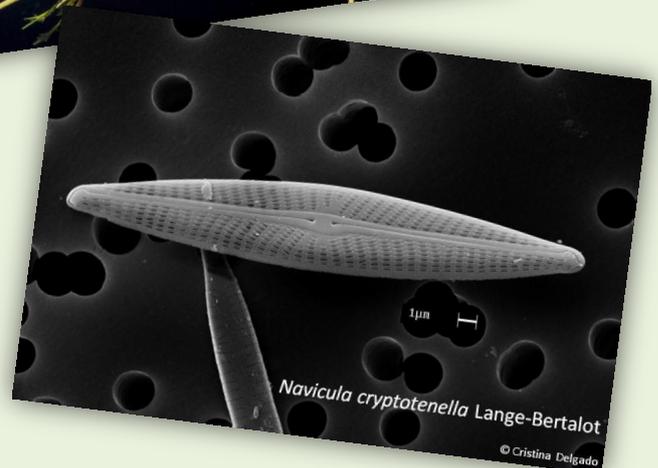


# Protocolos de muestreo de comunidades biológicas acuáticas fluviales en el ámbito de las Confederaciones Hidrográficas del Miño-Sil y Cantábrico

Invertebrados bentónicos, Diatomeas, Peces y Macrófitos

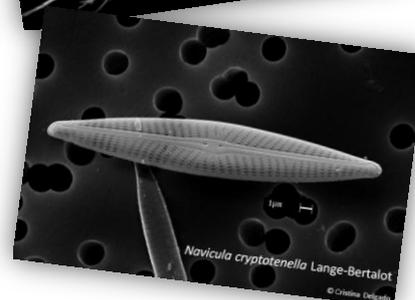


# Protocolos de muestreo de comunidades biológicas acuáticas fluviales en el ámbito de las Confederaciones Hidrográficas del Miño-Sil y Cantábrico

## Invertebrados bentónicos, Diatomeas, Peces y Macrófitos

Este protocolo ha sido realizado por la **Confederación Hidrográfica del Miño-Sil y Cantábrico** con la asistencia técnica de:

**Isabel Pardo** – Universidad de Vigo  
**Liliana García** – Universidad de Vigo  
**Cristina Delgado** – Universidad de Vigo  
**Noemi Costas** – Universidad de Vigo  
**Rut Abraín** – Universidad de Vigo



UNIVERSIDADE  
DE VIGO



GOBIERNO  
DE ESPAÑA

MINISTERIO  
DE MEDIO AMBIENTE,  
Y MEDIO RURAL Y MARINO

CONFEDERACIÓN  
HIDROGRÁFICA  
DEL MIÑO-SIL



GOBIERNO  
DE ESPAÑA

MINISTERIO  
DE MEDIO AMBIENTE,  
Y MEDIO RURAL Y MARINO

CONFEDERACIÓN  
HIDROGRÁFICA  
DEL CANTÁBRICO

NIPO 783-10-001-8

## Cómo citar este documento:

---

PARDO, I., GARCÍA, L., DELGADO, C., COSTAS, N. & ABRAÍN, R., 2010. Protocolos de muestreo de comunidades biológicas acuáticas fluviales en el ámbito de las Confederaciones Hidrográficas del Miño-Sil y Cantábrico. Convenio entre la Universidad de Vigo y las Confederaciones Hidrográficas del Miño-Sil y Cantábrico. 68pp. NIPO 783-10-001-8



# 1

## Protocolo para la obtención de datos de invertebrados bentónicos

# 1. Protocolo para la obtención de datos de invertebrados bentónicos

1.1.	Los invertebrados bentónicos como elementos biológicos de calidad en ríos	1
1.1.1.	Uso de los invertebrados como indicadores de calidad en ríos	1
1.1.2.	Requerimientos de la DMA	2
1.2.	Protocolo de campo	3
1.2.1.	Diseño del muestreo	3
1.2.2.	Selección del tramo de estudio	3
1.2.3.	Material necesario para el trabajo de campo	4
1.2.4.	Procedimiento de muestreo de invertebrados	4
1.2.5.	Recogida de datos complementarios	8
1.2.6.	Etiquetado y conservación de las muestras	8
1.3.	Protocolo de laboratorio	9
1.3.1.	Consideraciones previas	9
1.3.2.	Material necesario para el trabajo de laboratorio	9
1.3.3.	Procesado de las muestras	9
1.3.4.	Identificación y recuento	11
1.3.5.	Etiquetado y conservación de las muestras	12
1.4.	Tratamiento de datos	12
1.4.1.	Composición de la comunidad de invertebrados	12
1.4.2.	Abundancia de la comunidad de invertebrados	12
1.5.	Referencias bibliográficas	13
1.6.	Agradecimientos	14
1.7.	Anexos	15

## 1.1 Los invertebrados bentónicos como elementos biológicos de calidad en ríos

En la fauna bentónica que habita los sustratos sumergidos de los medios acuáticos se pueden distinguir macroinvertebrados y microinvertebrados. Los macroinvertebrados son el grupo dominante en los ríos, aunque también se encuentran en la zona litoral y el fondo de lagos y humedales. Se consideran como macroinvertebrados a todos los animales invertebrados que tienen un tamaño superior a 500  $\mu\text{m}$ . Los macroinvertebrados que habitan en los ecosistemas fluviales están ampliamente representados por diferentes familias de moluscos y larvas de insectos, aunque dependiendo del tipo de río también pueden ser comunes los crustáceos, oligoquetos, anélidos, nematodos e hirudíneos. Por otra parte, los microinvertebrados agrupan a los invertebrados de menor tamaño y son especialmente importantes en lagos y humedales. Por ello los ejemplos que se muestran a lo largo de este capítulo de ríos se enfocan principalmente en los invertebrados de mayor tamaño.

### 1.1.1 Uso de los invertebrados como indicadores de calidad en ríos

La eficacia del seguimiento biológico en el asesoramiento del estado ecológico de los sistemas acuáticos es indiscutible, aplicándose ampliamente en programas de gestión de la calidad de recursos hídricos (National Water Council 1981, Hellawell 1986, Loeb 1994). Los invertebrados bentónicos son uno de los 4 elementos biológicos que utiliza la Directiva Marco del Agua (DMA) (Directiva 2000/60/EC) para evaluar el estado ecológico de los ríos, y han sido uno de los más utilizados para conocer la calidad del agua de muchos ecosistemas acuáticos epicontinentales.

Como se mencionaba en el apartado anterior, los invertebrados que ocupan un hábitat determinado poseen unas características morfológicas, comportamentales y fisiológicas que les permiten adaptarse al mismo. Por lo tanto, muchos invertebrados que habitan en los ecosistemas fluviales son muy exigentes con su hábitat, lo que les hace especialmente **sensibles a la degradación ambiental**.

La sensibilidad de muchos taxones de invertebrados bentónicos a la perturbación humana de los hábitats acuáticos, unido a la relativa facilidad del estudio de la composición y abundancia de sus comunidades, han fomentado en los últimos años el uso de estos organismos en numerosos programas de seguimiento ambiental. En el ámbito de la aplicación de la DMA, los invertebrados bentónicos se consideran útiles para la detección y seguimiento de distintos tipos de presiones como contaminación térmica, orgánica, eutrofización, alteración del régimen de caudal o de la morfología del lecho, etc.

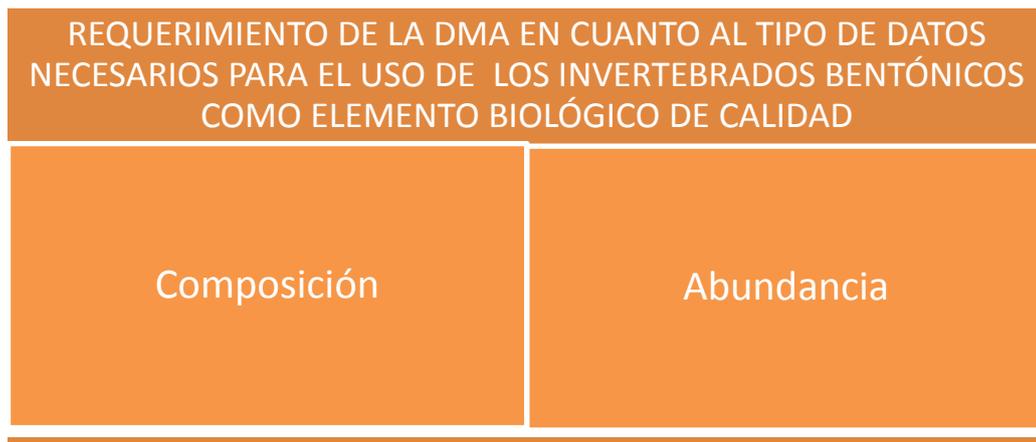
Los invertebrados que habitan en los ríos poseen una duración del ciclo de vida comprendida entre menos de un mes hasta más de un año, lo que hace que sus comunidades muestren una gran variabilidad, no solo en el espacio, sino también en el tiempo. Estos ciclos de vida y las características que poseen permiten el uso de los invertebrados como indicadores de **perturbaciones ocurridas a medio y largo plazo**, que complementan las respuestas

obtenidas con otros elementos biológicos, como el fitobentos (principalmente diatomeas bentónicas, con tiempos de respuesta más cortos), o la comunidad de peces y otros vertebrados con ciclos de vida más largos (con tiempos de respuesta más largos).

### 1.1.2 Requerimientos de la DMA

Este protocolo está dedicado a los invertebrados bentónicos de aguas corrientes y tiene como objetivo especificar las directrices metodológicas para el muestreo de campo, tratamiento en laboratorio y posterior identificación de los invertebrados bentónicos en el marco de la aplicación de la Directiva Marco del Agua 2000/60/EC.

Como se indicaba en el apartado anterior, en general, los invertebrados que habitan en los ríos son muy buenos indicadores del estado del ecosistema fluvial dado que, de forma similar a lo que ocurre con otros elementos biológicos, entre los invertebrados se encuentran taxones más o menos sensibles a los distintos tipos de degradación del hábitat. Es por ello que la DMA obliga al uso de parámetros de **composición** y **abundancia** de invertebrados en sus definiciones normativas del estado, para que éstos puedan usarse como indicadores biológicos del estado ecológico de los ríos (Anexo V de la DMA).



La definición y estima de estos parámetros a partir de los datos obtenidos en el campo y en el laboratorio se explican al final de este capítulo.

## 1.2 Protocolo de campo

El método empleado para la recogida de invertebrados en el campo está basado en el protocolo de muestreo de hábitats múltiples publicado por la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (EPA) (Barbour et al. 1999, Barbour et al. 2006). Este protocolo se ha adaptado a los ríos del Norte de España (Pardo et al. 2007) en lo referente al área muestreada, al procedimiento de separación de la muestra en campo y laboratorio, y a la identificación, submuestreo y recuento de invertebrados. El protocolo que aquí se describe es similar al desarrollado en el proyecto europeo AQEM (AQEM consortium 2002, Hering et al. 2003), que también se basa en el sistema americano de hábitats múltiples, y sobre el cual se está preparando un protocolo estándar internacional de muestreo.

### 1.2.1 Diseño del muestreo

El objetivo del muestreo es obtener estimas de las poblaciones de invertebrados bentónicos en los tramos de estudio. El método empleado para la obtención de datos de invertebrados es el de capturas por unidad de esfuerzo (CPUE). Este método implica la captura de los ejemplares de invertebrados en el campo, siendo la unidad de esfuerzo empleada el área muestreada.

Sin embargo, para que el método de captura por unidad de esfuerzo sea válido tienen que cumplirse las siguientes condiciones (Caughley 1994):

- Las condiciones de captura deben de estar estandarizadas para que se puedan hacer comparaciones de los datos en el espacio (*i.e.*, entre distintos tramos) y en el tiempo
- La eficiencia de la captura debe de estar estandarizada
- El mecanismo de captura debe de estar estandarizado
- La captura de un ejemplar no debe afectar la captura de otro
- Todos los animales deben de tener la misma posibilidad de ser capturados, independientemente de su tamaño, edad, o sexo

En el procedimiento seguido para efectuar la recogida de muestras de invertebrados que se explica a continuación se especifica cómo han de cumplirse estas condiciones.

### 1.2.2 Selección del tramo de estudio

El tramo de estudio donde se va a realizar el muestreo debe ser de 100 metros. Es necesario tener en cuenta algunos aspectos al seleccionar el tramo de estudio: se evitarán zonas, estructuras y/o características particulares que no reflejen la variabilidad completa del tramo. Es importante señalar claramente la localización de la estación de muestreo (inicial y

final), tomando las coordenadas con un GPS, e indicando su posición en la cartografía de trabajo.

Las estaciones de muestreo deben ser representativas de la masa de agua a la que pertenecen y estar designadas previamente a la realización del muestreo, según una tipología de ríos (anexo II de la DMA) y el diseño de red establecido para el área a estudiar. Una vez seleccionada la estación de muestreo, la obtención de las muestras biológicas (*i.e.* invertebrados bentónicos) se realizará a lo largo de un tramo de 100 m.

### 1.2.3 Material necesario para el trabajo en el campo

A continuación se expone un listado del material que se necesita para poder efectuar la recogida de muestras de invertebrados en el campo:

- Permisos para la recogida de muestras
- Libreta de campo (preferiblemente resistente al agua)
- Lápices
- Rotulador indeleble
- Rotuladores electrónicos portátiles para hacer etiquetas de plástico
- Botas vadeadoras
- Guantes de látex
- “Kick net” (manga de mano, ver detalles en el apartado 1.2.4)
- Recipientes para almacenar las muestras (bolsas y botes de plástico)
- Bidones o cajas grandes para almacenar y transportar las muestras
- Etanol 96% o Formol 40%

Unos días antes de comenzar cada campaña de muestreo hay que asegurarse de que el material está en las condiciones adecuadas para su uso, comprobando el buen funcionamiento de los aparatos electrónicos (rotulador eléctrico, GPS, etc.), revisando que hay pilas de repuesto e, importante, cerciorándose de que los conservantes están en buen estado.

### 1.2.4 Procedimiento de muestreo de invertebrados

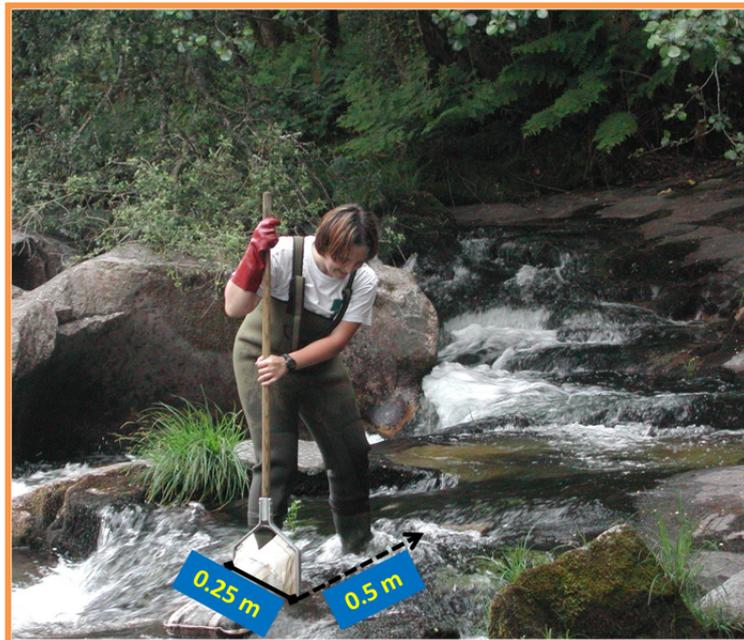
El trabajo de recogida de las muestras de invertebrados se desarrolla según el siguiente esquema de actuación:

- **Cartografiar y evaluar visualmente el tramo de muestreo** identificando los hábitats más representativos (*i.e.*, ocupan al menos un 5 % de la superficie del lecho) en función de los tipos y tamaño del sustrato. Se identifican en el tramo distintos hábitats según manchas de vegetación, acúmulos de materia orgánica, régimen de velocidad/profundidad y heterogeneidad del sustrato. Para estandarizar esta cartografía se propone la identificación de 5 tipos de hábitats: rápidos con sustratos duros, pozas con fondos blandos, bancos vegetados, detritos y macrófitos sumergidas
- **Estimar visualmente la superficie** aproximada (en porcentaje) que ocupa cada uno de los hábitats identificados a lo largo de todo el tramo (véase tabla)

TIPO DE HÁBITAT	SÍMBOLO CARTOGRAFÍA	% DE OCUPACIÓN	Nº KICKS
Rápidos con sustratos duros			
Pozas con fondo de arenas y otros sedimentos finos			
Bancos vegetados			
Detritos vegetales			
Macrófitos sumergidas			

- Proceder a la **toma de muestras**
  - Para estandarizar la unidad de esfuerzo se recogen un total de 20 muestras en el tramo de 100 m seleccionado
  - Las muestras se recogen con un “kick”, que es una red de mano en forma de “D” con unas dimensiones estándares de 0.25 m de ancho y 0.25 m de alto y con una red de 500 µm de luz de malla (para la toma de muestras en ríos)
  - Se muestrea una longitud de 0.5 m por encima de la boca de la red de mano, desde la zona proximal a la distal. Por lo tanto la unidad de esfuerzo de cada muestra es de 0.125 m<sup>2</sup> (resultado de multiplicar 0.5 m por los 0.25 m que mide la boca de la red de mano) (véase figura)
  - Dado que tenemos una unidad estándar de esfuerzo por área podemos hablar de un tipo de muestreo semicuantitativo, con una unidad de esfuerzo de muestreo por tramo de estudio de 2.5 m<sup>2</sup> (resultado de multiplicar 0.125 m<sup>2</sup> de unidad de esfuerzo de cada muestra por el total de 20 muestras que se toman en cada tramo)

- La recogida de muestras se realiza en proporción al porcentaje de ocupación de los hábitats presentes (estimados previamente) de manera que si, por ejemplo en un determinado tramo identificamos un 20 % de macrófitos sumergidas y un 80 % de rápidos sobre substrato duro, se cogerán 4 muestras (“kicks”) en el primer tipo de hábitat y 16 muestras en el segundo. Se anota en la hoja de campo (véase tabla) el número de kicks recogidos en cada hábitat
- El modo de utilizar el kick varía en función del tipo de hábitat que se esté muestreando (véase tabla)
- Por lo general, la recogida de muestras se realiza a contracorriente, esto es, desde una posición del operador, situado aguas abajo, hacia aguas arriba. Así nos aseguramos que la recogida de una muestra de invertebrados aguas abajo no afecta a las muestras que se recogen en zonas localizadas aguas arriba del operador



- Para efectuar la recogida de muestras de invertebrados son necesarias dos personas. Una tomará los kicks (se recomienda que el operador sea siempre el mismo para minimizar errores derivados de esta fuente de variación) y la otra la seguirá desde la orilla, llevando las hojas de la cartografía con el control de la toma de unidades de kick y las bolsas para recoger las muestras
- Es conveniente realizar una limpieza en campo, eliminando con cuidado piedras y trozos grandes de detritos para reducir el tamaño de la muestra a transportar y evitar la rotura si se transporta en bolsas. Las muestras se vacían en recipientes o bolsas de plástico previamente etiquetadas (véase siguiente apartado), agarrando la parte inferior de la red con toda la mano y dándole la vuelta dentro de la bolsa con varias sacudidas. Para asegurarnos que la red queda totalmente vacía de restos repetir el procedimiento anterior

TIPO DE HÁBITAT	DESCRIPCIÓN	MÉTODO DE MUESTREO
<p><b>RÁPIDOS CON FONDO DE SUBSTRATO DURO</b></p> 	<p>Rápidos con fondo compuesto de gravas-piedras</p>	<p>Mantener el borde inferior de la red contra el suelo y con ayuda del pie desalojar los organismos del substrato. Ayudarse de las manos si es necesario. Si la corriente es baja y no ayuda a dirigir a los organismos hacia la red hay que mover ésta para recoger el material en suspensión</p>
<p><b>POZAS CON FONDO DE SUBSTRATO BLANDO</b></p> 	<p>Pozas con fondo compuesto de limos, arenas o gravas</p>	<p>Situarse con cuidado para no espantar a los insectos de la superficie del agua y dar tres pasadas rápidas en la misma zona. La primera pasada se realiza por la superficie, la segunda arrastrando 1 cm del fondo y la última para recoger lo que quede en suspensión. Es importante evitar recoger grandes cantidades de sedimentos finos en la muestra</p>
<p><b>BANCOS VEGETADOS</b></p> 	<p>Orillas vegetadas de los ríos, incluyendo las raíces de los árboles de la ribera.</p>	<p>Pasar tres veces la red, rozando y sacudiendo las raíces a diferentes profundidades. Hacer una, pasada por el fondo del sedimento donde enraíza la vegetación</p>
<p><b>DETRITOS VEGETALES</b></p> 	<p>Ramas, madera y acúmulos de hojarasca depositados en el fondo del río, sea en rápidos o pozas</p>	<p>Se muestrea sacudiendo primero los acúmulos de detritos para desalojar a los animales y pasando la red posteriormente. Es importante evitar la recogida de grandes cantidades de detrito</p>
<p><b>MACRÓFITOS</b></p> 	<p>Plantas acuáticas sumergidas en el cauce del río</p>	<p>Pasar la red desde la base (situada en el lecho del río) hacia la terminación de la planta (máximo 0.5 m). En aguas someras, se muestrea sacudiendo la planta e incluyendo el material resuspendido. Es importante evitar los sedimentos</p>

### 1.2.5 Recogida de datos complementarios

Se considera importante disponer de datos físico-químicos (pH, oxígeno, conductividad) y de caudal (L/s) del tramo de río en el que se realiza el muestreo.

### 1.2.6 Etiquetado y conservación de las muestras



Aunque pueden utilizarse otro tipo de recipientes, lo más común es el uso de bolsas o botes de plástico grueso específicos. En el caso de usar bolsas se recomienda el uso de dos unidades por muestra, para aumentar la resistencia (véase figura).

Para cada muestra se recomienda incluir dos etiquetas, una etiqueta se colocará dentro del recipiente en la que se ha depositado el material recogido, y la otra en el exterior (véase figura para el caso del uso de bolsas).

Las etiquetas deben contener, como mínimo, el código de la estación de muestreo y la fecha (véase figura). Se aconseja que antes de comenzar la primera campaña de muestreo se estandarice el formato e información que va a contener las etiquetas. El correcto etiquetado de las muestras es de suma importancia para evitar posibles errores en la asignación de las mismas a los tramos fluviales de estudio.

En la medida de lo posible, se recomienda el uso de etiquetas impresas en tiras de plástico, que tienen una mayor resistencia. También se aconseja rotular los recipientes que se utilicen para almacenar las muestras con rotuladores indelebles que sean resistentes al alcohol.

Una vez hemos vaciado la muestra en el recipiente, añadir etanol al 96% o formol al 4%, remover para homogeneizar toda la muestra, cerrar el recipiente y meter la muestra en un contenedor, debidamente etiquetado para su almacenamiento. En el caso de usar bolsas de plástico, y para evitar que éstas se perforen (lo que podría conllevar a una pérdida de parte del

material recogido) hay que tratar de manipular el bidón con cuidado.

## 1.3 Protocolo de laboratorio

### 1.3.1 Consideraciones previas

Antes de proceder al procesado de las muestras de invertebrados, y a la posterior identificación de los ejemplares recogidos en las mismas, se ha de fijar el tiempo medio que tiene que llevar a cada operador realizar las distintas tareas de este procedimiento. El procesado de las muestras no es algo trivial, sobre todo para los principiantes y se aconseja que se realice de forma continua, para evitar errores comunes que se dan a lo largo de este procedimiento. Por ello se recomienda que inicialmente se deje un margen amplio de tiempo, respetando los mínimos establecidos (unas 4.30 h) para llevar a cabo esta tarea (véase apartado 1.3.3 y figura).

### 1.3.2 Material necesario para el trabajo de laboratorio

- Columna de tamices de diferente luz de poro: 5 mm, 1 mm y 0.5 mm
- Bandejas
- Pinzas
- Guantes de látex
- Placas de Petri
- Material óptico: al menos una lupa (5x) y un microscopio (40x)
- Botes para el almacenamiento de las muestras una vez han sido procesadas
- Etanol 70%
- Parafilm©
- Claves de identificación

### 1.3.3 Procesado de las muestras

Las muestras recogidas en el campo se vierten, bajo el grifo, sobre una columna de tamices con diferente luz de poro: 5 mm, 1 mm y 0.5 mm, obteniéndose así tres fracciones, gruesa, media y fina, respectivamente. Este procedimiento facilita tanto la localización de ejemplares como su identificación y recuento. En el caso de que algunas de las fracciones contenga grandes cantidades de sedimento fino se procederá a la resuspensión (elutriación) de las muestra utilizando para ello una batería de bandejas de laboratorio. El material resuspendido se pasará de nuevo por la columna de tamices.

Es importante señalar que el grifo no debe abrirse muy fuerte, mejor dispersar el chorro de agua de forma suave, para evitar no solo las salpicaduras sino también la posible rotura de los ejemplares que contenga la muestra.



Posteriormente se procederá a la separación de los invertebrados de cada fracción, para ser contados e identificados. Todos los individuos presentes en la fracción gruesa (retenida en el tamiz de 5 mm) se separan manualmente. Cuando el número de individuos presentes en las fracciones menores a 5 mm (fracciones media y fina) es muy elevado, se puede realizar un submuestreo.

Para realizar el submuestreo de la fracción media (1-5 mm), hay que homogeneizar el contenido de la muestra, bien por un método volumétrico del que se sacan alícuotas de conocido volumen (Wrona et al., 1982), bien sobre bandejas divididas en partes iguales, tomando tantas partes como fuesen necesarias hasta alcanzar o superar el umbral de 100 individuos, que representan una fracción representativa del total (Wrona et al., 1982). Una vez separados los individuos de la fracción submuestreada repasaremos visualmente el resto de la muestra por si hubiese algún representante de algunos de los taxones que, sin ser tan común, estuviese presente en la misma, lo cual afectaría al cómputo de la riqueza de taxones.

En el submuestreo de la fracción fina (0.5-1 mm) se realiza previamente una separación del material inorgánico del orgánico puesto en suspensión (elutriación) con cuidado de no dejar ningún espécimen atrás. Después, la muestra debe ser homogeneizada para poder fraccionarla mediante el submuestreador descrito por Wrona et al. 1982 o bien con cualquier método comparable (*i.e.* de la misma manera que se hizo en la fracción fina).

Es muy importante anotar en el estadillo el submuestreo que se lleva a cabo para cada fracción (véase tabla).

Se recomienda que antes de empezar a ejecutar el trabajo de laboratorio se hayan elaborado los estadillos de identificación de ejemplares. Los estadillos en este caso listan las familias de invertebrados que están presentes en los ríos que forman parte de las Confederaciones Hidrográficas del Cantábrico y Miño-Sil. Además, se recomienda incluir 4 columnas más para anotar la abundancia obtenida en cada una de las fracciones en la que podamos llegar a separar la muestra (véase tabla). Además, el uso de estadillos estándar facilita la posterior elaboración de las matrices de datos.

ORDEN	FAMILIA	Fracción 1	Familias "raras"	Fracción 2 (x ....)	Fracción 3 (x .....	Abundancia Total
AMPHIPODA	Gammaridae					
BIVALVIA	Sphaeriidae					
COLEOPTERA	Dryopidae					
COLEOPTERA	Dytiscidae					
COLEOPTERA	Elmidae					
COLEOPTERA	Gyrinidae					
...	...					

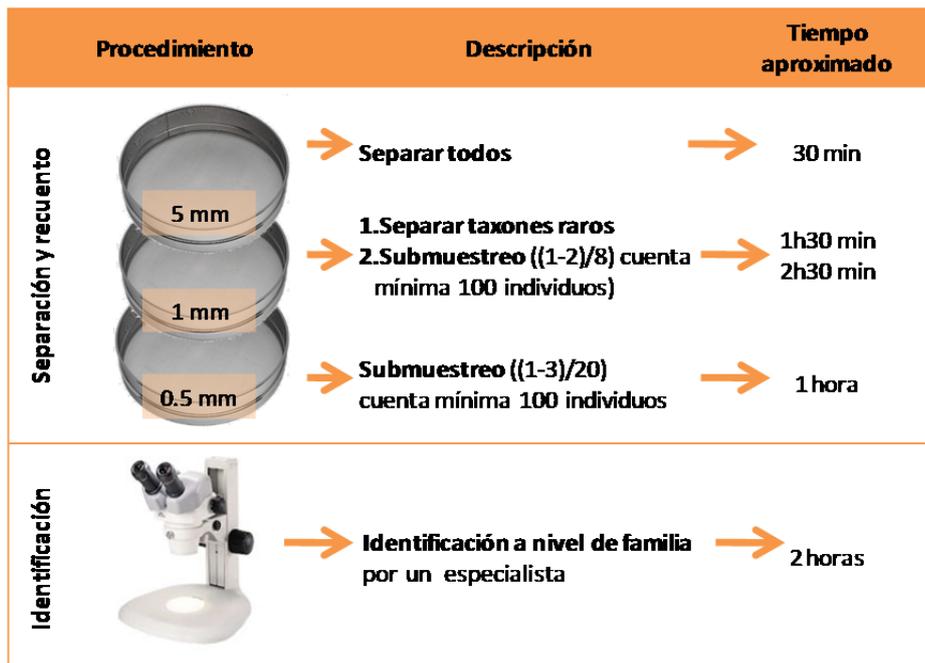
### 1.3.4 Identificación y recuento de las muestras



El nivel de identificación que se requiere para este estudio es el de familia, excepto para Oligochaeta e Hydrachnidia, que se dejan a nivel de clase. Por un lado, la relación coste-eficiencia es beneficiosa, ya que se ha demostrado que el número de familias es un nivel óptimo para la evaluación del estado ecológico en áreas geográficas amplias (BEAST, RIVPACS, etc.); o

para la comparación de comunidades de invertebrados y su respuesta a la presión en distintas regiones europeas (ejercicio de intercalibración europeo). Por otro lado, la pérdida de información ecológica que el nivel de especie suministra, puede ocasionar sistemas poco sensibles a las perturbaciones, debido al posible reemplazo de especies con distinta tolerancia ambiental dentro de las familias en los gradientes de presión antropogénica.

En resumen, el procedimiento de procesado, separación e identificación de los individuos presentes en la muestra sigue el siguiente esquema:



### 1.3.5 Etiquetado y conservación de las muestras

Los ejemplares separados por fracción, una vez identificados y contados, se vuelven a fijar en etanol al 70% y se almacenan en recipientes destinados a este fin. Las diferentes fracciones deben almacenarse en un mismo recipiente y etiquetarse debidamente. Si estos recipientes tienen tapa de rosca se recomienda sellar el recipiente con Parafilm® para evitar, en la medida de lo posible, la evaporación del alcohol.

## 1.4 Tratamiento de datos

---

El objetivo del procedimiento explicado para la obtención de datos de invertebrados bentónicos es el de obtener información sobre dos parámetros principales, por un lado la composición de la comunidad de invertebrados y por otro su abundancia.

### 1.4.1 Composición de la comunidad de invertebrados

La composición de la comunidad de invertebrados consiste en un **inventario taxonómico** de los taxones identificados en el tramo de estudio. Además este listado sirve para analizar la posible incidencia de especies exóticas o invasoras en la comunidad.

Como se mencionó en el apartado anterior la mayor parte de estos taxones se dan a nivel de familia. En el anexo 1 se presenta un listado de los taxones típicos de los ríos del Norte de España.

### 1.4.2 Abundancia de la comunidad de invertebrados

La abundancia estimada de individuos para cada uno de los taxones identificados debe indicarse en forma de **densidad poblacional**. Sin embargo, dado que la unidad de esfuerzo empleada (un área de 2.5 m<sup>2</sup> en cada tramo de estudio) es estándar, a efectos comparativos las estimas de invertebrados se pueden presentar en forma de abundancia absoluta (*i.e.*, número de ejemplares por familia).

Es importante realizar estimas de la **diversidad** de especies que encontramos en las muestras, mediante índices de uso frecuente (e.g. índices de Shannon-Wiener, Simpson, Margalef). El uso de los índices de diversidad está relacionado con la idea de que un elevado valor indica una comunidad estable y equilibrada (Merritt et al. 2008). También puede ser muy útil la información de **grupos funcionales**, que difiere de las anteriores medidas en que miden aspectos de funcionamiento más que de estructura de la comunidad. Por último, la relación de taxa **sensibles** y **tolerantes** nos proporciona información ecológica de relevancia para estudios de evaluación del estado ecológico.

## 1.5 Referencias bibliográficas

---

- 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](http://www.aqem.de))
- Barbour MT, Gerritsen J, Snyder BD, Strinbling JB. 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 MT, Strinbling JB, Verdonschot PFM. 2006. The Multihabitat Approach of USEPA's Rapid Bioassessment Protocols: benthic Macroinvertebrates. *Limnética* 25(3): 839-850
- Caughley G, Sinclair ARE. 1994. Wildlife ecology and management. Blackwell Sciences Publishers. Boston. 334 pp
- European Union. 2000. Directive 2000/60/EC of the Parliament and of the Council establishing a framework for the Community action in the field of water policy. Official Journal of the European Communities L372:1-72
- Hellawell JM. 1986. Biological indicators of freshwater pollution and environment management. Elsevier Applied Science Publishers, London. 546 pp
- Hering D, Buffagni A, Moog O, Sandin L, Sommerhäuser M, Stubauer I, Feld C, Johnson R, Pinto P, Skoulikidis N, Verdonschot P, Zahràdková S. 2003. The Development of a System to Assess the Ecological Quality of Streams Based on Macroinvertebrates. Design of the Sampling Programme within the AQEM Project. *International Review of Hydrobiology*, 88(3-4):345-361
- Loeb SL. 1994. An ecological context for Biological Monitoring. En: *Biological Monitoring of Aquatic Systems*. Loeb SL & Spacie A (eds). Lewis Publishers, Boca Ratón. 381 pp
- Merritt RW, Cummins KW, Berg MB. 2008. An introduction to the aquatic insects of North America. 4th edition. Kendall/Hunt Publishing Company, Dubuque Iowa.
- National Water Council. 1981. River Quality: the 1980 survey and further outlook. NWC, London
- Pardo I, Álvarez M, García E. 2007. Asistencia científico-técnica para la aplicación de los anejos II y V de la Directiva Marco del Agua en la Demarcación Hidrográfica del Norte. Informe Final. 357 pp
- Wrona FJ, Culp JM, Davies RW. 1982. Macroinvertebrate subsampling: a simplified apparatus and approach. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39:1051-1054

## **1.6 Agradecimientos**

---

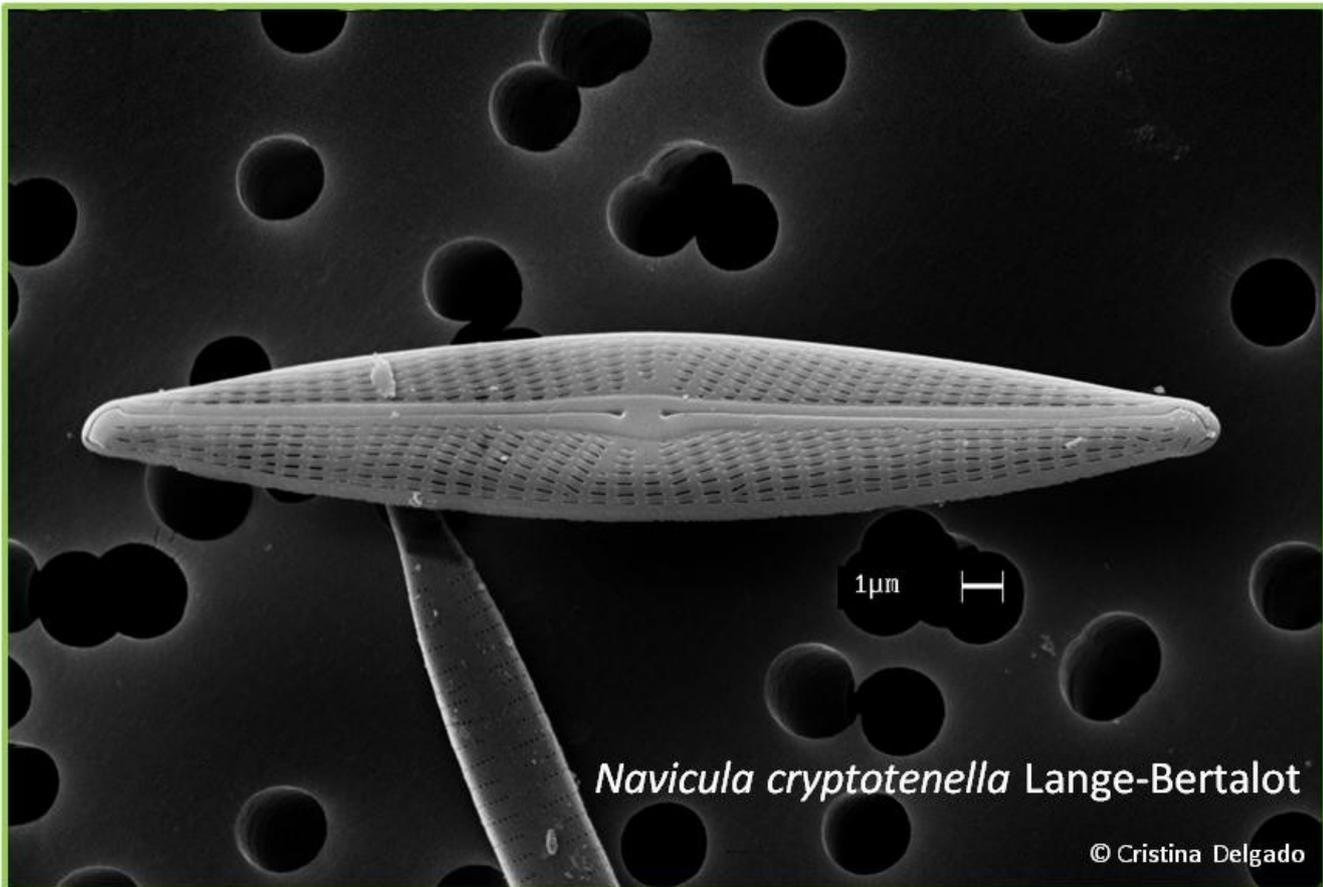
A todo el equipo de Ecohydros, en especial a Gonzalo A. de Santocildes y Agustín Monteoliva.

## 1.7 Anexos

Anexo 1. Listado de las familias de invertebrados típicas de los ríos del Norte de España

ORDEN	FAMILIA
AMPHIPODA	Gammaridae
BIVALVIA	Sphaeriidae
COLEOPTERA	Dryopidae
COLEOPTERA	Dytiscidae
COLEOPTERA	Elmidae
COLEOPTERA	Gyrinidae
COLEOPTERA	Haliplidae
COLEOPTERA	Hydraenidae
COLEOPTERA	Hydrochidae
COLEOPTERA	Hydrophilidae
COLEOPTERA	Hygrobiidae
COLEOPTERA	Scirtidae
DECAPODA	Astacidae
DIPTERA	Anthomyiidae
DIPTERA	Athericidae
DIPTERA	Blephariceridae
DIPTERA	Ceratopogonidae
DIPTERA	Culicidae
DIPTERA	Chironomidae
DIPTERA	Dixidae
DIPTERA	Dolichopodidae
DIPTERA	Empididae
DIPTERA	Limoniidae
DIPTERA	Psychodidae
DIPTERA	Rhagionidae
DIPTERA	Simuliidae
DIPTERA	Stratiomyidae
DIPTERA	Tabanidae
DIPTERA	Thaumaleidae
DIPTERA	Tipulidae
EPHEMEROPTERA	Baetidae
EPHEMEROPTERA	Caenidae
EPHEMEROPTERA	Ephemerellidae
EPHEMEROPTERA	Ephemeridae
EPHEMEROPTERA	Heptageniidae
EPHEMEROPTERA	Leptophlebiidae
GASTROPODA	Ancylidae
GASTROPODA	Bithyniidae
GASTROPODA	Hydrobiidae
GASTROPODA	Lymnaeidae
GASTROPODA	Neritidae
GASTROPODA	Physidae
GASTROPODA	Planorbidae
HETEROPTERA	Aphelocheiridae
HETEROPTERA	Corixidae

ORDEN	FAMILIA
HETEROPTERA	Gerridae
HETEROPTERA	Hydrometridae
HETEROPTERA	Naucoridae
HETEROPTERA	Nepidae
HETEROPTERA	Notonectidae
HETEROPTERA	Veliidae
HIRUDINEA	Erpobdellidae
HIRUDINEA	Glossiphoniidae
ISOPODA	Asellidae
MEGALOPTERA	Sialidae
ODONATA	Aeshnidae
ODONATA	Calopterygidae
ODONATA	Coenagrionidae
ODONATA	Cordulegastridae
ODONATA	Corduliidae
ODONATA	Gomphidae
ODONATA	Lestidae
ODONATA	Platycnemididae
OLIGOCHAETA	Oligochaeta ( <i>todos</i> )
PLECOPTERA	Chloroperlidae
PLECOPTERA	Leuctridae
PLECOPTERA	Nemouridae
PLECOPTERA	Perlidae
PLECOPTERA	Perlodidae
TRICHOPTERA	Beraeidae
TRICHOPTERA	Brachycentridae
TRICHOPTERA	Calamoceratidae
TRICHOPTERA	Ecnomidae
TRICHOPTERA	Glossosomatidae
TRICHOPTERA	Goeridae
TRICHOPTERA	Helicopsychidae
TRICHOPTERA	Hydropsychidae
TRICHOPTERA	Hydroptilidae
TRICHOPTERA	Lepidostomatidae
TRICHOPTERA	Leptoceridae
TRICHOPTERA	Limnephilidae
TRICHOPTERA	Odontoceridae
TRICHOPTERA	Philopotamidae
TRICHOPTERA	Polycentropodidae
TRICHOPTERA	Psychomyiidae
TRICHOPTERA	Rhyacophilidae
TRICHOPTERA	Sericostomatidae
TRICHOPTERA	Uenoidae
TRICLADIDA	Dugesidae
TRICLADIDA	Planariidae



# 2

## Protocolo para la obtención de datos de diatomeas bentónicas

## **2. Protocolo para la obtención de datos de diatomeas bentónicas**

<b>2.1.</b>	<b>Las diatomeas como elementos biológicos de calidad en ríos.....</b>	<b>16</b>
2.1.1.	<b>Uso de las diatomeas como indicadores de calidad en ríos .....</b>	<b>16</b>
2.1.2.	<b>Requerimientos de la DMA .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.</b>	<b>Protocolo de campo .....</b>	<b>17</b>
2.2.1.	<b>Diseño del muestreo .....</b>	<b>18</b>
2.2.2.	<b>Selección del tramo de estudio .....</b>	<b>18</b>
2.2.3.	<b>Material necesario para el trabajo de campo.....</b>	<b>21</b>
2.2.4.	<b>Procedimiento de muestreo de diatomeas bentónicas .....</b>	<b>22</b>
2.2.5.	<b>Recogida de datos complementarios .....</b>	<b>23</b>
2.2.6.	<b>Etiquetado y conservación de las muestras .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3.</b>	<b>Protocolo de laboratorio .....</b>	<b>24</b>
2.3.1.	<b>Consideraciones previas .....</b>	<b>24</b>
2.3.2.	<b>Material necesario para el trabajo de laboratorio .....</b>	<b>24</b>
2.3.3.	<b>Preparación de las muestras .....</b>	<b>25</b>
2.3.4.	<b>Etiquetado y conservación de las muestras .....</b>	<b>27</b>
2.3.5.	<b>Identificación y recuento.....</b>	<b>27</b>
<b>2.4.</b>	<b>Tratamiento de datos .....</b>	<b>29</b>
2.4.1.	<b>Composición de la comunidad de diatomeas bentónicas .....</b>	<b>29</b>
2.4.2.	<b>Abundancia de diatomeas bentónicas .....</b>	<b>29</b>
<b>2.5.</b>	<b>Referencias Bibliográficas .....</b>	<b>30</b>
<b>2.6.</b>	<b>Agradecimientos .....</b>	<b>31</b>
<b>2.7.</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>32</b>

## 2.1. Las diatomeas como elementos biológico de calidad en ríos

Las diatomeas (pertenecientes al grupo de las bacilariofitas) son algas unicelulares que aparecen principalmente como células individuales, aunque en algunas especies forman colonias (eg. *Diatoma*, *Tabellaria*, *Asterionella*, etc).

Una de las características que las hace únicas entre el resto de las algas, es que tienen una pared celular de sílice muy resistente denominada "frústulo". Son un componente muy importante en los ecosistemas acuáticos, en concreto en los ríos constituyen un vínculo fundamental entre la producción primaria y la secundaria, porque muchos microorganismos se alimentan de ellas, integrándose de nuevo en las redes tróficas acuáticas.

Las diatomeas bentónicas, dentro del fitobentos (organismos autótrofos que viven asociados a sustratos) de agua dulce, son el grupo taxonómico que más se ha utilizado en los estudios de evaluación ambiental en ríos europeos (Kwandrans et al., 1998; Kelly & Whitton, 1998; Kelly et al., 2008; Kelly et al., 2009) y también en España (Gomà et al., 2004; Leira & Sabater, 2005; Delgado et al., 2010). Esto se debe a su gran diversidad, su elevado número de especies y a que las diatomeas pueden colonizar prácticamente cualquier sustrato sumergido

### 2.1.1 Uso de las diatomeas como indicadores de calidad en los ríos

Las diatomeas bentónicas son indicadores ecológicos particularmente útiles porque: 1) son muy sensibles a los cambios en la físico-química del agua; 2) son microalgas eucariotas muy abundantes en la mayoría de los ecosistemas lóticos; 3) debido a su pequeño tamaño, tienen unas tasas de renovación muy elevadas (al contrario de lo que ocurre con las macrófitas, véase capítulo 4: Macrófitas); 4) son fáciles de recoger, manipular y conservar; 5) las técnicas de recuento son rápidas y 6) sus requerimientos ecológicos son en algunos casos ampliamente reconocidos. Por estos motivos la composición y abundancia de las comunidades de diatomeas son buenos indicadores de **perturbaciones ocurridas a corto plazo**.

Las comunidades de diatomeas bentónicas responden al aumento de nutrientes, sobre todo nitrógeno y fósforo en el agua mediante cambios en la composición de la comunidad. Por este motivo la importancia en el uso de las diatomeas como indicadores destaca por su correlación con las concentraciones de nutrientes, de manera que este grupo de algas puede alcanzar una importancia destacada en condiciones de **contaminación orgánica y eutrofización**.

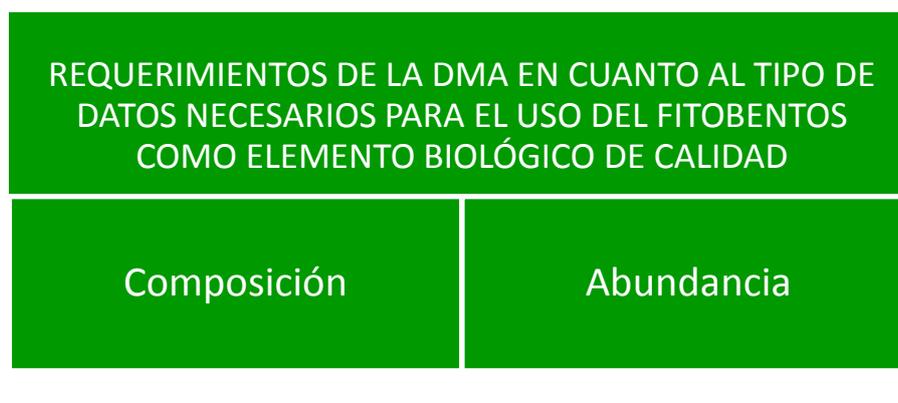
Con respecto a las alteraciones hidromorfológicas en el hábitat (en régimen hidrológico, modificación del lecho y continuidad del río) las diatomeas son poco sensibles a este tipo de alteraciones.

### 2.1.2 Requerimientos de la DMA

Este protocolo está dedicado a las diatomeas bentónicas de aguas corrientes y tiene como objetivo especificar las directrices metodológicas para el muestreo de campo, tratamiento en laboratorio y posterior identificación de las diatomeas bentónicas en el marco de la aplicación de la directiva Marco del Agua 2000/60/EC.

La Directiva Marco del Agua (DMA) (WFD, European Union, 2000) indica que la evaluación del estado ecológico de los ríos debe basarse en diferentes indicadores biológicos. El fitobentos es uno de ellos y dentro de este grupo son las diatomeas bentónicas las más utilizadas, al ser buenas indicadoras del estado de los ecosistemas fluviales, y de forma similar a lo que ocurre con otros elementos biológicos, se pueden encontrar taxones más o menos sensibles a los diferentes tipos de degradación del hábitat.

Como se mencionaba en el apartado anterior, las diatomeas forman parte del fitobentos de los ríos, por lo que los requerimientos de su aplicación por parte de la DMA son los mismos que se especifican para el fitobentos. Al igual que se indicaba para el uso de invertebrados, la DMA obliga el uso de datos de **composición** y **abundancia** de fitobentos para que estos puedan usarse como indicadores biológicos de calidad del estado ecológico de los ríos.



A partir de las muestras recogidas en el campo, se identifican y estiman diferentes parámetros como son la composición y abundancia de diatomeas bentónicas en cada una de las muestras.

## 2.2. Protocolo de campo

El muestreo de las algas bentónicas que crecen sobre piedras (epiliton) es el método general más extendido y utilizado para la obtención de muestras de diatomeas en toda Europa (Kelly et al., 1998; CEN, 2003; DARES, 2004a). Por lo tanto, siempre que sea posible se debe tratar de muestrear este tipo de sustratos (piedras, cantos).

### 2.2.1. Diseño del muestreo

Como indicamos antes, el muestreo de diatomeas bentónicas epilíticas es el método más utilizado en Europa. Las diatomeas poseen estrategias que les permiten colonizar con éxito distintos tipos de hábitats, y de esta manera la composición de la comunidad de diatomeas bentónicas varía en función de las características del hábitat en el que se desarrollen (como indicamos en el apartado 2.1.1). Por este motivo y para reducir el efecto del tipo de hábitat se deben recoger las muestras de diatomeas de zonas concretas. De esta manera los resultados de la composición y abundancia de las mismas serán fácilmente comparables, tanto espacial como temporalmente, si las condiciones de luz, velocidad de la corriente, tipo de sustrato, etc., son similares en todas las muestras recogidas.

Por lo tanto el primer paso para llevar a cabo este tipo de muestreo consiste en localizar el hábitat y tipo de sustrato (piedras o cantos) donde se tiene que llevar a cabo la recogida de muestras, tal y como se describe en el apartado 2.2.4.

### 2.2.2. Selección del tramo de estudio

Al igual que se indica en el protocolo de invertebrados (ver capítulo 1) se debe seleccionar un tramo de 100 metros donde podamos encontrar fácilmente los sustratos adecuados, en este caso piedras y cantos (tamaño aproximado 10 x 10 cm), para la toma de muestras de diatomeas bentónicas.

El lugar adecuado de muestreo de las diatomeas bentónicas debe ser una zona **de corriente** (donde el agua fluya sobre las piedras) y **bien iluminada**. La toma de muestras en estas zonas garantiza el intercambio de agua en la zona, impidiendo la acumulación de una química local y la sedimentación de organismos que son arrastrados de otras zonas. Por lo tanto se debe de evitar la recogida de muestras cerca de la orilla o en zonas muy sombreadas, a no ser que ésta sea la situación de todo el tramo de estudio.

Otro factor que afecta a la cantidad de luz que alcanza el lecho del río es la profundidad de la columna de agua, por lo que todas las muestras tienen que recogerse a una **profundidad similar**. Lo ideal es que esta profundidad esté entre 10-50 cm, para asegurar que las piedras a muestrear lleven sumergidas un tiempo y que las comunidades de diatomeas desarrolladas sobre su superficie son maduras, y por lo tanto pueden considerarse una buena representación del tramo. Este hecho también justifica el que no se tomen muestras de las orillas de los ríos, ya que están sometidas a una mayor fluctuación en el nivel del agua, evitando que se formen comunidades estables. Además, y a no ser que éstas sean las condiciones de todo el tramo, la profundidad de recogida de la muestra no deberá ser superior a los 50 cm, ya que la entrada de luz podría ser limitante.

Las comunidades de diatomeas bentónicas (pertenecientes la mayoría al Orden Pennales) pueden ser detectadas sobre los sustratos por su tacto mucilaginoso. Dependiendo de los sustratos a los que se adhieren podemos distinguir cuatro tipos de comunidades relacionados con microhábitats particulares:

- **Epilíton:** se desarrollan sobre sustratos duros (gravas, piedras y lechos rocosos)
- **Epipelón:** se desarrollan sobre sedimentos
- **Epifíton:** se fijan sobre vegetación acuática
- **Episammon:** se desarrollan entre las partículas de arena

La estructura de la comunidad de diatomeas bentónicas se rige, en cierta medida, por las asociaciones a sustratos pero son importantes otros factores que influyen en la composición de la comunidad como: composición química, turbulencia y velocidad del agua, suministro de nutrientes inorgánicos y régimen lumínico dentro de los diferentes microhabitats.

Sin embargo, si en el tramo no existen zonas de rápidos con sustratos duros y se tienen que muestrear otros hábitats hay que tener en cuenta una serie de consideraciones previas a la recogida de las muestras, que se resumen en la siguiente tabla:

COMUNIDAD DE ALGAS REPRESENTATIVA	SUSTRATO	HÁBITAT	MÉTODO DE MUESTREO
<b>Epilíton</b> 	Duro (Piedras, cantos)	Rápidos	Raspado/cepillado de la superficie de las piedras
<b>Epipelón</b> 	Blando (Sedimentos finos)	Pozas	Evitar la toma de muestras de las diatomeas que crecen sobre sedimento fino. Recoger piedras/cantos que se encuentren por encima de los sedimentos.
<b>Epifíton</b> 	Plantas (musgos, macrófitas)	Rápidos o pozas	Si todo el tramo está cubierto por macrófitas, tomar las muestras de los sustratos duros que estén disponibles. Si el tramo está <u>totalmente</u> cubierto por musgos y no quedan sustratos duros sin cubrir disponibles sacudir una superficie conocida de los mismos. En ningún caso incluir algas filamentosas, musgos o macrófitas como parte de las muestras.
<b>Episamón</b> 	Partículas de arena	Pozas	Evitar la toma de muestras de las diatomeas que aparecen entre las partículas de arena. Recoger piedras/cantos que se encuentren sobre la arena.

Por lo tanto, teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, el protocolo para estudiar la composición de diatomeas bentónicas de los ríos que pertenecen a las Demarcaciones Hidrográficas del Cantábrico y Miño-Sil se basa en el estudio del epilíton.

En el supuesto caso de no encontrarse en el tramo de estudio sustratos naturales (piedras o cantos), se pueden tomar las muestras de diatomeas bentónicas de estructuras construidas por el hombre como pilares de puentes y paredes de cemento.

Debe hacerse también una descripción detallada del lugar de muestreo: localización del tramo con GPS, anotar la anchura y profundidad del tramo, presencia y abundancia de macrófitos, sombreado del tramo de estudio y hacer fotografías. Todo ello nos facilitará el trabajo en los siguientes muestreos.

### **2.2.3. Material necesario para el trabajo de campo**

A continuación se expone un listado del material que se necesita para poder efectuar la toma de muestras de diatomeas bentónicas en el campo:

- Permisos para la recogida de muestras
- Estadillo de campo o libreta de notas
- Cámara de fotos
- Bandeja de plástico
- Botas vadeadoras
- Rotuladores indelebles y etiquetas
- Guantes de látex
- Cepillos de cerda fina (e.g., cepillos de dientes)
- Frasco lavador
- Agua destilada
- Botes de cristal o de plástico herméticos para el almacenamiento de las muestras
- Papel de aluminio
- Formaldehído, lugol o etanol

Unos días antes de comenzar cada campaña de muestreo debería hacerse un inventario para comprobar que tanto el material como los conservantes están en las condiciones adecuadas para su uso y en las cantidades adecuadas para iniciarse el trabajo de campo.

#### 2.2.4. Procedimiento de muestreo de diatomeas bentónicas

La toma de muestras de diatomeas bentónicas se realiza tomando muestras de las superficies de las piedras sumergidas que se hayan seleccionado previamente (véase apartado 2.2.2).

##### - Recogida de sustratos

En cada uno de los tramos de estudio se van a recoger entre 5-10 piedras (dependiendo del tamaño) del lecho del río (con un diámetro de unos 10 cm cada una). Esta recogida se realizará en sentido aguas arriba, a fin de provocar que la turbidez provocada por los operadores no interfiera en la comunidad de diatomeas que habita sobre los sustratos. Aunque la selección del



punto de muestreo y del tipo de sustrato a muestrear se hace siguiendo las indicaciones señaladas en el apartado 2.2.2, la recogida de una u otra piedra debe hacerse al azar.

##### - Recolección de muestras de diatomeas

Como antes indicamos deben seguirse metodologías estándar (Kelly et al., 1998; EN 13946 2003; DARES, 2004a) y el procedimiento para la obtención de muestras de diatomeas bentónicas consiste en raspar la superficie de las piedras preferiblemente con un cepillo de dientes de cerda fina o con una navaja o cuchillo, ayudándonos con un frasco lavador que contenga agua del río. La suspensión de algas bentónicas se introduce en un vial de unos 50ml de cristal (o en su defecto de plástico) con tapadera de rosca y se le añaden unas gotas de lugol, alcohol o formol al 4% dependiendo de la fijación que queramos hacer (ver apartado etiquetado y conservación de las muestras). Puesto que se trata de un muestreo semi-cuantitativo, no hace falta estimar la superficie de piedra.

Si se quieren hacer observaciones con microscopía óptica de la suspensión in vivo, no se le añadirá ningún fijador y se mantendrán en frío y oscuridad aproximadamente unas 24 horas para poder ver el material vivo.

Es importante que todo el material que se utiliza para la recolección de las muestras (cepillos y frascos lavadores) se limpie bien, a ser posible con agua destilada, antes de que sea reutilizado para la recogida de muestras en el siguiente tramo. Además, se recomienda que durante el muestreo de las diatomeas se utilicen guantes de látex, para evitar posibles contaminaciones.

##### - Toma de muestras para la estima de clorofila y biomasa epilitica

Sería interesante, además de tener las muestras de diatomeas bentónicas, poderlos comparar con datos de clorofila y biomasa epilitica. Para ello se deben recoger de 3-6

pedras (3 muestras de clorofila y 3 de biomasa) en un transecto horizontal del mismo tramo de donde tomemos las muestras de diatomeas. Las pedras deben rasparse, con un cepillo de cerda fina, limpiar bien la superficie con agua destilada y guardar las muestras en botes de plástico para conservarlos en frío y en oscuridad para evitar la degradación del material. Se debe anotar, para cada una de las pedras recogidas, el área de sustrato que se está muestreando, la profundidad y las características del hábitat donde se ha recogido la muestra, tal y como se muestra en la siguiente tabla:

Diatomeas Bentónicas					
	1	2	3	4	5
Sustrato * (B, P, G, C, A)					
Profundidad (cm)					
Características del hábitat					
Superficie raspada (cm <sup>2</sup> )					

\* B= bloque, P= piedra, C= canto, G= grava, A = arena

### 2.2.5. Recogida de datos complementarios

Se considera importante disponer de datos físico-químicos (pH, oxígeno, conductividad) y de caudal (L/s) del tramo de río en el que se realiza el muestreo.

### 2.2.6. Etiquetado y conservación de las muestras



Cada uno de los botes debe etiquetarse tanto en la tapadera como en el lateral utilizando para ello bien rotuladores indelebles o bien etiquetas plastificadas.

Las etiquetas deben de incluir: el código de la estación y la fecha de recolección y a mayores puede añadirse el sustrato del que procede cada muestra y el fijador utilizado.

Se aconseja que antes de comenzar la primera campaña de muestreo se estandarice la codificación de los ríos (eg. NAV=Navia; MI=Miño) e información que va a contener las etiquetas. El correcto etiquetado de las muestras es de suma importancia para evitar posibles errores en la asignación de las mismas a los tramos fluviales y fechas en los que se ha llevado a cabo su recogida.

Las suspensiones de diatomeas bentónicas se pueden mantener en un lugar fresco y oscuro (unas 24 horas) antes de ser fijadas o fijarlas en el momento de la recogida en el campo. La fijación de las muestras se puede hacer con distintas sustancias:

- Lugol yodado: si se quiere ver el material a microscopio antes de ser tratado y si se van a analizar en un corto espacio de tiempo.

- Etanol 70% (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) o una solución tamponada de formaldehído (CHCHO al 4% v/v): para preservar material, que aún no ha sido tratado, a largo plazo.

Todas ellas se utilizan para frenar la división celular de las diatomeas y la descomposición de la materia orgánica.

## 2.3. Protocolo de laboratorio

### 2.3.1. Consideraciones previas

Antes de proceder al procesado de las muestras de diatomeas y a su posterior identificación, se ha de estimar el tiempo aproximado que tiene que llevar cada una de las diferentes partes del proceso (ver esquema en apartado 2.3.4).

### 2.3.2. Material necesario para el trabajo de laboratorio

- Vasos de precipitados de cristal
- Tubos de centrifuga de cristal resistentes al calor
- Rotuladores indelebles
- Pipetas Pasteur y micropipetas desechables
- Gradilla metálica para colocar los tubos
- Placa calefactora
- Baño maría
- Agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 30%
- Ácido clorhídrico (HCl) 0.1M al 10%
- Campana extractora de gases
- Agua destilada
- Centrifuga
- Papel indicador de pH
- Agitador Vortex (opcional)
- Portaobjetos

- Cubreobjetos
- Resina Naphrax® (i. r. = 1.74)
- Microscopio óptico
- Aceite de inmersión
- Claves básicas de identificación de diatomeas (Krammer & Lange-Bertalot, 1986-1991; Lange-Bertalot & Krammer (1989), Lange-Bertalot (1993, 1999, 2000, 2001), Krammer (1997a, 1997b, 2002).

### 2.3.3. Preparación de las muestras

Para la determinación cualitativa y cuantitativa de la comunidad de diatomeas, las muestras recogidas en campo y fijadas se trataron siguiendo el procedimiento de Renberg (1990) con ligeras modificaciones.



#### - Limpieza de las muestras de diatomeas recogidas en el campo

En primer lugar se dejan reposar, las muestras recogidas en el campo aproximadamente 24 horas para que se sedimente el material en suspensión.

Después se retira parte del sobrenadante y se homogeniza el resto de la muestra para tomar 2-3 ml de la suspensión. Se coloca cada muestra en tubos de centrifuga a los que se le añade una pequeña cantidad de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 30%, para eliminar toda la materia orgánica. La reacción que se produce al añadir el  $H_2O_2$  es una reacción exotérmica, por lo que después de añadirla se espera unas horas a temperatura ambiente para controlar la intensidad de la reacción. Cuando la reacción de oxidación es menos intensa se llevan los tubos al baño María, aproximadamente a  $85^\circ C$ , para acelerar el proceso de digestión de la materia orgánica. Aunque la duración de este proceso de oxidación depende del contenido de materia orgánica de cada muestra, se dejarán en el baño maría un mínimo de 48h hasta varios días dependiendo del contenido de materia orgánica.

En aguas ricas en carbonato cálcico es recomendable añadirle unas gotas de HCl diluido al 10% para eliminar los carbonatos, dejándolo actuar unas 12 horas.

#### - Eliminación de los reactivos y lavado de las muestras

Posteriormente se llenarán los tubos de centrifuga con agua destilada hasta alcanzar un volumen de 10 ml y se dejan reposar durante aproximadamente 12 horas, manteniendo las muestras en frío para evitar posibles reacciones que pudiesen re-suspender la muestra.

Transcurrido este tiempo, las muestras se limpian mediante lavados sucesivos para eliminar los restos de ambos reactivos. Estos lavados se hacen mediante centrifugación suave, 3-4 veces a 1200 r.p.m. (durante tres minutos cada centrifugación). Entre cada centrifugación, se

va eliminando el sobrenadante y se añade agua destilada a la muestra, tratando de no volver a resuspender el sedimento. Para verificar que no queda HCl en la muestra se mide su pH entre cada lavado, usando para esto papel indicador universal. La muestra se dará como limpia de los restos del reactivo cuando alcance un pH neutro.

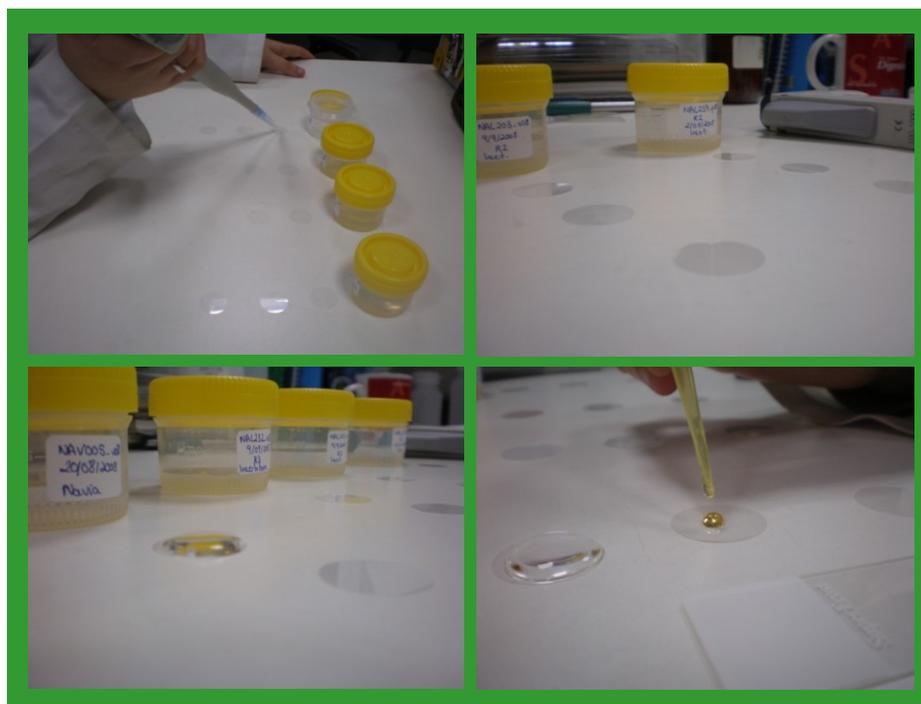
- **Conseguir la concentración adecuada de diatomeas**

Una vez lavada la muestra y eliminado el último sobrenadante de la misma, ésta se diluirá con agua destilada en viales independientes para poder obtener una concentración adecuada para el recuento de valvas al microscopio.

La densidad de valvas en la muestra se comprueba fácilmente con la evaporación de una gota de la suspensión en un cubreobjetos y observándolo al microscopio con un objetivo de 40X. Si la muestra está muy diluida se vuelve a centrifugar la muestra y se retira parte del sobrenadante. En cambio si está muy concentrada se debe añadir agua destilada hasta alcanzar una concentración adecuada de valvas que sería de aproximadamente 10-15 valvas por campo con un aumento de 1000X.

- **Elaboración de preparaciones permanentes**

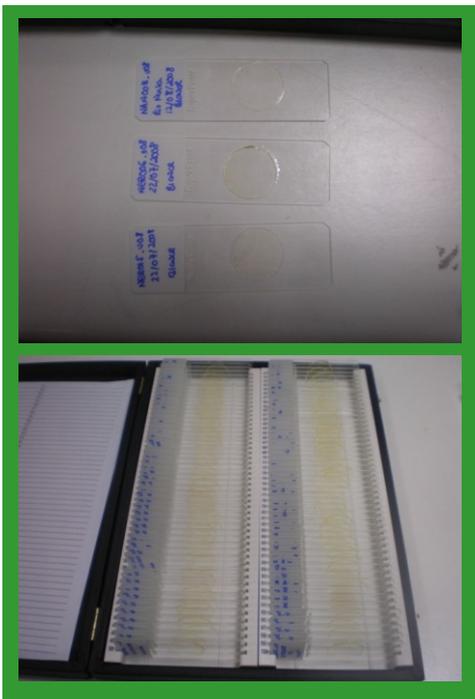
Una vez tengamos la concentración adecuada con ayuda de una micropipeta, se toman 0.5 ml del centro de la suspensión homogeneizada y se vierten sobre un cubreobjetos, para lograr una distribución uniforme de las valvas. Esta suspensión acuosa se deja unas 12 horas a temperatura ambiente, hasta que se evapore el agua, en un sitio cálido, resguardado del polvo y sin vibración. El resto de la suspensión se guarda por si fuera necesario montar más muestras o hacer revisiones del material en un futuro, y se le pueden añadir unas gotas de formol para evitar el crecimiento microbiano.



A los cubreobjetos con la muestra seca se les añade una gota de una resina sintética con un índice de refracción elevado, superior a 1.6 (se recomienda el uso de Naphrax® i. r. = 1.74) y se adhieren al portaobjetos. Una vez finalizado el **montaje de las preparaciones con resina** se calientan en una placa calefactora durante aproximadamente 15 minutos para eliminar los restos de disolventes presentes en la resina y dejando las muestras fijadas de forma permanente.

Debe asegurarse que la resina se expande hasta los bordes del cubreobjetos. Se deja enfriar y se comprueba en el microscopio que la concentración es la adecuada.

#### 2.3.4. Etiquetado y conservación de las muestras



Las preparaciones de diatomeas se montan en preparaciones definitivas para su posterior identificación y recuento de valvas (apartado 2.3.5).

Es importante que estas preparaciones se etiqueten adecuadamente, identificando cada una de ellas con el código de la estación de muestreo y la fecha de recogida de la muestra.

Pero además, el recipiente que contiene la suspensión inicial de diatomeas de la cual se extrajeron los 0.5 ml para hacer las preparaciones, también se debe etiquetar con la misma información de las preparaciones. Para asegurar su conservación a largo plazo se les añade unas gotas de un fijador como el formaldehído al 4%, para evitar el crecimiento microbiano o la disolución química de los frústulos. Se recomienda guardar

estas muestras fijadas por si fuera necesario comprobar resultados anómalos.

#### 2.3.5. Identificación y recuento

La identificación y recuento de las especies de diatomeas se realiza con un **microscopio óptico**, con el objetivo de 100X pero añadiéndole aceite de inmersión para alcanzar el aumento necesario de 1000X. Se hace el recuento de valvas enteras de diatomeas, en el caso de encontrar frústulos enteros se cuantificarán dos valvas. Se excluirán del recuento todas las valvas rotas. En todas las muestras se contabilizan aproximadamente 400 valvas. El conteo de las valvas se realiza por campos de visión y a lo largo de transectos.

##### Atención

La identificación de diatomeas debe ser realizada por especialistas en la materia.

Se coloca la preparación en la platina del microscopio y se anota la información que está en el portaobjetos en una hoja de recuentos.

Se recomienda comenzar a contar en el margen de la muestra e identificamos todas las valvas presentes en ese campo de visión utilizando el objetivo con aceite de inmersión. Si alguna valva no puede ser identificada en un primer momento se recomienda tomar algún tiempo para: obtener fotografías o dibujos detallados, tomar datos sobre la forma y dimensiones de la valva, densidad de estrías, forma del área central y detalles del rafe para que sea más fácil poder identificarla.

Una vez identificadas y contadas las valvas en el primer campo nos iremos moviendo a lo largo de la muestra en un desplazamiento horizontal hasta el siguiente campo de visión, hasta alcanzar las 400 valvas identificadas.

En cada estadillo de recuento debe indicarse la fecha, la estación de muestreo y el número de muestra. El uso de estadillos estándar facilita la posterior elaboración de las matrices de datos.

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

En resumen, el procedimiento de procesado, identificación y recuento de las muestras de diatomeas bentónicas sigue el siguiente esquema:

Procedimiento	Descripción	Tiempo aproximado
Separación y fijación de las muestras	→ Oxidar materia orgánica	→ 48 h – 96 h
	→ Eliminar carbonatos	→ 12 h
	→ Eliminar HCl y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	→ 1.5 h
	→ Montar preparaciones: • Diluir y dejar secar las muestras • Fijar y montar las muestras	→ 14 h • 12 h • 2 h
Identificación y recuento	→ Identificación y recuento de las valvas (por un especialista)	→ 5 – 8 h

## 2.4. Tratamiento de datos

El objetivo de todo este proceso que hemos explicado es la obtención de datos de diatomeas bentónicas y a partir de ellos se obtiene la información sobre la composición y abundancia de uno de los bioindicadores que define la DMA.

### 2.4.1. Composición de la comunidad de diatomeas bentónicas

La composición de especies de la comunidad de diatomeas consiste en identificar todas las diatomeas encontradas en la muestra (hasta un total de 400 aproximadamente) y poder aportar un **inventario taxonómico** de las especies identificadas en cada una de las localidades de estudio.

En el anexo 1 se presenta un listado de especies que han aparecido en las muestras de la Confederación Hidrográfica del Norte entre los años 2006-2008.

### 2.4.2. Abundancia de diatomeas bentónicas

La unidad de recuento recomendada son las valvas (un frústulo entero = 2 valvas). Debido a que el procedimiento de recuento seguido sigue un método semicuantitativo, la abundancia de individuos estimada para cada una de los taxones identificados se presenta en forma de **abundancia relativa**. Sin embargo, como la unidad de esfuerzo empleada es constante (en este caso el número total de valvas contabilizadas es de aproximadamente 400, dado que valores más pequeños podrían carecer del rigor estadístico necesario), la abundancia de cada una de las especies/géneros suele expresarse como el número total de ejemplares.

Es importante realizar estimas de la **diversidad** de especies que encontramos en las muestras, mediante índices de diversidad como el de Shannon-Wiever. El uso de los índices de diversidad está relacionado con la idea de que un elevado valor indica una comunidad estable y equilibrada. También puede ser muy útil la información de **grupos funcionales**, que difiere de las anteriores medidas en que miden aspectos de funcionamiento más que de estructura de la comunidad. Por último, el estudio de taxa **sensibles** (Delgado et al., 2010) y **tolerantes** nos proporciona información ecológica de relevancia para estudios de evaluación del estado ecológico.

Lo más utilizado en la actualidad es el cálculo, a partir de las abundancias de diatomeas, de índices de diatomeas como el IPS (Specific pollution sensitivity index), TDI (Trophic diatom index), IBD (Biological diatom index), CEE (Commision for economical community metric, etc. Todos ellos pueden ser calculados con el programa Omnidia (Lecointe et al., 1993, 2003).

## 2.5. Referencias bibliográficas

- DARES a (Diatoms for Assessing river Ecological Status). DALES (Diatoms for Assessing Lake Ecological Status). Sampling protocol Version 2.0. April 2004.
- Delgado C, Pardo I, García L. 2010. A multimetric diatom index to assess the ecological status of coastal Galician rivers (NW Spain). *Hydrobiologia* 644 (1): 371-384.
- EN 13946, 2003. Water Quality: Guidance Standard for the Routine Sampling and Pretreatment of Benthic Diatoms for Rivers.
- European Union 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Official Journal of the European Communities* L327: 1–73.
- Kelly MG, Cazaubon A, Coring E, Dell'Uomo A, Ector L, Goldsmith B, Guasch H, Hürlimann J, Jarlman A, Kawecka B, Kwadrans J, Laugaste R, Lindstrom EA, Leitao M, Marvan P, Padišák J, Pipp E, Prygiel J, Rott E, Sabater S, Van Dam H, Vizinet J. 1998. Recommendations for the routine sampling of diatoms for water quality assessments in Europe. *Journal of Applied Phycology* 10: 215-224.
- Krammer K. 1997a. Die cymbelloiden Diatomeen. Teil 1. Allgemeines und Encyonema part. - *Biblioth. Diatomol.* 36: 1-382.
- Krammer K. 1997b. Die cymbelloiden Diatomeen. Teil 2. Encyonema part., Encyonopsis und Cymbellopsis. - *Biblioth. Diatomol.* 37: 1-469.
- Krammer K. 2000. The genus *Pinnularia*. - In: LANGE-BERTALOT, H. (ed.): *Diatoms of Europe* 1: 1-703. A.R.G. Gantner-Verlag, Ruggell, Liechtenstein.
- Krammer K. 2002. *Cymbella*. - In LANGE-BERTALOT, H. (ed.): *Diatoms of Europe* 3: 1-584. A. R. G. Gantner-Verlag, Liechtenstein.
- Krammer K, Lange-Bertalot H. 1986-1991. Bacillariophyceae. In: Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D. (Eds.), *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, vol. 1-5. Fischer-Verlag, Stuttgart.
- Lange-Bertalot H. 1993. 85 neue Taxa und über 100 weitere neu definierte Taxa ergänzend zur Süßwasserflora von Mitteleuropa Vol. 2/1-4. - *Biblioth. Diatomol.* 27: 1-454.
- Lange-Bertalot, H. (1999): Neue Kombinationen von Taxa aus *Achnanthes* (sensu lato). - In: LANGE-BERTALOT, H. (ed.): *Iconographia Diatomologica* 6: 276-289.
- Lange-Bertalot H. 2001. *Navicula* sensu stricto and 10 genera separated from *Navicula* sensu lato, *Frustulia*. - In Lange-Bertalot, H. (ed.) *Diatoms of Europe* 2: 1-526. A.R.G. Gantner Verlag Ruggell, Liechtenstein.
- Lange-Bertalot H, Krammer K. 1989. *Achnanthes*, eine Monographie der Gattung mit Definition des Gattung *Cocconeis*. - *Biblioth. Diatomol.* 18: 1-393
- Lecoite C., Coste M. & Prygiel J. 1993. 'OMNIDIA' software for taxonomy, calculation of diatom indices and inventories management. *Hydrobiologia* 269(270): 509–513.

- Lecointe C., Coste M. & Prygiel J. 2003. Omnidia 3.2 Diatom Index Software including diatom database with taxonomic names, reference and codes of 11643 diatom taxa.
- Renberg I. 1990. A procedure for preparing large sets of diatom slides from sediment cores. *Journal of Paleolimnology*, 4: 87-90.

## **2.6. Agradecimientos**

---

A todo el equipo de Ecohydros, en especial a Gonzalo A. de Santocildes y Agustín Monteoliva.

## 2.7. Anexos

**Anexo 1:** Listado de taxones de diatomeas que pueden aparecer en los ríos pertenecientes a la Confederación Hidrográfica del Cantábrico y Miño-Sil

CÓDIGO DE ESPECIE	NOMBRE
ASHU	<i>Achnanthes subhudsonis</i> Hustedt
ADMI	<i>Achnantheidium minutissimum</i> (Kützing) Czarnecki
ADPY	<i>Achnantheidium pyrenaicum</i>
ADSU	<i>Achnantheidium subatomus</i> (Hustedt)
ADMS	<i>Adlafia minuscula</i> Grunow in Van Heurck 1880
ADMM	<i>Adlafia minuscula</i> Grunow var. <i>muralis</i> (Grunow) Lange-Bertalot
ABRY	<i>Adlaphia bryophila</i> Boye Petersen
APEL	<i>Amphipleura pellucida</i> Kützing
ACOP	<i>Amphora copulata</i> (Kützing) Shoeman et Archibald
AINA	<i>Amphora inariensis</i> Krammer
APED	<i>Amphora pediculus</i> (Kützing) Grunow
BBRE	<i>Brachysira brebissonii</i> Ross in Hartley spp. <i>brebissonii</i>
BVIT	<i>Brachysira vitrea</i> (Grunow) Ross in Hartley
CBAC	<i>Caloneis bacillum</i> (Grunow) Cleve
CBRD	<i>Caloneis branderii</i> (Hustedt) Krammer
CPUL	<i>Caloneis pulchra</i> Messikommer
CSHU	<i>Caloneis schumanniana</i> (Grunow) Cleve
CSIL	<i>Caloneis silicula</i> (Ehr.) Cleve
CATE	<i>Caloneis tenuis</i> (Gregory) Krammer
CCOC	<i>Cavinula cocconeiformis</i> (Gregory ex Greville) Mann & Stickle
CVVA	<i>Cavinula variostrata</i> (Kraske) D.G. Mann & Stickle
CNDI	<i>Cocconeis neodiminuta</i> Krammer
CPED	<i>Cocconeis pediculus</i> Ehrenberg
CPLE	<i>Cocconeis placentula</i> Ehrenberg var. <i>euglypta</i> (Ehrenberg) Grunow
CPLK	<i>Cocconeis placentula</i> Ehrenberg var. <i>klinoraphis</i> Geitler
CPLI	<i>Cocconeis placentula</i> Ehrenberg var. <i>lineata</i> (Ehrenberg) Van Heurck
CPLA	<i>Cocconeis placentula</i> Ehrenberg var. <i>placentula</i>
COPL	<i>Cocconeis pseudolineata</i> (Geitler) Lange-Bertalot
CPPL	<i>Cocconeis placentula</i> Ehrenberg var. <i>pseudolineata</i> Geitler
CSCU	<i>Cocconeis scutellum</i> Ehrenberg var. <i>scutellum</i>
CSTF	<i>Cocconeis stauroneiformis</i> (W.Smith) Okuno
CRAC	<i>Craticula accomoda</i> (Hustedt) Mann
CHAL	<i>Craticula halophila</i> (Grunow ex Van Heurck) Mann
CMLF	<i>Craticula molestiformis</i> Hustedt
CSBN	<i>Craticula submolesta</i> (Hust.) Lange-Bertalot
CMEN	<i>Cyclotella meneghiniana</i> Kützing
CASP	<i>Cymbella aspera</i> (Ehr.) Cleve
CTUM	<i>Cymbella tumida</i> (Brebisson) Van Heurck
CBAM	<i>Cymboppleura amphicephala</i> Naegeli
CBNA	<i>Cymboppleura naviculiformis</i> (Auerswald) Krammer var. <i>naviculiformis</i>
DELE	<i>Denticula elegans</i> Kützing 1844
DTEN	<i>Denticula tenuis</i> Kützing
DCOF	<i>Diademsis confervacea</i> (Kützing) Grunow
DCOT	<i>Diademsis contenta</i> (Grunow ex Van Heurck) Mann
DLAE	<i>Diademsis laevisima</i> (Cleve) Mann
DPER	<i>Diademsis perpusilla</i> (Grunow) D. G. Mann in Round & al.
DMES	<i>Diatoma mesodon</i> (Ehrenberg) Kützing
DMON	<i>Diatoma moniliformis</i> Kützing
DITE	<i>Diatoma tenuis</i> Agardh
DVUL	<i>Diatoma vulgare</i> Bory 1824
*DELL	<i>Diploneis elliptica</i> (Kützing) Cleve
DMAR	<i>Diploneis marginestriata</i> Hustedt
DMOD	<i>Diploneis modica</i> Hustedt

Anexo 1 (cont.): Listado de taxones de diatomeas que pueden aparecer en los ríos pertenecientes a la Confederación Hidrográfica del Cantábrico y Miño-Sil

CÓDIGO DE ESPECIE	NOMBRE
DOBL	<i>Diploneis oblonguella</i> (Naegeli) Cleve-Euler
DOVA	<i>Diploneis ovalis</i> (Hilse) Cleve
DPST	<i>Discotella pseudostelligera</i> (Hustedt) Houk et Klee
DSTE	<i>Discotella stelligera</i> (Cleve et Grunow) Houk & Klee
ENLB	<i>Encyonema Lange-Bertalotii</i> Krammer morphotype 1
ENMI	<i>Encyonema minutum</i> (Hilse in Rabenhorst) D.G. Mann
ENNG	<i>Encyonema neogracile</i> Krammer
ENMS	<i>Encyonema neomesianum</i> Krammer
ENPE	<i>Encyonema perpusillum</i> (A. Cleve) D.G. Mann
ESLE	<i>Encyonema silesiacum</i> (Bleisch in Rabenhorst) D.G. Mann
EAQL	<i>Encyonopsis aequalis</i> (W.Smith) Krammer
ECES	<i>Encyonopsis cesatii</i> (Rabenhorst) Krammer
ESHU	<i>Encyonopsis schubartii</i> (Hustedt) Krammer
EPAL	<i>Entomoneis paludosa</i> (W.Smith) Reimer var. <i>paludosa</i>
EOMI	<i>Eolimna minima</i> (Grunow) Lange-Bertalot
ESBM	<i>Eolimna subminuscula</i> (Manguin) Moser Lange-Bertalot & Metzeltin
EADN	<i>Epithemia adnata</i> (Kützing) Brebisson
EARL	<i>Eunotia arculus</i> (Grunow) Lange-Bertalot & Nörpel
EARC	<i>Eunotia arcus</i> Ehrenberg var. <i>arcus</i>
EBID	<i>Eunotia bidentula</i> W.M. Smith
EBIL	<i>Eunotia bilunaris</i> (Ehr.) Mills var. <i>bilunaris</i>
EBLI	<i>Eunotia bilunaris</i> var. <i>linearis</i>
EUNO	<i>Eunotia</i> C.G. Ehrenberg
ECIR	<i>Eunotia circumborealis</i> Nörpel & Lange-Bertalot
EDIO	<i>Eunotia diodon</i> Ehrenberg
EETE	<i>Eunotia exigua</i> (Breb.) Rabenhorst var. <i>tenella</i> (Grunow) Nörpel et Alles
EEXI	<i>Eunotia exigua</i> (Brebisson ex Kützing) Rabenhorst
EFAB	<i>Eunotia faba</i> Grunow
EFLE	<i>Eunotia flexuosa</i> (Brebisson) Kützing
EFOR	<i>Eunotia formica</i> Ehrenberg
EGLA	<i>Eunotia glaciaria</i> Meister
EIMP	<i>Eunotia implicata</i> Nörpel, Lange-Bertalot & Alles
EINC	<i>Eunotia incisa</i> Gregory var. <i>incisa</i>
EUIN	<i>Eunotia intermedia</i> (Krasske ex Hustedt) Nörpel & Lange-Bertalot
EMIN	<i>Eunotia minor</i> (Kützing) Grunow in Van Heurck
EMON	<i>Eunotia monodon</i> Ehrenberg var. <i>monodon</i>
EMUC	<i>Eunotia mucophila</i> (Lange-Bertalot, Nörpel et Schempp) Metzeltin, Lange-Bertalot & Compere
ENAE	<i>Eunotia naegeli</i> Migula
EUPA	<i>Eunotia paludosa</i> Grunow in Van Heurck var. <i>paludosa</i>
EPTR	<i>Eunotia paludosa</i> Grunow var. <i>trinacria</i> (Krasske) Nörpel et Alles
EPAR	<i>Eunotia parallela</i> Ehrenberg
EPEC	<i>Eunotia pectinalis</i> (Dyllwyn) Rabenhorst var. <i>pectinalis</i>
EPUN	<i>Eunotia pectinalis</i> (Kützing) Rabenhorst var. <i>undulata</i> (Ralfs) Rabenhorst
EPRA	<i>Eunotia praerupta</i> Ehrenberg var. <i>praerupta</i>
ERHO	<i>Eunotia rhomboidea</i> Hustedt
ESOL	<i>Eunotia soleirolii</i> (Kützing) Rabenhorst
EUNS	<i>Eunotia</i> sp.
ESUB	<i>Eunotia subarcuatoides</i> Alles, Nörpel & Lange-Bertalot
ESUD	<i>Eunotia sudetica</i> O. Muller
ETEN	<i>Eunotia tenella</i> (Grunow) Hustedt
ETRI	<i>Eunotia tridentula</i> Ehrenberg
EVEN	<i>Eunotia veneris</i> (Kützing) De Toni
FHEL	<i>Fallacia helensis</i> (Schulz.) D.G. Mann
FIND	<i>Fallacia indifferens</i> (Hustedt) D.G. Mann

Anexo 1 (cont.): Listado de taxones de diatomeas que pueden aparecer en los ríos pertenecientes a la Confederación Hidrográfica del Cantábrico y Miño-Sil

CÓDIGO DE ESPECIE	NOMBRE
<b>FLEN</b>	<i>Fallacia lenzi</i> (Hustedt) Lange-Bertalot
<b>FPYG</b>	<i>Fallacia pygmaea</i> (Kützing) Stickle & Mann
<b>FSBH</b>	<i>Fallacia subhamulata</i> (Grunow in Van Heurck) D.G. Mann
<b>FSAP</b>	<i>Fistulifera saprophila</i> (Lange-Bertalot & Bonik) Lange-Bertalot
<b>FGRA</b>	<i>Fragilaria gracilis</i> Oestrup
<b>FARC</b>	<i>Fragilaria arcus</i> (Ehrenberg) Cleve var. <i>arcus</i>
<b>FCPE</b>	<i>Fragilaria capucina</i> Desm. var. <i>perminuta</i> (Grunow) Lange-Bertalot
<b>FCAP</b>	<i>Fragilaria capucina</i> Desmazieres
<b>FCAU</b>	<i>Fragilaria capucina</i> Desmazieres var. <i>austriaca</i> (Grunow) Lange-Bertalot
<b>FCCP</b>	<i>Fragilaria capucina</i> Desmazieres var. <i>capitellata</i> (Grunow) Lange-Bertalot
<b>FCAP</b>	<i>Fragilaria capucina</i> Desmazieres var. <i>capucina</i>
<b>FCDI</b>	<i>Fragilaria capucina</i> Desmazieres var. <i>distans</i> (Grunow) Lange-Bertalot
<b>FCME</b>	<i>Fragilaria capucina</i> Desmazieres var. <i>mesolepta</i> (Rabenhorst) Rabenhorst
<b>FCRA</b>	<i>Fragilaria capucina</i> Desmazieres var. <i>radians</i> (Kützing) Lange-Bertalot
<b>FCRP</b>	<i>Fragilaria capucina</i> Desmazieres var. <i>rumpens</i> (Kützing) Lange-Bertalot ex Bukhtiyarova
<b>FCVA</b>	<i>Fragilaria capucina</i> Desmazieres var. <i>vaucheriae</i> (Kützing) Lange-Bertalot
<b>SCON</b>	<i>Fragilaria construens</i> (Ehrenberg) Grunow f. <i>construens</i>
<b>FEXI</b>	<i>Fragilaria exigua</i> Grunow
<b>FFAM</b>	<i>Fragilaria famelica</i> (Kützing) Lange-Bertalot var. <i>famelica</i>
<b>FMAZ</b>	<i>Fragilaria mazamaensis</i> (Sovereign) Lange-Bertalot
<b>FNYA</b>	<i>Fragilaria nyansae</i> (G.S. West) Lange-Bertalot
<b>FPUL</b>	<i>Fragilaria pulchella</i> (Ralfs ex Kütz) Lange-Bertalot
<b>FRAS</b>	<i>Fragilaria species</i>
<b>FTEN</b>	<i>Fragilaria tenera</i> (W. Smith) Lange-Bertalot
<b>FUAC</b>	<i>Fragilaria ulna</i> (Nitzsch.) Lange-Bertalot var. <i>acus</i> (Kützing) Lange-Bertalot
<b>FVIR</b>	<i>Fragilaria virescens</i> Ralfs
<b>FCRS</b>	<i>Frustulia crassinervia</i> (Breb.) Lange-Bertalot et Krammer
<b>FERI</b>	<i>Frustulia erifuga</i> Lange-Bertalot & Krammer
<b>FRHO</b>	<i>Frustulia rhomboides</i> (Ehr.) De Toni
<b>FRSA</b>	<i>Frustulia rhomboides</i> (Ehr.) De Toni var. <i>saxonica</i> (Rabenhorst) De Toni
<b>FRVI</b>	<i>Frustulia rhomboides</i> (Ehr.) De Toni var. <i>viridula</i> (Brébisson) Cleve
<b>FRCA</b>	<i>Frustulia rhomboides</i> (Ehrenberg) De Toni var. <i>capitata</i> (A. Mayer) Patrick
<b>FSAX</b>	<i>Frustulia saxonica</i> Rabenhorst
<b>FRSP</b>	<i>Frustulia species</i>
<b>FVUL</b>	<i>Frustulia vulgaris</i> (Thwaites) De Toni
<b>GPGL</b>	<i>Gomphonema grovei</i> M. Schmidt var. <i>lingulata</i> (Hustedt) Lange-Bertalot
<b>GTHI</b>	<i>Gleissleria thingvallae</i> (Oestrup) Metzeltin & Lange-Bertalot
<b>GACU</b>	<i>Gomphonema acuminatum</i> Ehrenberg
<b>GAMO</b>	<i>Gomphonema amoenum</i> Lange-Bertalot
<b>GANT</b>	<i>Gomphonema angustum</i> Agardh
<b>GBAV</b>	<i>Gomphonema bavaricum</i> Reichardt & Lange-Bertalot
<b>GOMP</b>	GOMPHONEMA C.G. Ehrenberg
<b>GCLA</b>	<i>Gomphonema clavatum</i> Ehrenberg
<b>GCLE</b>	<i>Gomphonema clevei</i> Fricke
<b>GEXL</b>	<i>Gomphonema exilissimum</i> (Grunow) Lange-Bertalot & Reichardt
<b>GGRA</b>	<i>Gomphonema gracile</i> Ehrenberg
<b>GLAT</b>	<i>Gomphonema lateripunctatum</i> Reichardt & Lange-Bertalot
<b>GMIC</b>	<i>Gomphonema micropus</i> Kützing var. <i>micropus</i>
<b>GMIN</b>	<i>Gomphonema minutum</i> (Agardh) Agardh f. <i>minutum</i>
<b>GOLI</b>	<i>Gomphonema olivaceum</i> (Hornemann) Brébisson var. <i>olivaceum</i>
<b>GPAR</b>	<i>Gomphonema parvulum</i> (Kützing) Kützing var. <i>parvulum</i> f. <i>parvulum</i>

Anexo 1 (cont.): Listado de taxones de diatomeas que pueden aparecer en los ríos pertenecientes a la Confederación Hidrográfica del Cantábrico y Miño-Sil

CÓDIGO DE ESPECIE	NOMBRE
GPPA	<i>Gomphonema parvulum</i> var. <i>parvulus</i> Lange-Bertalot & Reichardt
GPAS	<i>Gomphonema parvulum</i> var. <i>parvulum</i> f. <i>saphrophilum</i> Lange-Bertalot & Reichardt
GPRO	<i>Gomphonema productum</i> (Grunow) Lange-Bertalot & Reichardt
GPSA	<i>Gomphonema pseudoagur</i> Lange-Bertalot
GPUM	<i>Gomphonema pumilum</i> (Grunow) Reichardt & Lange-Bertalot
GPRI	<i>Gomphonema pumilum</i> var. <i>rigidum</i> Reichardt & Lange-Bertalot
GRHB	<i>Gomphonema rhombicum</i> M. Schmidt
GROS	<i>Gomphonema rosenstockianum</i> Lange-Bertalot & Reichardt
GSUB	<i>Gomphonema subtile</i> Ehrenberg
GTRU	<i>Gomphonema truncatum</i> Ehrenberg
GYAC	<i>Gyrosima acuminatum</i> (Kützing) Rabenhorst
HAMP	<i>Hantzschia amphioxys</i> (Ehrenberg) Grunow in Cleve et Grunow 1880
HCAP	<i>Hippodonta capitata</i> (Ehrenberg) Lange-Bertalot, Metzeltin y Witkowski
HHUN	<i>Hippodonta hungarica</i> (Grunow) Lange-Bertalot, Metzeltin & Witkowski
KLAT	<i>Karayevia laterostrata</i> (Hustedt) Kingston
KPLO	<i>Kolbesia ploenensis</i> (Hustedt) Kingston
KGES	<i>Kolbesia ploenensis</i> var. <i>gessneri</i> (Hustedt) Aboal
LGOE	<i>Luticola goeppertiana</i> (Bleisch in Rabenhorst) D.G. Mann
LMUT	<i>Luticola mutica</i> (Kützing) D.G. Mann
LVEN	<i>Luticola mutica</i> var. <i>ventricosa</i> (Kützing) D.G. Mann
LMTF	<i>Luticola muticopsis</i> (Van Heurck) D.G. Mann
LNIV	<i>Luticola nivalis</i> (Ehrenberg) D.G. Mann
MAGR	<i>Mayamaea agrestis</i> (Hustedt) Lange-Bertalot
MAAT	<i>Mayamaea atomus</i> (Kützing) Lange-Bertalot
MAPE	<i>Mayamaea atomus</i> var. <i>permitis</i> (Hustedt) Lange-Bertalot
MAPE	<i>Mayamaea atomus</i> var. <i>permitis</i> (Hustedt) Lange-Bertalot
MAMU	<i>Mayamaea muraliformis</i> (Hustedt) Lange-Bertalot
MELS	<i>Melosira species</i>
MVAR	<i>Melosira varians</i> Agardh
MCCO	<i>Meridion circulare</i> (Greville) Agardh var. <i>constrictum</i> (Ralfs) Van Heurck
MCIR	<i>Meridion circulare</i> (Greville) C.A. Agardh var. <i>circulare</i>
NVDS	<i>Navicula (dicta) seminulum</i> (Grunow) Lange-Bertalot
NAAN	<i>Navicula angusta</i> Grunow
NANT	<i>Navicula antonii</i> Lange-Bertalot
NARV	<i>Navicula arvensis</i> Hustedt
NBRI	<i>Navicula britannica</i> Hustedt et. Aleem
NCAP	<i>Navicula capitata</i> Ehrenberg
NCAR	<i>Navicula cari</i> Ehrenberg
NCIN	<i>Navicula cincta</i> (Ehrenberg) Ralfs in Pritchard
NCCT	<i>Navicula concentrica</i> Carter
NCRY	<i>Navicula cryptocephala</i> Kützing
NCTE	<i>Navicula cryptotenella</i> Lange-Bertalot
NCTO	<i>Navicula cryptotenelloides</i> Lange-Bertalot
NDIF	<i>Navicula difficillima</i> Hustedt
NDGT	<i>Navicula digitulus</i> Hustedt
NEXI	<i>Navicula exilis</i> Kützing
NFES	<i>Navicula festiva</i> Krasske
NGPE	<i>Navicula gallica</i> (W.Sm.) Lagerstedt var. <i>perpusilla</i> (Grunow) Lange-Bertalot
NGRE	<i>Navicula gregaria</i> Donkin
NHAL	<i>Navicula halophila</i> (Grunow) Cleve
NAVI	NAVICULA J.B.M. Bory de Sant Vincent
NKRA	<i>Navicula krasskei</i> Hustedt
NLAN	<i>Navicula lanceolata</i> (Agardh) Ehrenberg

Anexo 1 (cont.): Listado de taxones de diatomeas que pueden aparecer en los ríos pertenecientes a la Confederación Hidrográfica del Cantábrico y Miño-Sil

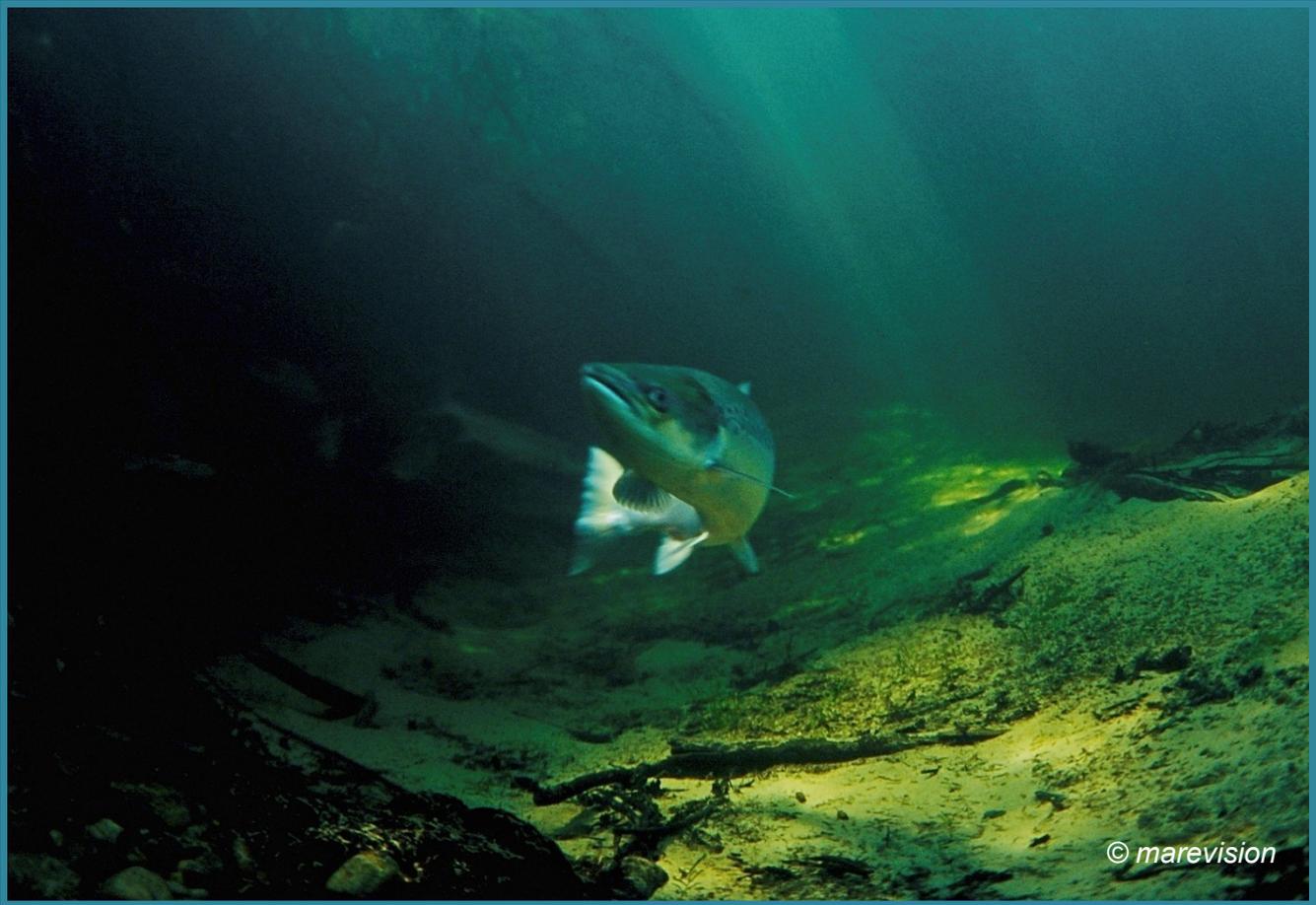
CÓDIGO DE ESPECIE	NOMBRE
<b>NLST</b>	<i>Navicula leptostriata</i> Jorgensen
NMCE	<i>Navicula maceria</i> Schimanski
<b>NMGL</b>	<i>Navicula margalithii</i> Lange-Bertalot
NMCV	<i>Navicula mediocconvexa</i> Hustedt 1961
<b>NMEN</b>	<i>Navicula menisculus</i> Schumann var. <i>menisculus</i>
FMOC	<i>Navicula monoculata</i> (Hustedt) D.G. Mann
<b>NPHY</b>	<i>Navicula phyllepta</i> Kützing
NPNI	<i>Navicula pseudonivalis</i> Bock
<b>NRAC</b>	<i>Navicula radiosa</i> Kützing
NRCS	<i>Navicula recens</i> (Lange-Bertalot) Lange-Bertalot
<b>NRCH</b>	<i>Navicula reichardtiana</i> Lange-Bertalot var. <i>reichardtiana</i>
NRHY	<i>Navicula rynchocephala</i> Kützing
<b>NSAL</b>	<i>Navicula salinarum</i> Grunow in Cleve et Grunow var. <i>salinarum</i>
NSLC	<i>Navicula salinicola</i> Hustedt
<b>NASP</b>	<i>Navicula</i> sp.
NVSU	<i>Navicula species</i> 2
<b>NTEN</b>	<i>Navicula tenelloides</i> Hustedt
NTPT	<i>Navicula tripunctata</i> (O.F. Müller) Bory
<b>NTRV</b>	<i>Navicula trivialis</i> Lange-Bertalot var. <i>trivialis</i>
NVEN	<i>Navicula veneta</i> Kützing
<b>NVIR</b>	<i>Navicula viridula</i> (Kützing) Ehrenberg
MAPE	<i>Nayamaea atomus</i> var. <i>permitis</i> (Hustedt) Lange-Bertalot
<b>NALP</b>	<i>Neidium alpinum</i> Hustedt
NBIS	<i>Neidium bisulcatum</i> (Lagerstedt) Cleve
<b>NDSS</b>	<i>Neidium densestriatum</i> (Oestrup) Krammer
NEDU	<i>Neidium dubium</i> (Ehrenberg) Cleve
<b>NITZ</b>	<b>NITZSCHIA</b> A.H. Hassall
NACI	<i>Nitzschia acicularis</i> (Kützing) W.M. Smith
<b>NALP</b>	<i>Nitzschia alpina</i> Hustedt
NAMP	<i>Nitzschia amphibia</i> Grunow var. <i>amphibia</i>
<b>NIAR</b>	<i>Nitzschia archibaldii</i> Lange-Bertalot
NBCL	<i>Nitzschia bacillum</i> Hustedt
<b>NIBU</b>	<i>Nitzschia bulbheimiana</i> (Rabenhorst) H.L. Smith
NCPL	<i>Nitzschia capitellata</i> Hustedt in A. Schmidt & al.
<b>NCOM</b>	<i>Nitzschia communis</i> Rabenhorst
TDEB	<i>Nitzschia debilis</i> Arnott ex O'Meara
<b>NDIS</b>	<i>Nitzschia dissipata</i> (Kützing) Grunow var. <i>dissipata</i>
NDME	<i>Nitzschia dissipata</i> (Kützing) Grunow var. <i>media</i> (Hantzsch.) Grunow
<b>NDUB</b>	<i>Nitzschia dubia</i> W. M. Smith
NEBR	<i>Nitzschia ebroidensis</i> Maillard
<b>NELE</b>	<i>Nitzschia elegantula</i> Grunow
NEPM	<i>Nitzschia epithemoides</i> Grunow in Cleve et Grunow var. <i>epithemoides</i>
<b>NEDT</b>	<i>Nitzschia epithemoides</i> Grunow var. <i>disputata</i> (Carter) Lange-Bertalot
NFON	<i>Nitzschia fonticola</i> Grunow in Cleve et Möller
<b>NIFS</b>	<i>Nitzschia fossilis</i> Grunow
NIFR	<i>Nitzschia frustulum</i> (Kützing) Grunow var. <i>frustulum</i>
<b>NFTE</b>	<i>Nitzschia frustulum</i> (Kützing) Grunow var. <i>teratogenica</i>
NGES	<i>Nitzschia gessneri</i> Hustedt
<b>NHAN</b>	<i>Nitzschia hantzschiana</i> Rabenhorst
NINC	<i>Nitzschia incospicua</i> Grunow
<b>NILA</b>	<i>Nitzschia lacuum</i> Lange-Bertalot
NLEI	<i>Nitzschia leistikowii</i> Lange-Bertalot

Anexo 1 (cont.): Listado de taxones de diatomeas que pueden aparecer en los ríos pertenecientes a la Confederación Hidrográfica del Cantábrico y Miño-Sil

CÓDIGO DE ESPECIE	NOMBRE
NLSA	<i>Nitzschia levidensis</i> (W.Smith) Grunow var. <i>salinarum</i> Grunow in Van Heurck
NLBT	<i>Nitzschia liebethuthii</i> Rabenhorst
NLIN	<i>Nitzschia linearis</i> (Agardh) W.M. Smith var. <i>linearis</i>
NMIC	<i>Nitzschia microcephala</i> Grunow in Cleve & Moller
NNAN	<i>Nitzschia nana</i> Grunow in Van Heurck
NPAL	<i>Nitzschia palea</i> (Kützing) W. Smith
NPAD	<i>Nitzschia palea</i> (Kützing) W. Smith var. <i>debilis</i> (Kützing) Grunow in Cleve & Grunow
NIPM	<i>Nitzschia perminuta</i> (Grunow) M. Peragallo
NIPR	<i>Nitzschia pura</i> Hustedt
NIPU	<i>Nitzschia pusilla</i> (Kützing) Grunow
NREC	<i>Nitzschia recta</i> Hantzsch in Rabenhorst
NREC	<i>Nitzschia recta</i> Hantzsch in Rabenhorst
NRFO	<i>Nitzschia rectiformis</i> Hustedt
NSCA	<i>Nitzschia scalaris</i> (Ehrenberg) W.M. Smith
NISC	<i>Nitzschia scalpelliformis</i> (Grunow) Grunow in Cleve & Grunow
NSIG	<i>Nitzschia sigma</i> (Kützing) W.M. Smith
NSIO	<i>Nitzschia sigmoidea</i> (Nitzsch) W. Smith
NSIT	<i>Nitzschia sinuata</i> (Thwaites) Grunow var. <i>tabellaria</i>
NSOL	<i>Nitzschia solgensis</i> Cleve-Euler
NSUA	<i>Nitzschia subacicularis</i> Hustedt in A. Schmidt et al.
NSBL	<i>Nitzschia sublinearis</i> Hustedt
NZSU	<i>Nitzschia supralitorea</i> Lange-Bertalot
NTER	<i>Nitzschia terrestris</i> (Petersen) Hustedt
NTRO	<i>Nitzschia tropica</i> Hustedt
NTUB	<i>Nitzschia tubicola</i> Grunow
NUMB	<i>Nitzschia umbonata</i> (Ehrenberg) Lange-Bertalot
NVAL	<i>Nitzschia valdestriata</i> Aleem & Hustedt
NVSA	<i>Nitzschia vitrea</i> Norman var. <i>salinarum</i> Grunow
NIVI	<i>Nitzschia vitrea</i> Norman var. <i>vitrea</i>
NULA	<i>Nupela lapidosa</i> (Lange-Bertalot) Lange-Bertalot var. <i>lapidosa</i>
PSAT	<i>Pasammothidium subatomoides</i> (Hustedt) Bukhtiyarova et Round
PFIB	<i>Peronia fibula</i> (Breb. ex Kütz) Ross
PAPP	<i>Pinnularia appendiculata</i> (Agardh) Cleve var. <i>appendiculata</i>
PBOR	<i>Pinnularia borealis</i> Ehrenberg var. <i>borealis</i>
PBRN	<i>Pinnularia brauniana</i> (Grunow) Mills
PBAM	<i>Pinnularia braunii</i> Grunow var. <i>amphicephala</i> (Mayer) Hustedt
PDIV	<i>Pinnularia divergens</i> W.H. Smith var. <i>divergens</i>
PDVG	<i>Pinnularia divergentissima</i> (Grunow) Cleve var. <i>divergentissima</i>
PGIB	<i>Pinnularia gibba</i> Ehrenberg
PGLI	<i>Pinnularia gibba</i> Ehrenberg var. <i>linearis</i> Hustedt
PGSC	<i>Pinnularia gibba</i> Ehrenberg var. <i>sancta</i> (Grunow) Meister
PITM	<i>Pinnularia intermedia</i> (Lagerstedt) Cleve
PLAP	<i>Pinnularia lapponica</i> Hustedt
PLEG	<i>Pinnularia legumen</i> Ehrenberg
PLUN	<i>Pinnularia lundii</i> Hustedt var. <i>lundii</i>
PMDI	<i>Pinnularia microstaurum</i> (Ehr.) Cleve f. <i>diminuta</i> Matuienko
PMIC	<i>Pinnularia microstaurum</i> (Ehr.) Cleve var. <i>microstaurum</i>
POBS	<i>Pinnularia obscura</i> Krasske
PPRI	<i>Pinnularia perirrorata</i> Krammer
PRUP	<i>Pinnularia rupestris</i> Hantzsch in Rabenhorst 1981
PSAP	<i>Pinnularia saprophila</i> Lange-Bertalot, Kobayasi & Krammer
PINI	<i>Pinnularia</i> sp1
PSCA	<i>Pinnularia subcapitata</i> Gregory var. <i>subcapitata</i>

Anexo 1 (cont.): Listado de taxones de diatomeas que pueden aparecer en los ríos pertenecientes a la Confederación Hidrográfica del Cantábrico y Miño-Sil

CÓDIGO DE ESPECIE	NOMBRE
PVIR	<i>Pinnularia viridis</i> (Nitzsch) Ehrenberg var. <i>viridis</i>
PCLT	<i>Placoneis clementis</i> (Grunow) Cox
PDAU	<i>Planothidium dau</i> (Foged) Lange-Bertalot
PTDU	<i>Planothidium dubium</i> (Grunow) Round & Bukhtiyarova
PLFR	<i>Planothidium frequentissimum</i> (Lange-Bertalot) Lange-Bertalot
PTLA	<i>Planothidium lanceolatum</i> (Brébisson ex Kützing) Lange-Bertalot
PTLA	<i>Planothidium lanceolatum</i> (Brébisson) Round & Bukhtiyarova
PRST	<i>Planothidium rostratum</i> (Oestrup) Lange-Bertalot
PLEV	<i>Pleurosira laevis</i> (Ehrenberg) Compère f. <i>laevis</i> Ehrenberg
PGDA	<i>Psammothidium grischunum</i> fo. <i>daonensis</i>
POBG	<i>Psammothidium oblongellum</i> (Oestrup) Van de Vijver
PSBR	<i>Pseudostaurosira brevistriata</i> (Grunow in Van Heurck) Williams & Round
PPRS	<i>Pseudostaurosira parasitica</i> (W. Sm.) Grunow var. <i>parasitica</i>
RSIN	<i>Reimeria sinuata</i> (Gregory) Kociolek & Stoermer
RUNI	<i>Reimeria uniseriata</i> Sala Guerrero & Ferraio
RABB	<i>Rhoicosphenia abbreviata</i> (C. A. Agardh) Lange-Bertalot
RHOS	<i>Rhopalodia species</i>
SEBA	<i>Sellaphora bacillum</i> (Ehrenberg) D.G. Mann
SPUP	<i>Sellaphora pupula</i> (Kützing) Mereschkowsky
SSEM	<i>Sellaphora seminulum</i> (Grunow) D.G. Mann
SSTM	<i>Sellaphora stroemii</i> (Hustedt) Mann
STAN	<i>Stauroneis anceps</i> Ehrenberg
STKR	<i>Stauroneis kriegeri</i> Patrick
SLAP	<i>Stauroneis lapidicola</i> Petersen
STNN	<i>Stauroneis nana</i> Hustedt
SOBT	<i>Stauroneis obtusa</i> Lagerstedt
SPMT	<i>Stauroneis perminuta</i> Grunow ex Cleve
SPRO	<i>Stauroneis producta</i> Grunow
SRSA	<i>Staurosira alpestris</i> (Krasske ex Hustedt) Van de Vijver
SCVE	<i>Staurosira construens</i> (Ehrenberg) Grunow f. <i>venter</i> (Ehrenberg) Hustedt
SELI	<i>Staurosira elliptica</i> (Schumann) Williams & Round
SRPI	<i>Staurosira pinnata</i> Ehrenberg
SPIN	<i>Staurosira pinnata</i> Ehrenberg var. <i>pinnata</i>
SSVE	<i>Staurosira venter</i> (Ehrenberg) Cleve & Moeller
STDE	<i>Stenopterobia delicatissima</i> (Lewis) Brébisson ex Van Heurck
SAPH	<i>Surirella amphioxys</i> W. Smith
SANG	<i>Surirella angusta</i> Kützing
SBPU	<i>Surirella brebisonii</i> Krammer & Lange-Bertalot var. <i>punctata</i> Krammer
SBKU	<i>Surirella brebisonii</i> Kützing var. <i>kuetzingii</i> Krammer et Lange-Bertalot
SBRE	<i>Surirella brebisonni</i> Krammer & Lange-Bertalot var. <i>brebisonni</i>
SLIN	<i>Surirella linearis</i> W.M. Smith
SLHE	<i>Surirella linearis</i> W.M. Smith var. <i>helvetica</i> (Brun.) Meister
SUMI	<i>Surirella minuta</i> Brébisson
SOVI	<i>Surirella ovalis</i> Brébisson
SURI	SURIRELLA P. J.F. Turpin
SRBA	<i>Surirella roba</i> Leclercq
SURS	<i>Surirella species</i>
SFSC	<i>Synedra fasciculata</i> Kützing
TFLO	<i>Tabellaria flocculosa</i> (Roth) Kützing
TVEN	<i>Tabellaria ventricosa</i> Kützing
TAPI	<i>Tryblionella apiculata</i> Gregory
UBIC	<i>Ulnaria biceps</i> (Kützing) Compère
UULN	<i>Ulnaria ulna</i> (Nitzsch) Compère



# 3

## Protocolo para la obtención de datos de peces

## 3. Protocolo para la obtención de datos de peces

3.1.	Los peces como elementos biológicos de calidad en ríos.....	39
3.1.1.	Uso de los peces como indicadores de calidad en ríos.....	39
3.1.2.	Requerimientos de la DMA .....	40
3.2.	Protocolo de campo .....	40
3.2.1.	Diseño del muestreo .....	41
3.2.2.	Selección del tramo de estudio.....	42
3.2.3.	Material necesario para el trabajo de campo.....	43
3.2.4.	Procedimiento de muestreo de peces.....	44
3.2.4.1	Generalidades .....	44
3.2.4.2	Procedimiento de pesca en tramos vadeables .....	46
3.2.4.3	Procedimiento de pesca en tramos no vadeables....	48
3.2.5.	Procesado de las muestras .....	48
3.2.6.	Etiquetado y conservación de las muestras .....	50
3.3.	Tratamiento de la información .....	50
3.3.1.	Composición por especies .....	50
3.3.2.	Abundancia.....	51
3.3.3.	Estructura de edades .....	52
3.3.4.	Factor de condición.....	52
3.3.5.	Estado de las poblaciones .....	53
3.4.	Referencias bibliográficas.....	53
3.5.	Agradecimientos .....	54
3.6.	Anexos.....	55

### 3.1. Los peces como elementos biológicos de calidad en ríos

La ictiofauna de las cuencas fluviales pertenecientes a la Demarcación Hidrográfica del Norte es relativamente pobre en especies, en parte como consecuencia del aislamiento geográfico de la Península Ibérica con respecto al resto de Europa. Sin embargo, independientemente de su riqueza, los peces que habitan estos ríos tienen un gran valor no sólo desde el punto de vista recreativo o económico, sino también ecológico.

#### 3.1.1. Uso de los peces como indicadores de calidad en ríos

Como consecuencia del papel que desempeña la ictiofauna en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas fluviales, en los últimos tiempos ha destacado el interés del uso de los peces como indicadores del estado ecológico en los sistemas fluviales. De hecho, son uno de los 4 elementos biológicos que utiliza la DMA con esta finalidad, y han sido uno de los primeros que se han utilizado para conocer la calidad del agua.

Una de las características de los peces, que los diferencia de otros elementos biológicos reside en su mayor longevidad y capacidad de desplazamiento.

Por una parte, un ciclo de vida largo permite que los cambios que se produzcan en la comunidad íctica puedan utilizarse como indicadores de **perturbaciones ocurridas a largo plazo**, y que pudieran pasar desapercibidas mediante el uso de otros elementos biológicos. Además, muchas especies de peces tienen una longevidad suficiente como para **acumular elementos contaminantes** en sus tejidos. De hecho, esta capacidad de reserva de metales pesados se utiliza frecuentemente en el seguimiento del estado de aquellos ecosistemas acuáticos que se han visto afectados por vertidos tóxicos.

Por otra parte, la capacidad que tienen las especies diádromas de realizar grandes desplazamientos hace que su presencia o ausencia en un río sea un fiel reflejo de la **conectividad longitudinal** del mismo. De hecho, tanto la presencia de grandes presas como la de obstáculos artificiales de menor entidad (minicentrales, azudes, etc.) interrumpen los movimientos naturales de estas especies, haciendo que desaparezcan de muchos ríos, a veces de forma definitiva,

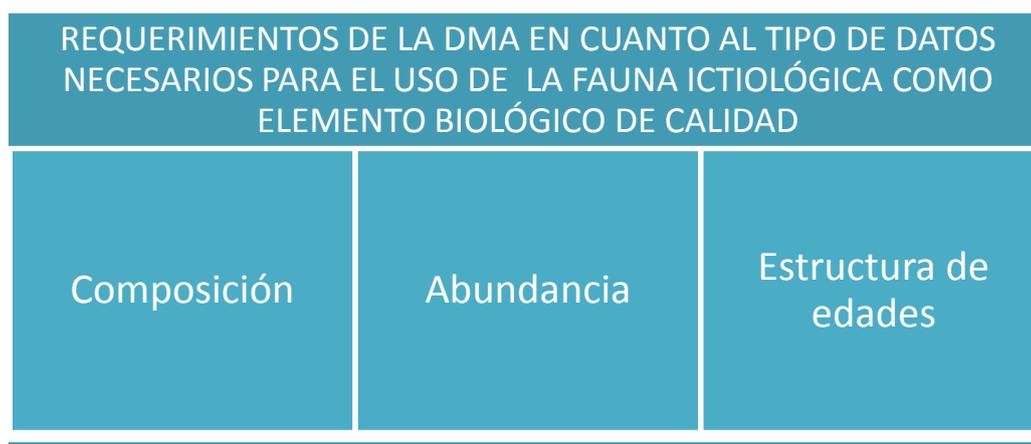
Por último, dado que los **peces depredadores** (como es el caso de los salmónidos y muchos ciprínidos) conforman el ápice de la cadena trófica de muchos ríos, su ausencia puede reflejar efectos de perturbación tanto directa como indirecta, esta última por alimentarse de otros organismos situados en niveles inferiores de la cadena. Por ello, la presencia de poblaciones viables y saludables de estas especies de peces depredadores es un buen indicador del estado de la comunidad de organismos acuáticos de los ríos.

### 3.1.2. Requerimientos de la DMA

Este protocolo está dedicado a los peces de aguas corrientes y tiene como objetivo especificar las directrices metodológicas para el muestreo de campo, trabajo en laboratorio e identificación de los peces en el marco de la aplicación de la directiva Marco del Agua 2000/60/EC.

Como se indicaba en el apartado anterior, en general, los peces que habitan en los ríos son muy buenos indicadores del estado del ecosistema fluvial dado que, de forma similar a lo que ocurre con otros elementos biológicos, entre los peces se encuentran especies más o menos sensibles a los distintos tipos de degradación del hábitat. Es por ello que la DMA (WFD; European Union, 2000) también obliga al uso de datos de **composición** y **abundancia** de peces para que los mismos puedan ser utilizados como indicadores biológicos del estado ecológico de los ríos.

Pero además de estos dos descriptores, la DMA exige el uso de datos relativos a la estructura de **clases de edad** de las especies de peces que se encuentra en cada uno de los tramos que quieren ser evaluados, a fin de conocer el estado de sus poblaciones.



La definición y estima de estos parámetros a partir de los datos obtenidos en el campo se explican al final de este capítulo.

## 3.2. Protocolo de campo

La metodología empleada para la captura de peces sigue el procedimiento establecido en la norma europea UNE-EN 14011 sobre “**muestreo de peces con electricidad**”. Esta normativa ha sido desarrollada para proporcionar un método de muestreo de peces mediante pesca eléctrica que permita caracterizar la composición, abundancia y clases de edad de la ictiofauna de ríos.

### 3.2.1. Diseño del muestreo

El objetivo del muestreo es obtener estimas sobre la composición y tamaño poblacional de la comunidad de peces que se encuentran en los tramos de estudio, así como obtener información sobre el estado de salud de las mismas.

La estrategia de muestreo a seguir para obtener las estimas de tamaño poblacional de peces va a depender de las características del río a muestrear (véase apartado 3.2.2). Siempre que sea posible muestrear de modo completo el área del tramo seleccionado se procederá a obtener estimas mediante métodos absolutos, pero cuando esto sea impracticable, las estimas se harán en base a métodos relativos.

El método empleado para la obtención de estimas absolutas es el de **capturas sucesivas sin devolución**. Este método permite estimar el tamaño poblacional a partir de la disminución que se da en las capturas a lo largo de las distintas pasadas, y se basa en que existe una relación directa entre esa tasa de reducción y el número acumulado de capturas así como con el número total de individuos de la población. Una vez realizadas las capturas, el cálculo de la densidad poblacional se puede hacer a través de diferentes modelos matemáticos. En el caso de este cuadernillo el modelo de cálculo propuesto es el desarrollado por Carle y Strub (1978) (véase apartado 3.3.2).

Sin embargo, para que este método sea eficaz deben satisfacerse las siguientes condiciones (Moran, 1951):

- La población debe ser cerrada. El efecto de la mortalidad, del reclutamiento y de la migración no debe ser significativo a lo largo del tiempo que dure el muestreo.
- En cada pasada debe reducirse la población en una proporción significativa respecto a la pasada anterior.
- Todos los individuos deben tener la misma probabilidad de ser capturados.
- La probabilidad de captura debe ser constante a lo largo de todas las pasadas.

Por su parte, el método empleado para la obtención de estimas relativas de peces es el de **captura por unidad de esfuerzo** (CPUE). Este método implica la captura de los ejemplares de peces en el campo, siendo la unidad de esfuerzo empleada el área de la parte del tramo que se ha muestreado en cada caso.

Para que el método de captura por unidad de esfuerzo sea válido tienen que cumplirse también una serie de condiciones (Caughley, 1994):

- Las condiciones de captura deben de estar estandarizadas para que puedan hacerse comparaciones de los datos en el espacio (i.e., entre distintos tramos) y en el tiempo.
- La eficiencia de la captura debe de estar estandarizada.
- El mecanismo de captura debe de estar estandarizado.

- La captura de un ejemplar no debe afectar la captura de otro.
- Todos los animales deben de tener la misma probabilidad de ser capturados, independientemente de su tamaño, edad, o sexo.

En el procedimiento seguido para efectuar la captura de peces (véase apartado 3.2.4.) se especifica cómo han de cumplirse estas condiciones. Sin embargo, antes de describir este procedimiento se explica a continuación como seleccionar el tramo fluvial de estudio en función del tipo de río a fin de estandarizar el muestreo y poder obtener conclusiones relativas a la caracterización de las comunidades de peces válidas y comparables entre los distintos tramos incluidos en la red.

### 3.2.2. Selección del tramo de estudio

La selección del tramo de estudio para la caracterización de la ictiofauna se hace siguiendo principios similares a los establecidos para la toma de datos de macroinvertebrados (véase capítulo 1). Del mismo modo que ocurre en el muestreo de macroinvertebrados, para proceder a la toma de datos de peces hay que procurar que el tramo de estudio incluya todos los hábitats donde se distribuyen las especies de peces dominantes. Sin embargo, dada la alta movilidad de los peces, para garantizar una buena representatividad de la comunidad hay que respetar una superficie mínima de muestreo, la cual varía en función de las características del tramo de estudio. Como se mencionaba en el apartado anterior, estas características también van a determinar que las estimas de las abundancias de peces se den en forma de valor absoluto o relativo.

Con el objeto de asegurar una descripción correcta de la comunidad de peces, la longitud mínima del tramo de muestreo en el que se va a realizar la pesca eléctrica se establece en función de su anchura, siguiendo el siguiente cuadro (véase Norma Europea EN: 14011: 2003 para más información).

Ancho del río (m)	Longitud mínima de muestreo (m)	Anchura mínima de muestreo (m)	Tipo de estima de abundancia
< 5 m	20 m	Completa	Absoluta
5-15 m	50 m	Completa	Absoluta
> 15 m	> 50 m	Margen Fluvial	Relativa

Además de estas indicaciones, en aquellos tramos en los cuales las abundancias de peces sean muy elevadas, para caracterizar la comunidad será suficiente con capturar 200 individuos, fijándose un área mínima de muestreo de 100 m<sup>2</sup>.

Por lo tanto, en la mayor parte de las ocasiones, la longitud del tramo a muestrear va a ser menor que los 100 m seleccionados para el estudio de la comunidad de macroinvertebrados o del fitobentos.

### 3.2.3. Material necesario para el trabajo de campo

A continuación se expone un listado del material que se necesita para poder efectuar el inventario de peces:

- Permisos de pesca pertinentes
- Cintas métricas (50 m mínimo)
- Botas vadeadores
- Guantes de goma gruesos
- Equipo de pesca eléctrica completo
- Conductivímetro
- Sacaderas (al menos 3), provistas de mangos no conductores
- Redes de retención para delimitar los tramos (en casos en los que se puedan tomar estimas de abundancias absolutas)
- Anestésico para peces (Eugenol)
- Cubos de plástico (al menos uno grande de recuperación, otro para poner la anestesia y 3 de almacenamiento)
- Aireadores portátiles
- Escala ictiológica
- Balanza de campo
- Estadillos de campo (preferiblemente impreso sobre papel resistente al agua)
- Alcohol etílico al 70% o hielo (normal, seco o nitrógeno líquido)
- Lápices
- Bolsas de plástico
- Rotulador de etiquetas plásticas



Unos días antes de comenzar cada campaña de muestreo hay que asegurarse de que todo el material, en especial el aparato de pesca eléctrica y el anestésico, se encuentran en las condiciones adecuadas para su uso. Se recomienda llevar baterías de repuesto para la balanza. También es aconsejable llevar una batería extra para el aparato de pesca eléctrica (en caso de que funcione con baterías) o fuel suficiente (en caso de tratarse de un generador) para asegurar su funcionamiento durante el muestreo.

Dado el riesgo que conlleva la utilización del equipo de pesca eléctrica, todos los operarios deben asegurarse de que cualquier parte de su cuerpo que pueda entrar en contacto con el campo eléctrico esté bien protegida. Para ello se recomienda usar vestimenta resistente al agua y no conductora de la electricidad. En este sentido, es importante revisar los vadeadores y asegurarse de que no están picados para evitar la entrada de agua, y con ella, el paso de la corriente al cuerpo del operador.

### 3.2.4. Procedimiento de muestreo de peces

Del mismo modo que la longitud del tramo de estudio depende de su anchura, el procedimiento de pesca eléctrica a seguir también varía en función de las características del tramo seleccionado, en particular de su anchura y profundidad.

Los tramos fluviales con una profundidad hasta 0.7-1 m se consideran **tramos vadeables**, y en ellos la pesca eléctrica debe hacerse a pie. Sin embargo, en tramos fluviales con una profundidad mayor a 1 m a lo sumo hasta 2-2.5 m (**tramos no vadeables**), la pesca eléctrica debe realizarse desde una embarcación adaptada, dado que el vadeo en esas circunstancias no sólo puede resultar peligroso, sino que las conclusiones obtenidas no se considerarían válidas.

#### 3.2.4.1. Generalidades

Las bases físicas en las que se apoya el método de la pesca eléctrica, sin entrar en una descripción más detallada, son las siguientes:

- El agua contiene iones en disolución que permiten que ésta sea un buen conductor de la electricidad
- La carga eléctrica que se genera para realizar la pesca provoca que se cree un polo positivo (ánodo) y uno negativo (cátodo) en la masa de agua, lo que permite que la corriente pueda descargarse y completar un circuito.
- Los peces presentan una resistividad eléctrica menor que el agua, por lo que la corriente eléctrica fluye preferentemente a través de ellos, generándose una diferencia de potencial entre sus dos extremos.

La corriente eléctrica generada (medida en voltios) se origina por medio de una batería o de un generador alimentado de gasolina. Independientemente del equipo que se utilice, para efectuar la pesca eléctrica se puede aplicar tanto corriente continua como corriente

#### IMPORTANTE:

**La pesca eléctrica debe realizarse bajo unas medidas de seguridad adecuadas.**

Los operadores que lleven a cabo esta actividad deben estar cualificados y familiarizados con la misma. Es responsabilidad de los operadores establecer las normas de seguridad y salud laboral apropiadas y asegurar el cumplimiento de las regulaciones nacionales existentes en la materia.

Sólo si la pesca eléctrica se realiza de forma adecuada se podrán evitar daños, tanto a los peces expuestos a la electricidad como a los propios operadores.

continua pulsante, pero nunca debe usarse corriente alterna, ya que ésta resulta muy perjudicial para los peces. En **corriente continua**, el flujo de electrones tiene un sentido unidireccional, desde el ánodo (extremo positivo) hasta el cátodo (extremo negativo) y, a diferencia de la corriente alterna, los electrodos del circuito no varían con el tiempo.

Sea cual sea el tipo de aparato de pesca eléctrica utilizado, el ánodo está formado por un anillo metálico que se sitúa en el final de una pértiga que no conduce la electricidad, y el cátodo es un cable expuesto que se mantiene sumergido en el agua para poder establecer el circuito de la corriente. La corriente es mayor alrededor del ánodo y del cátodo, y disminuye concéntricamente a medida que nos alejamos de los mismos (para más detalle véase por ejemplo Cowx y Lamarque, 1990). Por lo tanto el tamaño y la forma del ánodo y del cátodo afectan a la distribución de la corriente en el agua.

Cuando se genera una corriente en el agua, los peces, al hallarse dentro del campo eléctrico efectivo que se forma entre los dos extremos de su cuerpo, experimentan una natación forzada hacia el ánodo denominada **galvanotaxia**. Además, la corriente generada en las proximidades de éste provoca en los peces un aturdimiento y pérdida de sentido denominado **galvanonarcosis** o electronarcosis (Hervella y Caballero, 1999). En el momento de galvanonarcosis o electronarcosis los peces pueden ser fácilmente capturados por medio de sacaderas sin que éstos se vean afectados en sus constantes vitales.

### IMPORTANTE:

**Los aparatos de pesca eléctrica deben satisfacer la legislación aplicable**

Los aparatos de pesca eléctrica deben de ajustarse a las normativas vigentes, esto es a las normas CEI y CENELEC, y, de forma explícita, a la norma CEI 60335-2-86.

Sin embargo, la respuesta de los peces a la descarga dependerá del tamaño de los mismos y del voltaje al que se vean expuestos. Por un lado, los peces de menor tamaño son menos susceptibles a los daños producidos por la electricidad, dado que al ser más cortos, la diferencia de potencial que se crea a lo largo de sus cuerpos es menor. Sin embargo, los peces más largos son más susceptibles de ser capturados con electricidad, dado que el gradiente de corriente que cubren es mayor. Pero además, la eficiencia de la descarga es mayor cuanto más semejante sea la conductividad del pez a la del agua. Por ello, dado que la conductividad interna de los peces es difícil de medir, se debe de anotar la conductividad del agua en cada tramo. Los ríos del Norte de España van desde silicios a calcáreos, por tanto el rango de conductividades en los mismos es bastante variable. Como valores orientativos de **voltaje a** emplear para efectuar la pesca se recomiendan los siguientes en función de la conductividad de las aguas: conductividades  $\leq 100 \mu\text{S}/\text{cm}$  voltaje superior a 650 v y conductividades desde  $100 \mu\text{S}/\text{cm}$  voltaje superior a 350 v. En todo caso el **amperaje** suele ser siempre inferior a 2A.



Con el objetivo de garantizar la repetitividad del muestreo, siempre que sea posible debería de utilizarse el mismo equipo de pesca. Si por algún motivo hubiera que cambiarlo, debe realizarse un estudio comparativo de los resultados obtenidos con los dos aparatos, de forma que sea posible comparar los datos obtenidos con el equipo nuevo y con el antiguo.

El **equipo humano** necesario para realizar el trabajo de campo es de un mínimo de 4 operarios. De los cuales, tres realizan la pesca eléctrica propiamente dicha y el otro está al cuidado del correcto funcionamiento del equipo (ya sea de generador o portátil) y transporta los peces que se van sacando a los cubos de almacenamiento, donde se depositan hasta el momento de la toma de datos.

De los tres operarios que realizan la pesca eléctrica, uno lleva el ánodo (i.e., la pértiga) y el cubo de capturas, y los otros dos portan las sacaderas para ir recogiendo los peces aturdidos por el efecto de la corriente eléctrica. Aunque el uso de guantes de goma es obligatorio para efectuar la pesca eléctrica, se recomienda que las sacaderas tengan el mango de madera o de fibra de vidrio. En el caso de no utilizar un equipo de mochila, el generador-transformador se debe situar en una de las orillas a mitad del tramo y, con un cable de longitud suficiente se hace la pesca a lo largo de todo el tramo.

#### **3.2.4.2. Procedimiento de pesca en tramos vadeables**

El objetivo de este tipo de muestreo es determinar la abundancia de peces existentes en cada tramo, de manera que siempre que el muestreo se realice de forma adecuada estos datos de abundancia deberían de estar directamente relacionados con la densidad poblacional de cada especie.



Para llevar a cabo la pesca eléctrica en tramos vadeables, los operadores se desplazan desde el límite inferior del tramo, para que sus movimientos no afecten a los peces que se encuentran aguas arriba de la zona que está siendo vadeada. El desplazamiento del operario que lleva el ánodo debe ser lento, cubriendo el hábitat con movimientos de barrido de la pértiga. Los otros operarios que participen en la pesca deben estar situados siempre aguas abajo del operario que porta la pértiga.

**Tramos < 15 m de ancho:** Como se indicó en el apartado 3.2.2., en tramos fluviales con una anchura inferior a 15 m se recomienda el muestreo a lo largo de todo el cauce río, de una orilla a la otra. Por lo general, en este tipo de tramos es posible obtener **estimaciones absolutas de las abundancias** de peces. Para esto es importante asegurarse de que durante las labores de muestreo se trabaja con una población cerrada (i.e., no se produzcan entradas o salidas de peces). Para ello, cada tramo se acota con redes de retención (luz de 0,5 cm) u obstáculos naturales que cubran toda la anchura del mismo, tanto en sus límites superior como inferior. Con esta técnica se minimiza la influencia de la mortalidad y el reclutamiento en los resultados posteriores. Además, con esto se asegura que todos los peces incluidos dentro del tramo tienen la misma probabilidad de ser capturados.

En este caso, el método de muestreo para realizar los inventarios de la ictiofauna consiste en realizar pasadas sucesivas sin re-emplazamiento, procurando mantener el esfuerzo de pesca constante en todas las pasadas y asegurándose de que en cada pasada se cubran todos los hábitats presentes en el tramo.

**Tramos > 15 m de anchura:** En tramos cuya anchura supere los 15 m, o bien en aquellos tramos de menor tamaño en los que la estimación de abundancias absolutas sea impracticable, la caracterización de la comunidad de peces se hará en base a una **estimación relativa de abundancias**. En este caso, la estimación de las abundancias está basada en una única pasada de pesca efectuada en un área conocida, que se delimita por medio de barreras parciales, como son rápidos poco profundos o represas.

### **3.2.4.3. Procedimiento de pesca en tramos no vadeables**

Dado las dificultades de realizar estimaciones de abundancias de peces en tramos no vadeables, se recomienda que los tramos que se incluyan en la red de muestreo permitan que la pesca pueda realizarse a pie, ya sea dentro del cauce o desde la orilla.

En los casos en los que la red del diseño de puntos incluya tramos fluviales que no sean vadeables (como ocurre en los tramos bajos del Sella, Nalón y Cares) la comunidad de peces se tiene que caracterizar de **forma cualitativa**, no pudiendo utilizar estos datos para hacer estimaciones de densidades. En estos casos, es importante establecer un procedimiento de muestreo estratificado en función de la diversidad de hábitats.

Una segunda alternativa sería la realización de un muestreo **semicuantitativo** mediante la utilización de una embarcación adaptada a tal fin, provista con un sistema de ánodos colgantes desde la proa.

Sin embargo, el procedimiento de muestreo a seguir en estos tramos fluviales no vadeables pertenecientes a tramos bajos de grandes ríos depende del equipo disponible y de las propias características del tramo.

### 3.2.5. Procesado de las muestras

Todos los peces capturados en cada pasada se identifican, se cuentan y se miden. Además, aunque no entra dentro de los requerimientos especificados por la Directiva (DMA) se recomienda pesar un subconjunto representativo de los ejemplares capturados, asegurándose de tomar medidas de todas las especies, ya que las medidas de peso ayudan tanto a definir las clases de edad como a evaluar el estado de salud de las poblaciones. Para facilitar la manipulación de los peces durante estas tareas, los ejemplares depositados en los cubos de almacenamiento tras su extracción, se van echando, de pocos en pocos, en otro cubo con agua al que se le ha añadido un **anestésico** (el eugenol es uno de los más utilizado con este fin).

La **identificación de todos los ejemplares capturados se hace a nivel de especie**. En el caso de que exista duda en la identificación de alguna especie hay que guardar un ejemplar para su posterior examen en el laboratorio. Para esto se siguen las pautas que se indican en el apartado 3.2.6. Sin embargo, antes de recoger ningún ejemplar es importante comprobar si en el río de estudio hay especies de peces Raras o En Peligro de Extinción. En cuyo caso, se deberá de aprender a distinguirlas antes de salir al campo, o se le harán fotografías a diversos caracteres morfológicos externos para poder proceder a su posterior identificación.

La **medida de la longitud** que se debe tomar en los peces es la longitud furcal ( $L_F$ ), es decir, desde la cabeza hasta la escotadura de la aleta caudal. Esta medida se hace con un ictiómetro de 50 cm, con una precisión de  $\pm 10$  mm. Para **pesar** a cada uno de los ejemplares debe utilizarse una balanza de hasta 3 kg con una precisión de  $\pm 0.1$  g.



Además de estimar estos parámetros biológicos, también se procede al **análisis de posibles anomalías patológicas externas** en los individuos, para así conocer el estado general de la comunidad de peces en el tramo de estudio. Para cada uno de los ejemplares capturados hay que indicar si existen parásitos, ulceraciones u hongos externos, así como su ubicación en el cuerpo del animal (agallas, ojos, etc.). Se recomienda tomar algunas fotografías que sean representativas de los ejemplares capturados.

Todos los datos recogidos en el campo tienen que anotarse en estadillos o plantillas convenientemente diseñadas (véase anexo 1).



Al finalizar la toma de datos de los ejemplares capturados en cada pasada, estos son almacenados en otro cubo (llamado cubo de recuperación) que contiene agua del río limpia, sin anestésico y provisto de un aireador portátil, lo que permitirá mantener los peces capturados en buenas condiciones hasta su liberación.

Al final del estudio, y una vez nos aseguremos de que los ejemplares capturados se han recuperado del efecto de la anestesia, todos los peces se tendrán que devolver al agua sin que sufran ningún daño físico. La **devolución de los ejemplares capturados** se debe de realizar dentro del tramo inventariado, por lo que los peces se tienen que almacenar en los cubos de recuperación hasta el final del muestreo. Es por ello que los cubos deben mantenerse a la sombra y es necesario revisarlos cada cierto tiempo para evitar que se caliente el agua, en cuyo caso habría que reponerla con agua nueva. En caso de que el número de peces capturados sea muy elevado y no se puedan asegurar unas buenas condiciones durante el almacenamiento de los mismos, los ejemplares podrían soltarse aguas abajo del tramo de estudio al finalizar cada pasada. De este modo se minimizarían los posibles daños que puedan causarse durante el almacenamiento. En el momento de la suelta, es importante que los peces se liberen en zonas tranquilas cerca de la orilla, evitando las zonas con mucha corriente.

### 3.2.6. Etiquetado y conservación de las muestras

Aunque lo ideal sería que todos los ejemplares capturados se pudieran identificar en el campo, si esto no fuese posible se recomienda sacarles al menos tres fotografías a estos ejemplares para su posterior identificación con ayuda de especialistas o claves específicas.

En el caso de que se necesite transportar algunos ejemplares al laboratorio éstos se fijarán en el campo con alcohol etílico (70%) o se congelarán hasta que puedan examinarse. Los ejemplares recogidos en el campo se introducirán separadamente en bolsas plásticas gruesas previamente etiquetadas. Las etiquetas deberán contener información relativa al tramo de estudio, fecha, pasada y código de identificación de la especie. Se aconseja que este código sea consecutivo. Este código debe coincidir con el que se haya introducido en las hojas de campo durante la fase de procesado de las muestras. Además, se recomienda usar dos bolsas plásticas por ejemplar, para evitar la posible rotura de las mismas. En este caso se introducirá una etiqueta en la bolsa exterior y otra en la interior.

## 3.3. Tratamiento de la información

---

Los resultados obtenidos con los inventarios de pesca descritos sirven para proporcionar información sobre el estado actual de la comunidad de peces en el tramo de estudio seleccionado. Para esto, los datos recogidos suelen presentarse en forma de los siguientes parámetros: composición por especies, abundancia y estructura de edades. Además, si en el campo se hacen estimas del peso de los ejemplares también se puede calcular tanto el peso individual de cada ejemplar como el factor de condición de las especies capturadas.

### 3.3.1. Composición por especies

La composición por especies de la comunidad de peces consiste en proporcionar un **inventario taxonómico** de los ejemplares capturados en cada tramo de estudio. Además,

este listado también sirve para analizar la posible incidencia de especies de peces alóctonas en la comunidad.

En el Anexo 2 se proporciona un listado de las especies de peces que se encuentran comúnmente en los ríos pertenecientes a la Demarcación Hidrográfica del Norte.

### 3.3.2. Abundancia

La abundancia estimada de individuos por cada una de las especies identificadas en el tramo se debe indicar tanto en número total de ejemplares registrados, como en forma de capturas (i.e., número de ejemplares) por área del tramo muestreado (que suele darse en m<sup>2</sup>).

En los casos en los que se hayan podido realizar estimas absolutas, la densidad de peces capturados en cada tramo se calcula con el método de Máxima Verosimilitud Ponderada (Carle y Strub, 1978) que permite estimar las densidades de población a partir de muestreos repetidos con una unidad de esfuerzo similar. Se escoge este método por ser el de mayor robustez estadística (Cowx, 1983).

El modelo que se sigue para el cálculo de densidades es el siguiente (siguiendo Hervella y Caballero, 1999):

Sea T la captura total:

$$T = \sum_{i=1}^k C_i$$

Donde: k: nº de pasadas: C<sub>i</sub>: nº de capturas en la pasada i-ésima.

Definimos ahora la relación M:

$$M = \sum_{i=1}^k (k-i)(C_i)$$

Y el estimador de máxima verosimilitud ponderada del número total de individuos (N) vendrá dado por el menor número entero que sea  $\geq$  que T y que satisfaga la siguiente desigualdad:

$$\left( \frac{N_0 + T}{N_0 - T} \right) \sum_{i=1}^k \left( \frac{k \cdot N_0 - M - T + i}{k \cdot N_0 - M + i} \right) \leq$$

Donde la probabilidad de captura (p) se obtiene de la resolución de la siguiente ecuación:

$$p_0 = \frac{T}{k \cdot N_0 - M}$$

Y el error estándar de la estimación al 95% de significación viene dado por:

$$S.E.(N_0) = \sqrt{\frac{N_0(N_0 - T)}{T^2 - \frac{N_0(N_0 - T)}{k^2 p^2} (1 - \gamma)}}$$

Siendo la expresión de los límites de confianza (a un nivel de confianza del 95%) la siguiente:

$$95\%L.C. = \bar{N}_0 \pm .96 \cdot S.E.(N_0)$$

### 3.3.3. Estructura de Edades

La estructura de edad de los ejemplares capturados puede determinarse indirectamente a partir de la **frecuencia de longitudes** que se obtiene para cada una de las especies de peces encontradas en el tramo de estudio. Este método para estudiar la estructura de edades de una población se basa en que las longitudes de los individuos de cada edad tienen una distribución normal, por lo que al representarlos permiten identificar clases modales, que se asumen como cortes de las clases de edad presentes para esa especie. A pesar de no ser estrictamente necesario podría resultar de interés la recogida de estructuras como escamas u otolitos para determinar de modo directo la edad de los ejemplares. En el caso de las escamas se recogerá un pequeño número de ellas de los ejemplares, que se guardarán en sobres debidamente etiquetados. En el caso de la recogida de otolitos ésta exige la disección de los ejemplares, por tanto no se recomienda a no ser que sea realmente preciso. Dado que la preparación y lectura de las muestras presenta gran complejidad, este método requeriría el envío de las mismas a especialistas.

### 3.3.4. Factor de condición

El Factor de Condición (K) sirve para estimar el estado morfológico de los peces capturados en las estaciones de muestreo seleccionadas en relación con las clases de edad. El cálculo de este parámetro no es un requerimiento de la DMA, pero proporciona información adicional sobre el estado de las poblaciones de peces que se encuentran en un tramo. El índice compara la forma real de cada ejemplar con la que le correspondería a su crecimiento isométrico (i.e., el aumento de tamaño es proporcional al aumento de peso). Para realizar estos cálculos se sigue el modelo de Fulton, con base en Bagenal y Tesch (1978) que parte de que la relación existente entre la longitud y el peso de los peces se ajusta a un modelo potencial, como sigue:

$$P = aL^b$$

Donde:  $P$  = peso del pez,  $L$  = longitud furcal,  $b$  = coeficiente de regresión de la longitud y  $a$  = constante.

Las constantes  $a$  y  $b$  se pueden determinar fácilmente linealizando la expresión anterior, esto es, convirtiéndola en una ecuación de tipo logarítmico; quedando de la siguiente forma:

$$\ln P = \ln a + b \ln L$$

A partir de este modelo potencial de relación longitud-peso, se considera una  $b = 3$  (crecimiento isométrico) y se despeja  $a$ .

$$K = (P/L^b) * 100 \text{ (observado)}$$

$$k' = (P/L^3) * 100 \text{ (esperado)}$$

Así, para los ejemplares de especies que pertenecen a una misma clase de edad, aquellas que se encuentren en tramos más productivos y con una mayor diversidad de hábitats tendrán una  $k'$  mayor, o sea que se encontrarán en mejores condiciones físicas. Para establecer las comparaciones entre los factores de condición que se calculen para cada especie y tramos, los valores observados ( $K$ ) se dividen entre los esperados ( $k'$ ).

### 3.3.5. Estado de las poblaciones

Pero además de proporcionar información sobre la estructura y composición de la comunidad de peces, el análisis de posibles anomalías externas realizado en los ejemplares capturados también sirve para evaluar el **estado de las poblaciones** (parásitos, malformaciones, etc.).

## 3.4. Referencias bibliográficas

---

- Bagenal T, Tesch E. 1978. Age and Growth. In Tesch (Eds) Methods for fish production in freshwater. Blackwell, Oxford. 492 p.
- Carle F L, Strub MR. 1978. A new method for estimating population size from removal data. Biometrics 34: 621-380.
- Caughley G, Sinclair ARE. 1994. Wildlife ecology and management. Blackwell Sciences Publishers. Boston. 334 pp
- Cowx IG. 1983. Review of the methods for estimating fish population size from survey removal data. Fisheries Management 14: 67-82.
- Cowx I G, Lamarque P. (Eds) 1990. *Fishing with Electricity*. Fishing News Books, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- European Union 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. Official Journal of the European Communities L327: 1-73.
- Hervella F, Caballero P. 1999. Inventario piscícola dos ríos galegos. Santiago de Compostela, Spain: Consellería de Medio Ambiente.
- Moran P.A.P. 1951. A mathematical theory of animal trapping. Biometrika 38: 307-311.
- UNE-EN 14011:2003 Calidad del agua. Muestreo de peces con electricidad.

### 3.5. Agradecimientos

---

A todo el equipo de Ecohydros, en especial a Gonzalo A. de Santocildes y Agustín Monteoliva, así como a Francisco Hervella (Xunta de Galicia).

## 3.6. Anexos

Anexo 1: Hoja de campo para la recogida de datos de peces

**Ficha de campo:  
Recogida de datos de  
peces**





**Campaña:**     Primavera     Verano

Fecha     Hora comienzo     Hora final

Río     Tramo ID     UTM

Long tramo (m)     Anchura (m): 1     2     3

Prof. media (cm)     Temperatura     Oxígeno     PH

**Tipo corriente utilizada:**     Continua     Continua pulsada

Conductiv. (µs/cm)     Voltaje     Amperaje     Nº ánodos

Condiciones de muestreo		
Climatología	Condiciones	Turbidez
<input type="checkbox"/> Soleado	<input type="checkbox"/> Buenas	<input type="checkbox"/> Agua clara
<input type="checkbox"/> Nublado	<input type="checkbox"/> Regular	<input type="checkbox"/> Agua turbia (se ve el fondo)
<input type="checkbox"/> Lluvioso	<input type="checkbox"/> Malas	<input type="checkbox"/> Agua turbia (no se ve el fondo)

**VEGETACIÓN**

Tipo Vegetación de Ribera:

% Sombra sobre el cauce     % Vegetación sumergida

**SUSTRATO**

% Roca madre     % Bloques     % Gravas

% Gravillas     % Arena     % Limo

**HÁBITATS**

% Rápidos     % Pozas     % Remansos

% Tabla lenta     % Tabla rápida

% Isletas     Tipo vegetación isletas:



Anexo 2: Listado de las especies de peces típicas de los ríos que pertenecen a la Demarcación Hidrográfica del Norte

CLASE	ORDEN	FAMILIA	ESPECIE	Nombre común
Actinopterygii	Anguilliformes	Anguillidae	<i>Anguilla anguilla</i>	Anguila
Actinopterygii	Atheriniformes	Atherinidae	<i>Atherina boyeri</i>	Pejerrey
Actinopterygii	Cypriniformes	Balitoridae	<i>Barbatula quignardi</i>	Lobo de río
Actinopterygii	Cypriniformes	Cobitidae	<i>Cobitis paludica</i>	Colmilleja
Actinopterygii	Cypriniformes	Cyprinidae	<i>Barbus bocagei</i>	Barbo común
Actinopterygii	Cypriniformes	Cyprinidae	<i>Barbus graellsii</i>	Barbo de Graells
Actinopterygii	Cypriniformes	Cyprinidae	<i>Carasius auratus</i>	Pez rojo
Actinopterygii	Cypriniformes	Cyprinidae	<i>Achondrostoma arcasii</i>	Bermejuela
Actinopterygii	Cypriniformes	Cyprinidae	<i>Parachondrostoma miegii</i>	Madrilla
Actinopterygii	Cypriniformes	Cyprinidae	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa
Actinopterygii	Cypriniformes	Cyprinidae	<i>Gobio lozanoi</i>	Gobio
Actinopterygii	Cypriniformes	Cyprinidae	<i>Phoxinus phoxinus</i>	Piscardo
Actinopterygii	Cypriniformes	Cyprinidae	<i>Pseudochondrostoma duriense</i>	Boga de río
Actinopterygii	Cypriniformes	Cyprinidae	<i>Squalius carolitertii</i>	Bordallo
Actinopterygii	Cyprinodontiformes	Poeciliidae	<i>Gambusia holbrokii</i>	Gambusia
Actinopterygii	Gasterosteiformes	Gasterosteidae	<i>Gasterosteus gymnotus</i>	Espinoso
Actinopterygii	Perciformes	Centrarchidae	<i>Lepomis gibbosus</i>	Pez sol
Actinopterygii	Perciformes	Centrarchidae	<i>Micropterus salmoides</i>	Perca americana
Actinopterygii	Perciformes	Mugilidae	<i>Chelon labrosus</i>	Lisa
Actinopterygii	Perciformes	Mugilidae	<i>Liza ramada</i>	Morragute
Actinopterygii	Perciformes	Mugilidae	<i>Mugil cephalus</i>	Pardote
Actinopterygii	Pleuronectiformes	Pleuronectidae	<i>Platichthys flesus</i>	Platija
Actinopterygii	Salmoniformes	Salmonidae	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trucha arco iris
Actinopterygii	Salmoniformes	Salmonidae	<i>Salmo salar</i>	Salmón
Actinopterygii	Salmoniformes	Salmonidae	<i>Salmo trutta fario</i>	Trucha común
Actinopterygii	Salmoniformes	Salmonidae	<i>Salmo trutta trutta</i>	Reo
Actinopterygii	Scorpaeniformes	Cottidae	<i>Cottus aturi</i>	Burtaina
Cephalaspidomorphi	Petromyzontiformes	Petromyzontidae	<i>Lampetra planeri</i>	Lamprea de arroyo
Cephalaspidomorphi	Petromyzontiformes	Petromyzontidae	<i>Petromyzon marinus</i>	Lamprea marina



# 4

## Protocolo para la obtención de datos de macrófitos

## **4. Protocolo para la obtención de datos de macrófitos**

<b>4.1.</b>	<b>Los macrófitos como elementos biológicos de calidad en ríos .....</b>	<b>58</b>
4.1.1.	<b>Uso de los macrófitos como indicadores de calidad en ríos .....</b>	<b>58</b>
4.1.2.	<b>Requerimientos de la DMA.....</b>	<b>58</b>
<b>4.2.</b>	<b>Protocolo de campo.....</b>	<b>60</b>
4.2.1.	<b>Diseño del muestreo .....</b>	<b>60</b>
4.2.2.	<b>Selección del tramo de estudio .....</b>	<b>62</b>
4.2.3.	<b>Material necesario para el trabajo de campo .....</b>	<b>63</b>
4.2.4.	<b>Procedimiento de muestreo de macrófitos.....</b>	<b>63</b>
4.2.5.	<b>Recogida de datos complementarios.....</b>	<b>65</b>
4.2.6.	<b>Etiquetado y conservación de las muestras .....</b>	<b>65</b>
<b>4.3.</b>	<b>Protocolo de laboratorio.....</b>	<b>66</b>
4.3.1.	<b>Material necesario para el trabajo de laboratorio .....</b>	<b>66</b>
4.3.2.	<b>Procesado de las muestras .....</b>	<b>66</b>
4.3.3.	<b>Identificación del material.....</b>	<b>67</b>
<b>4.4.</b>	<b>Tratamiento de la información .....</b>	<b>67</b>
4.4.1.	<b>Composición de la comunidad de macrófitos .....</b>	<b>67</b>
4.4.2.	<b>Abundancia de la comunidad de macrófitos.....</b>	<b>67</b>
<b>4.5.</b>	<b>Referencias bibliográficas .....</b>	<b>68</b>
<b>4.6.</b>	<b>Agradecimientos.....</b>	<b>68</b>

## 4.1. Los macrófitos como elementos biológicos de calidad en ríos

El término macrófito designa a un grupo de especies vegetales acuáticas macroscópicas, es decir, visibles e identificables a simple vista, que habitan los ecosistemas acuáticos continentales. Aunque desde un punto de vista sistemático se trata de un grupo muy heterogéneo, entre los macrófitos se diferencian básicamente: **plantas vasculares, briófitos y crecimientos macroalgales** de clorófitas y algunas rodófitas.

### 4.1.1. Uso de los macrófitos como indicadores de calidad en ríos

En la Directiva Marco del Agua (DMA) (WFD; European Union, 2000) se refleja claramente la necesidad de utilizar este grupo de organismos como elemento indicador para establecer el estado ecológico de los ríos. Al igual que sucede con el resto de elementos biológicos, la utilización de los macrófitos como indicadores se basa precisamente en el hecho de que su presencia es característica de ciertos hábitats. De modo que modificaciones en las características morfológicas del lecho, en la variación del régimen de caudal, o en las propiedades físico-químicas de las aguas, van a provocar cambios en la abundancia, composición y distribución de este grupo de vegetales. Por lo tanto, estos organismos parecen a priori ser posibles candidatos a indicadores de posibles impactos antropogénicos que puedan existir en las masas de agua.

Una de las principales ventajas que presenta el uso de los macrófitos con este fin, es que presentan un ciclo vital mucho más largo que las microalgas que forman parte del fitobentos. De modo que las variaciones que se produzcan en su abundancia y composición serán de utilidad a la hora de identificar **cambios en las condiciones de los ríos que se han producido a medio o largo plazo** (del mismo modo que ocurre con los peces).

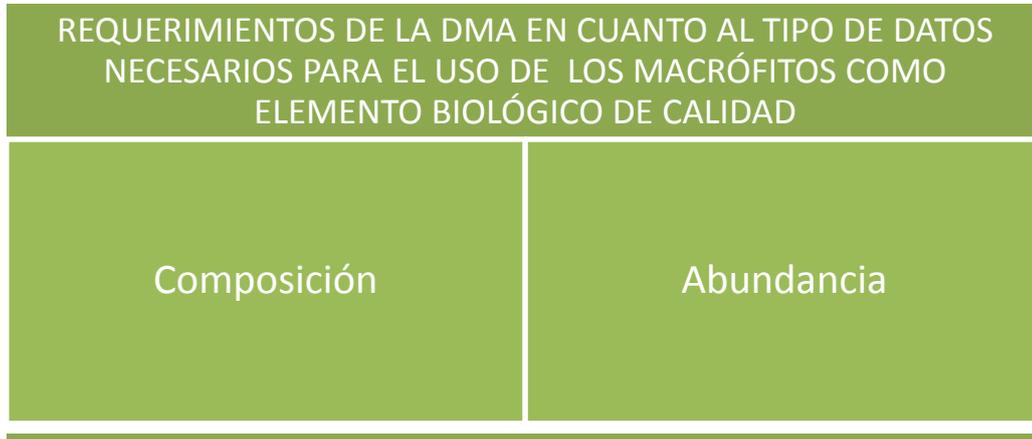
Cabe destacar, que dado que muchas de las especies que conforman este grupo de vegetales acuáticos están enraizadas al lecho de los ríos, ya sea dentro del cauce o en sus márgenes, su presencia/ausencia en los mismos es un buen indicador de **alteraciones hidromorfológicas**. Así, cabría esperar que su abundancia aumentase en lechos más estables y homogéneos, característicos de un río canalizado o que se haya visto sometido a algún proceso de estabilización.

Además, gran parte del valor indicador de este grupo radica en su dependencia de las concentraciones de nutrientes, de manera que este grupo de organismos autótrofos puede alcanzar una importancia destacada en condiciones de **contaminación orgánica**, al igual que ocurría en el caso de las diatomeas bentónicas (ver capítulo 2).

### 4.1.2. Requerimientos de la DMA

Este protocolo está dedicado a los macrófitos de aguas corrientes y tiene como objetivo especificar las directrices metodológicas para el muestreo de campo e identificación de los macrófitos en el marco de la aplicación de la directiva Marco del Agua 2000/60/EC.

Como se indicaba en el apartado anterior, en general, los macrófitos que habitan en los ríos son buenos indicadores del estado del ecosistema fluvial dado que, de forma similar a lo que ocurre con otros elementos biológicos, entre los mismos se encuentran taxones más o menos sensibles a distintos tipos de degradación del hábitat. Es por ello que la DMA obliga el uso de datos de **composición** y **abundancia** de macrófitos para que estos puedan usarse como indicadores biológicos de calidad del estado ecológico de los ríos.



La definición y estima de estos parámetros a partir de los datos obtenidos en el campo y en el laboratorio se explican al final de este capítulo.

## 4.2. Protocolo de campo

El método empleado para la recogida de datos relativos a macrófitos se ha diseñado en base a la norma EN 14184 (Water quality. Guidance standard for the surveying of aquatic macrophytes in running waters), siguiendo las recomendaciones al respecto contenidas en el proyecto STAR (Dawson, 2002). Se establece además la aplicación de una serie de modificaciones en base a la cobertura total de macrófitos presentes en los tramos muestreados.

### 4.2.1. Diseño del muestreo

#### Diseño inicial

La obtención de datos de composición y abundancia de macrófitos se lleva a cabo mediante un muestreo **estratificado**. Para lo cual, el tramo de 100m que forma parte de cada estación de muestreo, se subdivide en tres secciones relativamente homogéneas y se muestrea cada una de ellas de forma sistemática.

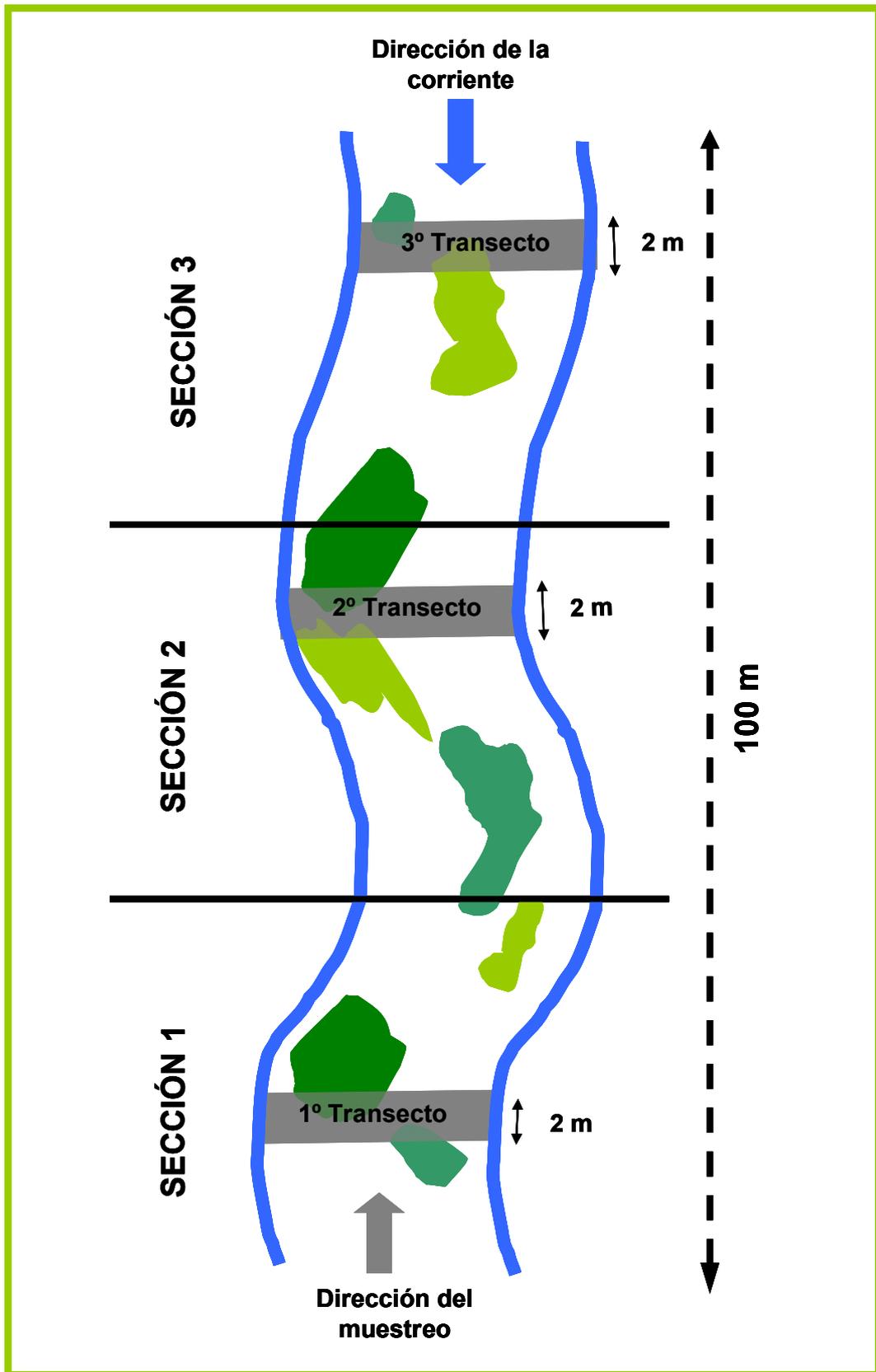
Debido al cambio de vegetación sumergida que existe en los ríos desde las orillas al centro, para la obtención de datos de macrófitos se utiliza un **muestro en transectos**. Para ello, se establecen de 1 a 3 bandas aleatorias de 2 m de anchura en cada una de las secciones (dependiendo de la cobertura total de macrófitos presentes en el tramo) y se toman datos de forma continua a lo largo de las mismas.

A fin de determinar el número final de transectos a muestrear, previamente se realizará un reconocimiento visual del tramo desde la orilla. De modo que se establece el siguiente criterio de elección:

- Macrófitos escasos: 3 bandas por sección.
- Macrófitos frecuentes: 2 bandas por sección.
- Macrófitos muy abundantes: 1 banda por sección

La finalidad de realizar el muestreo por transectos de anchura considerable así como la de incrementar el número de transectos cuando hay escasez de macrófitos, sería la de aumentar la intercepción y el área muestreada a fin de tener estimas más precisas sobre composición. Refiriendo posteriormente los datos recogidos al área real muestreada en cada tramo, considerando ésta como si fuese el 100% del mismo.

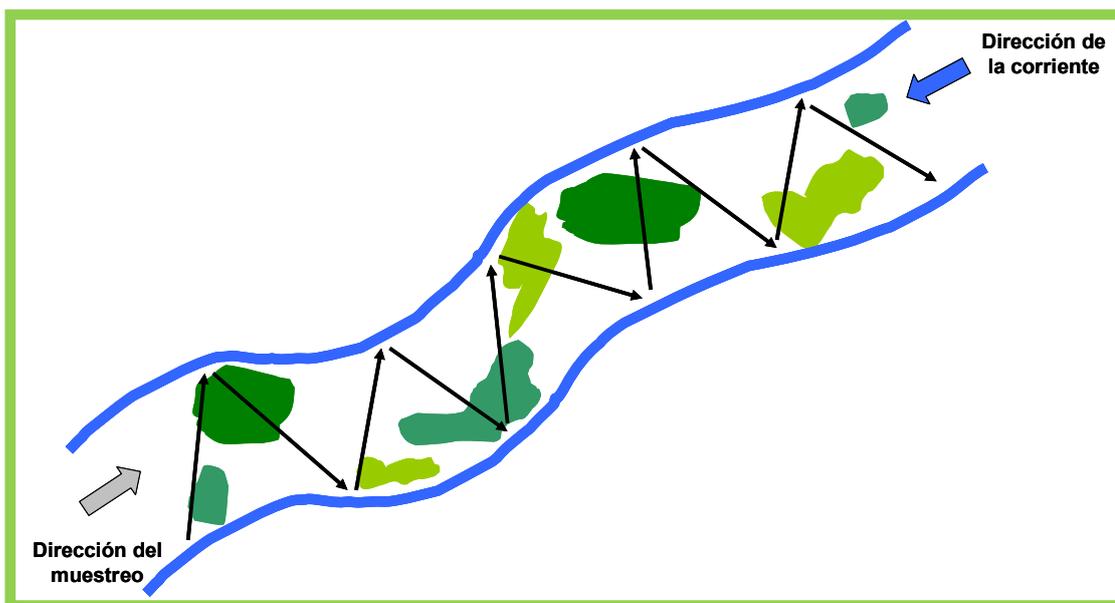
Con la finalidad de poder realizar comparativas temporales, es importante registrar la **localización** de los transectos lo más minuciosamente posible (mediante GPS, tomar nota de referencias visuales...).



### Diseños alternativos

Si bien la metodología anterior ha sido la utilizada hasta el momento, cabe destacar que existen otras posibilidades y consideraciones a tener en cuenta.

- Un método alternativo al muestreo por transectos, sería el de realizar un recorrido en zig-zag cubriendo todo el largo del tramo. A lo largo de este recorrido, del mismo modo a como se menciona en el diseño inicial, se van recogiendo datos de modo



continuo.

- Por otra parte, debemos tener en cuenta que los protocolos anteriormente mencionados están diseñados para ser llevados a cabo en ríos vadeables (el caso de la mayor parte de los ríos existentes dentro de esta demarcación hidrográfica). En los cuales, con un simple rastrillo o desde la orilla puedan recogerse u observarse los macrófitos presentes en sus zonas más profundas. En aquellos ríos en los cuales fuese necesario la utilización de una embarcación en determinadas zonas, se adoptarían las mismas directrices de observación que en los protocolos anteriores (bien a lo largo de transectos o en zig-zag), recogiendo ejemplares mediante material adecuado (ganchos atados a cuerdas, dragas...).

#### **4.2.2. Selección del tramo de estudio**

Al igual que se indicaba para la toma de muestras de invertebrados (ver capítulo 1) la obtención de muestras de macrófitos se lleva a cabo a lo largo del tramo de 100m seleccionado como parte del diseño de la red de puntos del estudio.

#### 4.2.3. Material necesario para el trabajo de campo

A continuación se expone un listado del material que se necesita para poder efectuar la toma de datos de macrófitos en el campo:

- Permisos para la recogida de muestras
- Libreta u hojas de campo (preferiblemente resistente al agua)
- Lápices
- Rotulador indeleble
- Rotuladores electrónicos portátiles para hacer etiquetas de plástico
- Botas vadeadoras
- GPS
- Guantes
- Tijeras
- Rastrillo
- Botes de plástico para el almacenamiento de las muestras
- Nevera portátil
- Cinta métrica para marcar los transectos
- Bolsas plásticas resistentes
- Frasco con líquido de Kew

Unos días antes de comenzar cada campaña de muestreo hay que asegurarse de que el material que necesitamos está en las condiciones adecuadas para su uso.

#### 4.2.4. Procedimiento de muestreo de macrófitos

- Para estudiar **la composición de macrófitos del tramo**, se recorre cada uno de los transectos seleccionados atravesando desde una orilla a la otra y tomando datos de forma continua. El reconocimiento de los diferentes transectos establecidos a lo largo del tramo se realizará en sentido aguas arriba, a fin de evitar que la turbidez provocada por los operadores interfiera en la observación de los macrófitos. Los ejemplares de macrófitos existentes en cada transecto se identifican “*in situ*” de forma visual. Debe tenerse especial cuidado en realizar un barrido minucioso de todo el ancho de los transectos a medida que se va atravesando de una orilla a la otra. En las zonas profundas y pozas donde la visibilidad sea reducida se utiliza un rastrillo para extraer una muestra de los ejemplares y poder proceder así a su identificación. Los ejemplares que no puedan identificarse en el campo se recolectan y se transportan al laboratorio para proceder a su identificación usando los manuales taxonómicos adecuados (ver apartado 4.3.3.). En este caso, a los ejemplares no identificados se les asigna un código (ver apartado 4.2.6.).

- Las estimas de abundancia de cada especie de macrófitos se hacen siguiendo un enfoque semi-cuantitativo, contrariamente a lo que sucede con la identificación de los ejemplares, que se hace de forma continua a lo largo de cada transecto. A tal fin, los ejemplares de macrófitos pertenecientes a una misma especie se agrupan en categorías que indiquen su abundancia en el tramo, utilizando para ello un sistema de estima visual basado en la siguiente escala:

ESCALA	CATEGORIA DE ABUNDANCIA	COBERTURA (%)
1	rara	Individuos aislados
2	ocasional	1-10
3	frecuente	10 - 50
4	abundante	50 - 70
5	muy abundante (dominante)	> 70

#### - Recolección de muestras

En caso de que la identificación *in situ* de los ejemplares no sea posible y sea preciso trasladar material al laboratorio para su identificación, el primer paso es la correcta recolección del mismo. Para lo cual es necesario tener en cuenta una serie de consideraciones previas.

- Previamente a la salida al campo, debemos confirmar si en el río de estudio hay especies de macrófitos Raras o En Peligro de Extinción. En cuyo caso debe aprenderse a distinguirlos, a fin de identificarlos *in situ* y así evitar el tener que recolectarlos.
- Cada muestra que se recolecte debe contener ejemplares de una única especie.
- Hay que recolectar una cantidad moderada para así evitar cualquier efecto en la capacidad de regeneración de la población.
- En la medida de lo posible recolectar plantas maduras, viables y sanas, dado la dificultad de identificar plantas muy pequeñas y/o inmaduras. En caso de encontrar una planta inmadura en el transecto, hay que fijarse en el tramo completo del río por si apareciese esa misma planta en estado maduro, que sería la que se recolectaría para su traslado al laboratorio. En todo caso se sigue anotando la presencia del ejemplar de estado inmaduro, y se recomienda hacer una anotación al margen de la hoja de campo.
- Con el fin de facilitar la identificación de las muestras de los ejemplares recolectados, es recomendable recoger, en la medida de lo posible, muestras del tallo, de las hojas, de la flor y del fruto, siendo estos últimos de suma importancia para la identificación de muchas familias de plantas vasculares.

El modo correcto de recoger la muestra varía dependiendo del grupo de plantas que se tenga que recolectar:

- a) **Plantas vasculares:** deben recogerse lo más completas que sea posible, si bien conviene tener en cuenta que arrancarlas supone la pérdida irrecuperable de los correspondientes ejemplares. Por ello, es más aconsejable cortarlas a nivel del sustrato, preservando las raíces y parte del tallo.
- b) **Algas:** se recoge una cantidad moderada de muestra
- c) **Briófitos:** se cortan a nivel de la superficie en la que estén anclados.

#### 4.2.5. Recogida de datos complementarios

Además de identificar cada uno de los ejemplares incluidos dentro de los transectos, se anota el tipo de sustrato sobre el que crece la planta y su ubicación respecto a la lámina de agua (sumergido, flotante, enraizado pero emergido, fuera del agua en el momento del muestreo, etc.). También es interesante recoger datos referentes a la profundidad, régimen lumínico, corriente, turbidez así como datos físico-químicos.

#### 4.2.6. Etiquetado y conservación de las muestras

- **Recogida.** Aunque pueden utilizarse otro tipo de recipientes para almacenar el material recogido, lo más común es guardar las muestras de algas en frascos de plástico pequeños y las de briófitos y plantas vasculares en bolsas de plástico grueso específicas. En este caso se recomienda el uso de dos bolsas por muestra, para aumentar la resistencia.

- **Etiquetado.** Para cada muestra se recomienda incluir dos etiquetas con su código de identificación. El código de identificación de la especie debe coincidir con el que se utilizado en las estimas de abundancia recogidas en la hoja de campo. Se recomienda asignar un número correlativo que identifique cada muestra recolectada y poder así relacionarla fácilmente con el resto de los datos tomados en el campo.



En caso de usar bolsas, una de las etiquetas se colocará dentro de la bolsa en la que se ha depositado el material recogido, y la otra en la bolsa exterior. En la medida de lo posible, se recomienda el uso de etiquetas impresas en tiras de plástico, ya que tienen una mayor resistencia. También se aconseja rotular los recipientes con rotuladores indelebles resistentes al alcohol.

Las etiquetas deben incluir, como mínimo, el código de la estación de muestreo y la fecha. Se aconseja que previamente al comienzo de la primera campaña de muestreo, el formato e información que van a contener las etiquetas sea estandarizado. El correcto etiquetado de las muestras es de suma importancia para

evitar posibles errores en la posterior asignación de las mismas a los tramos fluviales correspondientes.

- **Conservación.** Una vez recogidas y etiquetadas, las muestras de plantas vasculares y briófitos deben conservarse a la sombra, en un lugar seco y fresco (preferiblemente en una nevera de campo con hielo) hasta su llegada al laboratorio donde se procederá a su identificación o secado. El material en fresco nunca debe almacenarse más de dos días tras su recogida.

Dado que las algas se descomponen con facilidad, para su correcta conservación deben ser fijadas *in situ* con una pequeña cantidad de líquido de Kew. Este líquido está compuesto de alcohol etílico en un 65%, glicerina 5% y agua 30%. Dado que se fijan en el campo no se someten a ningún proceso de secado posterior.

### 4.3. Protocolo de laboratorio

---

#### 4.3.1. Material necesario para el trabajo de laboratorio

Para llevar a cabo el secado de las muestras hay que estar provistos del siguiente material:

- Papel de filtro, periódicos o cartones
- Prensa manual apta para el prensado de las plantas vasculares
- Lápices

#### 4.3.2. Procesado de las muestras

El secado de las muestras de macrófitos permite su conservación a largo plazo, y por lo tanto permite que su identificación se haga tiempo después de su recogida. Las técnicas empleadas para proceder al secado del material recogido dependen del grupo de vegetales del que se trate:

- **Plantas vasculares:** este grupo de macrófitos debe ser sometido a un secado por presión. Para lo cual, las plantas junto con su etiqueta, se colocan en el interior de pliegos de papel de filtro y distintos pliegos se van colocando unos sobre otros, introduciendo entre ellos almohadillas secantes o papeles de periódico que faciliten la extracción de la humedad. Es muy importante cuidar la correcta disposición de la muestra sobre el papel, ya que de ello dependerá su aspecto una vez seca y facilitará su identificación. Una vez hayamos formado una pila de pliegos (que no debe sobrepasar los 50 cm. de altura) y papel secante, ésta debe ser prensada. A tal efecto, se utilizan habitualmente unas prensas formadas por dos planchas de madera, entre las cuales se coloca la pila, y son apretadas por medio de correas u otros dispositivos. Se mantienen prensadas durante unos 5 días, cambiando el papel secante en caso de que sea necesario.

- **Briófitos:** se colocan sobre una capa de papel de periódico, cartón o similar y se dejan en oscuridad en un lugar seco, fresco y bien ventilado, hasta que se sequen. Para evitar la pudrición de las muestras hay que cambiar diariamente el papel secante que los sostiene. Una vez secas se introducirán en bolsas de papel debidamente etiquetadas.

#### 4.3.3. Identificación del material

A no ser que se disponga de las claves taxonómicas y medios adecuados para proceder a la identificación del material en fresco, el proceso de identificación se llevará a cabo sobre el material previamente fijado o secado. En este estado, y en caso de que sea necesario, el material estará en condiciones de ser enviado a especialistas en este grupo de vegetales.

### 4.4. Tratamiento de la información

---

El objetivo del procedimiento explicado para la obtención de datos de macrófitos es el de obtener información sobre dos parámetros, por un lado la composición de la comunidad de macrófitos y por otro su abundancia.

#### 4.4.1. Composición por especies

La composición por especies de la comunidad de macrófitos consiste en proporcionar un **inventario taxonómico** de las especies identificadas en el tramo de estudio. Además, este listado también sirve para analizar la posible incidencia de especies alóctonas.

#### 4.4.2. Abundancia

Dada la dificultad de estimar con precisión la densidad absoluta de las especies de macrófitos en la mayor parte de los ríos, la estima de estos organismos se presenta como abundancias relativas. Así, tal y como se especificó en el procedimiento de muestreo, las abundancias se dan en forma de frecuencia (%) siguiendo la **escala de categorías** indicada en el apartado 4.2.4.

#### 4.5. Referencias bibliográficas

---

CEN. 2003. Water Quality. Guidance standard for the surveying of aquatic macrophytes in running water. EN 14184. European Committee for Standardization

Dawson H. 2002. Guidance for the field assessment of macrophytes of rivers within STAR Project. NERC CEH- Dorset, UK.

European Union. 2000. Directive 2000/60/EC of the Parliament and of the Council establishing a framework for the Community action in the field of water policy. Official Journal of the European Communities L372:1-72

#### 4.6. Agradecimientos

---

A Laura González de la Universidad de León y a todo el equipo de Ecohydros, en especial a Gonzalo A. de Santocildes y Agustín Monteoliva.