagos de Cataluña se aplica un indicador basado en diatomeas (Agència Catalana de l'Aigua, 2003). Este índice ($InDia = \sum ai \times di$) se obtiene de ponderar la abundancia relativa de cada especie característica (d_i) por un valor indicador (a_i). Las especies características varían en cada tipo de lago.

3.2. MÉTRICAS BASADAS EN OTROS GRUPOS DE ALGAS

El carácter indicador de otros grupos de algas no diatomeas se ha puesto de manifiesto en diversos estudios de investigación. Por esta razón, en diversos países europeos también se utilizan las microalgas no diatomeas para evaluar la calidad del agua. Así tenemos el índice de los saprobios SLA (Sladeczek, 1973), utilizado en la República Checa, el índice E-P/I (Dell'Uomo, 1991) en Italia y más recientemente el índice trófico TI (Rott, 1999) en Austria, que se han construido con bases de datos muy potentes de alrededor de 1000 entradas. Douterelo et al. (2004) analizan las variaciones que presentan las cianobacterias en tramos fluviales sometidos a vertidos de aguas residuales orgánicas, en ríos de la provincia de Madrid; y observan decrementos de la diversidad, cambios de especies y de sus abundancias. Los autores del citado estudio señalan que las cianobacterias podrían usarse como indicadores de calidad en los seguimientos de las redes de control de ríos. No obstante el trabajo debería ampliarse (a otras cuencas) y proceder a estandarizar su muestreo y análisis, lo cual es una tarea que podría desarrollarse en un futuro próximo.

3.3. MÉTRICAS BASADAS EN LA BIOMASA

La concentración de Clorofila *a* /m² puede ser usada como métrica del grado de eutrofia (límite de eutrofia superior a 100 – 150 mg Chl-*a*/m²) (Dodds et al. 1998). No obstante existen opiniones que cuestionan el uso de medidas cuantitativas de biomasa (Clorofila *a*), en el marco de seguimientos rutinarios de eutrofia. Kelly y Whitton (1998) señalan que los valores de biomasa algal pueden estar influidos por factores independientes a la carga de nutrientes como son avenidas, cambios estacionales y el ramoneo de invertebrados. También existen dificultades para la estandarización del muestreo (estima de la superficie de la que procede la medición, efecto sombra, etc...). Este indicador podría tener interés en el seguimiento de la eutrofia en tramos fluviales seleccionados (control operacional) pero no se considera adecuado para su inclusión en los controles de vigilancia.

4. PROPUESTA DE MÉTRICAS PARA LA CUENCA DEL EBRO

Se presenta una propuesta de métricas principales y complementarias para la determinación del estado ecológico de los ríos y lagos de la cuenca del Ebro.

4.1. RÍOS

Las métricas basadas en las microalgas que se han identificado para el establecimiento del estado ecológico de los ríos de la cuenca del Ebro son las siguientes:

Microalgas bentónicas	
Métricas principales	Métricas complementarias
Índice IPS de diatomeas Índice trófico TI (Rott 1999)	Índices de cianobacterias (a desarrollar medio y largo plazo). Clorofila <i>a</i> – Seguimientos operacionales (protocolos a estandarizar)

Tabla 2.1.: Métricas basadas en las microalgas bentónicas

Las diatomeas se consideran el principal indicador dentro de los productores primarios en los ríos de la demarcación del Ebro. Existen trabajos previos y se han obtenido buenos resultados en las experiencias realizadas (Confederación Hidrográfica del Ebro, 2004; C.H. del Duero, 2004; C.H. del Norte, 2005).

La CHE dispone de una Red de diatomeas que comprende cerca de 200 estaciones en la red fluvial, de las que una parte pertenecen a la red provisional de referencia. En estas estaciones se han aplicado los índices IPS, IBD y CEE, y los resultados muestran que el índice IPS es la métrica que ofrece mejores resultados en la cuenca del Ebro (CHE, 2004).

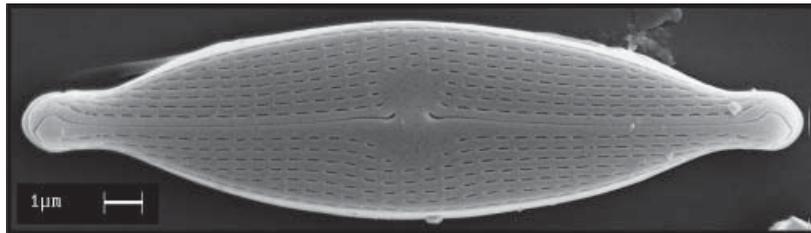
Se considera adecuado mantener el índice IPS como una de las métricas a usar en el establecimiento del estado ecológico de las masas fluviales de la cuenca del Ebro. No obstante se recomienda realizar mejoras según las siguientes directrices:

- Ampliar el número de estaciones o redistribuir las existentes dentro de las masas de agua fluviales identificadas.
- Asegurar un número suficiente de estaciones de referencia en los tipos que dispongan de ellas. Los resultados del estudio de presiones e impactos en fase de finalización permitirán testar la bondad de las estaciones de referencia provisionales y detectar otras posibles.
- Establecer los valores de referencia del IPS para cada tipo identificado en la demarcación del río Ebro.
- Buscar otras métricas resultantes del análisis de los inventarios de microalgas que puedan ser de interés para completar los resultados que se obtienen con los índices. Inicialmente se recomienda aplicar el índice TI (Rott, 1999).
- Preparar un Atlas iconográfico de las diatomeas presentes en las distintas cuencas para facilitar las identificaciones de las especies.
- Proponer cursos de formación a la taxonomía de las diatomeas y ejercicios de intercalibración entre los técnicos.
- Incluir toda la información (inventario de especies, recuentos, resultados de los índices calculados) en una Base de datos georreferenciada.

El protocolo que se presenta en esta memoria incluye los procedimientos de muestreo (apartado 5), tratamiento de las muestras (apartado 6) y análisis (apartado 7) recomendados para la obtención de métricas basadas en las **diatomeas bentónicas**, que permitan establecer el estado ecológico de los ríos de la cuenca de la demarcación hidrográfica del Ebro.

4.2. LAGOS

Existe poca información, no obstante se considera interesante incluir las diatomeas bentónicas como indicadores del estado ecológico de los lagos, especialmente en los lagos someros. En el protocolo de muestreo de diatomeas (apartado 5) se presentan las directrices metodológicas para su muestreo en lagos.



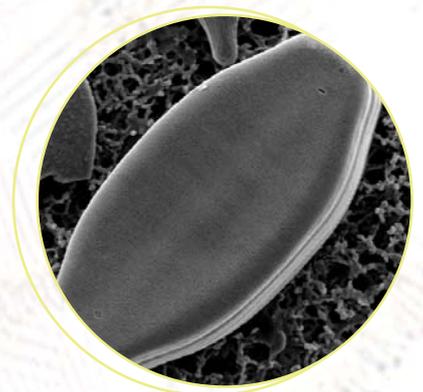
Fotografía 2.2.: *Navicula gregaria* (Propiedad de C. Bouillon y L.Ector)



Parte 2: ■ Protocolos

En las páginas siguientes se incluyen los procedimientos destinados al uso de las microalgas bentónicas (diatomeas) en el establecimiento del estado ecológico de las aguas superficiales, los cuales se refieren a los siguientes aspectos:

- Muestreo
- Pre-tratamiento de muestras
- Identificación
- Control de la calidad



5. PROCEDIMIENTO PARA EL MUESTREO DE DIATOMEAS BENTÓNICAS

5.1. INTRODUCCIÓN

Este procedimiento establece un método para el muestreo de las diatomeas epilíticas y epifíticas utilizadas para evaluar la calidad del agua de ríos y lagos. Los datos obtenidos mediante este método son los más apropiados para obtener los índices de calidad del agua basados en la abundancia relativa de los taxones.

La elaboración del procedimiento se ha basado en los siguientes documentos: Norma 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 continentales (MMA, 2002).

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.
- Conservar la muestra.

5.2. EQUIPOS Y REACTIVOS

5.2.1. Equipos de muestreo

- Protección personal
 - Botas o vadeadores de pescador.
 - Guantes de látex (especialmente en aguas sospechosas de contaminación).
- Recolección de muestras
 - Cepillo de dientes duro (u otro instrumento similar) o cuchillo (u otra hoja adecuada).-
 - Azada de mango largo con una red fina adherida (por si deben muestrearse superficies duras verticales).
 - Caja o cubo con el fondo de vidrio (*Aquascope*), para encontrar, en algunas circunstancias, los sustratos idóneos.
 - Botes o viales de plástico con tapón hermético.
 - Bolígrafo o rotulador permanente (o cualquier otro método para etiquetar las muestras). Si se usan etiquetas, estas deben ser resistentes a la humedad.

5.2.2. 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 ésta se conserve en frío (4 °C) y a oscuras; la muestra también se puede ultracongelar.

En caso de conservar las muestras se recomienda usar formaldehído tamponado o etanol, especialmente para periodos de conservación de las muestras largos; las muestras en formaldehído pueden conservarse durante meses o años, siendo recomendable añadir más conservante en periodos de conservación superiores a 6 meses – 1 año.

- a) **Solución tamponada de formaldehído (HCHO) al 4% v/v:** Diluir una solución stock de formaldehído al 4% en una solución tamponada de pH 7 (la solución tampón se requiere para prevenir la disolución de los frústulos). Entre los tampones más indicados se encuentra HEPES (N-2- hidroximetilpiperazina-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 orgánica presente en la muestra).

Dada la naturaleza tóxica de esta sustancia, en caso de utilización se deben tomar precauciones (trabajar en un ambiente bien ventilado, usar guantes).

b) **Etanol 70% (C₂H₅OH)**: Puede utilizarse para este propósito.

5.3. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO

5.3.1. Selección del punto de muestreo

Debe seleccionarse un segmento del río o del litoral del lago donde puedan encontrarse los sustratos adecuados para la toma de muestras (ver apartado 5.3.2.). Como norma general, debe tener unos 10 m de largo, aunque longitudes superiores podrían ser apropiadas dependiendo de la uniformidad física del río y de la disponibilidad de sustrato.

Tiene que hacerse una descripción detallada del lugar de muestreo: localización, anchura, profundidad, tipo de sustrato, presencia y abundancia de macrófitos, grado de sombra, y otros datos de interés ecológico. También se recomienda hacer una fotografía. Toda esta información es valiosa para la interpretación de los resultados y facilita el trabajo de los siguientes muestreos (localización del punto de muestreo, reconocimiento de posibles cambios, mejor reproducibilidad del protocolo de muestreo).

5.3.2. Selección del sustrato

La selección del sustrato es un paso importante ya que las diatomeas se pueden encontrar en muchas superficies sumergidas, y la composición de las comunidades halladas puede variar en función del sustrato escogido. Por esta causa se deben establecer criterios de selección del sustrato a muestrear. Como criterio general, es recomendable muestrear las comunidades (superficies parduzcas resbaladizas) que se desarrollen sobre sustratos duros estables situados en zonas sumergidas del lecho fluvial o del litoral de lagos como: rocas, piedras, y cantos rodados de un tamaño mínimo de 10 x 10 cm. En caso de no encontrarse este tipo de sustrato, se puede tomar la muestra en estructuras construidas por el hombre como pilares de puentes o paredes de infraestructuras hidráulicas (azudes, obras de defensa), siempre y cuando no estén hechos de madera, ya que la materia orgánica puede descomponerse favoreciendo la presencia de determinadas especies. También puede muestrearse sobre otras superficies artificiales como ladrillos o tejas, si podemos garantizar su presencia en el agua durante al menos cuatro a ocho semanas¹; en general, un lapso de tiempo de dos meses se considera suficiente para que la comunidad de diatomeas sea madura; no obstante este tiempo puede variar según las condiciones ecológicas.

Si dominan la arena o limos pero existe más de un 10% del total del sustrato que sean rocas o piedras, se escogerán preferentemente las rocas o piedras como sustrato a muestrear. Si únicamente existen arenas, limos o plantas acuáticas, se recogerán las muestras de aquellos que sean característicos del punto de muestreo².

En tramos fluviales profundos y en lagos pueden muestrearse los tallos de los helófitos o bien sustratos rocosos. Para uniformizar el muestreo se recomienda muestrear siempre las mismas especies o grupos morfológicamente similares; también pueden usarse sustratos artificiales introducidos en zonas seleccionadas.

5.3.3. Directrices para la toma de la muestra

En la toma de muestras tener en cuenta las siguientes indicaciones generales:

Ríos

- Evitar muestrear sustratos procedentes de zonas muy sombreadas, a no ser que esta sea la característica distintiva del punto a evaluar.
- Evitar tomar sustratos de zonas emergidas o que presumiblemente lo hubieran estado en algún momento reciente.
- Evitar tomas de sustratos en áreas demasiado cercanas a las orillas, y obtenerlas principalmente del punto medio del río, en zona de corriente.
- Evitar zonas debajo de puentes o recientemente afectadas por obras de ingeniería o de alteración de lecho fluvial.
- Evitar las pozas y los tramos de escasa corriente en las que suele haber deposición de limos y de detritos lo que limita la colonización de las diatomeas epilíticas; tampoco son recomendables las zonas de excesiva corriente (rápidos).

¹ No existe consenso en este dato y los expertos consultados dan un periodo mínimo de 4, 7 u 8 semanas.

² Si se muestrean diatomeas epifitas se asegurará que proceden de plantas totalmente sumergidas.

Lagos

- Evitar tomar sustratos en áreas presumiblemente inundadas recientemente (menos de 4-6 semanas).
- Evitar tomar sustratos de zonas emergidas o que presumiblemente lo hubieran estado en algún momento reciente.

5.3.3.1. Procedimiento para la toma de las muestras en ríos

5.3.3.1.1. Superficies duras naturales móviles

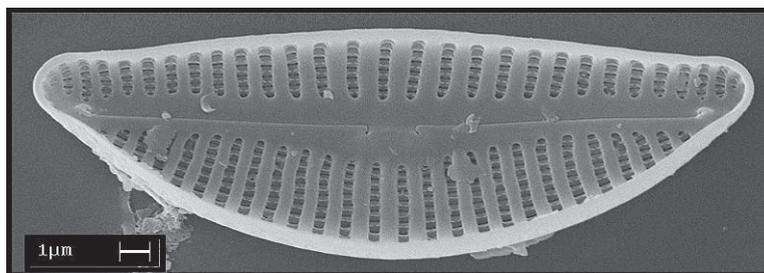
Las piedras y cantos rodados son el sustrato más idóneo. Seguir el siguiente procedimiento:

- Seleccionar como mínimo 5 piedras o bien hasta 10 si sólo existen piedras pequeñas o guijarros. Asegurarse que las piedras se extraen de las zonas adecuadas (inundadas permanentemente, en zonas soleadas, y con aguas corrientes si las hay).
- Para realizar el muestreo, es conveniente situarse en el punto de máxima corriente (si es posible) e ir recorriendo el río a contra corriente (aguas arriba), para minimizar el efecto de contaminación de las muestras.
- Eliminar cualquier tipo de contaminación adherida a los sustratos (p.ej. detritus orgánicos) limpiando un poco la superficie en la corriente de agua. Si el sustrato está recubierto de algas filamentosas se intentarán desprender éstas, tanto como sea posible, antes de tomar la muestra (siempre es preferible evitar los sustratos recubiertos de algas filamentosas).
- Cepillar (o raspar con navaja) la superficie superior de los sustratos, evitando así las superficies de erosión y sedimentación. Limpiar una zona aproximada de cómo mínimo 10 cm² por piedra (20 cm² si se toman 5 piedras). La superficie total de muestreo será de unos 100 cm².
- Introducir el cepillo (o la hoja de la navaja) en el bote de la muestra que previamente se habrá aclarado y contendrá unos 50 ml de agua³. Agitar suavemente para permitir la transferencia de las diatomeas. El agua de la muestra se tornará turbia y de color marrón.
- Aclarar con abundante agua del río el cepillo o instrumento usado para tomar la muestra.
- Proceder a etiquetar la muestra y a su conservación (ver apartado 5.3.4.).

5.3.3.1.2. Superficies verticales de infraestructuras artificiales

En ríos profundos y navegables pueden muestrearse las paredes verticales sumergidas de infraestructuras hidráulicas (p.ej. azudes, defensas). El procedimiento recomendado es:

- Usar un rastrillo con mango telescópico, lo que permite recoger el material que se desprende al pasar esta herramienta sobre la superficie a muestrear. Este rastrillo puede disponer de una red que recoja el raspado; no obstante esta técnica presenta un riesgo elevado de contaminarse con diatomeas planctónicas.
- Tomar la muestra a 30 cm por debajo del nivel del agua para evitar la zona influida por la fluctuación del nivel de agua y del oleaje.
- Limpiar, aproximadamente, una superficie de 10 cm² por zona de la superficie a muestrear. Proceder a extraer el material retenido en la red e introducir éste en el recipiente de la muestra. Repetir el procedimiento tres veces como mínimo.
- Etiquetar y conservar la muestra según se indica en el apartado 5.3.4.



Fotografía 2.3.: *Encyonema caespitosum* (Propiedad de C. Bouillon y L. Ector)

³ El agua de la muestra puede tomarse del río o preferiblemente ser agua embotellada (en los ríos de aguas lentas en los que puede haber abundancia de diatomeas planctónicas).

5.3.3.1.3. Vegetación acuática

En tramos leníticos de ríos con abundante crecimiento de vegetación acuática se puede muestrear la comunidad de diatomeas epifíticas que se encuentra en macrófitos y macroalgas sumergidas y/o las partes sumergidas de helófitos. No obstante algunos expertos consideran inadecuado este tipo de sustrato por ser determinante del tipo de comunidad de diatomeas que aparece, siendo preferible limitar el muestreo del epilíton en sustratos duros artificiales o naturales.

En todo caso se indican los procedimientos de muestreo:

Macrófitos y macroalgas sumergidos

- Recoger la planta entera (si es pequeña) o bien cortar una parte utilizando un cuchillo o tijeras; guardar la planta (o su parte) en una bolsa de plástico. Coger 5 réplicas. Se evitarán las partes sumergidas de las hojas flotantes (nenúfares) por no recibir luz directa.
- En el laboratorio remover o agitar las plantas enérgicamente, durante 2 minutos, en un vaso de precipitados grande que contenga agua destilada (Zimba, 1997) para extraer todas las diatomeas adheridas. Sacar los macrófitos del vaso de precipitados, y dejar que las diatomeas sedimenten; extraer el sobrenadante y conservar la muestra de diatomeas según se requiera.
- En el caso de algas filamentosas, es preferible evitar su muestreo ya que las diatomeas aparecen dominadas por *Cocconeis*, y su valor indicador se reduce. En todo caso también es posible escurrir una pequeña cantidad de ellas y recoger la suspensión resultante (que contendrá diatomeas epifíticas) en el vial de muestreo.

Macrófitos emergentes

Las muestras sólo pueden tomarse sobre macrófitos emergentes que contengan porciones que permanezcan permanentemente sumergidas, pero que no estén contaminadas por sedimentos del fondo.

- Cortar los tallos por debajo del nivel del agua. Para ello, cortar el tallo al nivel del agua; poner una botella de plástico o de vidrio boca abajo en la parte sumergida del tallo. Cortar el tallo hasta la boca de la botella, después girar la botella con el tallo dentro y cerrar.
- En el laboratorio sacar las diatomeas de los tallos agitándolos con cuidado en la botella.

5.3.3.1.4. Sustratos artificiales

Son preferibles sustratos con superficies heterogéneas (p. ej.: tejas, cuerdas de propileno deshilachadas) a las superficies lisas (p. ej. portaobjetos de vidrio). Deben dejarse en el río el tiempo suficiente para asegurar que la comunidad esté madura. Como mínimo se recomiendan 7-8 semanas, pero el periodo de exposición depende de las condiciones ambientales, así los periodos de exposición podrían ser más largos bajo algunas circunstancias (p. ej.: condiciones muy oligotróficas, bajas temperaturas, mucha sombra).

Debe cuidarse que el diseño y la ubicación de los sustratos introducidos no interfiera con las actividades legítimas de los usuarios del río y minimizar el riesgo de vandalismo. Tienen que colocarse réplicas extras, para compensar las posibles pérdidas por crecidas o por vandalismo.

Cuando se utilicen sustratos para realizar estudios en el mismo curso de agua, es importante que todos los sustratos estén expuestos a las mismas condiciones, así como también es necesario que el periodo de exposición y la fecha de inicio de la introducción del sustrato sea el mismo.

Para el etiquetado y el transporte al laboratorio se siguen las directrices del apartado 5.3.4.

5.3.3.2. Procedimiento para la toma de muestras en lagos y zonas húmedas

Se pueden usar los mismos métodos que se describen para los ríos. No obstante en el litoral de lagos y en zonas húmedas puede existir una cierta dificultad en encontrar rocas o piedras para muestrear las diatomeas. Por el contrario abundan gravas y limos, y en la mayoría de ellos la vegetación acuática.

De cara a uniformizar el muestreo se recomienda el muestreo en los tallos de los helófitos sumergidos. Para ello deben cortarse los tallos de los helófitos que permanecen bajo el nivel del agua y fragmentarlos en porciones de unos 10 cm de longitud (no deben incluirse en la muestra fragmentos contaminados por los sedimentos del fondo ni que presumiblemente hubieran estado emergidos recientemente); estas porciones se introducen en el bote de muestra y se cubren de agua. Posteriormente se limpian los tallos agitándolos con suavidad.

5.3.4. Conservación y etiquetaje de las muestras

Una vez tomada cada muestra se procederá a su etiquetado. Se usará un rotulador resistente al agua, y se indicará un código identificador del muestreo, un código de la estación de muestreo, la fecha de la recolección, los sustratos de los que procede y el fijador utilizado.

Se procederá a conservar la muestra según lo indicado en el apartado 5.2.2.

Las muestras deben guardarse en un lugar oscuro y fresco durante el trayecto hasta el laboratorio.

Toma de muestras de diatomeas bentónicas		
		
<ul style="list-style-type: none"> ● Seleccionar un tramo bien iluminado y en zona de corriente 	<ul style="list-style-type: none"> ● Escoger piedras y cantos rodados sumergidos 	<ul style="list-style-type: none"> ● Cepillar la superficie del sustrato; limpiar el cepillo en el recipiente con agua

Fotografía 2.4.: Toma de muestras de *diatomeas bentónicas* (Propiedad de Jaume Cambra)

6. PRE-TRATAMIENTO DE MUESTRAS DE DIATOMEAS BENTÓNICAS

6.1. INTRODUCCIÓN

Este procedimiento establece los métodos de laboratorio para el estudio de las diatomeas epilíticas y epifíticas utilizadas para evaluar la calidad del agua de ríos y lagos. Incluye los procedimientos de tratamiento de las muestras previas a su identificación y recuento.

La elaboración del procedimiento se ha basado en los siguientes documentos: Norma prEN 14407:2004; Protocolo de la Agencia Catalana del Agua para la evaluación de la calidad biológica de los ríos mediante diatomeas (2003).

El procedimiento incluye directrices metodológicas para lo siguiente:

- Identificación del equipo de laboratorio y reactivos requeridos.
- Pre-tratamiento de las muestras.

6.2. MATERIAL DE LABORATORIO

6.2.1. Equipos

- Campana extractora o sistema equivalente.
- Placa calefactora, baño de arena o baño de agua.
- Vasos de precipitados o tubos de ebullición (uno por muestra).
- Medios para medir volúmenes de 20 ml de agentes oxidantes.
- Pipetas Pasteur limpias.

- Centrifuga (opcional)⁴ (algunos expertos no son partidarios de utilizar centrifuga, ya que las células grandes o poco silificadas se rompen y se alteran los resultados)
- Tubos de centrifuga (opcional). Estos tubos deberían ser resistentes al ataque de agentes oxidantes o ácidos utilizados para limpiar las diatomeas.

6.2.2. Reactivos

6.2.2.1. Reactivos para limpiar diatomeas

Para limpiar los frústulos de las diatomeas, se debe tratar la muestra con reactivos que permitan la digestión de la materia orgánica. Éstos son los siguientes:

- Solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30% (110 volúmenes).
- Ácido clorhídrico diluido (ex 1 M) (HCl).
- Ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄).
- Permanganato potásico (KMnO₄) en cristales.
- Ácido oxálico saturado (C₂H₂O₄).

De los reactivos indicados el más recomendable es la **solución de peróxido de hidrógeno**, ya que el resto son sustancias tóxicas cuya manipulación requiere condiciones de seguridad más estrictas.

6.2.2.2. Reactivos para preparaciones permanentes

Se requiere de un medio de montaje con un índice de refracción superior a 1,6. Se recomienda el uso de Naphrax®.

6.3. TRATAMIENTO PREVIO A LA OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

Las muestras deben guardarse en un lugar oscuro y fresco durante el trayecto hasta el laboratorio y mientras se mantengan almacenadas. El pre-tratamiento incluye la concentración de la muestra, la digestión de la materia orgánica y la realización de las preparaciones microscópicas.

6.3.1. Concentración de las muestras

La separación de las diatomeas del agua de la muestra puede realizarse por uno de los dos métodos siguientes:

- Dejar reposar las muestras 24 horas, como mínimo. Con esto se consigue que el material en suspensión sedimente y se acumule en el fondo del frasco; entonces el sobrenadante se puede retirar con una pipeta.
- Centrifugar la muestra. Previamente para quitar los restos grandes de sustrato o de plantas es preferible pasar la muestra por un colador de cocina. La velocidad y tiempo necesarios para completar la sedimentación de todas las diatomeas (incluyendo las especies pequeñas) dependerá de las características individuales de la centrifugadora utilizada (realizar pruebas preliminares para asegurar que no se dejan diatomeas en el sobrenadante con el tiempo y la velocidad escogidos).

Se recomienda un examen microscópico preliminar de las muestras sin tratar, y anotar cualquier característica inusual que se observe (p. ej. gran cantidad de frústulos vacíos).

Siempre debe guardarse una parte de la muestra, para evitar la pérdida en el caso que haya problemas durante el proceso de preparación.

6.3.2. Limpieza de las diatomeas

Para una identificación adecuada de las diatomeas, es necesario eliminar todo el contenido celular. Esto puede hacerse exponiendo la muestra a agentes oxidantes fuertes. El peróxido de hidrógeno (110 vol.) es el más común y el más recomendado (ver apéndice 2).

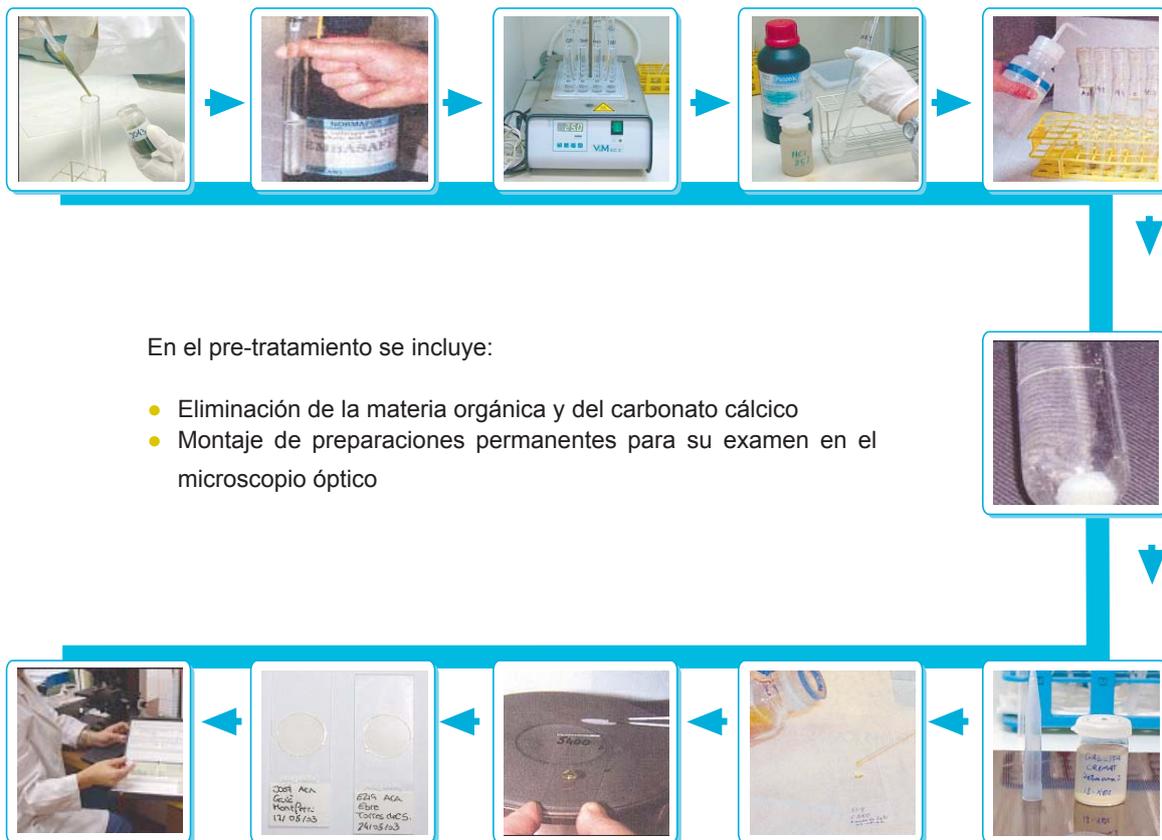
En aguas ricas en carbonato cálcico, se recomienda eliminar los carbonatos con HCl diluido. Este tratamiento también es necesario para muestras ricas en hierro.

⁴ Nota: si no se dispone de centrifugadora, se puede dejar sedimentar el material sólido durante una noche, después de esto puede vaciarse con cuidado el sobrenadante.

6.3.3. Elaboración de preparaciones permanentes

- Conseguir la concentración adecuada de diatomeas. Si la suspensión de muestra que se obtiene después de la digestión de la materia orgánica, se observa lechosa o turbia, debería añadirse agua destilada o desmineralizada para diluir su concentración; también puede utilizarse etanol⁵. La densidad de valvas puede comprobarse rápidamente mediante la evaporación de una gota de la suspensión en un cubreobjetos y observándola al microscopio con un objetivo medio (x40). Si la suspensión está muy diluida, hay que volver a centrifugar la muestra. Si esto falla, se repite el proceso de preparación.
- Secado de la submuestra de diatomeas. Agitar el vial que contiene la suspensión de diatomeas limpias. Con una pipeta Pasteur limpia extraer una o dos gotas de líquido (que debería ser turbio) de la parte central del tubo, y depositarlas en un cubre-objetos redondo. Dejar evaporar el líquido, depositando el cubreobjetos en un lugar cálido, resguardado del polvo y sin vibraciones, o bien calentarlo suavemente en una placa calefactora. El resultado tendría que ser una película de color gris que cubre el cubre-objetos.
- Adición del medio de montaje. Seguir las instrucciones de los fabricantes en la utilización del medio de montaje. Uno de los más utilizados es la resina Naphrax[®]. Debe asegurarse que el medio de montaje se expanda hasta los márgenes del cubre-objetos. Dejar enfriar y comprobar en el microscopio. La concentración ideal para el recuento sería aquella que a x1000 se puedan contar de 10 a 15 valvas en un campo. Si la preparación tiene muchas valvas por campo, se repite el proceso con una muestra diluida de las diatomeas limpias de materia orgánica.
- Etiquetar la preparación. Indicar como mínimo, los códigos de identificación de la muestra, la fecha y cualquier código necesario para permitir el acceso a la otra información.

Pre-tratamiento de la muestra de diatomeas bentónicas



Fotografía 2.5.: Pretratamiento de la muestra de *diatomeas bentónicas* (Propiedad de Jaume Cambra)

⁵ Nota: El etanol ayuda a dispersar las diatomeas uniformemente en el cubre-objetos

7. IDENTIFICACIÓN Y RECUENTO DE DIATOMEAS BENTÓNICAS

7.1. INTRODUCCIÓN

En este apartado se establece un método para la identificación, recuento y obtención de la frecuencia relativa de las especies de diatomeas presentes en las preparaciones y la interpretación de los resultados para valorar la calidad del agua de ríos y arroyos. Los datos obtenidos con estos métodos son los más apropiados para obtener índices de calidad del agua basados en la abundancia relativa de estos taxones

La elaboración del protocolo se ha basado en los documentos: Norma prEN 14407:2004 y Protocolo de la Agencia Catalana del Agua para la evaluación de la calidad biológica de los ríos mediante diatomeas (2003).

El procedimiento incluye directrices metodológicas para lo siguiente:

- Criterios para la identificación taxonómica y para los recuentos.
- Identificación de las diatomeas.
- Recuentos.
- Registros de datos y muestras.

7.2. MATERIAL DE LABORATORIO

- **Microscopio óptico:** equipado con una platina mecánica y objetivos de grandes aumentos y de inmersión. Se recomienda el contraste de fases o el objetivo con interferencia diferencial (Nomarski). El microscopio ha de estar preparado para poder tomar medidas (p. ej. ocular con micrométrico) con una resolución de 1µm como mínimo. Los aparatos de captura de imagen, vídeo o fotomicroscopía, son útiles para registrar las especies difíciles y puede también ayudar a medir la densidad de estrías, etc.
- **Portaobjetos con escala micrométrica:** Es una preparación que tiene inscrita una distancia conocida, con divisiones y subdivisiones, para poder calibrar el ocular micrométrico, o cualquier otro aparato de medida.
- **Aceite de inmersión** y aplicador.
- **Pañuelos:** para la limpieza de los lentes.
- **Formularios** para anotar el recuento de las especies. Puede contener una lista de taxones con espacios donde anotar el recuento; también puede usarse un programa de ordenador preparado para la entrada directa de datos.
- **Guías de identificación y iconografías:** adecuadas al ámbito de estudio.
- Medios para verificar la identificación de las especies de difícil taxonomía: Esto puede hacerse de diversas formas: con dibujos y micro-fotografías de alta resolución; con imágenes de vídeo. También es muy útil localizar el taxón en la preparación usando la escala de Vernier del microscopio.

7.3. PROTOCOLO DE IDENTIFICACIÓN, RECUENTO E INTERPRETACIÓN DE DIATOMEAS

Las diatomeas bentónicas, limpias del contenido celular, se montan en un medio con un índice alto de refracción y se identifican y cuentan utilizando un microscopio óptico de alta resolución. Los resultados se interpretan usando uno o más índices de calidad del agua u otros métodos de evaluación.

7.3.1. Aspectos preliminares a la identificación

7.3.1.1. Nivel taxonómico de identificación

La mayoría de índices de calidad requieren una identificación a nivel de especie o género. Es importante asegurar la correcta identificación de los taxones, y para ello hay que tener en cuenta los siguientes aspectos:

- Existencia de varios sistemas paralelos de nomenclatura. La nomenclatura definitiva a usar debe establecerse antes de empezar el trabajo. Los autores de los nombres de los taxones deben citarse en todos los casos, ya que existen posibilidades de confusión en la nomenclatura.
- Es recomendable adoptar la nomenclatura de la flora existente en el área estudiada, aunque también es posible utilizar los inventarios de diatomeas nacionales y regionales. Cuando los convenios taxonómicos del índice y los inventarios difieran, los del índice se han de ajustar a aquellos del inventario (checklist).
- Es recomendable tener actualizada periódicamente la nomenclatura y la subdivisión taxonómica de las especies.

- Si la identificación y recuento de células va a realizarse entre varias personas, deben acordarse previamente la nomenclatura y la bibliografía taxonómica a utilizar, en especial en lo referente a sinonimias y nuevas combinaciones.

7.3.1.2. Determinación de la unidad de recuento

- La unidad de recuento recomendada son las valvas (un frústulo entero = 2 unidades de recuento). Las diatomeas deben identificarse tanto en vistas valvares como en vistas pleurales (conectivas).

7.3.1.3. Determinación del tamaño de la muestra

Para la aplicación de los índices de diatomeas se requieren recuentos de 400 valvas (mínimo). Valores más pequeños podrían carecer del rigor estadístico necesario para algunas aplicaciones.

7.3.1.4. Preparación del microscopio

El ocular micrométrico, o cualquier otro aparato de medida, deben calibrarse regularmente con un portaobjetos con escala micrométrica. Una resolución de 1 μm es adecuada para los análisis rutinarios.

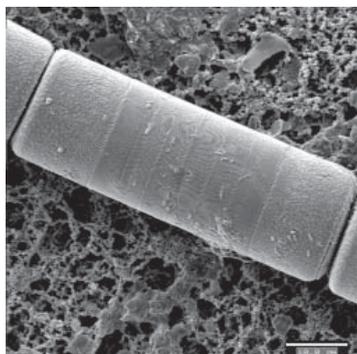
El segundo ocular puede estar equipado con una rejilla para ayudar al recuento; ésta puede ser de distintas formas pero lo importante es que permita seguir un criterio que impida contar dos veces una misma valva.

7.3.1.5. Tratamiento de valvas rotas y diatomeas no identificadas

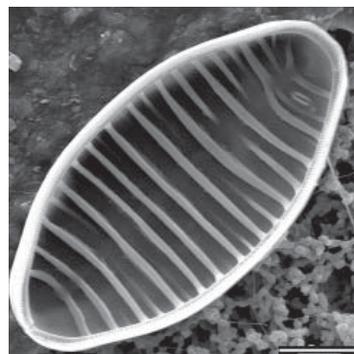
Para eliminar el riesgo de incluir fragmentos de valvas, debe decidirse un criterio antes de empezar el trabajo. Los criterios posibles son:

- Incluir un individuo roto sólo si tiene aproximadamente $\frac{3}{4}$ partes de la valva.
- Incluir un individuo roto sólo si tiene como mínimo un extremo y la parte central.
- Excluir todos los individuos rotos⁶.

Una diatomea puede no ser identificable por distintos motivos: la diatomea está en posición pleural, la presencia de residuos que impidan una visión clara, o que el taxón no sea reconocido por el identificador. Si el exceso de residuos oculta muchas valvas, entonces debe repetirse la preparación utilizando suspensiones más diluidas para separar las diatomeas de los residuos. Algunos taxones son reconocibles a pesar de encontrarse en posición pleural, porque incluso en esta posición tienen una visión característica (p. ej. *Rhoicosphenia abbreviata*) o porque la visión pleural puede asignarse con seguridad a un taxón en particular identificándolo con la correspondiente visión valvar. A pesar de ello, no siempre es posible y en caso de duda debe hacerse un recuento de las visiones pleurales a nivel taxonómico más pequeño que se le pueda asignar con seguridad (p. ej. *Gomphonema* sp., o diatomea pennada en visión pleural). Este mismo criterio debería aplicarse a cualquier otra valva encontrada en la preparación y que no pueda ser identificada. Un gran número de valvas no identificadas puede ser debido a un problema con la preparación o a falta de conocimientos del operador. La resolución que debería tomarse dependerá del método de evaluación propuesto. No todos los taxones necesitan ser identificados para algunos de los índices utilizados. Aunque, para los índices se pide que todos los taxones de la muestra tienen que identificarse, se recomienda que los individuos que no se identifiquen a nivel específico no sean más del 12% del total contador.



Fotografía 2.6.: *Melosira varians* (Propiedad de Juan Alcober)



Fotografía 2.7.: *Diatoma vulgare* (Propiedad de Juan Alcober)

⁶ La presencia de muchos fragmentos de diatomeas puede indicar el arrastre de diatomeas de aguas arriba.

7.3.2. Procedimiento analítico

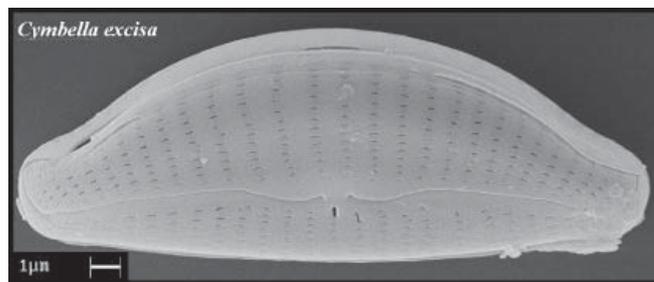
- a) Colocar la preparación en la platina del microscopio y anotar la información más importante en la hoja de recuentos o en el programa de ordenador. La información mínima recomendada es: nº de muestra, nombre del río, localidad y fecha de muestreo. Otra información importante es la fecha del recuento y el nombre del analista.
- b) Seleccionar una buena posición de la preparación para empezar⁷. Se recomienda el margen de la “mancha” de muestra seca, pero debemos asegurarnos que no se produzca un “efecto margen” significativo (p.ej. que no se dé un mayor número de individuos en el margen que en cualquier otro punto de la preparación).
- c) Identificar las valvas presentes en el primer campo de visión utilizando un objetivo de 100x.
- d) Si una valva no puede identificarse, se recomienda obtener fotografías, imágenes digitales o dibujos detallados. Debe describirse el taxón: la forma y dimensiones de la diatomea, densidad de estrías, forma y tamaño del área central, nombre y posición de los estigmas y detalles de la finalización del rafe.
- e) Una vez identificadas y contadas las valvas del primer campo, hay que moverse en un desplazamiento horizontal o vertical hasta un nuevo campo de visión.
- f) Para según que propósitos, es útil continuar el estudio de la preparación una vez contadas las 400 valvas, e incluir en el inventario cualquier taxón que no esté identificado en el recuento. También es útil hacer un rastreo con un aumento medio (p.ej. x400) para detectar los taxones de mayor tamaño (p.ej. Gyrosigma, Pinnularia) que pueden escapar del análisis con grandes aumentos.

Al final del recuento se retira la preparación de la platina y se limpia de aceite de inmersión.

7.3.3. Registros de datos, preparaciones y muestras

Las preparaciones de diatomeas se pueden guardar indefinidamente, hecho que permite revisar los resultados en el futuro. Por eso, es importante que las preparaciones se almacenen de forma correcta, como p.ej. en un herbario. Las preparaciones tienen que etiquetarse con un código que permita identificarlas inequívocamente en una base de datos que contenga otros datos de la localidad: coordenadas geográficas, datos químicos, hidrológicos, etc.

La suspensión de valvas/frústulos limpios también debe etiquetarse y guardarse para permitir hacer más preparaciones en el caso de que sean necesarias. Para prevenir el crecimiento microbiano o la disolución química de los frústulos debe añadirse un fijador como el etanol o el formaldehído. También se recomienda guardar las muestras fijadas por si fuera necesario comprobar resultados anómalos.



Fotografía 2.8.: *Cymbella excisa* (Propiedad de C. Bouillon y L. Ector)

8. CONTROL DE LA CALIDAD EN EL MUESTREO, TRATAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS

8.1. INTRODUCCIÓN

La implementación de la Directiva 2000/60/CE requiere que los métodos que se utilicen en el establecimiento del estado ecológico procedan de metodologías estandarizadas (ISO, CEN, o de organismos nacionales de estandarización), que los laboratorios dispongan de programas de aseguramiento de la calidad (EN ISO 17025) y participen regularmente en ejercicios de intercalibración (*proficiency testing programmes*).

⁷ Una variación del método de los transectos es el recuento mediante campos aleatorios. Si se opta por este método, los campos aleatorios se han de localizar mediante la escala de Vernier con los listados de números generados aleatoriamente.

La toma de muestras de diatomeas bentónicas y el pretratamiento de las muestras están estandarizados según la norma EN 13946: 2003. Las tareas de identificación y recuento de diatomeas están estandarizadas por la norma prEN 14407: 2004; no obstante en los apartados siguientes se indican algunas medidas a tomar para asegurar la calidad de los trabajos.

La toma de muestras puede estar influida por el tipo de río y por la pericia del muestreador. En ríos de los tipos de montaña y llanura sedimentaria es fácil encontrar un número determinado de sustratos duros para muestrear las diatomeas, mientras que en los tramos de los tipos de grandes ríos y del eje del Ebro esto puede ser más difícil, y por lo tanto se debe realizar un tipo de muestreo diferente (sobre sustratos vegetales o mediante sustratos artificiales).

El tratamiento de las muestras y la identificación de los taxones son la principal fuente de variabilidad de los resultados según experiencias en otros países (Prygiel *et al.* 2002). Muchas diferencias se deben a errores de identificación que en muchos casos son debidos a inexperiencia del personal pero también a las dificultades taxonómicas que presentan algunos taxones incluidos en los índices, a la falta de buenos manuales de identificación y/o a la diferente potencia y calidad de los equipos de microscopía que se usen.

Todo lo indicado hace necesario la elaboración y aplicación de métodos de control de calidad específicos para las actividades relacionadas con el muestreo e identificación de diatomeas bentónicas.



Fotografía 2.9.: Identificación de las diatomeas y cálculo de índices (Propiedad de Jaume Cambra y Juan Alcober)

- Identificación de las diatomeas y recuento de valvas
- Aplicación del programa OMNIDIA para el cálculo del índice IPS
- Obtención de las clases de calidad para la red de diatomeas de la demarcación del Ebro

8.2. DIRECTRICES PARA ASEGURAR LA CALIDAD DURANTE EL MUESTREO

Objetivo: Realizar el trabajo de campo y evaluaciones según los procedimientos estándar previamente definidos	
Medidas	<ul style="list-style-type: none"> ● Preparación de un plan de muestreo específico para los diferentes tipos de ríos que recoja las peculiaridades de los tipos de ríos y/o lagos de la cuenca del Ebro. Elaborar hojas directrices que resuman de forma clara y didáctica las tareas y procedimientos a desarrollar. ● Formar al personal a cargo del muestreo, de forma específica para cada proyecto.
	<ul style="list-style-type: none"> ● Documentar los trabajos y usar hojas de campo previamente preparadas. Indicar la localización de la estación de muestreo (coordenadas GPS y esquema del tramo), el número de sustratos muestreados y sus características (tipo, tamaño) y demás datos de interés (grado de sombra, velocidad del agua, análisis fisicoquímicos, análisis biológicos, etc...).
	<ul style="list-style-type: none"> ● Aportar documentación fotográfica de las estaciones de muestreo y detalles de los recubrimientos de microalgas observados. La comparación de fotos realizadas en diferentes años será de gran ayuda para la identificación de tendencias.

Tabla 2.2.: Realizar los trabajos de campo y evaluar según los procedimientos estándar

8.3. DIRECTRICES PARA ASEGURAR LA CALIDAD EN LOS TRABAJOS DE LABORATORIO

Objetivo: Asegurar que se sigan rigurosamente los procedimientos de pre-tratamiento de las muestras	
Medidas	<ul style="list-style-type: none"> Redactar los métodos a usar en el laboratorio de forma clara incluyendo todos los pasos a seguir, e indicar las fuentes de error y los límites de confianza. Realizar entrenamientos al personal en la aplicación concreta de cada procedimiento o uso de equipos.

Tabla 2.3.: Asegurar que se sigan rigurosamente los procedimientos de pre-tratamiento de las muestras

Objetivo: Asegurar la correcta identificación de las microalgas (diatomeas) y la fiabilidad de los recuentos	
Medidas	<ul style="list-style-type: none"> La identificación y recuento de las diatomeas son tareas a realizar por personal entrenado. En España, la formación del personal se realiza, en la actualidad, en las universidades y en el marco de los estudios de licenciatura y doctorado. No existen acreditaciones específicas. En otros países europeos (Francia, Luxemburgo) se organizan cursos de capacitación para el análisis y recuento de diatomeas. Sería deseable que la Administración organizara cursos de capacitación para el personal a trabajar en las redes de seguimiento. Favorecer la elaboración de documentos (Atlas de diatomeas) y bases de datos que recojan tanto aspectos taxonómicos como de distribución y ecología de las especies Aplicar medidas de control de calidad internos (recuento de una misma muestra por dos operadores, estimas de los niveles de confianza). Participar en ejercicios de intercalibración entre laboratorios. Esto es muy importante y es requerido por la DMA.

Tabla 2.4.: Asegurar la correcta identificación de las microalgas (diatomeas) y la fiabilidad de los recuentos

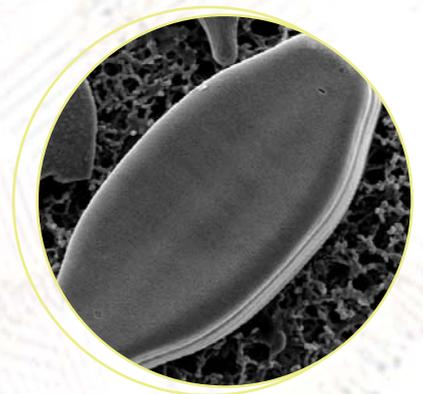
8.4. DIRECTRICES PARA ASEGURAR LA CALIDAD EN EL TRATAMIENTO DE DATOS

Objetivo: Control del manejo de datos y análisis de los resultados	
Medidas	<ul style="list-style-type: none"> Todos los datos de un muestreo específico se deben identificar de forma individual, en la base de datos por medio de códigos.
	<ul style="list-style-type: none"> La documentación de campo y laboratorio (muestras, estadillos, fotos) se guardará durante un periodo no inferior a 5-6 años.
	<ul style="list-style-type: none"> Los datos en formato electrónico deberán incluir identificación de su origen (autores, fechas, etc...) y referencias para ampliar la información. Los inventarios y recuentos de laboratorio se introducirán en bases de datos y/o ficheros electrónicos y otro operario revisará que no existen errores de transcripción.

Tabla 2.5.: Control del manejo de datos y análisis de los resultados



Bibliografía:



9. BIBLIOGRAFÍA

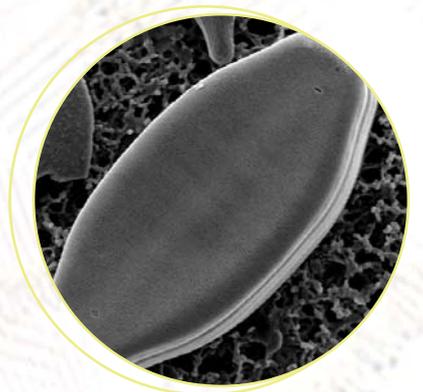
- **AENOR** (2004). Norma española UNE-EN 13946:2004 Calidad del agua. Guía para el muestreo en rutina y el pretratamiento de diatomeas bentónicas de ríos. 20 págs.
- **AENOR** (2005). Norma española UNE-EN 13946:2004 Calidad del agua. Guía para la identificación, recuento e interpretación de muestras de diatomeas bentónicas de ríos. 16 págs.
- **AFNOR** (2002). Qualité de l'eau. Détermination de l'Indice Biologique Diatomées (IBD). Norme Française NF T 90-354, juin 2000. Association Française de Normalisation, Saint-Denis La Plain: 63 pp.
- **Agència Catalana de l'Aigua** (2003). Desenvolupament d'un índex integral de qualitat ecològica i regionalització ambiental dels sistemes lacustres de Catalunya. Centre d'estudis Avançats de Banes (CSIC). 88 págs.
- **Agència Catalana de l'Aigua** (2003). Anàlisi de la viabilitat i proposta d'indicadors fitobentònics de la qualitat de l'aigua per als cursos fluvials de Catalunya. Universitat de Girona (Institut d'Ecologia Aquàtica) y Universitat de Barcelona (Dep. Biología vegetal. Facultat de Biología). 113 págs.
- **Blanco S., Ector L. y E. Bécares** (2004). Epiphytic diatoms as water quality indicators in Spanish shallow lakes. *Vie et Milieu* 54: 71-79.
- **Blanco S., Ector L. y E. Becarés** (2005). Muestreo de fitobentos en ríos, lagos y humedales: requisitos y recomendaciones para la Directiva Marco del Agua, con especial enfoque a los trabajos desarrollados sobre diatomeas en la Cuenca del Duero. *Algas* 34 (en prensa).
- **CEMAGREF** (1982). Etude des methods biologiques d'appréciation quantitative de la qualité des eaux. Rapport Q.E. Lyon, Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse-Cemagref, Lyon, 218 pp.
- **CEN. European Committee for Standardization**. 2003 /TC 230. *Water Quality. Guidance for routine sampling and pre-treatment of benthic diatoms from rivers*. EN 13946. 14 pp.
- **CEN. European Committee for Standardization**. February 2004. *Water Quality. Guidance standard for the identification, enumeration, and interpretation of benthic diatom samples from runnings waters*. pr EN 14407.
- **Confederación Hidrográfica del Duero** (2005). Establecimiento de las bases para la aplicación de las diatomeas como indicadores de calidad en la cuenca del río Duero. Estudio de la situación actual de la calidad de las aguas superficiales mediante índices de diatomeas en la cuenca. – Campaña verano 2004 – Informe final conjunto. S. Blanco, V. Huck, O. Monnier, E. Bécares y L. Ector (Universidad de León y Centre de Recherche Public - Gabriel Lippmann, Luxembourg), 49 p. + anexo.
- **Confederación Hidrográfica del Ebro** (2004). 2ª Fase del diseño de la red de diatomeas en la cuenca del Ebro. 2003. J. Goma, J. Cambra (Universidad de Barcelona), V. Huck y L. Ector (Centre de Recherche Public Gabriel Lippmann).
- **Confederación Hidrográfica del Norte** (2005). Diseño de la red de diatomeas de la Cuenca Hidrográfica del Norte. Informe final. R. Ortiz, V. Huck, J. Cambra y L. Ector (Universidad de Barcelona y Centre de Recherche Public - Gabriel Lippmann, Luxembourg), 59 p. + anexos
- **Dell'Uomo A.** (1991). Use of benthic macroalgae for monitoring rivers in Italy. In: Whitton, B.A., Rott, E. y G. Friedrich (eds). Use of Algae for Monitoring Rivers. *Inst. für botanik. Univ. Innsbruck*: 129-137.
- **Dell'Uomo A.** (2004). L'indice diatomico di eutrofizzazione/polluzione (EPI-D) nel monitoraggio delle acque correnti. Linee guida. A.P.A.T., A.R.P.A.T., 101 p.
- **Descy, J.P. y Coste M.** (1990). Utilisation des diatomées benthiques pour l'évaluation de la qualité des eaux courantes. Rapport final. Univ. Namur, CEMAGREF Bordeaux CEE-B. 112 págs.
- **Dodds, W.K., Jones, J.R., y E.B. Welch** (1998). Suggested classification of stream trophic state: Distributions of temperate stream types by chlorophyll, total nitrogen, and phosphorus. *Water Research* 32: 1455-1462.
- **Douterelo I., Perona E. y P. Mateo** (2004). Use of cyanobacteria to assess water quality in runnings waters. *Environmental pollution* 127: 377-384.
- **Ector L. y F. Rimet** (2005). Using bioindicators to assess rivers in Europe: An overview. In S. Lek, M. Scardi, P.F.M. Verdonschot, J.P. Descy y Y.S. Park (eds). Modelling community structure in freshwater ecosystems, Springer Verlag, Berlin Heidelberg: 7-19.
- **European Committee for Standardization** (2003). Water quality - Guidance standard for the routine sampling and pretreatment of benthic diatoms from rivers. European Standard EN 13946. European Committee for Standardization, Brussels, 14 pp.
- **European Committee for Standardization** (2004). Water quality - Guidance standard for the identification, enumeration and interpretation of benthic diatom samples from running waters. European Standard prEN 14407. European Committee for Standardization, Brussels, 12 pp.
- **Gomà J., Ortiz R., Cambra J. y L. Ector** (2004). Water quality evaluation in Catalanian Mediterranean rivers using epilithic diatoms as bioindicators. *Vie et Milieu* 54: 81-90.
- **Gomà J., Rimet F., Cambra J., Hoffmann L. y L. Ector** (2005). Diatom communities and water assessment in mountain rivers of the upper Segre basin (La Cerdanya, Oriental Pyrenees). *Hydrobiologia* 551: 1-17.
- **Kelly, M.G. y B.A. Whitton** (1998). Biological monitoring of eutrophication in rivers. *Hydrobiologia* 384: 55-67.

- ▣ **Kelly M.G., Cazaubon A., Coring E., Dell'Uomo A., Ector L., Goldsmith B., Guasch H., Hürlimann J., Jarlman A., Kawecka B., Kwadrans J., Laugaste R., Lindstrom E.A., Leitao M., Marvan P., Padisák P., Prygiel J., Rott E., Sabater S., van Dam H. y J. Vizinet.** Recommendations for the routine sampling of diatoms for water quality assessments in Europe. *Journal of Applied Phycology* 10: 215-224.
- ▣ **Kelly M.G., C.J. Penny y B.A. Whitton** (1995). Comparative performance of benthic diatom indices used to assess river water quality. *Hydrobiologia* 302: 179-188.
- ▣ **Kitner M. y A. Poulícková** (2003). Littoral diatoms as indicators for eutrophication of shallow lakes. *Hydrobiologia* 506-509: 519-524.
- ▣ **Lange-Bertalot, H.** (1979). Pollution tolerance of diatoms as a criterion for water quality estimation. *Nova Hedwigia* 64: 285-304.
- ▣ **Leclercq, L. y B. Maquet** (1987). Deux nouveaux indices chimique et diatomique de qualité d'eau courante. Application au Samson et ses affluents (Basin de la Meuse Belge). In: Comparaison avec d'autres indices chimiques, biocénétiques et diatomiques. Document de travail n° 38. Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique, Bruxelles, 113 pp.
- ▣ **Lecoite, C., M. Coste y J. Prygiel** (1993). "OMNIDIA": A software for taxonomy, calculation of diatom indices and inventories management. *Hydrobiologia* 269/270: 509-513.
- ▣ **Moliner E. y A. Camacho** (2002). Recomendaciones para la toma de muestras de agua, biota y sedimentos en humedales. Ministerio de Medio Ambiente. Dirección General de Conservación de la Naturaleza.
- ▣ **Parlamento Europeo de la Unión Europea** (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for the Community action in the field of water policy. *Off. J. Eur.Comm.* 327: 1-72.
- ▣ **Prygiel J. y M. Coste** (1998). Progress in the use of diatoms for monitoring rivers in France. In Prygiel J., B.A. Whitton y J. Bukowska (eds). Use of Algae for Monitoring Rivers – III Agence de l'Eau Artois-Picardie, Douai, France. Pp. 165-179.
- ▣ **Prygiel, J., M. Coste y J. Bukowska** (1999). A review of the major diatom based techniques for the quality assessment of rivers – State of the art in Europe. A: Prygiel, J., B. Whitton y J. Bukowska (eds.): Use of algae for monitoring rivers III: Agence de l'Eau Artois-Picardie. Pp 138-144.
- ▣ **Prygiel, J. y 27 autores más** (2002). Determination of the biological diatom index (IBD NF T 90-354): results of an intercomparison exercise. *Journal of Applied Phycology* 14: 27-39.
- ▣ **Rimet F., L Ector, H.M. Cauchie y L. Hoffmann** (2004). Regional distribution of diatoms assemblages in the headwater streams of Luxembourg. *Hydrobiologia* 520: 105-117.
- ▣ **Rimet F., H.M. Cauchie, L. Hoffmann & L. Ector** (2005) Response of diatom indices to simulated water quality improvements in a river. *Journal of Applied Phycology* 17: 119–128.
- ▣ **Rott E., G. Hofmann, K. Pall, P. Pfister y E. Pipp** (1997). Indikationslisten für Aufwuchsalgen in österreichischen Fließgewässern. Teil 1: Saprobielle Indikation Wasserwirtschaftskataster, Bundesministerium f. Land- u. Forstwirtschaft, Wien, 73 pp.
- ▣ **Rott E., E. Pipp, P. Pfister, H. Van Dam, K. Ortler, N. Binder y K. Pall** (1999). Indikationslisten für Aufwuchsalgen in österreichischen Fließgewässern. Teil 2: Trophieindikation (sowie geochemische Präferenzen, taxonomische und toxikologische Anmerkungen). -Wasser-wirtschaftskataster herausgegeben vom Bundesministerium f. Land- u. Forstwirtschaft, Wien, 248 pp.
- ▣ **Rott E., E. Pipp, P. Pfister** (2003). Diatom methods developed for river quality assessment in Austria and a cross-check against numerical trophic indication methods used in Europe. *Algol. Stud.* 110: 91-115.
- ▣ **Sabater S.** (2000). Diatom communities as indicators of environmental stress in the Guadimar River, S.W Spain following a major mine tailings spill. *Journal of Applied Phycology* 12: 113-124.
- ▣ **Seele J., M. Mayr, F. Staab y U. Raeder** (2000). Combination of two indication systems in pre-alpine lakes – diatom index and macrophyte index. *Ecological Modelling* 130: 145 –149.
- ▣ **Sládeček, V.** (1973). System of water quality from biological point of view. Archiv für Hydrobiologie Beihefte. Ergebnisse der Limnologie, 7:1-218.
- ▣ **Sládeček, V. y A. Sládečkova** (1996). Atlas of aquatic organisms with respect to the water supply, surface water and wastewater treatment plants. Praga. 351 pp.
- ▣ **Trobajo, R., Quintana, X. D. y S. Sabater** (2004). Factors affecting the periphytic diatom community in Mediterranean coastal wetlands (Empordà wetlands, NE Spain). *Archiv für Hydrobiologie* 160(3): 375-399.
- ▣ **Van Dam, H., A. Mertens y J. Sinkeldam** (1994). A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from the Netherlands. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology* 28: 117-133.
- ▣ **Wegl, R.** (1983). Index für die limnosaprobität. *Wasser und Abwasser* 26: 1-175.
- ▣ **Whitton B.A., E. Rott y G. Friedrich** (1991). Use of algae for monitoring rivers. Proceedings of an International Symposium at Landesamt für Wasser und Abfall Nordrhein-Westfalen. Düsseldorf, Germany, 26-28 May 1991.
- ▣ **Whitton B.A. y E. Rott** (1996). Use of Algae for Monitoring Rivers II. Proceedings of the 2nd European Workshop, Innsbruck, 1995. Universität Innsbruck. 196 pp.
- ▣ **Zelinka, M. y P. Marvan** (1961). Zur Präzisierung der biologischen Klassifikation der Reinheit fließender Gewässer. *Archiv für Hydrobiologie* 57: 389 –407



Apéndice 1:

■ Hoja de campo para el muestreo de diatomeas bentónicas





MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE
 CONFEDERACIÓN HIDROGRÁFICA DEL EBRO

HOJA DE MUESTREO DE FITOPLANCTON

Nº ESTACIÓN:	
CÓDIGO MASA AGUA:	
TIPO:	
UTM:	

RÍO:	
LOCALIDAD:	
TÉCNICO:	
FECHA:	
HORA:	

ANCHO APROX. (m):

PROFUNDIDAD APROX. (cm):

CARACTERÍSTICAS HIDROMORFOLÓGICAS:

VELOCIDAD DE LA CORRIENTE: <input type="checkbox"/> MUY RÁPIDA <input type="checkbox"/> RÁPIDA <input type="checkbox"/> LENTA <input type="checkbox"/> AGUA ESTANCADA	TIPO CAUCE: <input type="checkbox"/> RECTO <input type="checkbox"/> CURVADO <input type="checkbox"/> SINUOSO <input type="checkbox"/> MEANDRIFORME <input type="checkbox"/> ANASTOMOSADO <input type="checkbox"/> OTROS
VEGETACIÓN ACUÁTICA <input type="checkbox"/> AUSENTE <input type="checkbox"/> PRESENTE: <input type="checkbox"/> < 10% <input type="checkbox"/> 10-50% <input type="checkbox"/> > 50%	PORCENTAJE DE SOMBRA EN EL CAUCE: <input type="checkbox"/> SOMBREADO CON VENTANAS <input type="checkbox"/> TOTALMENTE EN SOMBRA <input type="checkbox"/> GRANDES CLAROS O EXPUESTO
TIPO DE SUBSTRATO (dominancia de): <input type="checkbox"/> ROCAS <input type="checkbox"/> ROCAS CON PRESENCIA DE CANTOS RODADOS <input type="checkbox"/> CANTOS RODADOS CON ALGUNAS ROCAS <input type="checkbox"/> CANTOS RODADOS <input type="checkbox"/> CANTOS RODADOS Y ARENA GRUESA <input type="checkbox"/> CANTOS RODADOS PEQUEÑOS Y ARENA FINA <input type="checkbox"/> ARENA GRUESA <input type="checkbox"/> ARENA FINA <input type="checkbox"/> LIMOS <input type="checkbox"/> MACRÓFITOS O ALGAS FILAMENTOSAS <input type="checkbox"/> OTROS:	ESQUEMA DEL TRAMO:

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS:

TRANSPARENCIA DEL AGUA

fondo visible algo turbio
 poco visible no visible

TEMPERATURA DEL AGUA (°C):

pH (unidades):

CONDUCTIVIDAD (µS/cm):

OXÍGENO DISUELTO: mg/l
 %sat

USO DEL ENTORNO

agrícola ganadero industrial recreativo urbano servicios
 ninguno

IMPACTOS

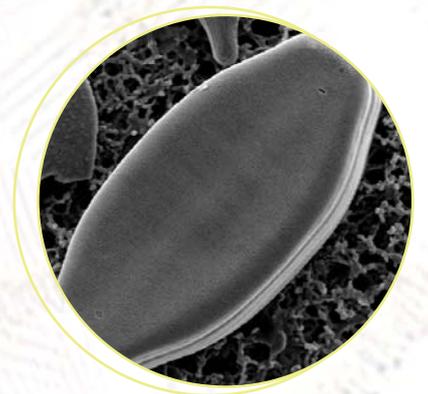
puente pantano azud aforo canal dique
 áridos vertidos dragados otros:

COMENTARIOS



Apéndice 2:

■ Método de limpieza de diatomeas bentónicas



Existen diferentes métodos para limpiar diatomeas, todos ellos especificados en la literatura y perfectamente adecuados para los estudios de calidad del agua. A continuación se detalla el método recomendado.

Método con peróxido de hidrógeno caliente

Aparatos:

- Campana extractora o sistema equivalente.
- Placa calefactora, baño de arena o baño de agua.
- Vasos de precipitados o tubos de ebullición (uno por muestra).
- Medios para medir volúmenes de 20 ml de agentes oxidantes.
- Pipetas Pasteur limpias.
- Centrifugadora (opcional).
- Tubos de centrifuga. Estos tubos deberían ser resistentes al ataque de agentes oxidantes o ácidos utilizados para limpiar las diatomeas.

Nota. Si no se dispone de centrifugadora, las muestras se pueden dejar sedimentar, después el sobrenadante se puede eliminar con cuidado.

Reactivos:

- Solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% (100 volúmenes).
- Ácido clorhídrico diluido (p.ej. 1M) (HCl).

Método:

- Homogenizar la muestra agitando y transferir entre 5 ml y 10 ml de suspensión a un vaso de precipitados o a un tubo de ebullición.
- Añadir aproximadamente 20 ml de peróxido de hidrógeno y calentar en una placa calefactora, baño de arena o baño de agua a aproximadamente $90 (\pm 5)^\circ C$ hasta que toda la materia orgánica se halla oxidado (normalmente unas 3 horas). En las muestras de macrófitos, los restos del material de las plantas, se pueden quitar después de 30 minutos. Se ha de ir con cuidado al añadir el peróxido de hidrógeno en las muestras ricas de materia orgánica y plantas acuáticas, y también durante el proceso de calentamiento.
- Quitar el vaso de precipitados o el tubo de ebullición del calor.
- Añadir unas cuantas gotas de ácido clorhídrico para eliminar el carbonato cálcico.
- Limpiar con agua destilada o desmineralizada.
- Dejar enfriar en una campana de humos.
- Nota: No es necesario añadir ácido clorhídrico si la muestra proviene de una región donde es improbable que se encuentren carbonatos presentes.
- Transferir el contenido del vaso de precipitados o del tubo de ebullición a un tubo de centrifuga. Llenar hasta arriba con agua destilada o desmineralizada y centrifugar. (Ver nota para los detalles de centrifugación en el apartado 1.6.4.1).
- Decantar el sobrenadante y resuspender el *pellet* con agua destilada o desmineralizada y repetir la centrifugación.
- El proceso de limpieza de debería de repetir como mínimo 3 veces, o hasta que todas las trazas de peróxido de hidrógeno se hallan eliminado.
- Cuando todas las trazas de peróxido de hidrógeno y ácido se hallan eliminado, resuspender el *pellet* de diatomeas en una pequeña cantidad de agua destilada o desmineralizada y lo transferimos a un vial limpio y pequeño.
- Añadir unas gotas al 4% de formaldehído o etanol par prevenir el crecimiento de hongos.
- La muestra, entonces, se puede almacenar de forma indefinida.



Capítulo 3:

■ Protocolos de muestreo y análisis para macrófitos



Parte 1:
Generalidades



1. DEFINICIONES

El término *fitobentos* se aplica a los vegetales que viven asociados a cualquier sustrato sólido en los ecosistemas acuáticos. El término *macrófito* se refiere a las plantas acuáticas visibles a simple vista, entre las que se encuentran plantas vasculares (cormófitos), *briófitos*, macroalgas (algas caráceas y de otros grupos) y cianobacterias.

El término hidrófito describe a las plantas acuáticas en sentido estricto, es decir aquellas que completan su ciclo biológico cuando todas sus partes se encuentran sumergidas o flotando en la superficie (Cirujano y Medina, 2002). Por el contrario los *helófitos* son plantas anfíbias con la parte inferior sumergida en el agua.

Este documento está dedicado a los macrófitos de aguas corrientes y de lagos, especialmente a los hidrófitos, y tiene como objetivo identificar y proponer métricas para el establecimiento del estado ecológico de las aguas fluyentes y estancadas de la cuenca del Ebro, en aplicación de la Directiva 2000/60/CE, y especificar las directrices metodológicas para el muestreo y análisis de las muestras de los indicadores.



Fotografía 3.1.: Lemna sobre pies de *Myriophyllum* y *Ceratophyllum* (Propiedad de URS)



Fotografía 3.2.: Lemna sobre pies de *Myriophyllum* y *Ceratophyllum* (Propiedad de URS)

2. VALOR INDICADOR DE LOS MACRÓFITOS

El uso de los macrófitos como indicadores del estado ecológico está claramente señalado en la DMA, y procede de experiencias realizadas, en Europa, en el marco de la vigilancia de la calidad de las aguas en aplicación de otras Directivas europeas: Directiva de tratamiento de aguas urbanas residuales (91/271/EEC), Directiva de nitratos (91/676/EEC), y de normativas de diferentes países. En los EE.UU. los macrófitos se usan como indicadores de forma habitual y existen procedimientos estandarizados para el muestreo y procesado de muestras (*Environmental Protection Agency*).

En España, las experiencias con indicadores basados en macrófitos (especialmente en hidrófitos) se limitan en muchos casos al ámbito de la investigación, y éstos todavía no se han incluido en las redes de control de calidad gestionadas por la Administración.

En el marco de la aplicación de la DMA, los macrófitos se consideran útiles para la detección y seguimiento de las presiones físicoquímicas que produzcan:

- Reducción de la transparencia del agua.
- Variación de la mineralización (conductividad y salinidad).
- Eutrofia

Los macrófitos también son sensibles a las presiones hidromorfológicas que produzcan:

- Variaciones del régimen de caudal, continuidad del río y características morfológicas del lecho en ríos.
- Variación del nivel del agua en lagos o cambios en la duración del periodo de inundación en humedales.
- Variación de las características morfológicas del vaso en lagos.

En el análisis del valor indicador de los macrófitos hay que tener en cuenta los siguientes aspectos:

Hidrófitos (macroalgas, briófitos y cormófitos)

- Son sensibles a los cambios de calidad fisicoquímica (nutrientes, mineralización, temperatura, transparencia), al igual que las microalgas; no obstante a diferencia de éstas tienen un tiempo de respuesta mayor, o sea que son indicadores de cambios a medio y largo plazo (las microalgas son indicadoras a corto plazo). La comunidad de hidrófitos presente en una estación refleja las condiciones de calidad existentes durante los últimos meses o incluso años. La desaparición de una especie de un sistema acuático (especialmente las de pequeño tamaño) puede ser altamente significativo.
- Reflejan las alteraciones hidromorfológicas relacionadas con la estabilización del caudal en los ríos. La respuesta suele ser el aumento de la cobertura de las especies.
- No todos los hidrófitos tienen el mismo valor indicador. El nivel taxonómico de especie es esencial para poder utilizarlos como indicadores. Su utilidad a nivel de género queda reducida al valor de presencia o ausencia.
- El valor indicador de la abundancia (biomasa) está influido por variaciones anuales e interanuales, luego su uso como indicador del estado ecológico está limitado y en todo caso debe acotarse dentro de cada tipo de masa de agua, y analizarse para un periodo de tiempo de varios años.

Helófitos

Son buenos indicadores de la estructura de las riberas fluviales y lacustres, y también son sensibles a cambios en la calidad del agua (mineralización y nutrientes) aunque de forma menos acusada que los hidrófitos.

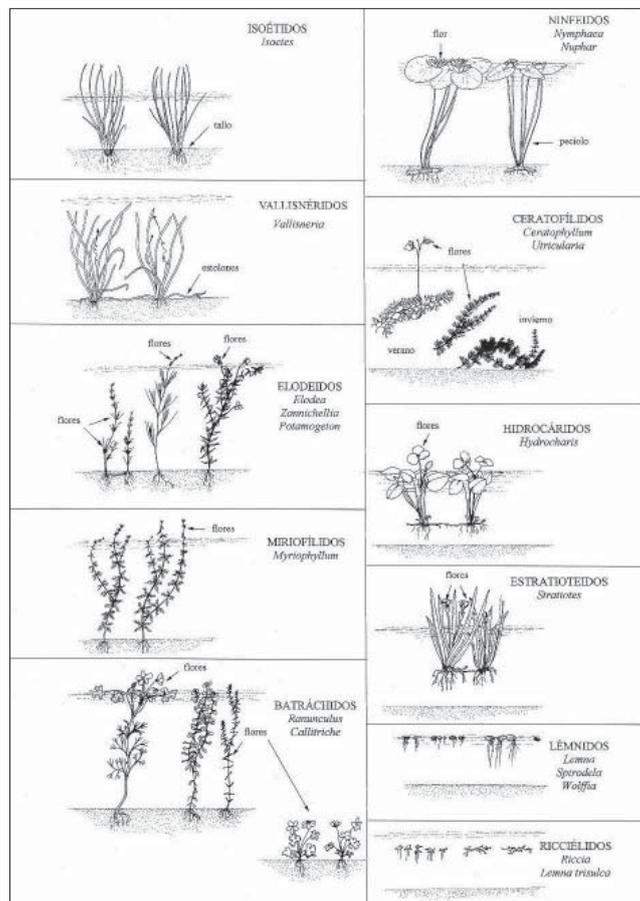


Figura 3.1.: Tipos de hidrófitos (según Den Hartog y Segal, 1964; in Cirujano y Medina, 2002)

3. SISTEMAS INDICADORES EXISTENTES

Se ha realizado una revisión de los sistemas indicadores basados en macrófitos recogidos en la bibliografía. Se han identificado algunos métodos e índices que pueden ser de utilidad para el desarrollo de una metodología a usar en la cuenca del Ebro. Esta información se presenta resumida en las tablas 3.1 (ríos) y 3.2 (lagos).

Índice / Método	Autores	Descripción	Método de evaluación												
Índice de macrófitos (IM) de ríos de la cuenca del Segura	M.L.Suarez, A.Mellado, M.M. Sánchez-Montoya y MR Vidal-Abarca (en prensa)	<ul style="list-style-type: none"> • Índice aditivo que tiene en cuenta el valor indicador de los taxones, grupos o formaciones consideradas, la diversidad funcional-morfológica de los macrófitos y su abundancia (<5%, 5-50%, y >50%). • No requiere la determinación de la especie sino que incluye géneros y formaciones vegetales (musgos, hepáticas, Caráceas, clorofíceas filamentosas, etc...) • Existe un protocolo de aplicación. 	Se han establecido 5 clases de calidad a juicio de experto y de acuerdo con los características observadas en la cuenca del río Segura.												
Índice Biológico de macrófitos en ríos IBMR	AFNOR, 2003	<p>La aplicación del índice requiere la determinación "in situ" de los macrófitos en un tramo fluvial y la estima de su recubrimiento usando una escala de 1 a 5 (Ki). Los taxones recogidos se caracterizan según su valor indicador respecto a la eutrofia (Csi, varía de 1 a 20) y su grado de estenoicidad (sensibilidad) (Ei entre 1 y 3). Estos valores están determinados para las especies más comunes. La puntuación del IBMR se obtiene a partir de la siguiente fórmula:</p> $IBMR = \frac{\sum_{i=1}^n Ei \times Ki \times Csi}{\sum_{i=1}^n Ei \times Ki}$ <p>El manual de aplicación del IBMR presenta los Csi y Ei para 207 especies de macrófitos (bacterias, algas, líquenes, hepáticas, musgos, pteridófitos y fanerógamas); la mayoría son hidrófilos aunque también hay helófitos..</p>	<p>El IBMR se aplica en Francia y permite determinar el nivel trófico del tramo fluvial. Las puntuaciones del índice se agrupan en las siguientes cinco clases de calidad:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Nivel trófico</th> <th>Valor IBMR</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Muy bajo</td> <td>IBMR >14</td> </tr> <tr> <td>Bajo</td> <td>12 < IBMR ≤ 14</td> </tr> <tr> <td>Medio</td> <td>10 < IBMR ≤ 12</td> </tr> <tr> <td>Elevado</td> <td>8 < IBMR ≤ 10</td> </tr> <tr> <td>Muy elevado</td> <td>IBMR ≤ 8</td> </tr> </tbody> </table>	Nivel trófico	Valor IBMR	Muy bajo	IBMR >14	Bajo	12 < IBMR ≤ 14	Medio	10 < IBMR ≤ 12	Elevado	8 < IBMR ≤ 10	Muy elevado	IBMR ≤ 8
Nivel trófico	Valor IBMR														
Muy bajo	IBMR >14														
Bajo	12 < IBMR ≤ 14														
Medio	10 < IBMR ≤ 12														
Elevado	8 < IBMR ≤ 10														
Muy elevado	IBMR ≤ 8														
Índice de eutrofización / Polución (E/P-I)	Dell'Uomo, 1991	Basado en macroalgas, valora la calidad del agua de forma general.	<p>Se ha aplicado en ríos de Cataluña (Ter y Francolí) (ACA, 2003). Se han usado los siguientes rangos de calidad:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Muy buena (0 – 1) • Buena (1 – 1,5) • Aceptable (1,5 –2) • Mala (2 – 2,5) • Muy Mala (2,5 – 4) 												
Índice SLA Índice SAP	Sládecek y Sladeckova, 1996 Wegl, 1983	<p>Índices para macroalgas basados en el sistema de los Saprobios. Su fórmula se basa en la expresión de Zelinka y Marvan (1961):</p> $\tilde{ndice} = \sum aj sj vj \div aj sj$ <p>a = abundancia relativa (1 a 5) s = valor de sensibilidad frente al grado de perturbación (1 a 4) v = valor indicador de la especie (1 a 5)</p>	<p>Estos índices se han aplicado en ríos de Cataluña (Ter y Francolí) con resultados prometedores. Para estos ríos se han usado los siguientes rangos de calidad (ACA 2003):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Muy buena (0 – 1,39) • Buena (1,4 – 1,7) • Aceptable (1,71 –2,1) • Mala (2,11 – 2,5) • Muy Mala (>2,51) <p>Se observan desviaciones cuando el número de especies es bajo.</p>												

Índice / Método	Autores	Descripción	Método de evaluación
Trophic Index of Macrophytes (TIM)	S. Schneider y A. Melzer. 2003	<ul style="list-style-type: none"> Su cálculo se basa en la fórmula del índice de Saprobios de Zelinka y Marvan (1961). $TIM = \sum IV_a W_a Q_a \div \sum W_a Q_a$ <p>IV_a = Valor indicador de la especie a. W_a = Sensibilidad (tolerancia) de la especie a Q_a = Cantidad de la especie a en la sección fluvial</p> <ul style="list-style-type: none"> El valor indicador de las especies respecto a la trofia está basado en los resultados del análisis de fósforo reactivo en el agua próxima al macrófito y del agua del sedimento. Presentan valores indicadores para 49 especies de macrófitos sumergidos. Existe procedimiento de muestreo. 	Los valores de TIM varían entre 1 y 4 y se diferencian 7 categorías tróficas. <ul style="list-style-type: none"> oligotrófico (1 - <1,45) oligo-mesotrófico (1,45 - <1,87) mesotrófico (1,87 - <2,25) meso-eutrófico (2,25 - <2,63) eutrófico (2,63 - <3,05) eu-politrófico (3,05 - <3,5) politrófico (3,5 - 4)
Mean Trophic Rank, (MTR)	Holmes, 1995; Holmes 1996; Newman et al., 1997	Se identifican todas las especies presentes dentro del agua, en el tramo en estudio, y se determina su cobertura según unas clases de abundancia predefinidas. El índice Mean Trophic Rank (MTR) se calcula según la siguiente expresión: $MTR = [(\sum SCV) \div (\sum CVS)] \times 10$ <p>Donde</p> <ul style="list-style-type: none"> SCV (Species Cover Value) = Cobertura especies según tablas predefinidas. CVS (Cover Value Score) = STR * SCV STR (Species Trophic Rank): valor indicador de la especie (está determinado para 129 especies que incluyen algas, hepáticas, pteridófitos y fanerógamas) Requiere seguir un procedimiento de campo específico.	Se elaboró para su aplicación en Inglaterra con objeto de evaluar el nivel trófico de los ríos, en aplicación de la Directiva de Tratamiento de Residuos urbanos. Los valores de MTR varían entre 10 y 100. Su aplicación en otros países y para evaluar otras presiones que las debidas a vertidos puntuales orgánicos requeriría de experimentación previa.
The Scientific group GIS Index	G. Thiebault, F. Guérol y S. Muller, 2002	Sigue la metodología del índice MTR. Las especies tienen asignado una puntuación según su tolerancia a la eutrofización (mayor puntuación significa menor tolerancia) y además se calcula una puntuación media, que se pondera según la abundancia de las especies. Los valores varían entre 1 (eutrofia baja) y 10 (eutrofia elevada). Se calcula según la siguiente expresión: $\frac{Gis(aq) \text{ presencia}}{\text{ausencia}} = \frac{\sum Csi}{n}$ <p>Csi = puntuación específica especie i n = n° especies</p> $\frac{Gis(aq) \text{ abundance}}{\text{dominance}} = \frac{\sum Adi \times CSi}{\sum Adi}$ <p>Adi = porcentaje de cobertura planta i (escala 1 a 5)</p>	Calculan correlaciones entre los valores del índice y parámetros fisicoquímicos indicadores de eutrofia (nutrientes) y de mineralización (calcio, sulfato, cloruro).

Tabla 3.1.: Métricas y métodos para la determinación del estado ecológico de ríos en base a los macrófitos



Fotografía 3.3.: Chara vulgaris (Propiedad de URS y Red Control)

Índice / Método	Autores	Descripción	Método de evaluación
Método ECOFRAME (lagos someros)	Moss et al. 2003	<ul style="list-style-type: none"> Se evalúa y registra la comunidad vegetal presente en el 10% (aprox.) de la superficie del lago. Se identifican los siguientes indicadores: Tipo de comunidad (ver descripción en Moss et al): Alg: Biomasa baja, comunidades de sustrato rocoso, con musgos, algas filamentosas desmidiaceas y Zygnematales, algas rojas y a veces colonias de cianofitos (Aphanocapsa y Nostoc). Iso: Lagos dominados por Isoétidos. Char: Biomasa media. Dominan carófitos. Sphag: Domina Sphagnum. EIPo: Biomasa elevada, con Elodeidos y otros grupos enraizados acompañados de ninfeidos y carófitos invasores. CanNym: Comunidades extensas de ninfeidos y /o plantas con sistema redicular débil (Ceratophyllum, Lemna). Diversidad calculada respecto a la inspección del 10% de la superficie del lago Abundancia según lo siguiente: <ol style="list-style-type: none"> sin plantas, nada en los rastrillos algunas plantas en los rastrillos plantas presentes pero escasas, algunos rastrillos recogen plantas (hasta 70%, las plantas no interfieren en el movimiento de la barca. plantas abundantes (>70% de los rastrillos con plantas); las plantas interfieren en el movimiento de la barca. 	<ul style="list-style-type: none"> ECOFRAME considera que no se pueden identificar lagos de referencia de los tipos ya que cada ecosistema incluso sin alteración antrópica puede presentar escenarios diferentes. El método usado está basado en la determinación de condiciones de referencia según juicio de experto, a partir de la selección y muestreo de lagos que presumiblemente pueden representar el buen estado ecológico.
Elementos indicadores para la determinación del estado ecológico en humedales del País Vasco . Se usan tres indicadores.	Gobierno Vasco. "Red de seguimiento del estado ecológico de los humedales interiores de la CAPV".	<ul style="list-style-type: none"> Seleccionan carófitos, plantas acuáticas (sumergidas) y helófitos. Para cada humedal se selecciona la comunidad más representativa. Los carófitos han sido el elemento de calidad más usado. 	Comparan la cobertura de la comunidad vegetal seleccionada del tramo a evaluar con la que debería tener en condiciones óptimas (de referencia). Éstas últimas se determinan a partir de los datos obtenidos en las estaciones de referencia o a través de otros métodos indirectos.
		<ul style="list-style-type: none"> Índice de valoración de humedales (Ivh) de Cirujano et al. (1992). 	El estado de referencia se calcula según los datos históricos disponibles en la bibliografía, la comparación con humedales semejantes en otras zonas de la Península Ibérica y el criterio de experto.
		<ul style="list-style-type: none"> Presencia de plantas acuáticas o marginales introducidas. 	Se adjudican los siguientes estados: <ul style="list-style-type: none"> Muy bueno y Bueno: Ausencia de plantas introducidas Moderado: Presencia puntual de plantas introducidas Malo y Muy malo: Presencia extensiva e invasora de plantas introducidas.
Elementos indicadores para la determinación del estado ecológico en lagos de montaña y cársticos de Cataluña	Agencia Catalana de l'Aigua (ACA) – Centre d'Estudis Avançats de Blanes, 2003	<ul style="list-style-type: none"> Número de especies de macrófitos (excluidos musgos, carófitos y helófitos). 	Comparación con los valores de referencia: <ul style="list-style-type: none"> Entre 0 y 3 (en los tipos de lagos de Pirineos). 4 en los lagos cársticos.
		<ul style="list-style-type: none"> Cinturón de vegetación helofítica (sólo lagos cársticos). Se estima el porcentaje de perímetro ocupado. 	Comparación con los valores de referencia: <ul style="list-style-type: none"> 90% del perímetro del lago.
Elementos indicadores para la determinación del estado ecológico en zonas húmedas de Cataluña	Agencia Catalana de l'Aigua (ACA) – Institut d'Ecologia Aquàtica (Universitat de Girona). 2004	<ul style="list-style-type: none"> No se evalúan los macrófitos de forma individual sino como parte del índice ECELS (<i>Índice del estado de conservación de los ecosistemas leníticos someros</i>). En el bloque 5 de ECELS se evalúa la cantidad de vegetación sumergida o flotante con raíz y de vegetación flotante en la superficie; la puntuación final del bloque 5 se modula en función del tipo de vegetación (plantas vasculares, carófitos, algas filamentosas, lenteja de agua, especies alóctonas). 	No existen sistemas de referencia. Se considera condición de referencia el valor máximo del ECELS (≥80).

Tabla 3.2.: Métricas y métodos para la determinación del estado ecológico de lagos y humedales



Fotografía 3.4.: *Potamogeton* (Propiedad de Red Control)

4. PROPUESTA DE MÉTRICAS PARA LA DEMARCACIÓN DEL EBRO

Dentro de la flora acuática, los macrófitos hidrófitos se consideran un elemento de calidad biológica principal para la determinación del estado ecológico de los lagos de la demarcación del Ebro. Para los ríos se han propuesto las microalgas diatomeas como elemento de calidad biológica principal, y los macrófitos se proponen como elementos de calidad biológica complementarios.

Existe poca experiencia en el uso de los macrófitos como indicadores de calidad de las aguas españolas y en particular en las de la cuenca del Ebro. El uso de cualquiera de las métricas existentes (ver capítulo 3) o la elaboración de métricas adaptadas a las condiciones específicas de los tipos de masas de agua lacustres y fluviales de la cuenca del Ebro, requerirá de un fase de experimentación.

Procedimiento general de trabajo

Este se esquematiza en la figura adjunta, y comprende las siguientes tareas:

Muestreos iniciales y control de vigilancia

Planificación de los trabajos con el elemento de calidad macrófitos para la demarcación del Ebro

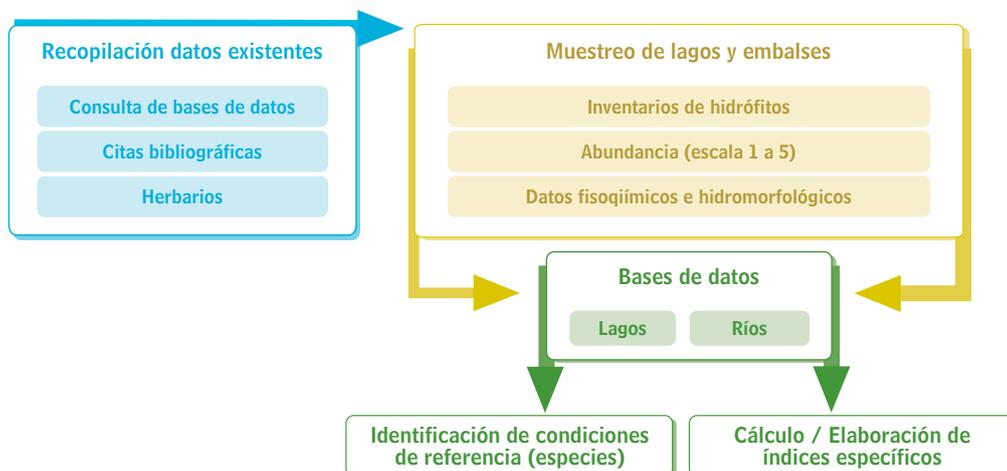


Figura 3.2.: Planificación de los trabajos con el elemento de calidad macrófitos para la demarcación del Ebro

Recopilación de datos existentes

Se recogerá la información existente en bases de datos y en la bibliografía. En la actualidad existen varios proyectos en los que se están elaborando bases de datos con objetivos florísticos y de conservación:

- FICODAT – Base de datos de algas continentales de la Península Ibérica (en el ámbito del proyecto “Flora ibérica de las algas continentales”). Se ha recogido información sobre diatomeas, clorófitos y carófitos. Persona de contacto: Jaume Cambra. Universidad de Barcelona.
- Base de datos del grupo de investigación de Macrófitos Acuáticos del Real Jardín Botánico de Madrid, CSIC. Tiene 40.000 registros de carófitos, plantas vasculares y una parte de helófitos. Persona de contacto: Santos Cirujano. Real Jardín Botánico de Madrid.
- Sociedad Española de Ficología (SEF). Persona de contacto: Marina Aboal. Universidad de Murcia.

Muestreo de lagos (y ríos)

- Se realizarán muestreos en las masas de agua de referencia y en las sometidas a diferentes grados de alteración fisicoquímica e hidromorfológica, con objeto de conocer la composición de los hidrófitos y su abundancia relativa. El procedimiento de muestreo recomendado se presenta en la parte II de este documento y está basado en las directrices CEN para lagos y ríos; no obstante hay que tener en cuenta que la aplicación de índices ya existentes puede requerir procedimientos de muestreo específicos. El número de masas de referencia para cada tipo deberá ser estadísticamente suficiente, así como el esfuerzo de muestreo (nº de transectos en un lago, longitud de tramo fluvial, etc.).
- Se obtendrán datos fisicoquímicos e hidromorfológicos de las estaciones de muestreo que permitan conocer la ecología de las especies de hidrófitos (propuesta en los apartados 7.3 y 8.3).

Análisis y tratamiento de resultados

- Se analizarán los inventarios de las masas de referencia con objeto de identificar:
 - Especies A: Específicas de las masas de agua prístina o no alterada de forma sensible (masas de referencia).
 - Especies B: Aparecen tanto en masas de agua de referencia como en masas de agua con alteración.
 - Especies C: Dominan las masas de agua más alteradas. Pueden ser especies invasoras.

En las masas de referencia el porcentaje de especies A y su abundancia constituirán las condiciones de referencia del tipo. En caso de no existir masas de referencia, las condiciones se determinarán mediante juicio de experto.

Se trabajará con inventarios que posean como mínimo 4 especies. Se realizarán análisis estadísticos y se contrastarán los resultados con expertos.

- Diseño de una base de datos que responda a los requerimientos de la DMA. El tipo de datos a incluir sería:
 - Nombre de la especie
 - Categoría de masa en la que se encuentra: Lago, río, aguas de transición
 - Tipo de la masa (según la tipificación realizado según la DMA)
 - Masa de referencia / No referencia
 - Localización geográfica (coordenadas) (inicio y final de tramo en caso de ríos)
 - Clasificación en función de su abundancia en el tramo fluvial / lago: Se puede usar una escala del tipo 1: rara; 2: ocasional; 3: frecuente; 4 abundante; 5 dominante
 - Datos fisicoquímicos: conductividad y nutrientes
 - Datos hidromorfológicos: profundidad, sustrato, rangos de velocidad del agua, grado de sombra., fluctuación del nivel, etc.
 - Otros datos complementarios (resultados de IHF, QBR, IVF,...).
- Diseño de índices específicos. Con un número suficiente de datos (1.000 inventarios) podría abordarse el diseño de un índice específico para los tipos de masas de aguas.

Dado que la elaboración de índices es un proceso que requerirá un cierto tiempo de trabajo, se recomienda que en la fase inicial de trabajo se usen métricas sencillas como el **número de especies**. Esta opción ha sido adoptada por la Agencia

Catalana del Agua para los lagos de montaña y cársticos de Cataluña (“InMac = nº especies de macrófitos” excluidos los musgos, carófitos y helófitos) (ACA 2003). También pueden usarse índices existentes (ver tablas 3.-1 y 3.2). Entre éstos los siguientes se podrían aplicar fácilmente:

Ríos

- Índice **SLA, SAP** (se han aplicado previamente en ríos de Cataluña) y especialmente el índice IBMR (recomendado por AFNOR).
- Índice **IM** para una caracterización rápida de los tramos fluviales.

Lagos

- Índice I_H (Id.e valoración de humedales): Se ha aplicado en humedales del País Vasco para la determinación del estado ecológico.

The background of the page is a detailed microscopic image of plant tissue, showing various cellular structures and patterns. The cells are arranged in a somewhat regular, grid-like pattern, with some larger, more complex structures interspersed. The colors are primarily light brown and tan, with some darker spots and lines.

Parte 2: ■ Protocolos

En las páginas siguientes se incluye un procedimiento destinado al uso de los macrófitos sumergidos (hidrófitos) como elemento de calidad biológica de lagos y ríos. El objetivo es facilitar la obtención de inventarios comparables que permitan la identificación de las especies de referencia y la determinación del estado ecológico en ríos y lagos de la cuenca del Ebro. No obstante debe advertirse que la aplicación de alguno de los índices existentes en la bibliografía puede requerir procedimientos específicos.



5. INTRODUCCIÓN

El procedimiento está basado en la información obtenida de:

- Documento de trabajo “*Guidance standard for the surveying of macrophytes in lakes- Complementary element*” del Comité técnico CEN/TC 230 Water analysis (2003).
- Norma CEN prEN 14184 “*Guidance standard for the surveying of aquatic macrophytes in running water (2002)*”.
- Información recogida en la reunión de expertos realizada en la CHE, y de la consulta de la bibliografía adjunta.

El procedimiento abarca los siguientes temas:

- Identificación del equipo de muestreo
- Muestreo en lagos
- Muestreo en ríos
- Selección del periodo de muestreo
- Directrices para la cuantificación de los macrófitos
- Conservación y etiquetado de muestras
- Identificación de ejemplares
- Control de la calidad

6. EQUIPOS Y REACTIVOS

6.1. EQUIPOS DE MUESTREO

- Equipo de protección personal
 - Botas o vadeadores de caucho.
 - Guantes de latex (para aguas sospechosas de contaminación)
 - Gafas de sol polarizadas
 - Salvavidas
- Equipo para la recolección de muestras
 - Rastrillo con mango extensible para aguas someras
 - Gancho en corona con cuerda larga para aguas profundas
 - Draga del tipo Van Veen para aguas profundas
 - Caja o cubo con el fondo de vidrio (Aquascope), para facilitar la visión de los crecimientos y sus coberturas
 - Cinta métrica lavable con plomos para marcar transectos
 - Bandejas de plástico blanco
 - Bolsas de plástico herméticas
 - Recipientes de plástico y tubos pequeños de plástico o cristal (para especies pequeñas)
 - Nevera portátil
 - Prensa portátil con pliegos y almohadillas para la conservación en seco de plantas vasculares.
 - Aparato de localización geográfica (GPS)
 - Mapas, con escalas compatibles con el muestreo de macrófitos
 - Bolígrafo o rotulador permanente (o cualquier otro método para etiquetar las muestras). Si se usan etiquetas, estas deben ser resistentes a la humedad
 - Lupa, x10 aumentos
 - Claves de identificación y guías de campo
 - Cámara fotográfica con lentes polarizadas

Instrumentos adicionales para muestreos con embarcación y buceo:

- Barca adecuada para las condiciones locales con el equipo de seguridad apropiado (salvavidas)
- Equipo de buceo

- Cuerdas y boyas para fijar transectos
- Profundímetro o cinta métrica lastrada para medir profundidades
- Cámara fotográfica sumergible

6.2. REACTIVOS FIJADORES

Alternativamente a la conservación de los macrófitos por medio del prensado de los especímenes, pueden usarse reactivos fijadores, lo cual es preferible para los cormófitos de pequeño tamaño y para las macroalgas. Los reactivos fijadores más usuales son:

- Formaldehído (HCHO) al 4% vv. 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).
- Alcohol etílico con glicerina y agua (líquido de Kew modificado) en proporción 65%, 5% y 30%. También puede utilizarse este conservante de forma concentrada eliminando el agua.

7. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO EN LAGOS

7.1. SELECCIÓN DEL PUNTO DE MUESTREO

- Identificar estaciones de muestreo que sean representativas de la diversidad de hábitats existentes y de los posibles impactos humanos debidos a las actividades y/o usos existentes en el lago y en zonas circundantes. Para esto se recomienda examinar fotos aéreas del lago y de su cuenca previamente a la visita.
- La caracterización de los hábitats debe incluir: tipo de sustrato, profundidad, condiciones de iluminación, y tipo de vegetación de ribera.
- En lagos grandes (> 50 ha) habrá que identificar varias estaciones de muestreo, en las que realizar transectos perpendiculares a la orilla. El número de transectos puede estimarse empíricamente o por aproximaciones matemáticas.
- Los transectos podrán ser de anchuras y largos variables pero esto debe estandarizarse lo más posible para la comparación de lagos con las mismas características hidromorfológicas.
- Una vez identificadas las estaciones de muestreo de muestreo se fijará su posición tomando las coordenadas geográficas con un GPS, y referencias topográficas que faciliten su localización posterior.

7.2. DIRECTRICES PARA LA TOMA DE MUESTRAS

- Recorrer la zona a muestrear extrayendo las plantas mediante ganchos y rastrillos. Realizar transectos de orilla a zona profunda, en diferentes puntos del lago (si es extenso) o bien atravesar el lago en dos direcciones (si no es muy extenso). El uso de rastrillos con mango extensible permite muestrear las zonas más profundas.
- Identificar las plantas de "visu" y anotar su abundancia según el método indicado en el apartado 11 (escala de 1 a 5).
- Si se requiere la identificación posterior de la especie, introducir una muestra en una bolsa de plástico hermética y rotular convenientemente.
- El uso de un visor (aqua scope) puede facilitar la observación de la distribución y cobertura de las especies.
- Anotar las coordenadas de inicio y final de cada transecto.

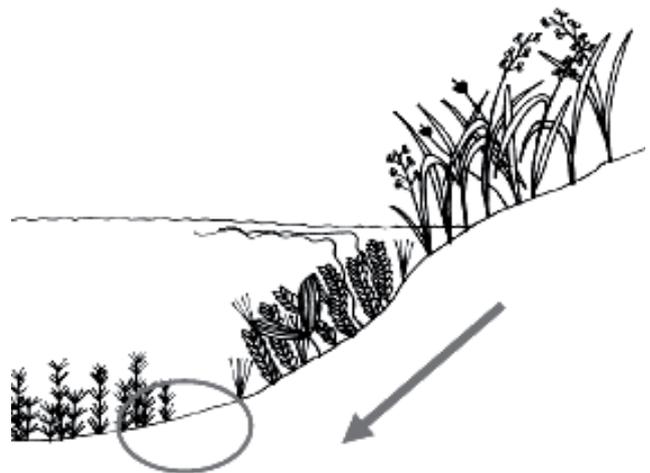


Figura 3.3.: Transectos en lagos vadeables (profundidad < 1.5 m)

Lagos profundos

El muestreo de los macrófitos requiere el uso de embarcaciones o de equipos de buceo. Para el caso de usar embarcación se recomienda lo siguiente:

- Iniciar la navegación en un punto de la orilla (se recomienda marcarlo de alguna forma) y navegar despacio perpendicularmente a la orilla. Cada cierta longitud del transecto (0,5 m o bien cada 2-5 m o >5 m según la escala de trabajo) se tomarán muestras del fondo con ganchos o dragas (varias extracciones), se identificarán las especies “in situ” o bien se conservarán muestras (en bolsas herméticas convenientemente rotuladas) para su determinación en el laboratorio. En cada punto de muestreo, anotar como mínimo la profundidad y si es posible las características del sustrato (muestras con draga). Estimar la abundancia según el método indicado en el apartado 10 (escala de 1 a 5). Repetir este procedimiento hasta completar la longitud del transecto.
- El uso de una cámara subacuática permitirá obtener un mayor detalle en la determinación de la cobertura y distribución de las especies de hidrófitos. Como método complementario, cuando sea posible, se recomienda muestrear con la ayuda de un buzo que realice la toma directa de los ejemplares anotando su cobertura.
- Completar el muestreo recorriendo tramos de orilla a pie para recoger las especies que se encuentran en el límite de las aguas (musgos,...).
- Cada transecto debe identificarse mediante la toma de las coordenadas geográficas con un GPS, al menos al inicio y final de cada uno.

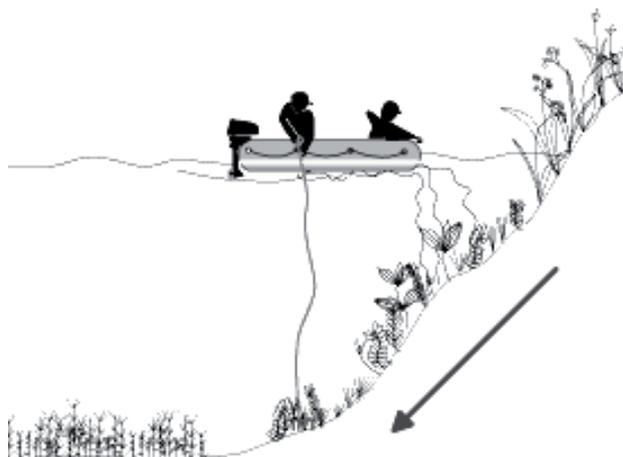


Figura 3.4.: Transectos en lagos profundos

7.3. DATOS Y/O MUESTRAS COMPLEMENTARIOS AL MUESTREO DE LOS MACRÓFITOS EN LAGOS

Se considera recomendable disponer de los siguientes datos tomados en los puntos de muestreo de macrófitos en lagos y zonas húmedas:

Parámetros Hidromorfológicos	Parámetros Físico-químicos
<p>Sustrato: Roca madre; piedras; gravas; arenas; limos</p> <p>Profundidad: < 50 cm; 50-1 m; >1m (lagos someros) o bien anotar la profundidad (lagos profundos).</p> <p>Turbidez:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Determinación cualitativa según una escala: Transparente; algo turbia; turbia; muy turbia. ● Determinación cuantitativa: Profundidad del Disco Secchi y/o nefelómetro. <p>Color del agua: Sin color; azulada; verde; lechosa; marrón; etc.</p> <p>Morfología de las orillas: Pendiente, playas, sinuosidad, etc.</p> <p>Tipo de recubrimiento vegetal de las orillas: Carrizal, juncal, prados, estrato arbóreo, etc.</p> <p>Índice de estructura y conservación del lago: ECELS – Índice de estado de conservación de ecosistemas leníticos someros (opcional). (índice de la Agència Catalana de l’Aigua)</p>	<p>Básicos (control de vigilancia):</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Temperatura del agua ● Conductividad, pH y alcalinidad ● Nutrientes: nitrato, nitrito, amonio, fósforo soluble, fósforo total <p>Complementarios o específicos (controles operacionales)</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Calcio, sulfato, cloruro ● Sólidos en suspensión ● DBO, DQO ● Metales (especialmente cobre y zinc)

Tabla 3.3.: Datos a recopilar en los puntos de muestreo de macrófitos

Toma de muestras de macrofitos mediante rastrillo



Fotografía 3.5.: Toma de muestras de *macrofitos* mediante rastrillo (Propiedad de URS)

8. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO EN RÍOS

8.1. SELECCIÓN DE LA ESTACIÓN DE MUESTREO

- Identificar una estación (tramo) representativa de las condiciones de la masa fluvial. Este tramo debe tener una longitud suficiente para reflejar de forma adecuada la composición florística y abundancia de las especies características del tipo de masa de agua. La longitud del tramo debe establecerse al inicio del muestreo y para los diferentes tipos de ríos, y mantenerlo en todos los muestreos para que los resultados sean comparables.
- Las características del tramo (sustrato, profundidad del agua, grado de sombra, rango de caudal) deberán de ser similares a las que se encuentran en las estaciones las cuales suelen modificar la estructura del sustrato, régimen de caudal y grado de sombra; en general estas infraestructuras suelen favorecer el crecimiento de los macrofitos.

8.2. DIRECTRICES PARA LA TOMA DE MUESTRAS

Se recomienda usar un método de muestreo semicuantitativo que permita obtener el listado de las especies más relevantes del tramo, y una estima aproximada de su abundancia en el tramo. De acuerdo con el objetivo del procedimiento, el objetivo de muestreo son los hidrófitos (especies sumergidas); no obstante algunas especies de este grupo pueden encontrarse a veces fuera del agua como es el caso de los musgos.

Ríos vadeables

La toma de muestras se realiza a partir de recorridos de la totalidad del tramo (si la longitud es pequeña - <50 m), en zigzag desde una orilla a la otra. Se van recogiendo los diferentes macrófitos, los cuales se identifican "in situ" o bien se recoge muestra en una bolsa de plástico, vial o prensa para su posterior análisis (ver apartado 12). Asimismo se anota su abundancia considerando una escala de 1 a 5 (ver apartado 10), así como otras características como el tipo de sustrato, profundidad y velocidad del agua (rango), grado de sombra etc. (ver estadillo en Apéndice).



Fotografía 3.6.: (Propiedad de URS)

Si el tramo a analizar tiene una longitud superior a 50 m o bien hay partes profundas, se realizarán varios transectos desde una orilla hacia el centro volviendo otra vez hacia la orilla; en este recorrido se recogerá muestra de los macrófitos (y datos morfológicos del cauce) existentes en un radio de 2 metros por lado del muestreador.

En las zonas profundas y pozas se pueden usar rastrillos con mango telescópico, o ganchos atados en el extremo de una cuerda para extraer las muestras.

Se anotarán las coordenadas geográficas de inicio y final del tramo recorrido mediante un GPS. Se tomará nota de aspectos que ayuden a la repetición del muestreo en posteriores campañas (localización del tramo y de los transectos realizados, muestreo en pozas, etc...).

Ríos profundos

El muestreo en ríos profundos se realizará desde una embarcación, y siguiendo las directrices indicadas para los lagos profundos (ver apartado 7.2).

La navegación puede ser en zigzag, o bien mediante el recorrido de una orilla y posteriormente de la otra. Se extraerán los macrófitos con ganchos atados al extremo de una cuerda y/o dragas cada 1-5 m o bien cada 25-50 metros (dependiendo de la escala de trabajo). Se fijaran los puntos de inicio y final de cada transecto mediante las coordenadas geográficas de un GPS; también es recomendable tomar nota de particularidades de la orilla que permitan la identificación de los puntos en posteriores muestreos (en algunos casos se pueden realizar marcas con pintura).



Fotografía 3.7.: *Potamogeton crispus* (Propiedad de URS)



Fotografía 3.8.: *Potamogeton pectinatus* (Propiedad de URS)



Fotografía 3.9.: *Potamogeton pectinatus* (Propiedad de URS)

8.3. DATOS Y/O MUESTRAS COMPLEMENTARIOS AL MUESTREO DE LOS MACRÓFITOS EN RÍOS

Se considera recomendable disponer de los siguientes datos tomados en los puntos de muestreo de macrofitos:

Parámetros hidromorfológicos	Parámetros fisico-químicos
Sustrato: Roca madre; piedras; gravas; arenas; limos	Básicos (control de vigilancia): <ul style="list-style-type: none"> • Temperatura del agua • Conductividad, pH y alcalinidad • Nutrientes: nitrato, nitrito, amonio, fósforo soluble, fósforo total
Corriente: Alta; media; baja; nula	
Profundidad: < 50 cm; 50-1 m; >1m o bien anotar la profundidad.	Complementarios o específicos (controles operacionales) <ul style="list-style-type: none"> • Calcio, sulfato, cloruro • Sólidos en suspensión • DBO, DQO • Metales (especialmente cobre y zinc)
Anchura del río: medida aproximada.	
Turbidez: <ul style="list-style-type: none"> • Determinación cualitativa según una escala: Transparente; algo turbia; turbia; muy turbia. • Determinación cuantitativa: Profundidad del Disco Secchi y/o nefelómetro. 	
Color del agua: Sin color; azulada; lechosa; marrón; etc.	
Índices de estructura del cauce y de la ribera: En los controles de vigilancia sería deseable la aplicación de los siguientes índices: IHF – Índice de habitat fluvial (Pardo et al., 2002) IVF – Índice de vegetación fluvial (C. Gutierrez – ACA) QBR – Índice de calidad de ribera (Munné et al., 1998)	

Tabla 3.4.: Datos complementarios en el muestreo de macrofitos en ríos

9. SELECCIÓN DEL PERIODO DE MUESTREO Y FRECUENCIA

9.1. PERIODO DE MUESTREO

El muestreo de los macrofitos debe realizarse durante el periodo vegetativo de las especies que suele ser entre primavera y otoño. No obstante el periodo óptimo puede variar con las condiciones climáticas características de cada tipo de masa de agua y con la especie. La recolección de ejemplares inmaduros puede dar origen a errores de identificación.

Para los lagos, los periodos inicialmente recomendados, son:

Lagos de montaña	Agosto - Septiembre
Lagos cársticos	Julio - Agosto-Septiembre - Octubre
Lagos llanura sedimentaria permanentes	Junio - Julio
Lagos llanura sedimentaria temporales	Abril - Mayo - Junio
Lagunas litorales	Mayo - Junio -Julio

Tabla 3.5.: Periodos recomendados para el muestreo de macrofitos en lagos

Los periodos recomendados para los ríos son:

Ríos de alta montaña Ríos de montaña húmeda calcárea	Julio-Agosto-Septiembre
Ríos de montaña mediterránea silíceo Ríos de montaña mediterránea calcárea Ríos mineralizados de baja montaña mineralizada	Junio - Julio
Grandes Ejes en ambiente mediterráneo Ejes mediterráneo-continentales mineralizados Ejes mediterráneo continentales poco mineralizados	Agosto - Septiembre

Tabla 3.6.: Periodos recomendados para el muestreo de macrófitos en ríos

Inicialmente puede realizarse un único muestreo por periodo, no obstante si los recursos lo permiten sería recomendable realizar dos muestreos (al inicio y final del periodo vegetativo de las plantas). Esto permitiría un mejor análisis de la comunidad, teniendo en cuenta que las tasas de crecimiento de las diferentes especies pueden variar a lo largo del periodo vegetativo.

9.2. FRECUENCIA DE MUESTREO EN LOS CONTROLES DE VIGILANCIA Y OPERATIVOS

En los trabajos iniciales de identificación de las condiciones de referencia y del diseño de la red de vigilancia, se recomienda realizar muestreos cada año (entre 2005 y 2007). Posteriormente se recomienda muestrear cada 3 años.

Para la red de control operativo la frecuencia de muestreo podría ser anual o bianual, con dos o tres muestreos por año dependiendo del impacto que se está evaluando.

- Seguimiento de un impacto hidromorfológico: muestreo en aguas altas y aguas bajas (ejemplo: ver los efectos de puntas de caudal sobre crecimientos de macrófitos).
- Seguimiento de eutrofia: muestreo a inicio (primavera) y final (inicio otoño) del periodo vegetativo.

No se requieren frecuencias más cortas de muestreo, teniendo en cuenta que la respuesta de los macrófitos es más lenta que la de otros indicadores como las microalgas.

10. DIRECTRICES PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LOS MACRÓFITOS

La cuantificación de los hidrófitos puede realizarse mediante evaluación visual y por medio de una escala de cinco niveles, que describa la abundancia de cada especie en el área de muestreo. Se propone usar la siguiente escala de coberturas:

Escala	Abundancia de cada especie	Porcentaje de cobertura (%)
	Descriptor	Clase
1	Rara	Individuos aislados
2	Ocasional	1-10%
3	Frecuente	10-50%
4	Abundante	50-70%
5	Muy abundante (dominante)	>70%

Tabla 3.7.: Escala de abundancia de macrófitos

Se utilizará una hoja de campo en la que se anotarán las características de distribución y abundancia de las especies, y su situación en la masa de agua por medio de un esquema.

11. CONSERVACIÓN Y ETIQUETADO DE LAS MUESTRAS

Se recomienda obtener y conservar muestras de las diferentes especies, con la finalidad de asegurar la identificación de las especies y mantener una colección de referencia que podría depositarse en un herbario o institución pública.

11.1. TÉCNICAS DE CONSERVACIÓN

Conservación en el campo

- Se pueden conservar en fresco en bolsas de plástico y dentro de una nevera eléctrica o con hielo.
- En caso de no poder conservarse las muestras en fresco se pueden usar formaldehído, o bien alcohol etílico o líquido de Kew modificado y proceder según una de las dos opciones siguientes:
 - Empapar los ejemplares con un poco de formaldehído 4-5%v/v e introducirlos en bolsas de plástico con cierre hermético.
 - Introducir el ejemplar en una pequeña bolsa de plástico, vial o bote de plástico y añadir el líquido de Kew modificado en cantidad suficiente para que la muestra quede cubierta. Si se utiliza el líquido concentrado se deberá añadir un poco de agua (aproximadamente el 30%) del punto de muestreo.

En todo caso las muestras se deben conservar a oscuras y en lugar fresco durante el traslado al laboratorio para lo cual se utilizará una nevera portátil con hielo.

Conservación permanente

Los métodos de conservación recomendados son:

- En seco para las especies de fanerógamas de mayor tamaño y para los musgos. Colocar el ejemplar entre hojas de periódico o papel secante y prensar durante 3 – 5 días, cambiando los secantes cada dos días hasta que la planta esté lo suficientemente seca. Una vez secas guardar las plantas convenientemente etiquetadas en pliegos de papel blanco.
- En viales herméticos o pequeños botes de plástico herméticos con una solución de formaldehído al 4% o bien líquido de Kew modificado para macroalgas y fanerógamas de pequeño tamaño.
- En caso de realizar preparaciones microscópicas de macroalgas con glicerina, se recomienda conservar éstas selladas con laca.

11.2. ETIQUETADO

Todas las muestras y preparaciones deben estar convenientemente etiquetadas de forma que se identifique un código de la muestra, un código de su procedencia (localización), fecha de recolección, sustratos de los que procede, fijador utilizado y persona o entidad a cargo de la recolección e identificación. El código de la muestra servirá de enlace en la base de datos. Se usará un rotulador resistente al agua.

12. IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS Y TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

La identificación de macroalgas, musgos y cormófitos de pequeño tamaño puede requerir trabajos de laboratorio.

12.1. Equipos de laboratorio

La identificación de los macrófitos puede requerir del siguiente equipo:

- Microscopio estereoscópico.
- Microscopio óptico: equipado con una platina mecánica y objetivos de grandes aumentos y de inmersión.
- Portaobjetos con escala micrométrica: Es una preparación que tiene inscrita una distancia conocida, con divisiones y subdivisiones, para poder calibrar el ocular micrométrico, o cualquier otro aparato de medida.

- Guías de identificación y iconografías: adecuadas al ámbito de estudio.
- Medios para verificar la identificación de las especies de difícil taxonomía: Esto puede hacerse de diversas formas: con dibujos y micro-fotografías de alta resolución; con imágenes de vídeo.

Para eliminar las incrustaciones de carbonatos presentes en determinadas algas es necesario tratar las muestras con un reactivo. Éstos pueden ser los siguientes:

- Ácido acético (ex 1N)
- Ácido clorhídrico diluido (ex 1 M) (HCl)

Para visualizar las estructuras se pueden usar los siguientes colorantes:

- Lugol (detección de la presencia de almidón)
- Azul de metileno (contraste de estructuras aprietales)
- Carmín acético (teñir núcleos de las células)

12.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS MACRÓFITOS

La identificación de los macrófitos es una tarea a realizar por un experto botánico dado que se requiere alcanzar el nivel de especie. Esto es especialmente importante para los lagos en los que la diversificación de los macrófitos es mayor que en las aguas corrientes. En la bibliografía se incluyen los textos generales más importantes que se usan para la identificación de las especies.

En algunos casos se recomienda confirmar la identificación de las especies de taxonomía más difícil mediante consulta con expertos nacionales o internacionales.

12.3. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Los resultados de los muestreos realizados se deberían incluir en una base de datos centralizada diseñada para la cuenca del Ebro, o de ámbito nacional que recoja el marco de trabajo de la DMA (ver información requerida para cada especie en el apartado 4).

Esto facilitará la aplicación de técnicas estadísticas para la identificación de las especies características de los diferentes tipos de ríos y lagos, y el diseño de índices específicos.

Toma de muestras de macrófitos mediante rastrillo



Fotografía 3.10.: *Eichornia crasipes* (Propiedad de URS)



Fotografía 3.11.: *Nuphar luteum* (Propiedad de Red Control)

13. CONTROL DE LA CALIDAD EN EL MUESTREO, TRATAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MACRÓFITOS

13.1. INTRODUCCIÓN

La implementación de la Directiva 2000/60/CE requiere que los métodos que se utilicen en el establecimiento del estado ecológico procedan de metodologías estandarizadas (ISO, CEN, o de organismos nacionales de estandarización), que los laboratorios dispongan de programas de aseguramiento de la calidad (EN ISO 17025) y participen regularmente en ejercicios de intercalibración (*Proficiency testing programmes*).

El muestreo e identificación de los macrófitos como elementos de calidad para la determinación de la DMA debe realizarse siguiendo procedimientos estandarizados y con sistemas de control de la calidad.

En el caso de los macrófitos, la correcta identificación de las especies es un aspecto de gran importancia dado que son éstas las que tienen el mayor grado de indicación, ante las presiones e impactos de origen antrópico.

Todo lo indicado hace necesario la elaboración y aplicación de métodos de control de calidad específicos para las actividades relacionadas con el muestreo e identificación de macrófitos. El grupo CEN TC 230 WG 2 está desarrollando programas para asegurar la calidad en las tareas de implantación de la DMA.

13.2. DIRECTRICES PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD

Las medidas a seguir persiguen garantizar la correcta identificación de las especies, así como la documentación de la toma de muestras y de la evaluación de la abundancia de las especies.

Objetivo: Asegurar la correcta identificación de las especies	
Medidas	Contar con técnicos que posean formación botánica. En la actualidad la formación de este personal se realiza en Universidades y centros de investigación. Sería deseable favorecer la organización de cursos de capacitación.
	Realizar colecciones de las especies recogidas en las estaciones de referencia y estaciones de la red de vigilancia. Es aconsejable guardar al menos un duplicado de los materiales en un herbario o institución pública.
	Aportar documentación fotográfica de las especies y recubrimientos en la masa de agua.

Tabla 3.8.: Asegurar la correcta identificación de las especies de macrófitos

Objetivo: Realizar el trabajo de campo y evaluaciones según los procedimientos estándar previamente definidos.	
Medidas	Preparar una hoja directriz que resuma de forma clara y didáctica las tareas y procedimientos a desarrollar en el trabajo de campo.
	Documentar los trabajos y usar hojas de campo previamente preparadas. Indicar la localización de las zonas / transectos de trabajo (coordenadas GPS y esquema del tramo), las especies encontradas (Nombre o número de muestra), su localización en la masa de agua (profundidad, sustrato, etc...), la abundancia asignada, y demás datos de interés (análisis fisicoquímicos, análisis biológicos, etc...).
	Aportar documentación fotográfica de las masas de agua y de los recubrimientos observados. La comparación de fotos realizadas en diferentes años será de gran ayuda para la identificación de tendencias.

Tabla 3.9.: Realizar el trabajo de campo y evaluaciones según los procedimientos estándar previamente definidos

Objetivo: Control del manejo de datos y análisis de los resultados.	
Medidas	Todos los datos de un muestreo específico se deben identificar de forma individual, en la base de datos por medio de códigos.
	La documentación de campo y laboratorio (muestras, estadillos, fotos) se guardará durante un periodo no inferior a 5-6 años.
	Los datos en formato electrónico deberán incluir identificación de su origen (autores, fechas, etc...) y referencias para ampliar la información.

Tabla 3.10.: Control de manejo de datos y de los análisis de resultados



Bibliografía:



11. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- **AFNOR** (2003). Qualité de l'eau: Détermination de l'indice biologique macrophytique en rivière (IBMR) – NF T 90-395
- **Agència Catalana de l'Aigua** (2001). Índex per a l'avaluació de la qualitat del medi fluvial a partir de la vegetació de ribera (I.V.F.). Autores: Cesar Gutiérrez y Andreu Salvat; Coordinació F. Sabater (Universitat de Barcelona).
- **Agència Catalana de l'Aigua** (2003). Desenvolupament d'un índex integral de qualitat ecològica i regionalització ambiental dels sistemes lacustres de Catalunya. Centre d'estudis Avançats de Banes (CSIC). 88 pàgs.
- **Agència Catalana de l'Aigua** (2003). Anàlisi de la viabilitat i proposta d'indicadors fitobentònics de la qualitat de l'aigua per als cursos fluvials de Catalunya. Universitat de Girona (Institut d'Ecologia Aquàtica) y Universitat de Barcelona (Dep. Biologia vegetal. facultat de Biologia). 113 pàgs.
- **Agència Catalana de l'Aigua** (2004). Caracterització i elaboració d'eines d'establiment de l'estat ecològic de les zones humides de Catalunya. Institut d'Ecologia Aquàtica, Universitat de Girona. 86 pàgs.
- **CEN European Committee for Standardization**. 2002/ TC 230. Water Quality. *Guidance standard for the surveying of aquatic macrophytes in running water*. prEN 14184.
- **CEN European Committee for Standardization**. 2003/ TC 230. Water Quality. *Guidance standard for the surveying of macrophytes in lakes – Complementary element* (documento de trabajo).
- **Cirujano S., M. Velayos, F. Castillo y M. Gil** (1992). Criterios botánicos para la valoración de las lagunas y humedales españoles (Península Ibérica y las Islas Baleares). Colección Técnica, ICONA.
- **Cirujano S. y L. Medina** (2002). Plantas acuáticas de las lagunas y humedales de Castilla – La Mancha. Real Jardín Botánico, CSIC – Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. Madrid. 340 pàgs.
- **Dell'Uomo A.** (1991). Use of benthic macroalgae for monitoring rivers in Italy. In: Whitton, B.A., Rott, E. y G. Friedrich (eds). Use of Algae for Monitoring Rivers. *Inst. für botanik. Univ. Innsbruck*: 129-137.
- **Holmes N.** (1995). Macrophytes for Water and other Quality Assessments. Report to the National Rivers Authority. Anglian Region. National Rivers Authority, Peterborough, UK, 47 pp.
- **Hauray J., Peltre M. C., Muller S., Thiébaud G., Tremolieres M., Demars B., Barbe J., Dutatre A., Daniel H., Bernez I., Guerlesquin M. y E. Lambert** (2000). Les macrophytes aquatiques bioindicateurs de systèmes lotiques –Intérêts et limites des indices macrophytiques. Synthèse bibliographique des principales approches européennes pour le diagnostic biologique des cours d'eau - UMR INRA-ENESA EQHC Rennes & CREUM-Phytoécologie Univ. Metz, Agence de l'Eau, Artois-Picardie: 101pp.+ ann.
- **Hauray J., Peltre M.C., Muller S., Trémolières M., Barbe J., Dutatre A. y M. Guerlesquin** (1996). Des indices macrophytiques pour estimer la qualité des cours d'eau français: premières propositions - *Écologie*, 27 (4): 233-244.
- **Moss B et al. (y 48 autores más)** (2003). The determination of ecological status in shallow lakes – a tested system (ECOFRAME) for implementation of the European Water Framework Directive. *Aquatic conservation: marine and freshwater ecosystems*, 13:507-549.
- **Munné A., Solà C. y N. Prat** (1998). QBR: Un índice rápido para la evaluación de la calidad de los ecosistemas de ribera. *Tecnología del Agua*, 175: 20-37.
- **Parlamento Europeo de la Unión Europea** (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for the Community action in the field of water policy. *Off. J. Eur.Comm.* 327: 1-72.
- **Pardo I., Álvarez, M., Casas J., Moreno, J.L., Vivas S., Bonada, N., Alba-Tercedor, J., Jáimez-Cuellar, P., Moyà, G., Prat, N., Robles S., Suárez, M.L., Toro, M. y M.R. Vidal Abarca** (2002). El hábitat de los ríos mediterráneos. Diseño de un índice de diversidad de hábitat. *Limnetica* 21(3-4): 115-133.
- **Schneider S. y A. Melzer** (2003). The Trophic Index of Macrophytes (TIM) – a new tool for indicating the trophic state of running waters. *Internat. Rev. Hydrobiol.* 88(1): 49-67.
- **Seele J., M. Mayr, F. Staab y U. Raeder** (2000). Combination of two indication systems in pre-alpine lakes – diatom index and macrophyte index. *Ecological Modelling* 130: 145 –149.
- **Sládecek, V. y A. Saldeckova** (1996). Atlas of aquatic organisms with respect to the water supply, surface water and wastewater treatment plants. Praga. 351 pp.
- **Suarez M.L., A. Mellado, M.M. Sánchez Montoya y M.R. Vidal Abarca** (en prensa). Propuesta de un índice de macrófitos (IM) para evaluar la calidad ecológica de los ríos de la cuenca del Segura. *Limnetica*.
- **Thiebaut G, F. Guérolod y S. Muller** (2002). Are trophic and diversity indices based on macrophyte communities pertinent tools to monitor water quality?. *Water research* 36: 3602-3610.
- **Wegl, R.** (1983). Index für die limnosaprobität. *Wasser und Abwasser* 26: 1-175.
- **Zelinka, M. y P. Marvan** (1961). Zur Präzisierung der biologischen Klassifikation der Reinheit fließender Gewässer. *Arch. Hydrobiol.* 57: 389 –407.

12. BIBLIOGRAFÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MACRÓFITOS

Algas (general):

- **Bourelly, P** (1966). *Les algues d'eau douce. Initiation a la systematique. Les algues vertes.* Ed. Boubée. 511 pàgs.
- **Bourelly, P** (1970). *Les algues d'eau douce. Initiation a la systematique. Les algues bleues et rouges.* Ed. N. Boubée. 512 pàgs.

Cianobacterias

- **Anagnostidis, K. y J. Komárek** (1988). Modern approach to the classification system of Cyanophytes, 3. Oscillatoriales. *Arch. Hydrobiol. / Algal. Studies* 50:327-472.
- **Desikachary, T.V.** (1959). *Cyanophyta.* ICAR 686 pàgs.
- **Geitler, L.** (1932). Rabenhorst's kryptogamenflora von Deutschland, osterreich und der Schweiz 14, Cyanophyceae. Leipzig..

Xantófitos

- **Ettl, H.** (1978). Xanthophyceae. In: Ettl, H., Gerloff, J., Heyning, H. (eds.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa.* Vol. 3. Ed. G. Fischer. 549 pp.
- **Rieth, A.** (1980). Xanthophyceae-2. In: Ettl, H., Gerloff, J., Heyning, H. (eds.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa.* Vol 4. Ed. G. Fischer. 147 pp.

Clorófitos

- **Comelles, M.** (1985). Clave de identificación de las especies de carófitos de la Península Ibérica. *Asociación Española de Limnología* 1, 35 pàgs.
- **Förster, (1982).** Conjugatophyceae. *Das Phytoplankton des Süßwassers. Die Binnengewässer.* Vol. 3. 322 pp.
- **Hoek, C. van den** (1963). Revision of the european species of *Cladophora.* E.J.Brill Leiden, 248 pp.
- **Komarek, J. y B. Fott** (1983). Chlorophyceae. Chlorococcales: In: Elster, H.J., Ohle, W. (eds.) *Das Phytoplankton des Süßwassers. Die Binnengewässer.* Vol. 7. 1044 pp.
- **Printz, H.** (1964). Die Chaetophorales der Binnengewässer. *Hydrobiologie.*, 24: 1-376.

Rodófitos

- **Starmach, K.** (1977). Rhodophyta. *Flora Slodkowodna Polski.*

Macrófitos (general)

- **Bolós, O de** (1990). *Flora manual dels Països catalans.* Ed. Pòrtic. Barcelona.
- **Casas C., M. Brugués y R.M. Cros** (2001). *Flora dels briòfits dels Països Catalans,* vol 1. Molses. Institut d'Estudis Catalans. Secció de Ciències Biològiques. Barcelona.
- **Castroviejo et al. (Eds.)** (1986-2005). *Flora Ibérica.* Vol. 1,2,3,4,5,6,7,8,10,14 y 21. Real Jardín Botánico. Madrid.
- **Cirujano, S. y L. Medina** (2002). *Plantas acuáticas de las lagunas y humedales de Castilla-La Mancha.* Real Jardín Botánico de Madrid, CSIC-Junta de Castilla-La Mancha. Madrid. 340 pàgs.
- **Comelles, M.** (1985). Clave de investigación de las especies de carófitos de la Península Ibérica. *AEL,* nº 1. 35 pàgs.
- **Moore, J.A.** (1986). *Charophytes of Great Britain and Ireland.* Botanical Society of British Isles nº 5. London. 140 pàgs.
- **Tutin, T.G. et al.** (1964-1980) *Flora Europaea.* Vol. 1,2,3,4, y 5. Cambridge University Press.
- **Valdés, V. et al.** (1987). *Flora Vascular de Andalucía Occidental.* Vol. 1,2 y 3. Ed. Ketres.



Apéndice:

■ Hojas de muestreo de macrófitos (lagos y ríos)





Hoja de campo para macrófitos sumergidos en lagos.

Localidad: _____ Responsable toma: _____
 Lago: _____ Coordenadas UTM: _____ (inicio) _____ Responsable muestreo: _____

Transecto n°: _____ (final)

Punto de medida:	Especies dominantes										Abundancia total	Profundidad (m)	Observaciones (otras medidas)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10				
1														
2														
3														
4														
5														
6														
7														
8														
9														
10														
11														
12														
13														
14														
15														
16														
17														
18														
19														
20														

Lista de especies	1:	3:	5:	7:	9:
	2:	4:	6:	8:	10:

HOJA DE CAMPO PARA MACRÓFITOS DE RÍOS

EL inventario se debe ajustar a lo esperable en cada cuenca

Río:
Localidad:
Subcuenca
Estación

Técnico:
Fecha: Hora:

Fotos (detalle ver detrás):

Anchura:
Profundidad:

	Rara	Ocasional	Frecuente	Abundante	Dominante
Perifiton de DIATOMEAS	1	2	3	4	5
CLORÓFITOS					
<i>Cladophora sp.</i>	1	2	3	4	5
Chaetophorales	1	2	3	4	5
<i>Chara sp.</i>	1	2	3	4	5
Cloroficeas incrustantes	1	2	3	4	5
RODOFICEAS	1	2	3	4	5
Filtros de OSCILATORIAS	1	2	3	4	5
CONJUGADAS	1	2	3	4	5
HEPÁTICAS	1	2	3	4	5
MUSGOS	1	2	3	4	5
PTERIDÓFITOS	1	2	3	4	5
MONOCOTILEDONEAS					
<i>Groenlandia sp.</i>	1	2	3	4	5
<i>Potamogeton crispus</i>	1	2	3	4	5
<i>Potamogeton lucens</i>	1	2	3	4	5
<i>Potamogeton pectinatus</i>	1	2	3	4	5
<i>Potamogeton perfoliatus</i>	1	2	3	4	5
<i>Potamogeton polygonifolius</i>	1	2	3	4	5
<i>Potamogeton sp.</i>	1	2	3	4	5
<i>Zannichelia sp.</i>	1	2	3	4	5
DICOTILEDONEAS					
<i>Callitriche</i>	1	2	3	4	5
<i>Ceratophyllum demersum</i>	1	2	3	4	5
<i>Miriophyllum alternifolium</i>	1	2	3	4	5
<i>Miriophyllum spicatum</i>	1	2	3	4	5
<i>Miriophyllum sp.</i>	1	2	3	4	5
<i>Nasturtium officinale</i>	1	2	3	4	5
<i>Ranunculus</i>	1	2	3	4	5
<i>Veronica anagallis-aquatica</i>	1	2	3	4	5
<i>Veronica beccabunga</i>	1	2	3	4	5
<i>Veronica sp.</i>	1	2	3	4	5
OTROS TAXONES					
	1	2	3	4	5
	1	2	3	4	5
	1	2	3	4	5
	1	2	3	4	5
	1	2	3	4	5

COMENTARIOS:

Responsable de la toma de muestra:
Responsable de la identificación:

Fotos:

Muestra/s tomada/s: Sí No

HOJA DE CAMPO PARA MACRÓFITOS DE RÍOS

ESQUEMA:

Apuntar porcentajes de cobertura de los diferentes taxones

Detalles fotos		<i>La foto muestra</i>
1	Foto nº / Carrete nº / Estación nº	Aguas arriba: Orilla derecha:
		Aguas abajo: Orilla izquierda:
		Coordenadas:
Descripción:		
2	Foto nº / Carrete nº / Estación nº	Aguas arriba: Orilla derecha:
		Aguas abajo: Orilla izquierda:
		Coordenadas:
Descripción:		
3	Foto nº / Carrete nº / Estación nº	Aguas arriba: Orilla derecha:
		Aguas abajo: Orilla izquierda:
		Coordenadas:
Descripción:		
4	Foto nº / Carrete nº / Estación nº	Aguas arriba: Orilla derecha:
		Aguas abajo: Orilla izquierda:
		Coordenadas:
Descripción:		



Capítulo 4:

■ Protocolos de muestreo y análisis para invertebrados bentónicos



Parte 1: Generalidades

La memoria incluye dos protocolos para el muestreo y análisis de muestras de zoobentos de ríos. El protocolo para ríos basado en la aplicación del IBMWP ha sido supervisado por Javier Alba-Tercedor, y el protocolo basado en la evaluación con multimétricos lo ha revisado Isabel Pardo. En ambos casos los expertos han proporcionado información y materiales (fotos, diagramas) para la elaboración de los procedimientos.



1. DEFINICIONES Y OBJETIVOS

El término *zoobentos* se refiere a la fauna de invertebrados que habita los sustratos sumergidos de los medios acuáticos. En el zoobentos se distinguen: *macroinvertebrados* y *microinvertebrados*.

Los macroinvertebrados¹ son los invertebrados de un tamaño relativamente grande (visibles al ojo humano), no muy inferiores de 0,5 mm pero habitualmente mayores de 3 mm. Comprenden principalmente artrópodos (insectos, arácnidos y crustáceos) y dentro de éstos dominan los insectos (en especial sus formas larvarias); también se encuentran oligoquetos, hirudíneos y moluscos (y con menor frecuencia celentéreos, briozoos o platelmintos). Los macroinvertebrados son el grupo dominante en los ríos y también se encuentran en el litoral y fondos de lagos y humedales.

Los microinvertebrados agrupan a los invertebrados de menor tamaño (en general inferior a 1 mm) y forman parte de éstos protozoos, nematodos, rotíferos, cladóceros, ostrácodos, copépodos e hidrácaros. Son especialmente importantes en lagos y humedales.

Este documento está dedicado a los macroinvertebrados bentónicos de aguas corrientes y de lagos, y a los microinvertebrados de lagos y humedales. Su objetivo es identificar y proponer métricas para el establecimiento del estado ecológico de las aguas fluyentes y estancadas de la cuenca del Ebro en aplicación de la Directiva 2000/60/CE, así como establecer las directrices metodológicas para las operaciones de muestreo y análisis.

2. VALOR INDICADOR DE LOS INVERTEBRADOS BENTÓNICOS

Los invertebrados bentónicos (y especialmente los macroinvertebrados) son uno de los grupos biológicos más ampliamente usados como indicadores de calidad del agua. Esto se debe a que integran muchas de las cualidades que se esperan de un indicador. Entre éstas, destaca su elevada diversidad y que estén representados diferentes taxones, con requerimientos ecológicos diferentes relacionados con las características hidromorfológicas (velocidad del agua, sustrato), fisicoquímicas y biológicas del medio acuático. En el ámbito de la aplicación de la DMA, los invertebrados bentónicos se consideran útiles para la detección y seguimiento de los siguientes tipos de presiones:

- **presiones fisicoquímicas** relacionadas con:
 - contaminación térmica
 - cambios en la mineralización del agua
 - contaminación orgánica
 - eutrofización
 - contaminación por metales u otros contaminantes
- **presiones hidromorfológicas** relacionadas con:
 - alteración del régimen de caudal / tasa de renovación
 - alteración de la morfología del lecho fluvial / lacustre

Una ventaja de los macroinvertebrados es que su muestreo es relativamente sencillo al igual que su identificación (sólo se requiere identificar a nivel de familia para algunas métricas). En el caso de los microinvertebrados bentónicos la identificación requiere un mayor esfuerzo (en general hay que determinar las especies).

Los invertebrados bentónicos indican alteraciones a medio y largo plazo, ya que sus especies poseen ciclos de vida entre menos de un mes hasta más de un año. Su valor indicador abarca un ámbito temporal intermedio que complementa el de otros elementos biológicos con tiempos de respuesta más cortos, como el fitobentos, o más largos, como los peces.

3. MÉTRICAS Y MÉTODOS DE EVALUACIÓN BASADOS EN LOS INVERTEBRADOS BENTÓNICOS

Los invertebrados bentónicos forman parte de numerosos sistemas indicadores y métricas desarrollados especialmente en ríos y, en menor medida, en lagos y humedales. En los apartados siguientes se presentan algunos de los métodos de mayor difusión en Europa y en España.

¹ El término "macroinvertebrados" es una abstracción artificial sin implicaciones taxonómicas.

3.1. RÍOS

El uso de los macroinvertebrados bentónicos para la vigilancia de la calidad de los ríos europeos es una práctica habitual desde hace décadas. Desde que se postuló el método de los Saprobios (Kolkwitz y Marson 1902), en el que se clasifican los organismos según su tolerancia a diversos grados de contaminación orgánica, han surgido un buen número de propuestas metodológicas. De éstas, algunas han sido adoptadas por las Agencias del agua de diferentes países europeos para los controles rutinarios de calidad (Hellowell, 1986; Ghetti y Bonazzi, 1981; De Pauw y Vanhoren, 1983; Rosenberg y Resh, 1993).

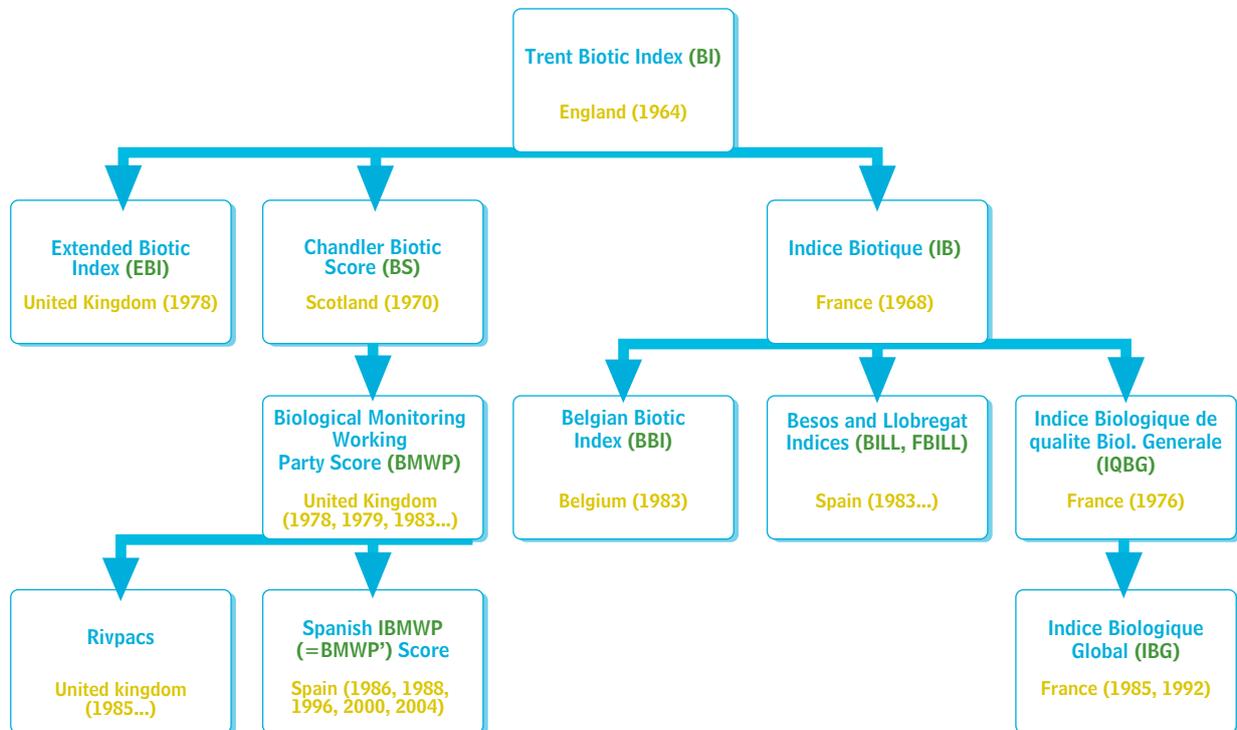
Una línea de trabajo ampliamente seguida ha sido la dirigida a la elaboración de índices bióticos; en otros casos se han analizado aspectos de la estructura de la comunidad de macroinvertebrados, a través de índices de diversidad, y también se han postulado modelos predictivos basados en las relaciones entre los factores medioambientales y la comunidad biológica de los ríos. Las métricas que surgen de estas líneas de trabajo se presentan en los apartados siguientes.

3.1.1. Índices bióticos

Los índices bióticos son herramientas de valoración de la calidad basados en la diferente respuesta de los organismos a las alteraciones del medio (grado de sensibilidad o tolerancia). La mayoría de índices bióticos se han elaborado para usarlos en un área geográfica concreta y, posteriormente, se han adaptado a otras zonas adecuando las listas de taxones y los valores de sensibilidad. En general los índices bióticos precisan muestreos cualitativos o semicuantitativos.

Entre los índices bióticos más utilizados cabe citar los siguientes: **TBI** (*Trent biotic Index*; Woodiwis, 1964); **EBI** (*Extended Biotic Index*) (Woodiwis, 1978); **BS** (*Biotic Score*; Chandler, 1970), **BMWP** (*Biological Monitoring Working Party*) y **ASPT** (*Average Score per Taxon*) (National Water Council, 1981; Armitage *et al*, 1983) desarrollados para los ríos de Gran Bretaña; el índice **VeT** (Verneaux y Tuffery, 1967) para los ríos de Francia; **IBE** (*Índice biótico Estesio*; Ghetti y Bonazzi, 1981; Ghetti, 1997) para los ríos italianos; **BBI** (*Belgian Biotic Index*, De Pauw y Vanhooren, 1983) para los ríos de Bélgica, etc... Un resumen de las principales metodologías, así como sus relaciones puede verse en la siguiente figura:

Desarrollo de los Índices Bioticos mas extendidos en Europa (Basado en Meltcafe, 1989)



Elaboración: J. Alba-Tercedor

Figura 4.1.: Desarrollo de los Índices Bióticos más extendidos en Europa

En España se han diseñado diferentes índices bióticos (Alba-Tercedor y Prat, 1992), entre los que cabe citar el **BILL** y **FBILL**² (Prat et al., 1983, 1986, 2000) para los ríos Besós y Llobregat, y otros ríos catalanes, el **Ib** para el Duero (García de Jalón y González del Tánago, 1986) y el **IBS** para el río Segre (Palau y Palomés, 1986). En 1988, Alba-Tercedor y Sánchez Ortega elaboran el índice **BMWP'** como resultado de la adaptación del índice británico **BMWP** a la fauna ibérica. Este índice es usado de forma extensiva en todo el territorio, y es adoptado como métrica de seguimiento biológico por la mayoría de las Confederaciones Hidrográficas y Agencias del Agua de España y Portugal. El **BMWP'** también se ha nombrado como **SBMWP** y finalmente ha tomado el nombre de **IBMWP** (Iberian Biological Monitoring Working Party) (Alba-Tercedor et al., 2004). Una versión de este índice adaptada a los ríos de Cataluña, usada por la Agencia Catalana del Agua, es el **BMWPC** (Benito de Santos y Puig García, 1999).

3.1.2. Índices de diversidad

La diversidad de la comunidad biológica es función del número de taxones y de la abundancia proporcional de las especies. La diversidad suele disminuir en ambientes alterados como resultado de la disminución del número de taxones y la diferente distribución de la abundancia (unos pocos taxones muy abundantes). Existen diferentes expresiones para medir la diversidad; una de las más utilizadas es el índice de Shannon-Weaver (1963).

$$H' = -\sum p_i \times \ln p_i$$

$$p_i = n_i \div n,$$

$n_i = \text{número individuos especie } i$
 $N = \text{abundancia total}$

Otro índice de interés es el de Margalef (1958):

$$I = S - 1 \div \log_e N$$

$S = \text{nº especies}$
 $N = \text{Nº individuos muestra}$

El uso de los índices de diversidad requiere muestreos cuantitativos y, en general, se aplican a nivel de especie.

3.1.3. Método de clasificación y predicción RIVPACS

El método RIVPACS (*River Invertebrate Prediction and Classification System*) (Wright et al, 1985; 1989) se desarrolló en Gran Bretaña, a partir del estudio de la comunidad de macroinvertebrados existente en ríos inalterados o con ligeras alteraciones, y su correlación con las características medioambientales de la estación. Mediante un programa informático (TWINSPAN) se obtuvieron agrupaciones de especies propias de los diferentes tipos de ríos y mediante análisis estadístico discriminante (MDA) se relacionaron los grupos de especies con las características fisicoquímicas asociadas. El siguiente paso fue usar las características fisicoquímicas de una estación para predecir la composición de la comunidad de macroinvertebrados y la calidad biológica. Con ello se han podido desarrollar modelos que permiten predecir la comunidad de macroinvertebrados de un punto de un río, a partir de los parámetros fisicoquímicos del agua.

En España se han realizado experiencias de aplicación de RIVPACS en ríos de Galicia (Armitage, Pardo et al., 1990) y del levante peninsular (Pujante, Furse et al. 1999). El método puede adaptarse a diferentes grados de predicción, requiriendo estudios taxonómicos a nivel de familia, género o especie según el caso; así se ha aplicado el método usando el nivel de familia en ríos de Galicia con buenos resultados. Lo interesante de su posible aplicación a las cuencas ibéricas fue puesto de manifiesto por Alba-Tercedor y Pujante (2000), y en la actualidad, dentro del proyecto de GUADALMED-2, se está realizando una aproximación predictiva denominada MEDPACS de aplicación a las cuencas mediterráneas españolas.

3.1.4. Método de la EPA (Barbour et al. 1999)

La agencia de medioambiente de los EE.UU. (*EPA, Environmental Protection Agency*) desarrolló unos procedimientos estandarizados para la evaluación de la calidad ecológica de ríos (*Rapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic macroinvertebrates and Fish* de Barbour et al. 1999). Entre éstos el dedicado a los macroinvertebrados bentónicos ha servido de base para el procedimiento de muestreo usado en algunos estudios. La aproximación al muestreo de hábitats múltiples no es un concepto nuevo pero está descrito en el *USEPA Rapid Bioassessment Protocols* (Barbour et al. 1999). El protocolo consiste en un procedimiento de muestreo multi-hábitat estandarizado de tipo semicuantitativo, cuya sensibilidad y precisión ha sido ampliamente contrastado (Barbour, Stribling y Verdonshot, en prensa).

² El índice FBILL (Prat et al., 2000) es una modificación del índice BILL en el que el nivel taxonómico es la familia.

El sistema de evaluación se basa en la combinación de distintas métricas en multimétricos que varían según la eco-región. El procedimiento de evaluación multivariante es el indicado para reducir los errores en la evaluación, y su uso en el ámbito de la DMA es indicado puesto que se basa en unas directrices metodológicas similares.

Este protocolo de muestreo se ha aplicado en distintos estudios realizados para las administraciones públicas en España, para el desarrollo de sistemas de clasificación del estado ecológico, en base al componente de invertebrados bentónicos. Las experiencias se han realizado en: ríos del Norte de España (Confederación Hidrográfica del Norte), ríos de las cuencas internas de la comunidad autónoma gallega (ríos de Galicia-Costa), ríos temporales (Gobierno de las Islas Baleares) y ríos de la cuenca del Duero (Confederación Hidrográfica del Duero).

3.1.5. Método AQEM

El proyecto de la Unión Europea **AQEM** (*Assessment System for the Ecological Quality of Streams and Rivers*) desarrollado entre 2000 y 2002, tuvo como objetivo crear un instrumento de evaluación de la calidad de los ríos europeos basado en los macroinvertebrados bentónicos que cumpliera con los requisitos de la Directiva Marco del Agua. En el proyecto se obtuvieron y analizaron muestras de macroinvertebrados de 28 tipos de ríos europeos, siguiendo un procedimiento de muestreo multi-hábitat estandarizado de tipo semicuantitativo. Se analizaron las características ambientales de los ríos (morfología del río y de la cuenca, condiciones fisicoquímicas) y se evaluaron de forma independiente y para cada tipo de río, diferentes métricas con objeto de identificar las respuestas de éstas a la degradación del tramo fluvial.

Como resultado se obtuvo una lista de 9.557 taxones para los que se dispone de información autoecológica. Un programa informático permite calcular diferentes tipos de métricas basadas en los invertebrados bentónicos, y facilita la aplicación del sistema de evaluación. Éste programa se puede descargar de www.aqem.de.

El sistema de evaluación final comprende cinco clases de estado ecológico:

5= alto, 4 = bueno, 3= moderado, 2= deficiente y 1= malo.

Y además, en muchos casos, se obtiene información de las posibles causas de la degradación del tramo.

Esta metodología es muy interesante, desde el punto de vista conceptual, pero puede resultar algo complicada para su uso en las evaluaciones rutinarias del estado ecológico.

3.2. LAGOS Y HUMEDALES

Los indicadores de calidad biológica basados en los invertebrados bentónicos están menos desarrollados en lagos y humedales. En general se han usado los macroinvertebrados de los fondos (oligoquetos y quironómidos) como indicadores de eutrofia y en particular de las condiciones de oxigenación del hipolimnion. Esto se ha aplicado especialmente a los embalses en los que la comunidad litoral está poco representada debido a la fluctuación del nivel del agua.

En el caso de los lagos, la comunidad litoral se considera más adecuada para la determinación del estado ecológico ya que refleja no solo las presiones relacionadas con la calidad del agua y el estado trófico sino también las presiones hidromorfológicas. Las experiencias existentes en el ámbito de implantación de la DMA, en cuencas próximas a la del Ebro, utilizan métricas sencillas, como el número de taxones en la muestra (número de familias en el País Vasco), número de taxones³ para los lagos del Pirineo (ACA, 2003), o la relación entre las abundancias relativas de diferentes grupos faunísticos, etc.

En el proyecto ECOFRAME⁴ se analiza la comunidad de macroinvertebrados del litoral de los lagos mediante la toma de muestras en tallos sumergidos de macrófitos emergentes y en los sedimentos finos. Los organismos se determinan hasta familia (o grupo en el caso de los Quironómidos) y se realizan recuentos a nivel de grupo (por ejemplo abundancia de oligoquetos y quironómidos, grupos de depredadores y no depredadores, etc.).

Los microcrustáceos y especialmente las asociaciones de branquiópodos (*Chydoridae*) (*assemblages*) pueden ser muy útiles para la determinación del estado ecológico de los lagos, ya que además de ser buenos indicadores dejan restos

³ Los taxones considerados son: Turbellaria, Nematoda, Oligochaeta, Hirudinea, Gasteropoda, Bivalvia, Amphipoda, Odonata, Ephemeroptera, Plecoptera, Heteroptera, Megaloptera, Dytiscidae, Chironomidae y Trichoptera. La métrica usada (IndMacro) alcanza como máximo 15 puntos.

⁴ Moss et al. 2003. The determination of ecological status in shallow lakes – a tested system (ECOFRAME) for implementation of the European Water Framework Directive. *Aquatic Conservation. Marine and Freshwater Ecosystems*, 13: 507-549.

identificables en los sedimentos, lo que permite las reconstrucciones paleolimnológicas tan útiles para el establecimiento de las condiciones de referencia. La utilización de los quidóridos como indicadores cuenta con una experiencia previa realizada en lagos someros de 10 países europeos incluida España (Eyto, *et al.* 2003).

El índice QAELS (*Índex de qualitat de l'aigua d'ecosistemes lenítics soms*) elaborado para la determinación del estado ecológico de los sistemas lagunares someros de Catalunya (ACA, 2004) aúna aspectos de riqueza taxonómica con otros de abundancia. Este índice se compone de dos métricas:

- ACCO basado en la abundancia de cladóceros, copépodos y ostrácodos

$$ACCO = \sum_{i=1}^j ki \times ni \quad ni = Ni \div N_{tot}$$

i = taxones indicadores

j = número de taxones indicadores

ni = abundancia relativa del taxón *i*

Ni = abundancia del taxón *i*

N_{tot} = suma de la abundancia de los taxones indicadores

ki = valor de calidad del taxón *i* (se obtiene del análisis de PCA)

- RIC basado en la riqueza de insectos y crustáceos

RIC = N° géneros de crustáceos + N° géneros de formas adultas de coleópteros y heterópteros + N° familias de larvas y pupas de insectos

El índice **QAELS** responde a la siguiente fórmula:

$$QAELS = (ACCO + 1) \times \log(RIC + 1)$$

Las puntuaciones se han separado en 5 categorías de calidad:

Rangos de la clase de calidad	Significado
QAELS ≥ 8	I : calidad muy buena
6 ≤ QAELS < 8	II: calidad buena
4 ≤ QAELS < 6	III: calidad mediocre
2 ≤ QAELS < 4	IV: calidad deficiente
QAELS < 2	V: calidad mala

Tabla 4.1.: Categorías de calidad del Índice QAELS

La aplicación de estos índices en la cuenca del Ebro, particularmente el ACCO requiere una adaptación ya que muchos de los tipos de masas de agua para los que ha sido concebido son diferentes a los de Cataluña.

4. PROPUESTA DE MÉTRICAS PARA LA DEMARCACIÓN DEL EBRO

Se recoge una propuesta de métricas basadas en los macroinvertebrados bentónicos para los ríos y lagos (en parte), y de métricas de microinvertebrados bentónicos para los lagos.

4.1. RÍOS

Se recogen dos propuestas metodológicas para las que existen experiencias de aplicación en la Península Ibérica. Éstas son:

- Método del índice IBMWP, suscrito por J. Alba-Tercedor e incluido en la propuesta metodológica de GUADALMED.
- Método de evaluación con multimétricos, suscrito por I. Pardo.

Inicialmente no se propone el uso estricto de la metodología AQEM por tratarse de un método para el que no existe ninguna experiencia previa en España.

4.1.1. Método IBMWP (protocolo Guadalmed modificado)

Requiere un muestreo de tipo cualitativo que incluya todas las familias de macroinvertebrados que habiten en el tramo en estudio (ver apartado 5). El índice se obtiene de la suma de las puntuaciones asignadas a las familias que se han identificado en la muestra (ver hoja de cálculo en apéndice). La puntuación total del IBMWP varía entre 0 y >100 (en algunos ríos peninsulares se obtienen máximos superiores a 200 e incluso de 300).

Las puntuaciones del IBMWP se agrupan en cinco clases de calidad que inicialmente se han asimilado a los siguientes niveles del estado ecológico (según GUADALMED; ver Jáimez-Cuéllar *et al.*, 2004):

Estado Ecológico	Calidad	IBMWP
Muy Bueno	Buena. Aguas no contaminadas o no alteradas de modo sensible	≥ 101
Bueno	Aceptable. Son evidentes algunos efectos de contaminación	61 - 100
Aceptable (=Moderado)	Dudosa. Aguas contaminadas	36 - 60
Deficiente	Crítica. Aguas muy contaminadas	16 - 35
Malo	Muy crítica. Aguas fuertemente contaminadas	< 15

Tabla 4.2.: Categorías de calidad del Índice IBMWP

En la cuenca del Ebro se aplica el índice IBMWP en estaciones de la red RCVA (*Red de Control de Variables Ambientales*) desde 1993; y existe una base de datos que recoge toda la información generada (inventario de familias y puntuaciones del IBMWP). Tras el estudio de regionalización realizado por la Oficina de Planificación de la CHE, se reescalaron las puntuaciones del IBMWP para los 6 tipos de ríos identificados (Munné y Prat, 1999).

Reescalado y clases de calidad IBMWP								
Tipos CHE, 1988	M. Húmeda	Grandes Ríos		Depresión	Eje del Ebro	M.Mediterránea		A. montaña
Tipos CEDEX-CHE, 2004	M. húmeda calcárea	Ejes mediterráneo continentales mineralizados	Ejes mediterráneo poco mineralizados	Ríos mineralizados de baja montaña mediterránea	Grandes ejes en ambiente mediterráneo	M. Med. calcárea	M. Med. silíceas	Alta montaña
Por confirmar con resultados de condiciones de referencia								
Muy buena	>100	>65				>90		>110
Buena	81 - 100	56 - 65				71 - 90		86 - 110
Aceptable	61 - 80	41 - 55				55 - 70		66 - 85
Deficiente	31 - 60	20 - 40				25 - 54		35 - 65
Mala	<30	<20				< 25		< 35

Tabla 4.3.: Adaptación de las categorías de calidad del Índice IBMWP ala Confederación Hidrográfica del Ebro

Sin embargo, son necesarios estudios adicionales que confirmen los rangos del IBMWP para los 8 tipos fluviales, finalmente identificados en la demarcación del Ebro, como resultado de la caracterización efectuada, según los criterios de la DMA. Asimismo hay que analizar si las bajas puntuaciones del IBMWP, que se obtienen en los tramos inferiores de los ríos, en general no vadeables y difíciles de muestrear, reflejan la realidad o deficiencias del muestreo.

En la actualidad se está calculando el IBMWP (siguiendo el procedimiento Guadalmed) en tramos fluviales identificados sin riesgo, según el análisis de presiones e impactos, y en otros cuyas condiciones ambientales son buenas (según indicadores de la estación de muestreo), y en los que podrían existir condiciones de referencia.

El procedimiento de muestreo del IBMWP en su origen (cuando se le denominaba BMWP') daba información cualitativa, y su aplicación no tenía en cuenta la abundancia. Como la DMA especifica la "abundancia" como parámetro descriptor de los elementos de calidad (artículo 1.1.1. del Anexo V de la DMA) se propuso realizar recuentos que permitan obtener

la **abundancia relativa** de las familias en la muestra. Esta opción es la adoptada por Guadalmed para el estudio de las muestras procedentes de estaciones de referencia (ver Jáimez-Cuéllar, *et al.*, 2004).

El tiempo estimado para la aplicación del índice IBMWP está generalmente comprendido entre 30' y 1 hora para la toma de la muestra, y de 2-4 horas para su tratamiento. Sin embargo esto depende mucho de las condiciones del tramo a estudiar y de la pericia de los operadores.

En el apartado 6 se presentan los procedimientos de muestreo y tratamiento de la muestra.

4.1.2. Método de evaluación con multimétricos

Este método propuesto por Isabel Pardo esta basado en los procedimientos de muestreo de Barbour *et al* (1999) (ver apartado 3.1.4.) y sigue una metodología de trabajo en laboratorio propia. Se ha usado en trabajos de aplicación de los criterios de la DMA, realizados para la Confederación Hidrográfica del Norte, Comunidad Autónoma de Galicia, Gobierno de las Islas Baleares y Confederación Hidrográfica del Duero. No existen experiencias previas para los ríos de la demarcación del Ebro.

Se basa en un muestreo multihábitat semicuantitativo (20 kicks repartidos proporcionalmente entre los tipos de hábitats más frecuentes del tramo a analizar). La muestra se procesa en el laboratorio hasta el nivel más bajo posible; no obstante también se trabaja a nivel de familia, obteniéndose recuentos de la abundancia de los taxones referida al área de muestreo (20 kicks equivalen a 2,5 m²).

El tiempo estimado para la aplicación del método es de aproximadamente 30 minutos, según la dificultad del tramo, para la toma de la muestra, 2 horas y 30 minutos para la separación y recuento de la muestra por un operador de laboratorio y 2 horas de especialista para la identificación hasta familia.

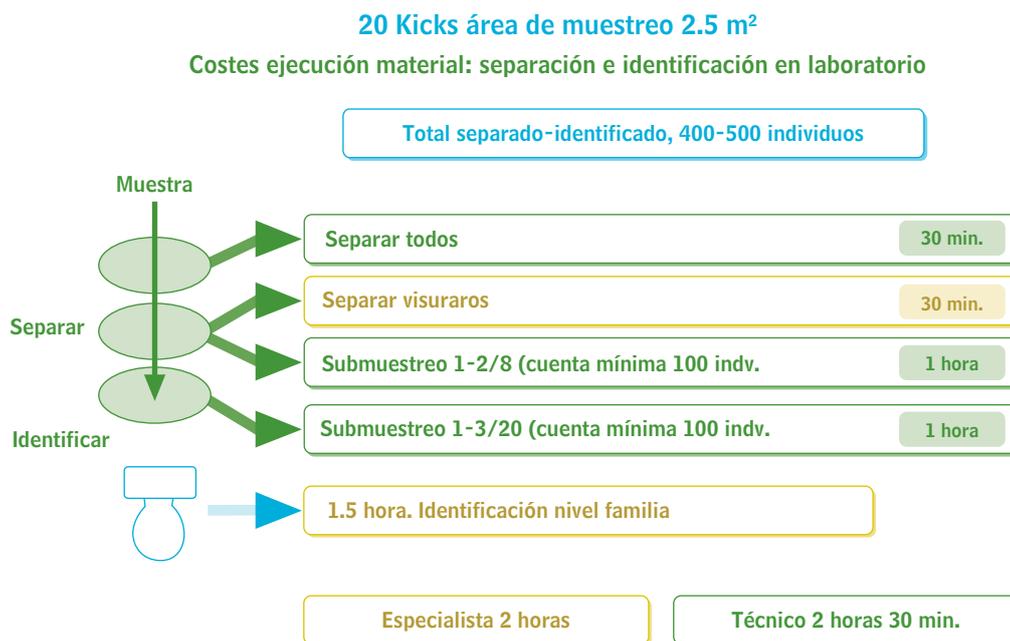


Figura 4.2.: Método de evaluación con multimétricos

Con la matriz de resultados se aplican diferentes métricas usando, en algunos casos el software de AQEM. Se utilizan sólo aquellas métricas del AQEM que corresponden a los niveles taxonómicos utilizados, familia o inferior (ver detalles en la descripción de las métricas y el nivel taxonómico requerido para su cálculo en el manual del software AQEM).

En el apartado 7 se presentan los procedimientos de toma de muestras y análisis en el laboratorio.

4.2. LAGOS Y HUMEDALES

Para los ambientes lagunares de la demarcación del Ebro, se propone analizar los invertebrados bentónicos del litoral como elemento de calidad biológica, y para completar los diagnósticos debidos a otros elementos de calidad (flora). Las métricas a analizar serían el número de taxones, diversidad, abundancia relativa de grupos taxonómicos, etc.; también se propone adaptar el índice QAELS a la demarcación del Ebro.

El tipo de muestreo y análisis de las muestras se presentan en el apartado 8.

Parte 2: Protocolos

Se han preparado de forma independiente los siguientes protocolos:

- **Protocolo IBMWP:** Incluye las directrices de muestreo, tratamiento de muestras e identificación de macroinvertebrados de ríos para la aplicación del índice IBMWP.
- **Protocolo de evaluación con MULTIMÉTRICOS:** Incluye las directrices de muestreo, tratamiento de muestras e identificación de macroinvertebrados de ríos para el cálculo de multimétricos (basado en el procedimiento de la EPA, Barbour *et al.* 1999).
- **Propuesta de modificación del protocolo IBMWP:** Incluye directrices del procedimiento de evaluación con MULTIMÉTRICOS para el muestreo.
- **Protocolo en lagos:** Directrices de muestreo y tratamiento de muestras de invertebrados bentónicos en lagos.
- **Protocolo general para invertebrados bentónicos:** Incluye directrices generales para la conservación y manipulación de muestras de invertebrados bentónicos.
- **Protocolo de calidad:** Incluye directrices para el control de la calidad.



5. PROTOCOLO IBMWP

5.1. INTRODUCCIÓN

Este protocolo incluye las directrices metodológicas a seguir para la aplicación del índice IBMWP para los objetivos y condiciones especificadas en el capítulo 4.1.1.

5.2. EQUIPOS Y REACTIVOS

Los equipos y reactivos a usar en las tareas especificadas en este protocolo se presentan en el apartado 9.

5.3. PROCEDIMIENTOS DE MUESTREO

5.3.1. Selección y caracterización de las estaciones de muestreo

La estación de muestreo comprende un tramo fluvial representativo de la masa de agua a la que pertenece. Como norma general, el tramo de río a evaluar tendrá una longitud aproximada de 100 m. Este valor es orientativo dado que para aplicar el IBMWP según el procedimiento de Alba-Tercedor, la toma de muestras finaliza cuando ya no aparecen nuevos taxones en sucesivas redadas (ver apartado 5.3.3.1.).

Se evitará situar la estación de muestreo inmediatamente aguas abajo de perturbaciones (hidromorfológicas o fisicoquímicas); para ello se evaluará el alcance de éstas.

Es de gran importancia documentar las características de la estación de muestreo, y para ello se describirán los accesos, se dibujará un esquema de la situación de la estación de muestreo, y se indicarán las coordenadas geográficas medidas con un GPS). También se recomienda tomar fotografías (aguas arriba y abajo del tramo fluvial, y de detalle del sustrato).

5.3.2. Selección de los hábitats

Antes de iniciar el muestreo deben identificarse todos los hábitats existentes en el tramo. Estos hábitats se definen en base a diferentes combinaciones de profundidad (somero-profundo), velocidad del agua (rápida, mediana, lenta), naturaleza del sustrato (grandes rocas y guijarros, guijarros decimétricos, gravas, arenas y limos) y presencia de vegetación (hidrófitos o helófitos). Éstos son los siguientes:

- Sustrato duro y corriente fuerte (zonas lólicas) (1)
- Sustrato duro y corriente moderada-lenta (zonas leníticas) (2)
- Vegetación acuática emergida de los márgenes de los ríos (3)
- Macrófitos emergidos o macroalgas (4)
- Arena, grava o fango (5)

Para la aplicación del índice IBMWP es muy importante seleccionar un tramo de río que posea todos o la mayor parte de los tipos de hábitats indicados, lo que permitirá recoger la máxima diversidad de organismos.

5.3.3. Directrices para la toma de muestras

5.3.3.1. Ríos vadeables

Antes de iniciar el muestreo se deben localizar y capturar los animales esquivos que viven en la superficie como *Gyrinidae*, *Gerridae* o *Hydrometridae* ya que tratan de huir rápidamente y podrían pasar desapercibidos si no se lleva a cabo el muestreo de inmediato.

El muestreo debe empezar aguas abajo del final del tramo delimitado y proceder aguas arriba; esto es para evitar enturbiar el agua que todavía no ha sido muestreada, y sobretodo para evitar que los macroinvertebrados se dejen arrastrar por la corriente al detectar las vibraciones. Es recomendable vaciar periódicamente la red en bateas colocadas en las orillas, para evitar que la red se colmate, y los macroinvertebrados escapen de ell arrastrados por la corriente.

El muestreo es cualitativo y, se realiza removiendo los sustratos previamente seleccionados con la mano y/o botas, colocando la red encarada a la corriente, e inmediatamente aguas abajo, realizando un movimiento oscilatorio de izquierda a derecha, con la red de mano (o salabre) (el tamaño de la malla recomendado es de 300 ó 500 μm ; ver apartado 9.2), con la finalidad de que los macroinvertebrados sean arrastrados por ésta y se amontonen en el fondo de la red.

En el esquema adjunto se muestra la caracterización y selección de los hábitats a muestrear en la estación de muestreo.

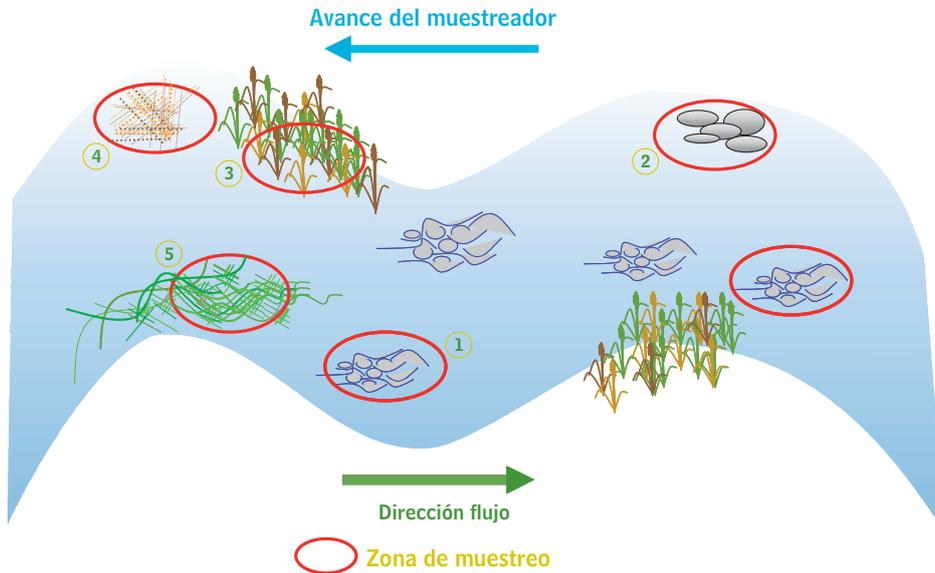


Figura 4.3.: Tipología de hábitats a muestrear para la aplicación del índice IBMWP: 1: zonas líticas; 2: zonas leníticas; 3: vegetación acuática emergida; 4: arena, grava o fango; 5: macrófitos o macroalgas

La metodología de muestreo varía según el tipo de hábitat:

a) Sustratos duros:

1) Zonas reófilas (1):

En aguas **someras** (< 50 cm), se sitúa el salabre aguas abajo de la zona a muestrear (y de cara a la corriente) y se procede a remover y voltear los sustratos raspándolos con la mano; de este modo todos los organismos que se van despegando del sustrato son arrastrados por la corriente y se introducen en el salabre. Se examinan las piedras, y se retira cualquier taxón que aparezca adherido al sustrato, añadiéndose a la muestra. Se remueven los depósitos inferiores más finos para desalojar cualquier organismo. Si las piedras tienen un diámetro inferior a unos 10 cm, remover con los pies y recoger el material con la red a contracorriente.

En aguas vadeables **profundas** (50 cm a 1 m) en las que no sea posible un muestreo manual se realizará la misma operación con los pies (*kick sampling* según la terminología británica). El objetivo es remover al menos los primeros 10-15 cm de profundidad del sustrato.

Se repite este proceso en varias zonas líticas a lo largo de la estación de muestreo hasta que nuevas redadas no aportan nuevas familias.

2) Zonas leníticas (2):

En zonas de remanso o aguas arriba de azudes la corriente no introducirá los organismos en el salabre de modo que se procederá del modo que se especifica en el apartado anterior (i) pero removiendo intensamente el salabre para recoger todos los materiales suspendidos al remover el fondo. Si hay piedras en el sustrato, estas se retirarán cuidadosamente y se rasparán/limpiarán con la mano dentro de la red, asegurándose que ningún organismo haya quedado adherido a la piedra.

b) Vegetación acuática (3) y (4): Pasar el salabre entre la vegetación, raíces sumergidas y macrófitos existentes en la estación de muestreo, y mover el sustrato con la ayuda de las botas, recogiendo el material en suspensión y los organismos que queden adheridos a la vegetación.

c) Arena, grava o fango (5): Remover el fondo con las manos o con los pies en función de la profundidad y recoger con el salabre el material que se lleve la corriente o quede en suspensión.

Como ya se ha indicado, el material recogido se vaciará periódicamente en bateas blancas a las que se habrá añadido previamente agua. Esto evitará que la red de muestreo se colmate y posibles pérdidas de organismos al ser arrastrados por la corriente (ver Alba-Tercedor, 1996).

Técnicas de muestreo de invertebrados bentónicos. Método del IBMWP		
		
<ul style="list-style-type: none"> Muestreo de los diferentes hábitats fluviales existentes en la estación de muestreo hasta que no se observan nuevos taxones. 	<ul style="list-style-type: none"> Examen de la muestra e identificación de las familias del IBMWP. 	<ul style="list-style-type: none"> Conservación de parte o de la totalidad de la muestra para realizar el recuento de organismos y para finalizar el cálculo del IBMWP.

Fotografía 4.1.: Técnicas de muestreo de *invertebrados bentónicos*. Método del IBMWP (Propiedad de Javier Alba Tercedor)

Es importante limpiar la red con abundante agua después de cada muestreo para evitar la contaminación de las muestras entre los diferentes puntos. Especial cuidado hay que tener en desinfectar los equipos, cuando se ha muestreado en zonas bajas para no llevar organismos patógenos a las cabeceras (por ejemplo los tramos con presencia de *Procambarus clarkii* presentan el Oomiceto *Aphanomyces astaci*, que llevado accidentalmente a las cabeceras puede hacer desaparecer los relictos de las poblaciones del cangrejo autóctono (*Austropotamobius pallipes*). En los puntos de muestreo con presencia de mejillón cebra la desinfección de los aparejos deberá realizarse siguiendo las indicaciones de la CHE (ver www.chebro.es).

5.3.3.2. Ríos profundos (no vadeables)

En aguas profundas, estáticas o de corriente lenta, no vadeables, se recomienda el uso de sustratos artificiales para la determinación de la calidad del agua, mediante la aplicación del índice IBMWP.

Los resultados (en términos de inventario y especialmente en abundancia relativa de los taxones) pueden tener desviaciones importantes respecto a la comunidad del tramo, derivados de la diferente apetencia de los taxones por el sustrato artificial (puede favorecer a algunos). Es importante intentar reproducir los hábitats naturales, mezclando sustratos duros de diferentes granulometrías y añadiendo haces de leña, fibras vegetales (estropajos), etc. (ver apartado 5.2.1.).

Se instalaran varias unidades de sustratos artificiales sumergidos en puntos del cauce, en general 4 sustratos, 2 en orillas y 2 en zonas líticas centrales. El tiempo de colonización se estima entre 25-30 días (Alba-Tercedor, 1996). La ubicación del sustrato artificial debe ser la apropiada para que no quede expuesto al aire, en época de sequía, ni sea manipulado en actos de vandalismo.

Otra opción de muestreo para los ríos profundos es el uso de dragas para la recolección de muestras de fondo. El principal inconveniente de este sistema es que está diseñado para sacar muestras de sustratos finos, y la presencia de rocas y piedras en el lecho (que se encuentran en la mayor parte de los tramos), impide su uso.

5.3.4. Limpieza de las muestras en el campo

A medida que se van tomando muestras en los diferentes hábitats de la estación de muestreo, se debe proceder a la limpieza de restos orgánicos e inorgánicos y a la identificación previa de los taxones, dado que el muestreo se prolonga hasta que no se observan nuevos taxones. El procedimiento es el siguiente:

- Retirar a mano las gravas, piedras y restos orgánicos en la misma red de mano.
- Poner la muestra o porciones de ella en una o varias bateas blancas con un poco de agua:

- Retirar a mano las hojas y los restos más gruesos (vigilar que no queden organismos adheridos)
- Si la muestra contiene mucho limo, realizar sucesivos lavados filtrando en la red el sobrenadante. Repetir varias veces el procedimiento hasta que el sobrenadante salga suficientemente limpio. Debe tenerse cuidado de que no queden moluscos y organismos pesados (tricópteros con estuche) entre la arena.
- Anotar en la hoja de campo del IBMWP (ver Apéndice) la presencia de los diferentes taxones que por su tamaño o características morfológicas no ofrecen dificultades de identificación, y conservar de 1 a 3 individuos de cada taxón. Anotar asimismo la presencia de taxones de gran movilidad observados durante la toma de muestras como ciertos heterópteros (Gérridos, népidos, hidrométidos).
- Tomar muestra de los taxones que por su pequeño tamaño o dificultades taxonómicas (como algunas familias de tricópteros, plecópteros, coleópteros, etc.) requieren su examen bajo el estereomicroscopio, en el laboratorio.

En el procedimiento inicial de IBMWP, la identificación de las familias de invertebrados bentónicos presentes en la muestra se realiza en el campo (excepto las dudas que se resuelven en el laboratorio). No obstante la experiencia extraída de la realización de campañas extensivas, como los muestreos para la explotación de la Red de Variables Ambientales de la CHE, demuestra que para este tipo de proyectos es más conveniente y fiable guardar la muestra para completar la separación e identificación en el laboratorio. Esto permite:

- Reducir el tiempo de permanencia en la estación de muestreo y por lo tanto los costes asociados a la realización del muestreo (la identificación en el campo requiere más días o más equipos trabajando en paralelo para completar la campaña dentro de una misma época del año).
- Asegurar que todos los taxones existentes en la muestra son incluidos en el inventario y se contabilizan en el índice. Esto es especialmente necesario en muestras con abundancia de algas filamentosas y/o restos vegetales muy fragmentados, cuyo análisis en el campo suele ser dificultoso.

En el caso de que se vayan a realizar recuentos para la estima de la abundancia relativa de los taxones, la muestra (o parte de ella) se conservará para su análisis posterior.

5.4. CONSERVACIÓN Y ETIQUETADO DE LAS MUESTRAS

Las muestras a conservar podrán ser de organismos previamente separados en el campo o bien de la totalidad del material recogido con la red de mano. En el primer caso los organismos se introducirán en viales de plástico o vidrio y se conservarán con alcohol etílico de 70°.

Para la conservación de muestras para la realización de recuentos y para completar la determinación del IBMWP en el laboratorio, se recomienda fijar la muestra con formaldehído (10%)⁵. Las directrices para la conservación y etiquetado de las muestras se presentan en los apartados 9.3. y 9.4.

5.5. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA EN EL LABORATORIO

La muestra para recuento o para completar la determinación del IBMWP (en caso de que no se haya efectuado en su totalidad en el campo), se acaba de procesar en el laboratorio siguiendo el siguiente procedimiento:

- 1) Vaciar el contenido de las muestras en un salabre de 300 μm ó 500 μm de diámetro de malla (según se haya usado uno u otro en el muestreo) y aclarar con abundante agua para eliminar los restos de conservantes (especialmente si se ha usado formaldehído). Realizar esta tarea en un lugar ventilado o usando una mascarilla. Extraer los restos vegetales y pequeñas piedras que hubieran quedado después de la limpieza previa en el campo (cuidar de que no tengan macroinvertebrados adheridos).
- 2) Homogeneizar la muestra en la bandeja
- 3) Repartir la muestra entre diferentes placas de Petri
- 4) Anotar la información más importante en la hoja de recuentos o en el programa de ordenador. La información mínima recomendada es: nº de muestra o submuestra, nombre del río, localidad y fecha de muestreo (ver hoja en Apéndice). Otras informaciones importantes es la fecha del recuento y el nombre del analista.
- 5) Separar e identificar hasta familia, o grupo taxonómico incluido en el IBMWP, todos los taxones diferentes existentes en la muestra.

⁵ Debido a la toxicidad del formaldehído la muestra puede conservarse con alcohol etílico de 70° pero en este caso no hay seguridad de que las muestras se puedan conservar por mucho tiempo.

- 6) Proceder al recuento (nº individuos) de los primeros 200 individuos recogidos al azar (criterio Guadalmed, Bonada et al., 2004⁶), o bien de la totalidad de la submuestra que corresponda al muestreo representativo de los hábitats (ver propuesta J. Alba en el apartado 7); en el segundo caso puede ser necesario contar varias fracciones de la muestra convenientemente homogeneizada. Los resultados de los recuentos constituyen una estima de la abundancia relativa de los macroinvertebrados en la muestra.

5.6. CÁLCULO DE MÉTRICAS

Se calcularán las siguientes métricas:

- IBMWP (*Iberian Biological Monitoring Working Party*). En la hoja de cálculo adjunta se indican los taxones (familias en su mayoría) presentes en la muestra, y se obtiene el valor del índice IBMWP que es la suma de las puntuaciones asignadas a cada uno.
- ASPT (*Average Score per Taxon*). Se obtiene del cociente entre la puntuación del IBMWP y el número de taxones (usados para el cálculo del IBMWP).
- Taxones dominantes. En las muestras de recuento se identifican los grupos taxonómicos y taxones dominantes.

6. PROTOCOLO DE EVALUACIÓN DE LOS INVERTEBRADOS BENTÓNICOS DE RÍOS CON MULTIMÉTRICOS

6.1. INTRODUCCIÓN

El método que se presenta se debe a Isabel Pardo de la Universidad de Vigo, y está basado en el muestreo de hábitats múltiples (*multihabitat approach*), extensivamente utilizado por la Agencia de Medio Ambiente de los EE.UU. (EPA - Barbour et al, 1999; Barbour, Stribling y Verdonschot. en prensa). La metodología de tratamiento de la muestra y del análisis de los resultados son propios.

6.2. EQUIPOS Y REACTIVOS

Los equipos y reactivos a usar en las tareas especificadas en este protocolo se presentan en el apartado 9.

6.3. PROCEDIMIENTOS DE MUESTREO

Selección y delimitación de las estaciones de muestreo

La estación de muestreo es un tramo seleccionado de 100 m representativo de las características de la masa de agua. El tramo presentará los tipos de hábitat más frecuentes, en la masa de agua, de modo que existan duplicados de elementos físicos y estructurales (por ejemplo la secuencia rápido-pozas, etc.)

Algunos aspectos a tener en cuenta al seleccionar la estación de muestreo son:

- La morfología fluvial y composición del hábitat serán las características del tramo a evaluar, por ejemplo se evitarán zonas canalizadas si el resto del tramo no lo está.
- La cobertura de la vegetación (densidad, sombra) serán las características del tramo; así se evitara muestrear una zona de sombra, si esto no es habitual en el tramo.
- La estación de muestreo reflejará la secuencia de rápidos-lentos que domine en el tramo a analizar.
- Se evitarán las zonas inmediatas a puentes, vados o azudes, a menos que sean característicos del tramo.
- Si en el tramo a evaluar existe un vertido que afecta de forma local a la calidad del agua, se evitará muestrear en la zona inmediata al punto de descarga, y se fijará la estación de muestreo aguas abajo de la zona de mezcla del vertido.

⁶ El procedimiento de recuento según Bonada et al (2004) consiste en contar 50 individuos al azar en la muestra homogeneizada; luego volver a homogeneizar la muestra y realizar otro recuento de 50 individuos, y así sucesivamente hasta completar 200 individuos. Este valor se ha obtenido analizando la variación del nº de familias y puntuación del índice IBMWP ante diferentes tamaños del recuento (100, 200, 300, 400, 500 y 600 individuos), y al observar que a partir de 200 individuos el incremento de las métricas indicadas es poco importante.

Se evitará seleccionar estaciones cuyo acceso entrañe riesgos a los técnicos de campo (laderas escarpadas, paso a través de aguas profundas o con acúmulos de lodos,...).

Es importante señalar claramente la localización de la estación de muestreo (inicio y final), tomando las coordenadas con un GPS, e indicando su posición en la cartografía de trabajo.

6.3.2. Caracterización de la estación de muestreo

Previamente al muestreo, se completarán las siguientes tareas:

- Descripción completa de la estación de muestreo incluyendo datos sobre su localización (nombre del río, cuenca, municipio, coordenadas UTM de los puntos de inicio y final del tramo), tipo de río (según la tipificación de la DMA), y características hidromorfológicas del cauce (forma del canal y estructuras fluviales, fijación de los sustratos del lecho etc.); también se indicarán los usos de la ribera (tipo de bosque, pastos, tierras cultivadas, zonas urbana, industrial, etc.) y los principales impactos antrópicos (presas o azudes, canalizaciones, vertidos, detracciones, etc.).
- Caracterización de los hábitats fluviales de la estación de muestreo. Se sigue el protocolo de la USEPA que consiste en identificar *de visu* la cobertura de todos los tipos de hábitats disponibles en el tramo. En base a esta estima, se recogerán los invertebrados bentónicos de forma sistemática en los diferentes hábitats, y en proporción a su frecuencia en el tramo de río. Para facilitar el procedimiento de identificación *de visu*, los hábitats se agrupan en los siguientes cinco tipos:
 - Sustratos duros (*Cobble*)
 - Detritos vegetales (*Snags*)
 - Orillas vegetadas (*Vegetated banks*)
 - Macrófitos sumergidos (*Submerged macrophytes*)
 - Arena y otros sedimentos finos (*Sand and other fine sediments*)

La cobertura (%) de los tipos de hábitats en la estación de muestreo permite determinar el número de muestras (kicks) que corresponden a cada hábitat, teniendo en cuenta que el muestreo incluye **20 kicks** (ver apartado 6.3.3).

Es conveniente disponer de unas hojas de campo previamente preparadas que faciliten la toma de datos para la caracterización del tramo (ver modelos adjuntos).

Para estimar el número de kicks por tipo de hábitat es útil la siguiente tabla:

Símbolo	Tipo hábitat	%	Nº kicks de 20
*	Macrófitos sumergidos o emergentes		
→	Rápidos sobre sustrato duro		
	Orillas vegetadas		
⊗	Detritos (hojarasca, ramas, madera)		
	Pozas (describir sustrato: limo, arena, detritos, etc)		

Tabla 4.4.: Tipos de hábitats

En la hoja de campo (ver modelo en Apéndice) se indicará el tipo de sustrato en las pozas: piedra, arena y limo; y el porcentaje de detrito en ese sustrato.

Se identificarán las especies de las plantas acuáticas sumergidas y se indicará su cobertura (%) en el tramo de muestreo. También se indicará la cobertura (%) de musgo sobre las piedras.

Las raíces muertas de macrófitos se consideran detritos; no obstante si están todavía enraizadas y vivas aunque la parte emergente esté senescente se señalarán como macrófitos. También se señalarán como macrófitos las ramas vivas de árboles y arbustos sumergidas en el agua.

6.3.3. Directrices para la toma de muestras

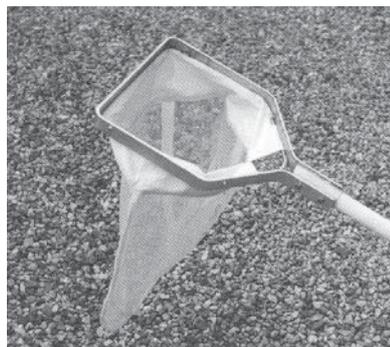


Figura 4.4.: Red de mano estándar accFBA

La toma de muestras se realiza con una red de mano estándar **acc FBA** de sección cuadrada (boca de 0,25 m de ancho y 0,5 m de largo).

El muestreo se realiza en base a **20 kicks** en 100 m. Una unidad de muestreo (**kick**) incluye remover con pies y manos (o agitando y resuspendiendo el sustrato de diversas formas) (Barbour *et al*, 1999), el sustrato situado en los 0,5 m cercanos a la boca de la red. En total se muestrean 2,5 m² de sustrato fluvial (20 kicks * 0,5 m * 0,25 m).

En función de las coberturas (%) de los cinco tipos de hábitat (ver apartado 6.3.2.), en la estación de muestreo, se determina el número de kicks que hay que tomar en cada tipo de hábitat (cada 5% de la superficie ocupada por un hábitat corresponde a un kick). Véase por ejemplo la siguiente distribución de hábitats:

Tipo de hábitat	%	Nº kicks de 20
Sustratos duros (rocas, piedras, gravas).	50	10
Detritos vegetales	20	4
Orillas vegetadas	5	1
Macrófitos sumergidos	10	2
Arena y otros sed. finos	15	3
Total	100	20

Tabla 4.5.: Ejemplo de distribución de hábitats

Los hábitats que representan menos del 5% no se contabilizan como una unidad de muestreo. Pero a veces 2 hábitats minoritarios presentes pueden estar muy cercanos, y en la suma de porcentajes contabilizar un kick. Por ejemplo: ramas y acúmulos de detritos (3%) en pequeñas pozas de limo (2%), en estos casos se hace 1 kick sobre un área de poza con detrito encima.

El muestreo se inicia aguas abajo del tramo a estudiar y se realiza remontando el río; de esta forma se evita que el operador reciba materiales y organismos de zonas muestreadas previamente aguas arriba, y al caminar por el lecho fluvial, afecte a las zonas que faltan por muestrear. Las directrices de muestreo para cada tipo de hábitat se presentan en la tabla adjunta:

Directrices de muestreo para cada tipo de hábitat	
<p>SUSTRATOS DUROS:</p> <p>Rápidos de todo tipo, se muestrean gravas-piedras manteniendo el borde inferior de la red contra el lecho fluvial a la vez que se desalojan los organismos, removiendo con pies o mano el sustrato a lo largo de 0,5 m aguas arriba de la red.</p>	<p>DETRITOS VEGETALES (ramas-madera-hojarasca):</p> <p>Se muestrea removiendo con pies o manos los depósitos de detritos, y manteniendo la red aguas abajo (con corriente) o pasando la red sobre ellos (aguas lentas) para recolectar los organismos en suspensión. También se muestrean en este hábitat la madera acumulada en pozas, evitando trozos grandes.</p>
<p>ORILLAS VEGETADAS:</p> <p>Orillas fluviales con raíces y plantas emergentes asociadas a ellos. Se agitan las raíces con pies o manos, y se recogen los organismos en suspensión o arrastrados por la corriente, con la red situada aguas abajo.</p>	<p>MACRÓFITAS SUMERGIDAS:</p> <p>Su presencia es estacional y pueden no encontrarse si el muestreo se realiza en invierno o a finales de otoño. Se muestrean pasando la red a través de la vegetación desde el lecho (donde enraíza) hasta la superficie del agua (máximo de 0,5 m). En aguas someras, el muestreo se realiza agitando con pies o manos las plantas a lo largo de 0,5 m y recogiendo los organismos en suspensión o arrastrados por la corriente con la red. Evitar la resuspensión del sedimento.</p>
<p>ARENA Y OTROS SEDIMENTOS FINOS:</p> <p>Se muestrean las zonas de deposición de sedimentos no vegetados, agitando éstas con pies y manos, e incluyendo el material en suspensión en la red, a lo largo de 0,5 m. No es conveniente arrastrar la red a través de los sedimentos blandos ya que entonces se recoge mucho sedimento, y se dificulta la limpieza posterior de la muestra.</p>	

Tabla 4.6.: Directrices de muestreo para cada tipo de hábitat

Técnica de muestreo con kicks para la evaluación con multimétricos		
		
	<p>Caracterización del hábitat y estima de</p> <p>↓</p> <p>Nº Kicks /Tipo de hábitat</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La unidad de muestreo – kick – incluye remover con pies y manos el sustrato situado en los 0,5 m cercanos a la boca de la red. • Se muestrea en base a 20 kicks en 100 m, repartidos proporcionalmente en los tipos de hábitat indicados: Sustratos duros, detritos vegetales, orillas vegetadas, macrófitas sumergidas, arena y otros sedimentos finos. El área final de muestreo es de aproximadamente 2,5 m².
		

Fotografía 4.2.: Técnica de muestreo con kicks para la evaluación con multimétricos (Propiedad de URS)

6.3.4. Limpieza de las muestras en el campo

Es conveniente ir vaciando la red a medida que se completan los kicks, dependiendo de su grado de colmatación. El contenido de la red se deposita en una bandeja y se eliminan con cuidado piedras, trozos grandes de detritos (trozos de madera, hojas grandes...). El resto del material se introduce en un recipiente y se procede a su fijación y etiquetado.

6.4. CONSERVACIÓN Y ETIQUETADO DE LAS MUESTRAS

Seguir las directrices indicadas en los apartados 9.3 y 9.4.

6.5. TRATAMIENTO DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO

El procedimiento que se indica es el utilizado por el Equipo de Isabel Pardo del Departamento de Ecología y Biología Animal de la Universidad de Vigo.

El tratamiento de las muestras comprende la extracción y recuento de los macroinvertebrados de la muestra y su identificación. Se realizan las siguientes tareas:

- Con guantes, mascarilla y gafas de protección se procede a lavar el recipiente que contiene la muestra; se vierte la muestra sobre los tamices y se recoge el agua con formol para su tratamiento posterior como residuo tóxico. Luego bajo el grifo, se lava con agua abundante la muestra, hasta que desaparezca el olor.
- Se colocan los tamices de 5 mm, 1 mm y 0,5 mm en el fregadero, y según el orden indicado.

- Se vierte una porción de muestra en el tamiz superior (5 mm) extrayendo la etiqueta si es visible.
- Se vierte el contenido de cada tamiz en las respectivas bandejas de fracción gruesa (>5 mm), media (entre 5 y >1 mm) y fina (entre 1 y 0,5 mm). Para ello, se lava el contenido hacia un lado del tamiz antes de depositarlo en la bandeja y después se lava, dándole la vuelta.
- Se prepara el estadillo identificando la muestra según el etiquetado.
- Se separa la fracción gruesa extrayendo **todos** los invertebrados que haya.
- Se identifican los taxones y la abundancia absoluta.
- Se guarda en alcohol al 70% lo extraído, con la referencia del punto de muestreo, fecha e indicando **fracción G x 1**.
- Se separa la fracción media (entre 5 y >1 mm) extrayendo sólo los taxones nuevos durante media hora (extraer un par de ejemplares de cada taxón). Posteriormente se realiza el submuestreo de la fracción media, como se indica a continuación.
- Se separa la fracción fina (entre 1 y 0,5 mm), la fracción más homogénea, y se procede a su submuestreo, como se indica a continuación.
- Se toma otra porción del recipiente de la muestra, y se repite el procedimiento indicado.

Submuestreo de la fracción media:

La fracción media se submuestra, extrayendo una porción de la muestra (ej. 1/8), de forma que sea suficientemente representativa y precisa (contenga al menos 100 invertebrados, siguiendo a Wrona *et al.*, 1982). En el caso de que el número no llegue a 100, hay que coger una segunda o posteriores submuestras, hasta que se alcance el número de 100. El submuestreo se realiza homogeneizando y dividiendo en partes iguales la muestra de la fracción media.

Se toma una o más partes y se cuantifica la abundancia de cada taxón, señalando en el estadillo el número de individuos por taxón y la fracción que la submuestra representa del total de la muestra.

Se conserva la fracción en alcohol debidamente etiquetada (**fracción M, x8**). Esto correspondería a 1 submuestra.

Submuestreo de la fracción fina:

Se procede según el siguiente procedimiento:

- Elutriación inicial para separar el material inorgánico (piedras pequeñas, gravas) del orgánico puesto en suspensión.
- Revisar si en los sustratos inorgánicos queda algún macroinvertebrado. Para ello se cogen pequeñas porciones con una pipeta Pasteur, se colocan en una placa Petri y se examinan con la lupa.
- Se procede a la homogeneización de la parte que contiene los macroinvertebrados. Para ello se utiliza el submuestreador descrito por Wrona *et al.* (1982) o cualquier método comparable:
 - Encender el aparato antes de echar la muestra.
 - Enrasar con la muestra y agua a 1 litro, en el aparato.
 - Dejar que se agite hasta conseguir una mezcla completa.
- Extraer 2 ó 3 subunidades de 50 ml (cada una representa el 1/20 del total), de la solución agitada, mediante una jeringa de 50 ml, y depositarlas en placas Petri. Deberá submuestrearse un número aproximado de como mínimo 100 individuos para que la submuestra sea representativa de la muestra (Wrona *et al.*, 1982).
- Contar e identificar los invertebrados de las subunidades.
- Anotar los recuentos de cada taxón en el estadillo, señalando la fracción que la submuestra representa del total de la muestra.
- Guardar los invertebrados en alcohol al 70% y etiquetar la muestra (**fracción F, x20**) (esto correspondería a 1 submuestra).

6.6. CÁLCULO DE MÉTRICAS

Pueden calcularse diferentes métricas a partir del inventario de taxones y sus abundancias. En esta tarea puede ser útil el uso del software AQEM, si bien hay limitaciones relacionadas con el nivel de identificación de los organismos (la mayoría de métricas de AQEM se han diseñado a nivel de especie).

Para un nivel de identificación de familia son aplicables las siguientes métricas:

Abundancia total - Abundancia Plecópteros, Tricópteros etc. y restantes órdenes, familias...
Frecuencia (Abundancia relativa) de grupos taxonómicos, individuales y combinados, por ejemplo % EPT (Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera)
Diversidad /equitatividad
Numero total de taxones (familias, géneros, especies)
Número de taxones EPT (Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera) y restantes órdenes.
IBMWP / ASPT

Tabla 4.7.: Métricas aplicables para un nivel de identificación de familia

Los resultados obtenidos (listado de especies, riqueza, abundancias,...) de los muestreos realizados se deberían incluir en una base de datos centralizada diseñada para la cuenca del Ebro, o de ámbito nacional que recoja el marco de trabajo de la DMA.

7. MODIFICACIÓN DEL PROTOCOLO IBMWP CON MUESTREO BASADO EN LA EVALUACIÓN CON MULTIMÉTRICOS

La propuesta de Javier Alba, incluye la realización de las siguientes tareas, en la estación de muestreo:

- 1) Distribuir el esfuerzo de muestreo proporcionalmente a la extensión de los diferentes microhábitats presentes en el tramo (Muestreo según Barbour *et al* con **20 kicks**).
- 2) Una vez realizado el muestreo limpiar la muestra del modo habitual y guardarla en un bote debidamente etiquetado (ver apartado 9.4), marcado con un “1” para hacer constar que es el material resultante procede del muestreo semicuantitativo.
- 3) Continuar el muestreo según el protocolo IBMWP, es decir, hasta que no parezca ninguna nueva familia.
- 4) Una vez realizado el muestreo limpiar la muestra del modo habitual y guardarla en un bote debidamente etiquetado marcado con un “2”.
- 5) Fijar las muestras con formol al 4% o bien con alcohol al 95%.

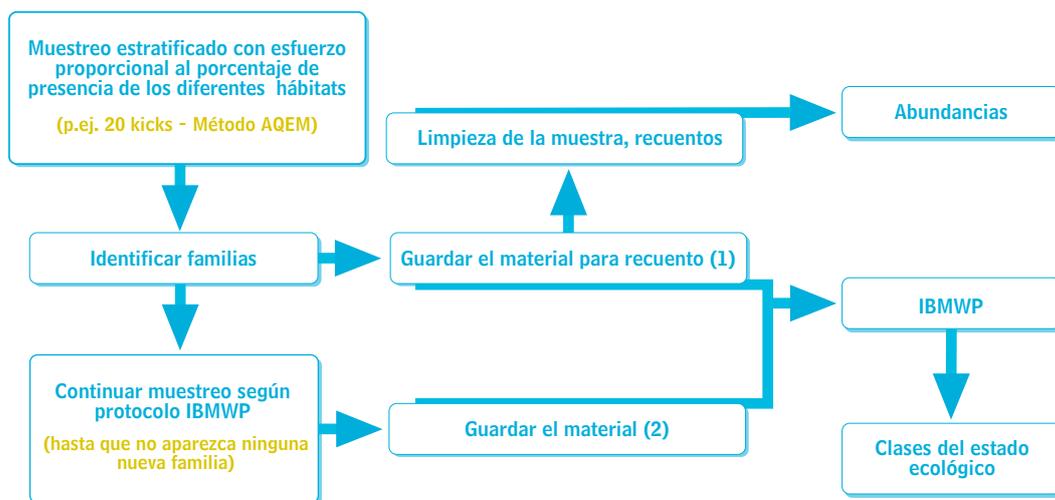


Tabla 4.8.: Modificación del protocolo IBMWP con muestreo basado en la evaluación con multimétricos

La muestra semicuantitativa, marcada con un “1”, permitirá el cálculo de las abundancias, mientras que el listado de familias encontradas en las dos muestras servirá para el cálculo del índice IBMWP.

8. PROTOCOLO PARA INVERTEBRADOS BENTÓNICOS DE LAGOS

8.1. INTRODUCCIÓN

Los invertebrados bentónicos del litoral de los lagos se consideran el elemento biológico a analizar para la obtención de métricas que permitan la determinación del estado ecológico. El procedimiento de muestreo es de tipo cualitativo-semicuantitativo (unidad de esfuerzo), y se ha elaborado a partir de la consulta de la bibliografía especializada.

8.2. EQUIPOS Y REACTIVOS

Los equipos y reactivos a usar en las tareas especificadas en este protocolo se presentan en el apartado 9.

8.3. PROCECIMIENTO DE MUESTREO

8.3.1. Selección y caracterización de las estaciones de muestreo

- Identificar estaciones de muestreo en el litoral de los lagos, que sean representativos de la diversidad de hábitats existente y de los posibles impactos humanos debidos a las actividades y/o usos existentes en el lago y en zonas circundantes. Para esto se recomienda examinar fotos aéreas del lago y de su cuenca previamente a la visita.
- La caracterización de los hábitats litorales debe incluir: tipo de sustrato mineral y vegetal, profundidad, tipo de vegetación de ribera, etc...
- En el litoral de lagos grandes (>50 ha) puede ser conveniente fijar más de una estación de muestreo, en las que realizar el muestreo de los invertebrados bentónicos, teniendo en cuenta la diversidad de hábitats existentes.
- Una vez identificadas las estaciones de muestreo se fijará su posición tomando las coordenadas geográficas con un GPS, y referencias topográficas que faciliten su localización posterior.

8.3.2. Directrices para la toma de muestras

Se presentan dos métodos de muestreo, el primero tiene como objeto capturar los organismos que se encuentran junto al sustrato pétrico o entre la vegetación, mientras que con la segunda se recolectan principalmente organismos epifíticos. Si se opta por el cálculo de un índice concreto, será necesario consultar la metodología de muestreo adaptada a dicho índice.

8.3.2.1. Muestreo con salabre (“dipping”)

Consiste en realizar pasadas con una red de muestreo (100 μm de diámetro de poro) con un recorrido de bajada seguido de un recorrido a aproximadamente 1m cerca del fondo y subiendo hasta la superficie; esto se denomina “*dipping*” en versión anglosajona.

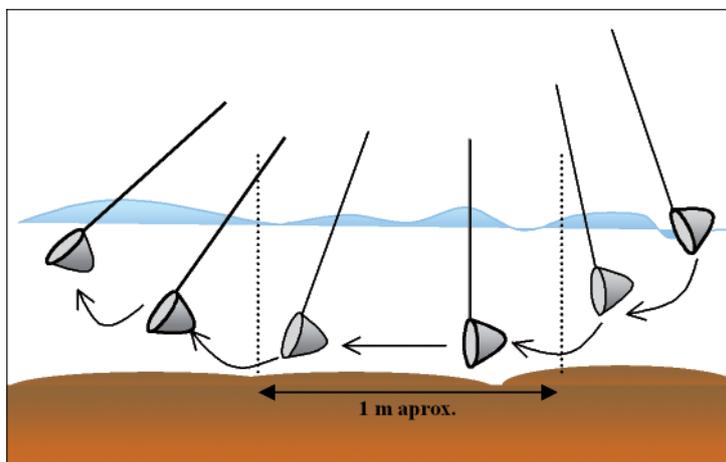


Figura 4.5.: Muestreo con salabre

Se realizará un número de pasadas de red en varios puntos representativos de la variedad de hábitats del litoral del lago (piedras, gravas y arenas, vegetación acuática, etc.) y el contenido se guardará en un recipiente y se fijará (ver apartado 9.3); obteniéndose de esta forma una muestra integrada del litoral.

El número de pasadas puede determinarse previamente al inicio del muestreo (por ejemplo 20 en el estudio de los ecosistemas leníticos someros de Cataluña; ACA 2004).

La toma de muestras se completará con la limpieza de 2-3 piedras sumergidas para recoger aquellos organismos que estén adheridos a ellas y que, por lo tanto, no suelen encontrarse en las pasadas de red.

8.3.2.2. Muestreo en vegetación sumergida (método de Kornijow y Kairesalo)

La aplicación del método Kornijow y Kairesalo (1994) permite un estudio cuantitativo de las comunidades de invertebrados epifíticos y de los que nadan en el seno de los carrizales. La metodología consiste en la recolección de tallos individuales o grupos de tallo, mediante tubos de PVC. El procedimiento se esquematiza en la siguiente figura, y consiste en:

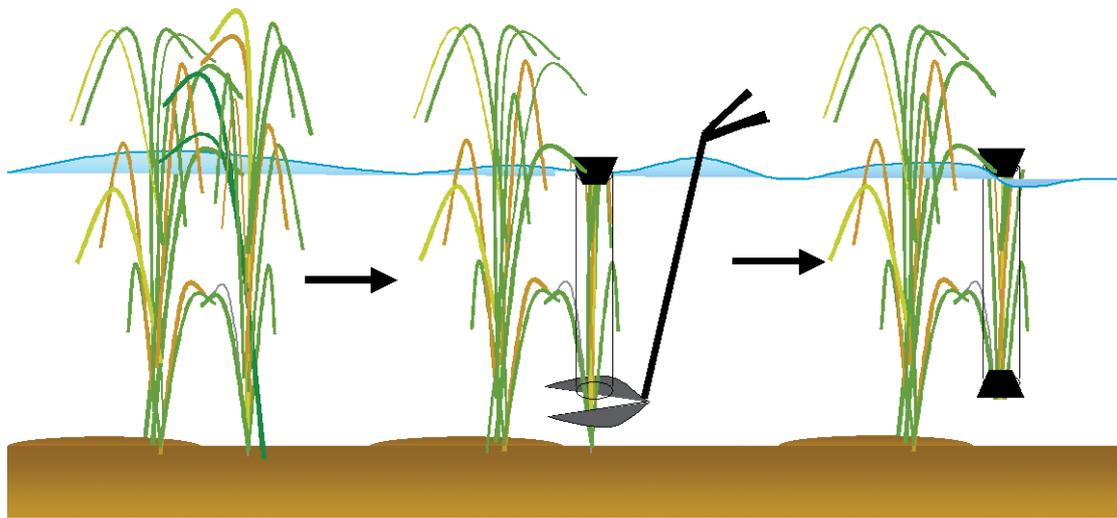


Figura 4.6.: Muestreo en vegetación sumergida

- 1) Seleccionar tallos de carrizo o enea que hayan permanecido sumergidos suficiente tiempo como para presentar macroinvertebrados epifíticos; deben evitarse tallos que, por fluctuaciones del nivel del agua, hayan permanecido al descubierto recientemente.
- 2) Cortar el/los tallos al nivel de la superficie del agua y colocar el tubo de PVC intentado perturbar el mínimo posible tanto el tallo como el agua de su alrededor.
- 3) Tapar la parte superior del tubo con un tapón de goma.
- 4) Cortar la caña a la altura de la parte inferior del tubo de modo que podamos colocar el otro tapón de goma. Actuando así no sólo habremos recolectado los invertebrados epifíticos sino también aquellos que se encontraban alrededor del tallo.
- 5) Retirar el tubo con cuidado de no perder el contenido de agua y verterlo en una bandeja.
- 6) Lavar los tallos con la misma agua contenida en el tubo cuidando de despegar todos los organismos en ellos adheridos.
- 7) Medir la longitud y el diámetro de los tallos con un pie de rey y apuntar los datos en una hoja de campo. Estos datos servirán para poder calcular la superficie colonizable y así, posteriormente, referir el número de individuos encontrados a un área.

8.3.3. Limpieza de las muestras en el campo

Es conveniente realizar una limpieza previa en el campo de las muestras, con la finalidad de extraer restos grandes de macrófitos y/o macroalgas; no obstante el material desechado deberá ser examinado en detalle para desprender los organismos que estén adheridos. En todo caso hay que tener en cuenta que no es conveniente eliminar todas las masas de algas o restos vegetales ya que con ellas se perderá una buena parte de microcrustáceos y otros grupos de pequeño tamaño.

Una opción es ajustar a la red de 100 µm un tamiz de 1000 µm que sirva para retener las fracciones vegetales mayores.

8.4. CONSERVACIÓN Y ETIQUETADO DE LAS MUESTRAS

Las muestras se conservarán y etiquetarán según lo indicado en los apartados 9.3 y 9.4.

8.5. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO

Las muestras obtenidas mediante las técnicas de muestreo indicadas se limpiarán y analizarán siguiendo el siguiente procedimiento:

- a) Colocar la muestra bajo la lupa binocular y anotar la información más importante en la hoja de recuentos o en el programa de ordenador. La información mínima recomendada es: código de la muestra, nombre del lago, localidad y fecha de muestreo. Otra información importante es la fecha del recuento y el nombre del analista.
- b) Identificar y contabilizar todos los individuos presentes en la muestra en el nivel de estudio requerido (género o especie los microcrustáceos; género o familia los insectos y otros grupos). Para el recuento puede usarse escalas de abundancia relativa (1= <5; 2= 5-50; 3= 50-100; 4= 100-1000; 5= >1000) o bien el total en la muestra.
- c) Para las muestras tomadas según el método Kornijow & Kairesalo la abundancia se referirá a la superficie colonizable (que se estimará con los datos de diámetro y longitud de las cañas muestreadas).

8.6. CÁLCULO DE MÉTRICAS

Para los invertebrados bentónicos de lagos y zonas húmedas se pueden calcular las siguientes métricas, entre otras:

- Riqueza taxonómica: N° de taxones de los grupos de invertebrados presentes en la muestra o bien de grupos previamente seleccionados.
- Índices de diversidad de Shannon, Margalef, etc.
- Índice QAELS (ver hoja adjunta) adaptado a la demarcación del Ebro.
- Presencia y abundancia relativa de especies o asociaciones de especies de microcrustáceos característicos del tipo de lagos.
- Abundancia (%) de oligoquetos / quironómidos, y de otros grupos taxonómicos.

Los resultados obtenidos (listado de especies, diversidad, abundancias, cálculo de índices, etc.) de los muestreos realizados se deberían incluir en una base de datos centralizada diseñada para la cuenca del Ebro, o para todo el territorio nacional que recoja el ámbito de trabajo de la DMA.

9. PROTOCOLO GENERAL PARA EL MUESTREO Y MANIPULACIÓN DE INVERTEBRADOS BENTÓNICOS

9.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se han recogidos los aspectos referidos a los equipos de muestreo y laboratorio, técnicas de conservación de muestras y etiquetado de las muestras, los cuales son comunes a los procedimientos incluidos en el documento. Si algún equipo está indicado en un procedimiento concreto, se indica la referencia.

9.2. EQUIPOS

9.2.1. Equipos de muestreo de invertebrados en ríos y lagos

Equipos de protección personal:

- Botas o vadeadores de pescador.
- Guantes de látex.

Equipos para la recolección de las muestras:

- Redes y salabres de muestreo
- Bateas blancas (mínimo 20 x 30 cm)
- Pinzas entomológicas
- Botes de plástico con tapón hermético de ¼ de litro como mínimo
- Viales de plástico o vidrio (recoger ejemplares aislados)
- Bolígrafo o rotulador permanente (o cualquier otro método para etiquetar las muestras). Si se usan etiquetas, estas deben ser resistentes a la humedad
- Lápiz, tijeras, cinta aislante
- Cámara digital
- Hojas de campo, cartografía

En la tabla adjunta se muestran los tipos de redes a usar para la aplicación de los métodos indicados:

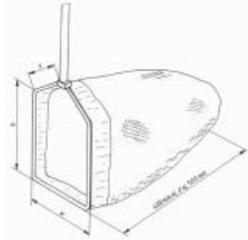
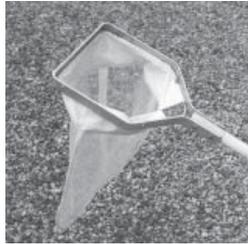
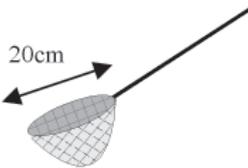
Procedimiento de muestreo	Medidas	Tamaño de malla recomendado	Esquema/Dibujo
Guadalmed (IBMWP)	Anchura 200-400mm Altura 200-300 mm	300 - 500 µm	 EN 27828: 1994
Método con multimétricos (I. Pardo)	Anchura 250 mm	500 µm	
Sustratos artificiales	Cubos de 25 cm de lado	1 cm	
Lagos (columna de agua)	Red de mano de diámetro: 20 cm	250-300 µm (macroinvertebrados) 100 µm (microcrustáceos)	

Tabla 4.9.: Tipos de redes

El tamaño de malla varía según los objetivos del estudio. En la tabla adjunta se indican los tamaños recomendados en las guías EN 27828: 1994 y EN 28265: 1994.

Tipos de estudio	Tamaño máximo de apertura	Comentarios
Seguimientos rutinarios de la calidad biológica, mediante el uso de índices bióticos.	500-750 µm	Nula o escasa representación en la muestra de los primeros estadios de desarrollo (principalmente en insectos).
Seguimientos de la calidad biológico a partir de inventarios más completos de los taxones presentes.	500 µm	Captura de un mayor número de insectos en los primeros estadios de su desarrollo.
Estudios que requieran listas de taxones completos.	250 µm	Asegura la captura de primeros estadios y de organismos muy pequeños que pueden ser interesantes para determinar la calidad del agua.

Tabla 4.10.: Tamaños de redes recomendados en las guías EN 27828: 1994 y EN 28265: 1994

La malla de 500 µm para ríos, y la de 100-250 µm para lagos son las que se consideran adecuadas para la aplicación de los procedimientos indicados en este documento.

9.2.2. Equipos para el tratamiento de muestras en el laboratorio

Equipos de protección personal:

- Guantes
- Mascarilla
- Gafas

Equipos para la manipulación de muestras en el laboratorio

- Fregadero
- 3 Bateas blancas de plástico (mínimo 30 x 20 cm)
- Tamices de 5mm, 1mm y 0,5 mm (Metodología Multimétricos)
- Submuestreador (Wrona et al., 1982) (Metodología Multimétricos)
- Jeringas de 60 ml (Metodología Multimétricos)
- Placas de Petri
- Pinzas entomológicas y/o aspirador entomológico
- Viales de plástico y otros recipientes con tapones herméticos
- Contadores
- Estereomicroscopio
- Campana de gases o extractor
- Rotulador resistente al agua
- Etiquetas
- Formularios previamente preparados para anotar la identificación y recuentos. Pueden contener una lista de taxones con espacios en los que indicar su presencia en la muestra y anotar el recuento; también puede usarse un programa de ordenador preparado para la entrada directa de datos.
- Guías de identificación: adecuadas al ámbito de estudio.

9.3. CONSERVANTES

Las muestras se deben fijar inmediatamente después de la recolección para evitar la acción de los carnívoros, especialmente de plecópteros (*Perlidae*), odonatos, heterópteros (népidos), coleópteros (*Adephaga*), tricópteros (*Rhyacophylidae*), megalópteros (*Sialidae*), entre otros. Si la muestra se va a procesar antes de 24 horas se pueden separar las especies de carnívoros de mayor tamaño, y mantener la muestra en frío (4°C), ya que la separación en vivo ayuda mucho.

Para conservar las muestras se pueden usar los siguientes fijadores:

- Formaldehído (HCHO). Es adecuado para la conservación de las muestras en el campo. Se añade a la muestra hasta conseguir una concentración final entre 4-10%. Esta sustancia es tóxica y su uso requiere la aplicación de medidas de seguridad e higiene (evitar derrames, trabajar al aire libre o en ambientes bien ventilados, usar guantes y recipientes herméticos).

- Etanol (C₂H₅OH). Es adecuado para la conservación de los invertebrados una vez extraídos de la muestra. También puede usarse como conservador de la muestra en el campo pero en este caso deberá ajustarse bien la concentración para asegurar la correcta fijación de los organismos. La concentración ideal es del 70%, por ello si los organismos se separan en el campo vivos, es mejor usar directamente alcohol de 96% (o ligeramente diluido), ya que cada vez que se introduce un individuo en el vial, se añade una pequeña cantidad de agua que hace que el alcohol se vaya diluyendo. En este tipo de muestras es aconsejable sustituir el alcohol de la muestra de campo por nuevo alcohol de 70%, al llegar al laboratorio (si las muestras se van a almacenar por un periodo superior a una semana).

Para las muestras conservadas con formaldehído se usarán recipientes con cierre hermético para evitar la liberación de vapores.

9.4. ETIQUETADO DE LAS MUESTRAS

Las muestras se identificarán mediante una etiqueta adhesiva en el exterior del recipiente y con una etiqueta de papel vegetal colocada en el interior. En ambas se anotará la siguiente información:

- Nombre del proyecto
- Código de la estación de muestreo
- Nombre del río
- Localidad
- Fecha

En la etiqueta externa se anotará también:

- Conservante (por ejemplo formaldehído 4-10% o alcohol 70-95%)
- Si se utiliza más de un recipiente por muestra, éstos se numerarán (p.ej. 1 de 2, 2 de 2, etc.)

En la ficha de campo se anotarán todo lo indicado anteriormente y además:

- Nombre del recolector
- Otras codificaciones de interés (tipo de río o lago según la clasificación de la DMA, número de la masa de agua, etc.).
- Descriptor de la muestra. Esto incluye si la muestra corresponde a un tipo de hábitat concreto; fracción filtrada, profundidad (lagos), etc...
- Taxones que son difíciles de capturar, o que se han devuelto al río (Gérridos, hidrométridos, cangrejos, etc...).

9.5. TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

Las muestras con material no fijado se transportarán refrigeradas en nevera. También es útil el uso de neveras o cajas con tapa estanca para el transporte de las muestras fijadas con formaldehído. De este modo se evita que los operadores respiren los vapores de este producto durante su transporte en el vehículo.

9.6. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS E IDENTIFICACIÓN DE LOS INVERTEBRADOS BENTÓNICOS

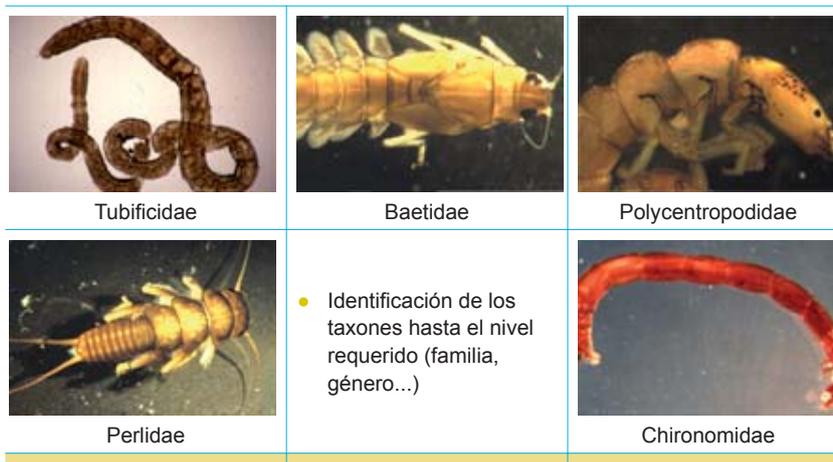
Los procedimientos de tratamiento de las muestras en el laboratorio se han incluido en cada uno de los protocolos que incluye esta memoria (ver apartados 5, 6 y 8).

La identificación de los invertebrados bentónicos se realiza con el apoyo de manuales de taxonomía y mediante el examen de los ejemplares bajo un estereoscopio (a 4, 10 y 25 aumentos). En ocasiones la identificación requiere la disección de los ejemplares, su montaje en una preparación microscópica (con diferentes medios de montaje) y su examen en el microscopio óptico (a 40, 100, 200 y hasta 1000 aumentos). En la bibliografía se recogen los textos generales más usuales para la identificación de los invertebrados bentónicos a nivel de familia o género.

Tratamiento de muestras e identificación de invertebrados bentónicos



- Limpieza de la muestra, separación de los taxones y recuento.



Fotografía 4.3.: Tratamiento de muestras e identificación de *invertebrados bentónicos* (Propiedad de URS)

10. PROTOCOLO PARA CONTROL DE CALIDAD

En los tipos de estudio cuya metodología se presenta en este documento es obligado disponer de los mecanismos que evalúen y aseguren la calidad de la aplicación de los procedimientos y del tratamiento de los datos (Stevenson *et al.* 2004). Además la implementación de la Directiva 2000/60/CE requiere que los métodos que se utilicen en el establecimiento del estado ecológico procedan de metodologías estandarizadas (ISO, CEN, o de organismos nacionales de estandarización), que los laboratorios dispongan de programas de aseguramiento de la calidad (EN ISO 17025) y participen regularmente en ejercicios de intercalibración (*Proficiency testing programmes*).

El muestreo e identificación de los invertebrados bentónicos como elementos de calidad para la determinación de la DMA debe realizarse siguiendo procedimientos estandarizados y con sistemas de control de la calidad. Asimismo la correcta identificación de los invertebrados bentónicos a nivel de familia, género o especie es un aspecto de gran importancia. Son de aplicación las siguientes normas:

- EN 27828: 1995. Calidad del agua. Métodos de muestreo biológico. Guía para el muestreo manual con red de macroinvertebrados bénticos (ISO 7828:1985). (Versión oficial EN 27828:1994).
- EN 28265: 1995. Calidad del agua. Concepción y utilización de los muestreadores de macroinvertebrados bénticos sobre sustrato rocoso en aguas dulces poco profundas (ISO 8265: 1988). (Versión oficial EN 28265:1994).
- UNE-EN-ISO 9391: 1995. Calidad del agua. Muestreo de macroinvertebrados en aguas profundas. Guía de utilización de aparatos de toma de muestra de colonización cualitativos y cuantitativos (ISO 9391:1993).

- EN ISO 8689-1: 1999. Calidad del agua. Clasificación biológica de los ríos. Parte1: Guía para la interpretación de los datos relativos a la calidad biológica a partir de estudios de macroinvertebrados béticos (ISO 8689-1:2000).
- EN ISO 8689-2: 1999. Calidad del agua. Clasificación biológica de los ríos. Parte 2: Guía para la presentación de los datos relativos a la calidad biológica a partir de estudios de macroinvertebrados béticos (ISO 8689-2:2000).

El grupo CEN TC 230 WG 2 está desarrollando otros estándares aplicables al muestreo de invertebrados (00230176 prEN 27828:1994 rev. *Guidance on handnet sampling of aquatic benthic macroinvertebrates*; 00230213 – *Guidance on the sampling and processing of the pupal exuviae of Chironomidae (Order Diptera) for ecological assessment*)

Del mismo modo, el manual de *USEPA Rapid Bioassessment Protocols* incluye directrices para el control de calidad de los trabajos de campo y de laboratorio.

En cualquier caso es muy importante la adecuada formación del personal que participa en el muestreo, análisis de las muestras y tratamiento de los resultados, por lo que deberían arbitrarse los mecanismos necesarios que aseguren este aspecto.

En el apartado siguiente se recogen algunas directrices sobre la calidad de los trabajos incluidos en el presente documento.

10.1. DIRECTRICES PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD EN LA TOMA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Objetivo: Realizar el trabajo de campo y evaluaciones según los procedimientos estándar previamente definidos	
Medidas	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar una hoja directriz que resuma de forma clara y didáctica las tareas y procedimientos a desarrollar en el trabajo de campo.
	<ul style="list-style-type: none"> • Documentar los trabajos y usar hojas de campo previamente preparadas en las que se pueda incluir: <ul style="list-style-type: none"> ○ La localización de la estación de muestreo (coordenadas GPS y esquema del tramo) y los códigos aplicables (código de estación, código de masa de agua, fecha, técnicos a cargo, etc.). ○ Datos para la caracterización hidromorfológica, y fisicoquímica. ○ Características del muestreo de invertebrados realizado (tipo de muestreo, nº muestras y submuestras; réplicas para control de calidad). ○ Especies identificadas no incluidas en la muestra. ○ Aspectos de interés (identificación de presiones e impactos fisicoquímicos e hidromorfológicos).
	<ul style="list-style-type: none"> • Aportar documentación fotográfica de las estaciones fluviales y lacustres. La comparación de fotos realizadas en diferentes años será de gran ayuda para la identificación de tendencias.

Tabla 4.11.: Realización del trabajo de campo y evaluación según los procedimientos estándar

Objetivo: Asegurar la correcta identificación de los taxones en el campo, si se aplica el método del IBMWP con identificación “in situ”	
Medidas	<ul style="list-style-type: none"> • Contar con personal entrenado para la identificación y manipulación de macroinvertebrados bentónicos.
	<ul style="list-style-type: none"> • Conservar de 1-3 individuos por taxón en viales con alcohol convenientemente etiquetados para su posterior comprobación (si fuera requerida).

Tabla 4.12.: Asegurar la correcta identificación de los taxones en el campo

Objetivo: Asegurar la correcta identificación de las muestras en el campo	
Medidas	<ul style="list-style-type: none"> • Etiquetar convenientemente el recipiente por el exterior, e incluir etiquetas con la misma información en el interior del mismo. Se indicarán los códigos del proyecto, de la estación y de la muestra (si se toma más de una); el nombre del río/lago y su localización; la fecha, el nombre del recolector; y el conservante utilizado.
	<ul style="list-style-type: none"> • Completar la cadena de custodia que acompañe a las muestras al laboratorio.

Tabla 4.13.: Asegurar la correcta identificación de las muestras en el campo

Objetivo: Asegurar que no se contaminan las muestras ni los sistemas acuáticos muestreados	
Medidas	<ul style="list-style-type: none"> • Aclarar con agua abundante y por ambas caras las redes usadas para el muestreo con la finalidad de que no queden ejemplares adheridos a la red. • Dejar secar la red o pasar por una solución de alcohol para reducir el riesgo de transportar especies no deseables de un río a otro.

Tabla 4.14.: asegurar que no se contaminan las muestras ni los sistemas acuáticos

Objetivo: Verificar los resultados del muestreo de los equipos de trabajo	
Medidas	<ul style="list-style-type: none"> • Tras tomar la muestra, tomar otra en un tramo situado aguas arriba y que tenga las mismas características del inicial. Esto permitirá conocer el nivel de variabilidad y determinar el nivel que se considere aceptable • Conservar al menos un ejemplar de los organismos que se identifican en el campo para comprobar que la identificación es la misma por parte de los diferentes equipos.

Tabla 4.15.: Verificar los resultados del muestreo de los equipos de trabajo

10.2. DIRECTRICES PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD EN EL LABORATORIO

Objetivo: Asegurar la correcta identificación de los diferentes taxones (familias, géneros o especies, según el caso)	
Medidas	<ul style="list-style-type: none"> • Contar con técnicos que posean formación. En la actualidad la formación de este personal se realiza en Universidades y centros de investigación. Es de vital importancia favorecer la organización de cursos de capacitación que faciliten la formación del personal. • Someter a un control de calidad los resultados obtenidos (Acreditación)
	<ul style="list-style-type: none"> • Realizar colecciones de los diferentes taxones recogidos en las estaciones de referencia y estaciones de la red de vigilancia.
	<ul style="list-style-type: none"> • Aportar documentación gráfica y fotográfica de los taxones.
	<ul style="list-style-type: none"> • Disponer de bibliografía adecuada para el nivel de estudio requerido.

Tabla 4.16.: Asegurar la correcta identificación de los diferentes taxones

Objetivo: Correcta manipulación de las muestras y organismos	
Medidas	<ul style="list-style-type: none"> • Evitar el deterioro de los organismos manejando la muestra de forma que se reduzca la abrasión (no lavar la muestra bajo el chorro fuerte del grifo, decantar con suavidad, no dejar secar la muestra).

Tabla 4.17.: Correcta manipulación de las muestras y organismos

10.3. DIRECTRICES PARA EL CONTROL DE CALIDAD EN EL TRATAMIENTO DE LOS DATOS

Objetivo: Control del manejo de datos y análisis de los resultados	
Medidas	<ul style="list-style-type: none"> • Todos los datos de un muestreo específico se deben identificar de forma individual, en la base de datos por medio de códigos.
	<ul style="list-style-type: none"> • La documentación de campo y laboratorio (muestras, estadillos, fotos) se guardará durante un periodo no inferior a 5-6 años.
	<ul style="list-style-type: none"> • Los datos en formato electrónico deberán incluir identificación de su origen (autores, fechas, etc...) y referencias para ampliar la información.

Tabla 4.18.: Control de la manejo de datos y análisis de los resultados



Bibliografía:



11. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- ▣ **Agencia Catalana de l'Aigua** (2003). Desenvolupament d'un índex integral de qualitat ecològica i regionalització ambiental dels sistemes lacustres de Catalunya. Centre d'estudis Avançats de Banes (CSIC). 88 pàgs.
- ▣ **Agencia Catalana de l'Aigua** (2004). Caracterització, regionalització i elaboració d'eines d'establiment de l'estat ecològic de les zones humides de Catalunya. Institut d'Ecologia Aquàtica. Universitat de Girona. 86 pàgs.
- ▣ **Alba-Tercedor J. y A. Sánchez-Ortega** (1988). Un método rápido y simple para evaluar la calidad biológica de las aguas corrientes basado en el de Hellawell (1978). *Limnetica* 4: 51-56.
- ▣ **Alba-Tercedor, J.** (1996). Macroinvertebrados acuáticos y calidad de las aguas de los ríos. IV Simposio del Agua en Andalucía (SIAGA). Almería. Vol II: 203-213. ISBN: 84-7840-261-6.
- ▣ **Alba-Tercedor, J. y A.M. Pujante** (2000). Running-water biomonitoring in Spain: Opportunities for a predictive approach. Pp:207-216. En: *Assessing the biological quality of fresh waters. RIVPACS and similar techniques* (J.F. Wright, D.W. Sutcliffe y M.T. Furse Editors). Freshwater Biological Association, Ambleside, 400 pàgs. ISBN: 0-900386-62.
- ▣ **Alba-Tercedor, J. y N. Prat** (1992). Spanish experience in the use of macroinvertebrates as biological pollution indicators. En: *River Water Quality. Ecological Assessment and Control. 1992.* pp733-738 (Eds. Newman, P.J., M.A. Piavaux y R.A. Sweeting). Commission of the European Communities. Brussels. ISBN.: 92-826-2929-5.
- ▣ **Alba-Tercedor, J., Jáimez-Cuellar, P., Álvarez, M., Avilés, J., Bonada, N., Casas, J., Mellado, A., Ortega, M., Pardo, I., Prat, N., Rieradevall, M., Robles, S., Sáinz-Cantero, C.E., Sánchez-Ortega, A., Suárez, M.L., Toro, M., Vidal-Abarca, M.R., Vivas, S. y C. Zamora-Muñoz** (2004). Caracterización del estado ecológico de ríos mediterráneos ibéricos mediante el índice IBMWP (antes BMWP'). *Limnetica* (2002) 21(3-4): 175-185.
- ▣ **Alba-Tercedor, J., Picazo-Muñoz, J. y C. Zamora-Muñoz** (1995). Relationships between the distribution of mayfly nymphs and water quality in the Guadalquivir River basin (Southern Spain). En: *Current Research on Ephemeroptera.* pp 41-54 (L.D. Corkum y J.J.H. Ciborowski Editors), Canadian Scholar Press Toronto.
- ▣ **Allan, J.D.** (1995). *Stream Ecology. Structure and function of running waters.* Chapman y Hall. London.
- ▣ **Andreu Moliner, E. y A. Camacho González** (2002). Recomendaciones para la toma de muestras de agua, biota y sedimentos en humedales Ramsar. Ministerio de Medio Ambiente. Dirección general de Conservación de la Naturaleza.
- ▣ **AQEM Consortium** (2002). Manual for the application of the AQEM system. A comprehensive method to assess european streams using benthic macroinvertebrates, developed for the purpose of the Water Framework Directive. Version 1.0 (www.aqem.de).
- ▣ **Armitage P.D. y Petts, G.E.** (1992). Biotic score and prediction to assess the effects of water abstractions on river macroinvertebrates for conservation purposes. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater ecosystems*, vol 2: 1-17.
- ▣ **Armitage P.D., Pardo I., Furse M.T. y J.F. Wright** (1990). Assessment and prediction of biological quality. A demonstration of a British macroinvertebrate-based method in two Spanish rivers. *Limnetica* 6: 147-156.
- ▣ **Armitage, P.D.; Moss, D; Wright, J.F. y M.T. Furse** (1983). The performance of a new biological water quality score system based on macroinvertebrates over a wide range of unpolluted running –water sites. *Water Res*, 17(3): 333-347.
- ▣ **Barbour M.T., Gerritsen J., Snyder B.D. y J.B. Strinbling** (1999). *Rapid Bioassessment Protocols for use in streams and wadeable rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish.* EPA 841-B-99-002. Environmental Protection Agency; Office of Water; Washington, D.C.
- ▣ **Barbour M.T., Strinbling J.B. y P.F.M. Verdonschot** (en prensa). The Multihabitat Approach of USEPA's Rapid Bioassessment Protocols: benthic Macroinvertebrates. *Limnetica*.
- ▣ **Benito de Santos G. y M.A. Puig García** (1999). BMWPC un índice biológico para la calidad de las aguas adaptado a las características de los ríos catalanes. *Tecnología del Agua* 191: 43-56.
- ▣ **Bonada N., Prat, N., Munné, A., Plans, M., Solà, C., Álvarez, M., Pardo, I., Moyà, G., Ramon, G., Toro, M., Robles, S., Avilés, J., Suárez, M.L., Vidal-Abarca M.R., Mellado, A., Moreno J.L., Guerrero, C., Vivas, S., Ortega, M., Casas, J., Sánchez-Ortega A., Jáimez-Cuellar, P. y J. Alba-Tercedor** (2004). Intercalibración de la metodología GUADALMED. Selección de un protocolo de muestreo para la determinación del estado ecológico de los ríos mediterráneos. *Limnetica* 21 (3-4): 13-33 (2002).
- ▣ **Chandler J.R.** (1970). A biological approach to water quality management. *Water Poll. Control*, 69: 415-422.
- ▣ **De Manuel, J y J. Armengol** (1993). Rotifer assemblages: a contribution to the typology of Spanish reservoirs. *Hydrobiologia*, 255/256: 421-428.
- ▣ **De Manuel, J. y D. Jaume** (1993). Zooplankton of reservoirs from the River Ebro basin (Spain): Relationships with some physical, chemical and biological features. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 25(2): 1236-1241.
- ▣ **De Pauw, N, Ghetti, P.F., Manzini, P. y Spaggiari, R.** (1992). Biological assessment methods for running water quality. *Ecological assessment and control.* Newman, P.J. (De.). C.C.E., Brussels, 217-248.
- ▣ **De Pauw, N. y G. Vanhooren** (1983). Method for biological quality assessment of watercourses in Belgium. *Hydrobiologia* 100: 153-168.
- ▣ **EVS** (2003). *GVRD Benthic Macroinvertebrate B-IBI Guide.* Prepared for the Greater Vancouver Regional District, Burnaby, BC by Environmental Consultants, North Vancouver, BC.

- **Eyto E. de, Irvine, K., García-Criado, F., Gyllström, M. Jeppensen E., Kornijow, R., Miracle R.M., Nykänen M., Bareiss, C., Cerbin, S., Salujoe, J., Franken, R., Stephens, D. y Moss, B.** (2003). The distribution of chydorids (Branchiopoda, Anomopoda) in European shallow lakes and its application to ecological quality monitoring. *Arch. Hydrobiol.* 156(2): 181–202.
- **García de Jalón D., y González del Tánago M.** (1986). Métodos biológicos para el estudio de la calidad de las aguas. Aplicación a la cuenca del Duero. ICONA. Monografía 45. Madrid. 244 p.
- **Ghetti, P.F. (1997). Manuale di applicazione indice biotico esteso** (I.B.E.). I macroinvertebrati nel controllo della qualità degli ambienti di acque correnti. Prov. Autonoma di Trento. Agenzia provinciale per la protezione dell'ambiente. Trento.
- **Ghetti, P.F. y G. Bonazzi** (1981). I macroinvertebrati nella sorveglianza ecologica dei corsi d'acqua. Consiglio Nazionale delle Ricerche AQ/1/127, 169 pág.
- **González del Tánago M. y García de Jalón D.** (1984). Desarrollo de un índice biológico para estimar la calidad de las aguas de la cuenca del Duero. *Limnetica* 1: 263-272.
- **Hellawell, J.M.** (1986). Biological indicator of freshwater pollution and environmental management. Elsevier Science Publ. Ltd., England, 546 pp.
- **Hering, D., Verdonschot, P.F.M., Moog, O. y Sanding L. Editors** (2004). Integrated Assessment of Running Waters in Europe. *Hydrobiologia* 513:1-3 (Special issue)
- **Jáimez-Cuellar, P., Vivas, S., Bonada, N., Robles, Mellado, A., Álvarez, M., Avilés, J., Casas, J., Ortega, M., Pardo, I., Prat, N., Rieradevall, M., Sáinz-Cantero, C.E., Sánchez-Ortega, A., Suárez, M.L., Toro, M., Vidal-Abarca, M.R., y Zamora-Muñoz, C. y J. Alba-Tercedor** (2004). Protocolo GUADALMED (PRECE). *Limnetica* (2002) 21(3-4): 187-204.
- **Kolkwitz R. y M. Marsson** (1902). Grundzüge für die biologische Beurteilung der Wassers nach seiner Flora und Fauna. Mitt. Prüfungsanst. Wasserversog. Abwasserreinig 1: 33-72.
- **Kornijow R., Kairesalo T.** (1994). A simple apparatus for sampling epiphytic communities associated with emergent macrophytes. *Hydrobiologia* 294: 141-143.
- **Margalef, R.** (1951). Species diversity in natural communities. *Barcelona, Publ. Inst.Biol..Appl.* 6: 59-72.
- **Moreno-Amich, R., Quintana, X.D., Suñer, L. Trobajo, R. Y Gascón, S.** (1999). Dinámica del heleoplancton en relación a las fluctuaciones hidrológicas en "Aiguamolls de l'Empordà" (NE de la Península Ibérica). Propuesta de un método sencillo de monitorización basado en la abundancia de grupos taxonómicos. *Limnetica* 16: 17-31
- **Moss et al.** (2003). The determination of ecological status in shallow lakes – a tested system (ECOFRAME) for implementation of the European Water Framework Directive. *Aquatic Conservation. Marine and Freshwater Ecosystems*, 13: 507-549.
- **Munné, A. y Prat, N.** (1999). Regionalización de la cuenca del Ebro para el establecimiento de los objetivos del estado ecológico de sus ríos. Informe para la CHE (Oficina de Planificación Hidrológica). Zaragoza, 186p.
- **National Water Council** (1981): River Quality: the 1980 survey and future outlook. London.
- **O'Malley C.** (1995). Seven ways to a successful dipping career. *Wings Beats* 6 (4): 23-24.
- **Palau, A. y Palomés, A.** (1986). Los macroinvertebrados bentónicos como elementos de juicio para la evaluación de la calidad biológica del río Segre (Lérida, NE España). *Limnetica* 2: 205-216.
- **Parlamento Europeo de la Unión Europea** (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for the Community actino in the field of water policy. *Off. J. Eur.Comm.* 327: 1-72.
- **Prat, N., G. González y X. Millet** (1986). Comparación crítica de dos índices de calidad del agua ISQA y BILL. *Tecnología del agua*, 31: 33-49.
- **Prat, N., Munné, A., Rieradevall, M., Solá, C.y Bonada, N.** (2000). ECOSTRIMED Protocolo para determinar el estado ecológico de los ríos mediterráneos. Diputació de Barcelona. Área de Medi Ambient (Estudis de la Qualitat Ecológica dels Rius: 8). 94 págs.
- **Prat, N., Puig, M.A., i González, G.** (1983). Predicció i control de la qualitat de les aigües dels rius Besòs i Llobregat. II. El poblament faunístic i la seva relació amb la qualitat de les aigües. *Monografies*, 9. Diputació de Barcelona. Servei del Medi Ambient.
- **Prat, N., Rieradevall, M., Munné, A. y Chacón G.** La qualitat ecológica del Besòs i el Llobregat. Informe 1994.1995. Diputació de Barcelona.
- **Rico E., Rallo A., Sevillano, M.A. y Arretxe M.L.** (1992). Comparison of several biological indices based on river macroinvertebrate benthic community for assessment of running water quality. *Annls. Limnol.* 28(2), 147-156.
- **Rico E., Rallo, A., Sevillano, M.A. y Arretxe M.L.** (1992). Comparison of several biological indices based on river macroinvertebrate benthic community for assessment of running water quality. *Annls. Limnol.* 28(2): 147-156.
- **Rosenberg, D.M. y Resh, V.H.** (1993). *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates*. Chapman y Hall. 488 p.
- **Rosenberg, D.M., Davies, I.J., Cobb, D.G. y Wiens A.P.** Protocols for Measuring Biodiversity: Benthic Macroinvertebrates in Fresh Waters. Freshwater Institute, 501 University Crescent, Winnipeg, Manitoba, R3T2N6.
- **Shannon, C.E. y W. Weaver** (1963). *The Mathematical Theory of Communication*. Univ. of Illinois Press. ISBN 0252725484.
- **Spence K., Soranno P.A. y Serbin R.D.** (2000). Macroinvertebrates associated with submerged macrophytes: sample size and power to detect effects. *Hydrobiologia* 441: 133-139.

- **Stevenson R.J., Bailey, R.C., Harrass M.C., Hawkins, CH. P., Alba-Tercedor J., Couch C., Dyer, S., Fulk, F.A., Harrington J.M., Hunsaker C.T. y Johnson R.K.** (2004). Designing Data Collection for Ecological Assessments. In: Ecological Assessment of Aquatic Resources. Michael T. Babour et al. editors. 55-84 p.
- **Stevenson R.J., Bailey, R.C., Harrass M.C., Hawkins, CH. P., Alba-Tercedor J., Couch C., Dyer, S., Fulk, F.A., Harrington J.M., Hunsaker C.T. y Johnson R.K.** (2004). Interpreting Results of Ecological Assessments. In: Ecological Assessment of Aquatic Resources. Michael T. Babour et al. editors. 85-111 p.
- **Verneaux, J. y G. Tuffery** (1967). Une méthode de zoologie pratique de détermination de la qualité biologique des eaux courantes. Annales scientifiques de l'Université de Besaçon, Zoologie 3: 79-90.
- **Vinson, M.R. y Hawkins, C.P.** (1996). Effects of sampling area and subsampling procedure on comparisons of taxa richness among streams. Journal North American benthological society, 15: 392-399.
- **Williams, D.D. y Hynes, H.B.N.**, 1976. The recolonization mechanisms of stream benthos. Oikos., 27: 265-272.
- **Woodiwis F.S.** (1978). Second Technical Seminar – Background information. Commission of the European Communities.
- **Woodiwis, F.S.** (1964). The biological system of stream classification used by Trent River Board. Chemy.Indust., 11: 443-447.
- **Wright J.F., Armitage P.D. y M.T. Furse** (1989). Prediction of invertebrate communities using stream measurements. Regulated Rivers 4: 147-155.
- **Wright, J.F., Armitage, P.D. Furse, M.T. y Moss, D.** (1985). The classification and prediction of macroinvertebrate communities in British rivers. Rep. Freshwat.biol.Ass. 53:80-93.
- **Wright, J.F., Furse M.T. y P.D. Armitage** (1993). RIVPACS – a techniques for evaluating the biological quality of rivers in the UK. European Water pollution Control, 3(4): 15-25.
- **Wright, J.F., Sutcliffe, D.W. y Furse, M.T.** (2000). Assessing the biological quality of fresh waters. RIVPACS and other techniques. Freshwater Biological Association.
- **Wrona, F.J., Culp, J.M. y R.W. Davies** (1982). Macroinvertebrate subsampling: a simplified apparatus and approach. Can.J.Fish.Aquat.Sci., 39:1051 – 1054.
- **Zamora-Muñoz, C., Sáinz-Cantero C.E., Sánchez-Ortega, A. y Alba-Tercedor, J.** (1995). Are biological indices BMWP' and ASPT' and their significance regarding water quality seasonally dependent? Factors explaining their variations. Water Research 29(1): 285-290.

12. BIBLIOGRAFÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS INVERTEBRADOS BENTÓNICOS

- **Adam, W.** (1960). Faune de Belgique. Tome I. Mollusques terrestres et dulcicoles. Ed. Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique. 402 pp.
- **Alba – Tercedor, J.** (1981). Recopilación de las citas de efemerópteros en la Península Ibérica e Islas Baleares. Trab. Monogr. Dep. Zool. Univ. Granada, (N.S.), 4 (2): 41-81.
- **Alba – Tercedor, J.** (1982). Las familias y géneros de las ninfas de Efémeras de la Región Paleártica Occidental. Claves para la identificación de la fauna española, 4. Publicaciones de la Universidad Complutense de Madrid. 28 pp.
- **Alba – Tercedor, J. y Derka, T.** (2003). *Torleya nazarita* sp.n., a new species from southern Spain (Ephemeroptera: Ephemerellidae). Aquatic Insects, 25(1): 23-32.
- **Alba – Tercedor, J. & Derka, T.** (2004). The status of knowledge of the genus *Ecdyonurus* in the Iberian Peninsula, with description of two new species of the *E. venosus* group from Spain (Ephemeroptera: Heptageniidae). Aquatic Insects, 26 (3/4): 227-242.
- **Alonso, M.** (1996). Crustacea, Branchiopoda. M.A. Ramos Editor. Fauna Ibérica, 7. Museo Nacional de Ciencias naturales. CSIC. Madrid. 486 págs.
- **Arconada, B. y Ramos, M.A.** (2001). New data on Hydrobiidae Systematics: two new genera from the Iberian Peninsula. Journal of Natural History, 35: 949-984.
- **Aston, R. J.** (1971). The Oligochaeta worms of four Welsh mountain streams. Nature Wales, 12: 213-220.
- **Azpeitia, F.** (1929). Monografía de las Melanopsis vivientes y fósiles de España. Mem. Inst. Geol. Min. España. 402 pp.
- **Azpeitia, F.** (1993). Conchas bivalvas de agua dulce de España y Portugal. Mem. Inst. Geol. Min. España. 2 tomos: 402 y 763 pp.
- **Aubert, J.** (1963). Les Plécoptères de la Péninsule Ibérique. EOS, 29 (1/2): 23-107.
- **Baena, M. y Vázquez, M.A.** (1986). Catálogo preliminar de los Heterópteros acuáticos ibéricos (Heteroptera: Nepomorpha, Gerromorpha). Graellsia, 42: 61-89.
- **Ball, I.R. y Reynoldson, T.B.** (1981). British Planarians. Cambridge University Press, New York.
- **Baltanás, A., Beroiz, B. y López, A.** (1996). Lista faunística y bibliográfica de los Ostrácodos no-marinos (Crustacea, Ostracoda) de la Península Ibérica, Islas Baleares e Islas Canarias. Listas de la flora y fauna de las aguas continentales de la Península Ibérica. Publ. N° 12. 71 pp.

- **Bargues, M.D., Vigo, M., Horak, P., Dvorak, J., Patzner, R.A., Pointier, J.P., Jackiewicz, M., Meier-Brook, C. y Mas-Coma, S.** (2001). European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematoidases, base don nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Infections, Genetics and Evolution*, 1: 85-107.
- **Belfiore, C.** (1983). Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane. 24. Efemeroteri. Consiglio Nazionale delle Ricerche AQ/1/201. 113 pp.
- **Boeters, H.D.** (1988). Moitessieriidae und Hydrobiidae in Spanien und Portugal (Mollusca: Prosobranchia). *Arch. Moll.*, 118(4/6): 181-261.
- **Bouchard, R. W., Jr.** (2004). Guide to aquatic macroinvertebrates of the Upper Midwest. Water Resources Center, University of Minnesota, St. Paul, MN. 208 pp.
- **Bouchard, M., Tachet, H.-Perrin, J.F.** (1982). Les Hydropsychidae (Trichoptera) du Haut-Rhone entre Geneve et Lyon. *Annales de Limnologie*, 18(1): 61-80.
- **Brindle, A.** (1960). The larvae and pupae of the British Tipulidae (Diptera: Tipulidae). *Transactions of the Society for British Entomology*, 14 (3): 63-111.
- **Brindle, A.** (1967). The larvae and Pupae of the british Cylindrotominae and Limoniinae (Diptera, Tipulidae). *Transactions of the Society for British Entomology*, 17(7): 151-215.
- **Camargo, J.A. y García de Jalón, D.** (1992) Redescipción de la larva de *Agapetus laniger* (Pictet, 1834) (Trichoptera, Glossosomatidae) a partir de ejemplares de la Península Ibérica. *Boln. Asoc. Esp. Ent.*, 16: 83-93.
- **Campaioli, S., Ghetti, P.F., Minelli, A. y S. Ruffo** (1994). Manuali per il riconoscimento dei macroinvertebrati delle acque dolci italiane. Provincia Autonoma di Trento, vol. I.
- **Carchini, G.** (1983). Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane. 21. Odonati. Consiglio Nazionale delle Ricerche AQ/1/198. 80 pp.
- **Castagnolo, L., Franchini, D. y Giusti, F.** (1980). Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane. 10. Bivalvi. Consiglio Nazionale delle Ricerche AQ/1/49. 64 pp.
- **Conesa, M.A.** (1985). Larvas de Odonatos. Claves para la identificación de la fauna española, 14. Publicaciones de la Universidad Complutense de Madrid. 39 pp.
- **Consiglio, C.** (1980). Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane. 9. Plecotteri. Consiglio Nazionale delle Ricerche AQ/1/77. 68 pp.
- **Dahm, A. G.** (1958). Taxonomy and ecology of five species groups in the family Planariidae (Turbellaria, Tricladida, Paludicola). *Malmö-Nya Litografen*. 241 pp.
- **Davies, L.** (1968). A key to the British species of Simuliidae (Diptera) in the larval, pupal and adult stages. *Freshwater Biological Association. Scientific Publication No. 24.* 126 pp.
- **Dethier, M.** (1985 – 86). Hétéroptères aquatiques et ripicoles. Genres et principales espèces. *Bulletin mensuel de la Société Linnéenne de Lyon*, 54 (10): 250-261 y 55 (1): 11-40.
- **Dethier, M. y Haenni, J.P.** (1986). Planipennes, megalopteres et lepidopteres a larves aquatiques. *Bulletin mensuel de la Société Linnéenne de Lyon*, 55(6): 201-224.
- **De Manuel, J.** (1997). Rotífers dels embassaments espanyols peninsulars: Ecologia I Aspectes sistemàtics I zoogeogràfics. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. Facultad de Biología. Departamento de Ecología. 190 págs.
- **De Pauw, N. y Vannevel, R.** (1991) Macro-Invertebraten en Waterkwaliteit. Dossiers stichting Leefmilieu, 11: 316 pp.
- **De Pauw, N., Van Damme, D. y Bij De Vaate, A.,** (1995). Manual for macro-invertebrate identification and water quality assessment. Document intended for use in the "Integrated Programme for implementation of the Recommended Transnational Monitoring Strategy for the Danube River Basin" a CEC PHARE/TACIS project. State University of Ghent.
- **Descarpentries, A. y Villiers, A.** (1973). Petits animaux des eaux douces. Natan Ed., Paris.
- **Disney, R.H.L.** (1975). A key to British Dixidae. *Freshwater Biological Association. Scientifica Publication, No. 31.* 78 pp.
- **Dussart, B.** (1967). Les Copépodes des eaux continentales d'Europe occidentale, I : Calanoïdes et Harpacticoides. Boubee y Cie Ed. Collection « Faunes et Flores actuelles ». Paris. 500 págs.
- **Dussart, B.** (1969). Les Copépodes des eaux continentales d'Europe occidentale, II. Cyclopoïdes et biologie. Bouee y Cie Ed., Collection « Faunes et Flores actuelles ». Paris.
- **Edington, J. M. y Hildrew, A.G.** (1981). A key to the caseless caddis larvae of the British isles with notes on their ecology. *Freshwater Biological Association. Scientific Publication No. 43.* 92 pp.
- **Elliot, J. M.** (1977). A key to the larvae and adults of British freshwater Megaloptera and Neuroptera, with notes on their life cycles and ecology. *Freshwater Biological Association. Scientific Publication No. 35.* 52 pp.
- **Elliot, J.M. y Mann, K.H.** (1979). A key to the British freshwater leeches. *Freshwater Biological Association. Scientific Publication No. 40.* 72 pp.
- **Elliot, J.M. Humpesch, U.H. y Macan, T.T.** (1988). Larvae of the British Ephemeroptera: A key with ecological notes. *Freshwater Biological Association. Scientific Publication No. 49.* 145 pp.
- **Faessel, B.** (1985). Les trichoptères. Données biologiques, éthologiques et écologiques. Clés de détermination larvaire des familles et des principaux genres de France. *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, 299: 1-41.
- **Fitter, R. y Manuel, R.** (1986). A Collins field guide to Freshwater life of Britain and North-West Europe. William Collins Sons y Co. Ltd, London, 382 pp.
- **Friday, L.E.** (1988). A key to the adults of British Water Beetles. *Field Studies*, 7: 1-151.

- **Gamo-García, J.** (1987). Claves de identificación de los turbelarios de las aguas continentales de la Península Ibérica e Islas Baleares. Asociación Española de Limnología. 35 pp.
- **García de Jalón, D.** (1981). Description of Hydropsyche larvae found in the Iberian Peninsula. Proceedings of the 3rd International Symposium on Trichoptera. Series Entomologica, 20: 87-92. Dr. W. Junk Publishers, The Hague.
- **Gasull, L.** (1971). Fauna malacológica de las aguas continentales del Sudeste Ibérico. Bol. Soc. Hist. Nat. Baleares, 16: 23-93.
- **Gasull, L.** (1981). Fauna malacológica terrestre y de agua dulce de la provincia de Castellón de la Plana. Bol. Soc. Hist. Nat. Baleares, 25: 55-102.
- **Germain, L.** (1969). Faune de France. Mollusques terrestres et fluviatiles. Klaus reprint. Nendeln/Liechtenstein. 817 pp.
- **Ghetti, P.F. y McKenzie, K.** (1981). Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane. 11. Ostracodi. Consiglio Nazionale delle Ricerche AQ/1/108. 83 pp.
- **Girod, A., Bianchi, I. y Mariani, M.** (1980). Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane. 7. Gasteropodi, 1. Consiglio Nazionale delle Ricerche AQ/1/44. 86 pp.
- **Giusti, F. y Pezzoli, E.** (1980). Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane. 8. Gasteropodi, 2. Consiglio Nazionale delle Ricerche AQ/1/47. 67 pp.
- **Gledhill, T., Sutcliffe, D.W. y Williams, W.D.** (1993). British Freshwater Crustacea Malacostraca: A Key with Ecological Notes. Freshwater Biological Association. Scientific Publication No. 52. 173 pp.
- **Glöer, P. y Meier-Brook, C.** (1994). Süßwassermollusken Deutscher Jugendbund für Naturbeobachtung. Hamburg. 136 pp.
- **González, G.** (1998). Claves para la identificación de las larvas y pupas de los simúlidos (Diptera) de la Península Ibérica. Asociación Española de Limnología. 77 pp.
- **González, M., Da Terra, L.S.W., García de Jalón, D. y Cobo, F.** (1992). Lista faunística y bibliográfica de los Tricópteros de la Península Ibérica e Islas Baleares. Listas de la flora y fauna de las aguas continentales de la Península Ibérica. Publ. N° 11. 200 pp.
- **Henry, J.P. y Magniez, G.** (1983). Crustacées Isopodes (principalement Asellotes). Bulletin mensuel de la Société Linnéenne de Lyon, 52(10) : 319-357.
- **Hynes, H.B.N.** (1977). A key to the adults and nymphs of British Stoneflies (Plecoptera) with notes on their Ecology and Distribution. Freshwater Biological Association. Scientific Publication No. 17. 92 pp.
- **Illies, J.** (1978). Limnofauna Europaea. Gustav Fischer Verlag-Stuttgart-New York, Swets y Zeitlinger-Amsterdam. 532 pp.
- **Jiménez, J. M. y García-Más, I.** (1981). El género Batracobdella Viguiet, 1879, en la Península Ibérica (Hirudinea, Glossiphoniidae). Bol. R. Soc. Española Hist. Nat. (Biol.), 79: 265-271.
- **Jiménez, J.M. y García – Más, I.** (1982). Hirudíneos de España: Catálogo provisional. Bolm. Soc. Port. Ciè. Nat., 20: 119-125.
- **Kiefer, F.** (1978a). Freilebende Copepoda. In: Das zooplankton der binnengewässer, 2 Teil: 1-343 (Die Binnengewässer 26, 2 Teil). Schweizerbart, Stuttgart.
- **Kiefer, F.** (1978b). Calanoida. In: Limnofauna europaea. J. Illies (ed.): 211-213. G.F. Verlag. Stuttgart-New York.
- **Koste, W.** (1978). Rotatoria. Die Radertiere Mitteleuropas (Überordnung Monogononta). Bestimmungswerk begründet von max Voigt. 2 vols. (Borntraeger, Stuttgart).
- **Lafont, M.** (1983). Annélides Oligochètes. Bulletin mensuel de la Société Linnéenne de Lyon, 4: 108-135.
- **Macan T.T.** (1975). Guía de animales. Invertebrados de agua dulce. Ediciones Universidad de Navarra. Pamplona. 118 págs.
- **Macan, T.T.** (1977). A key to the British fresh- and brackish-water Gastropods with notes on their ecology. Freshwater Biological Association. Scientific Publication No. 13. 46 pp.
- **Mann, K.H.** (1962). Leeches (Hirudinea). Their structure, Physiology, Ecology and Embryology. Pergamon Press, 201 pp.
- **Margalef, R.** (1953). Los crustáceos de las aguas continentales ibéricas. Min. Agricultura, Inst. For. Inv. Exp., Madrid 243 págs.
- **Margalef, R.** (1955). Los organismos indicadores en la Limnología. Biología de las aguas continentales. 12. Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias. Madrid. 300 pp.
- **Martínez-Ortí, A. y Robles, F.** (2003). Moluscos continentales de la Comunidad Valenciana. Generalitat Valenciana. Conselleria de Territori i Habitatge. 259 pp.
- **McCafferty, W.P.** (1981). Aquatic Entomology. Science Books International. Boston.
- **McCafferty, W.P.** (1983). Aquatic Entomology. Jones and Bartlet Publishers, Inc. 448 pp.
- **Meier-Brook, C.** (1983). Taxonomic studies on Gyraulax (Gastropoda: Planorbidae). Malacología, 24(1-2): 1-113.
- **Miller, P.L.** (1987). Dragonflies. Naturalists' Handbooks, 7: 1-84.
- **Minelli, A.** (1977). Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane 1. Irudinei. Consiglio Nazionale delle Ricerche AQ/1/2. 43 pp.
- **Minelli, A.** (1979). Fauna d'Italia: Hirudinea. Ed. Calderini. Bologna. 152 pp.

- **Montes, C. y Soler, A.G.** (1986). Lista faunística y bibliográfica de los coleópteros acuáticos Dryopoidea (Dryopidae y Elmidae) de la Península Ibérica e Islas Baleares. Listas de la flora y fauna de las aguas continentales de la Península Ibérica. Publ. Nº 3. 38 pp.
- **Moretti, G.** (1983). Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane. 19. Tricotteri. Consiglio Nazionale delle Ricerche AQ/1/1996. 155 pp.
- **Mouthon, J.** (1982). Les mollusques dulcicoles. Données biologiques et écologiques. Clés de détermination des principaux genres de Bivalves et de Gasterópodes de France. Bull. Francç. Piscicultura, 5: 1-27.
- **Needham, J.G. y Needham, P.R.** (1978). Guía para el estudio de los seres vivos de las aguas dulces. Ed. Reverté. Barcelona. 131 pp.
- **Nieser, N. y Montes, C.** (1984). Lista faunística y bibliográfica de los Heterópteros acuáticos (Nepomorpha y Gerromorpha) de España y Portugal. Listas de la flora y fauna de las aguas continentales de la Península Ibérica. Publ. Nº 1. 69 pp.
- **Nieser, N., Baena, M., Martínez-Avilés, J. y Millán, A.** (1994). Claves para la identificación de los heterópteros acuáticos (Nepomorpha y Gerromorpha) de la Península Ibérica- con notas sobre las especies de las Islas Azores, Baleares, Canarias y Madeira. Asociación Española de Limnología. 112 pp.
- **Nourisson, M. y Thiery, A.** (1988). Crustacés Branchiopodes (Anostracés, Notostracés, Conchostracés). Bulletin mensuel de la Société Linnéenne de Lyon, 57(3-4): 75-135.
- **Ocaña, A.** (1990). Clave de identificación de las especies de nematodos dulceacuícolas de la Península Ibérica (órdenes: Monhysterida, Araeolaimida, Chromadorida y Enoplida). Asociación Española de Limnología. 83 pp.
- **Pattée, E. y Goubault, N.** (1981). Turbellariés triclades paludicoles (planaires d'eau douce). Bulletin mensuel de la Société Linnéenne de Lyon, 9: 279-303.
- **Pinkster, S.** (1973). The Echinogammarus berilloni-group, a number of predominantly Iberian amphipod species (Crustacea). Bijdr. Dierk., 43 (1): 1-38.
- **Pirsinu, Q.** (1981). Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane. 13. Palpicorni (Coleoptera: Hydraenidae, Helophoridae, Spercheidae, Hydrochidae, Hydrophilidae, Sphaeriidae). Consiglio Nazionale delle Ricerche AQ/1/128. 97 pp.
- **Puig, M.A.** (1984). Efemerópteros y Plecópteros de los ríos catalanes. Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona, 533 pp.
- **Puig, M.A.** (1999). Els macroinvertebrats dels rius catalans. Guia il·lustrada. Generalitat de Catalunya. Departament de Medi Ambient. 251 pp.
- **Ramos, M.A., Arconada, B., Rolán, E. y Moreno, D.** (2000). A new genus and a new species of hydrobiid snail (Mollusca; Gastropoda; Hydrobiidae) from eastern Spain. Malacologia, 43(1-2): 75-101.
- **Reynoldson, T.B.** (1978). A key to the British Species of Freshwater Triclad. Freshwater Biological Association. Scientific Publication. Nº 23: 32 pp.
- **Richoux, P.** (1982). Introduction pratique a la systematique des organismes des eaux continentales françaises. Coléoptères aquatiques (Genres: Adultes et Larves). Bulletin mensuel de la Société Linnéenne de Lyon, 51 (4,8 y 9): 105-304.
- **Rico, E. Pérez, L.C. y Montes, C.** (1990). Lista faunística y bibliográfica de los Hydradephaga (Coleoptera: Haliplidae, Hygrobiidae, Gyrinidae, Noteridae, Dytiscidae) de la Península Ibérica e Islas Baleares. Listas de la flora y fauna de las aguas continentales de la Península Ibérica. Publ. Nº 7. 216 pp.
- **Rivosecchi, L.** (1984). Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane. 28. Ditteri. Consiglio Nazionale delle Ricerche AQ/1/206. 177 pp.
- **Rolán, E. y Martínez-Ortí, A.** (2003). Nuevas especies de la familia Hydrobiidae (Mollusca, Orthogastropoda) de la Comunidad Valenciana. Iberus, 21(1): 191-206.
- **Sánchez-ortega, A. y Alba-Tercedor, J.** (1987). Lista faunística y bibliográfica de los Plecópteros (Plecoptera) de la Península Ibérica y Baleares. Listas de la flora y fauna de las aguas continentales de la Península Ibérica. Publ. Nº 4. 133 pp.
- **Sánchez-Ortega, A. y Alba-Tercedor, J.** (2002). Lista faunística y bibliográfica de los Plecópteros (Plecoptera) de la Península Ibérica e Islas Baleares. Listas de la flora y fauna de las aguas continentales de la Península Ibérica. Publ. Nº 16. 198 pp.
- **Sansoni, G.** (1988). Atlante per il riconoscimento dei Macroinvertebrate dei corsi d'acqua italiani. Provincia Autonoma di Trento. Stazione Sperimentale Agraria Forestale. Servizio Protezione Ambiente. 191 pp.
- **Satchell, G. H.** (1947). The larvae of the british species of Psychoda (Diptera: Psychodidae). University College, Nottingham, 38: 51-69.
- **Satchell, G.H.** (1949). The early stages of the british species of Pericoma Walker (Diptera: Psychodidae). Transactions of the Royal Society of London, 100 (15): 411-447.
- **Savage, A.A.** (1989). Adults of the British aquatic Hemiptera Heteroptera. A key with ecological notes. Freshwater Biological Association. Scientific Publication No 50: 173 pp.
- **Sawyer, R.T.** (1974). Leeches (Annelida: Hirudinea). En: Pollution Ecology of Freshwater Invertebrates (Eds. C.W. Hart, jr. y S.L.H. Fuller). Pp. 82-136. Academic Press.

- **Soriano, O., Cobo, F., Rieradevall, M. y Prat, N.** (1997). Lista faunística y bibliográfica de los quironómidos (Diptera, Chironomidae) de la Península Ibérica e Islas Baleares. Listas de la flora y fauna de las aguas continentales de la Península Ibérica. Publ. N° 13. 210 pp.
- **Tachet, H., Bournaud, M. y Richoux, P.** (1980). Introduction a l'étude des macroinvertebrées des eaux douces (Systématique élémentaire et aperçu écologique). Université Lyon I. Association française de Limnologie.
- **Tachet, H., Richoux, P. y Usseglio-Polatera, P.** (2000). Invertébrés d'eau douce. Systématique, biologie, écologie. CNRS editions. 588 págs.
- **Tamani, L.** (1979). Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane. 6. Eterotteri Acquatici. Consiglio Nazionale delle Ricerche AQ/1/45. 106 pp.
- **Thorp, J.H. y Covich, A.P.** (1991). Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates. Academic Press Inc. San Diego. California.
- **Traveset, A.** (1986). Clave de identificación de las esponjas de agua dulce de la Península Ibérica. Asociación Española de Limnología. 25 pp.
- **Valdecasas, A.G.** (1988). Lista sinonímica y bibliográfica de las Hidracnelas (Acari, Hydrachnellae) de la Península Ibérica, Islas Baleares e Islas Canarias. Listas de la flora y fauna de las aguas continentales de la Península Ibérica. Publ. N° 5. 81 pp.
- **Valladares, L.F. y Montes, C.** (1991). Lista faunística y bibliográfica de los Hydraenidae (Coleoptera) de la Península Ibérica e Islas Baleares. Listas de la flora y fauna de las aguas continentales de la Península Ibérica. Publ. N° 10. 93 pp.
- **Valladares, L.F. y Ribera, I.** (1999). Lista faunística y bibliográfica de los Hydrophiloidea acuáticos (Coleoptera) de la Península Ibérica e Islas Baleares. Listas de la flora y fauna de las aguas continentales de la Península Ibérica. Publ. N° 15. 114 pp.
- **Vázquez, A. y Baena, M.** (1986). Las familias y géneros de los Hemípteros acuáticos de España. Claves para la identificación de la fauna española, 9. Pub. Univ. Complutense Madrid. 31 pp.
- **Vera, R.** (1978). Claves de determinación de familias y géneros del orden Trichoptera (Larvas) de la Región Paleártica Occidental. Universidad Complutense de Madrid. 122 pp.
- **Verneaux, J. y Faessel, B.** (1979). Larves du genre *Hydropsyche* (Trichoptères Hydropsychidae) taxonomie, données biologiques et écologiques. Annales de Limnologie, 12 (1): 7-16.
- **Vidal-Abarca, C. y Suárez, M.L.** (1985). Lista faunística y bibliográfica de los moluscos (Gastropoda y Bivalvia) de las aguas continentales de la Península Ibérica e Islas Baleares. Listas de la flora y fauna de las aguas continentales de la Península Ibérica. Publ. N° 2. 193 pp.
- **Vinçon, G. y Clergue-Gazeau, M.** (1993). Les Simulies (Diptera, Simuliidae) dus Sud-Ouest de l'Europe : le crénal et l'épirhithral. Anns. Limnol., 29(2): 157-169.
- **Wallace, I.D., Wallace, B. y Philipson, G.N.** (1990). A key to the case-bearing caddis larvae of Britain and Ireland. Freshwater Biological Association. Scientific Publication No. 51: 237 pp.
- **Williams, D.D. y Feltmate, B.W.** (1992). Aquatic Insects. C.A.B. Int., Toronto. 358 pp.
- **Wilson, R.S. y Ruse, L.P.** (2005). A guide to the identification of genera of Chironomid pupal exuviae occurring in Britain and Ireland (including common genera from Northern Europe) and their use in monitoring lotic and lentic freshwaters. Freshwater Biological Association Special Publication No. 13. 176 pp.
- **Zamora-Muñoz, C. y Alba-Tercedor, J.** (1992). Description of the larva of *Rhyacophila* (*Rhyacophila*) *nevada* Schmid, 1952 and key to the species of *Rhyacophila* of the Iberian Peninsula (Trichoptera: Rhyacophilidae). Aquatic Insects, 14: 65-71.
- **Zariquiey, R.** (1968). Crustáceos decápodos ibéricos. Investigación Pesquera, 32: 1-510.



Apéndice:

■ Formatos citados en los procedimientos



HOJA DE CÁLCULO DEL IBMWP

Nº Estación:
Código masa de agua:
Tipo:
UTM:

Río:
Localidad:
Fecha/Hora:
Técnico:

ARÁCNIDOS	Punt.	EFEMERÓPTEROS	Punt.	ODONATOS	Punt.
<i>Hidracarina</i>	4	<i>Baetidae</i>	4	<i>Aeshnidae</i>	8
COLEÓPTEROS		<i>Caenidae</i>	4	<i>Calopterygidae</i>	8
<i>Chrysomelidae</i>	4	<i>Ephemerellidae</i>	7	<i>Coenagrionidae</i>	6
<i>Clambidae</i>	5	<i>Ephemeridae</i>	10	<i>Cordulegasteridae</i>	8
<i>Curculionidae</i>	4	<i>Heptageniidae</i>	10	<i>Corduliidae</i>	8
<i>Dryopidae</i>	5	<i>Leptophlebiidae</i>	10	<i>Gomphidae</i>	8
<i>Dytiscidae</i>	3	<i>Oligoneuriidae</i>	5	<i>Lestidae</i>	8
<i>Elmidae</i>	5	<i>Polymitarcidae</i>	5	<i>Libellulidae</i>	8
<i>Gyrinidae</i>	3	<i>Potamanthidae</i>	10	<i>Platycnemididae</i>	6
<i>Haliplidae</i>	4	<i>Prosopistomatidae</i>	7	OLIGOQUETOS	
<i>Helophoridae</i>	5	<i>Siphonuridae</i>	10	Todos	1
<i>Hydraenidae</i>	5	HETERÓPTEROS		PLECÓPTEROS	
<i>Hydrochidae</i>	5	<i>Aphelocheiridae</i>	10	<i>Capniidae</i>	10
<i>Hydrophilidae</i>	3	<i>Corixidae</i>	3	<i>Chloroperlidae</i>	10
<i>Hygrobiidae</i>	3	<i>Gerridae</i>	3	<i>Leuctridae</i>	10
<i>Noteridae</i>	3	<i>Hydrometridae</i>	3	<i>Nemouridae</i>	7
<i>Psephenidae</i>	3	<i>Mesoveliidae</i>	3	<i>Perlidae</i>	10
<i>Scirtidae (=Helodidae)</i>	3	<i>Naucoridae</i>	3	<i>Perlodidae</i>	10
CRUSTÁCEOS		<i>Nepidae</i>	3	<i>Taeniopterygidae</i>	10
<i>Asellidae</i>	3	<i>Notonectidae</i>	3	TRICÓPTEROS	
<i>Astacidae</i>	8	<i>Pleidae</i>	3	<i>Beraeidae</i>	10
<i>Atyidae</i>	6	<i>Veliidae</i>	3	<i>Brachycentridae</i>	10
<i>Corophiidae</i>	6	HIRUDÍNEOS		<i>Calamoceratidae</i>	10
<i>Gammaridae</i>	6	<i>Erpobdellidae</i>	3	<i>Ecnomidae</i>	7
<i>Ostracoda</i>	3	<i>Glossiphoniidae</i>	3	<i>Glossosomatidae</i>	8
<i>Palaemonidae</i>	6	<i>Hirudidae</i>	3	<i>Goeridae</i>	10
DÍPTEROS		<i>Piscicolidae</i>	4	<i>Hydropsychidae</i>	5
<i>Anthomyiidae (*)</i>	4	NEURÓPTEROS		<i>Hydroptilidae</i>	6
<i>Athericidae</i>	10	<i>Sialidae</i>	4	<i>Lepidostomatidae</i>	10
<i>Blephariceridae</i>	10	LEPIDÓPTEROS		<i>Leptoceridae</i>	10
<i>Ceratopogonidae</i>	4	<i>Crambidae (=Pyralidae)</i>	4	<i>Limnephilidae</i>	7
<i>Chironomidae</i>	2	MOLUSCOS		<i>Molannidae</i>	10
<i>Culicidae</i>	2	<i>Ancylidae</i>	6	<i>Odontoceridae</i>	10
<i>Dixidae</i>	4	<i>Bithyniidae</i>	3	<i>Philopotamidae</i>	8
<i>Dolichopodidae</i>	4	<i>Ferrissidae</i>	6	<i>Phryganeidae</i>	10
<i>Empididae</i>	4	<i>Hydrobiidae</i>	3	<i>Polycentropodidae</i>	7
<i>Ephydriidae</i>	2	<i>Lymnaeidae</i>	3	<i>Psychomyiidae</i>	8
<i>Limoniidae</i>	4	<i>Neritidae</i>	6	<i>Rhyacophilidae</i>	7
<i>Psychodidae</i>	4	<i>Physidae</i>	3	<i>Sericostomatidae</i>	10
<i>Ptychopteridae</i>	4	<i>Planorbidae</i>	3	<i>Uenoidae (=Thremmatidae)</i>	10
<i>Rhagionidae</i>	4	<i>Sphaeriidae</i>	3	TURBELARIOS	
<i>Scatophagidae (*)</i>	4	<i>Thiaridae</i>	6	<i>Dendrocoelidae</i>	5
<i>Sciomyzidae</i>	4	<i>Unionidae</i>	6	<i>Dugesidae</i>	5
<i>Simuliidae</i>	5	<i>Valvatidae</i>	3	<i>Planariidae</i>	5
<i>Stratiomyidae</i>	4	<i>Viviparidae</i>	6		
<i>Syrphidae</i>	1				
<i>Tabanidae</i>	4				
<i>Thaumaleidae</i>	2				
<i>Tipulidae</i>	5				

(*) *Anthomyiidae* y *Scatophagidae* se agrupaban antes como *Muscidae*

PUNTUACIÓN IBMWP (Alba-Tercedor y Sánchez-Ortega, 1988; Alba-Tercedor, 1996; Alba-Tercedor y Pujante, 2000; Jáimez-Cuéllar et al., 2004):

Estado Ecológico	IBMWP	Significado (*)	Color
Muy Bueno	>100	Curso de agua no contaminado o no alterado de modo sensible	Azul
Bueno	61-100	Curso de agua con leves signos de contaminación o alteración	Verde
Aceptable (=Moderado)	36-60	Curso de agua contaminado o alterado, en situación dudosa (sistema alterado)	Amarillo
Deficiente	16-35	Curso de agua muy contaminado en situación crítica (sistema muy alterado)	Naranja
Malo	<15	Curso de agua fuertemente contaminado, en situación muy crítica (sistema fuertemente alterado)	Rojo



Capítulo 5:

■ Protocolos de muestreo y análisis para ictiofauna



Parte 1:
Generalidades



1. OBJETIVOS

Este documento está dedicado a la ictiofauna, y tiene como objetivo identificar y proponer métricas para establecer el estado ecológico de los ríos, lagos y embalses de la demarcación del Ebro, en aplicación de la Directiva 2000/60/CE especificar las directrices metodológicas para el muestreo y análisis de la ictiofauna.

2. VALOR INDICADOR DE LOS PECES

La ictiofauna es uno de los elementos de calidad biológica cuyo estudio es requerido por la DMA. Existen como antecedente, las experiencias realizadas en Europa, EE.UU y otros países, que señalan a los peces como buenos indicadores de la calidad medioambiental. En Europa se comenzó a utilizar la ictiofauna para la vigilancia de la calidad de las aguas en el ámbito de aplicación de diferentes Directivas europeas: Directiva de tratamiento de aguas urbanas residuales (91/271/CEE), Directiva de nitratos (91/676/CEE), y de las normativas de diferentes países. En los EE.UU. la ictiofauna se usa para la vigilancia de la calidad de las aguas de forma habitual y se han desarrollado procedimientos estandarizados para el muestreo y procesado de muestras (IBI).

Las comunidades de peces incluyen diferentes niveles tróficos: omnívoro, insectívoro, planctívoro, piscívoro; y se sitúan en los niveles próximos al vértice de la pirámide trófica. De este modo la composición y estructura de la comunidad integran la información de los niveles tróficos inferiores (especialmente de algas e invertebrados), y reflejan el estado de calidad de todo el ecosistema acuático.

En los cursos fluviales las comunidades de peces (*fish assemblage*) varían desde la cabecera a la desembocadura, siguiendo las variaciones de la profundidad del agua, velocidad de la corriente y sustrato. En los sistemas lóticos inalterados o con alteración mínima, la densidad de los peces y la biomasa aumenta, de una manera general, desde la cabecera hacia la desembocadura.

Desde el punto de vista indicador, los peces tienen características propias que les diferencian de otros elementos biológicos (fitobentos, plancton, macroinvertebrados, macrófitas) y les hacen complementarios ineludibles. Su mayor longevidad (hasta 20 y 30 años) permite a los peces ser testigos e indicadores de afecciones e impactos a las masas de aguas, históricas cuyas causas ya han desaparecido. Además, su mayor tamaño y movilidad les permite jugar un papel preponderante en los ecosistemas, al influir en el flujo de energía y transporte de sustancias y elementos. Por todo ello, su valor indicador peculiar reside en ser los indicadores con una escala espacio-temporal mayor. Además a diferencia del fitobentos, macroinvertebrados y macrófitas cuyo valor indicador reside en la escala del 'microhábitat', en el caso de los peces su valor indicador se refiere a la escala del **meso-hábitat**, es decir del tramo o del segmento fluvial.

En el marco de la aplicación de la DMA los peces se consideran útiles para la detección y seguimiento de las **presiones hidromorfológicas que produzcan:**

- Alteración del hábitat con producción de cambios en:
 - profundidad y anchura del río
 - velocidad del agua
 - composición granulométrica
 - morfología del lecho
 - vegetación de ribera
- Continuidad del río

La ictiofauna también es sensible a las presiones fisicoquímicas que produzcan:

- Contaminación del agua
- Eutrofia y aparición de toxicidad por algas
- Desoxigenación del agua

En España, las experiencias con indicadores basados en peces son escasas y, existen pocos casos en los que éstos se hayan incluido en las redes de control de calidad gestionadas por las Confederaciones y los servicios de Medio Ambiente de las Comunidades Autónomas.



Fotografía 5.1.: *Salmo trutta** (Propiedad de URS)

* Todas las fotografías son de ejemplares vivos durante la toma de medidas biométricas o de individuos destinados a análisis toxicológicos

3. SISTEMAS INDICADORES EXISTENTES

3.1. ANTECEDENTES EN LA CUENCA DEL EBRO

La ictiofauna de la demarcación del Ebro se conoce relativamente bien y cuenta con 15 especies autóctonas, 15 especies introducidas y 1 especie migradora considerada continental (*Anguila anguilla*), según los trabajos de Doadrio (2001) y Doadrio y Madeira (2004). Este último estudio presenta los resultados del análisis de secuenciación del ADN para las poblaciones ibéricas de *Gobio* y se demuestra que éstas pertenecen a una especie endémica de las aguas peninsulares ibéricas y del suroeste francés (*Gobio lozanoi*).

En las tablas adjuntas se presenta el listado de las especies citadas en la cuenca del Ebro, excluidas las del Delta del Ebro.

Familia	Especies	Autor	Nombre común
Salmonidae	<i>Salmo trutta</i>	Linnaeus, 1758	Trucha común
Blenniidae	<i>Salaria fluviatilis</i>	(Asso, 1801)	Freile, blenio de río
Balitoridae	<i>Barbatula barbatula</i>	(Linnaeus, 1758)	Lobo de río
Cobitidae	<i>Cobitis calderoni</i>	Bacescu, 1962	Lamprehuela
	<i>Cobitis paludica</i>	(de Buen, 1930)	Colmilleja
Cyprinidae	<i>Barbus graellsii</i>	Steindachner, 1866	Barbo de Graells
	<i>Barbus haasi</i>	Mertens, 1925	Barbo colirrojo
	<i>Chondrostoma arcasii</i>	(Steindachner, 1866)	Bermejuela
	<i>Chondrostoma miegii</i>	Steindachner, 1866	Madrilla
	<i>Gobio lozanoi</i>	Doadrio y Madeira, 2004	Gobio
	<i>Squalius cephalus</i>	(Linnaeus, 1758)	Bagre
	<i>Squalius pyrenaicus</i>	Günther, 1868	Cacho
	<i>Phoxinus phoxinus</i>	(Linnaeus, 1758)	Piscardo
	<i>Tinca tinca</i>	(Linnaeus, 1758)	Tenca
Cottidae	<i>Cottus gobio(a)</i>	Linnaeus, 1758	Cavilat

(a).El cavilat está presente en el río Garona.

Tabla 5.1.: Listado de especies de peces autóctonos presentes en la demarcación del Ebro (según Doadrio, 2001 y Doadrio y Madeira, 2004; Caiola y Sostoa com.per.) (no se incluye el Delta del Ebro).

Familia	Especies	Autor	Nombre común
Centrarchidae	<i>Lepomis gibbosus</i>	(Linnaeus, 1758)	Pez sol
	<i>Micropterus salmoides</i>	(Lacepède, 1802)	Perca americana
Cyprinidae	<i>Abramis bjoerkna</i>	Linnaeus, 1758	Brema blanca
	<i>Alburnus alburnus</i>	Linnaeus, 1758	Alburno
	<i>Carassius auratus</i>	(Linnaeus, 1758)	Pez rojo
	<i>Cyprinus carpio</i>	(Linnaeus, 1758)	Carpa
	<i>Rutilus rutilus</i>	(Linnaeus, 1758)	Rutilo
	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	(Linnaeus, 1758)	Escardinio
Esocidae	<i>Esox lucius</i>	(Linnaeus, 1758)	Lucio
Ictaluridae	<i>Ameiurus melas</i>	(Rafinesque, 1820)	Pez gato
Percidae	<i>Sander lucioperca</i>	(Linnaeus, 1758)	Lucioperca
Poeciliidae	<i>Gambusia holbrooki</i>	(Girard, 1859)	Gambusia
Salmonidae	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	(Walbaum, 1792)	Trucha arco-iris
	<i>Salvelinus fontinalis</i>	(Mitchell, 1815)	Salvelino
Siluridae	<i>Silurus glanis</i>	Linnaeus, 1758	Siluro

Tabla 5.2.: Listado de especies de peces exóticos presentes en la demarcación del Ebro (según Doadrio, 2001 y Carol et al. 2003) (no se incluye el Delta del Ebro).

Familia	Especies	Autor	Nombre común
Anguillidae	<i>Anguilla anguilla</i>	(Linnaeus, 1758)	Anguila

Tabla 5.3.: Listado de especies migradoras consideradas continentales presentes en la cuenca del Ebro (según Doadrio, 2001) (no se incluye el Delta del Ebro).



Fotografía 5.2.: *Salaria fluviatilis* (Propiedad de URS)

Los datos disponibles sobre ictiofauna del Ebro proceden de:

- Estudio ictiológico realizado por la CHE en tramos fluviales de la Red de Control de Variables Ambientales (RCVA) en 1996.
- Pescas realizadas en las estaciones de la Red de Sustancias Peligrosas (desde 1999 hasta la fecha).
- Estudios realizados por las CCAA, empresas del sector eléctrico y por la Universidad (U. de Barcelona, U de Girona, etc.) y centros de investigación.

La información existente procede, en su mayoría de ríos, e incluye datos sobre la composición íctica, la abundancia en el tramo y, en algunos casos, sobre la estructura de la población (distribución de clases de edad). También existen estudios genéticos sobre las poblaciones de algunas especies (por ejemplo para la trucha). En otros casos los estudios de ictiofauna son parte de experiencias para la determinación del caudal ecológico (en aplicación de diferentes metodologías como IFIM-PHABSIM)

Próximamente la CHE va a realizar un estudio extensivo de peces para desarrollar un índice de integridad biótica que permita determinar el estado ecológico de los ríos de la cuenca del Ebro. El desarrollo, validación e implementación de dicho índice presupone la realización de las siguientes tareas:

- Clasificar las especies piscícolas según sus requerimientos ecológicos (tipo de alimentación, hábitat de reproducción, etc.).
- Desarrollar una tipología biológica de los ríos de la cuenca del Ebro basada en las comunidades de peces originales (datos históricos) y de su respectiva correspondencia con las variables abióticas que caracterizan esas comunidades.
- Realizar un muestreo cuantitativo de la ictiofauna y de otras variables bióticas y abióticas asociadas a cada estación de muestreo.
- Identificar y valorar las presiones e impactos antrópicos.
- Proponer una lista de métricas candidatas para verificar.
- Desarrollar un índice para cada tipo de río verificando la respuesta a las presiones e impactos de las métricas candidatas.
- Aplicar el índice a un conjunto de datos independiente para su calibración y validación.

3.2. MÉTRICAS E ÍNDICES EXISTENTES

3.2.1. Métricas usadas en los estudios de ictiofauna

3.2.1.1. Métricas basadas en la composición

Se identifica el inventario de especies y de forma adicional pueden clasificarse éstas según diferentes requerimientos ecológicos relativos a su ciclo biológico, alimentación, reproducción, tolerancia a la contaminación, etc... Algunas de las métricas más usuales son:

- Número de especies autóctonas e introducidas
- Número de especies bentónicas y planctónicas
- Número de especies omnívoras, insectívoras, herbívoras, piscívoras, etc.
- Número de especies tolerantes e intolerantes
- Número de especies que requieren sustratos de grava, piedras o vegetación acuática para la puesta.

3.2.1.2. Métricas basadas en la abundancia

Los recuentos de las pescas referidos a términos absolutos o relativos ofrecen una estima de la abundancia total de la ictiofauna, y de la abundancia de las diferentes especies. Las posibles métricas son:

- Número total de individuos. En general se expresa por unidad de esfuerzo (CPU, captura por unidad de esfuerzo)
- Número de individuos (o porcentaje) de los diferentes tipos de especies indicadas en el apartado 3.2.1.1.
- Biomasa total o por especies

3.2.1.3. Métricas basadas en aspectos biométricos

En general se calculan:

- Distribución de tamaños de los ejemplares de cada especie
- Distribución de edades. A partir de la distribución de tamaños se calculan las clases modales, y se considera que cada una corresponde a una clase de edad. En algunos casos las clases de edad podrán confirmarse mediante el estudio de las zonas de crecimiento que aparecen marcadas en algunas estructuras como escamas, otolitos, huesos operculares, etc...
- Determinación del crecimiento a través de relaciones longitud/peso (ecuación de Ricker, 1973) o de la longitud y el radio de la escama (ecuación de Frasser, 1916 y Lee, 1920).
- Determinación del índice de condición. Este índice compara la forma real del pez con la que le correspondería a su crecimiento isométrico.
- Peso medio individual (en gramos) de la comunidad íctica (indicador de los efectos de grandes embalses a medio y largo plazo).
-

3.2.1.4. Métricas basadas en el estado sanitario

- Proporción de individuos con deformidades
- Proporción de individuos con un alto grado de infectación (parásitos)



Fotografía 5.3.: *Cobitis paludica* (Propiedad de URS)

3.2.2. Índices y métodos estandarizados para el estudio de la ictiofauna

3.2.2.1. Índices de similitud

Son de gran utilidad para comparar las características de la comunidad íctica de una masa de agua, respecto a las condiciones de referencia del tipo al que pertenece (García de Jalón y González del Tánago, en prensa). Se propone el uso de los siguientes índices:

- **Índices cualitativos:** Permiten obtener la similitud de la composición íctica (presencia – ausencia) de una masa de agua respecto a sus condiciones de referencia. Se calculan mediante relaciones entre el número de especies de la masa de agua (p), de la referencia (r) y de las comunes a ambos (c). Los índices más usados son:

- Jaccard (1912)

$$I = c \div p + r - c$$

- Sorensen (1948)

$$I = 2c \div p + r$$

p = Número de especies en la masa de agua

r = Número de especies correspondiente a las condiciones de referencia

c = Número de especies comunes –masa de agua y referencia

- **Índices cuantitativos:** Permiten obtener la similitud entre las abundancias de las especies en la masa de agua respecto a las de referencia para el tipo. El siguiente índice se basa en abundancias relativas.

- Raabe (1952)

$$I = \sum_{i=1}^{i=5} \min(h_iP, h_iR)$$

$$h_iR = n_iR \div BR$$

h_iP, h_iR = Abundancia relativa de la especie i en la masa de agua (p) y en la referencia (r)

n_iP, n_iR = Abundancia de la especie i en la masa de agua (p) y en la referencia (r)

NP, NR = Abundancia total de peces en la masa de agua (p) y en la referencia (r)

3.2.2.2. Índices de integridad biótica

La integridad biótica se define como la capacidad de soportar y mantener una comunidad de organismos equilibrada, integrada y adaptativa, con una composición específica, diversidad y organización funcional comparable a la del hábitat natural de la región (Karr *et al.*, 1986). De este modo los sistemas con una elevada integridad biótica pueden soportar y/o recuperarse rápidamente de la mayor parte de las perturbaciones, tanto naturales, como de origen antrópico. Por el contrario, los medios con escasa integridad biótica están a menudo degradados y cuando son perturbados, bien por procesos naturales, bien por el hombre, es muy probable que cambien rápidamente a estados incluso más degradados. En resumen la integridad biótica es una cualidad de los medios naturales en los que su composición, estructura y función no han sido alteradas por las actividades humanas. En la actualidad el uso de este tipo de índices es generalizado en los EE.UU., si bien en Europa han sido poco utilizados.

3.2.2.2.1. IBI (Index of Biotic Integrity)



Fotografía 5.4.: *Phoxinus phoxinus* (Propiedad de URS)

El índice de integridad biótica basado en los peces, desarrollado por Karr (1981) constituye una herramienta metodológica muy valiosa para establecer el estado ecológico de los sistemas acuáticos. Esto ha sido el punto de partida de diferentes iniciativas para diseñar IBIs adaptados a diferentes regiones geográficas (Fausch *et al.*, 1984; Harris y Silveira, 1999; Belpaire *et al.*, 2000).

El grupo de investigación de Peces de la Universidad de Barcelona (A. Sostoa, N. Caiola, D. Vinyoles y F. Casals), en un proyecto de colaboración con la Agencia Catalana del Agua, ha desarrollado un IBI para los ríos de Catalunya (IBICAT) cuyo resumen se expone a continuación, como ejemplo de desarrollo de un IBI en cuencas ibéricas.

El IBICAT procede del muestreo de 158 ríos pequeños mediterráneos pertenecientes a 15 cuencas. Se caracterizaron 333 estaciones de muestreo con las comunidades originales de peces, y con 18 variables abióticas (ambientales, fisiogeográficas e hidromorfológicas).

El desarrollo del IBICAT ha requerido la recopilación y análisis de:

- Datos históricos de la presencia de las especies autóctonas en los ríos de Cataluña (consultas bibliográficas y series temporales), y clasificación de las especies en grupos, según sus requerimientos ecológicos (relacionados con los hábitos de reproducción, longevidad, alimentación, hábitat, migración y capacidad de tolerancia). La aplicación de un análisis de *cluster* permite la obtención de los grupos de especies.

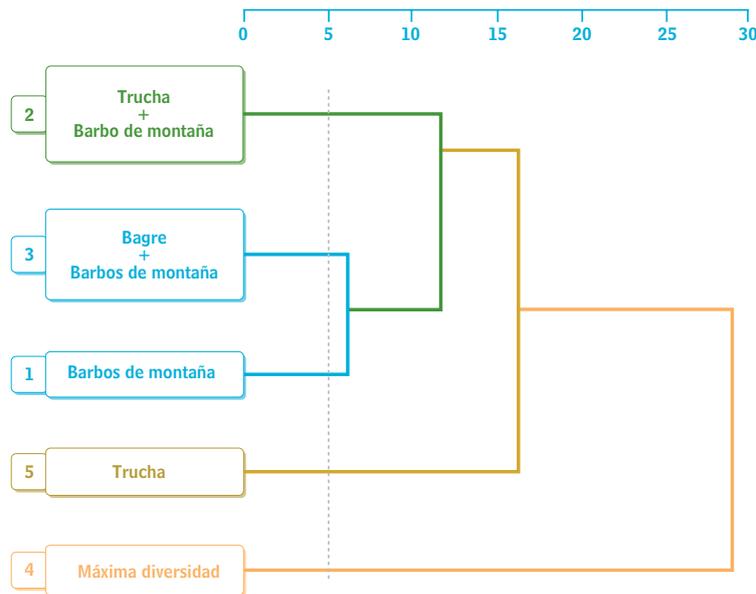


Figura 5.1.: Esquema simplificado del dendrograma (distancia Euclídea al cuadrado y método de vinculación de Ward) representando grupos de estaciones de muestreo, en base a la presencia histórica de los peces

- Datos geomorfológicos y climáticos de las cuencas fluviales (análisis a partir del GIS de la Agencia Catalana del Agua y de la Confederación Hidrográfica del Ebro). Entre las variables utilizadas, las más relevantes que explican la tipología biológica con un 79% de estaciones bien clasificadas, son: altitud, temperatura media anual del aire, temperatura media de enero del aire, temperatura media de julio del aire, temperatura máxima en julio, pendiente, orden del río, distancia al nacimiento, distancia a la desembocadura, precipitación caída en julio y déficit hídrico.

Se han establecido 5 tipos fluviales basados en la presencia histórica de peces pero con la respectiva correspondencia con las referidas variables abióticas. Estos son: 1) Montaña baja mediterránea, 2) Montaña húmeda mediterránea, 3) Zona Baja mediterránea, 4) Cursos principales de la cuenca del Ebro; y 5) Alta montaña. Para cada tipo fluvial se han formulado las condiciones de referencia para la comunidad íctica, y la desviación de estas condiciones constituye una medida del estado ecológico.

Finalmente las métricas significativas del IBICAT (seleccionadas a partir de correlaciones de Spearman) para los cinco tipos de ríos, y las puntuaciones obtenidas para los casos impacto bajo o sin impacto, impacto moderado e impacto elevado se muestran en la siguiente tabla:

Tipo de río	Métrica	Puntuaciones		
		Sin impacto / impacto bajo	Impacto moderado	Impacto elevado
Mont. Baja. Medit.	Densidad total (ind./ha)	>1.200	400 –1.200	<400
Mont. Hum. Medit.	Nº especies nativas	>1	1	0
	Nº esp. Nativas insectívoras	>1	1	0
	Densidad nativas intolerantes (ind./ha)	≥1.500	<1.500	0
Zona Baja Medit.	% especies nativas	>80	20-80	<20
	% especies intolerantes	>80	50-80	<50
Ríos prales. Ebro	% especies nativas	>80	40-80	<40
	% especies insectívoras	>80	40-80	<40
	Nº nativas/Nº nativas distrib.original	>0,6	0,3-0,6	<0,3
Alta Montaña	Nº nativas tolerantes	>1	1	0
	Densidad nativas longevas (ind./ha)	>3.000	1.000-3.000	<1.000
	Nº especies litofílicas	>1	1	0

Tabla 5.4.: Métricas significativas del IBICAT y las puntuaciones obtenidas

Una metodología semejante se aplicará a la cuenca del Ebro para desarrollar un Índice de Integridad Biótica de características similares al IBICAT.

3.2.2.2.2. Reservoir Fish Assemblage Index (RFAI)

Los índices de peces en embalses están mucho menos desarrollados que en ríos y consisten básicamente en el índice RFAI (Hickman *et al.* 1994; Jennings *et al.* 1995; Hickman y McDonough, 1996; McDounough y Hickman, 1999) que está basado en el IBI, y se utiliza en los embalses de los EE.UU para evaluar la calidad de la comunidad de peces. El método de aplicación del índice se basa en el muestreo combinado con pesca eléctrica desde embarcación y con redes, y en la determinación de las siguientes métricas:

Composición específica y riqueza
Nº especies
Nº especies piscívoras
Nº de sunfish species (Lepómidos). (a)
Nº de sucker species (Catastómidos). (b)
Nº especies intolerantes
% Individuos tolerantes
% Dominancia de una sola especie
Composición trófica
% Individuos omnívoros
% Individuos insectívoros
Composición reproductora
Nº especies con freza en sustratos rocosos
Abundancia
Captura por unidad de esfuerzo (nº individuos)
Estado sanitario
% Individuos con anomalías (lesiones, parásitos externos, deformidades, etc.).

(a) y (b). En Europa estas métricas se sustituyen por Nº de especies invertívoras.

Tabla 5.5.: Métricas a determinar en el RFAI

La aplicación del método del RFAI en embalses de Cataluña (Armengol *et al.*, 2003; Carol *et al.*, en prensa), muestra que la mayoría de las métricas originales del índice no son muy sensibles al estado trófico; por el contrario tienen mejor respuesta las siguientes:

- % individuos con anomalías
- CPUE de carpas litorales
- CPUE de carpas limnéticas
- % de CPUE litorales que son carpas
- % de CPUE limnéticas que son carpas

Para cada métrica se calculan los rangos para las tres categorías del índice (malo, aceptable y óptimo), al igual que se hace en el IBI. No obstante los valores pueden reagruparse en las cuatro categorías del potencial ecológico establecidas en la DMA (Bueno y superior, Moderado, Deficiente y Malo).

3.2.2.3. European Fish Index (EFI) y proyecto FAME

El proyecto FAME (*Fish-based Assessment Method for Ecological Status of European Rivers*) es un proyecto europeo que tiene como objetivo desarrollar, evaluar e implementar un método estandarizado para establecer el estado ecológico, basado en los peces, que garantice la obtención de resultados comparables en toda Europa.

Forman parte del proyecto FAME, 25 grupos de investigación pertenecientes a 12 países europeos, entre los que se encuentra España.

Como punto de partida se ha recogido la información existente de muestreos de peces en una base de datos, FIDES (*Fish Database of European Streams*). La información procede de los 12 países integrantes del proyecto y comprende datos de muestreo de más de 15.000 muestras de 8.000 estaciones de muestreo localizadas en unos 2.700 ríos. Están representados 16 ecoregiones de las 25 ecoregiones europeas (*sensu* Illies).

FIDES incluye información sobre diferentes tipos de ríos, estaciones de referencia específicas de los tipos de ríos y diferentes niveles de impacto.

En el ámbito del proyecto se ha desarrollado el índice **EFI** (*European Fish Index*) basado en la metodología de los IBI. La aplicación de este índice está facilitada a través de la aplicación informática existente (<http://fame.boku.ac.at>).

4. PROPUESTA DE MÉTRICAS PARA LA DEMARCACIÓN DEL EBRO

La ictiofauna, a través del análisis de la composición, abundancia y estructura de edades, es uno de los elementos de calidad biológica considerados por la DMA para el establecimiento del estado ecológico en ríos y lagos. En la demarcación del Ebro se propone considerar la ictiofauna como:

- un elemento de calidad biológica principal para la determinación del estado ecológico de los ríos (red de vigilancia y en los puntos de la red operativa para los que sea el elemento más sensible).
- un elemento de calidad biológica complementario en los lagos, entendido esto por un uso específico (en lagos concretos) como elemento de calidad más sensible para el seguimiento de alguna presión. El uso de la ictiofauna en todos los lagos no se considera útil dada la importancia cuantitativa de las especies introducidas, en su mayoría.

En el caso de los embalses, la ictiofauna también puede ser útil para la determinación del potencial ecológico.

Procedimiento general de trabajo

Se propone:

- Recopilar información existente sobre la composición íctica y características ecológicas (alimentación, reproducción, tolerancia, etc.) de las especies de los ríos de la demarcación del Ebro.
- Diseñar un plan de trabajo (recopilación de datos y muestreos) que permita elaborar un índice de integridad biótica adaptado a la cuenca del Ebro. Se muestrearán inicialmente 300 estaciones.

- Seleccionar las métricas a usar. Esto se realizará mediante la elección, en una lista de aproximadamente 500 métricas potenciales, de aquellas métricas que tengan una respuesta significativa a los impactos y presiones antrópicos y que no sean redundantes entre si. Estas métricas potenciales, utilizadas en el desarrollo del IBICAT, proceden de recopilaciones bibliográficas de los trabajos más relevantes de IBIs, y de la propuesta de métricas del grupo de investigación de Peces de la Universidad de Barcelona.
- Analizar el posible uso de índices de similitud para las métricas seleccionadas, los cuales podrían utilizarse directamente como EQR (“ecological quality ratio”) (propuesta de D. García de Jalón).
- Preparar una base de datos a nivel estatal tomando FIDES como punto de partida, para recoger toda la información obtenida en las campañas de muestreo. Será una base de datos abierta que podrá incluir tanto los datos existentes como los futuros, siempre que éstos se adapten a su estructura.

Plan de trabajo

Planificación de los trabajos con el elemento de calidad ictiofauna para los ríos de la demarcación del Ebro

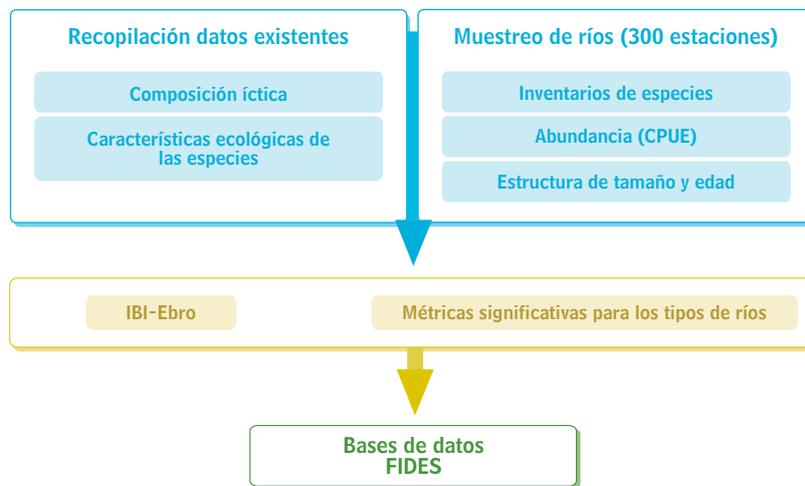


Figura 5.2.: Planificación de los trabajos con el elemento de calidad ictiofauna para los ríos de la demarcación del Ebro



Fotografía 5.5.: *Barbus graellsii* (Propiedad de URS)

Parte 2:
■ Protocolos



5. INTRODUCCIÓN



Fotografía 5.6.: *Caruassius auratus* (Propiedad de URS)

El procedimiento está basado en las directrices técnicas contenidas en la norma EN ISO 14011:2003. Calidad del agua. Muestreo de peces con electricidad, y en la información recogida en la reunión de expertos realizada en la CHE, y de los datos obtenidos de la consulta de la bibliografía que se indica en la memoria.

El procedimiento tiene como objetivo dar las directrices metodológicas que permitan obtener datos de composición, abundancia y estructura de la población (edad y tamaño) de las especies ícticas de las masas de agua fluviales y lacustres de la demarcación del Ebro.

Abarca los siguientes temas:

- Identificación del equipo de muestreo y de reactivos
- Muestreo con pesca eléctrica
- Muestreo con redes y artes de pesca
- Manipulación de los peces. Obtención de medidas biométricas
- Conservación y etiquetado de muestras
- Cálculos y estimas de las métricas
- Control de la calidad

6. EQUIPOS Y REACTIVOS

6.1. EQUIPOS DE MUESTREO

- Equipo de protección personal y ambiental
 - Vadeadores y botas de caucho (materiales no conductores de la electricidad).
 - Guantes de latex y neopreno.
 - Gafas de sol polarizadas.
 - Salvavidas (uso en embarcación y en aguas vadeables profundas).
 - Extintor (para pesca eléctrica en zonas con riesgo de incendio o para el uso del generador eléctrico en una embarcación).
 - Equipo de primeros auxilios con guías para realizar una respiración asistida y masaje cardíaco.
- Equipos para la pesca eléctrica.
 - Generador eléctrico y convertidor de corriente (ver características en apartado 7.2).
 - Pértiga (ánodo). Mango de material aislante y con un aro de diámetro variable al final, hecho de material conductor.
 - Reja (cátodo) de material conductor.
- Equipos para la pesca con redes
 - Redes estáticas (nasas, trasmallos, agalladeras).
 - Redes de arrastre.

- Equipos para la manipulación de los peces
 - Sacaderas y salabres para capturar los peces.
 - Cubos de goma o plástico (10-12 L) para trasladar los peces hasta los contenedores.
 - Contenedores para peces de diferentes tamaños (adecuados para el número y tamaño de peces); en general capacidad entre 40 y 50 L. En éstos se depositan los peces que van a ser pesados y medidos.
 - Contenedores de rejilla de plástico o goma que permitan una vez introducidos y anclados (con piedras en su interior) en el cauce fluvial, el paso del agua a su través. Estos se sitúan fuera del área del campo eléctrico y permiten mantener a los peces en buenas condiciones hasta que son devueltos al río.
 - Recipientes para muestras de peces.
 - Balanza o dinamómetros para pesar los peces.
 - Ictiómetro o regla de campo para medir los peces.
 - Bandejas blancas para depositar los ejemplares que se vayan a fotografiar.
 - Oxigenador. Puede ser necesario cuando no es posible mantener a los peces en contenedores de rejilla, en el propio río, o si la densidad de peces en los contenedores es alta.
- Otros equipos complementarios
 - Cámara fotográfica (preferible con lentes polarizadas).
 - Aparato de localización geográfica (GPS).
 - Conductivímetro para medir la conductividad del agua y ajustar la intensidad del convertidor de corriente.
 - Hojas de campo preparadas para el registro de datos de la estación y de los peces capturados.
 - Bolígrafo o rotulador permanente (o cualquier otro método para etiquetar las muestras si las hubiere).
 - Pinzas para extraer escamas del pez (para el estudio en detalle de la edad).
 - Nevera.
 - Claves de identificación.

Instrumentos adicionales para muestreos con embarcación y buceo:

- Barca adecuada para las condiciones locales con el equipo de seguridad apropiado (salvavidas).
- Equipo de buceo para la observación de las pautas de comportamiento.
- Cuerdas y boyas para fijar transectos.
- Profundímetro o cinta métrica lastrada para medir profundidades.
- Cámara fotográfica sumergible.



Fotografía 5.7.: *Scardinius erythrophthalmus* (Propiedad de URS)

6.2. PRODUCTOS PARA ANESTESIA, CONSERVACIÓN Y DESINFECCIÓN

6.2.1. Anestésicos

Para facilitar el trabajo y evitar que los ejemplares se autolesionen durante la manipulación puede ser necesario el uso de un anestésico. Los anestésicos de peces más utilizados con resultados satisfactorios son: Tricaina-metano-sulfonato (denominado MD-222) o bien el aceite esencial de clavo de olor (euglenol).

6.2.2. Conservantes

Para la conservación de ejemplares necesarios para verificar la determinación taxonómica o para otros análisis se puede usar:

- Formaldehído (HCHO) al 4-10% vv. Para conservar ejemplares de pequeño tamaño. Este producto es ligeramente ácido por lo que se pueden descalcificar algunas estructuras (espinas, otolitos, etc.). Para evitar eso se puede preparar una solución tamponada (añadir 3 ml de borax por cada litro de solución al 10%).

Dada la naturaleza tóxica del formaldehído, su manipulación se debe realizar siguiendo medidas precautorias (trabajar en un ambiente bien ventilado, usar guantes y recipientes herméticos).

- Alcohol etílico (70%) para la conservación de ejemplares pequeños y estructuras (otolitos). Es menos eficaz para conservar los tejidos blandos.
- Hielo normal, seco o nitrógeno líquido. Dependiendo del tiempo desde la toma de la muestra hasta su traslado al laboratorio, donde se puede proceder a la congelación de los ejemplares.

6.2.3. Desinfectantes de los equipos

Los equipos de pesca se lavarán y desinfectarán al acabar el trabajo en una masa de agua, especialmente si existe riesgo de transferir, parásitos, agentes patógenos o especies invasoras.



Fotografía 5.8.: *Alburnus alburnus* (Propiedad de URS)

7. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO MEDIANTE PESCA ELÉCTRICA

En general el muestreo de la ictiofauna de ríos y zonas lacustres vadeables se realiza mediante pesca eléctrica a cargo de un operador que penetra a pie en la masa de agua. En ríos no vadeables, zonas litorales de lagos y embalses se realiza pesca eléctrica desde embarcación.

7.1. BASE METODOLÓGICA DE LA PESCA ELÉCTRICA

La pesca eléctrica es la técnica de muestreo de peces más utilizada en ríos y aguas estancadas vadeables. Es efectiva y relativamente inocua. El método se basa en la creación de un campo eléctrico en una zona del medio acuático, que modifica el comportamiento del pez existente y facilita su captura. La corriente eléctrica puede causar electrotaxis (natación obligada), electrotétano (contracción muscular) y electronarcosis (relajación muscular).

La creación del campo eléctrico requiere:

- Un generador eléctrico. Éste puede ser:
 - Un grupo electrógeno de gasolina cuando se requiere trabajar durante horas o en ríos con conductividad del agua muy baja ($< 100 \mu\text{S}/\text{cm}$) o muy elevada (entre 900 y 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$). En general son equipos pesados que se depositan en la orilla del río. Éstos usan grupos de tipo monofásico con una potencia entre 2.200 y 3.000 W (600 V de voltaje y hasta 2,5 A de amperaje). Estos equipos generan corriente a 220 V y, en general, alterna.
 - Un equipo dotado de batería recargable, de tipo “mochila” o “martín pescador”. Permiten muy buena maniobrabilidad en el río y el muestreo en tramos de difícil acceso. Están limitados por la capacidad de carga de la batería.
- Un convertidor que permite rectificar el tipo de corriente (regular el voltaje y el amperaje). La más utilizada es la Corriente Continua Pulsátil (CCP), la cual es una corriente unidireccional con interrupciones periódicas (pulsos de voltaje).

- Un ánodo y cátodo unidos por cable eléctrico al generador eléctrico y convertidor. El ánodo está conectado mediante un cable eléctrico de longitud variable al convertidor y a una pértiga que es el elemento móvil que conduce la electricidad a los diferentes puntos del río. El cátodo también está conectado mediante un cable eléctrico, de menor longitud, al convertidor y a una reja metálica que se deposita en el río y actúa de “masa” para crear el campo eléctrico.

7.2. SELECCIÓN DE LA ESTACIÓN DE MUESTREO Y DEL ÁREA DE CAPTURA

Como primer paso al muestreo de peces se requiere:

- Identificar estaciones de muestreo (tramos en ríos y transectos en lagos o embalses) representativas de las condiciones de las masas de agua. Para ello se caracterizarán los hábitats según su complejidad, la velocidad del agua, el tipo de sustrato, profundidad, condiciones de iluminación, y tipo de vegetación de ribera, etc... En los ríos la aplicación de índices como el IHF (Pardo *et al.*, 2004) o el protocolo de la *EPA Rapid Bioassessment* modificado por el Grupo de investigación de Peces de la Universidad de Barcelona, pueden ser de gran utilidad. En los ríos se escogerá un tramo lo más natural posible, con vegetación de ribera y variedad de hábitats. La vegetación de ribera y la morfología de la orilla son importantes porque aportan heterogeneidad de hábitat, constituyen refugios y proporcionan sombra a los peces. Es favorable que el tramo a pescar esté delimitado por dos rápidos, los cuales actúan de barrera natural para los peces de mayor tamaño.
- El área de muestreo tendrá una longitud de 10 veces la anchura media del río, con un mínimo de 100 m² (según recomendación de la norma CEN EN 14011).
- Una vez identificada la estación de muestreo se fijará su posición tomando las coordenadas geográficas con un GPS, y mediante referencias topográficas que faciliten su localización posterior. También se redactará una breve descripción de cómo llegar a la estación de muestreo (y se adjuntará un croquis de localización).

7.3. PROCEDIMIENTOS DE PESCA ELÉCTRICA

Los procedimientos de pesca y los equipos específicos a usar dependen de la profundidad del agua, tamaño de la masa de agua, velocidad del agua, de las especies a capturar y de la conductividad del agua. En los apartados siguientes se describen los procedimientos para la pesca eléctrica en aguas vadeables y desde embarcación.

7.3.1. Pesca eléctrica en aguas vadeables

El muestreo se debe efectuar durante el día y preferiblemente al final de la estación de crecimiento (final de verano, inicio de otoño), lo que permitirá capturar los juveniles. No se debe pescar con temperaturas inferiores a 5°C (la actividad es mínima y la eficiencia de pesca muy baja) (EN 14011:2003).

La realización de pesca eléctrica requiere tener en cuenta aspectos de seguridad en la manipulación de los equipos y en los procedimientos de pesca. Éstos se describen en el apartado 7.4.

Preparación del equipo y organización de la pesca

- Inicialmente se medirán los parámetros fisicoquímicos básicos del agua (temperatura, conductividad, pH y oxígeno disuelto). La medida de la conductividad es necesaria para graduar la intensidad del convertidor de corriente. Para las aguas dulces la intensidad de la corriente necesaria para la pesca eléctrica disminuye a medida que aumenta la **conductividad** (en aguas de baja conductividad es necesaria mayor intensidad de corriente). En las aguas salobres no es posible realizar pesca eléctrica ya que los peces no se ven afectados por el campo eléctrico (el agua es más conductora que el propio pez). La temperatura del agua influye en la conductividad (ésta aumenta con la T°C) y en el porcentaje de saturación del oxígeno (el %O₂ disminuye al aumentar la T°C).
- Se situará el generador y el convertidor de corriente cerca de la orilla del río, en una localización adecuada que permita pescar desde aguas abajo del tramo hacia aguas arriba. Se conectará el cátodo (reja) al convertidor y se introducirá en el agua (en un punto intermedio del tramo para limitar la fluctuación de la intensidad de la corriente).
- Se conectará la pértiga (ánodo) al convertidor de corriente con un cable suficientemente largo para cubrir toda la longitud del tramo.
- Se situarán los depósitos contenedores de los peces y el material necesario para tomar las medidas biométricas en un sitio llano y sombreado.
- En caso de muestreos que tengan como objeto la estima de la abundancia absoluta del tramo se instalarán redes acotando el tramo, y se realizarán sucesivas pasadas aplicando posteriormente un método estadístico de cálculo.

Procedimientos de pesca

- El equipo humano de pesca estará integrado por 2 a 4 personas. El técnico más experimentado conduce la pesca, es decir lleva la pértiga y va accionando ésta remontando el río (de arriba abajo); de este modo la turbidez provocada por el movimiento no afecta a la eficiencia de la pesca. Es conveniente moverse suavemente e ir barriendo con el ánodo todos los hábitats del ancho fluvial. Otro técnico o dos se sitúan detrás del portador de la pértiga con sacaderas, y recogen los peces que aturdidos por la electricidad son arrastrados por la corriente fluvial. En ríos pequeños y de difícil acceso puede usarse el equipo de mochila que portará uno de los técnicos, avanzando por el río seguido de un ayudante.
- Los peces capturados se depositan en cubos de plástico llenos de agua y se trasladan a los contenedores o viveros instalados en la orilla, a la espera de que se tomen las medidas biométricas.
- Hay que controlar que la densidad de peces en los contenedores no sea excesiva y que los peces se encuentren en buenas condiciones (renovar el agua, mantener el contenedor a la sombra, oxigenar el agua, etc.). No obstante lo más práctico y que reduce al mínimo la mortandad es la utilización de viveros sumergidos en el río (convenientemente alejados de la zona de pesca).

Muestreo de peces con pesca eléctrica en aguas vadeables



Fotografía 5.9.: Muestreo de peces con pesca eléctrica en aguas vadeables (Propiedad de URS)

Identificación, recuento y toma de medidas biométricas

Seguir las directrices que se indican en el apartado 9.

- Para manipular los peces (identificar, pesar y medir) es conveniente usar un producto anestésico que los relaje y facilite el trabajo (especialmente para los peces más activos como la trucha). Se recomienda usar MS-222 o eugenol.

Es importante controlar el tiempo de exposición al anestésico, dado que una exposición excesiva puede conducir a la muerte del ejemplar.

- Cada uno de los ejemplares capturados se identificará, contabilizará y se tomará nota de: peso, longitud furcal o total (dependiendo del tipo de aleta caudal) y estado sanitario (ver apartado 9).
- Se realizará un reportaje fotográfico representativo de los ejemplares capturados.
- Si existen dudas en la identificación de alguna especie, se conservará algún ejemplar (en hielo o fijado con formaldehído al 10%) para su examen en el laboratorio.
- Para confirmar la edad pueden tomarse muestras de estructuras que permitan determinar este parámetro (p.ej. escamas).

Recuperación y suelta de los peces

- Los ejemplares ya medidos y pesados se introducirán en otro contenedor con agua fresca; hay que evitar una densidad excesiva de peces que conduciría a la desoxigenación rápida del agua. Lo más favorable es colocar estos peces en contenedores de rejilla de plástico o viveros sumergidos y depositados en el cauce fluvial, de modo que la corriente de agua circule a su través. Esta práctica ayuda a la recuperación de los peces, en caso de haberse usado algún anestésico, y en todo caso mejora el confinamiento. Este contenedor debe situarse fuera de la zona de pesca para evitar que los peces sean afectados nuevamente por la corriente eléctrica.
- Una vez finalizada la pesca en el tramo, se procederá a devolver los peces al río, asegurándose que están recuperados de la anestesia; para ello se elegirá una zona de corriente moderada cerca de la orilla (evitar la suelta en tramos de fuerte corriente).
- Se realizará una estima de la mortandad debida al muestreo (% peces muertos).
- En caso de necesitar la conservación de algún ejemplar para estudios posteriores se usarán los ejemplares que hayan podido resultar muertos. No se introducirá ningún ejemplar vivo en el producto conservante, sino que se sedará en exceso hasta asegurar la muerte del ejemplar.

7.3.2. Pesca eléctrica desde embarcación

En las masas de agua no vadeables puede usarse la pesca eléctrica combinada con otras técnicas de pesca. Se usará una embarcación preparada para la realización de pesca eléctrica. Esta deberá ser lo suficiente amplia para contener los equipos de pesca eléctrica (generador, batería, convertidor de corriente, cables del ánodo y cátodo) y el personal y otros equipos (incluidos los de seguridad). En EE.UU. y Canadá se venden embarcaciones específicas para la pesca eléctrica; éstas suelen ser de casco de aluminio y disponen de una plataforma en la proa de la que cuelgan dos brazos correspondientes al ánodo y cátodo.

La embarcación recorrerá el tramo de río no vadeable o la zona del litoral cubriendo los diferentes hábitats. En aguas lentas el movimiento de la barca puede controlarse, si es necesario, mediante cuerdas desde el litoral. En aguas con corriente es importante que la barca se mueva a la misma velocidad que la corriente, usando el motor o los remos únicamente para maniobrar.

Los peces se recogen con sacaderas y se van depositando en depósitos con agua de la propia masa de agua, convenientemente oxigenada. Se procede al recuento y a la tomas de las medidas necesarias según lo especificado en el apartado 7.3.1.



Fotografía 5.10.: *Ameiurus melas* (Propiedad de URS)

7.4. MEDIDAS DE SEGURIDAD ESPECÍFICAS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PESCA ELÉCTRICA

Se preparará un plan de seguridad que identifique y cubra los riesgos de shock eléctrico, incendio, o inhalación de gases durante la realización de la pesca. Las siguientes medidas de seguridad pueden ser aplicables:

- Evitar realizar pesca eléctrica con caudales elevados y/o en tramos de fuerte corriente.
- No se puede practicar la pesca eléctrica cuando llueve.
- La pesca siempre se realizará por dos personas (mínimo).
- Los equipos eléctricos de pesca (generador, convertidor, cables, ánodo y cátodo) se almacenarán desconectados, secos y limpios. Se identificarán desperfectos (cables pelados, interruptores rotos) y se repararán antes del inicio de la pesca. Durante la pesca, el generador se mantendrá en un espacio libre de vegetación y a la sombra, evitando cualquier posibilidad de que éste caiga al agua. No se moverá estando en marcha. Se tendrá disponible un extintor cerca del mismo.
- El generador se pondrá en marcha cuando el cátodo se encuentre en el agua listo para empezar la pesca y todo el personal haya sido avisado.
- El personal a cargo de la pesca vestirá vadeadores y botas altas de goma o neopreno. Se evitará introducir las manos dentro del agua y tocar las partes metálicas de los electrodos, a menos que el equipo esté desconectado.
- Todos los recipientes y contenedores usados para depositar los peces serán de plástico o goma.
- Los técnicos a cargo de la pesca deberán conocer las técnicas de reanimación después de un shock eléctrico (respiración boca a boca, masaje cardiaco). Se dispondrá de un equipo de primeros auxilios y un teléfono móvil para pedir ayuda médica en caso necesario.
- Como medida de seguridad se pueden utilizar pértigas con pulsadores de seguridad que interrumpen el campo eléctrico cuando deja de accionarse el pulsador.

Pesca eléctrica desde embarcación

- La embarcación debe ser adecuada para la pesca eléctrica, todas las superficies metálicas (tanques de fuel, cajas de herramientas, estructura que sostiene el generador) deben estar conectadas eléctricamente entre ellas, independientemente de que el casco sea de metal o de material no conductor. En embarcaciones no metálicas, el generador deberá estar protegido convenientemente de contactos indirectos.
- El generador se fijará en la embarcación de forma que se evite su movimiento en el balanceo. Se dispondrá de un extintor a bordo.
- El personal vestirá chalecos salvavidas todo el tiempo.

8. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO CON REDES Y OTRAS ARTES DE PESCA

El muestreo con redes y artes de pesca de diferentes tipos permite estudiar la ictiofauna de ríos profundos, lagos y embalses.

8.1. TIPOS DE REDES Y ARTES DE PESCA

La pesca con redes estáticas o activas se seleccionará en función de las características de la masa de agua a muestrear. Existen los siguientes tipos de redes:

Redes estáticas

- **Nasas y redes trampa:** Estas redes permiten la entrada de los peces pero no su salida. Suelen usarse en profundidades inferiores a 3 m y se mantienen sujetas al fondo. Son propias de orilla y de fondo. Son eficaces para peces grandes y en captura viva.
- **Agalladeras o redes de enmalle:** Son redes de un solo paño con hilo muy delgado. Se sitúan suspendidas a diferente nivel en la columna de agua y capturan los peces que intentan nadar a su través (éstos se enganchan en los hilos de la red por las agallas u otras partes del cuerpo como espinas, aletas, etc.). Existen modelos con diferentes tamaño de luz (permite seleccionar las capturas en función del tamaño); y otros que combinan diferentes tamaños de luz de

malla dentro del mismo paño. Estas artes son poco eficientes para capturar peces de pequeño tamaño (juveniles de menor de 50-60 mm), bentónicos y sin escamas.

- **Trasmallos:** Son redes formadas por tres paños de red superpuestas montadas sobre la misma relinga; las dos exteriores son iguales entre si, y la malla interior es más tupida y más fina. Los trasmallos se usan tanto en orilla como en el centro de la masa de agua, y a diferentes profundidades.

Redes activas

Requieren su arrastre en la masa de agua para efectuar las capturas. Éste se realiza desde una embarcación o a mano (en zonas someras). Entre éstas se encuentran redes de arrastre y los chinchorros.



Figura 5.11.: *Sander lucioperca* (Propiedad de URS)

8.2. SELECCIÓN DE LAS ESTACIONES DE MUESTREO

En lagos y embalses se seleccionarán diferentes estaciones de muestreo (entendidas éstas como la localización de una red de captura), según las características hidromorfológicas y de hábitat (profundidad, presencia de vegetación sumergida y litoral, etc.). Se identificarán estaciones en zonas próximas al litoral y en aguas abiertas, y en diferentes profundidades. En cada caso se usarán las redes adecuadas para las características de la estación y el tipo de ictiofauna (bentónica o pelágica).

El número de estaciones de muestreo (=redes a instalar) en la masa de agua depende del área, profundidad, heterogeneidad del hábitat, y de los objetivos del estudio. En estudios efectuados en lagos de Suecia¹ se dan los siguientes rangos (para permitir un nivel de detección del 50% de los cambios de la abundancia relativa de las especies en seguimientos de la masa de agua):

Prof. (m)	Área del lago (ha)					
	<20	21 - 50	51 - 100	101 - 250	251 - 1000	1001 - 5000
0 – 5,9	8	8	16	16	24	24
6 – 11,9	8	16	24	24	32	32
12 – 19,9	16	16	24	32	40	40
20 – 34,9	16	24	32	40	48	56
35 – 49,9	16	32	32	40	48	56
50 – 74,9			40	40	56	64
>75					56	64

En la cuenca del Ebro, existen pocos lagos que superen las 50 ha. En el caso de los embalses los más extensos alcanzan hasta 6.000 - 7.000 ha (Ebro, Mequinenza).

¹ Swedish standard methods for sampling freshwater fish with multi-mesh gillnets. Fiskerivertket 2000:1

8.3. DIRECTRICES PARA LA PESCA CON REDES

En general, en embalses y lagos es más usual el uso de redes estáticas. Las redes se instalan al atardecer y se revisan a primera hora de la mañana, con tiempos de captura de unas 12 horas. No obstante para determinados estudios se mantienen durante 24 horas (García-Berthou, 2001).

Las redes se instalan en lugares inicialmente elegidos, usando pesos y boyas.

El modo de instalación de las redes depende de las características de la red:

- **Nasas y redes trampa:** Se escogen puntos someros del litoral y se sitúan las redes junto al fondo, entre la vegetación o en la profundidad elegida. Las nasas pueden cebarse o no. Los cebos pueden ser muy variados (pescado, hígado, maíz, queso, etc...). Este tipo de red suele mantenerse unas 24 horas, en caso de mantenerlas durante un mayor periodo se deben revisar periódicamente para extraer las capturas.
- **Agalladeras y trasmallos:** Se instalan en las áreas elegidas en diferentes posiciones para aumentar la eficiencia de pesca. En general, se pueden situar algunas unidades perpendiculares al litoral, otras paralelas y otras en la masa libre de agua a diferentes profundidades.

Se usan boyas y anclajes para mantener la posición de las redes.

Transcurrido el tiempo de captura se procede a extraer los peces de las redes y a su identificación, recuento y a la toma de medidas biométricas y al examen de su estado sanitario (en caso requerido). Los peces se devuelven al agua inmediatamente. El procedimiento de manipulación de los peces es el mismo que se ha descrito para la pesca eléctrica (capítulo 7).

Se tienen que contabilizar los peces muertos; además éstos se pueden conservar para trabajos en el laboratorio.

Muestreo de peces en lagos y embalses

Pesca



Embarcación para pesca eléctrica (foto de E. García Berthou)

Redes



Fotografía 5.12.: Muestreo de peces en lagos y embalses (Propiedad de URS y E. Gracia Berthou)

9. IDENTIFICACIÓN, RECUENTO Y MEDIDAS BIOMÉTRICAS

9.1. IDENTIFICACIÓN

La identificación de los peces se realizará a nivel de especie mediante la observación de caracteres morfológicos externos, durante la pesca. En el caso de especies con características externas poco claras (híbridos, especies cercanas, juveniles) se conservarán algunos ejemplares para su posterior análisis en el laboratorio.

En la bibliografía se han incluido los textos más usuales para el estudio taxonómico.

9.2. RECUENTO Y MEDIDAS BIOMÉTRICAS

Para cada ejemplar capturado mediante pesca eléctrica o con redes, e identificado a nivel de especie, se tomarán las siguientes medidas biométricas:

- Peso (mediante una balanza electrónica de precisión o con un dinamómetro). Se indica en gramos.
- Longitud furcal (distancia entre el extremo de la cabeza y la hendidura de la cola que se mide con la ayuda de una regla o ictiómetro). Se indica en milímetros.
- Estado sanitario. Se indican ulceraciones, parásitos y su ubicación (agallas, ojos, etc.).

Los datos indicados se anotan en hojas de campo previamente preparadas (ver apéndice). Si el número de individuos de una especie supera los 30 ejemplares, se pesará y medirá una muestra representativa para determinar la estructura de las clases de edad (EN 14011:2003). En este caso la biomasa total capturada se estimaría a partir de la biomasa medida y el número de individuos capturados.

9.3. DETERMINACIÓN DE LA EDAD DE LOS EJEMPLARES

La edad de los ejemplares puede determinarse de forma indirecta a partir del análisis de la frecuencia de las clases de tamaño (según la longitud furcal). No obstante para obtener estimas directas de la edad pueden analizarse los patrones de crecimiento de algunas estructuras calcificadas, como por ejemplo otolitos y escamas.

- **Escamas**

En el caso de las escamas, el daño al ejemplar es mínimo ya que sólo hay que recoger unas pocas escamas (5), las cuales se guardan en un sobre, o en una preparación microscópica. Se recomienda tomar las escamas de lugares específicos del cuerpo (por ejemplo entre la línea lateral y el extremo final de la aleta dorsal para los salmónidos).

- **Otolitos**

Son unas pequeñas estructuras calcáreas que se encuentran en el oído medio. Su extracción requiere la disección del pez. Se usan para determinar la edad para las especies que carecen de escamas o para los ejemplares de más edad de las especies con escamas (en estos casos las líneas de crecimiento en las escamas aparecen muy comprimidas y no se pueden contar).

La determinación de la edad mediante escamas y sobre todo con otolitos requiere un proceso de preparación de las muestras, y su lectura presenta una cierta complejidad, precisándose un experto en datación de peces. Para más detalles sobre la estimación de edad y crecimiento se puede consultar Bagenal y Tesch (1978).



Fotografía 5.13.: *Lepomis gibbosus* (Propiedad de URS)



Fotografía 5.14.: *Micropterus salmoides* (Propiedad de URS)



Fotografía 5.15.: *Gambusia holbrooki* (Propiedad de URS)

10. CONSERVACIÓN Y ETIQUETADO DE LAS MUESTRAS

10.1. TÉCNICAS DE CONSERVACIÓN

Para conservar ejemplares para el estudio taxonómico se usará alguno de los conservantes indicados en el apartado 6.2.2., teniendo en cuenta las características de cada uno en cuanto a su especificidad y toxicidad.

Si los peces se requieren para realizar análisis toxicológicos de sus órganos, se envolverán en papel aluminio y se conservarán en hielo durante el transporte al laboratorio. Si las muestras no se pueden procesar en un tiempo corto, se procederá a congelar los ejemplares. El procedimiento de manipulación y conservación dependerá del tipo de análisis a efectuar:

- Para análisis de compuestos orgánicos en cualquier tejido del pez, se enjuagarán los ejemplares con agua limpia, se envolverán en papel de aluminio y se procederá a su inmediata congelación (-20° C).
- Para la determinación de metales u otros compuestos inorgánicos se introducirán los ejemplares en bolsas de polietileno de un solo uso y se procederá a su inmediata congelación (-20° C).
- La obtención de muestras de tejidos de cerebro, branquias o sangre para la determinación de parámetros específicos deberá ser realizada in situ. Estas muestras se mantendrán congeladas (-20° C) en viales de vidrio.
- Los ejemplares para análisis histológicos o de agentes infecciosos deberán mantenerse vivos hasta su llegada al laboratorio o, como mínimo, conservados en hielo entre 2° y 5° C (nunca congelados). Para mantenerlos vivos se transportarán en recipientes llenos de agua hasta la mitad, con inyección de aire o de oxígeno puro.

10.2. ETIQUETADO

Todas las muestras deben estar convenientemente etiquetadas de forma que se identifique un código de la muestra, un código de su procedencia (localización), fecha de recolección, persona o entidad a cargo de la recolección e identificación etc.... Es conveniente que cada ejemplar disponga de una etiqueta fijada al cuerpo (inserta en la boca o en la zona opercular) y otra etiqueta plastificada adherida al envoltorio de la muestra. Se usará un rotulador resistente al agua para escribir en las etiquetas.

11. SELECCIÓN DEL PERIODO DE MUESTREO Y FRECUENCIA

11.1. PERIODO DE MUESTREO

Los periodos recomendados para los ríos son:

Ríos de alta montaña Ríos de montaña húmeda calcárea	Julio-Agosto-Septiembre
Ríos de montaña mediterránea silíceo Ríos de montaña mediterránea calcárea Ríos mineralizados de baja montaña mineralizada	Mayo - Junio - Julio
Grandes Ejes en ambiente mediterráneo Ejes mediterráneo-continentales mineralizados Ejes mediterráneo continentales poco mineralizados	Agosto - Septiembre - Octubre

Tabla 5.6.: Periodos recomendados para el muestreo de peces en ríos

Para los lagos los periodos recomendados son:

Lagos de montaña	Agosto - Septiembre
Lagos cársticos	Mayo y Octubre
Lagos llanura sedimentaria permanentes	Junio - Julio
Lagos llanura sedimentaria temporales	Abril - Mayo - Junio
Lagunas litorales	Mayo - Junio - Julio

Tabla 5.7.: Periodos recomendados para el muestreo de peces en lagos

Inicialmente puede realizarse un único muestreo por periodo, entre verano e inicio del otoño, no obstante si los recursos lo permiten sería recomendable realizar dos muestreos (en primavera y otoño).

11.2. FRECUENCIA DE MUESTREO EN LOS CONTROLES DE VIGILANCIA Y OPERATIVOS

En los trabajos iniciales de identificación de las condiciones de referencia y del diseño de la red de vigilancia, se recomienda realizar un muestreo de un número elevado de estaciones (a realizar entre 2005 y 2007). Posteriormente se recomienda muestrear cada 3 años.

Para la red de control operativo la frecuencia de muestreo podría ser anual o bianual, con uno o dos muestreos por año dependiendo del impacto que se está evaluando.



Fotografía 5.16.: *Esox lucius* (Propiedad de URS)

12. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Los resultados que se obtienen de los tipos de muestreo de peces especificados en el procedimiento son los siguientes:

- Composición específica: Es el listado de las especies capturadas.
- Abundancia de peces que suele expresarse mediante el número de individuos (capturas) por unidad de esfuerzo (CPUE). La unidad de esfuerzo puede referirse a área muestreada (individuos/ha – pesca eléctrica) o área muestreada y unidad de tiempo (pesca con redes: individuos/ha hora).
- Estructura de tamaño y de edad: La estructura de edad se identificará para cada especie por medio del análisis de las frecuencias de las longitudes de los individuos que permitan identificar clases modales. Estas clases se asumen, entonces, como clases de edad.

Además se obtienen otros datos adicionales:

- Recuento de peces de cada especie
- Peso individual de cada ejemplar
- Estado sanitario (anomalías, lesiones, parásitos)

Es de interés el cálculo de los siguientes índices biométricos:

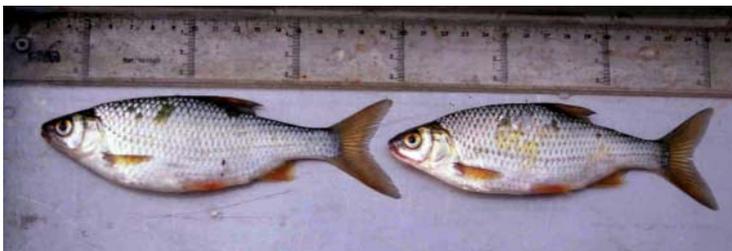
- Ecuación de Ricker: relación longitud (L_T) – peso (P_T)

$$P_T = a \times L_T^b$$

- Índice de condición

$$K = a \times e^{b \times L_T}$$

Toda la información que se obtenga debería recogerse en una base de datos de ámbito nacional o de cuenca y diseñada para dar cabida a los aspectos específicos de la DMA. Asimismo la información se georreferenciará e integrará en un SIG.



Fotografía 5.17.: *Rutilus rutilus* (Propiedad de URS)

13. CONTROL DE LA CALIDAD EN EL MUESTREO, TRATAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ICTIOFAUNA

13.1. INTRODUCCIÓN

La implementación de la Directiva 2000/60/CE requiere que los métodos que se utilicen en el establecimiento del estado ecológico procedan de metodologías estandarizadas (ISO, CEN, o de organismos nacionales de estandarización), que los laboratorios dispongan de programas de aseguramiento de la calidad (EN ISO 17025) y participen regularmente en ejercicios de intercalibración (*Proficiency testing programmes*).

El muestreo y manipulación de muestras de ictiofauna, como elemento de calidad para el establecimiento del estado ecológico, debe realizarse siguiendo procedimientos estandarizados y con sistemas de control de la calidad.

Todo lo indicado hace necesario la elaboración y aplicación de métodos de control de calidad específicos para las actividades relacionadas con el muestreo y manipulación de ictiofauna. El grupo CEN TC 230 WG 2 está desarrollando programas para asegurar la calidad en las tareas de implantación de la DMA.

13.2. DIRECTRICES PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD

Las medidas a seguir persiguen garantizar la correcta identificación de las especies, así como la documentación de la toma de muestras y de la evaluación de la abundancia de las especies.

Objetivo: Asegurar la comparación de los resultados de la pesca eléctrica, en sucesivos muestreos	
Medidas	<ul style="list-style-type: none"> Identificar y georreferenciar las estaciones de muestreo (anotar las coordenadas geográficas con un GPS, identificar puntos de referencia y accesos). Realizar fotografías de la estación de muestreo que puedan ser repetibles.
	<ul style="list-style-type: none"> Usar el mismo protocolo de pesca (tipo de equipos, procedimientos) en los sucesivos muestreos. Si éste se cambia se deberán obtener resultados comparativos entre el equipo/procedimiento antiguo y el nuevo para que los resultados sean comparables.

Tabla 5.8.: Asegurar la comparación de los resultados de la pesca eléctrica, en sucesivos muestreos

Objetivo: Realizar el trabajo de campo y evaluaciones según los procedimientos estándar previamente definidos	
Medidas	<ul style="list-style-type: none"> Preparar un plan de trabajo con directrices claras que describan de forma didáctica las tareas y procedimientos a desarrollar en el trabajo de campo.
	<ul style="list-style-type: none"> Contar con un equipo humano entrenado en las técnicas de pesca y un esquema organizativo adecuado. El jefe del equipo definirá las tareas a desarrollar por cada uno de miembros del equipo, e indicará a éstos las medidas preventivas para reducir los riesgos de shock eléctrico durante la pesca; así como las medidas para prevenir incendios y evitar la contaminación del medioambiente (derrame de gasoil, aceite, etc.).

Tabla 5.9.: Realizar el trabajo de campo y evaluaciones según los procedimientos estándar previamente definidos

Objetivo: Control del manejo de datos y análisis de los resultados	
Medidas	<ul style="list-style-type: none"> Todos los datos de un muestreo específico se deben identificar de forma individual, en la base de datos por medio de códigos.
	<ul style="list-style-type: none"> La documentación de campo y laboratorio (muestras, estadillos, fotos) se guardará durante un periodo no inferior a 5-6 años.
	<ul style="list-style-type: none"> Los datos en formato electrónico deberán incluir identificación de su origen (autores, fechas, etc...) y referencias para ampliar la información.

Tabla 5.10.: Control del manejo de datos y análisis de los resultados



Bibliografía:



11. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- **Agencia Catalana de l'Aigua. Departament de Medi Ambient** (2003). Desenvolupament d'un índex d'integritat biòtica (IBICAT) basat en l'ús dels peixos com a indicadors de la qualitat ambiental dels rius a Catalunya. Universitat de Barcelona. Departament de Biologia Animal.
- **Armengol J., Navarro E., García-Berthou E. y Moreno-Amich R. (directores)** (2003). Caracterització i propostes d'estudi dels embassaments catalans segons la Directiva 2000/60/EC del Parlament Europeu. Informe final para la Agencia Catalana del Agua (diciembre 2003). 212 pág.
- **Appelberg M. Editor** (2000). Swedish standard methods for sampling freshwater fish with multi-mesh gillnets. Fiskeriverket Information 2000:1. Göteborg.
- **B.C. Ministry of Environment, Lands and Parks. British Columbia** (1997). Fish Collection Methods and Standards version 4.0. Vancouver.
- **Baeza, D. y D. García del Jalón** (2004). The natural variability approach. Application to five rivers in the Ebro basin, Spain. In: D. García de Jalón & P. Vizcaino (eds.). Procs. 5th Int. Symp. on Ecohydraulics. Aquatic Habitats: Analysis & Restoration.(1339-1342). Vol. II. Madrid.
- **Bagenal, T.B. y F.W. Tesch** (1978). Age and growth, pp. 101-136. In T.B. Bagenal (ed.). Methods for assessments of fish production in fresh waters. Blackwell Scientific publications. Oxford, UK, 365 p.
- **Belpaire, C., R. Smolders, I. Vanden Auweeke, D. Ercken, J. Breine, G. Van Thuyne y F. Ollevier** (2000): An index of biotic integrity characterizing fish populations and the ecological quality of Flandrian water bodies. Hydrobiologia 434: 17-33.
- **Blanco J.C. y J.L. González** (1992). Libro Rojo de los Vertebrados de España. ICONA. Colección Técnica. MAPA. Madrid.
- **Bradley, C.M., C. McGuinness, J-R Baars, D. Tierney, W. Trodd y M. Kelly-Quinn** (2005). Species-level indicators of reference conditions in Irish rivers. Verh. Internat. Verein. Limnol. 29, 453-456.
- **Carol J., Benejam L., Pou-Rovira Q., Zamora L. y García-Berthou E.** (2003). Primera citació de brema blanca (*Abramis bjoerkna*) a Catalunya i noves introduccions de peixos exòtics (*Alburnus alburnus*, *Sander lucioperca* i *Silurus glanis*) a diverses conques catalanes. [First record of white bream (*Abramis bjoerkna*) in Catalonia (Spain) and new introductions of exotic fish (*Alburnus alburnus*, *Sander lucioperca* and *Silurus glanis*) into Catalan river basins]. Butlletí de la Institució Catalana d'Història Natural 71: 135-136.
- **Carol J., Benejam L., Alcaraz C., Vila-Gispert A., Zamora L., Navarro E., Armengol J. y García-Berthou E** (en premsa). The effects of limnological features on fish assemblages in fourteen Spanish reservoirs. Ecology of Freshwater Fish in press.
- **CEN EN 14011** "Water quality- Sampling of fish with electricity. March 2003.
- **CEN TC 230/WG 2/TG5: N32**. A guidance standard for assessing the hydromorphological features of rivers. May 2002.
- **Comisión Europea** (2000). Directiva 2000/60/EC de 23 de octubre de 2000 por la que se establece un marco para la acción comunitaria en materia de aguas.
- **Doadrio, I. & M.J. Madeira** (2004): A new species of the genus *Gobio* Cuvier, 1816 (Actynopterygii, Cyprinidae) from the Iberian Peninsula and Southwestern France. Graellsia 60(1): 107-116.
- **Dycus D.L.** Indicators of Reservoir Ecologica Condition. Tennessee Valley Authority.
- **FAME** (2001). Development, Evaluation & Implementation of a Standardised Fish-based Assessment Method for the Ecologica Status of European Rivers. A contribution to the Water Framework Directive. WP 10. Comparison of the European Fish Index with the Standardised European Model, The Spatially Based Models (eco-regional and European) and Existing Methods (D16-17). Final Report. Quataert P., Breine J. & I. Simoens coordinators.
- **FAME** (2002). Development, Evaluation & Implementation of a Standardised Fish-based Assessment Method for the Ecologica Status of European Rivers. A contribution to the Water Framework Directive. Defining Reference Conditions (D3). Final Report. Economu A.N. Coordinator). <http://fame.boku.ac.at>
- **FAME** (2002) Development, Evaluation & Implementation of a Standardised Fish-based Assessment Method for the Ecologica Status of European Rivers. A contribution to the Water Framework Directive. Metric Selection and Sampling Procedures for FAME (D4 – 6). Kestemont P. & D. Goffaux Coordinators.
- **FAME** (2004). Development, Evaluation & Implementation of a Standardised Fish-based Assessment Method for the Ecologica Status of European Rivers. A contribution to the Water Framework Directive (FAME). Final Report Scientific achievements Sections 5 & 6. Schmutz S. (Coordinator). <http://fame.boku.ac.at>
- **Fausch, K.D.; J.R. Karr & P.R., Yant** (1984). Regional application of an index of biotic integrity based on stream fish communities. Transactions of the American Fisheries Society 113: 39-55.
- **García-Berthou E. y R. Moreno-Amich** (1993). Multivariate análisis of covariance in morphometric studies of the reproductive cycle. Can.J.Fish. Aquat.Sci. 50: 1394-1399.
- **García-Berthou E. y R. Moreno-Amich** (2000). Introduction of exotic fish into a Mediterranean lake over a 90-year period. Arch.Hydrobiol. 149:271-284.

- **García-Berthou E.** (2001). Size and depth-dependent variation in habitat and diet of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquat.sci* 63: 466-476.
- **García de Jalon, D., M. Gonzalez Tanago y C. Casado** (1992). Ecology of regulated streams in Spain: An overview. *Limnetica* 8, 161-166.
- **García de Jalón D. y M. González del Tánago** (en prensa). Current Practices on the Water Frame Directive implementation in Spain: Problems and Perspectives. In: *Assessing Ecological Status of rivers, lakes and transitional waters*. (I. Cowx, ed.). Blackwell Sc. Pub. Oxford.
- **Gassner H., Tischler G. & J. Wanzenböck** (2003). Ecological Integrity of Lakes Using Fish Communities- Suggestions of new metrics developed in two Austrian Prealpine Lakes. *Internat.Rev.Hydrobiol.* 88(6): 635-652.

12. BIBLIOGRAFÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ICTIOFAUNA

- **Doadrio I. Editor** (2001). Atlas y Libro Rojo de los peces continentales de España. Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Museo Nacional de Ciencias Naturales. Madrid. 364 pag.
- **Doadrio I., Elvira B. Y Y. Bernat** (1991). Peces continentales españoles. Inventario y clasificación de zonas fluviales. MAPA-ICONA. Colección Técnica. MAPA. Madrid. 221 págs.
- **Maitland P.S.** (2000). *The Hamlyn guide to freshwater fish of Britain and Europe*. Hamlyn, London. 256 pp.
- **Maitland P.S.** (2004). *Keys to the freshwater fish of Britain and Ireland, with notes on their distribution and ecology*. Freshwater Biological Association, Ambleside.
- **Pinder A.C.** (2001). *Keys to larval and juvenile stages of coarse fishes from fresh waters in the British Isles*. Freshwater Biological Association, Ambleside, Cumbria, UK.



Apéndice :

■ Hojas de campo para muestreo con pesca eléctrica y con redes



HOJA DE CAMPO PARA PESCA ELÉCTRICA EN RÍOS

Hoja nº

Río:
Localidad / Municipio:
Estación:
Código estación:

Técnicos muestreo:

Fecha:
Hora:

Localización con GPS:
Huso: **Coordenadas_X (UTM):**
 Coordenadas_Y (UTM):

Parámetros fisicoquímicos:
Temperatura agua (°C):
Conductividad (±S/cm):
pH (unidades):
Oxígeno disuelto (mg/L):

Ajustes de pesca eléctrica:
Tipo de generador eléctrico:
Potencia generador (W):
Voltaje salida convertidor (V):
Amperaje salida convertidor (A):

Esfuerzo de pesca eléctrica:
Tiempo de pesca: **Hora inicio:** **Hora fin:**
Superficie de muestreo: **Longitud (m):** **Anchura (m):**

Descripción acceso:

Croquis localización:

Detalles fotos:		<i>La foto muestra</i>	
Foto nº / Carrete nº / Estación nº 1	Aguas arriba:	Orilla derecha:	
	Aguas abajo:	Orilla izquierda:	
	Coordenadas:		
Descripción:			
Foto nº / Carrete nº / Estación nº 2	Aguas arriba:	Orilla derecha:	
	Aguas abajo:	Orilla izquierda:	
	Coordenadas:		
Descripción:			
Foto nº / Carrete nº / Estación nº 3	Aguas arriba:	Orilla derecha:	
	Aguas abajo:	Orilla izquierda:	
	Coordenadas:		
Descripción:			
Foto nº / Carrete nº / Estación nº 4	Aguas arriba:	Orilla derecha:	
	Aguas abajo:	Orilla izquierda:	
	Coordenadas:		
Descripción:			

HOJA DE CAMPO PARA PESCA CON REDES

Hoja nº

Embalse:
Río:
Localidad / Municipio:
Estación:
Código estación:

Técnicos muestreo:

Localización (GPS) UTM_X:
Huso: UTM_Y:
Tipo de red:
Profundidad (m):
Posición y/o orientación:

Fecha:
Meteorología:

Calado **Fecha:**
Recogida **Hora:**
Fecha:
Hora:
Tiempo total:

Croquis localización y observaciones:

Especie	Long (mm)	Peso (g)	Estado sanitario (ulceraciones, parásitos)
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			

Estima mortandad (% peces muertos):



HOJA DE CAMPO PARA MEDIDAS BIOMÉTRICAS

Hoja nº

Río:
Localidad / Municipio:
Estación:
Código estación:

Técnicos muestreo:

Fecha:
Hora inicio:

Especie	Long (mm)	Peso (g)	Estado sanitario (ulceraciones, parásitos)
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			

Estima mortandad (% peces muertos):



Capítulo 6:

■ Directrices para el control de vigilancia y control operativo en lo referido al los indicadores de calidad



1. DIRECTRICES PARA EL CONTROL DE VIGILANCIA Y CONTROL OPERATIVO EN LO REFERIDO A LOS INDICADORES DE CALIDAD

La DMA establece la puesta en marcha de programas de seguimiento que permitan el diagnóstico y el seguimiento del estado ecológico de las masas de agua. Estos programas se indican en el diagrama adjunto:

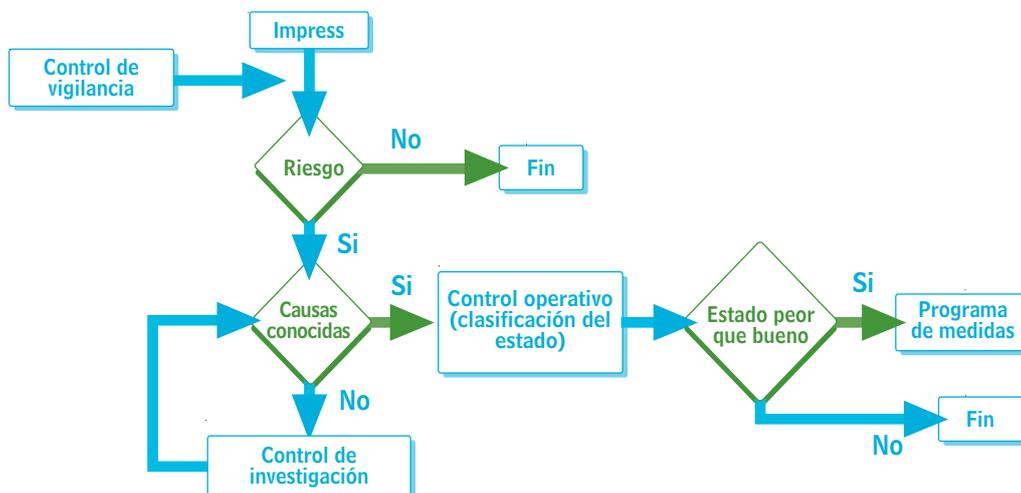


Figura 6.1.: Programas de seguimiento de la Directiva 2000/60/CE

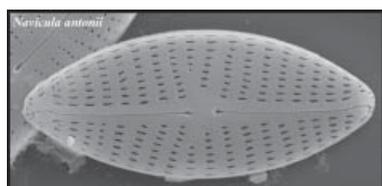
Los objetivos de las redes de control de vigilancia y control operativo se indican en el siguiente cuadro (según Anexo V apartados 1.3.1. y 1.3.2. de la DMA):

Control de vigilancia	Control operativo
<ul style="list-style-type: none"> • Completar y aprobar el procedimiento de evaluación de impacto (análisis de presiones e impactos). 	<ul style="list-style-type: none"> • Establecer el estado de las masas identificadas en riesgo de no cumplimiento de los objetivos medioambientales.
<ul style="list-style-type: none"> • Contribuir al diseño eficaz de los futuros programas de vigilancia. 	<ul style="list-style-type: none"> • Evaluar los cambios que se produzcan en las aguas indicadas, como resultado de los programas de medidas.
<ul style="list-style-type: none"> • Evaluar los cambios a largo plazo en las condiciones naturales. 	
<ul style="list-style-type: none"> • Evaluar los cambios a largo plazo resultantes de actividad antropogénica muy extendida 	

Tabla 6.1.: Objetivos de las redes de control de vigilancia y control operativo

En los apartados siguientes se indican las directrices a considerar para el uso de los elementos de calidad biológica en las redes de control de vigilancia y control operativo.

1.1. SELECCIÓN DE LAS ESTACIONES DE CONTROL



Fotografía 6.1.: *Navicula antonii* (Propiedad de URS)

Se seleccionarán estaciones de referencia en los diferentes tipos de ríos y lagos, teniendo en cuenta los datos sobre las presiones e impactos. Se identificarán estaciones de máxima calidad biológica para los tipos que carezcan de estaciones de referencia. Para los embalses (masas fuertemente modificadas) se puede adoptar, como criterio del potencial ecológico, que no supere un determinado nivel de estado trófico, que variará en los diferentes tipos de embalses, o que podrá ser específico para un determinado tipo de embalse

1.1.1. Red de referencia

En la Confederación Hidrográfica del Ebro están en marcha trabajos para la identificación y validación de estaciones de referencia en lagos y embalses.

La red de referencia de ríos cuenta actualmente con datos de macroinvertebrados y diatomeas, y están en marcha estudios de peces en algunas estaciones.

Los estudios para determinar la red de referencia de lagos están menos avanzados que los de los ríos y no se han realizados estudios sobre la ictiofauna por el momento. Sin embargo los peces se deberán analizar en todas las estaciones que integren la red de referencia, y en estas no deberían encontrarse especies introducidas.

Para los macrófitos se realizarán seguimientos en lagos seleccionados dentro de los diferentes tipos, con la finalidad de recabar información que permita perfilar las condiciones de referencia. En el caso de los ríos, se sugiere analizar los macrófitos en las estaciones de la red de referencia existente.

1.1.2. Control de vigilancia

La red de control de vigilancia deberá estar integrada por suficientes masas de agua representativas de las condiciones de la demarcación tanto en términos naturales como de las presiones e impactos identificados.

En la Demarcación del Ebro se han identificado 697 masas de aguas fluviales y existe unas 200 estaciones de muestreo de diatomeas y unas 500 estaciones de macroinvertebrados. Respecto a las diatomeas sería deseable ampliar el número de puntos hasta 400; esto es importante en las etapas iniciales de diseño y explotación preliminar de la red de vigilancia para ajustar el número de puntos final de forma estadística.

El número de puntos para los macroinvertebrados podría ser suficiente (o bien incrementarse ligeramente); no obstante se requiere redefinir la red en función de la configuración de masas fluviales.

En 2005-2006 se planea realizar estudios de peces en 300 estaciones de muestreo y se recomienda introducir el estudio de macrófitos en la totalidad de las estaciones de la red de control de vigilancia, cuando esta se defina.

Para los lagos se han identificado 92 masas de agua. De estas solo un tipo (alta montaña septentrional, dimictico, aguas ácidas) agrupa un número considerable de lagos (58), mientras que el resto de tipos están representados por 1 a 7 lagos.

Dado que en lagos se carece de datos de diatomeas bentónicas en la mayoría de las masas de agua, sería deseable muestrearlas todas si se adopta este indicador para la determinación del estado ecológico.

Se recomienda estudiar las diatomeas, fitoplancton, invertebrados bentónicos y, macrófitos de todos lo lagos (34) que pertenecen a los diferentes tipos (excepto al de montaña) y añadir a éstos una selección del grupo de lagos de montana (5 ó 6).

El estudio de los peces no se plantea inicialmente para los lagos, por no existir comunidades características en muchos y por la dominancia de las especies introducidas.

Para la selección de los puntos de muestreo hay que tener en cuenta que:

- Estén representados tramos de referencia para los tipos que dispongan de ellos (según el estudio de presiones e impacto)
- Existan tramos representativos de los diferentes grados de calidad (según los estudios de presiones e impactos)
- Coincida en el punto de la red al menos, diatomeas, macroinvertebrados, macrófitos, peces y la calidad físico-química siempre que sea posible.



Fotografía 6.2.: *Chondrostoma arcasii*
(Propiedad de URS)



Fotografía 6.3.: *Chondrostoma miegii*
(Propiedad de URS)

En los apartados correspondientes de los capítulos se presenta el procedimiento que señala las directrices para la selección del punto de muestreo. No obstante en términos generales se recomienda:

- Evitar situar la estación de muestreo de la red de vigilancia muy cerca de vertidos directos, siendo más adecuado situar la estación donde el agua vertida se ha mezclado totalmente con la del medio receptor.
- Analizar la posibilidad de muestrear en más de un punto en masas de agua muy extensas. La longitud media de las masas de agua fluviales de la cuenca de Ebro es de 19 km pero existen algunas masas de agua que superan los 40 km y hasta los 80 km (Jalón, Piedra, Manubles). En estos casos se debería disponer de más de un punto de muestreo.
- Siempre que sea posible las estaciones de muestreo tienen que ser vadeables en su totalidad.
- Deben estar representados, en la estación de muestreo, los mesohabitats presentes en el tramo fluvial (rápidos, tablas y pozas)
- Evitar los tramos con azudes, ya sea embalsados o bajo presas o infraestructuras hidráulicas que puedan favorecer a los macrófitos



Fotografía 6.4.: *Barbus haasi* (Propiedad de URS)



Fotografía 6.5.: *Tinca tinca* (Propiedad de URS)

1.1.3. Control operativo

Los puntos de control operativo deben cubrir todas las masas identificadas en riesgo de no cumplir los objetivos medioambientales. No obstante, no se han de analizar todos los parámetros indicadores de los elementos de calidad que indica la DMA, sino aquellos más sensibles a las presiones a las que está sujeta la masa.

Las diatomeas epilíticas son especialmente adecuadas para evaluar impactos derivados de la eutrofización e incrementos de materia orgánica en la cuenca del Ebro. También son indicadas para evaluar impactos que ocasionen cambios de salinidad y del pH.

Los indicadores fitoplancton y macroinvertebrados en los ríos, se consideran especialmente adecuado para evaluar impactos a corto plazo derivados de la eutrofización y de la contaminación orgánica, así como de las presiones hidromorfológicas que produzcan variaciones de la tasa de renovación del agua.

En los lagos los macroinvertebrados bentónicos (crustáceos) son adecuados para la evaluación de impactos a corto y medio plazo relacionados con la eutrofia, contaminación orgánica, cambios en la salinidad de las aguas, y tasa de renovación. Los macroinvertebrados bentónicos pueden usarse para evaluar impactos relacionados con la fluctuación del nivel del agua.

La localización de los puntos de control operativo referidos al uso de métricas basadas en los indicadores debe tener en cuenta que:

- debe permitir evaluar la magnitud e impacto de los procesos de contaminación orgánica y/o salinización de origen difuso y puntual,
- y en caso de existir varios puntos de contaminación puntual, los puntos de control se situarán de modo que sean representativos de la magnitud y el impacto del conjunto

1.2. FRECUENCIA DE MUESTREO

En general, la frecuencia de muestreo en microalgas en los estudios de seguimiento de la calidad del agua varían entre una vez por año (en época de aguas bajas y estables) a cuatro veces al año (coincidiendo con las estaciones del año). No obstante los recientes estudios realizados en ríos europeos demuestran que las comunidades de diatomeas integran los cambios de calidad del agua durante un periodo de unos 60 días (Ritmo et al., 2005) y entonces indican la calidad de los dos meses anteriores a la fecha del muestreo.



Fotografía 6.6.: *Cerathophyllum demersum*
(Propiedad de URS)

Según la DMA se debe realizar un control de vigilancia durante un periodo de un año dentro del periodo que abarque el plan de cuenca (6 años). No obstante en las primeras etapas de reconocimiento de la demarcación y durante los tres primeros años de funcionamiento de la red de control (2006–2008) sería deseable una mayor frecuencia de muestreo

	Periodo de muestreo	Frecuencia de de los controles de vigilancia y operativo
Fitobentos	<p>Algunas directrices a tener en cuenta en la selección de la época de muestreo son:</p> <ul style="list-style-type: none"> Las microalgas responden más rápido a los cambios de la calidad del agua con temperaturas cálidas que frías, luego las épocas favorables son primavera y verano. Evitar el muestreo después de periodos de lluvias fuertes; se recomienda esperar hasta 4 semanas después de una tormenta fuerte. <p>En los controles de vigilancia a realizar en ríos se recomienda muestrear las diatomeas epilíticas, 2 veces al año en primavera (periodo de aguas altas) y verano (periodo de aguas bajas); ajustándose los periodos de muestreo en cada tipo fluvial según sus condiciones climáticas. En general los muestreos se realizarán entre mayo y octubre.</p> <p>En caso de que sólo se programe un muestreo éste se realizará en verano.</p>	<p>Se recomienda un frecuencia anual en las primeras etapas, y en etapas posteriores se recomienda realizar controles de vigilancia cada 3 años.</p> <p>La frecuencia de muestreo de microalgas bentónicas en los controles operativos y de investigación se determinará de forma específica.</p>
Fitoplancton	<p>La variabilidad temporal del fitoplancton es acusada, y su composición y abundancia responde a los patrones de variación de la iluminación (intensidad y fotoperiodo), turbulencia del agua, tasa de renovación del agua, temperatura, mineralización, pH y concentración de nutrientes a lo largo del año. En estudios de investigación, los seguimientos con periodicidad mensual permiten alcanzar un nivel de descripción bastante adecuado, si bien la frecuencia correcta sería quincenal o incluso semanal (Reynolds, 1984, 1990). Esta frecuencia de muestreo está fuera de alcance en el ámbito de la implementación de la DMA. En la guía "Monitoring"(a) se recomienda muestrear el fitoplancton al menos dos veces al año; no obstante una buena caracterización del fitoplancton requeriría 4-6 muestreos al año, con una repartición temporal que refleje la estacionalidad(b).</p>	<p>Se recomienda una frecuencia bianual dadas las variaciones debidas a la climatología mediterránea</p> <p>La frecuencia de muestreo en el control operativo podrá ser más corta (4 veces al año con algún muestreo adicional en el periodo de primavera a otoño), pero esto se ajustará a cada caso específico.</p>

(a) Guidance on monitoring for the Water Framework Directive. Working Group 2.7. Final Version 23 January 2003.

(b)Indicación de Eduardo Vicente

Tabla 6.2.: Periodos y frecuencia de muestreo en los controles de vigilancia y operativo

	Periodo de muestreo	Frecuencia de de los controles de vigilancia y operativo
Vertebrados bentónicos	Sería deseable contar con muestreos estacionales para reflejar la temporalidad, no obstante en caso de sólo poder efectuarse un muestreo de macroinvertebrados bentónicos al año, éste se realizará en periodos favorables. Éstos comprenden la primavera y verano, épocas en las que la comunidad alcanza su máxima diversidad. No obstante la programación de los muestreos se ajustará a las condiciones climáticas específicas de los tipos de ríos y lagos.	Se recomienda una frecuencia anual o bianual para un número seleccionado de estaciones. En etapas posteriores se recomienda realizar controles de vigilancia cada 3 años; no obstante se pueden programar los controles en años sucesivos para diferentes grupos de estaciones de muestreo. La frecuencia de muestreo en los controles operativos se determinarán de forma específica para cada caso, y como mínimo será de 1 año.
Ictiofauna	Éste abarca entre primavera y otoño que es cuando la temperatura del agua es adecuada para la pesca eléctrica. No obstante, en general la mejor época de muestreo se sitúa entre mitad de verano y principio de otoño, cuando se dan caudales bajos y poco fluctuantes. En este periodo los alevines ya tienen suficiente tamaño para ser capturados; además en esta época los peces tienden a permanecer en la misma área. No es recomendable comparar datos recogidos durante diferentes periodos del año, y los recogidos después de fuertes avenidas.	Recomendable mayor frecuencia de muestreo que la que determina la DMA También sería deseable realizar dos campañas al año de estudio (primavera y otoño).
Macrófitos	Los macrófitos se tienen que muestrear dentro de su periodo vegetativo que comprende el periodo primavera-otoño. En el apartado 10 se recomiendan los periodos de muestreo para los diferentes tipos de lagos y ríos.	Se recomienda una frecuencia de muestreo anual o bianual.

Tabla 6.3.: Periodos y frecuencia de muestreo en los controles de vigilancia y operativo (continuación)

En concreto para invertebrados bentónicos los periodos de muestreo recomendados para los ríos son:

Ríos de alta montaña Ríos de montaña húmeda calcárea	Julio y Agosto
Ríos de montaña mediterránea silíceo Ríos de montaña mediterránea calcárea Ríos mineralizados de baja montaña mineralizada	Junio y Julio
Grandes Ejes en ambiente mediterráneo Ejes mediterráneo-continentales mineralizados Ejes mediterráneo continentales poco mineralizados	Julio, Agosto y Septiembre

Tabla 6.4.: Periodos de muestreo recomendados para invertebrados bentónicos en ríos

Para los lagos, los periodos inicialmente recomendados, son:

Lagos de montaña	Agosto y Septiembre
Lagos cársticos	Julio y Agosto
Lagos llanura sedimentaria permanentes	Junio y Julio
Lagos llanura sedimentaria temporales	Noviembre y Mayo

Tabla 6.5.: Periodos de muestreo recomendados para invertebrados bentónicos en ríos



Glosario:



GLOSARIO

Agalladera	Tipo de red estática de un solo paño, confeccionada con hilo muy delgado o poco visible. Los peces se enganchan por las agallas u otras partes del cuerpo como espinas, aletas, etc.
Alevín	Denominación que se da al pez en la etapa comprendida entre la eclosión y los primeros estadios de desarrollo.
Ánodo	En el equipo de pesca eléctrica está conectado mediante cable eléctrico al convertidor de corriente y a una pértiga, que es el elemento móvil que conduce la electricidad a los diferentes puntos de pesca.
Apertura numérica (AN)	Es la diferencia entre el índice de refracción del medio entre el objetivo y objeto multiplicado por el seno de la mitad del ángulo de la luz incidente. Indica la medida de la resolución de un objetivo de microscopio o de un sistema óptico.
Asociaciones de algas (Algal assemblages)	Asociaciones de cianobacterias y algas del plancton que tienden a repetirse en un tipo de masa de agua, en determinadas épocas del año o condiciones ambientales.
Assemblages	Asociaciones de organismos que tienden a repetirse en un tipo de masa de agua, en determinadas épocas del año o condiciones ambientales. En la memoria se aplica a los microcrustáceos de lagos.
Batea	Bandeja en la que se deposita la muestra de zoobentos para su limpieza.
Bentónico	Relativo al fondo de la masa de agua.
Bentos	Comunidad animal y vegetal que habita asociada a los sustratos sumergidos.
Biovolumen	Expresión del volumen total que ocupa la biomasa algal, obtenido como el sumatorio de los volúmenes de todas las células que aparecen en el recuento, asimiladas a formas geométricas de fácil cubicación, o bien obtenido por técnicas de análisis de imagen, citometría u otras similares.
Botella hidrográfica	Dispositivo que permite tomar muestras de agua a la profundidad deseada.
Campo de recuento	Área delimitada (cuadrícula o rejilla) en el campo de visión del microscopio que se usa para el recuento. Puede ser también todo el campo óptico del microscopio (sin utilizar cuadrícula).
Capa fótica	Masa de agua comprendida entre la superficie y la profundidad a la que llega el 1% de la radiación incidente. Esta capa es equivalente a la zona trofogenica.
Carotenoides	Pigmentos fotosintéticos que reúnen los carotenos y las xantofilas. Consisten en cadenas alifáticas que presentan los máximos de absorción de la luz en la banda de 400 a 550 nm.
Cátodo	En el equipo de pesca eléctrica está conectado al convertidor de corriente y a una reja metálica que se deposita en un punto del río y actúa como "masa" para crear el campo eléctrico.
Cianobacterias	Bacterias que llevan a cabo la fotosíntesis oxigénica (aparato fotosintético organizado en los fotosistemas PSI y PIS), gracias a que poseen pigmentos fotosintéticos (clorofila a, beta caroteno y ficobilinas). Se las conoce también como cianoprocariontes y anteriormente como cianofíceas.
Clorofilas	Bacterias que llevan a cabo la fotosíntesis oxigénica gracias a que poseen pigmentos fotosintéticos (clorofila a, beta caroteno y ficobilinas).
Pigmentos fotosintéticos	Moléculas complejas derivados de la porfina y que contienen magnesio; tienen dos máximos de absorción de la luz hacia 430 y 665 nm. Existen diferentes tipos, de los que la clorofila a se encuentra en todos los organismos fotosintetizadores, excepto en las bacterias fotosintéticas. Éstas tienen un pigmento equivalente, las bacterioclorofilas de las que también hay varios tipos.

Condiciones de referencia	Para cualquier masa de agua las condiciones de referencia del tipo al que pertenece son un estado ecológico, en el presente o en el pasado, donde los valores de los elementos hidromorfológicos, fisicoquímicos y biológicos corresponden a los que existen en ausencia de alteraciones antropogénicas o de muy escasa importancia (según Guía REFCOND, 2003).
Conservante	Sustancia que se añade a la muestra con el objetivo de impedir o retrasar la alteración de las características originales.
Convertidor de corriente	En el equipo de pesca eléctrica, recibe la alimentación eléctrica del generador y la transforma al voltaje (V) e intensidades (A) deseadas. Su conexión con el ánodo y cátodo permiten aplicar un potencial eléctrico en la masa de agua fluvial.
CPU	Captura por unidad de esfuerzo. Unidad que expresa los resultados de las capturas con pesca eléctrica o redes referidos a un área muestreada (ha) o unidad de tiempo (hora).
Cromatografía	Técnica analítica que permite separar los componentes de una mezcla química según su tiempo de retención en la columna cromatográfica del sistema.
Diatomeas bentónicas	Algas diatomeas que viven asociadas a los sustratos naturales o artificiales sumergidos (no suspendidas en el seno del agua).
Dinamómetro	Balanza de muelle, originalmente utilizada para medir fuerzas, que se utiliza para pesar peces. Las hay de rangos muy variados.
Dipping	Es una técnica de muestreo de aguas leníticas someras consistente en realizar pasadas con un salabre (o red de muestreo) en el seno de agua.
Disco de Secchi	Es un disco de 25 cm de diámetro, con cuatro sectores blancos y negros (diseño original) que se utiliza para medir la transparencia del agua, y a partir de este dato calcular el coeficiente de extinción y la penetración de la luz en las masas de agua. El disco se sumerge verticalmente en el agua hasta que se deja de ver. La distancia recorrida por el disco se denomina profundidad del Disco de Secchi (D). Se considera que este valor multiplicado por 2,5 es el espesor de la capa fótica (1% de la intensidad de la luz incidente), si bien este coeficiente puede variar según las características del agua (es recomendable calibrar este valor con ayuda de un medidor de luz).
DMA	Directiva Marco del Agua, Directiva 2000/60/CE. Establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
ECELS	Índice del estado de conservación de los ecosistemas leníticos someros. Herramienta para el establecimiento del estado ecológico de las zonas húmedas de Cataluña (Ver bibliografía).
ECOFRAME	Propuesta metodológica para la determinación del estado ecológico en lagos someros. Ver Moss et al (2003).
EFI	European Fish Index
Elutriación	En este documento se aplica a la técnica de liberar los organismos y restos orgánicos del sustrato que los contiene (piedras, arenas,...), mediante el lavado con agua y la resuspensión de la fracción fina de la muestra.
Epifiton	Comunidad biológica que vive sobre la vegetación acuática sumergida.
Epilítion	Comunidad biológica que vive sobre un sustrato pétreo (piedras, rocas, etc.).
Epipelon	Comunidad biológica que vive sobre sedimento.
Escala de Vernier	Aparato de medida asociado a la platina mecánica del microscopio que permite anotar la posición relativa transversal y longitudinal de la preparación, con una precisión de 0,1 mm.
Espectrofotometría	Método de análisis óptico basado en la medida de las densidades ópticas de una sustancia para diferentes longitudes de onda.

Estaciones de referencia	Estaciones de muestreo en las masas de agua de ríos, lagos y aguas de transición en las que se encuentran condiciones de referencia.
Estado ecológico	En el marco de aplicación de la DMA, se define como una expresión de la calidad de la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos asociados a las aguas superficiales.
Estereomicroscopio	Lupa binocular.
Eutrofización	Aumento de nutrientes en el agua, especialmente de los compuestos de nitrógeno y o fósforo, que provocan un crecimiento acelerado de algas, y especies vegetales superiores, con el resultado de trastornos no deseados en el equilibrio entre organismos presentes en el agua y en la calidad del agua a la que afecta.
FAME	Fish-based Assessment Method for Ecological Status of European Rivers
Feofitina	Es un producto de degradación de la clorofila tras perder ésta el átomo de magnesio.
Ficobilinas	Pigmentos fotosintéticos accesorios. Constituidas por proteínas solubles en agua; tienen máximos de absorción de la luz en la banda de 500 a 660 nm. Las principales son: ficocianina, ficoeritrina y aloficocianina.
FIDES	Fish Database of European Streams
Fish assemblage	Asociaciones de peces que tienden a repetirse en un tipo de masa de agua, en determinadas épocas del año o condiciones ambientales.
Fitobentos	Organismos fototróficos que viven asociados a cualquier sustrato del fondo de los ecosistemas acuáticos. Incluye cianobacterias, algas microscópicas (microalgas), macroalgas y macrófitos.
Fitoplancton	Comunidad de microorganismos fotosintéticos (microalgas eucariotas y cianobacterias) que vive suspendida en la masa de agua.
Floraciones	Crecimiento masivo de las poblaciones de algas y cianobacterias que aumentan considerablemente la turbidez del agua y confieren a ésta coloraciones muy llamativas (verde, verde-azulada, rojiza, dorada, marrón).
Fluorimetría	Referido al análisis de pigmentos de las algas, es una técnica que permite su identificación, a partir de su fluorescencia.
Fluorocromo	Sustancia que tiene la propiedad de emitir un fotón de una longitud de onda determinada cuando es excitada por un fotón incidente de una longitud de onda más energética que la que emite.
Freza	Todo aquello relacionado con el desove de los peces.
Frústulo	Cubierta celular silícica de las diatomeas, formada por dos valvas unidas por dos o más bandas pleurales.
Generador de corriente	Motor de combustión de gasolina que contiene un alternador y permite la obtención de corriente eléctrica alterna de forma totalmente autónoma.
Hábitat	Lugar donde habita un organismo (planta o animal) y que está caracterizado por unos factores ambientales determinados (velocidad del agua, tipo de sustrato, temperatura, etc.).
Helófitos	Plantas anfibias con la parte inferior sumergida en el agua, pero con hojas, la mayor parte del tallo y las flores aéreas.
Hidrófitos	Plantas acuáticas en sentido estricto, es decir aquellas que completan su ciclo biológico cuando todas sus partes se encuentran sumergidas o flotando en la superficie del agua.
Hipolimnion	En un lago estratificado térmicamente se refiere al volumen de agua que queda por debajo de la termoclina.

IBI	Index of Biotic Integrity.
IBICAT	Índice de integridad biótica desarrollado para los ríos de Cataluña (Sostoa et al., 2004).
Ictiofauna	Fauna de peces de los ambientes acuáticos.
IFIM_PHABSIM	Instream Flow Incremental Methodology / Physical Habitat Simulation. Metodología para el establecimiento de caudales mínimos idóneos teniendo en cuenta la optimización del hábitat fluvial por parte de los peces con diferentes situaciones de caudal.
IHF	Índice de hábitat fluvial (Pardo et al. 2002).
Índice biótico	Expresión matemática que traduce la información contenida en una lista faunística o vegetal en valores de una escala establecida. Permite realizar estudios comparativos y comprobar cambios en la estructura de las comunidades biológicas.
Índice de diversidad	Expresión matemática que relaciona el número de taxones y su abundancia.
Individuo	Término usado en el protocolo para referirse o bien a valvas o a frústulos intactos de las diatomeas.
Insectívoro	Con una alimentación basada en insectos.
IVF	Índice de vegetación fluvial (ACA -C.Gutiérrez, 2001).
Kick	Es una unidad de muestreo de los invertebrados bentónicos consistente en remover con pies y/o manos el sustrato existente en el área frente a la red de muestro, con la finalidad de que los organismos puestos en suspensión en el agua sean arrastrados hasta el fondo de la red.
Límite de detección	En este documento se aplica al número mínimo de un taxón o grupo de organismos en la muestra cuya presencia puede detectarse con una probabilidad del 99%.
Lótico	Relativo a las aguas corrientes. Se refiere a todos aquellos sistemas acuáticos donde la masa de agua se encuentra en movimiento.
Macrófitos	Plantas acuáticas visibles a simple vista, entre las que se encuentran plantas vasculares (cormófitos), briófitos y macroalgas (algas caráceas y de otros grupos).
Macrófitos	Vegetales acuáticos visibles a simple vista, entre las que se encuentran plantas vasculares (cormófitos), briófitos y macroalgas (algas caráceas y de otros grupos).
Macroinvertebrados	Este término se aplica a los invertebrados bentónicos, en general, visibles al ojo humano.
Macroinvertebrados	Este término se aplica a los invertebrados bentónicos, en general, visibles al ojo humano.
Métricas	Son los resultados de las mediciones de diferentes parámetros (por ejemplo nº de taxones, índices bióticos, índices de diversidad, abundancia de taxones o grupos taxonómicos, etc...).
Microinvertebrados	Agrupar a los invertebrados bentónicos de pequeño tamaño (en general inferior a 1 mm)
Microscopio confocal	Es un microscopio óptico en el que la muestra se ilumina por barrido con uno o más laceres monocromáticos (generalmente azul, verde y rojo) y un diafragma de objetivo que selecciona únicamente la luz procedente del plano focal (o sea la luz enfocada). La imagen de cada punto se incorpora a un registro digital a partir del que se obtiene la imagen del campo del microscopio. De esta manera, la imagen de la muestra desglosada en planos focales de grosor predeterminado, se va incorporando al registro digital, del que puede construirse una imagen tridimensional. Este microscopio permite obtener imágenes por reflexión y también el estudio de muestras con marcaje fluorescente, haciendo secciones ópticas de las mismas y obteniéndose una imagen tridimensional computerizada.

Microscopio de contraste de fases	Es un microscopio óptico modificado con un condensador y objetivo especial que controlan la iluminación de forma que se ven contrastadas las sustancias de diferente grosor o densidad.
Microscopio invertido	Microscopio óptico que presenta los objetivos situados bajo la platina, y la fuente de iluminación en posición superior; se usa para la determinación y recuento del fitoplancton.
Muestra integrada	En el documento se aplica a muestras de agua obtenidas de mezclar volúmenes equivalentes de agua procedente de diferentes puntos de la superficie o del perfil batimétrico de la masa de agua.
Nasa	Arte de pesca que captura peces e invertebrados por el principio de la ratonera. Se trata de una estructura rígida o semirígida con un único orificio de entrada.
Objetivo Nomarski	Objetivo de contraste interferencial que permite la observación de los objetos de la preparación microscópica con un cierto relieve.
Ocular micrométrico:	Ocular del microscopio dotado de una escala métrica, que permite obtener medidas absolutas de los objetos de la preparación. La relación entre cada división del micrométrico y el tamaño real del objeto dependerá del aumento del microscopio, por lo que es necesario calcular previamente a su uso, el coeficiente micrométrico del conjunto microscopio-ocular micrométrico para cada combinación de aumento.
Omnívoro	Que come de todo, alimentos de origen animal y vegetal.
Otolito	Pequeñas estructuras calcáreas existentes en el oído medio del pez. Se usan para determinar la edad.
Perifiton	Comunidad microbótica que vive sobre sustratos sumergidos de diferente naturaleza (sustratos duros, vegetación viva o muerta, etc.).
Pesca eléctrica	Método de pesca que consiste en la creación de un campo eléctrico en el medio acuático que modifica el comportamiento del pez y favorece su captura en vivo.
Picoplancton	Fracción del fitoplancton constituida por organismos de tamaño inferior a 2 μ m.
Piscívoro	Que se alimenta de peces.
Placa de Petri	Recipiente redondo, de cristal o plástico, de diferentes diámetros (en general de 5 y 10 cm), de fondo bajo, y con una cubierta de la misma forma que la placa pero de diámetro superior, lo que permite su colocación encima a modo de cierre.
Planctívoro	Que se alimenta de plancton, o sea de todo aquello que vive suspendido en la masa de agua.
Planctónico	Referente al plancton (comunidad biótica formada por todos aquellos organismos que se encuentran en suspensión en el seno de la masa de agua).
Poisson (distribución de)	Similar a la distribución normal pero truncada en la izquierda cerca de la media. Describe la probabilidad de hechos al azar en espacio tiempo; en este protocolo se aplica a la distribución de células algales en la muestra.
Poza	Charca o concavidad en la que queda estancada agua del río.
Preparación microscópica	Porta-objetos y cubre-objetos entre los que se monta la muestra de diatomeas.
Preparación microscópica	Porta-objetos y cubre-objetos entre los que se monta todo o parte de un invertebrado para su observación en el microscopio.
QBR	Índice de calidad de ribera (Munné et al 1998).
Recolonización	Proceso mediante el cual diferentes organismos vuelven a ocupar un hábitat que ha sido afectado por una perturbación física o química.
Reófilo	Zona del río donde la velocidad del agua es elevada.
RFAI	Reservoir Fish Assemblage Index.

Sacadera	Ver salabre.
Salabre	Instrumento utilizado para recoger los peces durante la realización de la pesca eléctrica, consistente en un bolso de red sujeto a una armadura con mango.
Sobrenadante	Fracción de la muestra que queda en suspensión en el agua al efectuar movimientos sucesivos del recipiente (bandeja) en el que se limpia una muestra.
Sustrato artificial	Sustrato introducido en el río por un operador especialmente para la colonización de las diatomeas y de invertebrados bentónicos.
Tamiz	Cedazo tupido (diferentes diámetros de poro) que se utiliza para separar las diferentes fracciones de tamaño en las muestras de macroinvertebrados.
Taxón	Unidad taxonómica, por ejemplo familia, género o especie.
Tolerancia	Capacidad máxima que tiene un organismo de soportar una variación del hábitat sin que ello perjudique a su ciclo vital.
Transecto	Recorrido que realiza el muestreador para llevar a cabo la toma de medidas o de muestras.
Trasmallo	Tipo de red estática de paño múltiple formada por tres redes superpuestas, dos exteriores de malla clara y una central montada más floja. Los peces se enredan en la red interior, de malla más tupida, después de atravesar las paredes exteriores.
Vadeador	Peto confeccionado con neopreno que lleva incorporado unas botas de agua. Permite acceder al río en zonas vadeables para tomar medidas y/o muestras.
Valva	Componente estructural del frústulo de las diatomeas.
Viales	Recipientes de vidrio o plástico de diferente tamaño que se usan para conservar los invertebrados bentónicos una vez separados de la muestra.
Zoobentos	Fauna de invertebrados que habita los sustratos sumergidos de los medios acuáticos.