



***Plan Hidrológico de la parte
española de la demarcación
hidrográfica del Duero.
2015-2021***

Anejo 8.2 Valoración del estado de las masas de agua

Apéndice VII Protocolo GUADALMED (PRECE)



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN
Y MEDIO AMBIENTE

CONFEDERACIÓN
HIDROGRÁFICA
DEL DUERO

***PLAN HIDROLÓGICO DE LA PARTE ESPAÑOLA DE LA DEMARCACIÓN
HIDROGRÁFICA DEL DUERO (2015-2021)***

Anejo 8.2 – VALORACIÓN DE ESTADO

Apéndice VII – PROTOCOLO GUADALMED (PRECE)

Valladolid, diciembre de 2015

ÍNDICE

Instrucciones de aprobación

Instrucción del Secretario de Estado de Medio Ambiente por la que se aprueban los protocolos aplicables en la explotación las redes de seguimiento del estado y potencial ecológico de las masas de agua superficiales continentales

Protocolos de muestreo y laboratorio

Organismos invertebrados bentónicos en ríos. Protocolo de muestreo y laboratorio de fauna bentónica de invertebrados en ríos vadeables. ML-Rv-I-2013

Organismos fitobentónicos en ríos. Protocolo de muestreo y laboratorio de flora acuática (organismos fitobentónicos) en ríos. ML-R-D-2013

Organismos fitoplanctónicos en lagos y embalses. Protocolo de muestreo de fitoplancton en lagos y embalses. M-LE-FP-2013

Organismos invertebrados bentónicos en lagos. Protocolo de muestreo y laboratorio de invertebrados bentónicos en lagos. ML-L-I-2013

Otro tipo de flora acuática en lagos. Protocolo de muestreo de otro tipo de flora acuática (Macrófitos) en lagos. M-L-OFM-2013

Protocolo de muestreo de fauna ictiológica en ríos. ML-R-FI-2015

Protocolo de muestreo y laboratorio de macrófitos en ríos. ML-R-M-2015

Protocolos para el cálculo de índices y métricas

IBMWP. Protocolo de cálculo del índice IBMWP. IBMWP-2013

IBCAEL. Protocolo para el cálculo del índice de invertebrados IBCAEL en lagos. IBCAEL-2013

Organismos fitoplanctónicos en lagos y embalses. Protocolo de análisis y cálculo de métricas de fitoplancton en lagos y embalses. MFIT-2013

IPS. Protocolo de cálculo del índice de poluosensibilidad específica. IPS-2013

Otro tipo de flora acuática en lagos. Protocolo de laboratorio y cálculo de métricas de otro tipo de flora acuática (Macrófitos) en lagos. OFALAM-2013

IBMR. Protocolo de cálculo del índice biológico de macrófitos en ríos de España. IBMR-2015

METI. Protocolo de cálculo del índice multimétrico específico del tipo de invertebrados bentónicos en ríos. MET-2015



INSTRUCCIÓN DEL SECRETARIO DE ESTADO DE MEDIO AMBIENTE POR LA QUE SE APRUEBAN LOS PROTOCOLOS APLICABLES EN LA EXPLOTACIÓN DE LAS REDES DE SEGUIMIENTO DEL ESTADO Y POTENCIAL ECOLÓGICO DE LAS MASAS DE AGUA SUPERFICIALES CONTINENTALES

El Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de Julio, por el que se aprueba el Texto Refundido de la Ley de Aguas (TRLA) incorpora a nuestro ordenamiento jurídico la Directiva 2000/60/CE, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. En el artículo 92bis del Título V del TRLA sobre la protección del dominio público hidráulico y de la calidad de las aguas se establecen los objetivos medioambientales derivados de la Directiva 2000/60/CE, entre los que cabe destacar la obligación de prevenir el deterioro del estado de las masas de agua superficiales; y proteger, mejorar y regenerar las mismas con el objeto de alcanzar un buen estado. El estado de las aguas superficiales viene determinado por el peor valor de su estado ecológico y de su estado químico. Para evaluar el cumplimiento de los objetivos medioambientales es necesario establecer programas de seguimiento que permitan valorar el estado de las masas de agua a través de elementos de calidad biológicos, fisicoquímicos e hidromorfológicos.

La Sección 5ª del Capítulo I, del Real Decreto 907/2007, de 6 de julio, por el que se aprueba el Reglamento de la Planificación Hidrológica, establece de forma general los elementos de calidad que deben utilizarse para la clasificar el estado ecológico de las masas de agua, que se clasifican en tres grupos: biológicos, hidromorfológicos y físico-químicos. La Orden ARM/2656/2008, de 10 de septiembre, por la que se aprueba la Instrucción de Planificación Hidrológica, define con más detalle los criterios para la clasificación del estado o potencial ecológico. En particular, en el apartado 5.1.2 se especifican los indicadores derivados para cada elemento de calidad que se utilizan para la evaluación del estado o potencial ecológico de los ríos, lagos, y masas de agua artificiales y muy modificadas.

La evaluación del estado ecológico mediante elementos de calidad requiere el empleo de índices o métricas, algunos de ellos incluidos en la Instrucción de Planificación Hidrológica. Con carácter general, los procedimientos para el cálculo de estas métricas se recogen en publicaciones de carácter científico o técnico que se actualizan periódicamente. Es decir, hasta ahora el desarrollo de estas herramientas ha estado ligado al ámbito de la investigación y de la docencia universitaria.

La Directiva Marco del Agua introduce la obligación legal de utilizar indicadores del estado en la gestión de las aguas. En consecuencia, en aras de la seguridad jurídica, es preciso disponer de procedimientos o protocolos estandarizados que adquieran el carácter de oficiales y que sean utilizados de forma rutinaria por los responsables de la gestión de las aguas en las administraciones hidráulicas.



En el ámbito europeo existe el Comité Europeo de Normalización (CEN) cuyo objetivo es, entre otros, la elaboración de normas o estándares que permiten garantizar la calidad, seguridad, interoperabilidad y comparabilidad de los productos, servicios y organizaciones existentes en los países de Europa. El Comité Técnico CEN/TC 230 tiene el cometido de elaborar normas sobre análisis de aguas, correspondiendo al Grupo de Trabajo 2 (WG 2) el desarrollo de métodos biológicos. Las Normas CEN marcan las principales pautas de trabajo, no obstante suelen ser normas de carácter general que requieren adaptación a los distintos Estados miembros. Además y por el momento no existen estándares para cada uno de los indicadores necesarios.

La ausencia de protocolos oficiales supone la permanencia de métodos dispares que pueden conducir a resultados divergentes, según sean las premisas o teorías aplicadas, dificultando el diagnóstico certero sobre el estado de las aguas con consecuencias negativas en la gestión del dominio público hidráulico y la planificación hidrológica. Esta carencia es especialmente relevante si se considera que el programa de medidas de cada demarcación hidrográfica se define con el fin de proteger o mejorar el estado de las masas de agua. Es necesario por lo tanto, disponer de procedimientos que permitan una evaluación del estado cierta y no dependiente de las herramientas o métodos aplicados.

Por ello, la Secretaría de Estado de Medio Ambiente, por medio de esta Instrucción, establece los protocolos para que todas las administraciones hidráulicas intercomunitarias clasifiquen el estado ecológico de sus masas de agua siguiendo procedimientos comunes, que abarcan desde la recogida de datos (protocolos de muestreo) hasta el procesado y cálculo de los valores de las métricas (protocolos de laboratorio y cálculo). Esto redundará en una mayor seguridad jurídica en el diagnóstico sobre el estado de las aguas y, en consecuencia, en el diseño de los programas de medidas.

A tenor de lo expuesto en los párrafos anteriores, en el ámbito competencial de esta Secretaría de Estado, conforme a las atribuciones conferidas por el Real Decreto 401/2012, de 17 de febrero, por el que se desarrolla la estructura orgánica básica del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, y en virtud del artículo 21 de la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común, tengo a bien dictar la siguiente:

INSTRUCCIÓN

1.- Aprobación de los Protocolos

Se aprueban los siguientes protocolos, cuyos textos figuran en el Anexo a la presente Instrucción:

1. Protocolo de muestreo y laboratorio de fauna bentónica de invertebrados en ríos vadeables. Código: ML-Rv-I-2013



2. Protocolo de muestreo y laboratorio de flora acuática (organismos fitobentónicos) en ríos. Código: ML-R-D-2013
3. Protocolo de muestreo de fitoplancton en lagos y embalses. Código: M-LE-FP-2013
4. Protocolo de cálculo del índice IBMWP. Código: IBMWP-2013
5. Protocolo de muestreo y laboratorio de invertebrados bentónicos en lagos. Código: ML-L-I-2013
6. Protocolo para el cálculo del índice de invertebrados IBCAEL en lagos. Código: IBCAEL-2013
7. Protocolo de análisis y cálculo de métricas de fitoplancton en lagos y embalses. Código: MFIT-2013.
8. Protocolo de cálculo del índice de poluosensibilidad específica. Código: IPS-2013.
9. Protocolo de muestreo de otro tipo de flora acuática (Macrófitos) en lagos. Código: M-L-OFM-2013.
10. Protocolo de laboratorio y cálculo de métricas de otro tipo de flora acuática (Macrófitos) en lagos. Código: OFALAM-2013.

Estos protocolos están sujetos a los cambios que se consideren necesarios en virtud del progreso científico en la materia.

2.- Difusión

Se procede a la publicación de esta Instrucción por razón de los destinatarios y de los efectos que puedan producirse, así como la difusión de su contenido en la página web de este departamento ministerial.

3.- Entrada en vigor

La presente Instrucción entrará en vigor en el día de la fecha.

Madrid, a 12 de noviembre de 2013
EL SECRETARIO DE ESTADO DE MEDIO AMBIENTE
*P.O. (Resol. 15-11-2013)
ET- D-G. Sostenibilidad de la Costa y del Mar*
Pablo Saavedra Inaraja
Federico Ramos de Armas

22 NOV 2013

PROTOCOLO DE MUESTREO Y LABORATORIO DE FAUNA BENTÓNICA DE INVERTEBRADOS EN RÍOS VADEABLES

CÓDIGO: ML-Rv-I-2013

Aprobado por instrucción del Secretario de Estado de Medio Ambiente de fecha 22 de noviembre de 2013



**GOBIERNO
DE ESPAÑA**

**MINISTERIO
DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN
Y MEDIO AMBIENTE**

Este documento pertenece a una serie de protocolos de muestreo, laboratorio y cálculo de índices y métricas para su utilización en los programas de seguimiento del estado de las masas de agua continentales (ríos, lagos y embalses) y en la clasificación del estado ecológico.

Las especificaciones de estos documentos deberán ser tenidas en cuenta por los Organismos de cuenca en la explotación de las redes oficiales de seguimiento del estado y potencial ecológico en las masas de agua superficiales continentales, bien directamente o a través de contratos de servicios. Estos protocolos están sujetos a los cambios que se consideren necesarios en virtud del progreso científico de la materia.



MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE

Edita:

© Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
Secretaría General Técnica
Centro de Publicaciones

Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado:
<http://publicacionesoficiales.boe.es/>

NIPO: 770-11-310-8



INDICE

1. APLICABILIDAD	5
2. OBJETIVO	5
3. NORMATIVA DE REFERENCIA	5
4. EQUIPOS, REACTIVOS Y CONSERVANTES	6
4.1. TRABAJO DE CAMPO.....	6
4.2. TRABAJO DE LABORATORIO	7
5. SELECCIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PUNTO DE MUESTREO.....	7
6. FRECUENCIA Y ÉPOCA DE MUESTREO	8
7. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO	8
7.1. CARACTERIZACIÓN DE LA ZONA DE MUESTREO E IDENTIFICACIÓN DE LOS TIPOS DE HÁBITAT	8
7.2. MUESTREO.....	9
8. CONSERVACIÓN, ETIQUETADO Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS	10
9. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS EN LABORATORIO	11
9.1. LAVADO Y TAMIZADO DE LAS MUESTRAS	11
9.2. IDENTIFICACIÓN Y RECUENTO DE TAXONES	11
10. PROCESADO DE LOS DATOS.....	12
ANEXO I: HOJA DE CAMPO PARA MUESTREO	13
ANEXO II: HOJA DE CAMPO PARA IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA IN SITU	17
ANEXO III: HOJA DE LABORATORIO	21



1. APLICABILIDAD

Este protocolo de muestreo y laboratorio es de obligada aplicación en la explotación de las redes oficiales de evaluación del estado / potencial ecológico en cumplimiento de la Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, que explotan las Confederaciones Hidrográficas (CCHH), bien directamente o a través de contratos de servicios.

Las estaciones en las que se utilizará este protocolo son las pertenecientes al programa de control de vigilancia, programa de control operativo, programa de control de investigación y redes de referencia.

Este protocolo corresponde al muestreo y análisis en laboratorio de fauna bentónica de invertebrados de las masas de agua de la categoría ríos, así como a las masas de agua artificiales o muy modificadas asimilables a ríos que sean vadeables, siendo aplicable para la obtención de muestras para la clasificación del estado ecológico o del potencial ecológico.

La toma de muestras de este protocolo está orientada a la obtención de datos de composición y abundancia de macroinvertebrados bentónicos, que son el grupo utilizado en la clasificación del estado ecológico. Se trata de invertebrados de un tamaño relativamente grande (visibles al ojo humano), no inferiores a 0,5 mm. Comprenden principalmente artrópodos (insectos, arácnidos y crustáceos) junto a oligoquetos, hirudíneos y moluscos y, con menor frecuencia, celentéreos, briozoos o platelmintos.

Con la información recopilada mediante este protocolo se obtienen datos válidos para el cálculo de las métricas establecidas en la Instrucción de Planificación Hidrológica (Orden 2656/2008) para el elemento de calidad correspondiente a composición y abundancia de fauna bentónica de invertebrados:

- Iberian Biological Monitoring Working Party (IBMWP-2013).
- Multimétrico específico del tipo (METI).

Asimismo se podrá aplicar este protocolo de muestreo para el cálculo de otras métricas de invertebrados bentónicos que requieran datos de composición y abundancia tales como:

- Multimétrico IMMi-L (cualitativo) y IMMi-T (cuantitativo).
- Multimétricos usados en el GIG Mediterráneo (ICM-9, ICM-Star, ICM-7).
- Iberian Average Score Per Taxon (IASPT).
- Índice de diversidad de Margalef (MARGALEF).

2. OBJETIVO

La Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, establece que los Estados miembros deberán poner en marcha programas de seguimiento. Estos programas deben permitir controlar y evaluar la composición y abundancia de la fauna bentónica de invertebrados.

La Directiva Marco del Agua establece que los métodos empleados para controlar los parámetros de cada tipo serán conformes a las normas internacionales o nacionales que garanticen el suministro de información de calidad y comparabilidad científica equivalentes.

Por lo tanto, el objetivo de este protocolo es establecer un método de muestreo de invertebrados bentónicos en ríos que garantice el cumplimiento de los requisitos mencionados anteriormente.

3. NORMATIVA DE REFERENCIA

La normativa de referencia de este protocolo es la que se enumera a continuación:



- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- RD Legislativo 1/2001 por el que se aprueba el Texto Refundido de la Ley de Aguas.
- RD 907/2007 por el que se aprueba el Reglamento de Planificación Hidrológica.
- Orden MAM/3207/2006 por la que se aprueba la ITC-MMA EECC-1/06 Instrucción técnica complementaria sobre determinaciones químicas y microbiológicas para el análisis de las aguas.
- Orden ARM/2656/2008 por la que se aprueba la Instrucción de Planificación Hidrológica.
- Orden MAM/985/2006 por la que se desarrolla el régimen jurídico de las entidades colaboradoras de la administración hidráulica en materia de control y vigilancia de calidad de las aguas y de gestión de los vertidos al dominio público hidráulico.

Este protocolo se ha redactado teniendo en cuenta las siguientes normas:

- UNE – EN 10870: 2012 – Directrices para la selección de métodos y dispositivos de muestreo de macroinvertebrados bentónicos en agua dulce.
- UNE – EN 5667-1: 2007 – Parte 1. Guía para el diseño de programas de muestreo y técnicas de muestreo.
- UNE – EN 14996: 2007 – Guía para el aseguramiento de la calidad de las evaluaciones biológicas y ecológicas en el medio ambiente acuático.
- UNE – EN 8689-1: 2000 – Parte 1. Guía para la interpretación de los datos relativos a la calidad biológica a partir de estudios de macroinvertebrados benthicos.
- UNE – EN 8689-1: 2000 – Parte 2. Guía para la presentación de los datos relativos a la calidad biológica a partir de estudios de macroinvertebrados benthicos.
- UNE – EN 16150:2012 – Orientaciones para el muestreo de macroinvertebrados bentónicos en ríos vadeables por prorrateo de las superficies de cobertura de los hábitats presentes.

4. EQUIPOS, REACTIVOS Y CONSERVANTES

4.1. TRABAJO DE CAMPO

Equipos y material para la recolección de las muestras

- Red de muestreo de macroinvertebrados de 500 μm de luz de malla, cuyo marco tenga 0,25 m de base y una altura igual o superior y mango largo.
- 2 bandejas de PVC (mínimo 30 x 20 cm).
- Pinzas entomológicas.
- Botes estancos de 1-2 L y boca ancha para el almacenado de las muestras de macroinvertebrados.
- Frasco lavador.
- Formaldehído (HCHO) 40% / Alcohol etílico ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 96%.
- Borato de sodio $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times (10 \text{H}_2\text{O})$.
- Sonda multiparamétrica con sensores de temperatura, conductividad, pH y oxígeno disuelto.
- Protocolo de muestreo.
- Hojas de campo.
- Claves de identificación de los elementos de calidad biológicos (MAGRAMA).

Equipos y material complementario

- Bolígrafo, rotulador permanente o cualquier otro método para etiquetar las muestras. Si se usan etiquetas deben ser resistentes a la humedad.
- Fundas impermeables para las fichas de campo.
- GPS.



- Cámara digital.
- Cartografía adecuada.
- Teléfono móvil.
- Tijeras.
- Cinta adhesiva y papel cebolla para rotular las muestras.
- Recipientes adecuados para el transporte de los botes de muestras y el fijador.
- Vadeador.
- Guantes de látex y de goma largos (hasta por encima del codo).

Todo el material utilizado en campo deberá estar convenientemente limpio y desinfectado para evitar el transporte y la dispersión de propágulos o individuos de especies invasoras, siguiendo los protocolos establecidos por el Organismo de cuenca competente.

4.2. TRABAJO DE LABORATORIO

Equipos para el análisis de muestras

- Tamices de 5 mm, 1 mm y 0,5 mm.
- 3 Bandejas de PVC (mínimo 30 x 20 cm).
- Elutriador o hidroseparador.
- Submuestreador (Wrona et al., 1982) opcional.
- Alcohol etílico (C_2H_5OH) al 96% y al 70%.
- Formaldehído (HCHO) 40%.
- Borato de sodio $Na_2B_4O_7 \times (10 H_2O)$.
- Pipeta 50 ml.
- Placas de Petri.
- Pinzas entomológicas.
- Viales de plástico y otros recipientes con tapones herméticos.
- Claves de identificación de los elementos de calidad biológicos (MAGRAMA).
- Hojas de laboratorio.
- Gradilla graduada.

Equipos y material complementario

- Máscara de protección respiratoria con filtros para compuestos orgánicos (si se usa formaldehído para conservar las muestras).
- Gafas de seguridad.
- Guantes de látex.
- Campana de gases o aspirador con filtros para compuestos orgánicos en la zona de lavado de las muestras.
- Rotuladores indelebles.
- Cinta adhesiva.
- Tijeras.

Tanto para el trabajo de campo como de laboratorio se deberán tomar todas aquellas medidas necesarias para garantizar que los trabajos se desarrollan en unas condiciones adecuadas de seguridad e higiene.

5. SELECCIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PUNTO DE MUESTREO

El punto de muestreo será un tramo seleccionado de 100 m representativo de las características de la masa de agua.



El tramo seleccionado presentará los tipos de hábitat más frecuentes en la masa de agua, de modo que sea representativo de la variabilidad natural de elementos físicos y estructurales (por ejemplo la secuencia rápido-poza, etc.). Se tendrán en cuenta los siguientes aspectos:

- El tramo de muestreo reflejará la secuencia de rápidos-lentos dominante.
- La morfología fluvial y composición del hábitat serán las características del tramo a evaluar, por ejemplo se evitarán zonas canalizadas si el resto del tramo no lo está.
- La cobertura de la vegetación (densidad, sombra) será la característica del tramo; así se evitará muestrear una zona de sombra, si esto no es habitual en el tramo.
- Se evitarán las zonas inmediatas a puentes, vados o azudes, a menos que sean característicos del tramo. Si es posible se muestreará aguas arriba del punto de acceso.
- Se muestrearán puntos de muestreo accesibles. El muestreo se realizará en las zonas vadeables, tomando las precauciones necesarias y evitando riesgos.

El tramo seleccionado se delimitará mediante la anotación de las coordenadas UTM (medidas con GPS) del punto de inicio.

6. FRECUENCIA Y ÉPOCA DE MUESTREO

Los muestreos serán anuales y se realizarán en primavera, momento en que las comunidades de macroinvertebrados suelen alcanzar su máxima diversidad. Excepcionalmente, el muestreo podrá aplazarse hasta principios de verano para encontrar una situación más favorable en aquellos casos en que las condiciones meteorológicas o hidrológicas así lo requieran (principalmente, en zonas de montaña de elevada pluviosidad o influencia nival).

En caso de avenida reciente se esperará por lo menos 15 días para la toma de muestras. En los ríos temporales es muy importante adecuar el momento del muestreo a unas condiciones hidrológicas adecuadas que garanticen la existencia de un flujo de agua continuado.

7. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO

A continuación se describe el procedimiento de muestreo y caracterización de hábitats.

7.1. CARACTERIZACIÓN DE LA ZONA DE MUESTREO E IDENTIFICACIÓN DE LOS TIPOS DE HÁBITAT

Se recorrerá el punto de muestreo y se realizarán observaciones de la presencia de los hábitats fluviales, así como de las características de las riberas. Este recorrido se realizará por la orilla siempre que sea accesible para evitar el pisoteo del tramo antes del muestreo.

Se llevará a cabo un reportaje fotográfico y se rellenará la hoja de campo incluida en el anexo I de este protocolo.

Identificación de los tipos de hábitat: La identificación de los tipos de hábitat presentes en el tramo se realizará teniendo en cuenta los siguientes cinco grupos:

- Sustratos duros (→): rocas, piedras y gravas predominantes en zonas de rápidos, característicos de la mayor parte de los cauces de montaña y piedemonte. Dominante en la mayoría de los cursos altos y menos habituales en los cursos bajos.
- Detritos vegetales (hojarasca, troncos de diferente calibre) (⊗): los detritos y otros restos vegetales que han permanecido sumergidos durante un tiempo relativamente largo (no recién caídos) proporcionan una excelente colonización.
- Orillas vegetadas (±): bancos sumergidos, con raíces y plantas emergentes asociadas a ellos.



- Macrófitos sumergidos (*): son estacionales y pueden no estar presentes en todos los cauces, particularmente en los de tramo alto.
- Arena y otros sedimentos finos (♁): generalmente en zonas de baja corriente y asociados a las orillas, aunque puede ser el predominante en algunos cauces.

Una vez identificados los tipos de hábitat y el área ocupada por cada uno de ellos, se procederá a repartir las unidades de muestreo (kicks) que se van a realizar entre los distintos hábitats presentes en el tramo. Como regla general se realizarán veinte unidades de muestreo.

La distribución de las unidades de muestreo en los 5 tipos de hábitats se realizará de forma proporcional al área ocupada por cada uno en la estación de muestreo, de manera que a cada unidad de muestreo le corresponda el 5% de la superficie de cobertura de un hábitat.

Los hábitat con representación superior al 5% son dominantes y los inferiores al 5% son minoritarios. En el caso de hábitats minoritarios el ajuste se realizará mediante la combinación de fracciones de unidades de muestreo (p.e. 0,5 para un hábitat representado por una cobertura entre 2-3%).

De forma complementaria, la distribución de las unidades de muestreo tendrá en cuenta otros factores que puedan influir en la heterogeneidad de hábitat tales como la velocidad del agua y la profundidad.

En cada unidad de muestreo se lleva a cabo la remoción del sustrato situado en el medio metro delante de la boca de la red, la cual tiene una base de 0,25 m. El área final muestreada resultante de las veinte unidades de muestreo será aproximadamente de 2,5 m².

7.2. MUESTREO

Se muestrea remontando el río (de aguas abajo hacia aguas arriba) y teniendo en cuenta el número de unidades de muestreo y la distribución en los tipos de hábitats, previamente definidos.

Antes de iniciar el muestreo es necesario identificar los macroinvertebrados que viven en la superficie del agua, o aquellos que, aun viviendo sumergidos, son difíciles de capturar.

Cada tipo de hábitat se muestrea de manera diferente, tal y como se detalla a continuación:

- **Sustratos duros**: se muestrean gravas, cantos y bloques manteniendo el borde inferior de la red contra el suelo y desalojando los organismos, removiendo con pies o manos en zonas someras, una longitud de 0,5 m de sustrato aguas arriba de la red.
- **Detritos vegetales (hojarasca, troncos de diferente calibre)**: se muestrean removiendo con pies o manos los depósitos de detritos, manteniendo la red aguas abajo (con corriente) o pasando la red sobre ellos (en aguas lentas) para recolectar los organismos en suspensión. También se muestrea en este hábitat la madera acumulada en pozas, evitando trozos grandes porque generalmente son difíciles de muestrear adecuadamente.
- **Orillas vegetadas**: orillas fluviales con raíces y plantas emergentes asociadas a ellas. Se agitan las raíces con pies o manos en 0,5 m y se recogen los organismos en suspensión o arrastrados por la corriente, con la red situada aguas abajo.
- **Macrófitos sumergidos**: se muestrean arrastrando la red a través de la vegetación desde el lecho (donde enraíza) hasta la superficie del agua (máximo de 0,5 m). En aguas someras, el muestreo se realiza agitando con pies o manos las plantas a lo largo de 0,5 m, y recogiendo los organismos en suspensión o arrastrados por la corriente con la red. Evitar la resuspensión del sedimento.
- **Arena y otros sedimentos finos**: inicialmente se pasa la red por la superficie del agua para coger los macroinvertebrados de la superficie del agua. Se muestrean las zonas de deposición de sedimentos no vegetados, que se agitarán con pies o manos para incluir el material en suspensión en la red, a lo largo de 0,5 m. Se evitará arrastrar la red a través de los sedimentos blandos para reducir la cantidad de restos en las muestras.



Hay que tener en cuenta que en las aguas con corriente la velocidad del agua arrastrará los macroinvertebrados resuspendidos hacia el interior de la red, pero en el caso de las aguas con poca corriente habrá que mover la red manualmente a lo largo de los 0,5 m de recorrido para captar los macroinvertebrados.

A medida que se completan las unidades de muestreo, hay que ir vaciando la red en una o varias bandejas para evitar la pérdida de organismos al tomar nuevas redadas. Hay que vaciar la red previamente al nuevo muestreo, especialmente en tramos con poca corriente y algo profundos.

Se observa la muestra y se retiran con cuidado piedras y trozos grandes de detritos, evitando en todo momento la pérdida de invertebrados de la muestra.

Registro de los datos de muestreo

Los datos del muestreo deberán anotarse en la hoja de campo del anexo I. Se recogerá información sobre:

- Hábitats presentes y distribución de las unidades de muestreo: sustratos duros, detritos vegetales, orillas vegetadas, macrófitos sumergidos y arena y otros sedimentos finos. Se especificará si se trata de aguas con mucha o con poca corriente, el porcentaje de ocupación y el número de unidades de muestreo realizados (teniendo en cuenta que pueden incluir hábitats mixtos).
- Identificación en campo de los taxones capturados (visu) para lo que será necesario utilizar la hoja de campo del anexo II.
- Invertebrados observados en superficie o sumergidos, cuando no se hayan capturado para lo que será necesario utilizar la hoja de campo del anexo II.
- Número de botes y código de la muestra.
- Si existen desajustes entre los esfuerzos previstos y los que se han podido muestrear (hábitats no vadeables, subdivisión de hábitats, etc.) se deberán reflejar en la hoja de campo.

8. CONSERVACIÓN, ETIQUETADO Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

Una vez terminado el muestreo se introduce la muestra en botes con cierre hermético y boca ancha. Como conservante se puede usar:

- Alcohol etílico al 96% que se añadirá sobre el filtrado de la muestra una vez se haya retirado el exceso de agua hasta obtener una concentración de 70% v/v.
- Formaldehído al 40% que se añadirá sobre la muestra con agua hasta obtener una concentración en la muestra del 4% v/v. Se recomienda añadir primero sólo unas gotas para anestésicar a los invertebrados y evitar que adopten posturas rígidas que puedan dificultar su identificación y después de unos minutos añadir el resto del reactivo. El formaldehído es tóxico y su uso requiere la aplicación de medidas de seguridad. En el campo se trabajará al aire libre, con guantes de látex, se evitarán derrames y se usarán recipientes herméticos adecuados. Se recomienda añadir borato de sodio al formaldehído para evitar que se destruyan las partes calcáreas de los organismos.

Los botes se marcan con dos etiquetas, una de papel cebolla escrita a lápiz en el interior y otra en el exterior escrita con tinta indeleble. Ambas etiquetas, al menos, deberán mostrar: el código de la campaña de muestreo, el código de la muestra, la fecha y, en el caso de haber utilizado más de un bote para guardar las muestras, esta información también deberá quedar registrada.

En el transporte de las muestras del campo al laboratorio se tomarán las medidas necesarias para evitar la rotura de los botes de muestra o la liberación de vapores. Se recomienda usar botes herméticos y almacenarlos en neveras o cajas con tapa en lugar fresco evitando la exposición prolongada al sol.



9. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS EN LABORATORIO

Es recomendable que el tiempo entre la toma y el análisis de las muestras no sea excesivo para evitar la degradación de los macroinvertebrados. Como norma general el período entre la toma y el análisis de la muestra no superará nunca un año.

En caso de emplear alcohol etílico al 96%, dicho período deberá ser aún más corto sobre todo si la muestra presenta un gran contenido en materia orgánica.

El procesado de las muestras se realizará siguiendo los pasos siguientes:

9.1. LAVADO Y TAMIZADO DE LAS MUESTRAS

Con las medidas de protección necesarias, se procede a abrir el recipiente y a verter la muestra sobre la torre de tamices (de 5 mm, 1 mm y 0,5 mm) dejando abajo el de menor luz; el agua con formaldehído se recoge para su tratamiento posterior como residuo tóxico. Luego, bajo el grifo, se lava la muestra con agua abundante, separando los organismos de los restos de detritos, piedras y arena que hayan quedado, y hasta que desaparezca el olor a formaldehído, y la muestra se haya separado en las respectivas fracciones en los tamices.

Se vierte el contenido de cada tamiz en las respectivas bandejas de fracción gruesa (> 5 mm), media (entre 5 y > 1 mm) y fina (entre 1 y 0,5 mm). Para ello, se lava el contenido hacia un lado del tamiz antes de depositarlo en la bandeja y después se lava, dándole la vuelta. Se prepara la hoja de laboratorio, identificando la muestra según el etiquetado.

9.2. IDENTIFICACIÓN Y RECuento DE TAXONES

- Fracción gruesa: Se extraen, identifican y cuentan todos los individuos existentes en la fracción gruesa. El material extraído se guarda en un vial con alcohol etílico al 70%, con la referencia del punto de muestreo, fecha e indicando fracción G. En algunos casos (sólo cuando hay abundancia de algas o macrófitos) se puede realizar un submuestreo de la fracción gruesa (una vez lavada en los tamices). Esta se homogeniza en una bandeja y se subdivide en 2 ó 4 fracciones, de las cuales se inspecciona 1 ó 2, asegurando una cuenta mínima de 100 individuos, e inspeccionando posteriormente las otras fracciones de visu para ver si hay taxones no contabilizados en la submuestra analizada. En este caso se indicará G.x siendo 1/x la porción analizada de la fracción gruesa.
- Fracción media: Si la fracción tiene muchas arenas o gravas se separa primero el material inorgánico (arenas o gravas) del orgánico mediante una elutriación. Posteriormente se realiza el submuestreo de la fracción media; para ello se homogeniza y divide la muestra en partes iguales. Se extrae después una porción de la muestra (ej. 1/8), asegurándose que los taxones en la fracción tengan la misma proporción que en la totalidad de la muestra y que contenga al menos 100 invertebrados (siguiendo a Wrona et al., 1982). En el caso de que el número no llegue a 100, hay que coger una segunda o posteriores submuestras enteras, hasta que se alcance, al menos, el número de 100. Se cuantifica la abundancia de cada taxón. Posteriormente el resto de la muestra se deposita en una bandeja grande y se extraen los taxones nuevos para completar el listado taxonómico. La fracción analizada se conserva en alcohol etílico etiquetada M-a, siendo 1/a la porción analizada del total de la fracción media¹.
- Fracción fina: Es la fracción más homogénea. Para realizar el submuestreo hay que separar primero el material inorgánico (arenillas) del orgánico mediante una elutriación. Posteriormente habrá que revisar los sustratos inorgánicos por si queda algún invertebrado (cogiendo pequeñas porciones con una pipeta Pasteur y colocándolas en una placa Petri para examinarlas con la lupa). Luego se procede a la homogeneización de la parte que contiene los macroinvertebrados llevándolos a un litro de agua, utilizando el submuestreador descrito

¹ Si la fracción analizada representa 1/8 del total de la muestra, a=8



por Wrona et al. (1982) u otro método comparable. Una vez homogeneizada la muestra, se extraen 2 ó 3 subunidades de 50 ml (cada una representa el 1/20 del total) mediante una pipeta de 50 ml, y depositándolas en placas Petri. Deberá submuestrearse un número de subunidades con las que se obtenga una cantidad de individuos igual o superior a 100, para que la submuestra sea representativa de la muestra (Wrona et al., 1982).

- Un método alternativo de procesado de la fracción fina consiste en realizar la elutriación y comprobación de los sustratos inorgánicos tal como se ha descrito, y proceder al filtrado del material orgánico puesto en suspensión a través de un tamiz de 0,5 mm de luz de malla. Es conveniente tener tamices de diferente diámetro para usar el que mejor vaya según la cantidad de filtrado. Se asegura la homogeneización del filtrado en el tamiz colocando éste sobre una bandeja (con una gradilla dibujada en el fondo) con poca agua y realizando movimientos circulares para homogeneizar la muestra. Posteriormente se extrae una fracción que contenga al menos 100 individuos. Para ello hay que usar una herramienta para fraccionar la muestra y extraer la submuestra con la ayuda de una espátula y pinzas, lavando el filtro y paredes del tamiz convenientemente.
- A continuación es necesario contar e identificar los invertebrados de las subunidades analizadas (método de Wrona) o de la fracción observada (método alternativo). En ambos casos hay que anotar los recuentos de cada taxón en la hoja de laboratorio y señalar la fracción que la submuestra representa del total de la muestra.
- Los invertebrados de la fracción fina se guardan en un vial con alcohol al 70%, etiquetado F.b, siendo 1/b la porción analizada del total de la fracción fina².

La identificación de los taxones se realizará mediante la observación de características morfológicas, utilizando una lupa binocular y siguiendo guías apropiadas de identificación al nivel requerido. Como referencia principal se utilizará la Clave para la identificación de elementos de calidad biológicos elaborada por la Dirección General del Agua (ID-TAX)

Una vez realizado el tratamiento de la muestra en laboratorio se rellenarán los resultados en la hoja de laboratorio incluida en el anexo III de este protocolo.

10. PROCESADO DE LOS DATOS

Los resultados del muestreo y el análisis en laboratorio consistirán en:

- Inventario de taxones obtenidos y su abundancia total expresada en número de individuos de cada taxón. Las abundancias obtenidas de muestras analizadas según fracciones se calcularán como la suma de los individuos de las tres fracciones multiplicadas por sus dividendos ($G + M.a + F.b$; o bien $G.x + M.a + F.b$).
- Inventario de taxones (presencia / ausencia) identificados en campo (visu).
- Inventario de taxones identificados y su abundancia en cada una las fracciones analizadas: gruesa, media y fina.
- Hojas de campo y hoja de laboratorio completadas.

² Si la fracción analizada representa 1/20 del total de la muestra, $b=20$

ANEXO I: HOJA DE CAMPO PARA MUESTREO



MINISTERIO
DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN
Y MEDIO AMBIENTE

TOMA DE DATOS MUESTREO: INVERTEBRADOS BENTÓNICOS EN
RÍOS VADEABLES

DATOS IDENTIFICATIVOS DEL MUESTREO

TIPO DE LA MASA DE AGUA: _____ CÓDIGO DE LA MASA DE AGUA: _____

NOMBRE DE LA MASA DE AGUA: _____

CÓDIGO DEL PUNTO DE MUESTREO: _____ COORDENADAS X/Y (ETRS 89): _____ HUSO: _____

ORGANISMO/EMPRESA: _____

MUESTREADOR:		Programa:	Vigilancia:
CODIGO MUESTRA:	Nº DE BOTES:		Operativo:
FECHA: ____ / ____ / ____	Hora inicio: ____ : ____		Investigación:
	Hora fin: ____ : ____		Referencia:

CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA: Alcohol etílico Formaldehído

Descripción de acceso y localización del tramo: _____

CARACTERÍSTICAS FISCOQUÍMICAS

pH (unidades):	Oxígeno disuelto (mg O ₂ /l):
Temperatura del agua (°C):	% Saturación O ₂ :
Conductividad eléctrica a 20°C (µS/cm):	

Observaciones: _____

CARACTERÍSTICAS HIDROMORFOLÓGICAS

Anchura media (m) del tramo: _____ Profundidad media (m) del tramo: _____ Longitud (m) del tramo: _____

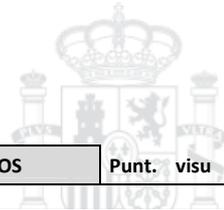
HÁBITATS	% COBERTURA	NÚMERO DE UNIDADES DE MUESTREO	CÓDIGO FOTO
Sustratos duros (→)			
Detritos vegetales (⊗)			
Orillas vegetadas (r)			
Macrófitos sumergidos (*)			
Arenas y otros sedimentos (c)			

VELOCIDAD PREDOMINANTE DEL AGUA (marcar con X)

Nula: Ausencia de flujo			
Reducida: Flujo laminar sin ondulaciones			
Moderada: Ondulación superficial pequeña simétrica			
Rápida: Ondulación superficial quebrada			
Muy rápida: Rápidos, formación de espuma			

Comentarios sobre el hábitat: _____

**ANEXO II: HOJA DE CAMPO PARA IDENTIFICACIÓN
TAXONÓMICA IN SITU**



CÓDIGO	ARÁCNIDOS	Punt.	visu	CÓDIGO	EFEMERÓPTEROS	Punt.	visu	CÓDIGO	ODONATOS	Punt.	visu
ACA001SPOR	Acariformes ¹	4		BAE001FAMI	Baetidae	4		AES001FAMI	Aeshnidae	8	
				CAE001FAMI	Caenidae	4		CAL004FAMI	Calopterygidae	8	
				EPH002FAMI	Ephemereillidae	7		COE001FAMI	Coenagrionidae	6	
CHR009FAMI	Chrysomelidae	4		EPH001FAMI	Ephemeridae	10		COR012FAMI	Cordulegasteridae	8	
CUR001FAMI	Curculionidae	4		HEP001FAMI	Heptageniidae	10		COR008FAMI	Corduliidae	8	
DRY001FAMI	Dryopidae	5		LEP003FAMI	Leptophlebiidae	10		GOM003FAMI	Gomphidae	8	
DYT001FAMI	Dytiscidae	3		OLI002FAMI	Oligoneuriidae	5		LES001FAMI	Lestidae	8	
ELM001FAMI	Elmidae	5		POL020FAMI	Polymitarciidae	5		LIB001FAMI	Libellulidae	8	
GYR001FAMI	Gyrinidae	3		POT003FAMI	Potamanthidae	10		PLA004FAMI	Platycnemididae	6	
HAL002FAMI	Haliplidae	4		PRO010FAMI	Prosopistomatidae	7					
HEL002FAMI	Helophoridae	5		SIP001FAMI	Siphonuridae	10		CÓDIGO	OLIGOQUETOS	Punt.	visu
HYD008FAMI	Hydraenidae	5							Todos	1	
HYD013FAMI	Hydrochidae	5		CÓDIGO	HETERÓPTEROS	Punt.	visu				
HYD011FAMI	Hydrophilidae	3		APH001FAMI	Aphelocheiridae	10		CÓDIGO	PLECÓPTEROS	Punt.	visu
HYG001FAMI	Hygrobiidae	3		COR004FAMI	Corixidae	3		CAP003FAMI	Capniidae	10	
NOT004FAMI	Noteridae	3		GER002FAMI	Gerridae	3		CHL004FAMI	Chloroperlidae	10	
PSE004FAMI	Psephenidae	3		HYD014FAMI	Hydrometridae	3		LEU004FAMI	Leuctridae	10	
SCI001FAMI	Scirtidae (=Helodidae)	3		MES001FAMI	Mesoveliidae	3		NEM001FAMI	Nemouridae	7	
				NAU001FAMI	Naucoridae	3		PER004FAMI	Perlidae	10	
				NEP002FAMI	Nepidae	3		PER006FAMI	Perlodidae	10	
CÓDIGO	CRUSTÁCEOS	Punt.	visu	NOT003FAMI	Notonectidae	3		TAE001FAMI	Taeniopterygidae	10	
ASE001FAMI	Asellidae	3		PLE004FAMI	Pleidae	3					
AST003FAMI	Astacidae	8		VEL001FAMI	Veliidae	3		CÓDIGO	TRICÓPTEROS	Punt.	visu
ATY001FAMI	Atyidae	6						BER001FAMI	Beraeidae	10	
COR003FAMI	Corophiidae	6		CÓDIGO	HIRUDÍNEOS	Punt.	visu	BRA006FAMI	Brachycentridae	10	
GAM001FAMI	Gammaridae	6		ERP001FAMI	Erpobdellidae	3		CAL002FAMI	Calamoceratidae	10	
OST001CLAS	Ostracoda	3		GLO005FAMI	Glossiphoniidae	3		ECN001FAMI	Ecnomidae	7	
PAL004FAMI	Palaemonidae	6		HIR002FAMI	Hirudidae (=Hirudinidae)	3		GLO004FAMI	Glossosomatidae	8	
				HIR002FAMI	Hirudidae (=Hirudinidae)	3		GOE001FAMI	Goeridae	10	
				PIS003FAMI	Piscicolidae	4		HYD006FAMI	Hydropsychidae	5	
CÓDIGO	DÍPTEROS	Punt.	visu	CÓDIGO	NEURÓPTEROS	Punt.	visu	HYD012FAMI	Hydroptilidae	6	
ANT004FAMI	Anthomyiidae ²	4		SIA001FAMI	Sialidae	4		LEP008FAMI	Lepidostomatidae	10	
ATH001FAMI	Athericidae	10						LEP004FAMI	Leptoceridae	10	
BLE001FAMI	Blephariceridae	10		CÓDIGO	LEPIDÓPTEROS	Punt.	visu	LIM002FAMI	Limnephilidae	7	
CER006FAMI	Ceratopogonidae	4		PYR004FAMI	Crambidae (=Pyalidae)	4		MOL001FAMI	Molannidae	10	
CHI001FAMI	Chironomidae	2						ODO001FAMI	Odontoceridae	10	
CUL001FAMI	Culicidae	2		CÓDIGO	MOLUSCOS	Punt.	visu	PHI001FAMI	Philopotamidae	8	
DIX001FAMI	Dixidae	4		ANC001FAMI	Ancylidae	6		PHR002FAMI	Phryganeidae	10	
DOL001FAMI	Dolichopodidae	4		BIT001FAMI	Bithyniidae	3		POL003FAMI	Polycentropodidae	7	
EMP001FAMI	Empididae	4		FER002GENE	Ferrissia ³	6		PSY002FAMI	Psychomyiidae	8	
EPH003FAMI	Ephydriidae	2		HYD005FAMI	Hydrobiidae	3		RHY001FAMI	Rhyacophilidae	7	
LIM005FAMI	Limoniidae	4		LYM001FAMI	Lymnaeidae	3		SER001FAMI	Sericostomatidae	10	
PSY001FAMI	Psychodidae	4		NER001FAMI	Neritidae	6		UEN001FAMI	Uenoidae (=Thremmatidae)	10	
PTY001FAMI	Ptychopteridae	4		PHY003FAMI	Physidae	3					
RHA004FAMI	Rhagionidae	4		PLA003FAMI	Planorbidae ⁴	3		CÓDIGO	TURBELARIOS	Punt.	visu
SCA002FAMI	Scatophagidae ²	4		SPH006FAMI	Sphaeriidae	3		DEN001FAMI	Dendrocoelidae	5	
SCI002FAMI	Sciomyzidae	4		THI001FAMI	Thiaridae	6		DUG001FAMI	Dugesiidae	5	
SIM002FAMI	Simuliidae	5		UNI001FAMI	Unionidae	6		PLA005FAMI	Planariidae	5	
STR003FAMI	Stratiomyidae	4		VAL001FAMI	Valvatidae	3					
SYR002FAMI	Syrphidae	1		VIV001FAMI	Viviparidae	6					
TAB002FAMI	Tabanidae	4									
THA003FAMI	Thaumaleidae	2									
TIP001FAMI	Tipulidae	5									

¹ El superorden Hidracarina ha pasado a ser el superorden Acariformes

² Anthomyiidae y Scatophagidae se agrupaban antes como Muscidae

³ La Familia Ferrissidae ha pasado a ser el Género Ferrissia

⁴ Todos los géneros excepto Ferrissia

ANEXO III: HOJA DE LABORATORIO

PROTOCOLO DE MUESTREO Y LABORATORIO DE FLORA ACUÁTICA (ORGANISMOS FITOBENTÓNICOS) EN RÍOS

CÓDIGO: ML-R-D-2013

Aprobado por instrucción del Secretario de Estado de Medio Ambiente de fecha 22 de noviembre de 2013



Este documento pertenece a una serie de protocolos de muestreo, laboratorio y cálculo de índices y métricas para su utilización en los programas de seguimiento del estado de las masas de agua continentales (ríos, lagos y embalses) y en la clasificación del estado ecológico.

Las especificaciones de estos documentos deberán ser tenidas en cuenta por los Organismos de cuenca en la explotación de las redes oficiales de seguimiento del estado y potencial ecológico en las masas de agua superficiales continentales, bien directamente o a través de contratos de servicios. Estos protocolos están sujetos a los cambios que se consideren necesarios en virtud del progreso científico de la materia.



MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE

Edita:

© Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
Secretaría General Técnica
Centro de Publicaciones

Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado:

<http://publicacionesoficiales.boe.es/>

NIPO: 770-11-311-3



INDICE

1. APLICABILIDAD	5
2. OBJETIVO	5
3. NORMATIVA DE REFERENCIA	5
4. EQUIPOS, REACTIVOS Y CONSERVANTES	6
5. SELECCIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PUNTO DE MUESTREO.....	7
5.1. SELECCIÓN DEL SUSTRATO	7
5.2. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE MUESTRAS POR PUNTO DE MUESTREO	7
6. FRECUENCIA Y ÉPOCA DE MUESTREO	7
7. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO.....	8
7.1. SUPERFICIES DURAS NATURALES MÓVILES.....	8
7.2. SUPERFICIES VERTICALES DE INFRAESTRUCTURAS ARTIFICIALES	9
7.3. VEGETACIÓN ACUÁTICA	9
7.4. SUSTRATOS ARTIFICIALES.....	10
8. CONSERVACIÓN, ETIQUETADO Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS.....	10
9. PRE-TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y ANÁLISIS EN LABORATORIO	10
ANEXO I: HOJA DE CAMPO PARA EL MUESTREO	13
ANEXO II: HOJA DE LABORATORIO	17



1. APLICABILIDAD

Este protocolo de muestreo es de obligada aplicación en la explotación de las redes oficiales de evaluación del estado / potencial ecológico en cumplimiento de la Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, que explotan las Confederaciones Hidrográficas (CCHH), bien directamente o a través de contratos de servicios.

Las estaciones en las que se utilizará este protocolo son las pertenecientes al programa de control de vigilancia, programa de control operativo, programa de control de investigación y redes de referencia.

Este protocolo corresponde al muestreo de organismos fitobentónicos de las masas de agua de la categoría ríos, así como a las masas de agua artificiales o muy modificadas asimilables a ríos, siendo aplicable para la obtención de muestras para la determinación y el cálculo de indicadores de evaluación del estado ecológico o del potencial ecológico.

La toma de muestras de este protocolo está orientada a la obtención de datos de composición y abundancia de diatomeas que son los organismos fitobentónicos utilizados para la clasificación del elemento de calidad flora acuática en ríos. Se trata de microalgas bentónicas que colonizan diferentes sustratos (piedras, vegetación, etc.) y forman parte del perifiton.

Con la información recopilada mediante este protocolo se obtienen datos válidos para el cálculo de las métricas establecidas en la Instrucción de Planificación Hidrológica (Orden 2656/2008) para el elemento de calidad flora acuática (organismos fitobentónicos).

- Índice de Polusensibilidad específica (IPS-2013.)
- Multimétrico de diatomeas (MDIAT).

Así mismo se podrá aplicar este protocolo de muestreo para el cálculo de otras métricas correspondientes al elemento de calidad flora acuática (organismos fitobentónicos) que no se encuentren en la citada Instrucción.

2. OBJETIVO

La Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, establece que los Estados miembros deberán poner en marcha programas de seguimiento. Estos programas de seguimiento deben permitir controlar y evaluar la composición y abundancia de los organismos fitobentónicos.

La Directiva Marco del Agua establece que los métodos empleados para controlar los parámetros de cada tipo serán conformes a las normas internacionales o nacionales que garanticen el suministro de información de calidad y comparabilidad científica equivalentes.

Por lo tanto, el objetivo de este protocolo es establecer un método de muestreo de fitobentos en ríos, en concreto de diatomeas bentónicas, epilíticas y epifíticas, que garantice el cumplimiento de los requisitos mencionados anteriormente.

3. NORMATIVA DE REFERENCIA

La normativa de referencia de este protocolo es la que se enumera a continuación:

- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas
- RD Legislativo 1/2001 por el que se aprueba el Texto Refundido de la Ley de Aguas.
- RD 907/2007 por el que se aprueba el Reglamento de Planificación Hidrológica.
- Orden MAM/3207/2006 por el que se aprueba la ITC-MMA EECC-1/06 Instrucción técnica complementaria sobre determinaciones químicas y microbiológicas para el análisis de las aguas.



- Orden ARM/2656/2008 por la que se aprueba la Instrucción de Planificación Hidrológica.
- Orden MAM/985/2006 por la que se desarrolla el régimen jurídico de las entidades colaboradoras de la administración hidráulica en materia de control y vigilancia de calidad de las aguas y de gestión de los vertidos al dominio público hidráulico.

Este protocolo se ha redactado teniendo en cuenta las siguientes normas:

- UNE - EN 14996: 2007. Guía para el aseguramiento de la calidad de las evaluaciones biológicas y ecológicas en el medio ambiente acuático.
- UNE - EN 5667-1: 2006. Guía para el diseño de programas de muestreo y técnicas de muestreo.
- UNE - EN 13946: 2004. Guía para el muestreo en rutina y el pretratamiento de diatomeas bentónicas en ríos.
- UNE - EN 14407: 2005. Guía para la identificación, recuento e interpretación de muestras de diatomeas bentónicas de ríos.

4. EQUIPOS, REACTIVOS Y CONSERVANTES

Equipos y material para la recolección de las muestras

- Cepillo de dientes duro o instrumento similar, o bien cuchillo o navaja adecuada.
- Rastrillo con mango telescópico con una red fina adherida en los casos en que haya que muestrear superficies duras verticales.
- Caja o cubo con el fondo de vidrio (Aquascope) para encontrar, en algunas circunstancias, los sustratos idóneos.
- Botes o viales de plástico con tapón hermético.
- Sonda multiparamétrica con sensores de temperatura, conductividad, pH y oxígeno disuelto.
- Solución tamponada de formaldehído (HCHO) al 4% v/v: Diluir una solución stock de formaldehído al 4% en una solución tamponada de pH 7. La solución tampón se requiere para prevenir la disolución de los frústulos. Entre los tampones más indicados se encuentra HEPES (N-2- hidroximetilpiperazina-n-2'-ácido sulfónico), borato y hexametileno-tetramina. Se recomienda una solución final entre el 1% y el 4% v/v en función de la cantidad de materia orgánica presente en la muestra.
- Alcohol etílico 70% (C₂H₅OH): Puede utilizarse de forma alternativa.
- Protocolo de muestreo.
- Hoja de campo.

Equipos y material complementario

- Vadeador.
- Guantes de látex y de goma largos (hasta por encima del codo).
- Bolígrafo o rotulador permanente o cualquier otro método para etiquetar las muestras.
- Etiquetas resistentes a la humedad.
- GPS.
- Cámara digital.
- Teléfono móvil.

Todo el material usado en campo deberá estar convenientemente limpio y desinfectado para evitar el transporte y la dispersión de propágulos o individuos de especies invasoras, siguiendo los protocolos establecidos por el Organismo de cuenca competente.

Tanto para el trabajo de campo como de laboratorio se deberán tomar todas aquellas medidas necesarias para garantizar que los trabajos se desarrollan en unas condiciones adecuadas de seguridad e higiene.



5. SELECCIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PUNTO DE MUESTREO

Se seleccionará un tramo del río donde puedan encontrarse los sustratos adecuados para la toma de muestras tal y como se indica en el apartado 5.1. Como norma general, debe tener unos 10 m de largo, aunque longitudes superiores podrían ser apropiadas dependiendo de la uniformidad física del río y de la disponibilidad de sustrato.

Se hará una descripción detallada del lugar de muestreo: localización, anchura, profundidad, tipo de sustrato, grado de sombra y otros datos de interés ecológico, que se incluirán a la entrega de los resultados. También se recomienda hacer una fotografía.

Una vez identificado el tramo de muestreo se fijará su posición tomando las coordenadas geográficas con un GPS y mediante referencias topográficas que faciliten la localización posterior.

5.1. SELECCIÓN DEL SUSTRATO

Los organismos fitobentónicos se pueden encontrar en muchas superficies sumergidas y la composición de las comunidades halladas puede variar en función del sustrato escogido.

Se muestrearán comunidades (superficies parduscas resbaladizas) que se desarrollen sobre sustratos duros estables situados en zonas sumergidas del lecho fluvial como rocas, piedras y cantos rodados de un tamaño mínimo de 10 x 10 cm.

En caso de no encontrarse este tipo de sustrato se podrá tomar la muestra en estructuras construidas por el hombre como pilares de puentes o paredes de infraestructuras hidráulicas (azudes, obras de defensa), siempre y cuando no estén hechos de madera, ya que la materia orgánica puede descomponerse favoreciendo la presencia de determinadas especies.

Otra alternativa puede ser muestrear sobre superficies artificiales como ladrillos o tejas, siempre que hayan estado sumergidas durante al menos ocho semanas; en general, un lapso de tiempo de dos meses se considera suficiente para que la comunidad de diatomeas sea madura; no obstante este tiempo puede variar según las condiciones ecológicas.

Si dominan la arena o limos pero existe más de un 10% del total del sustrato que esté constituido por rocas o piedras, se escogerán preferentemente las rocas o piedras como sustrato a muestrear. Si únicamente existen arenas, limos o plantas acuáticas, se recogerán las muestras de aquellos que sean característicos del punto de muestreo¹.

En tramos fluviales profundos pueden muestrearse los tallos de los helófitos o bien sustratos rocosos. Para uniformizar el muestreo en la medida que sea posible se muestrearán siempre las mismas especies o grupos morfológicamente similares; también pueden usarse sustratos artificiales introducidos en zonas seleccionadas.

5.2. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE MUESTRAS POR PUNTO DE MUESTREO

En cada punto de muestreo se tomará una muestra integrada siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 7.

6. FRECUENCIA Y ÉPOCA DE MUESTREO

La frecuencia con la que se muestrearán las diatomeas en los programas de seguimiento será de una vez cada año, durante el intervalo de primavera - verano, eligiendo el mes que se considere más apropiado para el muestreo, justificando a la entrega de resultados la elección de la fecha de muestreo.

¹ Si se muestrean organismos fitobentónicos epífitos se asegurará que proceden de plantas totalmente sumergidas.



7. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO

Para realizar la toma de las muestras hay que tener en cuenta las siguientes indicaciones generales:

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

El procedimiento para la toma de muestra dependerá del tipo del sustrato. En cualquier caso, en la hoja de campo deberán indicarse el tipo de superficie de muestreo correspondiente a cada muestra. En el caso de muestreos sobre vegetación acuática se deberá indicar las especies seleccionadas.

Además de las muestras correspondientes a fitobentos deberán tomarse datos correspondientes a elementos de calidad fisicoquímicos generales pertinentes para la clasificación del estado ecológico tales como: temperatura, pH, conductividad y oxígeno disuelto.

7.1. SUPERFICIES DURAS NATURALES MÓVILES

Es preferible el muestreo sobre piedras y cantos rodados porque son el sustrato más idóneo. El procedimiento a seguir es el siguiente:

- Para realizar el muestreo, hay que situarse en el punto de máxima corriente, siempre que sea posible, e ir recorriendo el río a contra corriente, en dirección aguas arriba, para minimizar el efecto de contaminación de las muestras. Para evitar zonas leníticas o sin sustratos adecuados, es conveniente recorrer un tramo de unos 100 metros aguas arriba o abajo del tramo hasta encontrar la zona idónea.
- Seleccionar como mínimo 5 piedras o bien hasta 10 si sólo existen piedras pequeñas o guijarros. Asegurarse que las piedras se extraen de las zonas adecuadas, es decir, inundadas permanentemente, en zonas soleadas y con aguas corrientes si las hay.
- Eliminar cualquier tipo de contaminación adherida a los sustratos por ejemplo detritos orgánico, limpiando un poco la superficie en la corriente de agua. Si el sustrato está recubierto de algas filamentosas se intentarán desprender éstas, tanto como sea posible, antes de tomar la muestra (siempre es preferible evitar los sustratos recubiertos de algas filamentosas).
- Cepillar o raspar con navaja, cuchilla o cepillo de dientes duro la superficie superior de los sustratos, evitando así las superficies de erosión y sedimentación. Limpiar una superficie aproximada de 10 cm² por piedra, si se han tomado 10 piedras ó 20 cm² si se toman 5 piedras. En cualquier caso, la superficie total de muestreo será de unos 100 cm² o bien la suficiente hasta garantizar la obtención de una cantidad de biofilm adecuada para el análisis (10-15 ml).
- Introducir el cepillo o la hoja de la navaja en el bote de la muestra que previamente se habrá aclarado y contendrá unos 50 ml de agua². Agitar suavemente para permitir la transferencia de las diatomeas. El agua de la muestra se tornará turbia y de color marrón.
- Aclarar con abundante agua del río el cepillo o instrumento usado para tomar la muestra.
- Proceder a etiquetar la muestra y a su conservación.

² El agua de la muestra puede tomarse del río o preferiblemente ser agua embotellada en los ríos de aguas lentas en los que puede haber abundancia de diatomeas planctónicas



7.2. SUPERFICIES VERTICALES DE INFRAESTRUCTURAS ARTIFICIALES

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

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

7.3. VEGETACIÓN ACUÁTICA

En tramos de poca corriente de ríos con abundante crecimiento de vegetación acuática y en ausencia de superficies duras, se permite muestrear la comunidad de organismos fitobentónicos epifíticos que se encuentra en macrófitos y macroalgas sumergidas y/o las partes sumergidas de helófitos.

No obstante, algunos expertos consideran inadecuado este tipo de sustrato por ser determinante del tipo de comunidad de fitobentos que aparece, siendo preferible limitar el muestreo del epilíton en sustratos duros artificiales o naturales. Para paliar esto se deben de seguir las siguientes directrices:

- Si existen hidrófitos y helófitos, es preferible muestrear sobre helófitos.
- Se debe elegir una única especie y siempre evitando plantas muertas o deterioradas.
- La planta recogida se debe preservar hasta su procesado en laboratorio en formaldehído 4% v/v. El formaldehído ayuda además a la remoción de los organismos fitobentónicos en el agitado.

En todo caso se indican los procedimientos de muestreo:

Macrófitos y macroalgas sumergidos

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

Macrófitos emergentes y helófitos

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



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

7.4. SUSTRATOS ARTIFICIALES

Los sustratos artificiales preferibles son los sustratos con superficies heterogéneas por ejemplo tejas, cuerdas de propileno deshilachada, etc., en lugar de las superficies lisas como los portaobjetos de vidrio. Deben dejarse en el río el tiempo suficiente para asegurar que la comunidad esté madura. Como mínimo se recomiendan 4-8 semanas, pero el periodo de exposición depende de las condiciones ambientales, así los periodos de exposición podrían ser más largos bajo algunas circunstancias como condiciones muy oligotróficas, bajas temperaturas o mucha sombra.

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

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

8. CONSERVACIÓN, ETIQUETADO Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

Los reactivos fijadores son necesarios para detener la división celular de las diatomeas y la descomposición de la materia orgánica.

En caso de conservar las muestras se recomienda usar formaldehído tamponado o alcohol etílico tal y como se establece en el apartado 4.

Las muestras en formaldehído pueden conservarse durante meses o años, siendo recomendable añadir más conservante en periodos de conservación entre 6 meses y 1 año.

No es necesario añadir un conservante si la muestra se procesa pocas horas después de su recogida y siempre que se conserve en frío (4°C) y a oscuras. La muestra también se puede ultracongelar.

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

Todas las muestras fijadas se conservarán protegidas de la luz y en lugar fresco por debajo de 15°C.

9. PRE-TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y ANÁLISIS EN LABORATORIO

Para la conservación y preparación de las muestras de cara a su análisis en laboratorio se seguirán las especificaciones contenidas en la Norma UNE EN 13946 Guía para el muestreo en rutina y el pretratamiento de diatomeas bentónicas de ríos.

Para la identificación, recuento e interpretación de muestras de diatomeas se seguirán las especificaciones contenidas en la Norma UNE EN - 14407 Guía para la identificación, recuento e interpretación de muestras de diatomeas bentónicas en ríos. Así mismo la identificación taxonómica deberá seguir los criterios establecidos en la Clave para la identificación de elementos de calidad biológicos elaborada por la Dirección General del Agua.



Los datos de abundancia de taxones se obtendrán tras contar un mínimo de 400 valvas. En caso de que no sea posible contar este número de valvas deberá justificarse convenientemente a la entrega de resultados.

Los resultados del análisis en laboratorio se recogerán en la hoja de laboratorio del anexo II.

ANEXO I: HOJA DE CAMPO PARA EL MUESTREO



DATOS IDENTIFICATIVOS DEL MUESTREO

TIPO DE LA MASA DE AGUA:		CÓDIGO DE LA MASA DE AGUA:	
NOMBRE DE LA MASA DE AGUA:			
CÓDIGO DEL PUNTO DE MUESTREO:	COORDENADAS X/Y (ETRS89):		HUSO:
ORGANISMO/EMPRESA:			
MUESTREADOR:		PROGRAMA	Vigilancia:
CÓDIGO MUESTRA:	Nº DE BOTES:		Operativo:
FECHA: / /	Hora inicio: :		Investigación:
	Hora fin: :		Referencia:
Descripción de acceso y localización del tramo:			

CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS

pH (unidades):	Oxígeno disuelto (mg O ₂ /l):
Temperatura del agua (°C):	% Saturación O ₂ :
Conductividad eléctrica a 20°C (µS/cm):	
Observaciones:	

CARACTERÍSTICAS HIDROMORFOLÓGICAS

Anchura media (m) del tramo:	Profundidad media (m) del tramo:	Longitud (m) del tramo:
------------------------------	----------------------------------	-------------------------

SUSTRATO MUESTREADO (marcar con X)

Superficies duras naturales móviles (preferible piedras grandes)		
Superficies verticales de infraestructuras artificiales		
Macrófitos sumergidos (indicar especie)		Especie:
Macrófitos emergidos (indicar especie)		Especie:
Sustratos artificiales		

VELOCIDAD PREDOMINANTE DEL AGUA (marcar con X)

SOMBREADO PREDOMINANTE DEL TRAMO (marcar con X)

Nula : Ausencia de flujo		Totalmente en sombra	
Reducida: Flujo laminar sin ondulaciones		Sombreado con ventanas	
Moderada: Ondulación superficial pequeña simétrica		Grandes claros o expuesto	
Rápida: Ondulación superficial quebrada			
Muy rápida: Rápidos, formación de espuma			



ANEXO II: HOJA DE LABORATORIO

PROTOCOLO DE MUESTREO DE FITOPLANCTON EN LAGOS Y EMBALSES

CÓDIGO: M-LE-FP-2013

Aprobado por instrucción del Secretario de Estado de Medio Ambiente de fecha 22 de noviembre de 2013



Este documento pertenece a una serie de protocolos de muestreo, laboratorio y cálculo de índices y métricas para su utilización en los programas de seguimiento del estado de las masas de agua continentales (ríos, lagos y embalses) y en la clasificación del estado ecológico.

Las especificaciones de estos documentos deberán ser tenidas en cuenta por los Organismos de cuenca en la explotación de las redes oficiales de seguimiento del estado y potencial ecológico en las masas de agua superficiales continentales, bien directamente o a través de contratos de servicios. Estos protocolos están sujetos a los cambios que se consideren necesarios en virtud del progreso científico de la materia.



MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE

Edita:

© Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
Secretaría General Técnica
Centro de Publicaciones

Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado:
<http://publicacionesoficiales.boe.es/>

NIPO: 770-11-309-5



INDICE

1.	APLICABILIDAD	5
2.	OBJETIVO	5
3.	NORMATIVA DE REFERENCIA.....	5
4.	EQUIPOS, REACTIVOS Y CONSERVANTES.....	6
4.1.	TRABAJO DE CAMPO	6
5.	DETERMINACIÓN DEL NÚMERO Y LOCALIZACIÓN DE PUNTOS DE MUESTREO	8
6.	DETERMINACIÓN DEL NÚMERO Y TIPO DE MUESTRAS POR PUNTO DE MUESTREO.....	8
7.	FRECUENCIAS Y ÉPOCA DE MUESTREO	9
8.	PROCEDIMIENTO DE MUESTREO	10
8.1.	TOMA DE MUESTRAS	10
8.2.	VOLUMEN NECESARIO PARA CADA ANÁLISIS	11
8.2.1.	FILTRADO EN CAMPO DE LA MUESTRA DESTINADA AL ANÁLISIS DE PIGMENTOS.....	11
8.3.	MUESTREOS ADICIONALES. MUESTREO CUALITATIVO DE FITOPLANCTON CON RED.....	12
8.4.	CONSERVACIÓN, ETIQUETADO Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS	12
9.	PROCESADO DE LOS DATOS.....	13
	ANEXO I: HOJA DE CAMPO PARA MUESTREO	15



1. APLICABILIDAD

Este protocolo de muestreo es de obligada aplicación en la explotación de las redes oficiales de evaluación del estado / potencial ecológico en cumplimiento de la Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, que explotan las Confederaciones Hidrográficas (CCHH), bien directamente o a través de contratos de servicios.

Las estaciones en las que se utilizará este protocolo son las pertenecientes al programa de control de vigilancia, programa de control operativo, programa de control de investigación y redes de referencia.

Este protocolo corresponde al muestreo de las masas de agua de la categoría lagos (lagos, lagunas y humedales naturales), así como a las masas de agua artificiales o muy modificadas asimilables a lagos que aparecen en la Orden ARM/2656/2008, de 10 de septiembre, por la que se aprueba la Instrucción de Planificación Hidrológica, siendo aplicable para la obtención de muestras para la determinación y el cálculo de los siguientes indicadores de evaluación del estado ecológico o del potencial ecológico para el elemento de calidad fitoplancton:

- Concentración de clorofila-a.
- Biovolumen total.
- Índice de grupos algales – IGA.
- Porcentaje de biovolumen de cianobacterias.

Asimismo se podrá aplicar este protocolo de muestreo para obtener información para el cálculo de otras métricas correspondientes al elemento de calidad fitoplancton que no se encuentren en la citada Orden Ministerial.

2. OBJETIVO

La Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, establece que los Estados miembros deberán poner en marcha programas de seguimiento que permitan controlar y evaluar la composición, abundancia y biomasa de las comunidades fitoplanctónicas.

La Directiva Marco del Agua establece que los métodos empleados para controlar los indicadores de evaluación de los elementos de calidad biológicos serán conformes a las normas internacionales o nacionales que garanticen el suministro de información de calidad y comparabilidad científica equivalentes.

Por lo tanto, el objetivo de este protocolo es establecer un método de muestreo de fitoplancton que garantice el cumplimiento de los requisitos mencionados anteriormente.

3. NORMATIVA DE REFERENCIA

La normativa de referencia de este protocolo es la que se enumera a continuación:

- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- RD Legislativo 1/2001 por el que se aprueba el Texto Refundido de la Ley de Aguas.
- RD 907/2007 por el que se aprueba el Reglamento de Planificación Hidrológica.
- Orden MAM/3207/2006 por la que se aprueba la ITC-MMA EECC–1/06 Instrucción técnica complementaria sobre determinaciones químicas y microbiológicas para el análisis de las aguas.
- Orden ARM/2656/2008 por la que se aprueba la Instrucción de Planificación Hidrológica.



- Orden MAM/985/2006 por la que se desarrolla el régimen jurídico de las entidades colaboradoras de la administración hidráulica en materia de control y vigilancia de calidad de las aguas y de gestión de los vertidos al dominio público hidráulico.

Éste protocolo se ha redactado teniendo en cuenta las siguientes normas:

- UNE - EN 15204:2007 – Guía para el recuento de fitoplancton con microscopía invertida (técnica de Utermöhl).
- UNE - EN 14996:2007 – Guía para el aseguramiento de la calidad de las evaluaciones biológicas y ecológicas en el medio ambiente acuático.
- Draft proposal of “Water quality – Phytoplankton biovolume determination by microscopic measurement of cell dimensions” (CEN TC 230 / WG 2 / TG 3/N116 30/03/2008).
- Draft proposal for “Water Quality - Guidance on quantitative and qualitative sampling of phytoplankton from inland waters” (CEN TC 230 / WG 2 / TG 3/ N118 15/04/2008).
- UNE - EN 5667-1:2007 – Parte 1: Guía para el diseño de los programas de muestreo y técnicas de muestreo.
- UNE - EN 7027:2001: - Determinación de la turbidez.
- UNE - EN 25814:1992 – Calidad del agua. Determinación del oxígeno disuelto. Método electroquímico. (ISO 5814:1990).
- UNE - EN 27888:1993 - Calidad del agua. Determinación de la conductividad eléctrica (ISO 7888:1985).
- ISO 10523:2008. Water quality - Determination of pH.

Asimismo se ha considerado la metodología aceptada por la comunidad científica internacional para la siguiente medición:

- Perfil fluorimétrico de clorofila-a

4. EQUIPOS, REACTIVOS Y CONSERVANTES

4.1. TRABAJO DE CAMPO

Equipos y material para la recolección de muestras

- Botellas de vidrio de 125 - 250 ml traslúcidas y de color ámbar, para proteger las muestras de fitoplancton de la luz.
- Botellas opacas de plástico (2 L) para contener las muestras para la determinación de la concentración de clorofila-a y otros recipientes con cierres herméticos adecuados para contener las muestras de agua para análisis químicos. El material y los recipientes para análisis químicos deberán estar previamente lavados con ácido sulfúrico 1N y aclarados tres veces con agua destilada.
- Botella hidrográfica para la toma de muestras discretas.
- Para la toma de muestras integradas se podrá utilizar alternativamente:
 - botella hidrográfica para la composición de muestras integradas a partir de muestras discretas.
 - muestreadores integradores.
 - tubo flexible de silicona lastrado de longitud predeterminada y entre 2 – 2,5 cm de diámetro.
- Para el programa de investigación además se utilizará:
 - Red de nailon (manga de plancton) de 20 μm de luz de poro para las muestras cualitativas con red.
 - Viales de vidrio o plástico con tapón hermético.



- Disco de Secchi (DS).
- Sonda multiparamétrica con sensores de profundidad, temperatura, conductividad, pH y oxígeno disuelto.
- Sonda fluorimétrica para la determinación de la concentración de clorofila-a en el perfil vertical.
- Ecosonda manual para determinar el punto de máxima profundidad.
- Contenedor para la homogenización de muestras discretas para componer la muestra integrada, cuando éstas se tomen con botella hidrográfica.
- Neveras portátiles para transporte de la muestra.
- Bolígrafo o rotulador permanente (o cualquier otro método para etiquetar las muestras). Si se usan etiquetas, éstas deben ser resistentes a la humedad.
- Barca y equipo adicional para la navegación o el vadeo, adecuados para las condiciones locales, con el equipo de seguridad apropiado.

En caso de filtrado en campo de las muestras para el análisis de clorofila-a (apartado 8.2.1.) será además necesario el siguiente equipo:

- Equipo de filtración. Este equipo estará compuesto de portafiltros (reutilizables, tipo “swinnex”) para filtros de 47 mm de diámetro y jeringa adaptable. Alternativamente podrá utilizarse un equipo de filtración con kitsatos, embudo y soporte para filtros de 47 mm de diámetro y bomba de vacío manual o eléctrica adaptable al kitsatos. Todo el equipo deberá lavarse con agua destilada antes de filtrar una nueva muestra.
- Filtros de microfibras de vidrio, de 47 mm de diámetro, con capacidad para retener todas las partículas de tamaño superior a 0,7 μm .
- Probeta para la medición del volumen de muestra a filtrar.
- Pinzas de punta roma para la manipulación de los filtros.
- Tubos de vidrio con tapón de rosca para depositar los filtros una vez filtrada la muestra.
- Equipo de congelación (temperatura inferior a -20°C) para la conservación del filtro para el análisis de clorofila-a.

Equipos y material complementario

- Protocolo de muestreo.
- Hoja de campo.
- Libreta de campo.
- Fundas impermeables para las fichas de campo.
- Cámara digital.
- Teléfono móvil.
- Cartografía adecuada.
- GPS.

Todo el material utilizado en campo deberá estar convenientemente limpio y desinfectado para evitar el transporte y la dispersión de propágulos o individuos de especies invasoras, siguiendo los protocolos establecidos por el Organismo de cuenca competente.

Reactivos fijadores (conservantes)

Las muestras para el recuento de fitoplancton (cuantitativas) y las muestras cualitativas tomadas con red (control de investigación) se fijarán con solución de Lugol (mezcla de yoduro potásico y yodo), tal como se especifica en el apartado 8.4.

Para la preparación de la solución de Lugol, en la norma EN 15204 (2007) se incluyen dos formulaciones:



- Solución ácida de Lugol (Willén, 1962). Disolver 100 g de KI (yoduro potásico) en 1 litro de agua desmineralizada; añadir 50 g de cristales de yodo y agitar hasta que se disuelvan; añadir 100 g de ácido acético glacial; decantar la solución antes de su uso para eliminar los posibles precipitados. Esta solución se utilizará para las muestras de fitoplancton procedentes de masas de agua con $\text{pH} < 7$.
- Solución alcalina de Lugol (Utermöhl, 1958 modificada). Se prepara como la anterior, excepto que, en lugar del ácido acético glacial, se añaden 100 g de acetato de sodio ($\text{CH}_3\text{COO-Na}$). Esta solución se utilizará para las muestras de fitoplancton procedentes de masas de agua con $\text{pH} \geq 7$.

El líquido resultante debe estar fuertemente coloreado y debe conservarse en un recipiente hermético de vidrio y protegido de la luz para minimizar su sublimación.

5. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO Y LOCALIZACIÓN DE PUNTOS DE MUESTREO

Se seleccionará siempre un punto de muestreo localizado en la vertical de la parte más profunda de la masa de agua y se evitarán las muestras litorales salvo razón específica que lo justifique (nunca sustituyendo al punto de muestreo de la zona más profunda).

En el caso de embalses el punto de muestreo se ubicará suficientemente separado de la presa para quedar aguas arriba de la ataguía.

La recogida de muestras para los análisis físico-químicos se realizará en el mismo punto en el que se tomen muestras para la determinación de fitoplancton.

6. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO Y TIPO DE MUESTRAS POR PUNTO DE MUESTREO

En el punto de muestreo se realizará, previamente al muestreo de fitoplancton, un perfil vertical con el fin de determinar la profundidad a la que se encuentra la termoclina (en su caso) y, por tanto, si la masa de agua se encuentra estratificada o no.

En el perfil vertical se determinarán las siguientes variables:

- Temperatura del agua ($^{\circ}\text{C}$).
- Conductividad eléctrica a 20°C ($\mu\text{S}/\text{cm}$).
- Oxígeno disuelto (concentración y saturación) ($\text{mg O}_2 / \text{L}$ y $\% \text{ sat O}_2$).
- pH (ud pH).
- Perfil fluorimétrico de la concentración de clorofila-a (mg/m^3 clorofila - a).

El número de determinaciones de las variables incluidas en el perfil será función de la profundidad máxima de la masa de agua:

- Profundidad máxima < 10 m: al menos cada medio metro.
- Profundidad máxima ≥ 10 m: al menos cada metro.

También se determinará la profundidad de visión del Disco de Secchi (DS).

El número y tipo de muestras dependerá de las características de la masa de agua, según el siguiente criterio:

- **Lagos y embalses de profundidad máxima ≤ 3 m y humedales:** se tomará una muestra integrada de la columna de agua desde la superficie hasta unos 20-30 cm del fondo, evitando acercarse excesivamente al sedimento o a la cobertura de macrófitos.
- **Lagos y embalses de profundidad máxima > 3 m, no estratificados:** se tomará una muestra integrada desde la superficie hasta la profundidad correspondiente a 2,5 DS (2,5



veces la profundidad de visión del Disco de Secchi). Cuando la profundidad del lago o embalse sea inferior a 2,5 DS se tomará una muestra integrada de toda la columna de agua desde la superficie hasta unos 20-30 cm del fondo, evitando acercarse al sedimento o a la cobertura de macrófitos.

- **Lagos y embalses de profundidad máxima > 3 m, estratificados:** se presentan dos posibilidades, una para el control de vigilancia, operativo y de referencia, y otra para el control de investigación.
 - **Control de vigilancia, operativo y redes de referencia:** se realizará del mismo modo que para los no estratificados.
 - **Control de investigación:** en los casos en los que resulte oportuno un control de investigación se procederá igual que en el control de vigilancia, y además se tomarán muestras discretas en las profundidades en las que la sonda fluorimétrica detecte picos de clorofila-a, donde las concentraciones sean al menos 10 veces superiores a las detectadas a 1 metro de profundidad.

7. FRECUENCIAS Y ÉPOCA DE MUESTREO

La frecuencia intraanual y la época del año en la que se tomarán las muestras dependerá de las características de la masa de agua:

- **Lagos de profundidad máxima > 3 m y permanentes (tipos 1-4, 6-10, 12, 14-15 y 22) y embalses de cualquier profundidad.** Se realizarán dos muestreos al año a lo largo del periodo de posible estratificación estival, el primero aproximadamente en la primera mitad del periodo estival, en torno al mes de julio; y el segundo en la segunda mitad del periodo estival, en el mes de septiembre. Estas fechas de muestreo serán también aplicables, para los lagos y embalses con estas características hidromorfológicas, en el caso de que la masa de agua no se estratifique.
- **Lagos y humedales someros de profundidad máxima \leq 3 m y permanentes (tipos 11, 16, 18, 20, 27-29 y los que presenten hidroperiodo permanente de los tipos 24-26).** Se realizarán dos muestreos al año, el primero aproximadamente a mitad de primavera, y el segundo en torno a la mitad del periodo estival.
- **Lagos y humedales temporales (tipos 5, 13, 17, 19, 21, 23, 30 y los que presenten hidroperiodo temporal de los tipos 24-26).** Se realizarán dos muestreos durante el hidroperiodo, el primero, al menos, un mes después del comienzo del llenado y se retrasará hasta finales del invierno, siempre que sea posible, mientras que el segundo se realizará en torno a la mitad de primavera, antes de que se inicie el periodo de desecación estival. En el caso de masas de agua con hidroperiodo más efímero, los dos muestreos se distribuirán de forma equitativa a lo largo del hidroperiodo, con criterios similares a los del resto de masas de agua temporales, a menos que el hidroperiodo sea demasiado corto, en cuyo caso se realizará un único muestreo.

En casos excepcionales, que deberán ser justificados, se podría alterar la época de muestreo para, por ejemplo, hacerlo coincidir con las fases de inicio y de máxima estabilidad de la estratificación de la masa de agua, que en el caso de los embalses puede depender del criterio de explotación. En cualquier caso, se deberá motivar la variación en la época de muestreo a la entrega de resultados.

Cuando en la masa de agua se den situaciones tales que dos muestreos anuales sean insuficientes (ej. frecuentes floraciones algales masivas, masas de agua estratégicas), se podrá aumentar el número de muestreos por año hasta cuatro. El aumento del número de toma de muestras por año deberá ser justificado a la entrega de resultados.

No se podrá realizar el muestreo cuando haya habido aportes excepcionales de sólidos en suspensión que afecten de forma significativa a la turbidez del agua. Se debe esperar a que las



condiciones de turbidez por partículas en suspensión inorgánicas en la masa de agua vuelvan a la normalidad.

El control de investigación tendrá unas frecuencias variables en cada estación de muestreo según su problemática específica.

8. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO

Se tomará una muestra integrada y una o varias discretas cuando corresponda, según se indica en el apartado 6. De éstas se extraerán alícuotas para realizar los análisis correspondientes a:

- Concentración de clorofila-*a*.
- Identificación, recuento y determinación del biovolumen de fitoplancton.

Además, de cada una de las muestras (integradas y discretas), se medirán in situ pH y conductividad, y como análisis complementarios, se tomarán alícuotas para realizar los siguientes análisis:

- Fósforo total (mg P/L).
- Nitrógeno total (mg N/L).
- Fosfatos (mg PO₄/L).
- Amonio total (mg NH₄ /L).
- Nitratos (mg NO₃/L).
- Alcalinidad (mg CaCO₃ /L).

Las muestras para los análisis de fosfatos, amonio total y nitratos se filtrarán a través de un filtro de microfibra de vidrio (como el descrito en el apartado 4.1.) inmediatamente después de su recogida y se depositarán, una vez filtrados, en los recipientes correspondientes.

Se rellenará la hoja de campo del anexo I de este protocolo.

8.1. TOMA DE MUESTRAS

Las muestras discretas, correspondientes a cada profundidad de la columna de agua, se obtienen mediante una botella hidrográfica que se sumerge a la profundidad deseada y se cierra mediante mensajero.

En el caso de muestras integradas, las submuestras tomadas a cada una de las profundidades se integran finalmente en una única muestra. Las submuestras tomadas deben cubrir de manera equidistante la columna de agua muestreada, dependiendo del espesor de la capa fótica:

- Zona fótica (2,5*DS) < 10 m: la equidistancia no deberá ser mayor de 1 metro.
- Zona fótica (2,5*DS) ≥ 10 m: la equidistancia no deberá ser mayor de 2 metros.

Se deberán tomar volúmenes iguales a cada una de las profundidades y homogenizarlos bien, pero de manera suave, en un recipiente de mezcla, para dar lugar a la muestra integrada de la que luego se toman las alícuotas mediante un recipiente adecuado, manteniendo bien la mezcla. Al igual que cualquier utensilio usado en la toma de muestras, tanto el recipiente de mezcla como el dispensador deberán estar bien limpios, de manera que no aporten ningún tipo de contaminación a la muestra.

Alternativamente se podrán utilizar muestreadores integradores homologados por normas internacionales, o bien un tubo de silicona, en cuyo caso deberá prestarse atención para que la caída del tubo por la columna de agua sea vertical y para conseguir una buena limpieza del mismo. Cuando se utilice el tubo de silicona, éste debe ser de longitud adecuada para la masa de agua y con un diámetro exterior de entre 2-2,5 cm. El tubo debe disponer de un lastre en uno de los extremos para que la caída del tubo por la columna de agua sea vertical y será almacenado limpio y seco entre



los distintos muestreos, y no deberá ser usado para otro propósito que para muestrear fitoplancton u otros parámetros acompañantes.

En función de las características del sistema el procedimiento de muestreo, acorde con el apartado 6, será el siguiente:

- **Lagos y embalses someros de profundidad máxima ≤ 3 m y humedales:** Se podrá utilizar la botella hidrográfica para tomar muestras discretas a diferentes profundidades que finalmente se homogenizarán en una única muestra integrada. Alternativamente, también podrá usarse un muestreador integrador, o bien un tubo flexible de 2-2,5 cm de diámetro exterior y longitud adecuada a la profundidad de la masa de agua.
- **Lagos y embalses de profundidad máxima > 3 m, no estratificados:** Se utilizará la botella hidrográfica para tomar muestras discretas a diferentes profundidades, que finalmente se homogenizarán en una única muestra integrada, o bien un muestreador integrador.
- **Lagos y embalses de profundidad máxima > 3 m, estratificados:**
 - **Control de vigilancia, operativo y de redes de referencia:** Se utilizará la botella hidrográfica para tomar muestras discretas a diferentes profundidades, que finalmente se homogenizarán en una única muestra integrada, o bien un muestreador integrador.
 - **Control de investigación:** Se utilizará la botella hidrográfica para tomar muestras discretas a diferentes profundidades, las cuales finalmente se homogenizarán en una única muestra integrada, o bien un muestreador integrador. Además se tomarán muestras discretas con botella hidrográfica a las profundidades de la columna de agua donde la sonda fluorimétrica haya detectado picos de clorofila-a (apartado 6).

8.2. VOLUMEN NECESARIO PARA CADA ANÁLISIS

De la muestra integrada, y de las discretas cuando corresponda, se extraerán las siguientes alícuotas:

- Para el análisis de clorofila-a: recoger un volumen de agua suficiente que oscila de 1 a 2L. Guardar la muestra en recipientes opacos y refrigerada (4°C) hasta el momento del análisis. Cuando la muestra se filtre in situ se seguirá el procedimiento señalado en el apartado 8.2.1.
- Para identificación y recuento de fitoplancton: recoger un volumen de agua de entre 125 ml y 250 ml. Guardar, una vez fijada (apartado 8.4), en recipientes traslúcidos de vidrio de color ámbar, en lugar fresco y protegido de la luz. En cuanto a la muestra cualitativa tomada con red (apartado 8.3), se guardará en el vial correspondiente el volumen en el que haya quedado recogido el contenido del copo de la manga de plancton. Una vez fijada (apartado 8.4), se guardará en las mismas condiciones, resguardándola de la luz y las altas temperaturas.
- Para los análisis químicos: tomar el volumen que indiquen las respectivas normas nacionales o internacionales.

8.2.1. FILTRADO EN CAMPO DE LA MUESTRA DESTINADA AL ANÁLISIS DE PIGMENTOS

En el caso de que el transporte al laboratorio de la muestra de agua no pueda realizarse en el mismo día y su procesado antes de 24 horas, es conveniente realizar in situ el filtrado de la muestra para análisis de pigmentos fotosintéticos (clorofila-a), y preservar congelado el filtro que contiene la muestra recogida.

Existen diversos tipos de dispositivos que pueden ser utilizados para el filtrado in situ de la muestra, que están descritos en el apartado 4.1. El más sencillo corresponde a portafiltros portátiles, tipo "swinnex", en los que se puede colocar el filtro de microfibras de vidrio y, mediante una jeringa, ir filtrando la muestra hasta que el filtro comience a estar saturado y tome un marcado color verde o amarillento. La adición de muestra a la jeringa debe hacerse con una probeta, de manera que se pueda medir exactamente el volumen filtrado, el cual debe anotarse convenientemente.



Alternativamente al “swinnex” y la jeringa se pueden utilizar sistemas clásicos de filtración como los utilizados en laboratorio, con un matraz kitasatos y un embudo de filtración con portafiltros. En este caso la fuerza de succión debe ser realizada por una bomba de vacío manual o por una bomba mecánica accionada por batería, si no se dispone de toma de corriente.

Los filtros utilizados para la filtración deben ser de microfibra de vidrio de 47 mm de diámetro, con capacidad para retener todas las partículas de tamaño superior a 0,7 μm , tal como se especifica en el apartado 4.1. Los portafiltros deberán ser, consecuentemente, los adecuados para ese diámetro de filtro.

8.3. MUESTREOS ADICIONALES. MUESTREO CUALITATIVO DE FITOPLANCTON CON RED

En el control de investigación, para ayudar en la identificación del fitoplancton se realizará además un muestreo cualitativo de fitoplancton con red, utilizando una manga de plancton de 20 μm de luz de malla. La red se arrastra en el seno del agua, verticalmente si la profundidad lo permite o si no horizontalmente, hasta conseguir un filtrado visible. El volumen en el que haya quedado recogido el contenido del copo de la manga de plancton se guardará en un vial de vidrio o plástico con tapón hermético y se fijará la muestra con lugol.

Esta muestra no tiene como objeto la obtención de un inventario de taxones, sino simplemente proporcionar material adicional para la identificación de estos en campañas de muestreo del programa de control de investigación.

8.4. CONSERVACIÓN, ETIQUETADO Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

Todas las muestras y preparaciones deben estar convenientemente etiquetadas de forma que se identifiquen mediante un código. Se usará un rotulador resistente al agua.

Para la conservación y transporte de las muestras se seguirá el siguiente procedimiento.

Muestras para análisis de clorofila-a

Las muestras se refrigerarán a 4°C y se mantendrán en oscuridad hasta el momento del filtrado, en el caso de que las muestras puedan filtrarse en el laboratorio antes de 24 horas.

Si no fuese posible respetar este plazo, el filtrado de la muestra se realizará in situ, tal y como describe el apartado 8.2.1, en cuyo caso el filtro deberá congelarse para su traslado al laboratorio, manteniéndose congelado hasta el momento de añadir el solvente. El sistema de congelación deberá garantizar en todo momento la conservación a una temperatura inferior a -20°C. Esto podrá conseguirse de diversas formas, tanto mediante el uso de congeladores portátiles autónomos o instalados en vehículos con compartimento isoterma, o en recipientes con aislamiento térmico conteniendo nieve carbónica, o en nitrógeno líquido usando contenedores homologados. No será válido para la congelación el uso de hielo, que tan sólo resulta útil para la refrigeración de la muestra previamente a su filtrado.

Muestras para identificación y recuento de fitoplancton

Para la fijación de estas muestras se utilizará una solución de Lugol preparado tal y como se describe en el apartado 4.2. Para ello se añade de 0,5 a 1 ml de Lugol por cada 100 ml de muestra hasta obtener un color miel (la cantidad a añadir dependerá siempre del contenido de materia orgánica u otros reductores en la muestra, siendo necesaria una mayor cantidad a mayor presencia de éstos). El Lugol se evapora y se degrada por foto-oxidación, por tanto las muestras se deben conservar en lugar fresco y a oscuras. Hay que controlar periódicamente la pérdida de color de la muestra, añadiendo más conservante si se requiere, siendo preferible la determinación de las muestras en un plazo inferior a 6 meses para evitar su degradación.



Muestras para analítica de variables químicas

Las muestras destinadas a la analítica de las variables químicas se refrigerarán a 4°C y se preservarán de la luz y, en su caso, se añadirá en cada una el conservante o reactivo adecuado y se realizará el procesado que corresponda siguiendo lo que indiquen las respectivas normas nacionales o internacionales.

Muestras discretas tomadas en máximos profundos

En el control de investigación, cuando se hayan tomado muestras discretas en las profundidades donde se hayan detectado máximos profundos de clorofila *a*, deberán conservarse igual que las muestras para identificación y recuento de fitoplancton y se analizarán según el protocolo de análisis y cálculo de métricas de fitoplancton.

9. PROCESADO DE LOS DATOS

Como resultado de los trabajos realizados en campo el responsable del muestreo deberá consignar la información generada en la hoja de campo del anexo I. Esta información deberá entregarse en formato en electrónico al organismo de cuenca pertinente.

ANEXO I: HOJA DE CAMPO PARA MUESTREO



DATOS IDENTIFICATIVOS DEL MUESTREO

NOMBRE DE LA MASA DE AGUA:		TIPO:	CÓDIGO DE LA MASA DE AGUA:	
CÓDIGO DEL PUNTO DE MUESTREO:	CÓORDENADAS X/Y (ETRS 89):		HUSO:	
ORGANISMO/EMPRESA:				
MUESTREADOR:		Programa	Vigilancia:	
CÓDIGO MUESTRA:	Nº DE BOTES:		Operativo:	
FECHA: / /	Hora inicio: :		Investigación:	
	Hora fin: :		Referencia:	
CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA:		<input type="checkbox"/> Lugol <input type="checkbox"/> Otro (indicar):		
Descripción de acceso y localización del tramo:				

CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS

pH (unidades):	Oxígeno disuelto (mg O ₂ /l):
Temperatura del agua (°C):	% Saturación O ₂ :
Conductividad eléctrica a 20°C (µS/cm):	Profundidad del Disco Secchi (m):
Observaciones:	

CARACTERÍSTICAS HIDROMORFOLÓGICAS

Profundidad máxima (m)	Longitud máxima (m)
Superficie (ha)	Nivel del agua respecto a la escala (m)
Perímetro (km)	Profundidad termoclina
Estratificación (Sí/No)	Presencia de blooms (Sí/No)

MUESTREO

Código PM	Coordenadas			Tipo de muestra (Integrada / discreta)	Profundidad máxima columna de agua (m)	Profundidad fin (m)	Filtro In situ Clorofila a (Sí/No)	Recogida de alícuotas (Sí/No)
	UTM X	UTM Y	Huso					

PROTOCOLO DE MUESTREO Y LABORATORIO DE INVERTEBRADOS BENTÓNICOS EN LAGOS

CÓDIGO: ML-L-I-2013

Aprobado por instrucción del Secretario de Estado de Medio Ambiente de fecha 22 de noviembre de 2013



Este documento pertenece a una serie de protocolos de muestreo, laboratorio y cálculo de índices y métricas para su utilización en los programas de seguimiento del estado de las masas de agua continentales (ríos, lagos y embalses) y en la clasificación del estado ecológico.

Las especificaciones de estos documentos deberán ser tenidas en cuenta por los Organismos de cuenca en la explotación de las redes oficiales de seguimiento del estado y potencial ecológico en las masas de agua superficiales continentales, bien directamente o a través de contratos de servicios. Estos protocolos están sujetos a los cambios que se consideren necesarios en virtud del progreso científico de la materia.



MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE

Edita:

© Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
Secretaría General Técnica
Centro de Publicaciones

Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado:
<http://publicacionesoficiales.boe.es/>

NIPO: 280-12-021-9



INDICE

1. APLICABILIDAD.....	5
2. OBJETIVO.....	5
3. NORMATIVA DE REFERENCIA	5
4. EQUIPOS, REACTIVOS Y CONSERVANTES	6
4.1. TRABAJO DE CAMPO	6
4.2. TRABAJO DE LABORATORIO.....	7
5. SELECCIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PUNTO DE MUESTREO	7
6. FRECUENCIA Y ÉPOCA DE MUESTREO.....	8
7. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO	8
7.1. TOMA DE MUESTRAS	8
7.1.1. TOMA DE MUESTRAS PARA ABCO	8
7.1.2. TOMA DE MUESTRAS PARA RIC	9
7.2. CONSERVACIÓN, ETIQUETADO Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS	9
8. PROCESADO Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA EN LABORATORIO.....	10
8.1. MUESTRA DEL ABCO	10
8.2. MUESTRA DEL RIC.....	11
9. PROCESADO DE LOS DATOS	11
ANEXO I: HOJA DE CAMPO PARA MUESTREO	13
ANEXO II: HOJA DE LABORATORIO.....	17



1. APLICABILIDAD

Este protocolo de muestreo y laboratorio es de obligada aplicación en la explotación de las redes oficiales de evaluación del estado / potencial ecológico en cumplimiento de la Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, que explotan las Confederaciones Hidrográficas (CCHH), bien directamente o a través de contratos de servicios.

Las estaciones en las que se utilizará este protocolo son las pertenecientes al programa de control de vigilancia, programa de control operativo, programa de control de investigación y redes de referencia.

Este protocolo corresponde al muestreo y análisis de las masas de agua naturales de la categoría lagos (lagos, lagunas y humedales) que aparecen en la Orden ARM/2656/2008, de 10 de septiembre, por la que se aprueba la Instrucción de Planificación Hidrológica (IPH), siendo aplicable para el cálculo de los indicadores que se desarrollen correspondientes al elemento de calidad fauna bentónica de invertebrados en lagos.

Con la información recopilada mediante este protocolo se obtienen datos válidos para el cálculo de las métricas siguientes:

- Índice ABCO (Abundancia de Branquiópodos, Copépodos y Ostrácodos). Este índice se basa en la determinación de asociaciones de crustáceos.
- Índice RIC (Riqueza de Insectos y Crustáceos). Este índice se basa en la determinación de macrozoobentos.

La combinación de los resultados de ABCO y RIC permite, a su vez, el cálculo del índice IBCAEL para la clasificación del estado ecológico de las masas de agua de la categoría lagos.

2. OBJETIVO

La Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, establece que los Estados miembros deberán poner en marcha programas de seguimiento. Estos programas deben permitir controlar y evaluar la composición y abundancia de la fauna bentónica de invertebrados.

La Directiva Marco del Agua establece que los métodos empleados para controlar los indicadores de evaluación de los elementos de calidad biológicos serán conformes a las normas internacionales o nacionales que garanticen el suministro de información de calidad y comparabilidad científica equivalentes.

Por lo tanto, el objetivo de este protocolo es establecer un método de muestreo de invertebrados bentónicos en lagos que garantice el cumplimiento de los requisitos mencionados anteriormente.

3. NORMATIVA DE REFERENCIA

La normativa de referencia de este protocolo es la que se enumera a continuación:

- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- RD Legislativo 1/2001 por el que se aprueba el Texto Refundido de la Ley de Aguas.
- RD 907/2007 por el que se aprueba el Reglamento de Planificación Hidrológica.
- Orden MAM/3207/2006 por la que se aprueba la ITC-MMA EECC-1/06 Instrucción técnica complementaria sobre determinaciones químicas y microbiológicas para el análisis de las aguas.
- Orden ARM/2656/2008 por la que se aprueba la Instrucción de Planificación Hidrológica.

- Orden MAM/985/2006 por la que se desarrolla el régimen jurídico de las entidades colaboradoras de la administración hidráulica en materia de control y vigilancia de calidad de las aguas y de gestión de los vertidos al dominio público hidráulico.

Asimismo se ha considerado también la siguiente referencia:

- Tesouro taxonómico para la clasificación del estado ecológico de las masas de agua continentales (TAXAGUA¹)

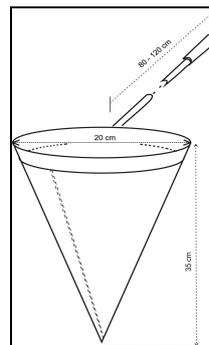
4. EQUIPOS, REACTIVOS Y CONSERVANTES

El equipo y los reactivos necesarios para la realización del muestreo son:

4.1. TRABAJO DE CAMPO

Equipos y material para la recolección de muestras

- Salabre (o red de mano o sacadera) de 100 μm de abertura de poro, montado en aro de 20 cm de diámetro y mango entre 80-120 cm de largo para el muestreo según el protocolo ABCO (ver figura siguiente).
- Salabre (o red de mano o sacadera) de 250 μm de abertura de poro, montado en aro de 20 cm de diámetro y mango entre 80-120 cm de largo para el muestreo según el protocolo RIC (ver figura siguiente).



Modelo de salabre para el muestreo según los protocolos ABCO (con luz de malla de 100 μm) y RIC (con luz de malla de 250 μm).

- Prefiltro de luz de malla gruesa (1 mm aproximadamente) para proteger el salabre de 100 μm y evitar que se colmate con elementos gruesos (p. ej.: algas filamentosas).
- Lupa de campo de 20x aumentos para comprobación in situ de la muestra destinada al ABCO.
- Bote de plástico de 30 - 50 ml de capacidad para recogida de la muestra destinada a la determinación del índice ABCO.
- Vial de vidrio transparente para mirar la muestra *in vivo* con la lupa.
- Bote de plástico de 250 - 500 ml de capacidad para recogida de la muestra destinada a la determinación del índice RIC.
- Sonda multiparamétrica con sensores de temperatura, conductividad, pH y oxígeno disuelto.
- Formaldehído² (HCHO) 40% y Borato de Sodio.
- Hoja de campo (anexo I).

Equipos y material complementario

¹ <http://www.magrama.es/es/agua/temas/estado-y-calidad-de-las-aguas/aguas-superficiales/programas-seguimiento/TAXAGUA.aspx>

² En caso de utilizar conservantes alternativos deberá justificarse la elección realizada garantizando un grado de conservación adecuado de la muestra



- Bolígrafo o rotulador permanente y lápiz (o cualquier otro método para etiquetar las muestras). Si se usan etiquetas, éstas deben ser resistentes a la humedad.
- GPS.
- Equipo de vadeo adecuado para las condiciones locales, con el equipo de seguridad apropiado. En casos muy excepcionales se requerirá también barca y equipo accesorio de navegación, así como chalecos salvavidas.
- Neveras portátiles para transporte de la muestra.
- Batea blanca de plástico.
- Teléfono móvil.
- Cámara digital.
- Cartografía adecuada.
- Cinta adhesiva y papel cebolla para rotular las muestras.
- Fundas impermeables para fichas de campo.

Todo el material utilizado en campo deberá estar convenientemente limpio y desinfectado para evitar el transporte y la dispersión de propágulos o individuos de especies invasoras, siguiendo los protocolos establecidos por el Organismo de cuenca competente.

4.2. TRABAJO DE LABORATORIO

Equipos para el análisis de las muestras

- Red de 100 μm de abertura de poro.
- Formaldehído (HCHO) 40 %.
- Estereomicroscopio de 40x equipado con luz diascópica.
- Placas de Petri de 50 mm de diámetro con bandas marcadas del ancho del campo de visión del estereomicroscopio a 20x.
- Disolución acuosa de glicerina.
- Lupa simple.
- Bandeja de plástico.
- Claves de identificación de los elementos de calidad biológicos (DGA).
- Pinzas entomológicas.
- Aguja enmangada.
- Viales de plástico y otros recipientes con tapones herméticos.

Equipos y material complementario

- Rotuladores indelebles.
- Cinta adhesiva.
- Tijeras.
- Guantes de goma.

Tanto para el trabajo de campo como de laboratorio se deberán tomar todas aquellas medidas necesarias para garantizar que los trabajos se desarrollan en unas condiciones adecuadas de seguridad e higiene.

5. SELECCIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PUNTO DE MUESTREO

El número de puntos de muestreo por masa de agua dependerá de las características de la misma. En general habrá un punto de muestreo por masa de agua, pero se podrá establecer más de uno en los casos en que, en función de la morfometría de la masa de agua o de sus criterios de gestión, se considere oportuno. En cualquier caso se deberá justificar la elección del número y localización de los puntos de muestreo.



La ubicación de los puntos de muestreo adicionales, cuando los hubiera, tendrá en cuenta las características de las masas de agua para que resulte lo más representativa posible del conjunto teniendo en cuenta aspectos como la morfometría de la cubeta, profundidad, entrada de flujos, vegetación acuática, usos y posibles vertidos puntuales. Se deberán especificar las razones de la elección.

En lagos y humedales someros de profundidad máxima ≤ 1 m, se muestrea tanto la zona litoral como la zona interior. En lagos y humedales de profundidad máxima > 1 m, independientemente de si están o no estratificados, se muestrea exclusivamente en la zona litoral.

6. FRECUENCIA Y ÉPOCA DE MUESTREO

La frecuencia intraanual y la época del año en la que se tomarán las muestras dependerá de las características de la masa de agua. Es muy importante, sobre todo en el caso de lagos temporales, adaptar la fecha del muestreo al momento hidrológico óptimo en función del tipo de lago, tal y como se indica a continuación.

- **Tipos 1-4 y 6-9.** Se realizará un muestreo al año, en verano (julio o agosto) y se hará coincidir con la segunda campaña de muestreo de fitoplancton (en el caso de control de vigilancia).
- **Tipos 10-12, 14-16, 18, 20, 22, 27-29 y los que presenten hidroperíodo permanente de los tipos 24-26.** Se realizará un muestreo al año, durante la primera mitad del período estival, en torno al mes de julio, y se hará coincidir con la primera campaña de muestreo de fitoplancton (en el caso de control de vigilancia).
- **Tipos 5, 13, 17, 19, 21, 23, 30 y los que presenten hidroperíodo temporal de los tipos 24-26.** Se realizará un muestreo al año durante la fase de inundación (1,5 - 2 meses después del comienzo del llenado), y se hará coincidir con la primera campaña de muestreo de fitoplancton (en el caso de control de vigilancia).

En casos excepcionales, que deberán ser justificados, se podrá cambiar la época de muestreo. En cualquier caso, se deberán motivar las variaciones a la entrega de resultados.

El control de investigación tendrá unas frecuencias variables en cada estación de muestreo en función de las necesidades detectadas.

7. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO

En cada punto de muestreo se tomarán dos muestras diferentes, complementarias entre sí:

- Una muestra para la obtención de datos de abundancia de branquiópodos, copépodos y ostrácodos que permita la determinación del índice ABCO.
- Otra muestra para la obtención de datos de riqueza de insectos y crustáceos que permita la determinación del índice RIC.

Se trata, por lo tanto, de dos muestreos que se complementan en la escala espacial de muestreo (ABCO se centra en microhábitats y RIC en mesohábitats) y en el tamaño de los organismos que componen la comunidad de invertebrados bentónicos.

7.1. TOMA DE MUESTRAS

7.1.1. TOMA DE MUESTRAS PARA ABCO

Es un muestreo para la determinación de crustáceos. Se muestrea en zonas vadeables con un salabre de 100 μm de abertura de poro. Se hacen pasadas, andando por el fondo lacustre, por encima de los sustratos (rocas, vegetación, sedimento, etc.). Es preferible poner una red de 1 mm de abertura de malla protegiendo la boca del salabre para que no entren materiales que luego dificultan la observación de los organismos con la lupa binocular, como es el caso de las algas filamentosas.



Es preciso muestrear todos los hábitats diferentes que existen en la zona vadeable. Se anotará el número total de pasadas (Unidades de Muestreo) realizado. Este último dato proporciona información sobre el esfuerzo de muestreo.

En lagos oligotróficos de montaña, el muestreo debe ser lo suficientemente largo o intenso como para asegurar que se toma una muestra representativa. Se pasa el salabre entre las rocas y la vegetación (si la hay), removiendo enérgicamente la columna de agua para resuspender los organismos.

Si hay sedimento fino, el salabre se pasará por encima de su superficie, todo lo cerca posible de ella pero sin incorporar sedimento en la muestra. Se debe remover enérgicamente la columna de agua para que los organismos se resuspendan y entren en la red.

En todos los casos es especialmente importante impedir que entre sedimento directamente en la red de muestreo, ya que si esto ocurre, la calidad de la muestra desciende mucho y la labor posterior de identificación se dificulta.

Al acabar de muestrear, se deposita todo el contenido de la red, o parte de él, en un tubo de vidrio transparente con algo de agua. Debe quedar como una suspensión de pequeños organismos que se mueven. Se mira con una lupa de campo de 20x y se comprueba que haya organismos bentónicos (Chydoridae, Macrotrichidae, Cyclopidae, ostrácodos, etc). Si se ve una muestra opaca, sin aparentemente organismos de este tipo, hay que volver a muestrear con más cuidado. Posiblemente el salabre se haya colmatado con barro o con detritus y no se haya recogido el material necesario para la determinación del índice ABCO.

Cuando se dé por acabado el muestreo se introduce toda la muestra en el frasco de 30-50 ml, con algo de agua y se añade el conservante (Formaldehído) tal y como se indica en el apartado 7.2.

7.1.2. TOMA DE MUESTRAS PARA RIC

Se emplea un salabre de luz de malla de 250 μm . El muestreador se desplaza por las zonas vadeables del lago, removiendo el fondo con los pies y recogiendo el material resuspendido con el salabre. Este debe pasarse también entre la vegetación sumergida presente en el lago así como entre la parte sumergida de la vegetación litoral. En el caso de encontrarse con piedras es conveniente recogerlas con las manos (con cuidado de que los invertebrados adheridos a ellas no se suelten) y limpiarlas dentro del salabre. No suele resultar necesario proteger el salabre con la red de abertura de malla de 1 mm.

Las muestras así recogidas se disponen en una bandeja blanca con algo de agua y se observan en el campo. Cuando se considera que la muestra es representativa porque en pasadas sucesivas no aparecen nuevos taxones se limpia en lo posible de materiales gruesos (macrófitos, hojas, etc.), se recoge en un envase de 250-500 ml y se fija con Formaldehído hasta una concentración del 4% tal y como se indica en el apartado 7.2.

7.2. CONSERVACIÓN, ETIQUETADO Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

Todas las muestras y preparaciones deben estar convenientemente etiquetadas en el interior (papel cebolla con lápiz) y el exterior (etiqueta adhesiva con rotulador indeleble), de forma que se identifiquen mediante un código. Ambas etiquetas, al menos, deberán mostrar: el código de la campaña de muestreo, el código de la muestra, la fecha y, en el caso de haber utilizado más de un bote para guardar las muestras, esta información también deberá quedar registrada.

La muestra recogida en el frasco de 30-50 ml será etiquetada indicando claramente que es para el cálculo del ABCO.

Por otro lado, la muestra recogida en el envase de 250-500 ml será etiquetada indicando claramente que es para el cálculo del RIC.



Para conservar las muestras se utilizará Formaldehído al 40% que se añadirá sobre la muestra con agua hasta obtener una concentración (en la muestra) del 4% v/v. Se recomienda añadir primero sólo unas gotas para anestesiar a los invertebrados y evitar que adopten posturas rígidas que puedan dificultar su identificación, y después de unos minutos añadir el resto del reactivo.

El Formaldehído es tóxico y su uso requiere la aplicación de medidas de seguridad. En el campo se trabajará al aire libre, con guantes de látex, se evitarán derrames y se usarán recipientes herméticos adecuados. Se recomienda adicionar borato de sodio al Formaldehído para evitar que se destruyan las partes calcáreas de los organismos.

En el transporte de las muestras del campo al laboratorio se tomarán las medidas necesarias para evitar la rotura de los botes de muestra o la liberación de vapores. Se recomienda usar botes herméticos y almacenarlos en neveras o cajas con tapa en lugar fresco evitando la exposición prolongada al sol.

8. PROCESADO Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA EN LABORATORIO

Previamente a la realización de cualquier manipulación de la muestra será preciso eliminar de ella el Formaldehído. Esto se efectuará disponiendo la muestra sobre una red de 100 μm de abertura de poro y recogiendo la solución de Formaldehído filtrada en el mismo envase de la muestra para su reutilización o tratamiento como residuo peligroso. La muestra, una vez separada del Formaldehído, se lavará con agua y se dispondrá en un nuevo envase sólo con agua.

8.1. MUESTRA DEL ABCO

El contenido del envase para el ABCO se examinará utilizando un estereomicroscopio de 20x equipado con luz diascópica. Para ello se disponen fracciones de la muestra en placas de Petri, pero en cantidades que permitan ver los organismos por transparencia. Los diferentes taxones se separarán y se realizarán las observaciones necesarias para su determinación taxonómica hasta nivel de especie siguiendo las guías y claves elaboradas por la Dirección General del Agua (ID-Tax) u otras alternativas que resulten apropiadas para la fauna ibérica. En la mayor parte de los casos, la determinación requiere la disección de las partes con significado taxonómico y su montaje en preparaciones microscópicas, con agua o una disolución acuosa de glicerina, para su observación con el microscopio a 400x, 1000x.

Como en el inventario aparecerán especies planctónicas y bentónicas mezcladas (particularmente de crustáceos), las primeras no deberán ser tenidas en cuenta en los lagos de los tipos IBCAEL 1 y 2, por lo que será necesario que el especialista encargado de analizar la muestra sea conocedor de la autoecología y hábitos de cada género o cada especie.



Tabla 1 Correspondencia entre los tipos IBCAEL y los tipos de lagos IPH

Tipo IBCAEL	Denominación IBCAEL	Tipo de Masa de Agua IPH
1	Alta montaña.	1, 2, 3, 4, 5 y 9
2	Media montaña o cárstico calcáreo.	6, 7, 8, 10, 11 y 12
3	Cárstico evaporitas y cuenca de sedimentación de origen fluvial	14, 15, 24, 25, 26, 27 y 29
4	Interior en cuenca de sedimentación, permanente, mineralización baja o media.	16 y 18
5	Interior en cuenca de sedimentación, permanente, mineralización alta o muy alta y litoral sin influencia marina.	20 y 28
6	Interior en cuenca de sedimentación, permanente, hipersalino.	22
7	Cárstico calcáreo, interior en cuenca de sedimentación y litoral en complejo dunar, temporal.	13, 17 y 30 ³
8	Interior en cuenca de sedimentación, temporal, mineralización media y alta.	19 y 21
9	Interior en cuenca de sedimentación, temporal, hipersalino.	23

El cálculo de las abundancias relativas de las diferentes especies se realizará mediante el recuento de un número de individuos suficientemente representativo. Para ello, y tras efectuar las determinaciones taxonómicas, se dispondrá una alícuota de la muestra en una placa de Petri de 50 mm de diámetro con bandas marcadas del ancho del campo de visión del estereomicroscopio a 20x y se contará la totalidad de individuos existentes de cada especie recorriendo todas las bandas mediante movimientos de la placa. La alícuota de muestra formará una película de suspensión acuosa de organismos que permitirá el paso de la luz para que éstos sean observados por transparencia.

Al terminar la observación, la muestra para la determinación del ABCO volverá a fijarse con Formaldehído al 4%.

8.2. MUESTRA DEL RIC

El contenido del envase para el RIC se extenderá sobre una bandeja y se observará a simple vista, con la ayuda de una lupa simple, o bajo el estereomicroscopio equipado con luz episcópica. La cuantificación del índice RIC requiere determinar los crustáceos, los coleópteros adultos y los hemípteros adultos a nivel de género; y las larvas, ninfas y pupas de todos los insectos (incluidos los coleópteros y hemípteros) como mínimo hasta nivel de familia siguiendo las guías y claves especializadas y aplicables a la península ibérica.

Al terminar la observación, la muestra para la determinación del RIC volverá a fijarse con Formaldehído al 4%.

9. PROCESADO DE LOS DATOS

En cada lago y para cada muestreo se entregará la hoja de campo del anexo I de este documento rellena con toda la información prevista.

³ El tipo 30 de la IPH ha quedado incluido en Tipo IBCAEL 7 debido a su grado de mineralización.



Los resultados de la determinación en laboratorio (hoja de laboratorio del anexo II) consistirán en un listado taxonómico completo de las especies identificadas y sus abundancias para el cálculo del índice ABCO. En cuanto a los taxones pertinentes para el cálculo del RIC únicamente será necesario facilitar un listado con los taxones identificados.

Los taxones de grupos no incluidos en el cálculo de las métricas del índice IBCAEL serán igualmente identificados e incluidos en los resultados.

ANEXO I: HOJA DE CAMPO PARA MUESTREO



DATOS IDENTIFICATIVOS DEL MUESTREO

NOMBRE DE LA MASA DE AGUA:		CÓDIGO DE LA MASA DE AGUA:	
TIPO DE MASA DE AGUA (IPH):		TIPO DE MASA DE AGUA (IBCAEL):	
CÓDIGO DEL PUNTO DE MUESTREO:	COORDENADA X/ COORDENADA Y (ETRS89): /		HUSO:
ORGANISMO/EMPRESA:			
MUESTREADOR:		Programa:	Vigilancia:
CODIGO MUESTRA:			Operativo:
FECHA: / /	Hora inicio: :		Investigación:
	Hora fin: :		Referencia:

Descripción de acceso y localización:

CARACTERÍSTICAS FISCOQUÍMICAS

pH (unidades):	Oxígeno disuelto (mg O ₂ /l):
Temperatura del agua (°C):	% Saturación O ₂ :
Conductividad eléctrica a 20°C (µS/cm):	Profundidad del DS (m):
Observaciones:	

CARACTERÍSTICAS HIDROMORFOLÓGICAS

Nivel del agua respecto a la escala (m):	Profundidad máxima (m):
------------------------------------------	-------------------------

MICROHÁBITAT

HÁBITATS	% COBERTURA	NÚMERO DE UNIDADES DE MUESTREO	CÓDIGO FOTO
Rocas desnudas (granito, caliza, pizarra, otros:.....)			
Sedimento blando sin vegetación (arcilla, limo, arena, grava)			
Hidrófitos (filamentosas, caráceas, fanerógamas)			
Helófitos (<i>Phragmites sp.</i> , <i>Typha sp.</i> , Otros :.....)			

ANEXO II: HOJA DE LABORATORIO





**MINISTERIO
DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN
Y MEDIO AMBIENTE**

HOJA DE LABORATORIO

Nombre del laboratorio:		Código Entidad Colaboradora: EC - /	
Analista:		Fecha de análisis:	
Referencias identificación taxonómica	Clave:	Bibliografía:	
Código masa de agua:		Nombre de la masa de agua:	
Código muestra:		Fecha de muestreo:	

CLASE	Nombre Taxon (ABCO)	CÓDIGO TAXAGUA (SISTCODSUP / SISTCODINF)	ABUNDANCIA (Nº individuos)
Branchiopoda	Acroperus angustatus	ACR006ANG130	
	Acroperus harpae	ACR006HAR026	
	Alona affinis	ALO003AFF041	
	Alona elegans	ALO003ELE075	
	Alona quadrangularis	ALO003QUA094	
	Alona rectangula	ALO003REC056	
	Alona salina	ALO003SAL065	
	Alonella excisa	ALO004EXC040	
	Alonella nana	ALO004NAN046	
	Artemia partenogenetica	ART003PAR030	
	Bosmina longirostris	BOS002LON138	
	Branchinecta ferox	BRA015FER007	
	Branchinectella media	BRA025MED051	
	Branchipus schaefferi	BRA024SCH124	
	Ceriodaphnia laticaudata	CER023LAT126	
	Ceriodaphnia quadrangula	CER023QUA093	
	Ceriodaphnia reticulata	CER023RET027	
	Chirocephalus diaphanus	CHI009DIA028	
	Chydorus sphaericus	CHY001SPH037	
	Cyzicus grubei	CYZ001GRU014	
	Cyzicus tetracerus	CYZ001TET043	
	Daphnia mediterranea	DAP001MED050	
	Daphnia obtusa	DAP001OBT066	
	Daphnia pulicaria	DAP001PUL085	
	Daphnia curvirrostris	DAP001CUR077	
	Daphnia magna	DAP001MAG029	
	Dunhevedia crassa	DUN002CRA089	
	Eurycercus lamellatus	EUR008LAM026	
	Graptoleberis testudinaria	GRA014TES025	
	Isaura mayeti	ISA001MAY008	
	Macrothrix hirsuticornis	MAC016HIR033	
	Maghrebestheria maroccana	MAG002MAR195	
	Moina brachiata	MOI001BRA082	
	Moina micrura	MOI001MIC081	
	Moina salina	MOI001SAL067	
	Oxyurella tenuicaudis	OXY011TEN163	
	Picripleuroxus denticulatus	PIC001DEN070	
	Pleuroxus aduncus	PLE017ADU007	
	Pleuroxus laevis	PLE017LAE053	
	Pleuroxus letourneuxi	PLE017LET001	
Pleuroxus truncatus	PLE017TRU042		
Scapholeberis rammneri	SCA009RAM016		
Sida crystallina	SID003CRY022		
Simocephalus exspinosus	SIM003EXS008		
Simocephalus vetulus	SIM003VET009		

PROTOCOLO DE LABORATORIO Y CÁLCULO DE MÉTRICAS DE OTRO TIPO DE FLORA ACUÁTICA (MACRÓFITOS) EN LAGOS

CÓDIGO: OFALAM-2013
Versión 1

Aprobado por instrucción del Secretario de Estado de Medio Ambiente de fecha 22 de noviembre de 2013



**GOBIERNO
DE ESPAÑA**

**MINISTERIO
DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN
Y MEDIO AMBIENTE**

Este documento pertenece a una serie de protocolos de muestreo, laboratorio y cálculo de índices y métricas para su utilización en los programas de seguimiento del estado de las masas de agua continentales (ríos, lagos y embalses) y en la clasificación del estado ecológico.

Las especificaciones de estos documentos deberán ser tenidas en cuenta por los Organismos de cuenca en la explotación de las redes oficiales de seguimiento del estado y potencial ecológico en las masas de agua superficiales continentales, bien directamente o a través de contratos de servicios. Estos protocolos están sujetos a los cambios que se consideren necesarios en virtud del progreso científico de la materia.



MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE

Edita:

© Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
Secretaría General Técnica
Centro de Publicaciones

Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado:
<http://publicacionesoficiales.boe.es/>

NIPO: 280-12-020-3



ACTUALIZACIÓN Y CORRECCIÓN DE ERRORES

Versión del protocolo	Fecha	Modificaciones
Versión 1	28/01/2014	Se modifica el pie de tabla 3 de la Tabla 1: Métricas aplicables por tipo de masa de agua



INDICE

1.	APLICABILIDAD	7
2.	OBJETIVO	7
3.	NORMATIVA DE REFERENCIA	8
4.	EQUIPOS, REACTIVOS Y CONSERVANTES	8
5.	PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO.....	9
5.1.	IDENTIFICACIÓN Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS.....	9
5.2.	PROCESAMIENTO DE LOS DATOS	9
6.	AGREGACIÓN DE LOS DATOS OBTENIDOS EN LOS PUNTOS DE MUESTREO	10
6.1.	ESTIMACIÓN DE LA COBERTURA POR TRANSECTO	10
6.2.	AGREGACIÓN DE LOS DATOS DE COBERTURA DE LOS TRANSECTOS PARA EL CONJUNTO DE LA MASA DE AGUA	12
7.	MÉTRICAS PARA CLASIFICAR EL ESTADO ECOLÓGICO POR MEDIO DEL ELEMENTO OTRO TIPO DE FLORA ACUÁTICA (MACRÓFITOS) EN LAGOS	12
7.1.	MÉTRICAS PARA EVALUAR PRESIONES DE TIPO HIDROMORFOLÓGICO.....	15
7.1.1.	PRESENCIA DE HIDRÓFITOS	15
7.1.2.	RIQUEZA DE ESPECIES DE MACRÓFITOS TÍPICOS	15
7.1.3.	COBERTURA TOTAL DE HIDRÓFITOS TÍPICOS.....	15
7.1.4.	COBERTURA TOTAL DE HELÓFITOS TÍPICOS	16
7.1.5.	COBERTURA TOTAL DE MACRÓFITOS TÍPICOS (HIDRÓFITOS + HELÓFITOS)	16
7.2.	MÉTRICAS PARA EVALUAR PRESIÓN POR EUTROFIZACIÓN	16
7.2.1.	COBERTURA DE ESPECIES DE MACRÓFITOS INDICADORAS DE CONDICIONES EUTRÓFICAS	16
7.3.	MÉTRICAS PARA EVALUAR PRESIÓN POR ESPECIES EXÓTICAS	17
7.3.1.	COBERTURA DE ESPECIES EXÓTICAS DE MACRÓFITOS	17
8.	PROCESADO Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA EN LABORATORIO	17
	ANEXO I: IDENTIFICACIÓN EN LABORATORIO Y NORMALIZACIÓN DE COBERTURAS DE MACRÓFITOS	19
	ANEXO II: AGREGACIÓN DE LOS DATOS OBTENIDOS EN LOS TRANSECTOS	25
	ANEXO III: HOJA DE RESULTADOS DEL CÁLCULO DE MÉTRICAS.....	29



1. APLICABILIDAD

Este protocolo de laboratorio y cálculo de métricas de otro tipo de flora acuática en lagos es de obligada aplicación en la explotación de las redes oficiales de evaluación del estado / potencial ecológico en cumplimiento de la Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, que explotan las Confederaciones Hidrográficas (CCHH), bien directamente o a través de contratos de servicios.

Este protocolo se aplica a la identificación en laboratorio y cálculo de las métricas de evaluación del estado ecológico correspondientes al elemento de calidad “otro tipo de flora acuática” (macrófitos), y a partir de la información obtenida mediante el “Protocolo de muestreo de otro tipo de flora acuática (macrófitos) en lagos (Código: ML- L- OFM - 2013)” en las masas de agua de la categoría lagos naturales (lagos, lagunas y humedales), y lagos declarados como muy modificados o artificiales que no sean embalses.

Las métricas contempladas son:

- Presencia/ausencia de hidrófitos típicos.
- Riqueza de especies de macrófitos típicos.
- Cobertura total de hidrófitos típicos.
- Cobertura total de helófitos típicos.
- Cobertura total de macrófitos típicos (hidrófitos+helófitos).
- Cobertura de especies de macrófitos indicadoras de condiciones eutróficas.
- Cobertura de especies exóticas de macrófitos.

Este protocolo es aplicable a todos los tipos de lagos naturales, con las debidas especificaciones según los tipos, incluso para aquellos en los que, debido a la deficiencia de información al respecto, no se hayan podido establecer aún ni condiciones de referencia ni valores frontera entre clases de estado ecológico. Únicamente para aquellas masas de agua incluidas dentro de la categoría lago que no tienen macrófitos en condiciones naturales conforme a la actual tipología española de lagos (Orden ARM/2656/2008 por la que se aprueba la Instrucción de Planificación Hidrológica), no se aplicarán las pautas que se recogen en este protocolo (lagos de los tipos 1-4 que se localicen por encima de los 2.300 msnm y los pertenecientes al tipo 9).

2. OBJETIVO

La Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, establece que los Estados miembros deberán poner en marcha programas de seguimiento que deben permitir controlar y evaluar la composición y abundancia de los organismos pertenecientes al elemento de calidad denominado “Otro tipo de flora acuática”.

Por lo tanto, el objetivo de este protocolo es establecer un método de laboratorio y de cálculo métricas de evaluación del estado ecológico correspondientes al elemento de calidad “otro tipo de flora acuática” (macrófitos), de forma que el suministro de información sea de calidad y de comparabilidad científica equivalente entre las Demarcaciones Hidrográficas, garantizando de este modo el cumplimiento de los requisitos mencionados anteriormente.



3. NORMATIVA DE REFERENCIA

La normativa de referencia de este protocolo es la que se enumera a continuación:

- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- RD Legislativo 1/2001 por el que se aprueba el Texto Refundido de la Ley de Aguas.
- RD 907/2007 por el que se aprueba el Reglamento de Planificación Hidrológica.
- Orden MAM/3207/2006 por el que se aprueba la ITC-MMA EECC–1/06 Instrucción técnica complementaria sobre determinaciones químicas y microbiológicas para el análisis de las aguas.
- Orden ARM/2656/2008 por la que se aprueba la Instrucción de Planificación Hidrológica.
- Orden MAM/985/2006 por la que se desarrolla el régimen jurídico de las entidades colaboradoras de la administración hidráulica en materia de control y vigilancia de calidad de las aguas y de gestión de los vertidos al dominio público hidráulico.

La presente Instrucción se ha redactado teniendo en cuenta también las siguientes referencias e informes técnicos:

- UNE EN 15460: 2008. Guía para el estudio de macrófitos en lagos.
- UNE EN 14996: 2007. Guía para el aseguramiento de la calidad de las evaluaciones biológicas y ecológicas en el medio ambiente acuático.
- MAGRAMA (2013) Protocolo de muestreo de fitoplancton en lagos y embalses (Código: M-LE-FP-2013).
- MAGRAMA (2013) Protocolo de muestreo de otro tipo de flora acuática (macrófitos) en lagos (Código: M - L- OFM - 2013).
- Tesauro para la clasificación del estado ecológico de las masas de agua continentales (TAXAGUA¹).
- CEDEX (2010a): Selección de métricas para la evaluación del estado ecológico de las masas de agua de la categoría “lagos” basadas en el elemento de calidad “composición y abundancia de otro tipo de flora acuática”, en aplicación de la Directiva Marco del Agua.
- CEDEX (2010b): Establecimiento de condiciones de referencia y valores frontera entre clases de estado ecológico en masas de agua de la categoría lago para los elementos de calidad “composición, abundancia y biomasa de fitoplancton” y “composición y abundancia de otro tipo de flora acuática”, en aplicación de la Directiva Marco del Agua.

4. EQUIPOS, REACTIVOS Y CONSERVANTES

Equipos y material para el análisis de muestras de macrófitos

- Claves de identificación de los elementos de calidad biológicos ID-TAX (DGA) y guías complementarias.
- Lupa binocular para la observación de determinados caracteres taxonómicos.
- Ácido acético o clorhídrico para procesado de muestras de macroalgas y su identificación.
- Azul de metileno y carmín acético para teñir estructuras celulares.
- Hoja de campo del protocolo de muestreo de otra flora acuática (macrófitos) con los datos del muestreo (M - L- OFM - 2013).
- Listados taxonómicos del protocolo de muestreo de otra flora acuática (macrófitos) en lagos (M - L- OFM - 2013).

Para el trabajo de laboratorio se deberán tomar todas aquellas medidas necesarias para garantizar que los trabajos se desarrollan en unas condiciones adecuadas de seguridad e higiene.

¹ <http://www.magrama.gob.es/es/agua/temas/estado-y-calidad-de-las-aguas/aguas-superficiales/programas-seguimiento/TAXAGUA.asp>



5. PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO

En caso de que no se haya podido determinar la identidad de un taxón en campo con un alto grado de fiabilidad, se procederá a su identificación en laboratorio tal y como establece el protocolo de muestreo de otro tipo de flora acuática. Estos taxones aparecerán en la hoja de campo con el código asignado a la muestra que contenga al espécimen en cuestión.

Una vez identificados todos los taxones pendientes en la hoja de campo del anexo I del Protocolo de muestreo de otro tipo de flora acuática, se procederá a la agregación de los datos y se estimarán las coberturas por transecto, siguiendo los criterios definidos a continuación en el punto 6.1.

5.1. IDENTIFICACIÓN Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS

El nivel de determinación taxonómica será el de especie, excepto para las algas filamentosas que será el de género. La identificación se llevará a cabo utilizando las Claves de identificación de los elementos de calidad biológicos elaboradas por la Dirección General del Agua (ID-TAX) y guías taxonómicas complementarias, siendo las primeras prioritarias. En caso de utilizar material complementario deberá referenciarse a la entrega de resultados. En cualquier caso la nomenclatura y clasificación de los taxones se adaptará a lo establecido en TAXAGUA².

Para la identificación de macroalgas suele ser necesario recurrir a preparaciones microscópicas y al uso de los siguientes reactivos:

- Ácido acético o clorhídrico diluido, según convenga, para eliminar los carbonatos de las algas incrustantes o las incrustaciones que diversos grupos algales pueden presentar y que dificultan su identificación (ej. Caráceas).
- Azul de metileno y carmín acético para teñir estructuras celulares.

En caso de realizar preparaciones microscópicas de algas filamentosas, se montarán en glicerina o en un medio apropiado y se sellarán con laca.

Los musgos y plantas recogidas y mantenidas en la prensa de campo se identificarán y conservarán de forma permanente en seco: los musgos en sobres de papel y las fanerógamas en pliegos de hojas blancas.

Los ejemplares fotografiados se documentarán y formarán parte de la colección taxonómica correspondiente a cada punto de muestreo.

Se conservarán colecciones de comprobación en forma de especímenes prensados o preservados para permitir el aseguramiento de la calidad en la identificación de los macrófitos. También será necesario almacenar fotografías digitales de las identificaciones realizadas en campo.

5.2. PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

Para cada masa de agua y para cada muestreo se generará, además de la información habitual relativa a la localización y características del muestreo, un listado de especies presentes en cada transecto muestreado con sus coberturas correspondientes, tal como se especifica en el "Protocolo de muestreo de otro tipo de flora acuática (macrófitos) en lagos" (Código: M - L - OFM - 2013). La nomenclatura y clasificación de las especies se adaptará a lo establecido en TAXAGUA.

² Tesoro taxonómico para la clasificación del estado ecológico de las masas de agua continentales. TAXAGUA



6. AGREGACIÓN DE LOS DATOS OBTENIDOS EN LOS PUNTOS DE MUESTREO

6.1. ESTIMACIÓN DE LA COBERTURA POR TRANSECTO

La información inicial para la estimación de las coberturas por transecto será la consignada en la hoja de campo para muestreo del anexo I del “Protocolo de muestreo de otro tipo de flora acuática (macrófitos) en lagos” (Código: M - L - OFM-2013) en la que se habrán incluido los taxones que quedaron pendientes de identificar en campo y las coberturas totales necesarias para el cálculo de las métricas estimadas en campo. Esta hoja de resultados se incluye también en el anexo I de este protocolo.

La aplicación del conjunto de métricas específicas de cada tipo de lago requiere la disponibilidad de los datos de coberturas totales estimadas o presencia de las especies identificadas para los transectos establecidos (o para el conjunto de la masa de agua cuando corresponda) para hidrófitos y helófitos.

Como resultado de las identificaciones realizadas en el laboratorio puede resultar necesario corregir alguno de los datos de cobertura total estimados en campo, todos ellos por transecto. Para ello será necesario consultar los listados taxonómicos del anexo II del Protocolo de muestreo de otro tipo de flora acuática (macrófitos) en lagos” (Código: M - L - OFM – 2013) para determinar si se trata de macrófitos típicos, macrófitos indicadores de condiciones eutróficas (o especies cuyo crecimiento se ve beneficiado por la eutrofización) o macrófitos exóticos.

En este sentido se podrán dar los siguientes casos:

- **CASO 1:** Todas las especies identificadas en el transecto son típicas y esto se confirma con las identificaciones de laboratorio. La cobertura total estimada en campo para el transecto prevalece.

Especies	TRANSECTO 1									
Especie típica 1	30							20		
Especie típica 2	30									10
Especie típica 3	30									
Especie típica 4 confirmada en laboratorio	30					10				
Cobertura total de hidrófitos en transecto estimada en campo	70									
Cobertura total de hidrófitos en transecto estimada en laboratorio	70									

- **CASO 2:** En laboratorio se identifican una o varias especies no típicas:
 - Si la especie no típica no estaba en multiestrato: la “Cobertura total de hidrófitos típicos” será la cobertura total estimada en campo menos la cobertura que se haya anotado en campo para esta especie no típica.

Especies	TRANSECTO 1									
Especie típica 1	30							20		
Especie típica 2	30									10
Especie típica 3	30									
Especie NO típica confirmada en laboratorio						20				
Cobertura total de hidrófitos en transecto estimada en campo	80									
Cobertura total de hidrófitos en transecto corregida en laboratorio	60									



- Si la especie no típica estaba en un multiestrato, pero no era la que tenía cobertura dominante en el multiestrato: la “Cobertura total de hidrófitos típicos” en el transecto será la cobertura total estimada en campo.

Especies	TRANSECTO 1									
Especie típica 1	30							20		
Especie típica 2	30									10
Especie típica 3	40									
Especie NO típica confirmada en laboratorio	30									
Cobertura total de hidrófitos en transecto estimada en campo	70									
Cobertura total de hidrófitos en transecto estimada en laboratorio	70									

- Si la especie no típica estaba en un multiestrato y además, era la dominante en el multiestrato: el valor de “Cobertura total de hidrófitos típicos” en el transecto será la cobertura total estimada en campo para el transecto menos la diferencia en dicho transecto entre la cobertura que hayamos anotado en campo para esta especie dominante no típica y la de la siguiente de mayor cobertura en el multiestrato que sí sea típica.

(Cobertura total de hidrófitos típicos en el transecto) = (Cobertura total de hidrófitos típicos en el transecto estimada en campo) – (Cobertura en el transecto de la especie no típica dominante en el multiestrato - Cobertura en el transecto de la especie típica subdominante en el multiestrato)

Especies	TRANSECTO 1									
Especie típica 1	30							20		
Especie típica 2	30									10
Especie típica 3	40									
Especie NO típica confirmada en laboratorio	50									
Cobertura total de hidrófitos en transecto estimada en campo	80									
Cobertura total de hidrófitos en transecto corregida en laboratorio	70									

- Si la especie no típica estaba tanto en multiestrato como en solitario: la “Cobertura total de hidrófitos típicos” será la cobertura total estimada en campo menos la cobertura que se haya anotado en campo para esta especie no típica en solitario, siempre que no fuera la dominante del multiestrato. Si es la dominante del multiestrato; habrá que restar, además, la diferencia entre la cobertura en multiestrato que hayamos anotado en campo para esta especie dominante no típica y la de la siguiente del multiestrato de mayor cobertura en dicho transecto que si sea típica.

Especies	TRANSECTO 1									
Especie típica 1	30							20		
Especie típica 2	30									10
Especie típica 3	40									
Especie NO típica confirmada en laboratorio	30						20			
Cobertura total de hidrófitos en transecto estimada en campo	90									
Cobertura total de hidrófitos en transecto corregida en laboratorio	70									



- **CASO 3:** En laboratorio se identifican una o varias especies exóticas: Por lo que se refiere a la estimación de la “Cobertura total de hidrófitos típicos” se procederá de la misma manera que en el caso anterior considerando la especie exótica como especie no típica. Por lo que se refiere a la estimación de la “Cobertura de especies exóticas” se tomará la cobertura anotada en campo para esta especie, cuando la especie sólo haya aparecido en solitario. Cuando haya aparecido en solitario y en multiestrato, sea o no la dominante del multiestrato se sumarán las coberturas anotadas en campo para esta especie. En caso de multiestratificación de varias especies exóticas, a efectos de cálculo de la “Cobertura de especies exóticas” se tomará la de la especie que sea dominante en el multiestrato.

Especies	TRANSECTO 1					
Especie típica 1	30				20	
Especie típica 2	30					10
Especie típica 3	40					
Especie EXÓTICA confirmada en laboratorio	30		20			
Cobertura total de hidrófitos en transecto	70					
Cobertura total de especies exóticas	50					

- **CASO 4:** En laboratorio se identifican una o varias especies indicadoras de eutrofia. Se realizará de la misma forma que en el caso 3 pero considerando la “Cobertura de especies de macrófitos indicadoras de condiciones de eutrofia” en lugar de la de “Cobertura de especies exóticas”, distinguiéndose entre aquellos taxones que son indicadores de elevados niveles tróficos, que contabilizan para este indicador en cualquier caso, y aquellos taxones cuyo crecimiento se ve favorecido por la eutrofización (*Ceratophyllum demersum*, *Polygonum amphibium*, y *Potamogeton pectinatus*), que sólo contabilizan en el caso de que su cobertura promedio supere el 50% de la cobertura ocupada por hidrófitos en el transecto.

Estos mismos criterios serán aplicables también para el cálculo de la métrica cobertura total de macrófitos.

Los resultados de las coberturas totales normalizadas por transecto como consecuencia de las identificaciones en laboratorio deberán consignarse en la hoja de resultados del anexo I “Identificación en laboratorio y normalización de coberturas de macrófitos” de este protocolo. Se incluirán además las coberturas o presencias de todas las especies identificadas, tanto en campo como en laboratorio.

6.2. AGREGACIÓN DE LOS DATOS DE COBERTURA DE LOS TRANSECTOS PARA EL CONJUNTO DE LA MASA DE AGUA

Los datos de cobertura de especies de macrófitos obtenidos en los transectos se deben agregar al conjunto del lago para cada fecha de muestreo. Para ello se realizará un promedio de la cobertura de cada una de las especies en los transectos para obtener un valor de cobertura de cada taxón en la masa de agua.

El resultado de la agregación de los datos de cobertura de taxones obtenidos en los transectos se debe reflejar de acuerdo con la ficha que se recoge en el anexo II “Agregación de los datos obtenidos en los transectos” de este protocolo.

7. MÉTRICAS PARA CLASIFICAR EL ESTADO ECOLÓGICO POR MEDIO DEL ELEMENTO OTRO TIPO DE FLORA ACUÁTICA (MACRÓFITOS) EN LAGOS

Como se ha comentado con anterioridad, no todas las métricas se utilizan en todos los tipos de lagos, sino en función del tipo de masa de agua se aplican unas métricas determinadas. En la siguiente tabla se resume la aplicabilidad de las métricas para la evaluación del estado ecológico del elemento de calidad biológica “Otro tipo de flora acuática” a cada uno de los tipos de lagos.



Tabla 1 Métricas aplicables por tipo de masa de agua

Tipos	Presencia / ausencia de hidrófitos	Riqueza de especies de macrófitos	Cobertura total de hidrófitos	Cobertura total de helófitos	Cobertura total de macrófitos (hidrófitos + helófitos)	Cobertura de especies de macrófitos indicadoras de condiciones eutróficas	Cobertura de especies exóticas de macrófitos
1	SI	NO	NO	NO	NO	SI	SI
2	SI	NO	NO	NO	NO	SI	SI
3	SI	NO	NO	NO	NO	SI	SI
4	SI	NO	NO	NO	NO	SI	SI
5	SI	NO	NO	NO	NO	SI	SI
6	SI	NO	NO	NO	NO	SI	SI
7	SI	NO	NO	NO	NO	SI	SI
8	SI	NO	NO	NO	NO	SI	SI
9 ⁽¹⁾	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
10	NO	SI	SI	SI	NO	SI	SI
11	NO	SI	SI	SI	NO	SI	SI
12	NO	SI	SI	SI	NO	SI	SI
13 ⁽²⁾	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
14	NO	SI	SI	SI	NO	SI	SI
15	NO	SI	SI	SI	NO	SI	SI
16 ⁽³⁾	NO	SI	SI	SI	NO	SI	SI
17 ⁽³⁾	NO	SI	NO	NO	SI	SI	SI
18 ⁽³⁾	NO	SI	SI	SI	NO	SI	SI
19 ⁽³⁾	NO	SI	NO	NO	SI	SI	SI
20 ⁽³⁾	NO	NO	SI	SI	NO	SI	SI
21 ⁽³⁾	NO	NO	SI	SI	NO	SI	SI
22 ⁽³⁾	NO	NO	SI	SI	NO	SI	SI
23 ⁽³⁾	NO	NO	SI	SI	NO	SI	SI
24 ⁽³⁾	NO	SI	SI	SI	NO	SI	SI
25 ⁽³⁾	NO	SI	SI	SI	NO	SI	SI
26 ⁽³⁾	NO	SI	SI	SI	NO	SI	SI
27 ⁽³⁾	NO	SI	SI	SI	NO	SI	SI
28 ⁽³⁾	NO	SI	SI	SI	NO	SI	SI
29 ⁽³⁾	NO	SI	SI	SI	NO	SI	SI
30 ⁽⁴⁾	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO

¹Se trata de un tipo en el que la única masa declarada, la Laguna de la Caldera, no tiene macrófitos en condiciones naturales, ya que está situada a 3040 msnm. Por ello no se pueden utilizar los macrófitos en la evaluación de su estado ecológico.

²No se ha dispuesto de información para el establecimiento de condiciones de referencia, por tanto no se puede proponer el uso de estas métricas para la evaluación del estado ecológico en este tipo, actualmente representado por una única masa de agua.

³ En lagunas de estos tipos que tengan permanentemente turbidez de manera natural (por resuspensión o formación de coloides), únicamente se utilizarán las métricas de Cobertura total de Helófitos y Cobertura de especies exóticas de macrófitos (teniendo en cuenta únicamente los helófitos) en la evaluación del estado ecológico. En las lagunas de los tipos 20 a 23, las especies propias del salicorniar que crecen en las orillas se asimilarán a helófitos para la evaluación de la métrica "Cobertura total de Helófitos".

⁴ Se trata de sistemas extremadamente variables y las condiciones de referencia dependerían mucho del tipo de alimentación hídrica, que es variable (Borja *et al.*, 2008), existiendo actualmente una carencia de información sobre la asociación de las características ecológicas y los patrones de alimentación hídrica, y su asociación a patrones de desarrollo de los macrófitos, que hace recomendable que no se establezcan valores de referencia para el elemento de calidad "Otra flora acuática" en tanto no se disponga de los estudios necesarios al respecto.



De manera general y por lo que se refiere a las métricas basadas en la estimación de cobertura (“Cobertura total de hidrófitos”, “Cobertura total de helófitos”, “Cobertura total de macrófitos (hidrófitos+helófitos)”, “Cobertura de especies de macrófitos indicadoras de condiciones eutróficas” y “Cobertura de especies exóticas de macrófitos”), el procedimiento de cálculo para cada uno de las métricas, salvo las excepciones o particularizaciones que se reseñan, será el siguiente:

- Para calcular el valor de la métrica para el conjunto del lago se realizará un promedio simple entre los valores de cobertura total en cada transecto (ya corregidos de la manera que se especifica en el apartado 6.1 Estimación de la cobertura por transecto), el cual se consignará en la hoja de resultados que se incluye en el anexo III. Además se procederá a estimar los valores de cobertura por especie en el conjunto del lago, promediando la cobertura de la especie en cada uno de los transectos, incluyéndose estos resultados en el anexo II.
- En el caso de helófitos, en lagos con un perímetro inferior a 1 km y dado que sólo se realiza un único transecto que abarca todo el perímetro, los valores de coberturas específicas y cobertura total de helófitos identificados en campo serán los correspondientes al resultado estimado para ese transecto.
- Para la métrica “Cobertura total de macrófitos (hidrófitos+helófitos)”, aplicable en los tipos de lagos 17 y 19, en los que la vegetación típica de toda la cubeta corresponde a todo el conjunto de macrófitos, la cobertura total se realizará calculando primero el promedio de la cobertura total estimada en cada transecto de la zona inundada, luego el promedio de los transectos o transecto de las orillas, y posteriormente el promedio de ambos, mientras que la agregación por especies se realizará separadamente para los transectos de la zona inundada y los de las orillas.
- Para calcular el indicador “Cobertura de especies de macrófitos indicadoras de condiciones eutróficas”, las especies cuyo crecimiento se ve beneficiado por la eutrofización (*Ceratophyllum demersum*, *Polygonum amphibium*, y *Potamogeton pectinatus*) serán consideradas como tales a efectos del cálculo del indicador para el conjunto del lago únicamente cuando ocupen más 50 % de cobertura en la zona ocupada por los hidrófitos como promedio para el conjunto de los transectos realizados.

Para la agregación de las métricas que no estiman coberturas (“Presencia/ausencia de hidrófitos” y “Riqueza de especies de macrófitos”) se procederá de la siguiente manera:

- Presencia/ausencia de hidrófitos. Dado que se trata de una métrica cualitativa, la aparición de hidrófitos típicos en cualquiera de los transectos realizados se considerará como presencia. Este resultado se consignará en la hoja de resultados que se incluye en el anexo III.
- Riqueza de especies de macrófitos. Se sumará el número de taxones típicos identificados en el conjunto de los transectos, tanto de hidrófitos como de helófitos y su resultado se consignará en la hoja de resultados que se incluye en el anexo III. Las especies no típicas pero que sean acreditadas como tales y aprobadas al respecto por la Subdirección General de Gestión Integrada del Dominio Público Hidráulico (que es la unidad encargada de coordinar el tesoro taxonómico para la clasificación del estado ecológico de las masas de agua continentales) se contabilizarán, una vez aceptadas como tales, como si fueran macrófitos típicos. Igualmente se contabilizarán para el valor agregado de este indicador para el conjunto del lago las especies típicas identificadas por debajo de 2 metros de profundidad (por tanto fuera de los transectos), o especies de briófitos encontradas en zonas rocosas, cuyas coberturas no tendrán que ser estimadas, pero su presencia si deberá serlo a efectos del cálculo de este indicador.

A continuación se presenta una descripción de las métricas utilizadas para la evaluación del estado ecológico conforme al elemento de calidad “Otro tipo de flora acuática” agrupadas de acuerdo al tipo de presión y se describe el procedimiento para su cálculo.



7.1. MÉTRICAS PARA EVALUAR PRESIONES DE TIPO HIDROMORFOLÓGICO

7.1.1. PRESENCIA DE HIDRÓFITOS

Se trata de una métrica que se aplica a los lagos de los tipos de montaña (**tipos 1-8**), y entre estos, sólo en aquellos que en condiciones naturales tienen macrófitos (se establece un límite superior de altitud de 2.300 msnm), que discrimina a algunos de los lagos de los tipos de alta montaña (tipos 1-4).

Se considerarán también en la aplicación de esta métrica, aparte de los taxones de hidrófitos y helófitos identificados en los puntos de muestreo localizados en zonas colonizables³, todos aquellos que se correspondan con alguna de las situaciones que a continuación se describen:

- especies en capas multiestratificadas no típicas del tipo de lago, o que, siendo típicas, no sean dominantes.
- especies identificadas por debajo de 2 metros de profundidad.
- especies de briófitos en zonas rocosas.

Se trata de una métrica que sólo tiene dos posibles resultados:

- Presencia.
- Ausencia.

7.1.2. RIQUEZA DE ESPECIES DE MACRÓFITOS TÍPICOS

Esta métrica se aplica exclusivamente para los lagos que cuenten con una diversidad de macrófitos significativa en condiciones naturales (tipos 10-12, 14-19, 24-29).

Evalúa la riqueza de especies típicas, esto es, el número de especies presentes, tanto de hidrófitos como de helófitos (y anfífitos, en su caso) pertenecientes a cualquiera de los grupos de macrófitos: plantas vasculares, briófitos o carófitos, siempre que el taxón en cuestión sea característico del tipo.

El procedimiento de cálculo consiste en el recuento de todos los taxones típicos de macrófitos presentes en una masa de agua.

Se considerarán también en la aplicación de esta métrica, aparte de los taxones de hidrófitos y helófitos identificados en los puntos de muestreo localizados en zonas colonizables, todos aquellos que se correspondan con alguna de las situaciones que a continuación se describen:

- especies en capas multiestratificadas no características, o que, siendo características, no sean dominantes.
- especies identificadas por debajo de 2 m de profundidad.
- especies de briófitos en zonas rocosas.

7.1.3. COBERTURA TOTAL DE HIDRÓFITOS TÍPICOS

Esta métrica se aplica en aquellos tipos de lagos que, en condiciones naturales, presentan una cobertura significativa de hidrófitos en las zonas colonizables (tipos 10-12, 14-16, 18 y 20-29).

Evalúa el porcentaje de cobertura de hidrófitos típicos (y anfífitos sumergidos) en aquellas partes de la cubeta del lago que reúnan unas condiciones tales que permitan su desarrollo. En el caso de los tipos salinos (tipos 20-23) no se tendrán en consideración (no se considerarán como zonas

³ En el caso de los hidrófitos se considerarán como colonizables aquellas zonas inundadas no rocosas ni pedregosas con pendiente < 30° hasta 2 metros de profundidad, mientras que en el caso de los helófitos se considerarán como zonas colonizables las orillas no rocosas ni pedregosas con pendiente < 30°.



colonizables por hidrófitos) las partes de la cubeta ocupadas por tapetes microbianos multiestratificados (no confundir con biofilms algales asociados a condiciones eutróficas).

El cálculo para el conjunto del lago se realizará mediante un promedio simple entre los valores de cobertura total de hidrófitos estimados en cada transecto (ya corregidos de la manera que se especifica en el apartado 6.1 Estimación de la cobertura por transecto) recogidos en el anexo I, el cual se consignará en la hoja de resultados que se incluye en el anexo III.

7.1.4. COBERTURA TOTAL DE HELÓFITOS TÍPICOS

Esta métrica se aplica en aquellos tipos de lagos que, en condiciones naturales, presentan una cobertura significativa de helófitos litorales y/o anfífitos emergentes. En el caso de los tipos de lagos salinos (tipos 20-23) el salicorniar se considera un tipo de vegetación característica de este tipo de sistemas. Aunque este tipo de vegetación estrictamente no se puede considerar helofítica, será considerada para el cálculo de esta métrica. Por tanto, esta métrica será de aplicación en los tipos de lago 10-12, 14-16, 18 y 20-29.

Evalúa el porcentaje de cobertura de helófitos litorales, anfífitos emergentes o asimilables (como el salicorniar de los tipos 20 a 23), en aquellas partes del litoral de la cubeta que permiten su colonización.

El cálculo se realizará mediante un promedio simple entre los valores de cobertura total de helófitos en cada transecto (ya corregidos de la manera que se especifica en el apartado 6.1 Estimación de la cobertura por transecto) recogidos en el anexo I, el cual se consignará en la hoja de resultados que se incluye en el anexo III.

7.1.5. COBERTURA TOTAL DE MACRÓFITOS TÍPICOS (HIDRÓFITOS + HELÓFITOS)

Esta métrica se aplica exclusivamente en los tipos de lagos con hidroperiodo temporal (tipos 17 y 19), en los que la vegetación característica de la cubeta está constituida por el conjunto de los macrófitos, es decir, tanto hidrófitos como helófitos. Se realizará una evaluación de la cobertura conjunta de hidrófitos y helófitos (y anfífitos, en su caso) en aquellas partes inundadas de la cubeta y las no inundadas de las orillas que permitan su colonización.

Su cálculo se realiza mediante un promedio simple entre los valores de cobertura total de macrófitos estimados en cada transecto en la zona inundada y en las orillas (ya corregidos de la manera que se especifica en el apartado 6.1 Estimación de la cobertura por transecto) recogidos en el anexo I. Posteriormente se promediarán ambos en un único valor para la masa de agua, el cual se consignará en la hoja de resultados que se incluye en el anexo III.

7.2. MÉTRICAS PARA EVALUAR PRESIÓN POR EUTROFIZACIÓN

7.2.1. COBERTURA DE ESPECIES DE MACRÓFITOS INDICADORAS DE CONDICIONES EUTRÓFICAS

Es la única métrica definida para evaluar la presión eutrofización por medio de los macrófitos y se aplicará en todos los tipos de lagos naturales excepto en los tipos 9, 13 y 30.

Evalúa la abundancia (cobertura) de especies de hidrófitos propias de aguas eutróficas, es decir, de aquellas especies de hidrófitos (incluyendo las plantas vasculares, los carófitos, los briófitos y las algas filamentosas) que sean tolerantes a un alto grado de eutrofización y cuya presencia, por lo tanto, se vea favorecida con el incremento de ésta.

Su cálculo se realizará a partir del sumatorio de las coberturas promedio para cada taxón recogidas en el anexo II, de todas aquellas especies que sean indicadores de condiciones eutróficas, distinguiéndose entre aquellos taxones que sean indicadores de elevados niveles tróficos, que contabilizan para este indicador en cualquier caso, y aquellos taxones cuyo crecimiento se ve



favorecido por la eutrofización, que solo contabilizan en el caso de que su cobertura promedio supere el 50% de la cobertura total de hidrófitos en la masa de agua.

7.3. MÉTRICAS PARA EVALUAR PRESIÓN POR ESPECIES EXÓTICAS

7.3.1. COBERTURA DE ESPECIES EXÓTICAS DE MACRÓFITOS

Para valorar la presión por presencia de especies exóticas utilizando los macrófitos se utiliza una única métrica para todos los tipos de lagos naturales excepto en los tipos 9,13 y 30.

Evalúa la abundancia (cobertura) de especies exóticas (incluyendo las plantas vasculares, los carófitos, los briófitos y las algas filamentosas), estimando para ello la cobertura total de estas especies en la masa de agua. La evaluación de esta métrica se realizará siempre respecto de la zona colonizable específica de cada tipo de macrófito:

- zona somera de la cubeta (<2 m) para los hidrófitos exóticos

Para los tipos 17 y 19, la zona colonizable de los helófitos e hidrófitos será toda la cubeta, mientras que para los helófitos litorales incluirá además la parte emergida de la orilla.

- zona emergida de la orilla para los helófitos exóticos.

Su cálculo se realizará a partir del sumatorio de las coberturas promedio de cada taxón exótico. Este cálculo se tendrá que aplicar tanto para las coberturas promedio de hidrófitos exóticos como para las coberturas promedio de helófitos exóticos. Se aplicarán por lo tanto los siguientes sumatorios:

$$Valor.cal = \sum cober.hidra.exo_i$$

Donde:

- cober.hidro.exo_i: cobertura promedio del taxón de hidrófitos exóticos i.

$$Valor.cal = \sum cober.helo.exo_i$$

Donde:

- cober.helo.exo_i: cobertura promedio del taxón de helófitos i incluido dentro del listado de taxones macrófitos exóticos recogido en el anexo III o que se acredite como tal en un futuro.

El resultado final será el peor valor de los dos resultados obtenidos, es decir, aquel en el que se obtenga una mayor cobertura, dado que esto implica un peor estado ecológico.

8. PROCESADO Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA EN LABORATORIO

Para el análisis de las variables físico-químicas se seguirán los protocolos de análisis internacionales estandarizados y las especificaciones establecidas en el Protocolo de muestreo de Fitoplancton en lagos y embalses (Código: M-LE-FP-2013).

**ANEXO I: IDENTIFICACIÓN EN LABORATORIO Y
NORMALIZACIÓN DE COBERTURAS DE MACRÓFITOS**

**ANEXO II: AGREGACIÓN DE LOS DATOS OBTENIDOS EN LOS
TRANSECTOS**

**ANEXO III: HOJA DE RESULTADOS DEL CÁLCULO DE
MÉTRICAS**



		MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE	HOJA DE RESULTADOS: MACROFITOS EN LAGOS
NOMBRE DEL LABORATORIO:		CÓDIGO ENTIDAD COLABORADORA: EC - /	
ANALISTA:		FECHA DE ANÁLISIS: ___/___/___	
REFERENCIAS IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA	CLAVE:	BIBLIOGRAFÍA:	
CÓDIGO MASA DE AGUA		NOMBRE DE LA MASA DE AGUA:	
CÓDIGO MUESTRA		FECHA DE MUESTREO: ___/___/___	
OBSERVACIONES:			
Indicadores		Valor de métrica	
Presencia / ausencia de hidrófitos			
Riqueza específica de macrófitos			
Cobertura total de hidrófitos			
Cobertura total de helófitos			
Cobertura total de macrófitos (hidrófitos + helófitos)			
Cobertura total de especies de macrófitos (hidrófitos) indicadoras de condiciones eutróficas			
Cobertura total de especies de macrófitos exóticas (hidrófitos y helófitos)			
Excepciones			
Especificar motivos que lo justifican	<input type="checkbox"/> Altitud > 2300 msnm <input type="checkbox"/> > 80 % de superficie total de la zona somera ocupada por zona no colonizable ⁵ por hidrófitos <input type="checkbox"/> > 80 % de la zona emergida de la orilla ocupada por zona no colonizable ⁵ por helófitos <input type="checkbox"/> Turbidez natural <input type="checkbox"/> Otras razones (detallar)		
Observaciones ¹			
¹ Indicar cualquier tipo de observación que sea de interés para la evaluación del estado ecológico conforme al elemento de calidad "Otro tipo de flora acuática", como sería el hecho de utilizar en el caso de los indicadores "cobertura total de hidrófitos", "cobertura total de helófitos", y "cobertura total de macrófitos", el procedimiento alternativo de cálculo propuesto en este protocolo			

PROTOCOLO DE MUESTREO DE FAUNA ICTIOLÓGICA EN RÍOS

CÓDIGO: ML-R-FI-2015



**GOBIERNO
DE ESPAÑA**

**MINISTERIO
DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN
Y MEDIO AMBIENTE**

Este documento pertenece a una serie de protocolos de muestreo, laboratorio y cálculo de índices y métricas para su utilización en los programas de seguimiento del estado de las masas de agua continentales (ríos, lagos y embalses) y en la clasificación del estado ecológico.

Las especificaciones de estos documentos deberán ser tenidas en cuenta por los Organismos de cuenca en la explotación de las redes oficiales de seguimiento del estado y potencial ecológico en las masas de agua superficiales continentales, bien directamente o a través de contratos de servicios. Estos protocolos están sujetos a los cambios que se consideren necesarios en virtud del progreso científico de la materia.



MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE

Edita:

© Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
Secretaría General Técnica
Centro de Publicaciones

Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado:
<http://publicacionesoficiales.boe.es/>

NIPO: 280-15-122-6



INDICE

1. APLICABILIDAD.....	5
2. OBJETIVO.....	5
3. NORMATIVA DE REFERENCIA.....	5
4. EQUIPOS, REACTIVOS Y CONSERVANTES.....	6
4.1. TRABAJO DE CAMPO.....	6
5. SELECCIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PUNTO DE MUESTREO.....	8
6. FRECUENCIA Y ÉPOCA DE MUESTREO.....	8
7. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO.....	9
7.1. PESCA ELÉCTRICA EN RÍOS VADEABLES O PARCIALMENTE VADEABLES.....	9
7.2. PESCA ELÉCTRICA EN RÍOS NO VADEABLES.....	10
7.3. IDENTIFICACIÓN, RECUENTO Y DATOS BIOMÉTRICOS.....	11
7.4. RECUPERACIÓN Y SUELTA DE LOS PECES.....	11
7.5. CARACTERIZACIÓN DEL HÁBITAT.....	12
7.6. MEDIDAS DE SEGURIDAD.....	12
7.7. REGISTRO DE LOS DATOS DE MUESTREO.....	13
ANEXO I: HOJA DE CAMPO PARA MUESTREO.....	14
ANEXO II: HOJA DE CAMPO PARA IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	18

1. APLICABILIDAD

Este protocolo de muestreo y laboratorio es de obligada aplicación en la explotación de las redes oficiales de evaluación del estado / potencial ecológico en cumplimiento de la Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, que explotan las Confederaciones Hidrográficas (CCHH), bien directamente o a través de contratos de servicios.

Las estaciones en las que se utilizará este protocolo son las pertenecientes al programa de control de vigilancia, que incluye el subprograma de referencia, programa de control operativo y programa de control de investigación.

Este protocolo corresponde al muestreo y análisis en laboratorio de fauna ictiológica de las masas de agua de la categoría ríos, siendo aplicable para la obtención de muestras para la clasificación del estado ecológico o del potencial ecológico.

Con la información recopilada mediante este protocolo se obtienen datos válidos para el cálculo de las métricas comúnmente utilizadas en la clasificación del estado ecológico mediante el elemento de calidad fauna ictiológica:

- IBIMED
- Composición de especies: especies nativas - especies introducidas
- Porcentaje de ejemplares con anomalías
- IBICAT
- ECP (Aguirre, A et al. 2006)
- European Fish Index – EFI

Así mismo se podrá utilizar este protocolo de muestreo para obtener información sobre composición y abundancia de peces que permita el cálculo de otros indicadores.

2. OBJETIVO

La Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, establece que los Estados miembros deberán poner en marcha programas de seguimiento. Estos programas deben permitir controlar y evaluar la composición y abundancia de la fauna ictiológica.

La Directiva Marco del Agua establece que los métodos empleados para controlar los parámetros de cada tipo serán conformes a las normas internacionales o nacionales que garanticen el suministro de información de calidad y comparabilidad científica equivalentes.

Por lo tanto, el objetivo de este protocolo es establecer un método de muestreo de peces en ríos que garantice el cumplimiento de los requisitos mencionados anteriormente.

3. NORMATIVA DE REFERENCIA

La normativa de referencia de este protocolo es la que se enumera a continuación:

- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- RD Legislativo 1/2001 por el que se aprueba el Texto Refundido de la Ley de Aguas.
- RD 849/1986 por el que se aprueba el Reglamento del Dominio Público Hidráulico que desarrolla los títulos preliminar, I, IV, V, VI, VII y VIII del texto refundido de la Ley de Aguas.
- Orden MAM/985/2006 por la que se desarrolla el régimen jurídico de las entidades colaboradoras de la administración hidráulica en materia de control y vigilancia de calidad de las aguas y de gestión de los vertidos al dominio público hidráulico.

- Orden MAM/3207/2006 por la que se aprueba la ITC-MMA EECC-1/06 Instrucción técnica complementaria sobre determinaciones químicas y microbiológicas para el análisis de las aguas.
- RD 907/2007 por el que se aprueba el Reglamento de Planificación Hidrológica.
- Orden ARM/2656/2008 por la que se aprueba la Instrucción de Planificación Hidrológica.

Este protocolo se ha redactado teniendo en cuenta las siguientes normas:

- UNE – EN 5667-1: 2007 – Parte 1. Guía para el diseño de programas de muestreo y técnicas de muestreo.
- UNE – EN 14996: 2007 – Guía para el aseguramiento de la calidad de las evaluaciones biológicas y ecológicas en el medio ambiente acuático.
- UNE – EN 14962: 2007. Líneas directrices sobre el campo de aplicación y la selección de métodos de muestreo de peces.
- UNE– EN 14757:2006. Muestreo de peces mediante redes de agalla con diferente luz de malla
- UNE– EN 14011:2003. Muestreo de peces con electricidad.

4. EQUIPOS, REACTIVOS Y CONSERVANTES

4.1. TRABAJO DE CAMPO

Equipos y material de pesca eléctrica

- Generador eléctrico¹ con una potencia adecuada a las necesidades del estudio. Éste puede ser de dos tipos:
 - Grupo electrógeno de gasolina fijo o portátil (mochila).
 - Grupo de batería recargable portátil.
- Convertidor² (rectificador) de corriente que permite controlar la intensidad, el voltaje y el tipo de corriente y transformar la corriente alterna (CA) que produce el generador eléctrico en corriente continua (CC).
- Cátodo. El cátodo está conectado mediante un cable eléctrico al convertidor, se deposita en el lecho del río y actúa como polo negativo para crear un campo eléctrico.
- Ánodo. Conectado mediante un cable eléctrico al convertidor y a una pértiga. Es el elemento móvil que actúa como polo positivo y permite cerrar el campo eléctrico. En caso de utilizar un grupo electrógeno fijo, se recomienda llevar un cable de más de 70 m para poder barrer una distancia de cauce de 100 m sin tener que desplazar el equipo por la orilla.

Equipos para la pesca con redes

- Redes estáticas (nasas, trasmallos, agalladeras).
- Redes de arrastre.

¹ El equipo generador debe estar diseñado o haber sido modificado de forma que resulte adecuado para su utilización en la pesca eléctrica. Los motores y fuentes de corriente eléctrica deben estar protegidos frente al vertido de gasolina, aceite o ácido de batería.

² Se puede utilizar corriente continua sin rectificar o corriente continua pulsátil (CCP), que es menos lesiva para los peces y más segura para el equipo de muestreadores. Se debe regular la frecuencia de pulsos y el voltaje de salida para adecuarlo a las condiciones de pesca. Se debe trabajar con equipos fijos de orilla que producen 400-1000 V y hasta 1,5 A de amperaje y equipos de mochila que producen 300-600 V y hasta 1,5 A de amperaje.

Equipos para la manipulación de peces

- Sacaderas (mango aislante, de madera o fibra de vidrio) y salabres.
- Cubos de goma o plástico (10-12 L) para trasladar los peces capturados hasta la orilla.
- Redes de bloqueo.
- Contenedores de rejilla de plástico, goma o malla que se anclarán en el cauce fluvial y serán utilizados para depositar los peces que van a ser pesados y medidos temporalmente hasta que sean devueltos al río. Cuando no sea posible utilizar un contenedor de rejilla, se pueden utilizar contenedores cerrados de diferentes tamaños (40-50 L); en ese caso puede ser necesario un oxigenador o si la densidad de peces es elevada.
- Balanzas para pesar los peces: una de precisión 0,1 g para peces pequeños y otra de precisión 1 g para peces más grandes.
- Ictiómetro de 1mm de precisión y de 50 cm de longitud.
- Cinta métrica para peces más grandes.
- Bandejas y recipientes para depositar los ejemplares.

Equipos y material complementario

- Vadeadores aislantes.
- Guantes de protección eléctrica.
- Recipientes adecuados para el transporte de los botes de muestras y el fijador.
- Equipo de primeros auxilios.
- Equipo de seguridad.
- Extintor.
- Protocolo de muestreo.
- Hojas de campo.
- Claves de identificación de los elementos de calidad biológicos (ID-TAX).
- Bolígrafo, rotulador permanente o cualquier otro método para etiquetar las muestras. Si se usan etiquetas deben ser resistentes a la humedad.
- Fundas impermeables para las fichas de campo.
- GPS.
- Cámara digital.
- Cartografía adecuada.
- Teléfono móvil.
- Tijeras.
- Nevera.
- Embarcación para ríos no vadeables.
- Salvavidas.
- Profundímetro.

Todo el material utilizado en campo deberá estar convenientemente limpio y desinfectado para evitar el transporte y la dispersión de propágulos o individuos de especies exóticas invasoras, siguiendo los protocolos establecidos por el organismo de cuenca competente.

Reactivos fijadores y materiales para la conservación

- Anestésico para disminuir el estrés de manejo.
- Bolsas de plástico, papel de aluminio, eppendorfs y viales de vidrio o botes herméticos para coger muestras.
- Formaldehído (HCHO) al 4 - 10% v/v para la conservación de ejemplares de mayor tamaño. Este producto es ligeramente ácido por lo que puede alterar algunas estructuras (espina, otolitos, etc.) Se puede añadir una solución tamponada añadiendo 3 ml de borato

de sodio por cada litro de solución al 10%. Dada la naturaleza tóxica del formaldehído, su manipulación se debe realizar siguiendo las adecuadas medidas de precaución.

- Alcohol etílico (C₂H₅OH) (70%) para la conservación de ejemplares pequeños y estructuras. Es menos eficaz para los tejidos blandos
- Hielo normal, seco o nitrógeno líquido, dependiendo del tiempo desde la toma de la muestra hasta su traslado al laboratorio.

Tanto para el trabajo de campo como de laboratorio se deberán tomar todas aquellas medidas necesarias para garantizar que los trabajos se desarrollan en unas condiciones adecuadas de seguridad e higiene.

5. SELECCIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PUNTO DE MUESTREO

Se escogerá el tramo del río más representativo, en cuanto a vegetación de ribera, en su caso, y morfología de la orilla se refiere, ya que estas dos variables, aportan heterogeneidad de hábitats, constituyen refugios y proporcionan sombra a los peces. Se evitará incluir singularidades tales como puntos de vertido, afluentes permanentes o presas.

Se escogerá un tramo delimitado por obstáculos naturales o rápidos, los cuales actúan de barrera natural para los peces; opcionalmente pueden instalarse redes de bloqueo al inicio y final del tramo a pescar.

El área de muestreo debe tener una longitud 10 veces la anchura media del río, con un mínimo de 100 m². Como criterio general el tramo de muestreo seleccionado deberá tener una longitud de al menos 100 m y deberán estar presentes todas las unidades de hábitat características de la masa de agua (pozas, rápidos y tablas).

La selección del tramo se realizará en función de la anchura de la masa de agua:

- Ríos con anchura < 15 m. Tramo de 100 m de longitud en el que se muestrea la anchura completa.
- Ríos con anchura > 15 m. En este tipo de ríos la secuencia poza-rápido-tabla suele ocupar longitudes superiores a los 100 m por lo que, para obtener una muestra representativa en términos de composición y abundancia, será necesario llevar a cabo una estratificación del muestreo. De esta forma se evita que aumente excesivamente la longitud del tramo muestreado. El número de submuestras deberá ser proporcional al número de hábitats presentes y será necesario referenciar el punto inicial y final de cada subtramo muestreado para determinar el área total pescada. También se muestrea la anchura completa.
- Ríos profundos no vadeables en su totalidad. Se aplican los mismos criterios mencionados anteriormente pero solo se muestrean las orillas (zonas vadeables), por lo que conviene aumentar la longitud del tramo muestreado en función del área no vadeable que se deja de pescar.

El tramo seleccionado se delimitará mediante la anotación de las coordenadas UTM (medidas con GPS) del punto de inicio y final.

6. FRECUENCIA Y ÉPOCA DE MUESTREO

Los muestreos serán anuales y se realizarán entre primavera y otoño, momento en que la temperatura del agua es adecuada para la pesca eléctrica. La mejor época para el muestreo se sitúa entre la mitad del verano y principio del otoño, cuando los caudales son poco fluctuantes, los peces tienden a estar en la misma área y los alevines ya tienen suficiente tamaño para ser capturados. Se evitará el muestreo después de fuertes avenidas.

Excepcionalmente, el muestreo podrá aplazarse hasta principios de verano para encontrar una situación más favorable en aquellos casos en que las condiciones meteorológicas o hidrológicas así

lo requieran (principalmente, en zonas de montaña de elevada pluviosidad o influencia nival o en ríos no vadeables).

7. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO

Los procedimientos de pesca y los equipos específicos que deben utilizarse dependen de la profundidad, velocidad, temperatura, conductividad y de la composición de la comunidad de peces existente en la masa de agua, si bien, con carácter general se tendrán en cuenta las siguientes consideraciones:

- Antes de comenzar la pesca eléctrica se deben medir los parámetros fisicoquímicos generales del agua tales como temperatura, conductividad, pH y oxígeno disuelto.
- La medida de la conductividad es necesaria para graduar la intensidad del convertidor de corriente. En aguas salobres y mediante las técnicas descritas en este protocolo, no es posible realizar pesca eléctrica ya que los peces no se ven afectados por el campo eléctrico. Por tanto en caso de que la conductividad sea muy alta la pesca es muy ineficaz y debe ser suspendida.

Como referencia se pueden seguir las siguientes indicaciones en cuanto al voltaje empleado según la conductividad del agua:

CONDUCTIVIDAD	VOLTAJE MÁXIMO
< 100 $\mu\text{S/cm}$	1000 V
100–300 $\mu\text{S/cm}$	600-800 V
>300 $\mu\text{S/cm}$	400 V

- La temperatura del agua influye en la conductividad (ésta aumenta con la temperatura) y en el porcentaje de saturación del oxígeno (el % Saturación O_2 disminuye al aumentar la temperatura) lo que influye en la tasa de supervivencia de los individuos capturados, en especial si se guardan en elevadas concentraciones.
- No se realizará la pesca eléctrica si la temperatura del agua es menor de 5 °C ya que con bajas temperaturas la actividad de los peces y la eficiencia de las capturas es muy baja.
- Se recomienda no realizar pescas mientras llueve, dado que la perturbación de la lámina de agua por las gotas impide ver a los peces y conlleva riesgos para la seguridad de los muestreadores.
- El muestreo debe efectuarse durante el día, preferiblemente a primera hora de la mañana, evitando las horas centrales del día en verano donde el calor puede hacer subir en exceso la temperatura del agua, comprometiendo la supervivencia de los individuos capturados.

La abundancia de taxones capturada se expresará como Capturas por Unidad de Esfuerzo referida al área muestreada (CPUE: individuos/100 m^2). No se utilizará el tiempo como unidad de esfuerzo.

7.1. PESCA ELÉCTRICA EN RÍOS VADEABLES O PARCIALMENTE VADEABLES

Antes de proceder con la pesca eléctrica, se ajustará la intensidad de la corriente. En aguas de baja conductividad es necesario un mayor voltaje. Se utilizará corriente continua pulsátil siempre que sea posible o, si ésta no produce una respuesta suficiente en los peces, corriente continua. En este caso, las frecuencias de pulsos se deben mantener lo más bajas posibles (preferentemente por debajo de 60 Hz).

El generador y el convertidor de corriente se situarán cerca de la orilla en un lugar que resulte adecuado, estable y que permita llevar a cabo la pesca desde aguas abajo del tramo seleccionado hacia aguas arriba. Se conectará el cátodo al convertidor y se introducirá en el agua, en un punto intermedio del tramo, para limitar la fluctuación de la intensidad de la corriente. En ríos de

profundidad homogénea, el equipo puede situarse en una pequeña embarcación entre los pescadores.

Se conectará la pértiga (ánodo) al convertidor de corriente con un cable suficientemente largo para cubrir la longitud del tramo que se va a muestrear.

Se situarán los depósitos contenedores de los peces y el material necesario para tomar los datos biométricos en un sitio llano y sombreado.

El equipo humano para realizar la pesca estará integrado por 2 a 4 personas. El técnico más experimentado es el que conduce la pesca, es decir, lleva la pértiga y la acciona mientras remonta el río para que la turbidez producida por el movimiento no afecte la eficiencia de la pesca. Es conveniente moverse suavemente e ir barriendo con la pértiga todos los hábitats del ancho fluvial. Es conveniente prestar atención a las zonas de refugio e intentar que los peces abandonen sus escondites. Dos técnicos se sitúan detrás del portador de la pértiga con sacaderas para recoger los peces que, aturdidos por la electricidad, son arrastrados por el flujo de agua, y un cuarto técnico provisto de un cubo con agua recogerá los peces capturados y los transportará a contenedores con mayor volumen de agua situados en la orilla.

En ríos vadeables se realiza un único pase de pesca y la abundancia se expresa en individuos capturados por superficie (CPUE: individuos/100 m²).

En el caso de ríos parcialmente vadeables, las pozas y las zonas de fuerte corriente son inaccesibles para efectuar la pesca en condiciones adecuadas y seguras por lo que, en este tipo de masas de agua, debe limitarse la pesca a las zonas vadeables (margen fluvial). En estos casos, será necesario tomar referencias de la superficie efectiva de pesca para realizar adecuadamente las posteriores mediciones del hábitat. Se tomarán datos relativos a la anchura del río donde se ha realizado la pesca eléctrica.

En ríos pequeños y de difícil acceso puede sustituirse el equipo de pesca de gran potencia por otro de mochila que portará uno de los técnicos, avanzando por el río seguido de un ayudante.

Los peces capturados se depositan en cubos de plástico llenos de agua y se trasladan a los contenedores instalados en la orilla, a la espera de que se tomen los datos biométricos. Es necesario mantener los contenedores a la sombra, controlar que la densidad de peces no sea excesiva y que las condiciones sean adecuadas, para lo que habrá que renovar y oxigenar el agua, si no se han utilizado contenedores de rejilla anclados en el cauce fluvial.

7.2. PESCA ELÉCTRICA EN RÍOS NO VADEABLES

En las masas de agua no vadeables, la pesca eléctrica debe limitarse a zonas cercanas a las orillas y, en general, a zonas de hasta 1,5 a 2 m de profundidad. Las capturas obtenidas mediante este procedimiento se complementarán con otras técnicas pasivas (redes y nasas) o activas (redes de arrastre) que únicamente contribuirán a los datos de composición.

Se utilizará una embarcación lo suficientemente amplia para contener los equipos de pesca eléctrica (generador, convertidor de corriente, cables del ánodo y cátodo), el personal y otros equipos (incluidos los de seguridad).

La embarcación recorrerá el tramo de río no vadeable (orillas) cubriendo los diferentes hábitats. La pesca eléctrica se limitará a las zonas de orilla y menos profundas. En este caso es necesario aumentar la longitud del tramo en función del área no vadeable de zonas profundas que se deja sin muestrear. Se medirá, mediante GPS, la distancia recorrida por la embarcación durante la pesca para calcular posteriormente el área pescada y poder obtener datos de abundancia por unidad de superficie.

El equipo de muestreo lo forman dos técnicos: uno situado en popa que maneja el motor de la embarcación y otro en proa que se encarga del ánodo. La pesca se realizará aguas arriba, remontando lentamente la corriente con ayuda del motor. En aguas con mucha corriente se requiere que la persona encargada del motor, sea un técnico experimentado, capaz de controlar la deriva y evitar que la eficiencia de la pesca disminuya.

7.3. IDENTIFICACIÓN, RECuento Y DATOS BIOMÉTRICOS

Para manipular los peces (identificar, pesar y medir) es conveniente usar un producto anestésico para disminuir el estrés de manejo (especialmente para los peces más activos como la trucha). Se recomienda usar MS-222 (tricaina-metano-sulfonato) o eugenol. Es importante controlar el tiempo de exposición al anestésico, dado que una exposición excesiva puede conducir a la muerte del ejemplar.

Se contabilizará cada uno de los ejemplares capturados, se identificará hasta nivel de especie y se tomarán los siguientes datos biométricos:

- Peso, expresado en gramos.
- Longitud furcal (distancia desde el rostro hasta la escotadura de los lóbulos de la aleta caudal) o total (distancia entre el rostro y la proyección de ambos lóbulos de la aleta caudal plegados), expresadas en milímetros.
- Estado sanitario de los individuos según caracteres externos (como erosiones de las aletas, lesiones o tumores visibles externamente en el cuerpo del pez o enfermedades).
- Sexo (si es factible)
- Observaciones

La identificación de los peces se realizará utilizando las claves taxonómicas elaboradas por la Dirección General del Agua (ID-TAX). En caso de que resulte necesario confirmar una identificación y de forma excepcional, se podrá conservar algún ejemplar muerto para su identificación en laboratorio.

Se realizará un reportaje fotográfico representativo de los ejemplares capturados que será entregado junto con los resultados del muestreo.

Si el número de individuos de una especie supera los 30 ejemplares, no será necesario medir todos sino que se pesará y medirá una muestra representativa que permita determinar la estructura de las clases de edad.

7.4. RECUPERACIÓN Y SUELTA DE LOS PECES

Los ejemplares ya medidos y pesados, se introducirán en otro contenedor con agua fresca, evitando una densidad excesiva de peces que conduciría a la desoxigenación rápida del agua. Lo más favorable es colocar estos peces en contenedores de rejilla sumergidos y anclados en el cauce fluvial, de modo que la corriente de agua circule a través.

Esta práctica ayuda en caso de haberse utilizado algún anestésico, y en todo caso, mejora el confinamiento. Este contenedor debe situarse fuera de la zona de pesca para evitar que los peces sean afectados nuevamente por la corriente eléctrica. Los tiempos de recuperación suelen oscilar entre 5 y 10 minutos.

Una vez finalizada la pesca en el tramo, se procederá a devolver los peces al río, asegurándose que están recuperados de la anestesia; para ello se elegirá una zona de corriente moderada cerca de la orilla y se evitará la suelta en tramos de fuerte corriente, dentro de los límites del tramo de muestreo.

7.5. CARACTERIZACIÓN DEL HÁBITAT

Cuando haya finalizado la pesca es necesario llevar a cabo una caracterización del hábitat fluvial correspondiente al tramo muestreado. Se tomarán medidas de la longitud total y la anchura media del tramo muestreado, con los que se calculará el área total sobre la que se ha realizado la pesca.

En cuanto a los ríos parcialmente vadeables, en cada transecto se realizarán dos mediciones relativas a la anchura:

- Anchura de pesca efectiva para calcular la superficie sobre la que se ha realizado la pesca
- Anchura total del río mediante medición o estimación visual

En ríos no vadeables en los que se haya realizado la pesca desde embarcación el área de pesca se calculará en función de la distancia lineal recorrida durante la pesca mediante GPS y una anchura media de 2 m (asumiendo que la pesca efectiva del ánodo en un transecto es de 2 m).

7.6. MEDIDAS DE SEGURIDAD

Se preparará un plan de seguridad que identifique y cubra los riesgos de shock eléctrico, incendio o inhalación de gases durante la realización de la pesca. Las siguientes medidas de seguridad pueden ser aplicables:

- Evitar realizar pesca eléctrica con caudales elevados y en tramos de fuerte corriente.
- No se puede practicar la pesca eléctrica cuando llueve y con tormenta eléctrica.
- La pesca siempre se realizará por un mínimo de dos personas.
- Los equipos eléctricos de pesca (generador, convertidor, cables, ánodo y cátodo) se almacenarán desconectados, secos y limpios. Se identificarán desperfectos (cables pelados, interruptores rotos) y se repararán antes del inicio de la pesca. Durante la pesca, el generador se mantendrá en un espacio libre de vegetación y a la sombra, evitando cualquier posibilidad de que se caiga al agua. No se moverá estando en marcha. Se tendrá disponible un extintor cerca del mismo.
- El generador se pondrá en marcha cuando el cátodo se encuentre en el agua, listo para empezar la pesca y todo el personal haya sido avisado.
- El personal a cargo de la pesca vestirá vadeadores aislantes. Se evitará introducir las manos dentro del agua y tocar las partes metálicas de los electrodos, a menos que el equipo esté desconectado. También es obligatorio el uso de guantes de protección eléctrica.
- Todos los recipientes y contenedores usados para depositar los peces serán de plástico o goma.
- Los técnicos a cargo de la pesca deberán conocer las técnicas de reanimación cardiopulmonar después de un shock eléctrico. Se dispondrá de un equipo de primeros auxilios y un teléfono móvil para pedir ayuda médica en caso necesario.
- Como medida de seguridad adicional se deben utilizar pértigas con pulsadores de seguridad que interrumpen el campo eléctrico cuando deja de accionarse el pulsador.

En el caso de pesca eléctrica desde embarcación:

- La embarcación será adecuada para la pesca eléctrica, todas las superficies metálicas deben estar conectadas eléctricamente entre ellas, independientemente de que el casco sea de metal o de material no conductor. En embarcaciones no metálicas, el generador debe estar protegido convenientemente de contactos indirectos.

- El generador se fijará en la embarcación de forma que se evite su movimiento en el balanceo. Se dispondrá de un extintor a bordo.
- El personal vestirá chalecos salvavidas todo el tiempo.

7.7. REGISTRO DE LOS DATOS DE MUESTREO

Los resultados del muestreo consistirán en:

- Inventario de taxones capturados y su abundancia expresada en número de individuos de cada taxón.
- Datos biométricos de todos los individuos capturados incluyendo el estado sanitario.
- Fotografías de los individuos y del tramo de muestreo.
- Anchura del tramo.
- Longitud del tramo.
- Anchura efectiva de pesca (ríos parcialmente vadeables).
- Hoja de campo de los anexos I y II.

Con estos datos podrán obtenerse las Capturas por Unidad de Esfuerzo (CPUE: individuos/100 m²) y la Biomasa por Unidad de Esfuerzo (BPUE: kg/100 m²), ambas por superficie efectiva de pesca.

ANEXO I: HOJA DE CAMPO PARA MUESTREO



MINISTERIO
DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN
Y MEDIO AMBIENTE

TOMA DE DATOS MUESTREO: FAUNA ICTIOLÓGICA EN RÍOS

DATOS IDENTIFICATIVOS DEL MUESTREO

TIPO DE LA MASA DE AGUA: CÓDIGO DE LA MASA DE AGUA:

NOMBRE DE LA MASA DE AGUA:

CÓDIGO DEL PUNTO DE MUESTREO: COORDENADAS X/Y (ETRS 89): / HUSO:

ORGANISMO/EMPRESA:

MUESTREADOR:	Programa o subprograma:	Vigilancia:
CODIGO MUESTRA:		Operativo:
FECHA: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>		Investigación:
Hora inicio: <input type="text"/> : <input type="text"/>		Referencia:
Hora fin: <input type="text"/> : <input type="text"/>		

CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA: Formaldehído Alcohol etílico

Descripción de acceso y localización del tramo:

EQUIPO DE PESCA

TIPO DE EQUIPO DE PESCA: Fijo Portátil

CORRIENTE: Continua Continua pulsátil VOLTAJE (V): INTENSIDAD (A):

Observaciones:

PROCEDIMIENTO DE MUESTREO

TIPO DE RÍO: Vadeable o parcialmente vadeable No vadeable con embarcación

REDES DE BLOQUEO: Sí No

PESCA CON REDES: Sí No TIPO DE REDES:

Observaciones:

CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS

pH (unidades): Oxígeno disuelto (mg O₂/l):

Temperatura del agua (°C): % Saturación O₂:

Conductividad eléctrica a 20°C (µS/cm): Observaciones:

CARACTERÍSTICAS HIDROMORFOLÓGICAS

Anchura media (m) del tramo: Profundidad media (m) del tramo: Longitud (m) del tramo:

Superficie de muestreo (m²) del tramo:

Porcentaje de orilla con vegetación: Porcentaje de iluminación/sombreado:

MESOHÁBITATS	% COBERTURA	NÚMERO DE UNIDADES DE MUESTREO	CÓDIGO FOTO
Aguas rápidas			
Tablas			
Pozas			
TIPOS DE REFUGIOS	% COBERTURA	NÚMERO DE UNIDADES DE MUESTREO	CÓDIGO FOTO
Refugios estructurales			
Troncos y ramas			
Cuevas			
Vegetación sumergida			
Arenas y otros sedimentos			
VELOCIDAD PREDOMINANTE DEL AGUA (marcar con X)			
Nula: Ausencia de flujo			
Reducida: Flujo laminar sin ondulaciones			
Moderada: Ondulación superficial pequeña simétrica			
Rápida: Ondulación superficial quebrada			
Muy rápida: Rápidos, formación de espuma			
Comentarios sobre el hábitat:			

**ANEXO II: HOJA DE CAMPO PARA IDENTIFICACIÓN
TAXONÓMICA**



PROTOCOLO DE MUESTREO Y LABORATORIO DE MACRÓFITOS EN RÍOS

CÓDIGO: ML-R-M-2015



**GOBIERNO
DE ESPAÑA**

**MINISTERIO
DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN
Y MEDIO AMBIENTE**

Este documento pertenece a una serie de protocolos de muestreo, laboratorio y cálculo de índices y métricas para su utilización en los programas de seguimiento del estado de las masas de agua continentales (ríos, lagos y embalses) y en la clasificación del estado ecológico.

Las especificaciones de estos documentos deberán ser tenidas en cuenta por los Organismos de cuenca en la explotación de las redes oficiales de seguimiento del estado y potencial ecológico en las masas de agua superficiales continentales, bien directamente o a través de contratos de servicios. Estos protocolos están sujetos a los cambios que se consideren necesarios en virtud del progreso científico de la materia.



MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE

Edita:

© Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
Secretaría General Técnica
Centro de Publicaciones

Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado:
<http://publicacionesoficiales.boe.es/>

NIPO: 280-15-120-5



INDICE

1. APLICABILIDAD	5
2. OBJETIVO.....	5
3. NORMATIVA DE REFERENCIA	5
4. EQUIPOS, REACTIVOS Y CONSERVANTES	6
4.1. TRABAJO DE CAMPO.....	6
4.2. TRABAJO DE LABORATORIO	7
5. SELECCIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PUNTO DE MUESTREO	8
6. FRECUENCIA Y ÉPOCA DE MUESTREO.....	8
7. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO	8
7.1. RÍOS VADEABLES	9
7.2. RÍOS NO VADEABLES.....	10
8. CONSERVACIÓN, ETIQUETADO Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS	11
9. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS EN LABORATORIO	12
9.1. IDENTIFICACIÓN Y RECUENTO DE TAXONES	12
10. PROCESADO DE LOS DATOS	13
ANEXO I: HOJA DE CAMPO PARA MUESTREO.....	14
ANEXO II: HOJA DE LABORATORIO.....	19



1. APLICABILIDAD

Este protocolo de muestreo y laboratorio es de obligada aplicación en la explotación de las redes oficiales de evaluación del estado / potencial ecológico en cumplimiento de la Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, que explotan las Confederaciones Hidrográficas (CCHH), bien directamente o a través de contratos de servicios.

Las estaciones en las que se utilizará este protocolo son las pertenecientes al programa de control de vigilancia, que incluye el subprograma de referencia, programa de control operativo y programa de control de investigación.

Este protocolo corresponde al muestreo y análisis en laboratorio de macrófitos en las masas de agua de la categoría ríos, así como en las masas de agua artificiales o muy modificadas asimilables a ríos, siendo aplicable para la obtención de muestras para la clasificación del estado ecológico o del potencial ecológico.

La toma de muestras de este protocolo está orientada a la obtención de datos de composición y abundancia de macrófitos, (plantas acuáticas visibles a simple vista, entre las que se encuentran plantas vasculares, briófitos y macroalgas tales como algas caráceas y otros grupos) y de sus coberturas en la estación de muestreo. Los grupos florísticos considerados son:

- Macroalgas
- Briófitos (musgos y hepáticas)
- Pteridófitos
- Fanerógamas (angiospermas)
- Otros grupos como líquenes acuáticos, etc.

Con la información recopilada mediante este protocolo se obtienen datos válidos para el cálculo de las métricas utilizadas para el elemento de calidad correspondiente a composición y abundancia de flora acuática de macrófitos:

- Índice biológico de macrófitos en ríos (IBMR-2015) adaptado a España.
- Índice de macrófitos (IM).
- Índice de vegetación acuática macroscópica (IVAM).

Asimismo se podrá aplicar este protocolo de muestreo para obtener información destinada al cálculo de otras métricas de macrófitos que se elaboren con posterioridad y que requieran datos de composición y abundancia.

2. OBJETIVO

La Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, establece que los Estados miembros deberán poner en marcha programas de seguimiento. Estos programas deben permitir controlar y evaluar la composición y abundancia de los macrófitos.

La Directiva Marco del Agua establece que los métodos empleados para controlar los parámetros de cada tipo serán conformes a las normas internacionales o nacionales que garanticen el suministro de información de calidad y comparabilidad científica equivalentes.

Por lo tanto, el objetivo de este protocolo es establecer un método de muestreo y laboratorio de macrófitos en ríos que garantice el cumplimiento de los requisitos mencionados anteriormente.

3. NORMATIVA DE REFERENCIA

La normativa de referencia de este protocolo es la que se enumera a continuación:



- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- RD Legislativo 1/2001 por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas.
- RD 849/1986 por el que se aprueba el Reglamento del Dominio Público Hidráulico que desarrolla los títulos preliminar, I, IV, V, VI, VII y VIII del texto refundido de la Ley de Aguas.
- Orden MAM/985/2006 por la que se desarrolla el régimen jurídico de las entidades colaboradoras de la administración hidráulica en materia de control y vigilancia de calidad de las aguas y de gestión de los vertidos al dominio público hidráulico.
- Orden MAM/3207/2006 por la que se aprueba la ITC-MMA EECC-1/06 Instrucción técnica complementaria sobre determinaciones químicas y microbiológicas para el análisis de las aguas.
- RD 907/2007 por el que se aprueba el Reglamento de Planificación Hidrológica.
- Orden ARM/2656/2008 por la que se aprueba la Instrucción de Planificación Hidrológica.

Este protocolo se ha redactado teniendo en cuenta las siguientes normas:

- UNE – EN 5667-1: 2007 – Parte 1. Guía para el diseño de programas de muestreo y técnicas de muestreo.
- UNE – EN 14996: 2007 – Guía para el aseguramiento de la calidad de las evaluaciones biológicas y ecológicas en el medio ambiente acuático.
- UNE – EN 14184: 2004. Calidad del agua. Guía para el estudio de los macrófitos acuáticos en cursos de agua.

4. EQUIPOS, REACTIVOS Y CONSERVANTES

4.1. TRABAJO DE CAMPO

Equipos y material para la recolección de las muestras

- Rastrillo con mango extensible para aguas someras.
- Gancho en corona con cuerda larga para aguas profundas (potera).
- Draga del tipo Van Veen para aguas profundas.
- Caja o cubo con el fondo de vidrio (Aquascope), para facilitar la visión de los crecimientos y sus coberturas.
- Cinta métrica lavable con plomos para marcar transectos.
- Bandejas de plástico blanco.
- Bolsas de plástico herméticas.
- Recipientes y tubos pequeños de plástico o cristal para recolectar ejemplares pequeños.
- Nevera portátil refrigerada.
- Espátula.
- Pinzas.
- Prensa portátil con pliegos y almohadillas para la conservación en seco.
- Sobres de papel para guardar briófitos.
- GPS.
- Mapas.
- Claves de identificación (ID-TAX).
- Papel vegetal.
- Bolígrafo, lápiz o rotulador resistente al agua. En caso de utilizar etiquetas, éstas deben ser resistentes a la humedad.
- Lupa 10X aumentos.
- Cámara fotográfica, preferentemente con objetivo macro y con filtros polarizadores.



- Sonda multiparamétrica.
- Formaldehído (HCHO) al 4% v/v.
- Alcohol etílico con glicerina y agua (líquido de *Kew* modificado) en proporción 65%, 5% y 30%
- Hoja de campo para muestreo (anexo I)

Equipos adicionales para el muestreo con embarcación

- Embarcación adecuada para las condiciones locales con el equipo de seguridad apropiado (salvavidas).
- Cuerdas y boyas para fijar transectos.
- Profundímetro o cinta métrica lastrada para medir profundidades.
- Cámara fotográfica sumergible.

Equipos y material complementario

- Botas o vadeadores.
- Guantes de látex.
- Salvavidas.
- Equipo de buceo (neopreno, tubo y gafas)

Todo el material utilizado en campo deberá estar convenientemente limpio y desinfectado para evitar el transporte y la dispersión de propágulos o individuos de especies invasoras, siguiendo los protocolos establecidos por el organismo de cuenca competente.

4.2. TRABAJO DE LABORATORIO

Equipos para el análisis de muestras

- Claves de identificación (ID-TAX)
- Lupa binocular
- Microscopio óptico
- Cámara fotográfica
- Bandejas de plástico blanco
- Pinzas
- Tubos de plástico pequeños
- Papel vegetal
- Lápiz o rotulador indeleble
- Placas de Petri
- Portaobjetos
- Cubres
- Agua destilada
- Guantes
- Gelatina glicerizada según Kaiser para hacer preparaciones microscópicas permanentes.
- Ácido acético o clorhídrico diluido para eliminar las deposiciones de carbonatos
- Lugol
- Azul de metileno y carmín acético para teñir estructuras celulares
- Hoja de laboratorio (anexo II)

Tanto para el trabajo de campo como de laboratorio se deberán tomar todas aquellas medidas necesarias para garantizar que los trabajos se desarrollan en unas condiciones adecuadas de seguridad e higiene.



5. SELECCIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PUNTO DE MUESTREO

El punto de muestreo será un tramo seleccionado de aproximadamente 100 m, representativo de las características físicas y estructurales de la masa de agua. Para su selección y delimitación se tendrán en cuenta los siguientes aspectos:

- El tramo incluirá los hábitats característicos y más frecuentes de la masa de agua: rápidos, remansos, balsas marginales, pozas, etc.
- Se evitará muestrear en tramos en los que existan infraestructuras viales o hidráulicas (puentes, estaciones de aforo, azudes...) las cuales suelen modificar la estructura del sustrato, régimen de caudal y grado de sombra; en general estas infraestructuras suelen favorecer el crecimiento de los macrófitos. Así como aquellos que presenten una turbidez elevada.

El muestreo debe llevarse a cabo en la zona de cauce inundada durante la mayor parte del año (canal bajo) y en la zona del cauce inundable en crecidas ordinarias en un período aproximado de dos años (orilla).

El tramo seleccionado se delimitará mediante la anotación de las coordenadas UTM (medidas con GPS) del punto de inicio y final.

6. FRECUENCIA Y ÉPOCA DE MUESTREO

Los muestreos serán anuales y deberán realizarse durante el periodo vegetativo de las especies, que suele ser entre primavera y otoño. No obstante el periodo óptimo puede variar con las condiciones climáticas características de cada tipo de masa de agua y con la especie. Es necesario tener en cuenta que la recolección de ejemplares inmaduros puede dificultar la identificación.

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

7. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO

Los grupos de macrófitos que se consideran son macroalgas, briófitos (musgos y hepáticas), pteridófitos, angiospermas y otros grupos como líquenes acuáticos, etc, siendo necesaria una identificación a nivel específico en el caso de fanerógamas, musgos y algunas macroalgas, y a nivel de género en el caso de la mayoría de las macroalgas. Para ello resulta recomendable realizar un trabajo previo de gabinete para familiarizarse con la determinación de los taxones presentes en el tipo de río, y más concretamente, en la masa de agua a muestrear, así como recopilar material de apoyo para la identificación en campo (claves de identificación ID-TAX, fotografías, descripciones, etc).

Se realizará un muestreo semicuantitativo que permita obtener el listado de los taxones más relevantes en el tramo y una estimación aproximada de su abundancia a partir de datos de porcentaje de cobertura para cada una de las especies de macrófitos presentes en el tramo.

Se tomarán datos relativos a:

- Rango de cobertura (en porcentaje) de cada taxón en el tramo. En caso de que pueda diferenciarse claramente facies lóxicas y leníticas, se harán estimaciones para cada una de ellas. Cuando los taxones se encuentren espacialmente superpuestos, la suma de sus coberturas podrá superar el 100%.
- Rango de cobertura total (en porcentaje) de macrófitos en el tramo, que no podrá superar el 100%.
- Superficie del tramo de muestreo que no es colonizable por macrófitos, expresado en porcentaje.



Las muestras de macroalgas y briófitos suelen presentar más de un taxón por lo que, a efectos de la cobertura, el valor estimado en el campo se asigna a la especie más abundante en la muestra y al resto de los taxones se les asigna simplemente el valor de presencia más bajo posible (<0,1%).

Las técnicas de recolección de muestras se adecuarán a las características del tramo (tramos vadeables y profundos) y a los distintos tipos de macrófitos tal y como se indica a continuación:

- Especies de pecton (talos aplanados, laminares o esféricos sujetos a un sustrato). Con la ayuda de una pequeña espátula se separará la muestra del sustrato. Posteriormente se introducirá la muestra en un recipiente de plástico y se conservará mediante la adición de formaldehído al 4% o líquido de Kew.
- Especies de plocon (algas filamentosas, fijadas al sustrato por la base pero cuya biomasa se extiende a cierta distancia del fondo) y especies flotantes. Se recogerán a mano o con la ayuda de un rastrillo o potera y se guardarán en bolsas de plástico herméticas, recipientes de plástico o cristal o pliegos de herbario. Posteriormente se conservarán según lo indicado en el apartado 8.

Las pozas profundas poco extensas presentes en tramos vadeables se pueden muestrear con la ayuda de rastrillos con mango telescópico o poteras.

A continuación se describe el procedimiento de muestreo diferenciado para ríos vadeables y no vadeables.

Se considerará río vadeable a efectos del presente protocolo, aquel que pueda ser cruzado a pie en la mayor parte del tramo de muestreo definido o aquel que no pudiendo ser cruzado a pie, pueda alcanzarse, al menos, la mitad de su anchura con seguridad y sin riesgo alguno para el muestreador.

Se considerará río no vadeable a efectos del presente protocolo, aquel en el que no se pueda alcanzar a pie, al menos, la mitad de su anchura.

7.1. RÍOS VADEABLES

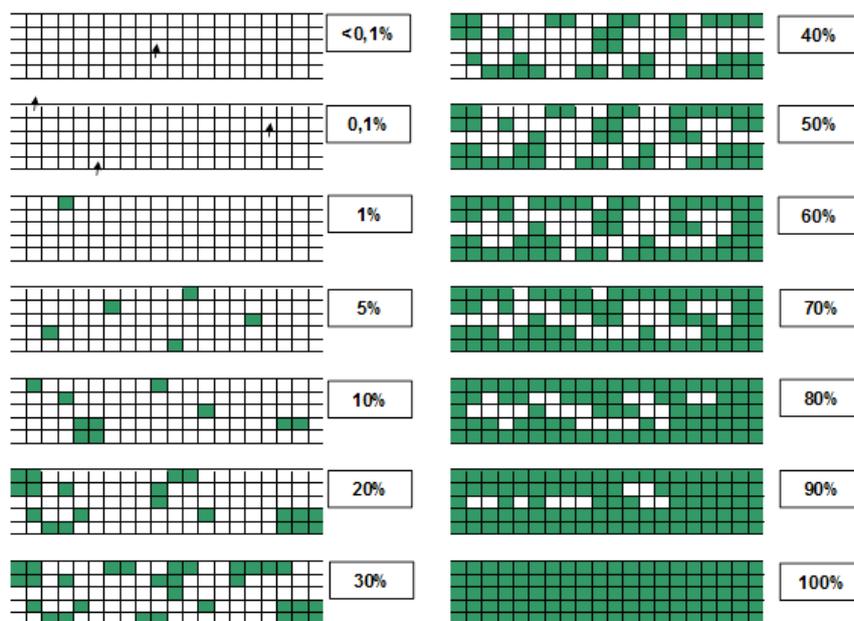
Se recorre el tramo de muestreo en zig-zag (de una orilla a otra) remontando siempre la corriente de aguas abajo a aguas arriba. En ríos anchos (> 10 m) vadeables además será necesario recorrer ambas orillas.

En el curso del recorrido se identifican “*in situ*” los diferentes taxones y se estima su rango de cobertura en el tramo. En el caso de que no se puede identificar con certeza algún taxón, se recogen ejemplares lo más completos posible para su identificación en laboratorio.

El porcentaje de cobertura de los taxones se anota teniendo en cuenta las siguientes clases:

Clases de cobertura (%)
<0,1% -Presencia
0,1 - <1% - Raro
1 - < 5%
5 - <10%
10 - <20%
20 - <30%
30 - <40%
40 - <50%
50 - <60%
60 - <70%
70 - <80%
80 - <90%
90 - 100%

A continuación se presenta una ilustración de apoyo a la estima de coberturas:



Además será necesario recoger la información necesaria para completar la hoja de campo del anexo I; en particular, las características hidromorfológicas del tramo incluyendo la anchura, profundidad y longitud medias del tramo, que podrán correlacionarse con otros parámetros hidrológicos, así como el tipo de sustrato expresado en porcentaje y la velocidad predominante del agua. Se deberían incluir comentarios sobre el hábitat, como la geología del sustrato, que permitirá inferir la naturaleza geoquímica del agua, y la distribución longitudinal aproximada de las facies lítica o lenítica en el punto de muestreo, que permitirá el cálculo del porcentaje de las facies sobre la superficie total considerada, para estimar la heterogeneidad del tramo.

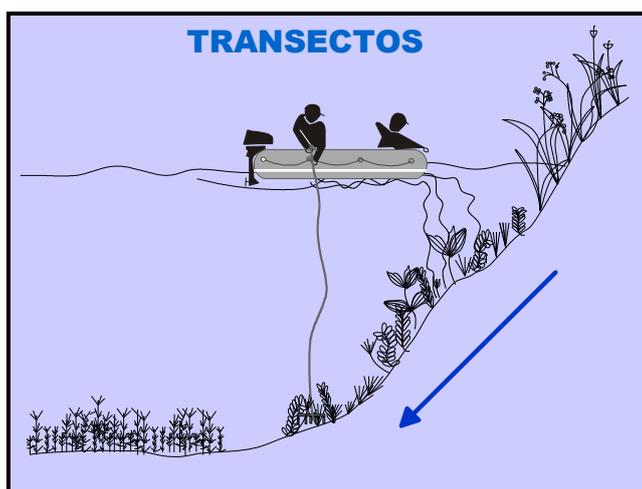
7.2. RÍOS NO VADEABLES

El muestreo en ríos no vadeables se realizará desde la orilla o embarcación, en función de la navegabilidad del tramo de muestreo seleccionado.

En ríos **no navegables**, el muestreo se realizará desde la orilla en puntos separados entre sí 5 m (o la distancia acorde con la escala de trabajo), siendo la franja de muestreo de aproximadamente unos 2 m (longitud de la cuerda de la potera).

En ríos **navegables**, el muestreo se realizará desde una embarcación. La navegación podrá ser en zig-zag o bien mediante el recorrido de una orilla y posteriormente la otra. Se extraerán los macrófitos con poteras y dragas cada 5 m.

Los transectos se localizarán mediante coordenadas del punto de inicio y final obtenidas con GPS. Resulta también recomendable tomar nota de posibles particularidades en la orilla que permitan identificar los puntos de muestreo en visitas posteriores.



En caso de que, en ríos de aguas turbias, profundas y no aptas para el buceo, no se puedan cuantificar las coberturas de las especies de forma precisa, éstas se estimarán de forma indirecta a partir de las muestras obtenidas con draga, potera o rastrillo a lo largo de los transectos, según lo indicado en la siguiente tabla:

La estimación del porcentaje de cobertura de cada taxón en ríos no vadeables se realizará utilizando la siguiente escala:

Escala	Descriptor (presencia de vegetación en la potera o rastrillo)
1	Algunos fragmentos
2	Cantidades pequeñas
3	Cantidades medias
4	Abundante
5	Muy Abundante

8. CONSERVACIÓN, ETIQUETADO Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

Se recomienda obtener y conservar muestras de las diferentes especies cuando no se tenga total certeza en la identificación "*in situ*".

Conservación en campo

Las muestras recogidas en campo se guardarán en fresco en viales (macroalgas) o bolsas de plástico herméticas (plantas vasculares), en nevera hasta su identificación o conservación permanente.

Conservación permanente

- Macroalgas y plantas vasculares de pequeño tamaño en viales herméticos o pequeñas bolsas de plástico herméticas, con una solución de formaldehído al 4%. También se pueden conservar en pliegos al igual que las plantas vasculares de mayor tamaño.
- Briófitos. Dejar secar al aire y guardar en sobres de papel.
- Plantas vasculares de tamaño grande. Se conservarán en seco y se colocará el ejemplar entre hojas de papel secante que se prensará durante 3-5 días, cambiando el papel cada dos días hasta que la planta esté lo suficientemente seca. Será necesario guardar las plantas convenientemente etiquetadas en pliegos de papel blanco.



Etiquetado

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

Se utilizará un rotulador resistente al agua o lápiz sobre papel vegetal.

Transporte

Todas las muestras se preservarán de la exposición a la luz. Los viales y recipientes de muestras fijadas con formol se cerrarán con cinta aislante y se transportarán en una nevera. Las muestras en fresco se transportarán en nevera con hielo. Las muestras prensadas se transportarán en la propia prensa.

9. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS EN LABORATORIO

Puede resultar necesario identificar las muestras en laboratorio para lo que, en algunos casos, habrá que hacer preparaciones para eliminar las incrustaciones de carbonatos presentes en determinadas algas o visualizar estructuras.

9.1. IDENTIFICACIÓN Y RECuento DE TAXONES

La identificación de los taxones se realizará mediante la observación de características morfológicas, utilizando una lupa binocular o microscopio óptico y siguiendo guías apropiadas de identificación al nivel requerido. Como referencia principal se utilizará el Catálogo y claves de identificación de organismos del grupo macrófitos utilizados como elementos de calidad biológicos en las redes de control del estado ecológico elaborada por la Dirección General del Agua (ID-TAX).

La resolución taxonómica requerida para poder obtener las métricas utilizadas para clasificar el estado ecológico de las masas de agua difiere según el grupo, siendo necesaria una identificación a nivel específico en el caso de plantas vasculares, briófitos y algunas macroalgas y a nivel de género en el caso de la mayoría de las macroalgas

Los géneros de macroalgas que deben identificarse hasta el nivel de especie son: *Chara*, *Didymosphenia*, *Hydrodictyon*, *Nitella*, *Stigeoclonium* y *Tolypella*.

En el caso de métricas que consideran identificaciones a niveles superiores a género se deberán incluir los datos de cobertura agrupados para los grupos requeridos por éstas.

Para la identificación de macroalgas es recomendable la realización de preparaciones microscópicas y el uso de reactivos:

- Ácido acético o clorhídrico según convenga, para eliminar los carbonatos de las algas incrustantes o las incrustaciones que diversos grupos algales pueden presentar y que dificultan la identificación (por ejemplo, Caráceas).
- Azul de metileno y carmín acético para teñir estructuras celulares.

Los briófitos y plantas vasculares recogidas y mantenidas en la prensa de campo se identificarán y conservarán de forma permanente en seco: los briófitos en sobres de papel y las plantas vasculares en pliegos de hojas blancas.

En caso de realizar preparaciones microscópicas de macroalgas, se montarán en gelatina glicerizada o en un medio apropiado, y se sellarán con laca de uñas.

Los ejemplares fotografiados se documentarán y formarán parte de la colección de referencia.



Una vez realizado el tratamiento de la muestra en laboratorio se rellenarán los resultados en la hoja de laboratorio incluida en el anexo II de este protocolo.

10. PROCESADO DE LOS DATOS

Los resultados del muestreo y el análisis en laboratorio consistirán en:

- Inventario de taxones obtenidos y su cobertura en porcentaje.
- Coberturas de grupos taxonómicos requeridos por métricas.
- Cobertura en porcentaje del sustrato potencialmente no colonizable.
- Hoja de campo para muestreo y hoja de laboratorio completadas.

ANEXO I: HOJA DE CAMPO PARA MUESTREO



MINISTERIO
DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN
Y MEDIO AMBIENTE

TOMA DE DATOS MUESTREO: MACRÓFITOS EN RÍOS

DATOS IDENTIFICATIVOS DEL MUESTREO

TIPO DE LA MASA DE AGUA:		CÓDIGO DE LA MASA DE AGUA:	
NOMBRE DE LA MASA DE AGUA:			
CÓDIGO DEL PUNTO DE MUESTREO:	COORDENADAS X/Y (ETRS 89): /		HUSO:
ORGANISMO/EMPRESA:			
MUESTREADOR:		Programa o subprograma:	Vigilancia:
CODIGO MUESTRA:	Nº DE BOTES:		Operativo:
FECHA: / /	Hora inicio: :		Investigación:
	Hora fin: :		Referencia:
CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA: <input type="checkbox"/> Líquido de Kew <input type="checkbox"/> Formaldehído			

Descripción de acceso y localización del tramo:

CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS

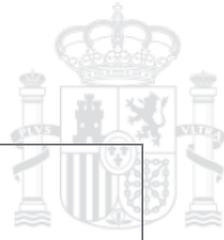
pH (unidades):	Oxígeno disuelto (mg O ₂ /l):
Temperatura del agua (°C):	% Saturación O ₂ :
Conductividad eléctrica a 20°C (µS/cm):	
Observaciones:	

CARACTERÍSTICAS HIDROMORFOLÓGICAS

Anchura media (m) del tramo:	Profundidad media (m) del tramo:	Longitud (m) del tramo:
Procentaje de superficie vegetada:	Porcentaje de sustrato potencialmente no colonizable:	Porcentaje de iluminación/sombreado:
TIPO DE SUSTRATO	NÚMERO DE UNIDADES DE MUESTREO	CÓDIGO FOTO
Rocas y bolos		
Cantos, gravas y gujarros		
Arena, limo y arcilla		
Raíces y troncos		
Turba y tierra		
Artificial		

VELOCIDAD PREDOMINANTE DEL AGUA (marcar con X)

Nula: Ausencia de flujo		
Reducida: Flujo laminar sin ondulaciones		
Moderada: Ondulación superficial pequeña simétrica		
Rápida: Ondulación superficial quebrada		
Muy rápida: Rápidos, formación de espuma		



Comentarios sobre el hábitat:

A large, empty rectangular box with a thin black border, intended for providing comments on the habitat. It spans most of the width of the page below the text label.

ANEXO II: HOJA DE LABORATORIO

PROTOCOLO DE CÁLCULO DEL ÍNDICE IBMWP

CÓDIGO: IBMWP-2013

Aprobado por instrucción del Secretario de Estado de Medio Ambiente de fecha 22 de noviembre de 2013



Este documento pertenece a una serie de protocolos de muestreo, laboratorio y cálculo de índices y métricas para su utilización en los programas de seguimiento del estado de las masas de agua continentales (ríos, lagos y embalses) y en la clasificación del estado ecológico.

Las especificaciones de estos documentos deberán ser tenidas en cuenta por los Organismos de cuenca en la explotación de las redes oficiales de seguimiento del estado y potencial ecológico en las masas de agua superficiales continentales, bien directamente o a través de contratos de servicios. Estos protocolos están sujetos a los cambios que se consideren necesarios en virtud del progreso científico de la materia.



MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE

Edita:

© Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
Secretaría General Técnica
Centro de Publicaciones

Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado:

<http://publicacionesoficiales.boe.es/>

NIPO: 770-11-308-X



INDICE

1. APLICABILIDAD	5
2. OBJETIVO	5
3. NORMATIVA DE REFERENCIA	5
4. DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ÍNDICE IBMWP.....	6
5. TRATAMIENTO DE LOS DATOS.....	6
ANEXO I: PUNTUACIÓN DE LAS FAMILIAS PARA EL CÁLCULO DE IBMWP	7



1. APLICABILIDAD

Este protocolo para el cálculo del índice IBMWP es de obligada aplicación en la explotación de las redes oficiales de evaluación del estado / potencial ecológico en cumplimiento de la Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, que explotan las Confederaciones Hidrográficas (CCHH), bien directamente o a través de contratos de servicios.

Este protocolo se aplica al cálculo del índice IBMWP a partir de muestras tomadas mediante el protocolo de muestreo y laboratorio de invertebrados bentónicos en ríos vadeables (ML-Rv-I-2013) en las masas de agua de la categoría ríos y en las masas de agua artificiales o muy modificadas asimilables a ríos.

El cálculo del índice IBMWP para la clasificación del estado / potencial ecológico mediante el elemento de calidad fauna bentónica de invertebrados, se realizará mediante la aplicación del presente protocolo.

2. OBJETIVO

La Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, establece que los Estados miembros deberán poner en marcha programas de seguimiento. Estos programas de seguimiento deben permitir controlar y evaluar la composición y abundancia de la fauna bentónica de invertebrados.

Por lo tanto, el objetivo de este protocolo es establecer un método de cálculo del índice IBMWP, de forma que el suministro de información sea de calidad y de comparabilidad científica equivalente entre las Demarcaciones Hidrográficas, garantizando de este modo el cumplimiento de los requisitos mencionados anteriormente.

3. NORMATIVA DE REFERENCIA

La normativa de referencia de este protocolo es la que se enumera a continuación:

- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- RD Legislativo 1/2001 por el que se aprueba el Texto Refundido de la Ley de Aguas.
- RD 907/2007 por el que se aprueba el Reglamento de Planificación Hidrológica.
- Orden MAM/3207/2006 por el que se aprueba la ITC-MMA EECC-1/06 Instrucción técnica complementaria sobre determinaciones químicas y microbiológicas para el análisis de las aguas.
- Orden ARM/2656/2008 por la que se aprueba la Instrucción de Planificación Hidrológica.
- Orden MAM/985/2006 por la que se desarrolla el régimen jurídico de las entidades colaboradoras de la administración hidráulica en materia de control y vigilancia de calidad de las aguas y de gestión de los vertidos al dominio público hidráulico.

Otra documentación de referencia:

- Alba-Tercedor y Sánchez-Ortega, 1988 - Un método rápido y simple para evaluar la calidad biológica de las aguas corrientes basado en el de Hallawell (1978). *Limnética*, 4: 51 – 56
- Alba-Tercedor, J., Jáimez-Cuéllar, P., Álvarez, M., Avilés, J., Bonada, N., Casas, J., Mellado, A., Ortega, M., Pardo, I., Prat, N., Rieradevall, M., Robles, S., Sáinz-Cantero, C.E., Sánchez-Ortega, A., Suárez, M.L., Toro, M., Vidal-Abarca, M.R., Vivas, S., Zamora-Múñoz, C. (2004). Caracterización del estado ecológico de ríos mediterráneos ibéricos mediante el índice IBMWP antes BMWP'. *Limnética*, 21(2002): 21, 3-4: 175-185
- Jáimez-Cuéllar, P., Vivas, S., Bonada, N., Robles, S., Mellado, A., Álvarez, M., Avilés, J., Casas, J., Ortega, M., Pardo, I., Prat, N., Rieradevall, M., Sáinz-Cantero, C., Sánchez-Ortega,



A., Suárez, M. L., Toro, M., Vidal-Abarca, M. R., Zamora-Muñoz, C., Alba-Tercedor, J. (2004). Protocolo GUADALMED (PRECE). *Limnética*, 21(2002): 21, 3-4: 187-204

- Ministerio de Medio Ambiente (2007). Metodología para el establecimiento del estado ecológico según la Directiva Marco del Agua en la Confederación Hidrográfica del Ebro.

4. DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ÍNDICE IBMWP

El procedimiento para el cálculo del índice IBMWP requiere la identificación previa en campo (visu) y el procesado en laboratorio de las diferentes familias recogidas mediante el protocolo de muestreo y laboratorio de fauna bentónica de invertebrados en ríos vadeables (ML-Rv-I-2013) elaborado por la Dirección General del Agua.

Una vez procesada y analizada la muestra (en campo y laboratorio) se anotan las familias y se asignan las puntuaciones correspondientes (tabla de puntuaciones en anexo I) y se van sumando hasta obtener un valor final, que será el resultado del índice IBMWP.

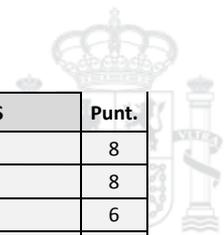
5. TRATAMIENTO DE LOS DATOS

Con la puntuación del IBMWP, obtenida según el procedimiento descrito en el punto anterior, se procederá a determinar el estado / potencial ecológico de la masa de agua. Para esta clasificación se deberán tener en cuenta las fronteras de estado ecológico establecidas legalmente para el indicador IBMWP en el tipo de masa de agua que corresponda.

En este sentido habrá que comparar el valor de IBMWP obtenido en el muestreo con el valor de referencia establecido para el tipo de masa de agua en cuestión para obtener un Ratio de Calidad Ecológica (RCE). El valor final del RCE obtenido se compara con los valores frontera del tipo de masa de agua para la métrica IBMWP y se clasifica el estado ecológico.

Ratio de Calidad Ecológica = Valor Observado / Valor de referencia

**ANEXO I: PUNTUACIÓN DE LAS FAMILIAS PARA EL
CÁLCULO DE IBMWP**



CÓDIGO	ARÁCNIDOS	Punt.
ACA001SPOR	Acariformes ¹	4

CÓDIGO	COLEÓPTEROS	Punt.
CHR009FAMI	Chrysomelidae	4
CUR001FAMI	Curculionidae	4
DRY001FAMI	Dryopidae	5
DYT001FAMI	Dytiscidae	3
ELM001FAMI	Elmidae	5
GYR001FAMI	Gyrinidae	3
HAL002FAMI	Haliplidae	4
HEL002FAMI	Helophoridae	5
HYD008FAMI	Hydraenidae	5
HYD013FAMI	Hydrochidae	5
HYD011FAMI	Hydrophilidae	3
HYG001FAMI	Hygrobiidae	3
NOT004FAMI	Noteridae	3
PSE004FAMI	Psephenidae	3
SCIO01FAMI	Scirtidae (=Helodidae)	3

CÓDIGO	CRUSTÁCEOS	Punt.
ASE001FAMI	Asellidae	3
AST003FAMI	Astacidae	8
ATY001FAMI	Atyidae	6
COR003FAMI	Corophiidae	6
GAM001FAMI	Gammaridae	6
OST001CLAS	Ostracoda	3
PAL004FAMI	Palaemonidae	6

CÓDIGO	DÍPTEROS	Punt.
ANT004FAMI	Anthomyiidae ²	4
ATH001FAMI	Athericidae	10
BLE001FAMI	Blephariceridae	10
CER006FAMI	Ceratopogonidae	4
CHIO01FAMI	Chironomidae	2
CUL001FAMI	Culicidae	2
DIX001FAMI	Dixidae	4
DOL001FAMI	Dolichopodidae	4
EMP001FAMI	Empididae	4
EPH003FAMI	Ephydriidae	2
LIM005FAMI	Limoniidae	4
PSY001FAMI	Psychodidae	4
PTY001FAMI	Ptychopteridae	4
RHA004FAMI	Rhagionidae	4
SCA002FAMI	Scatophagidae ²	4
SCIO02FAMI	Sciomyzidae	4
SIM002FAMI	Simuliidae	5
STRO03FAMI	Stratiomyidae	4
SYRO02FAMI	Syrphidae	1
TAB002FAMI	Tabanidae	4
THA003FAMI	Thaumaleidae	2
TIP001FAMI	Tipulidae	5

CÓDIGO	EFEMERÓPTEROS	Punt.
BAE001FAMI	Baetidae	4
CAE001FAMI	Caenidae	4
EPH002FAMI	Ephemerellidae	7
EPH001FAMI	Ephemeridae	10
HEP001FAMI	Heptageniidae	10
LEP003FAMI	Leptophlebiidae	10
OLI002FAMI	Oligoneuriidae	5
POL020FAMI	Polymitarcidae	5
POT003FAMI	Potamanthidae	10
PRO010FAMI	Prosopistomatidae	7
SIP001FAMI	Siphonuridae	10

CÓDIGO	HETERÓPTEROS	Punt.
APH001FAMI	Aphelocheiridae	10
COR004FAMI	Corixidae	3
GER002FAMI	Gerridae	3
HYD014FAMI	Hydrometridae	3
MES001FAMI	Mesoveliidae	3
NAU001FAMI	Naucoridae	3
NEP002FAMI	Nepidae	3
NOT003FAMI	Notonectidae	3
PLE004FAMI	Pleidae	3
VEL001FAMI	Veliidae	3

CÓDIGO	HIRUDÍNEOS	Punt.
ERP001FAMI	Erpobdellidae	3
GLO005FAMI	Glossiphoniidae	3
HIR002FAMI	Hirudidae (=Hirudinidae)	3
PIS003FAMI	Piscicolidae	4

CÓDIGO	NEURÓPTEROS	Punt.
SIA001FAMI	Sialidae	4

CÓDIGO	LEPIDÓPTEROS	Punt.
PYR004FAMI	Crambidae (=Pyrallidae)	4

CÓDIGO	MOLUSCOS	Punt.
ANC001FAMI	Ancylidae	6
BIT001FAMI	Bithyniidae	3
FER002GENE	Ferrissia ³	6
HYD005FAMI	Hydrobiidae	3
LYM001FAMI	Lymnaeidae	3
NER001FAMI	Neritidae	6
PHY003FAMI	Physidae	3
PLA003FAMI	Planorbidae ⁴	3
SPH006FAMI	Sphaeriidae	3
THI001FAMI	Thiaridae	6
UNI001FAMI	Unionidae	6
VAL001FAMI	Valvatidae	3
VIV001FAMI	Viviparidae	6

CÓDIGO	ODONATOS	Punt.
AES001FAMI	Aeshnidae	8
CAL004FAMI	Calopterygidae	8
COE001FAMI	Coenagrionidae	6
COR012FAMI	Cordulegasteridae	8
COR008FAMI	Corduliidae	8
GOM003FAMI	Gomphidae	8
LES001FAMI	Lestidae	8
LIB001FAMI	Libellulidae	8
PLA004FAMI	Platycnemididae	6

CÓDIGO	OLIGOQUETOS	Punt.
Todos		1

CÓDIGO	PLECÓPTEROS	Punt.
CAP003FAMI	Capniidae	10
CHL004FAMI	Chloroperlidae	10
LEU004FAMI	Leuctridae	10
NEM001FAMI	Nemouridae	7
PER004FAMI	Perlidae	10
PER006FAMI	Perlodidae	10
TAE001FAMI	Taeniopterygidae	10

CÓDIGO	TRICÓPTEROS	Punt.
BER001FAMI	Beraeidae	10
BRA006FAMI	Brachycentridae	10
CAL002FAMI	Calamoceratidae	10
ECN001FAMI	Ecnomidae	7
GLO004FAMI	Glossosomatidae	8
GOE001FAMI	Goeridae	10
HYD006FAMI	Hydropsychidae	5
HYD012FAMI	Hydroptilidae	6
LEP008FAMI	Lepidostomatidae	10
LEP004FAMI	Leptoceridae	10
LIM002FAMI	Limnephilidae	7
MOL001FAMI	Molannidae	10
ODO001FAMI	Odontoceridae	10
PHI001FAMI	Philopotamidae	8
PHR002FAMI	Phryganeidae	10
POL003FAMI	Polycentropodidae	7
PSY002FAMI	Psychomyiidae	8
RHY001FAMI	Rhyacophilidae	7
SER001FAMI	Sericostomatidae	10
UEN001FAMI	Uenoidae (=Thremmatidae)	10

CÓDIGO	TURBELARIOS	Punt.
DEN001FAMI	Dendrocoelidae	5
DUG001FAMI	Dugesidae	5
PLA005FAMI	Planariidae	5

¹ El suborden Hidracarina ha pasado a ser el superorden Acariformes

² Anthomyiidae y Scatophagidae se agrupaban antes como Muscidae

³ La Familia Ferrissidae ha pasado a ser el Género Ferrissia

⁴ Todos los géneros excepto Ferrissia

PROTOCOLO PARA EL CÁLCULO DEL ÍNDICE IBCAEL DE INVERTEBRADOS EN LAGOS

CÓDIGO: IBCAEL-2013
Versión 1

Aprobado por instrucción del Secretario de Estado de Medio Ambiente de fecha 22 de noviembre de 2013



**GOBIERNO
DE ESPAÑA**

**MINISTERIO
DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN
Y MEDIO AMBIENTE**

Este documento pertenece a una serie de protocolos de muestreo, laboratorio y cálculo de índices y métricas para su utilización en los programas de seguimiento del estado de las masas de agua continentales (ríos, lagos y embalses) y en la clasificación del estado ecológico.

Las especificaciones de estos documentos deberán ser tenidas en cuenta por los Organismos de cuenca en la explotación de las redes oficiales de seguimiento del estado y potencial ecológico en las masas de agua superficiales continentales, bien directamente o a través de contratos de servicios. Estos protocolos están sujetos a los cambios que se consideren necesarios en virtud del progreso científico de la materia.



MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE

Edita:

© Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
Secretaría General Técnica
Centro de Publicaciones

Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado:
<http://publicacionesoficiales.boe.es/>

NIPO: 280-12-023-X



ACTUALIZACIÓN Y CORRECCIÓN DE ERRORES

Versión del protocolo	Fecha	Modificaciones
Versión 1	19/12/2014	Se incluyen modificaciones en el texto del apartado 4.1 Cálculo del Índice ABCO y en la tabla del apartado 4.2 Cálculo del Índice RIC.



INDICE

1.	APLICABILIDAD	6
2.	OBJETIVO	6
3.	NORMATIVA DE REFERENCIA	6
4.	DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ÍNDICE IBCAEL	7
4.1.	CÁLCULO DEL ÍNDICE ABCO	8
4.2.	CÁLCULO DEL ÍNDICE RIC	8
5.	TRATAMIENTO DE LOS DATOS.....	9
	ANEXO I: TAXONES SENSIBLES PARA EL CÁLCULO DEL ABCO	10
	ANEXO II: CONDICIONES DE REFERENCIA Y VALORES FRONTERA.....	14



1. APLICABILIDAD

Este protocolo para el cálculo del índice IBCAEL es de obligada aplicación en la explotación de las redes oficiales de evaluación del estado / potencial ecológico en cumplimiento de la Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, que explotan las Confederaciones Hidrográficas (CCHH), bien directamente o a través de contratos de servicios.

Este protocolo se aplica a muestras tomadas mediante el Protocolo de muestreo y laboratorio de invertebrados bentónicos en lagos (ML-L-I-2013) en masas de agua naturales de la categoría lagos (lagos, lagunas y humedales) que aparecen en la Orden ARM/2656/2008, de 10 de septiembre, por la que se aprueba la Instrucción de Planificación Hidrológica (IPH)

El cálculo del índice IBCAEL para la clasificación del estado ecológico mediante el elemento de calidad fauna bentónica de invertebrados en lagos, se realizará mediante la aplicación del presente protocolo.

2. OBJETIVO

La Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, establece que los Estados miembros deberán poner en marcha programas de seguimiento. Estos programas de seguimiento deben permitir controlar y evaluar la composición y abundancia de la fauna bentónica de invertebrados.

Por lo tanto, el objetivo de este protocolo es establecer un método de cálculo del índice IBCAEL, de forma que el suministro de información sea de calidad y de comparabilidad científica equivalente entre Demarcaciones Hidrográficas, garantizando de este modo el cumplimiento de los requisitos mencionados anteriormente.

3. NORMATIVA DE REFERENCIA

La normativa de referencia de este protocolo es la que se enumera a continuación:

- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- RD Legislativo 1/2001 por el que se aprueba el Texto Refundido de la Ley de Aguas.
- RD 907/2007 por el que se aprueba el Reglamento de Planificación Hidrológica.
- Orden MAM/3207/2006 por la que se aprueba la ITC-MMA EECC-1/06 Instrucción técnica complementaria sobre determinaciones químicas y microbiológicas para el análisis de las aguas.
- Orden ARM/2656/2008 por la que se aprueba la Instrucción de Planificación Hidrológica.
- Orden MAM/985/2006 por la que se desarrolla el régimen jurídico de las entidades colaboradoras de la administración hidráulica en materia de control y vigilancia de calidad de las aguas y de gestión de los vertidos al dominio público hidráulico.
- Protocolo de muestreo y laboratorio de invertebrados bentónicos en lagos (ML-L-I-2013)

Asimismo se ha considerado también la siguiente referencia:

- Tesoro para la clasificación del estado ecológico de las masas de agua continentales (TAXAGUA¹)

¹ <http://www.magrama.es/es/agua/temas/estado-y-calidad-de-las-aguas/aguas-superficiales/programas-seguimiento/TAXAGUA.aspx>



4. DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ÍNDICE IBCAEL

Datos de partida

El procedimiento para el cálculo del índice IBCAEL requiere el muestreo, la identificación y el procesado en laboratorio de las diferentes especies de invertebrados identificadas mediante el protocolo de muestreo y laboratorio de invertebrados bentónicos en lagos (ML-L-I-2013)

Una vez procesada y analizada la muestra se obtiene la hoja de laboratorio del anexo II del protocolo de muestreo que contiene todas las especies identificadas y abundancia de Copépodos, Branquiópodos y Ostrácodos para el cálculo del índice ABCO. Además se dispondrá de un listado de otros invertebrados identificados (adultos de coleópteros y heterópteros y familias de larvas y pupas de insectos) pertinentes para el cálculo del índice RIC.

A partir del listado de taxones para el cálculo del RIC se obtendrá el número de géneros de coleópteros adultos, el número de géneros de heterópteros adultos, el número de familias de larvas de insectos y el número de familias de pupas de insectos.

Identificación del tipo de masa de agua

Una vez que se dispongan de los resultados del muestreo tal y como se ha indicado anteriormente, es preciso determinar el tipo IBCAEL en el que se encuentra la masa de agua objeto de evaluación. Para ello, en la siguiente tabla se presenta la relación de los tipos de lagos establecidos en la Instrucción de Planificación Hidrológica con los tipos de lagos establecidos para el desarrollo de la métrica IBCAEL.

Tabla 1 Correspondencia entre los tipos IBCAEL y los tipos de lagos IPH

Tipo IBCAEL	Denominación	Tipo de Masa de Agua IPH
1	Alta montaña	1, 2, 3, 4, 5 y 9
2	Media montaña y cárstico calcáreo	6, 7, 8, 10, 11 y 12
3	Cárstico evaporitas y cuenca de sedimentación de origen fluvial	14, 15, 24, 25, 26, 27 y 29
4	Interior en cuenca de sedimentación, permanente, mineralización baja o media	16 y 18
5	Interior en cuenca de sedimentación, permanente, mineralización alta o muy alta y litoral sin influencia marina	20 y 28
6	Interior en cuenca de sedimentación, permanente, hipersalino	22
7	Cárstico calcáreo, interior en cuenca de sedimentación y litoral en complejo dunar, temporal	13, 17 y 30 ²
8	Interior en cuenca de sedimentación, temporal, mineralización media y alta	19 y 21
9	Interior en cuenca de sedimentación, temporal, hipersalino	23

Cálculo del índice

La fórmula que deberá utilizarse para obtener el valor final del índice es:

$$IBCAEL = (ABCO + 1) * \log(RIC + 1)$$

Dónde:

- Índice ABCO (Abundancia de Branquiópodos, Copépodos y Ostrácodos) que valora la estructura y composición de las asociaciones de crustáceos.
- Índice RIC (Riqueza de Insectos y Crustáceos) que valora la riqueza taxonómica de insectos y crustáceos del conjunto de la comunidad bentónica de un modo simplificado.

² El tipo 30 de la IPH ha quedado incluido en el tipo IBCAEL 7 debido a su grado de mineralización.



Por tanto, una vez identificado el tipo IBCAEL de la masa de agua en cuestión, es necesario proceder con el cálculo de las dos métricas que componen el índice tal y como queda reflejado en la fórmula.

4.1. CÁLCULO DEL ÍNDICE ABCO

El valor del ABCO se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$ABCO = \sum_{i=1}^j ki \times ni$$

$$ni = \frac{Ni}{N_{tot}}$$

Dónde:

- | | | | |
|------|------------------------------------------------|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| i = | taxones indicadores del tipo de lago | ni = | abundancia relativa del taxón i |
| j = | número de taxones indicadores del tipo de lago | Ni = | número de individuos del taxón i |
| ki = | valor de sensibilidad del taxón i | N _{tot} = | suma del número total de individuos de taxones indicadores del tipo de lago muestreados en ABCO |

Para proceder con el cálculo se toman los resultados de la hoja de laboratorio del anexo II del Protocolo de muestreo y laboratorio de invertebrados bentónicos en lagos (ML-L-I-2013). De esta forma se tendrán las abundancias de las especies pertinentes para el cálculo del ABCO. Estas abundancias deberán expresarse en tanto por uno a efectos de cálculo, para lo que es necesario dividir el número de individuos del taxón indicador por el número total de individuos de los taxones indicadores del tipo obtenidos en la muestra ABCO.

A continuación se multiplica la abundancia relativa de cada una de las especies indicadoras (expresadas en tanto por uno) por el valor de sensibilidad que presente la especie en el tipo de masa de agua aplicable (ver anexo I). De esta forma obtenemos los valores de ABCO para cada una de las especies indicadoras muestreadas, que será necesario sumar para obtener el valor final de ABCO para ese muestreo.

Puesto que para el cálculo del índice ABCO solo se tienen en cuenta los taxones que presentan valores de sensibilidad, puede resultar valor 0 si se da el caso que en una masa de agua no se identifique ninguno de los taxones con valor de sensibilidad para el tipo de masa de agua en cuestión.

4.2. CÁLCULO DEL ÍNDICE RIC

El valor del RIC se calcula por medio de la siguiente fórmula:

$$RIC = A + B + C$$

Dónde:

Métrica	Descripción métrica	Codificación TAXAGUA
A	Número de géneros de crustáceos identificados en la muestra de RIC y en la muestra de ABCO (1)	SUBFILO Crustacea CRU002SBFI
B	Número de géneros de formas adultas de coleópteros y heterópteros (2)	Orden Coleoptera COL001ORDE SUBORDEN Heteroptera HET002SBOR
C	Número de familias de insectos en forma de larvas, ninfas y/o pupas (2)	CLASE Insecta INS001CLAS

(1) Para la determinación del número de géneros de crustáceos se tendrán en cuenta los crustáceos indicadores y no indicadores obtenidos en las muestras de ABCO y RIC. Como en el



inventario aparecerán taxones planctónicos y bentónicos mezclados, los taxones planctónicos se considerarán en el cálculo del RIC, excepto en los tipos 1 y 2 de IBCAEL.

(2) En caso de aparecer adultos de coleópteros y heterópteros junto con larvas o ninfas de estos grupos, tanto el adulto como la larva o ninfa se contarán como dos taxones.

Al número de géneros de crustáceos, se le sumará el número de géneros de los coleópteros y heterópteros adultos presentes en ambas muestras, así como el número de familias de insectos en forma de larva, ninfa y/o pupa.

Los taxones considerados en cada uno de los grupos deben estar incluidos en TAXAGUA. Para poder incluir en el cálculo de la métrica taxones muestreados que estén en la citada aplicación, será necesario solicitar el visto bueno de la Dirección General del Agua.

Para determinar el número de géneros de crustáceos se toman también en consideración los géneros obtenidos en el muestreo ABCO.

5. TRATAMIENTO DE LOS DATOS

Con la puntuación del índice IBCAEL obtenida según el procedimiento descrito en el punto anterior, se procederá a determinar el estado ecológico de la masa de agua.

Para ello se deberán tener en cuenta, hasta que se establezcan legalmente, las condiciones de referencia de estado ecológico para cada tipo de masa de agua y los valores frontera establecidos en el anexo II.

ANEXO I: TAXONES SENSIBLES PARA EL CÁLCULO DEL ABCO



TAXONES SENSIBLES POR TIPO PARA EL CÁLCULO DEL ABCO										
Nombre taxón i = taxones indicadores	CODIGO TAXAGUA sistcodsup/ sistcodinf	TIPOS IBCAEL ³ ki = valor de sensibilidad del taxón i								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
BRANCHIOPODA										
<i>Acroperus angustatus</i>	ACR006ANG130		9	7						
<i>Acroperus harpae</i>	ACR006HAR026	7								
<i>Alona affinis</i>	ALO003AFF041	7	5							
<i>Alona elegans</i>	ALO003ELE075		1	1						
<i>Alona quadrangularis</i>	ALO003QUA094		8	5						
<i>Alona rectangula</i>	ALO003REC056		3		3	7		3		
<i>Alona salina</i>	ALO003SAL065								10	9
<i>Alonella excisa</i>	ALO004EXC040	9	4	1						
<i>Alonella nana</i>	ALO004NAN046	7	3							
<i>Artemia parthenogenetica</i>	ART003PAR030						10			
<i>Bosmina longirostris</i>	BOS002LON138				5					
<i>Branchinecta ferox</i>	BRA015FER007								10	
<i>Branchinectella media</i>	BRA025MED051								9	
<i>Branchipus schaefferi</i>	BRA024SCH124								8	
<i>Ceriodaphnia laticaudata</i>	CER023LAT126				5					
<i>Ceriodaphnia quadrangula</i>	CER023QUA093				7			5		
<i>Ceriodaphnia reticulata</i>	CER023RET027				4			3		
<i>Chirocephalus diaphanus</i>	CHI009DIA028								7	
<i>Chydorus sphaericus</i>	CHY001SPH037	8	2		3			6		
<i>Cyzicus grubei</i>	CYZ001GRU014								7	
<i>Cyzicus tetracerus</i>	CYZ001TET043								6	
<i>Daphnia curvirostris</i>	DAP001CUR077							10		
<i>Daphnia magna</i>	DAP001MAG029			4	3	10		3	7	5
<i>Daphnia mediterranea</i>	DAP001MED050								6	8
<i>Daphnia obtusa</i>	DAP001OBT066							1		
<i>Daphnia pulicaria</i>	DAP001PUL085				2			7		
<i>Dunhevedia crassa</i>	DUN002CRA089								7	
<i>Eurycercus lamellatus</i>	EUR008LAM026	8								
<i>Graptoleberis testudinaria</i>	GRA014TES025	6	3	6						
<i>Isaura mayeti</i>	ISA001MAY008								7	
<i>Macrothrix hirsuticornis</i>	MAC016HIR033	4	1	6		7			3	
<i>Magrebestheria maroccana</i>	MAG002MAR195								7	
<i>Moina brachiata</i>	MOI001BRA082							5	8	
<i>Moina micrura</i>	MOI001MIC081				1					
<i>Moina salina</i>	MOI001SAL067									8
<i>Oxyurella tenuicaudis</i>	OXY011TEN163				8					
<i>Pleuroxus aduncus</i>	PLE017ADU007		4	10	5	6				
<i>Pleuroxus denticulatus</i>	PIC001DEN070				1					
<i>Pleuroxus laevis</i>	PLE017LAE053				7					
<i>Pleuroxus letourneuxi</i>	PLE017LET001								4	
<i>Pleuroxus truncatus</i>	PLE017TRU042		6	10						
<i>Scapholeberis rammneri</i>	SCA009RAM016				5					
<i>Sida crystallina</i>	SID003CRY022		10							
<i>Simocephalus exspinosus</i>	SIM003EXS008				6	6		6		
<i>Simocephalus vetulus</i>	SIM003VET009		7	6	8			7		
COPEPODA										
<i>Arctodiaptomus salinus</i>	ARC013SAL064									9
<i>Acanthocyclops gr. robustus-vernalis</i>	ACA008ROB039 / ACA008VER085				5			5		
<i>Acanthocyclops vernalis</i>	ACA008VER085		1	1						
<i>Arctodiaptomus wierzejskii</i>	ARC013WIE004								10	

³ La Tabla 1 de este protocolo permite consultar la correspondencia entre los tipos IBCAEL y los tipos de masas de agua de la categoría Lagos



TAXONES SENSIBLES POR TIPO PARA EL CÁLCULO DEL ABCO										
Nombre taxón i = taxones indicadores	CODIGO TAXAGUA sistcodsup/ sistcodinf	TIPOS IBCAEL ³ ki = valor de sensibilidad del taxón i								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Canthocamptus staphylinus</i>	CAN002STA040							9		
<i>Cletocamptus retrogressus</i>	CLE001RET006						9			
<i>Cyclops sp. pl.</i>	CYC009GENE				8			5		
<i>Diacyclops bicuspidatus</i>	DIA013BIC075							8	9	
<i>Diacyclops bisetosus</i>	DIA013BIS036							4		
<i>Diaptomus cyaneus</i>	DIA012CYA007							10		
<i>Ectocyclops phaleratus</i>	ECT001PHA023				7					
<i>Eucyclops macruroides</i>	EUC009MAC129		8	7						
<i>Eucyclops serrulatus</i>	EUC009SER067	9	2	9	5					
<i>Hemidiaptomus roubauii</i>	HEM015ROU006								2	
<i>Macrocyclops albidus</i>	MAC015ALB090		7		8					
<i>Megacyclops viridis</i>	MEG004VIR081				10	9		5	1	
<i>Metacyclops minutus</i>	MET013MIN236							7	6	
<i>Mixodiaptomus incrassatus</i>	MIX001INC104							7	4	
<i>Mixodiaptomus kupelwieseri</i>	MIX001KUP002							6		
<i>Neolovenula alluaudi</i>	NEO021ALL017			7				4	5	
<i>Tropocyclops prasinus</i>	TRO009PRA056				6					
OSTRACODA										
<i>Candelacypris aragonica</i>	CAN003ARA019						5			3
<i>Cycloocypris ovum</i>	CYC011OVU008							4		
<i>Cypria ophtalmica</i>	CYP009OPH005				3					
<i>Cypridopsis vidua</i>	CYP007VID007		3	3	8			8		
<i>Eucypris virens</i>	EUC010VIR085				9			5		
<i>Herpetocypris chevreuxi</i>	HER006CHE015				5			7		
<i>Heterocypris barbara</i>	HET013BAR051							4		
<i>Heterocypris incongruens</i>	HET013INC109							5		
<i>Heterocypris salina</i>	HET013SAL069				2		7			10
<i>Plesiocypridopsis newtoni</i>	PLE019NEW004							4		

**ANEXO II: CONDICIONES DE REFERENCIA Y VALORES
FRONTERA**



Condiciones de referencia IBCAEL

Tipos IBCAEL	Denominación	Condición de Referencia (IBCAEL)
1	Alta montaña.	8,62
2	Media montaña y cárstico calcáreo.	4,66
3	Cárstico evaporitas y cuenca de sedimentación de origen fluvial	6,19
4	Interior en cuenca de sedimentación, permanente, mineralización baja o media	12,44
5	Interior en cuenca de sedimentación, permanente, mineralización alta o muy alta y litoral sin influencia marina.	9,2
6	Interior en cuenca de sedimentación, permanente, hipersalino.	6,62
7	Cárstico calcáreo, interior en cuenca de sedimentación y litoral en complejo dunar, temporal.	11,08
8	Interior en cuenca de sedimentación, temporal, mineralización media y alta.	6,78
9	Interior en cuenca de sedimentación, temporal, hipersalino.	9,33

El valor obtenido a partir de los datos de muestreo de una determinada masa de agua se deberá comparar con la condición de referencia que sea aplicable en función del tipo de masa de agua para obtener el Ratio de Calidad Ecológica.

Ratio de Calidad Ecológica (RCE) = Valor Observado / Valor de Referencia

Hasta que los valores frontera no sean establecidos legalmente, el valor final del RCE obtenido se comparará con los valores frontera del tipo de masa de agua para la métrica IBCAEL establecidos en la siguiente tabla.

Valores frontera para la clasificación del estado ecológico mediante el índice IBCAEL

TIPO	ESTADO ECOLÓGICO	Valores frontera IBCAEL	RCE
1	Muy Bueno	IBCAEL \geq 7,96	RCE \geq 0,92
	Bueno	5,97 \leq IBCAEL $<$ 7,96	0,69 \leq RCE $<$ 0,92
	Moderado	3,98 \leq IBCAEL $<$ 5,97	0,46 \leq RCE $<$ 0,69
	Deficiente	1,99 \leq IBCAEL $<$ 3,98	0,23 \leq RCE $<$ 0,46
	Malo	IBCAEL $<$ 1,99	RCE $<$ 0,23
2	Muy Bueno	IBCAEL \geq 4,32	RCE \geq 0,93
	Bueno	3,24 \leq IBCAEL $<$ 4,32	0,69 \leq RCE $<$ 0,93
	Moderado	2,16 \leq IBCAEL $<$ 3,24	0,46 \leq RCE $<$ 0,69
	Deficiente	1,08 \leq IBCAEL $<$ 2,16	0,23 \leq RCE $<$ 0,46
	Malo	IBCAEL $<$ 1,08	RCE $<$ 0,23



TIPO	ESTADO ECOLÓGICO	Valores frontera IBCAEL	RCE
3	Muy Bueno	$IBCAEL \geq 4,84$	$RCE \geq 0,78$
	Bueno	$3,63 \leq IBCAEL < 4,84$	$0,59 \leq RCE < 0,78$
	Moderado	$2,42 \leq IBCAEL < 3,63$	$0,39 \leq RCE < 0,59$
	Deficiente	$1,21 \leq IBCAEL < 2,42$	$0,20 \leq RCE < 0,39$
	Malo	$IBCAEL < 1,21$	$RCE < 0,20$
4	Muy Bueno	$IBCAEL \geq 10,70$	$RCE \geq 0,86$
	Bueno	$7,22 \leq IBCAEL < 10,70$	$0,58 \leq RCE < 0,86$
	Moderado	$6,34 \leq IBCAEL < 7,22$	$0,51 \leq RCE < 0,58$
	Deficiente	$4,85 \leq IBCAEL < 6,34$	$0,39 \leq RCE < 0,51$
	Malo	$IBCAEL < 4,85$	$RCE < 0,39$
5	Muy Bueno	$IBCAEL \geq 7,36$	$RCE \geq 0,80$
	Bueno	$5,52 \leq IBCAEL < 7,36$	$0,60 \leq RCE < 0,80$
	Moderado	$3,68 \leq IBCAEL < 5,52$	$0,40 \leq RCE < 0,60$
	Deficiente	$1,84 \leq IBCAEL < 3,68$	$0,20 \leq RCE < 0,40$
	Malo	$IBCAEL < 1,84$	$RCE < 0,20$
6	Muy Bueno	$IBCAEL \geq 5,94$	$RCE \geq 0,90$
	Bueno	$4,45 \leq IBCAEL < 5,94$	$0,67 \leq RCE < 0,90$
	Moderado	$2,97 \leq IBCAEL < 4,45$	$0,45 \leq RCE < 0,67$
	Deficiente	$1,48 \leq IBCAEL < 2,97$	$0,22 \leq RCE < 0,45$
	Malo	$IBCAEL < 1,48$	$RCE < 0,22$
7	Muy Bueno	$IBCAEL \geq 9,86$	$RCE \geq 0,89$
	Bueno	$7,53 \leq IBCAEL < 9,86$	$0,68 \leq RCE < 0,89$
	Moderado	$6,20 \leq IBCAEL < 7,53$	$0,56 \leq RCE < 0,68$
	Deficiente	$4,99 \leq IBCAEL < 6,20$	$0,45 \leq RCE < 0,56$
	Malo	$IBCAEL < 4,99$	$RCE < 0,45$
8	Muy Bueno	$IBCAEL \geq 5,43$	$RCE \geq 0,80$
	Bueno	$4,07 \leq IBCAEL < 5,43$	$0,60 \leq RCE < 0,80$
	Moderado	$2,71 \leq IBCAEL < 4,07$	$0,40 \leq RCE < 0,60$
	Deficiente	$1,36 \leq IBCAEL < 2,71$	$0,20 \leq RCE < 0,40$
	Malo	$IBCAEL < 1,36$	$RCE < 0,20$
9	Muy Bueno	$IBCAEL \geq 7,85$	$RCE \geq 0,84$
	Bueno	$5,89 \leq IBCAEL < 7,85$	$0,63 \leq RCE < 0,84$
	Moderado	$3,93 \leq IBCAEL < 5,89$	$0,42 \leq RCE < 0,63$
	Deficiente	$1,96 \leq IBCAEL < 3,93$	$0,21 \leq RCE < 0,42$
	Malo	$IBCAEL < 1,96$	$RCE < 0,21$

Una vez comparado el resultado obtenido con la tabla anterior se clasifica el estado ecológico de la masa de agua en cuestión mediante el índice IBCAEL.

PROTOCOLO DE ANÁLISIS Y CÁLCULO DE MÉTRICAS DE FITOPLANCTON EN LAGOS Y EMBALSES

CÓDIGO: MFIT- 2013
Versión 1

Aprobado por instrucción del Secretario de Estado de Medio Ambiente de fecha 22 de noviembre de 2013



**GOBIERNO
DE ESPAÑA**

**MINISTERIO
DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN
Y MEDIO AMBIENTE**

Este documento pertenece a una serie de protocolos de muestreo, laboratorio y cálculo de índices y métricas para su utilización en los programas de seguimiento del estado de las masas de agua continentales (ríos, lagos y embalses) y en la clasificación del estado ecológico.

Las especificaciones de estos documentos deberán ser tenidas en cuenta por los Organismos de cuenca en la explotación de las redes oficiales de seguimiento del estado y potencial ecológico en las masas de agua superficiales continentales, bien directamente o a través de contratos de servicios. Estos protocolos están sujetos a los cambios que se consideren necesarios en virtud del progreso científico de la materia.



Aviso Legal: los contenidos de esta publicación podrán ser reutilizados, citando la fuente y la fecha, en su caso, de la última actualización



MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE

Edita:

© Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
Secretaría General Técnica
Centro de Publicaciones

Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado:
<http://publicacionesoficiales.boe.es/>

NIPO: 280-13-133-4

ACTUALIZACIÓN Y CORRECCIÓN DE ERRORES

Versión del protocolo	Fecha	Modificaciones
Versión 1	19/12/2014	Se incluye el apartado 10 Procedimiento para la combinación de métricas de fitoplancton en lagos y el apartado 11 Procedimiento para la combinación de métricas de fitoplancton en embalses



INDICE

1.	APLICABILIDAD	7
2.	OBJETIVO.....	7
3.	NORMATIVA DE REFERENCIA	7
4.	EQUIPOS, REACTIVOS Y CONSERVANTES	8
	4.1. EQUIPOS Y REACTIVOS PARA LA EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS.....	8
	4.2. EQUIPOS Y REACTIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CLOROFILA A	8
	4.3. EQUIPOS Y REACTIVOS PARA LA IDENTIFICACIÓN, RECUENTO DE CÉLULAS Y CÁLCULO DEL BIOVOLUMEN DEL FITOPLANCTON.....	9
5.	PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS EN LABORATORIO	10
6.	PROTOCOLO ANALÍTICO DE CLOROFILA <i>a</i>	10
	6.1. CONCENTRACIÓN DEL FITOPLANCTON Y EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS	10
	6.2. DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DEL EXTRACTO Y CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA... 11	11
7.	IDENTIFICACIÓN, RECUENTO DE CÉLULAS Y CÁLCULO DE BIOVOLUMEN DEL FITOPLANCTON	12
	7.1. CALIBRACIÓN DEL EQUIPO	12
	7.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	13
	7.3. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA	14
	7.4. RECUENTO DE CÉLULAS.....	14
	7.5. CÁLCULO DEL BIOVOLUMEN	16
8.	PROCESADO DE LOS DATOS	17
9.	PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO DE MÉTRICAS	17
	9.1. CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA A.....	18
	9.2. BIOVOLUMEN TOTAL DE FITOPLANCTON	18
	9.3. PORCENTAJE DE CIANOBACTERIAS (SOLO PARA EMBALSES).....	18
	9.4. ÍNDICE DE GRUPOS ALGALES (IGA) (SOLO PARA EMBALSES).....	18
10.	PROCEDIMIENTO PARA LA COMBINACIÓN DE MÉTRICAS DE FITOPLANCTON EN LAGOS	19
	10.1. CÁLCULO DEL RATIO DE CALIDAD ECOLÓGICA (RCE)	19
	10.2. TRANSFORMACIÓN DEL RCE A ESCALAS NUMÉRICAS EQUIVALENTES.....	19



10.3. COMBINACIÓN DE RCE TRANSFORMADOS PARA CLASIFICACIÓN DEL ESTADO ECOLÓGICO .20

11. PROCEDIMIENTO PARA LA COMBINACIÓN DE MÉTRICAS DE FITOPLANCTON EN EMBALSES
(*MARSP*)..... 20

11.1. CÁLCULO DEL RATIO DE CALIDAD ECOLÓGICA (RCE)20

11.2. TRANSFORMACIÓN DEL RCE A ESCALAS NUMÉRICAS EQUIVALENTES21

**11.3. COMBINACIÓN DE RCE TRANSFORMADOS PARA LA CLASIFICACIÓN DEL POTENCIAL
 ECOLÓGICO.....23**

ANEXO I: HOJA DE RESULTADOS..... 25





1. APLICABILIDAD

Este protocolo de análisis y cálculo de métricas de fitoplancton es de obligada aplicación en la explotación de las redes oficiales de evaluación del estado / potencial ecológico en cumplimiento de la Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, que explota las Confederaciones Hidrográficas (CCHH), bien directamente o a través de contratos de servicios.

Las estaciones en las que se utilizará este protocolo son las pertenecientes al programa de control de vigilancia, programa de control operativo, programa de control de investigación y redes de referencia.

Este protocolo se aplica a muestras tomadas con el Protocolo de muestreo de fitoplancton en lagos y embalses (Código: M-LE-FP-2013) en las masas de agua naturales de la categoría lagos (lagos, lagunas y humedales) así como en las masas de agua artificiales o muy modificadas asimilables a lagos (incluyendo embalses) que aparecen en la Orden ARM/2656/2008, de 10 de septiembre, por la que se aprueba la Instrucción de Planificación Hidrológica (IPH), siendo aplicable al análisis en laboratorio de la concentración de clorofila *a*, identificación de taxones, recuento de células y cálculo de biovolumen para la determinación de las métricas correspondientes al elemento de calidad composición y abundancia de fitoplancton. En concreto, los procedimientos descritos comprenden el cálculo de las siguientes métricas, cuando proceda según la categoría de la masa de agua:

- Concentración de clorofila *a*.
- Biovolumen total de fitoplancton.
- Porcentaje de cianobacterias.
- Índice de Grupos Algales (IGA).

2. OBJETIVO

La Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, establece que los Estados miembros deberán poner en marcha programas de seguimiento. Estos programas deben permitir controlar y evaluar la composición y abundancia del fitoplancton.

La Directiva Marco del Agua establece que los métodos empleados para controlar los indicadores de evaluación de los elementos de calidad biológicos serán conformes a las normas internacionales o nacionales que garanticen el suministro de información de calidad y comparabilidad científica equivalentes.

Por lo tanto, el objetivo de este protocolo es establecer un método analítico de fitoplancton en laboratorio y un método de cálculo de métricas de fitoplancton que garantice el cumplimiento de los requisitos mencionados anteriormente.

3. NORMATIVA DE REFERENCIA

La normativa de referencia de este protocolo es la que se enumera a continuación:

- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- RD Legislativo 1/2001 por el que se aprueba el Texto Refundido de la Ley de Aguas.
- RD 907/2007 por el que se aprueba el Reglamento de Planificación Hidrológica.
- Orden MAM/3207/2006 por la que se aprueba la ITC-MMA EECC-1/06 Instrucción técnica complementaria sobre determinaciones químicas y microbiológicas para el análisis de las aguas.
- Orden ARM/2656/2008 por la que se aprueba la Instrucción de Planificación Hidrológica.
- Orden MAM/985/2006 por la que se desarrolla el régimen jurídico de las entidades colaboradoras de la administración hidráulica en materia de control y vigilancia de calidad de



las aguas y de gestión de los vertidos al dominio público hidráulico.

Otra documentación de referencia:

- Standard ISO 10260:1992, *Water quality– Measurement of biochemical parameters – Spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration.*
- Standard Methods 10200H (APHA, 1998)¹
- UNE – EN 15204: 2007 – Guía para el recuento de fitoplancton con microscopía invertida (técnica de Utermöhl).
- *WISER Deliverable D3.1-4 Guidance document on sampling, analysis and counting standards for phytoplankton in lakes.*
- *Draft proposal of “Water quality – Phytoplankton biovolume determination by microscopic measurement of cell dimensions” (CEN TC 230 / WG 2 / TG 3/N116 30/03/2008).*
- Protocolo de muestreo de fitoplancton en lagos y embalses (Código: M-LE-FP-2013).
- Tesaurus para la clasificación del estado ecológico de las masas de agua continentales (TAXAGUA²).
- CEDEX (2010): Selección de métricas para la evaluación del estado ecológico de las masas de agua de la categoría “lagos” basadas en el elemento de calidad “composición, abundancia y biomasa de fitoplancton”, en aplicación de la Directiva Marco del Agua.

4. EQUIPOS, REACTIVOS Y CONSERVANTES

Los trabajos de laboratorio se llevarán a cabo tomando todas aquellas medidas necesarias para garantizar que se desarrollan en unas condiciones adecuadas de seguridad e higiene.

4.1. EQUIPOS Y REACTIVOS PARA LA EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS

- Equipo de filtración.
- Bomba de vacío.
- Probeta para medir el volumen filtrado.
- Filtros de microfibra de vidrio GF/F o similar.
- Tubos de centrífuga de vidrio de 15 mL con tapón de rosca y gradilla portadora.
- Solución de carbonato magnésico saturada: disolver 1 g de $MgCO_3$ en polvo en 100 mL de agua destilada.
- Solución de acetona (BP 56º síntesis) al 90%: mezclar 90 partes de acetona con 10 partes de agua destilada o de la solución saturada de carbonato magnésico.
- Nevera con congelador.
- Pinzas de punta roma.
- Triturador de tejidos vegetales o mejor un aparato de sonicación.
- Contenedor opaco para proteger los extractos de pigmentos de la luz ambiental.

4.2. EQUIPOS Y REACTIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CLOROFILA A

- Centrífuga refrigerada (opcional) o filtros de un solo uso resistentes a solventes orgánicos y jeringa de 10 mL de un solo uso, igualmente resistente a éstos.
- Espectrofotómetro con anchura de banda estrecha (de 0,5 a 2 nm), preferiblemente de barrido.
- Cubetas de vidrio o cuarzo con tapón esmerilado. Antes de medir, la cubeta debe ser lavada con una disolución de ácido nítrico al 20%, después lavada con agua destilada y finalmente

¹ APHA, 1998: *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 20.ª ed., Washington D.C. (EE.UU.), American Public Health Association.

² <http://www.magrama.gob.es/es/agua/temas/estado-y-calidad-de-las-aguas/aguas-superficiales/programas-seguimiento/TAXAGUA.aspx>



pasada un par de veces por la acetona utilizada como solvente de extracción. Submuestreador (Wrona et al., 1982) opcional.

- Pipeta de 5 mL de vidrio de clase A o, alternativamente, pipeta automática de 5 mL con émbolo cerámico (para evitar que sea dañada por la acetona).
- Pipetas Pasteur de vidrio de un solo uso y chupete succionador.
- Papel absorbente.

4.3. EQUIPOS Y REACTIVOS PARA LA IDENTIFICACIÓN, RECuento DE CÉLULAS Y CÁLCULO DEL BIOVOLUMEN DEL FITOPLANCTON

- Microscopio invertido: Debe estar equipado con un condensador de apertura numérica (AN) de 0,5 como mínimo y objetivos de bajos aumentos (4x o 10x) y de aumentos altos 20x y 40x (60x o un objetivo de inmersión 100x es recomendado para la identificación y cálculos de biovolúmenes de pequeñas especies). Los oculares x10 o x12,5 estarán equipados, uno de ellos, con un micrómetro ocular calibrado y el otro con una cuadrícula de recuento calibrada (necesaria en el caso de contar transectos). Estas piezas de los oculares no son necesarias si el microscopio está conectado a un ordenador y se dispone de un programa de análisis de imagen que permita realizar medidas. Para exámenes en detalle es aconsejable usar un microscopio equipado con contraste de fases o mejor con contraste interferencial de Nomarski.
- Cámara digital acoplada al microscopio.
- Aceite de inmersión, si se va a utilizar el objetivo de inmersión 100x.
- Cámara o cubeta de sedimentación de 10 a 100 mL de capacidad y de aproximadamente 25 mm de diámetro: consiste en una columna vertical con una base a través de la cual el contenido puede ser observado con el microscopio invertido. La columna, de volumen variable según el tipo de lago, se llena de muestra y las partículas sedimentan en el fondo de la cámara. El tipo habitual de cámara consta de dos piezas: una columna superior y una base. Ésta última lleva una arandela enroscable y un cubreobjetos redondo del diámetro adecuado que delimitan una cámara cilíndrica de pequeña altura. Una vez que las algas han sedimentado en el fondo, la columna superior se desliza hacia un lado y se sustituye por una tapa de vidrio. Se recomienda que el grosor del fondo de la cubeta (cubreobjetos circular) no exceda los 0,17 mm.
- Pipetas variadas para el caso de que sea necesario hacer diluciones o concentraciones.
- Cilindros de sedimentación graduados para concentrar la muestra en el caso de aguas muy oligotróficas, con densidades de fitoplancton extremadamente bajas.
- Etanol (C₂H₅OH) al 96% para el lavado de las cubetas.
- Ácido acético glacial.
- Agua con lugol, a la misma concentración de la muestra (indicado en el protocolo de muestreo de fitoplancton), para realizar las diluciones necesarias.
- Formularios para anotar el recuento de las especies. Pueden contener una lista de taxones con espacios donde anotar el recuento; también puede usarse un programa de ordenador preparado para la entrada directa de datos.
- Claves de identificación de los elementos de calidad biológicos (ID-TAX³) y/o guías de identificación e iconografía adecuadas al ámbito de estudio.
- Versión más actualizada del Tesoro para la clasificación del estado ecológico de las masas de agua continentales (TAXAGUA⁴).

³<http://www.magrama.gob.es/es/agua/temas/estado-y-calidad-de-las-aguas/aguas-superficiales/programas-seguimiento/ID-TAX.aspx>

⁴<http://www.magrama.es/es/agua/temas/estado-y-calidad-de-las-aguas/aguas-superficiales/programas-seguimiento/TAXAGUA.aspx>



5. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS EN LABORATORIO

A partir de las muestras tomadas mediante el Protocolo de muestreo de fitoplancton en lagos y embalses (Código: M-LE-FP-2013) se llevarán a cabo los análisis en laboratorio correspondientes que permitan el cálculo de las métricas de estado / potencial ecológico.

Las muestras tomadas mediante el protocolo citado anteriormente son:

- Muestras para el análisis de la concentración de clorofila *a*.
- Muestras para la identificación, recuento y cálculo de biovolumen del fitoplancton.
- Muestras de red para la ayuda en la identificación del fitoplancton en el control de investigación.

A partir de estas muestras se seguirán los procedimientos analíticos descritos a continuación para obtener la información necesaria para el cálculo de las métricas aplicables a lagos y embalses.

6. PROTOCOLO ANALÍTICO DE CLOROFILA *a*

La concentración de clorofila *a* es una medida indirecta de la biomasa del fitoplancton. El procedimiento para su análisis consiste en la concentración del fitoplancton; la extracción de los pigmentos con una solución acuosa de acetona (90%); y la determinación de la densidad óptica (absorbancia) del extracto por medio de un espectrofotómetro.

El procedimiento que se describe está basado en *Standard Methods* 10200 H (APHA, 1998)⁵, y es compatible con el Standard ISO 10260:1992, "*Water quality– Measurement of biochemical parameters – Spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration*", aunque éste último recomienda la extracción de clorofila mediante etanol.

6.1. CONCENTRACIÓN DEL FITOPLANCTON Y EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS

La alícuota destinada al análisis de clorofila obtenida a partir de la muestra integrada (Protocolo de muestreo de fitoplancton en lagos y embalses Código: M-LE-FP-2013) puede filtrarse en campo o en laboratorio.

En caso de filtrado en laboratorio éste se llevará a cabo a partir de la muestra refrigerada a 4^o C y conservada en oscuridad, durante las siguientes 24 horas al muestreo.

- Cuando la muestra se filtre en laboratorio se concentrará mediante el filtrado de un volumen suficiente de agua (normalmente entre 0,1 y 2 litros, dependiendo del estado trófico de la masa de agua), a través de un filtro de microfibras de vidrio (tipo GF/F o equivalente) y a una presión de menos de 100 mm Hg (~0,15 atm). La adición de una suspensión acuosa de carbonato magnésico al 1% aumenta la eficiencia de retención del filtro y evita la degradación de la clorofila (APHA, 1998). Los filtros utilizados para la filtración deben ser de microfibras de vidrio de 47 mm de diámetro, con capacidad para retener todas las partículas de tamaño superior a 0,7 µm.
- Posteriormente es necesario retirar el filtro del dispositivo de filtración mediante unas pinzas de punta roma. El filtro deberá quedar lo más escurrido posible. Si el filtro retiene un exceso de agua, ésta alterará el volumen final del solvente de extracción añadido y también su concentración. Tras retirar el filtro del soporte de filtración, se depositará sobre un papel de filtro blanco, seco y limpio durante unos segundos, para que por capilaridad pierda el agua sobrante. Si es necesario se repetirá la operación moviendo el filtro a una nueva posición seca del papel de filtro. Finalmente, se colocará el filtro cuidadosamente enrollado en el tubo

⁵ En aguas muy oligotróficas con muy bajo contenido en clorofila se filtrará un volumen suficiente de agua, incluso utilizando varios filtros, para que la medida sea fiable.



donde se va a realizar la extracción (normalmente un tubo de vidrio de 15 mL de capacidad, con tapón de rosca resistente a la acetona).

- En caso de filtrado en campo, el análisis se iniciará a partir de los filtros congelados a una temperatura inferior a -20°C , siempre antes de que transcurran 2-3 semanas desde el muestreo. En cualquier caso (filtrado en campo o en laboratorio), se deberá mantener el filtro congelado (-20°C), preferiblemente en el mismo tubo donde se realizará posteriormente la extracción, y protegido de la luz. El filtro se puede conservar así hasta 2-3 semanas, aunque es recomendable proceder a su procesado cuanto antes.
- Para iniciar el procedimiento de extracción se añadirá al tubo con el filtro de fitoplancton 5 mL de solución de acetona 90% de manera que cubra totalmente al filtro (añadir más cantidad de acetona si fuera necesario).
- Posteriormente se realizará, como mínimo, una trituración mecánica que garantice la rotura de las células pues de lo contrario la cantidad de pigmento extraído de algunas algas de paredes robustas puede verse mermada hasta en un 50%. Dado el pequeño tamaño de algunas algas y cianobacterias (picoplancton) la mera trituración mecánica puede no ser efectiva, por lo que se recomienda complementar esta trituración con una serie de tres tratamientos de sonicación de la muestra, a intervalos de 1-2 horas tras añadir el solvente de extracción, durante los que se les aplicará ultrasonidos en un baño sonicador con agua fría y hielo picado. El tiempo de sonicación no debe exceder los 2 minutos y, tras aplicar los ultrasonidos, la muestra debe volver al congelador o nevera durante 1-2 horas. El procedimiento se completará agitando los tubos a intervalos periódicos una o dos veces entre sonicaciones.
- Finalizada la trituración o sonicación, se mantendrá la muestra en frío ($0 - 4^{\circ}\text{C}$) y en la oscuridad, al menos 12 horas pero no más de 24 horas, pues en esas condiciones podría empezar la degradación del pigmento. También puede realizarse la extracción durante al menos 24 horas en congelador a -20°C y siempre en oscuridad pero sin exceder los 2-3 días.
- Todo el proceso debe realizarse en la oscuridad o con una iluminación indirecta lo más tenue posible.

6.2. DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DEL EXTRACTO Y CUANTIFICACIÓN DE LA CLOROFILA

La determinación espectrofotométrica y cuantificación de la clorofila *a* del extracto se realizará después de que el proceso de concentración y extracción de pigmentos haya terminado. Para ello se seguirán los pasos descritos a continuación:

- Una vez concluida la extracción, y después de agitar los tubos por última vez para homogenizar su contenido, se procederá a retirar los restos grandes del filtro con ayuda de unas pinzas y seguidamente a centrifugar los tubos en una centrifugadora preferiblemente refrigerada (4°C) y en oscuridad durante 5 minutos a 3.500 rpm, o bien a filtrar el solvente a través de un filtro de un solo uso, de pequeño volumen muerto y de membrana filtrante resistente a solventes orgánicos.
- Se medirá el volumen del extracto. Es importante trabajar rápido para evitar la evaporación de la acetona y la variación del volumen del extracto.
- La medida del extracto en el espectrofotómetro debe realizarse en cubetas de vidrio o cuarzo, preferiblemente de boca esmerilada provistas del correspondiente tapón hermético, del tipo utilizado para medidas con solventes volátiles.
- La cubeta ha de lavarse con una pequeña alícuota de la muestra antes de su llenado para efectuar la lectura. Es muy importante que cuando se toma la muestra del tubo de centrifugación no se resuspenda el sedimento. Cualquier medida en la que se aprecie turbidez debida a restos del material u otros detritus no tiene validez. La espectrofotometría solo es aplicable a soluciones completamente transparentes.
- Una vez llenada la cubeta, se medirán las densidades ópticas del extracto para las longitudes de onda que requiere la fórmula señalada a continuación. Las absorbancias de las muestras se miden frente a un blanco realizado con el solvente de extracción utilizado (acetona 90 %).
- Las medidas pueden realizarse en espectrofotómetros de bandas fijas, aunque es preferible realizar un barrido entre 350 y 850 nm y de ahí extraer las absorbancias a las longitudes de



onda necesarias para el cálculo, ya que al disponer de un espectro de absorción entre 350 y 850 se podrían hacer cálculos adicionales de otros pigmentos, ajustar mejor los cálculos de corrección y calcular diversos índices pigmentarios del fitoplancton.

- Los pigmentos en extracto son muy sensibles a la luz por lo que hay que realizar este proceso, así como la lectura espectrofotométrica, con la luz de la habitación muy atenuada, y mantener los tubos a baja temperatura en un contenedor opaco o debidamente protegidos de la luz.

Para el cálculo de la concentración de se utilizará la fórmula tricromática de Jeffrey y Humphrey (1975)⁶:

$$\text{Chl. "a"} \text{ (mg/m}^3\text{)} = \frac{[11,85 * (A664 - A750) - 1,54(A647 - A750) - 0,08 * (A630 - A750)] * v}{V * Z}$$

Dónde:

A630, A647, A664, A750 = Densidad óptica (absorbancia) medida a las longitudes de onda indicadas (en nm)

v = volumen del extracto, en mL

V = volumen de agua filtrada, en L

Z = Paso óptico de la cubeta, en cm

7. IDENTIFICACIÓN, RECUENTO DE CÉLULAS Y CÁLCULO DE BIOVOLUMEN DEL FITOPLANCTON

Para el análisis de la composición del fitoplancton se utilizará el método de Utermöhl con microscopio invertido, siguiendo la norma para el recuento de fitoplancton: UNE – EN 15204:2007 – Guía para el recuento de fitoplancton con microscopía invertida (técnica de Utermöhl) y las recomendaciones establecidas en *Deliverable D3.1-4 Guidance document on sampling, analysis and counting standards for phytoplankton in lakes (WISER)*.

El análisis cuantitativo que se describe a continuación comprende la descripción de los siguientes procedimientos:

- Calibración del equipo.
- Preparación de la muestra.
- Identificación taxonómica.
- Recuento de células.
- Cálculo de biovolúmenes.

7.1. CALIBRACIÓN DEL EQUIPO

Las operaciones señaladas a continuación para calibrar el equipo únicamente es necesario realizarlas una vez.

- Asegurarse de que el volumen de la cámara de sedimentación (las combinaciones de base y columna) tienen el volumen esperado (5, 10, 25, 50 o 100 mL). Si hay variaciones, se harán los cálculos posteriores con los volúmenes exactos. Se puede calcular el volumen pesando la cámara, incluidos el cubreobjetos y la placa de vidrio, antes y después de llenarla con agua destilada. La diferencia, en gramos, es equivalente al volumen de la cámara, en mililitros. Se repetirá 3 veces esta operación y se considerará el valor medio de los volúmenes obtenidos.
- Se calculará el área de la superficie de cada cámara, midiendo 5 veces el diámetro con la ayuda de, por ejemplo, un calibrador micrométrico.

⁶ JEFFREY, S.W. y G.F. HUMPHREY. 1975. *New spectrophotometric - equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton*. Biochem. Physiol. Pflanz 167:191-194



- El micrómetro y la cuadrícula de recuento de los oculares del microscopio tienen que estar calibrados para cada uno de los objetivos. Se puede hacer con un portaobjetos micrométrico graduado (por ejemplo, 100 μm divididas en 10 divisiones de 10 μm cada una).
- Para cada uno de los aumentos que se va a usar, hay que calcular el área de los campos de recuento y el área de los transectos. Los campos de recuento pueden ser: todo el campo ocular, el delimitado por la cuadrícula ocular (que puede ser un cuadrado o una rejilla) o el de la pantalla del ordenador (en el caso de usar esta opción de recuento). Para calcular el área de los transectos se tendrá en cuenta el diámetro de la cámara y las dimensiones de la cuadrícula ocular o del área observada en la pantalla del ordenador (si se elige esta opción).

7.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

El siguiente procedimiento incluye la aclimatación y homogeneización de la muestra fijada con lugol, la concentración o dilución de la misma, en caso de que sea necesario, y la preparación de las submuestras que se van a observar al microscopio.

Antes de iniciar los procesos que se señalan a continuación, las diferentes partes de las cámaras de sedimentación deben estar limpias y secas. Se debe cuidar especialmente la limpieza del fondo de la cubeta. Para ello se limpiará con etanol (96%) entre dos recuentos, si fuera necesario.

Aclimatación de la muestra

Las muestras, las cubetas de sedimentación y los equipos que se vayan a utilizar deben someterse a un periodo de aclimatación a temperatura ambiente (en general de 12 horas aunque puede variar según las diferencias de temperatura y el volumen de la muestra). De este modo se limitarán las corrientes de convección y se favorecerá la distribución al azar del fitoplancton sedimentado en la muestra.

Homogeneización de la muestra

Durante el tiempo en el que las muestras están almacenadas, las partículas sedimentan en la botella y se forman agregados entre algas pequeñas y otras algas, colonias más grandes o detritus. La homogeneización de la muestra supone la resuspensión y separación de las partículas. Mediante giros horizontales y verticales de la botella durante aproximadamente dos minutos se deben mezclar suavemente las muestras a fondo.

Preparación de las muestras

- Se usará una cámara de sedimentación de un tamaño adecuado, dependiendo de la concentración del fitoplancton en la muestra (la concentración de clorofila puede servir como guía). No se recomienda utilizar cámaras de menos de 5 mL o de más de 100 mL. Para densidades de fitoplancton muy altas o muy bajas es necesario diluir o concentrar la muestra. Como regla general, hay que conseguir de 4 a 20 unidades de recuento por campo al máximo aumento (400x-1000x).
- Se llenará la cubeta de sedimentación con la muestra. Tapar la cubeta con una pieza cuadrada o circular de cristal, evitando la formación de burbujas de aire. Se colocará la cámara de sedimentación en una superficie horizontal plana evitando fuentes de calor, luz y vibración. Es necesario poner una nota al lado de la cámara con el sitio y la fecha de muestreo, así como el volumen de muestra sedimentado.
- El tiempo de sedimentación recomendado para las cámaras de 10 mL es de al menos 12 horas, para las de 25 mL, de al menos 24 horas, para las de 50 mL, al menos 48 horas y para las de 100 mL, 72 h. Hay que tener en cuenta que un tiempo de sedimentación demasiado largo (varios días) aumenta el peligro de formación de burbujas y produce alteraciones en la sedimentación.
- Después de la sedimentación, si se están utilizando cámaras de dos piezas (base y columna), se deslizará la columna hacia un lado y se reemplazará por un cubreobjetos procurando que en este proceso no se introduzcan burbujas de aire en la cámara. Se colocará la cámara suavemente en el microscopio. Las cámaras abiertas no se deben mover, ya que las algas sedimentadas se pueden desplazar.



- Se observará la cámara con un objetivo de pocos aumentos. Si no se ha conseguido una distribución uniforme, hay que preparar una nueva submuestra.
- Si se observan, con el objetivo de menos aumentos, muchos organismos flotando en la parte superior de la cámara (cianobacterias o *Botryococcus*), preparar de nuevo la muestra añadiendo de 5 a 10 gotas de ácido acético glacial directamente sobre la muestra antes de la homogeneización, o bien utilizar alguna otra técnica, de las señaladas en la norma UNE-EN 15204:2007, para solucionar este problema.

Concentración o dilución de las muestras

- En aguas con densidad de algas muy baja (aguas ultra-oligotróficas), se recomienda concentrar la muestra. Normalmente, 250 mL es suficiente. El método más utilizado consiste en dejar sedimentar la muestra en cilindros de sedimentación graduados que se mantienen a oscuras y a temperatura ambiente constante durante 3 días. Posteriormente se eliminará el agua sobrenadante hasta dejar 25 mL en el fondo del cilindro.
- En aguas con densidad de algas elevada (aguas eutróficas e hipereutróficas) donde la sedimentación de 5 mL de muestra da lugar a una concentración de fitoplancton demasiado elevada para su recuento, es necesario diluir la muestra antes de su sedimentación. Para ello se añadirá, a un volumen conocido de submuestras, la cantidad necesaria de agua con lugol. Se utilizará agua del grifo, mejor que agua destilada, para que los procesos osmóticos no afecten a la morfología celular.

7.3. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

Antes de empezar los recuentos debe hacerse un inventario de los taxones presentes explorando la muestra a varios aumentos.

La identificación de los taxones se realizará preferentemente con el apoyo de las claves y guías elaboradas por la DGA a tal efecto (ID-TAX). Es importante comprobar las descripciones escritas de las especies (no sólo comparar con dibujos o fotos) y tener en cuenta la información ecológica (distribución, hábitat, requerimientos). TAXAGUA proporciona información de interés sobre las propiedades de los diferentes taxones, sinónimos, nombre aceptado actualmente, etc.

Se identificarán los taxones encontrados hasta el nivel taxonómico más preciso posible (género o especie), pero hay que tener en cuenta que es mejor identificar correctamente a un nivel superior que hacer una identificación errónea a un nivel inferior. Se codificará a las especies según el código TAXAGUA.

La muestra de fitoplancton de red recogida en el muestreo puede ayudar, si es necesario, a la identificación de algunos taxones del microplancton ($>20 \mu\text{m}$) poco abundantes en la muestra sedimentada.

Se recomienda realizar dibujos y fotografías, de utilidad como colección de referencia.

El trabajo de identificación y recuento sólo puede realizarlo personal especializado (con entrenamiento de varios años). Para la identificación de las especies en las muestras de referencia se recomienda contar con el apoyo de expertos, así como para la verificación de los taxones encontrados que susciten dudas.

7.4. RECUENTO DE CÉLULAS

Proceso de recuento

La estrategia del área de la cámara a contar depende de la composición del fitoplancton de la muestra. Siempre habrá que contar los taxones de menor tamaño a muchos aumentos, en campos elegidos al azar (ver apartado sobre calibración del equipo). Los organismos de mayor tamaño deberán ser contados en transectos, a menos aumentos. Si hay taxones de gran tamaño a veces es necesario realizar un recuento de toda la cámara, a bajos aumentos.



A la hora de hacer los recuentos hay que tener en cuenta las siguientes normas:

- Las células vacías (ej.: diatomeas, *Dinobryon*) no se contarán.
- Los organismos que presenten la propiedad nutrición heterótrofos (consultar TAXAGUA), sí se contarán, aunque no se tienen en cuenta para el cálculo de las métricas.
- Los taxones típicos del bentos, muy abundantes en aguas someras, sí se contarán.
- El picoplancton (< 2 µm) que forma colonias (ej. *Aphanothece*) sí se contará.
- El picoplancton unicelular (< 2 µm) no se contará, en tanto no se desarrollen protocolos específicos al efecto.
- Los heterocistes y acinetos de las cianobacterias nostocales deben contarse, y, si son muy abundantes, es conveniente separarlos en grupos diferentes al del resto de células.
- Para estimar el número de células por colonia o cenobio, es necesario contar el número total de células de la colonia, si se puede. Si la colonia es muy grande (ej. *Microcystis*), se estimará el número de células contando las células en un área restringida (subcolonia) a 400x o más aumentos. Luego se estimará el número de subcolonias, de tamaño similar, que existen en el campo de recuento. Finalmente se multiplicará el número de células de la subcolonia por el número de subcolonias del campo.
- Para estimar el número de células por filamento, se contarán directamente, si es posible. Si no es posible porque no se pueden diferenciar células o se están contando transectos, medir la longitud de los filamentos. Sólo se medirá la parte de los filamentos que entra dentro del campo de recuento o transecto. En el recuento por transectos, si hay muchos filamentos, se pueden contar y estimar la longitud media de los filamentos midiendo la longitud de al menos 30. Si a muchos aumentos es posible diferenciar las células (ej. *Aphanizomenon*), se calculará la media del número de células por unidad de longitud (ej. 20 µm) contando las células que hay en al menos 20 filamentos. Posteriormente se calculará el número de células contadas multiplicando el número medio de células en la unidad de longitud por la longitud de los filamentos contados. Si no es posible diferenciar células a muchos aumentos (ej. *Planktothrix*) se dará el resultado en longitud de filamentos (en µm).

Recuento por campos

Los organismos pequeños (aproximadamente < de 20 µm) se contarán a 400x o más aumentos, en campos de recuentos seleccionados al azar. El objetivo es contar de 50 a 100 campos de forma que, asumiendo la concentración de la muestra recomendada (ver en apartado 7.2, preparación de las submuestras), tras el recuento total se consigan al menos 400 organismos. Al seleccionar los campos a contar, no se mirará a través de los oculares, para asegurarse de que la selección se hace al azar.

Se aplicarán criterios estándar sobre los organismos que cruzan los campos de recuento, de forma que por ejemplo, se cuenten los individuos que toquen arriba y a la derecha pero no abajo y a la izquierda del campo o cuadrícula. En cuanto a las colonias y filamentos, se tomará como criterio no tener en cuenta las células que quedan fuera del campo de recuento.

Los resultados, para cada uno de los taxones, se expresarán en número de células (o en µm de filamento, en el caso de los filamentos en los que no se pueden diferenciar las células, como se explica en el apartado *Proceso de recuento*), por unidad de volumen de muestra, según la siguiente fórmula:

$$N = X * [(A * d) / (a * v)]$$

Donde:

- N** = número de células en la muestra (cel/mL)
- X** = número medio de células contadas por campo
- A** = área de la cámara
- v** = volumen de muestra sedimentado en la cámara
- a** = área del campo óptico o de la cuadrícula utilizada



d = factor de dilución o de concentración de la muestra (en caso de que se haya diluido o concentrado según la densidad de algas)

Recuento por transectos

Los organismos que no se hayan contado en el recuento por campos, se contarán a 200x-250x aumentos en 2 transectos que recorran el diámetro de la cámara, independientemente del número de individuos contados.

Si se ha usado el objetivo de 100x con aceite de inmersión en el recuento anterior, se limpiará bien la base de la cámara con etanol al 96 % para poder tener una correcta visión de los organismos a aumentos inferiores.

Es conveniente utilizar la cuadrícula del ocular (o la pantalla del ordenador). Hay que aplicar un criterio para las algas que quedan cortadas por las líneas del transecto. Por ejemplo, contar las que quedan arriba (o a la derecha, si se trata de un transecto vertical) y no contar las que cortan la línea de abajo (o de la izquierda).

Los resultados, para cada uno de los taxones, se calcularán aplicando la fórmula del apartado anterior, donde "a" es el área del transecto y X el número medio de células contadas por transecto.

Recuento de la cámara completa

Cuando no se haya llegado, en el recuento por transectos, a un recuento de 40 individuos en los taxones de gran tamaño (como *Ceratium*, colonias grandes de cianobacterias, etc), se contará la cámara entera. Esto se hará a 40-100x siguiendo transectos horizontales o verticales que cubran todo el área de la cámara. Para calcular el número de células por colonia se seguirán los pasos explicados en el apartado "Proceso de recuento". Se seguirán los mismos criterios del apartado anterior para los organismos que cortan las líneas de los transectos.

Los resultados, para cada uno de los taxones, se expresarán en número de células por unidad de volumen de muestra, según la siguiente fórmula:

$$N = X * d / v$$

Donde:

N = número de células en la muestra (cel/mL)

X = número de células contadas

v = volumen de muestra sedimentado en la cámara

d = factor de dilución o de concentración de la muestra (en caso de que se haya diluido o concentrado según la densidad de algas)

7.5. CÁLCULO DEL BIOVOLUMEN

Para facilitar el cálculo de biovolúmenes y asegurar la calidad de la información generada se han estandarizado biovolúmenes medios para algunas especies de fitoplancton. Estos valores pueden obtenerse en TAXAGUA.

Como norma general, para calcular el biovolumen se utilizará de forma preferente la información asociada a TAXAGUA. En caso de que esta información no esté disponible se podrá recurrir a las siguientes alternativas:

- Utilizar biovolúmenes de la bibliografía.
- Calcular los biovolúmenes celulares de las especies en cada masa de agua.



Para conocer el biovolumen por mL de cada especie en la muestra (expresado en mm^3/l) se multiplicará el biovolumen (estándar o calculado para cada especie) por el número de células/ml obtenido en el recuento. En el caso de los filamentos en los que no se pueden diferenciar las células (ver apartado *Proceso de recuento*) se multiplicará el área de la sección del filamento por la longitud de filamentos obtenida en el recuento.

Cálculo del biovolumen celular

Cuando resulte necesario calcular el biovolumen celular (o el área de la sección del filamento, en el caso de los filamentos en los que no se pueden diferenciar las células, como se explica en el apartado *Proceso de recuento*) se seguirán los siguientes criterios:

- Asignar a cada especie la figura geométrica indicada en TAXAGUA.
- Medir las dimensiones apropiadas.
- Aplicar la fórmula correspondiente (indicada en TAXAGUA) para calcular el biovolumen y los factores de corrección en caso de que procedan.

Las medidas de las dimensiones requeridas (longitud, anchura, diámetro) se realizarán a los aumentos apropiados, utilizando un micrómetro ocular calibrado o un programa de análisis de imagen. Se medirá como mínimo 20 individuos de cada especie. El volumen celular de cada especie se calculará como la media de los biovolúmenes individuales resultantes de aplicar las dimensiones lineales en la fórmula asociada a la figura geométrica correspondiente.

Normas a tener en cuenta:

- En las especies con esqueletos externos mucho mayores que el contenido celular (ejemplo *Dinobryon*), únicamente hay que medir el contenido orgánico (plasma) de la célula, no el esqueleto externo.
- Para estimar el biovolumen de los filamentos, se seguirá el método de recuento que se describe en el apartado anterior y, si se ha calculado el número de células, se multiplicará este número por el biovolumen celular. Si no se ha podido calcular el número de células, se calculará el área de la sección de los filamentos y se multiplicará por la longitud de filamentos calculada en el recuento.
- Los heterocistes y acinetos de las cianobacterias nostocales, si son muy abundantes y se han contado en grupos separados, han de ser medidos para estimar el biovolumen celular de cada tipo de célula.

8. PROCESADO DE LOS DATOS

Los datos de los análisis correspondientes a la muestra se incluirán en la hoja de resultados facilitada en el anexo I.

9. PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO DE MÉTRICAS

En los apartados siguientes se facilitan los procedimientos de cálculo aplicables a cada una de las métricas en lagos y embalses para la clasificación del estado / potencial ecológico de las masas de agua.

Las métricas aplicables a embalses son concentración de clorofila *a*, biovolumen total de fitoplancton, porcentaje de cianobacterias e índice de grupos algales (IGA).

Las métricas aplicables a lagos son concentración de clorofila *a* y biovolumen total de fitoplancton.

Es necesario señalar que los resultados obtenidos del análisis en laboratorio del fitoplancton consistirán en dos analíticas correspondientes a los dos muestreos realizados en el período estival, tal y como indica el protocolo de muestreo. Por tanto es necesario integrar los resultados de cálculo



de las métricas en cada muestra para dar un valor anual. Para ello se realizará la media de los valores de las métricas obtenidas en cada uno de los análisis.

9.1. CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA A

La concentración anual de clorofila *a* expresada en mg/m³, será la media de los valores de este parámetro obtenidos en los análisis llevados a cabo según el apartado 6 en las muestras recogidas en los dos muestreos anuales realizados según el protocolo de muestreo (M-LE-FP-2013).

9.2. BIOVOLUMEN TOTAL DE FITOPLANCTON

La estimación del Biovolumen total, para cada una de las muestras, se realizará integrando todos los taxones de fitoplancton identificados y analizados según el apartado 7. Para ello se llevará a cabo el sumatorio de los biovolúmenes de los taxones (BIOVOLMUES⁷) de fitoplancton determinados en la muestra y analizados de acuerdo al apartado 7. En este biovolumen no se incluirán los taxones que presentan la propiedad nutrición heterótrofa en TAXAGUA.

El biovolumen total anual (expresado en mm³/l) será la media de los valores de biovolumen total obtenidos en los análisis de los dos muestreos anuales.

9.3. PORCENTAJE DE CIANOBACTERIAS (SOLO PARA EMBALSES)

Los valores relativos al porcentaje de Cianobacterias se calcularán en función del biovolumen correspondiente a los taxones del filo Cyanobacteria de la muestra (excluidos el orden Chroococcales excepto los géneros *Microcystis* y *Woronichinia*) y el biovolumen total, según la siguiente fórmula:

$$\% \text{CIANO} = \frac{\text{BVOL}_{\text{CIA}} - [\text{BVOL}_{\text{CHR}} - (\text{BVOL}_{\text{MIC}} + \text{BVOL}_{\text{WOR}})]}{\text{BVOL}_{\text{TOT}}}$$

Donde:

ABREVIATURA	SIGNIFICADO	GRUPO TAXONÓMICO	SISTCODSUP TAXAGUA
BVOL _{CIA}	Biovolumen de cianobacterias	Cyanobacteria	CYA001FILO
BVOL _{CHR}	Biovolumen de Chroococcales	Chroococcales	CHR003ORDE
BVOL _{MIC}	Biovolumen de <i>Microcystis</i>	<i>Microcystis</i>	MIC003GENE
BVOL _{WOR}	Biovolumen de <i>Woronichinia</i>	<i>Woronichinia</i>	WOR001GENE
BVOL _{TOT}	Biovolumen total de fitoplancton		

El valor anual del porcentaje de cianobacterias será la media de los valores obtenidos para este parámetro en las muestras correspondientes a los dos muestreos anuales.

9.4. ÍNDICE DE GRUPOS ALGALES (IGA) (SOLO PARA EMBALSES)

Datos de partida

El cálculo del IGA (Índice de Grupos Algales, Catalán⁸ 2003) se basa en las proporciones de biovolúmenes de los distintos grupos del fitoplancton presentes en la muestra respecto al biovolumen total, que se obtienen por el procedimiento descrito en el apartado 7. En este biovolumen no se incluirán los taxones heterótrofos (consultar TAXAGUA).

El cálculo se realizará aplicando la siguiente fórmula:

⁷ Código empleado en la Base de datos de la Dirección General del Agua.

⁸ Catalán, J., M. Ventura, A. Munné & L. Godé. 2003. *Desenvolupament d'un index integral de qualitat ecològica i regionalització ambiental dels sistemes lacustres de Catalunya*. Agència Catalana del Aigua. Generalitat de Catalunya.

<http://mediambient.gencat.net/aca/ca/planificacio/directiva/treballs.jsp#D>



$$IGA = \frac{[1 + 0,1Cr + Cc + 2(Dc + Chc) + 3Vc + 4Cia]}{[1 + 2(D + Cnc) + Chnc + Dnc]}$$

Donde:

ABREVIATURA	GRUPO TAXONÓMICO	SISTCODSUP TAXAGUA
Cr	Criptófitos	CRY001FILO
Cc	Crisofíceas coloniales*	CHR001CLAS
Dc	Diatomeas coloniales*	BAC001FILO
Chc	Clorococales coloniales*	CHL002ORDE
Vc	Volvocales coloniales*	VOL001ORDE
Cia	Cianobacterias	CYA001FILO
D	Dinoflagelados	DIN001FILO
Cnc	Crisofíceas no coloniales*	CHR001CLAS
Chnc	Clorococales no coloniales*	CHL002ORDE
Dnc	Diatomeas no coloniales*	BAC001FILO

* La propiedad Colonial / no colonial se obtendrá de TAXAGUA

Cada grupo algal debe ir expresado como el porcentaje de biovolumen que representa sobre el biovolumen total de fitoplancton⁹.

El valor del IGA será la media de los valores obtenidos para este índice en las muestras recogidas en los dos muestreos anuales realizados según el protocolo de muestreo de fitoplancton (M-LE-FP-2013).

10. PROCEDIMIENTO PARA LA COMBINACIÓN DE MÉTRICAS DE FITOPLANCTON EN LAGOS

10.1. CÁLCULO DEL RATIO DE CALIDAD ECOLÓGICA (RCE)

Los valores del Ratio de Calidad Ecológica (RCE) de las métricas concentración de clorofila *a* y biovolumen total de fitoplancton se calcularán de forma inversa al procedimiento general, es decir, como la relación entre la condición de referencia (CR) y el valor de la métrica obtenido.

- Cálculo para concentración de clorofila *a* (CONCLO_a):

$$RCE = \frac{(1/CONCLO_a)}{(1/CR_CONCLO_a)}$$

- Cálculo para biovolumen total (BVOL_{TOT}):

$$RCE = \frac{(1/BVOL_{TOT})}{(1/CR_BVOL_{TOT})}$$

10.2. TRANSFORMACIÓN DEL RCE A ESCALAS NUMÉRICAS EQUIVALENTES

Los valores de RCE obtenidos se deben transformar a escalas numéricas equivalentes para normalizarlos a una escala lineal común.

Los RCE transformados se obtendrán mediante la aplicación de la siguiente fórmula, que no es más que una interpolación lineal entre los límites de cambio de clase de estado de los Ratios de Calidad Ecológica establecidos en condiciones de referencia para cada indicador, y los que se corresponden con una escala lineal.

⁹ En caso de que la suma de biovolúmenes de los grupos taxonómicos contemplados en el IGA no llegue a representar el 70% del biovolumen total de fitoplancton de la muestra, se descarta el cálculo de la métrica para la clasificación del estado ecológico.



$$RCE_trans = Val.trans_i + (RCE - Val_i) \times \frac{(Val.trans_s - Val.trans_i)}{Val_s - Val_i}$$

Donde:

- RCE_trans = Ratio de Calidad Ecológica transformado
- RCE = Ratio de Calidad Ecológica sin transformar
- Val.trans_i = Valor de RCE de cambio de clase de estado ecológico inferior transformado
- Val_i = Valor de RCE de cambio de clase de estado ecológico inferior sin transformar
- Val.trans_s = Valor de RCE de cambio de clase de estado ecológico superior transformado
- Val_s = Valor de RCE de cambio de clase de estado ecológico superior sin transformar

10.3. COMBINACIÓN DE RCE TRANSFORMADOS PARA LA CLASIFICACIÓN DEL ESTADO ECOLÓGICO

La combinación de los RCE transformados de los indicadores para la clasificación del estado ecológico del elemento de calidad composición, abundancia y biomasa de fitoplancton se realizará utilizando la siguiente fórmula:

$$RCE\ trans\ final = 0,75\ RCE_trans\ (CONCLOa) + 0,25\ RCE_trans\ (BVOL_{TOT})$$

El valor final de la combinación de los RCE transformados se utilizará para la clasificación del estado ecológico.

11. PROCEDIMIENTO PARA LA COMBINACIÓN DE MÉTRICAS DE FITOPLANCTON EN EMBALSES (MARSP)

11.1. CÁLCULO DEL RATIO DE CALIDAD ECOLÓGICA (RCE)

Los valores del Ratio de Calidad Ecológica (RCE) de las métricas concentración de clorofila a, biovolumen total de fitoplancton, Índice de Grupos Algales y porcentaje de cianobacterias se calcularán de forma inversa al procedimiento general, es decir, como la relación entre los valores de máximo potencial ecológico (MPE) y el valor de la métrica obtenido.

- Cálculo para concentración de clorofila a (CONCLOa):

$$RCE = \frac{(1/CONCLOa)}{(1/MPE_CONCLOa)}$$

- Cálculo para biovolumen total (BVOL_{TOT}):

$$RCE = \frac{(1/BVOL_{TOT})}{(1/MPE_BVOL_{TOT})}$$

- Cálculo para el Índice de Grupos Algales (IGA):

$$RCE = \frac{(400 - IGA)}{(400 - MPE_IGA)}$$

- Cálculo para el porcentaje de cianobacterias (%CIANO):

$$RCE = \frac{(100 - \%CIANO)}{(100 - MPE_ \%CIANO)}$$



Si en alguna de estas transformaciones el RCE obtenido es mayor de 1, el valor de RCE que se considera es 1.

11.2. TRANSFORMACIÓN DEL RCE A ESCALAS NUMÉRICAS EQUIVALENTES

Es necesario llevar a cabo la transformación de los valores de RCE obtenidos mediante el procedimiento descrito en el apartado anterior a una escala numérica equivalente para los cuatro indicadores, de acuerdo con el siguiente procedimiento.

Las ecuaciones para llevar a cabo esta transformación varían en función del tipo de embalse y son las que se indican a continuación:

Tipos 1, 2 y 3

Clorofila a	
RCE > 0,21	$RCE_{trans} = 0,5063 \times RCE + 0,4937$
RCE \leq 0,21	$RCE_{trans} = 2,8571 \times RCE$

Biovolumen	
RCE > 0,19	$RCE_{trans} = 0,4938 \times RCE + 0,5062$
RCE \leq 0,19	$RCE_{trans} = 3,1579 \times RCE$

% Cianobacterias	
RCE > 0,91	$RCE_{trans} = 4,4444 \times RCE - 3,4444$
RCE \leq 0,91	$RCE_{trans} = 0,6593 \times RCE$

Índice de Grupos Algales (IGA)	
RCE > 0,9737	$RCE_{trans} = 15,234 \times RCE - 14,233$
RCE \leq 0,9737	$RCE_{trans} = 0,6162 \times RCE$

Tipos 4 y 5

Clorofila a	
RCE > 0,25	$RCE_{trans} = 0,5333 \times RCE + 0,4667$
RCE \leq 0,25	$RCE_{trans} = 2,4 \times RCE$

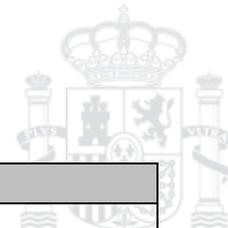
Biovolumen	
RCE > 0,248	$RCE_{trans} = 0,5316 \times RCE + 0,4684$
RCE \leq 0,248	$RCE_{trans} = 2,4234 \times RCE$

% Cianobacterias	
RCE > 0,647	$RCE_{trans} = 1,1318 \times RCE - 0,1318$
RCE \leq 0,647	$RCE_{trans} = 0,928 \times RCE$

Índice de Grupos Algales (IGA)	
RCE > 0,897	$RCE_{trans} = 3,8929 \times RCE - 2,8929$
RCE \leq 0,897	$RCE_{trans} = 0,6687 \times RCE$

Tipos 6 y 12

Clorofila a	
RCE > 0,195	$RCE_{trans} = 0,497 \times RCE + 0,503$
RCE \leq 0,195	$RCE_{trans} = 3,075 \times RCE$



Biovolumen	
RCE > 0,175	$RCE_{trans} = 0,4851 \times RCE + 0,5149$
RCE ≤ 0,175	$RCE_{trans} = 3,419 \times RCE$

% Cianobacterias	
RCE > 0,686	$RCE_{trans} = 1,2726x - 0,2726$
RCE ≤ 0,686	$RCE_{trans} = 0,875 \times RCE$

Índice de Grupos Algales (IGA)	
RCE > 0,929	$RCE_{trans} = 5,6325x - 4,6325$
RCE ≤ 0,929	$RCE_{trans} = 0,6459 \times RCE$

Tipos 7, 8, 9, 10 y 11

Clorofila a	
RCE > 0,43	$RCE_{trans} = 0,7018 \times RCE + 0,2982$
RCE ≤ 0,43	$RCE_{trans} = 1,3953 \times RCE$

Biovolumen	
RCE > 0,36	$RCE_{trans} = 0,625 \times RCE + 0,375$
RCE ≤ 0,36	$RCE_{trans} = 1,6667 \times RCE$

% Cianobacterias	
RCE > 0,72	$RCE_{trans} = 1,4286 \times RCE - 0,4286$
RCE ≤ 0,72	$RCE_{trans} = 0,8333 \times RCE$

Índice de Grupos Algales (IGA)	
RCE > 0,9822	$RCE_{trans} = 22,533 \times RCE - 21,533$
RCE ≤ 0,9822	$RCE_{trans} = 0,6108 \times RCE$

Tipo 13

Clorofila a	
RCE > 0,304	$RCE_{trans} = 0,575 \times RCE + 0,425$
RCE ≤ 0,304	$RCE_{trans} = 1,9714 \times RCE$

Biovolumen	
RCE > 0,261	$RCE_{trans} = 0,541x \times RCE + 0,459$
RCE ≤ 0,261	$RCE_{trans} = 2,3023 \times RCE$

% Cianobacterias	
RCE > 0,931	$RCE_{trans} = 5,7971 \times RCE - 4,7971$
RCE ≤ 0,931	$RCE_{trans} = 0,6445 \times RCE$

Índice de Grupos Algales (IGA)	
RCE > 0,979	$RCE_{trans} = 18,995 \times RCE - 17,995$
RCE ≤ 0,979	$RCE_{trans} = 0,6129 \times RCE$

RCE = Ratio de Calidad Ecológico

RCE_{trans} = Ratio de Calidad Ecológica transformado



11.3. COMBINACIÓN DE RCE TRANSFORMADOS PARA LA CLASIFICACIÓN DEL POTENCIAL ECOLÓGICO

La combinación de los valores de las métricas transformados se realizará utilizando la siguiente fórmula:

$$MASRP = \frac{\left(\frac{RCEn(Clo) + RCEn(BV)}{2} + \frac{RCEn(IGA) + RCEn(Cia\%)}{2} \right)}{2}$$

Dicha ecuación será aplicable siempre y cuando se disponga de datos de al menos una de las métricas relativa a la biomasa y al menos una de las métricas relativa a la composición.



ANEXO I: HOJA DE RESULTADOS



MINISTERIO
DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN
Y MEDIO AMBIENTE

HOJA DE RESULTADOS: FITOPLANCTON EN LAGOS Y EMBALSES

NOMBRE DEL LABORATORIO:		CÓDIGO ENTIDAD COLABORADORA: EC - /	
ANALISTA:		FECHA DE ANÁLISIS: __/__/__	
REFERENCIAS IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA	CLAVE:	BIBLIOGRAFÍA:	
CÓDIGO MASA DE AGUA	NOMBRE DE LA MASA DE AGUA:		
CÓDIGO MUESTRA	FECHA DE MUESTREO: __/__/__		
OBSERVACIONES:			

CLOROFILA

	RESULTADOS MUESTRA
Organismo / empresa	
Analista	
Fecha análisis	
Volumen agua filtrado (l)	
Volumen extracto (ml)	
Paso óptico de cubeta (cm)	
Absorbancia a 630 nm	
Absorbancia a 647 nm	
Absorbancia a 664 nm	
Absorbancia a 750 nm	
Concentración clorofila	

FITOPLANCTON

	RESULTADOS MUESTRA
Organismo / empresa	
Analista	
Fecha análisis	
Volumen de muestra sedimentado (ml)	
Factor de dilución	
Factor de concentración	



BIOVOLUMEN (mm ³ /l)		
GRUPOS IGA	CÓDIGO TAXAGUA	RESULTADOS MUESTRA
Cianobacterias*	CYA001FILO	
Diatomeas coloniales	BAC001FILO	
Criptofitos	CRY001FILO	
Crisoficeas coloniales	CHR001CLAS	
Clorococales coloniales	CHL002ORDE	
Volvocales coloniales	VOL001ORDE	
Dinoflagelados	DIN001FILO	
Crisoficeas no coloniales	CHR001CLAS	
Clorococales no coloniales	CHL002ORDE	
Diatomeas no coloniales	BAC001FILO	
Biovolumen total		

* Excluir el orden Chroococcales excepto los géneros *Microcystis* y *Woronichinia*.
La propiedad colonial / no colonial se obtiene de TAXAGUA

RESULTADOS DE LAS VARIABLES FISICOQUÍMICAS DETERMINADAS EN LABORATORIO	
	RESULTADOS MUESTRA
Fósforo total (mg P/L)	
Nitrógeno total (mg N/L)	
Fosfatos (mg PO ₄ /L)	
Amonio total (mg NH ₄ /L)	
Nitratos (mg NO ₃ /L)	
Alcalinidad (mg CaCO ₃ /L)	

RESULTADOS DE LAS MÉTRICAS EN EL AÑO			
RESULTADOS MÉTRICAS	RESULTADOS MUESTRA 1	RESULTADOS MUESTRA 2	RESULTADO FINAL
CONCENTRACIÓN CLOROFILA			
BIOVOLUMEN TOTAL FITOPLANCTON			
INDICE DE GRUPOS ALGALES (IGA)			
PORCENTAJE DE CIANOBACTERIAS			

PROTOCOLO DE CÁLCULO DEL ÍNDICE DE POLUSENSIBILIDAD ESPECÍFICA

CÓDIGO: IPS-2013

Aprobado por instrucción del Secretario de Estado de Medio Ambiente de fecha 22 de noviembre de 2013



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN
Y MEDIO AMBIENTE

Este documento pertenece a una serie de protocolos de muestreo, laboratorio y cálculo de índices y métricas para su utilización en los programas de seguimiento del estado de las masas de agua continentales (ríos, lagos y embalses) y en la clasificación del estado ecológico.

Las especificaciones de estos documentos deberán ser tenidas en cuenta por los Organismos de cuenca en la explotación de las redes oficiales de seguimiento del estado y potencial ecológico en las masas de agua superficiales continentales, bien directamente o a través de contratos de servicios. Estos protocolos están sujetos a los cambios que se consideren necesarios en virtud del progreso científico de la materia.



Aviso Legal: los contenidos de esta publicación podrán ser reutilizados, citando la fuente y la fecha, en su caso, de la última actualización



MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE

Edita:

© Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
Secretaría General Técnica
Centro de Publicaciones

Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado:

<http://publicacionesoficiales.boe.es/>

NIPO: 280-13-132-9



INDICE

1.	APLICABILIDAD	5
2.	OBJETIVO	5
3.	NORMATIVA DE REFERENCIA	5
4.	DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE IPS.....	6
5.	TRATAMIENTO DE LOS DATOS.....	6
	ANEXO I: HOJA PARA EL CÁLCULO DEL IPS	7



1. APLICABILIDAD

Este protocolo para el cálculo del índice IPS es de obligada aplicación en la explotación de las redes oficiales de evaluación del estado / potencial ecológico en cumplimiento de la Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, que explotan las Confederaciones Hidrográficas (CCHH), bien directamente o a través de contratos de servicios.

Este protocolo se aplica a muestras tomadas mediante el Protocolo de muestreo y laboratorio de flora acuática (organismos fitobentónicos) en ríos (Código: ML-R-D-2013) en masas de agua naturales de la categoría ríos y en las masas de agua artificiales o muy modificadas asimilables a ríos.

El cálculo del índice de polusensibilidad específica (IPS) para la clasificación del estado ecológico mediante el elemento de calidad flora acuática (fitobentos) en ríos, se realizará mediante la aplicación del presente protocolo.

2. OBJETIVO

La Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, establece que los Estados miembros deberán poner en marcha programas de seguimiento. Estos programas de seguimiento deben permitir controlar y evaluar la composición y abundancia de la flora acuática.

Por lo tanto, el objetivo de este protocolo es establecer un método de cálculo del índice IPS, de forma que el suministro de información sea de calidad y de comparabilidad científica equivalente entre Demarcaciones Hidrográficas, garantizando de este modo el cumplimiento de los requisitos mencionados anteriormente.

3. NORMATIVA DE REFERENCIA

La normativa de referencia de este protocolo es la que se enumera a continuación:

- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- RD Legislativo 1/2001 por el que se aprueba el Texto Refundido de la Ley de Aguas.
- RD 907/2007 por el que se aprueba el Reglamento de Planificación Hidrológica.
- Orden MAM/3207/2006 por la que se aprueba la ITC-MMA EECC-1/06 Instrucción técnica complementaria sobre determinaciones químicas y microbiológicas para el análisis de las aguas.
- Orden ARM/2656/2008 por la que se aprueba la Instrucción de Planificación Hidrológica.
- Orden MAM/985/2006 por la que se desarrolla el régimen jurídico de las entidades colaboradoras de la administración hidráulica en materia de control y vigilancia de calidad de las aguas y de gestión de los vertidos al dominio público hidráulico.
- MAGRAMA (2013). Protocolo de muestreo y laboratorio de flora acuática (organismos fitobentónicos) en ríos (Código: ML-R-D-2013).

Asimismo se ha considerado también la siguiente referencia:

- Tesoro para la clasificación del estado ecológico de las masas de agua continentales (TAXAGUA¹).

¹ <http://www.magrama.es/es/agua/temas/estado-y-calidad-de-las-aguas/aguas-superficiales/programas-seguimiento/TAXAGUA.aspx>



4. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE IPS

Datos de partida

El procedimiento para el cálculo del índice IPS requiere el muestreo, la identificación y el procesado en laboratorio de las diferentes especies de diatomeas identificadas mediante el Protocolo de muestreo y laboratorio de flora acuática (organismos fitobentónicos) en ríos (Código: ML-R-D-2013)

Una vez procesada y analizada la muestra se obtiene la hoja de laboratorio del anexo II del protocolo de muestreo que contiene todas las especies identificadas siguiendo la nomenclatura establecida en TAXAGUA y su abundancia en forma de número de valvas (2 valvas = 1 individuo).

Cálculo del índice

El índice IPS se calcula sobre la base de las medias ponderadas de los valores de sensibilidad a la contaminación (S_j), valores de tolerancia a la contaminación (V_j) y la abundancia relativa de cada especie.

La fórmula para obtener el valor del índice es:

$$IPS = 4,75 * \frac{\sum A_j * S_j * V_j}{\sum A_j * V_j} - 3,75$$

Dónde:

Abreviatura	Nombre	Fuente
A_j =	Abundancia relativa de la especie j	Muestreo y analítica de laboratorio
S_j =	Valor de sensibilidad de la especie j	TAXAGUA
V_j =	Valor de tolerancia de la especie j	TAXAGUA

Una vez obtenidos los valores de los productos de las abundancias relativas de cada una de las especies por sus correspondientes valores² de indicación y tolerancia se calcula el sumatorio, cuyo resultado se divide por el sumatorio de las abundancias de las especies multiplicadas por los valores de tolerancia. Este dato se pondera por medio de los coeficientes indicados en la fórmula.

5. TRATAMIENTO DE LOS DATOS

Con la puntuación del índice IPS obtenida según el procedimiento descrito en el punto anterior, se procederá a determinar el estado / potencial ecológico de la masa de agua. Para ello se deberán tener en cuenta las condiciones de referencia y los valores frontera de estado ecológico establecidos legalmente para el indicador IPS en el tipo de masa de agua que corresponda.

En este sentido habrá que comparar el valor de IPS obtenido en el muestreo con el valor de referencia establecido para el tipo de masa de agua en cuestión para obtener un Ratio de Calidad Ecológica (RCE). El valor final del RCE obtenido se compara con los valores frontera del tipo de masa de agua para la métrica IPS y se clasifica el estado ecológico.

Ratio de Calidad Ecológica = Valor Observado / Valor de referencia.

² Es necesario tener en cuenta que las formas teratogénicas pueden presentar valores de sensibilidad y tolerancia diferentes.

ANEXO I: HOJA PARA EL CÁLCULO DEL IPS

PROTOCOLO DE MUESTREO DE OTRO TIPO DE FLORA ACUÁTICA (MACRÓFITOS) EN LAGOS

CÓDIGO: M-L-OFM-2013

Aprobado por instrucción del Secretario de Estado de Medio Ambiente de fecha 22 de noviembre de 2013



Este documento pertenece a una serie de protocolos de muestreo, laboratorio y cálculo de índices y métricas para su utilización en los programas de seguimiento del estado de las masas de agua continentales (ríos, lagos y embalses) y en la clasificación del estado ecológico.

Las especificaciones de estos documentos deberán ser tenidas en cuenta por los Organismos de cuenca en la explotación de las redes oficiales de seguimiento del estado y potencial ecológico en las masas de agua superficiales continentales, bien directamente o a través de contratos de servicios. Estos protocolos están sujetos a los cambios que se consideren necesarios en virtud del progreso científico de la materia.



MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE

Edita:

© Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
Secretaría General Técnica
Centro de Publicaciones

Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado:
<http://publicacionesoficiales.boe.es/>

NIPO: 280-12-022-4



INDICE

1. APLICABILIDAD.....	5
2. OBJETIVO.....	5
3. NORMATIVA DE REFERENCIA	6
4. EQUIPOS, REACTIVOS Y CONSERVANTES	6
4.1. TRABAJO DE CAMPO	6
5. SELECCIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PUNTO DE MUESTREO	8
5.1. TIPOS DE LAGOS 1-16,18, 20-29.....	8
5.2. TIPOS DE LAGOS 17, 19 Y 30	13
6. FRECUENCIA Y ÉPOCA DE MUESTREO.....	13
7. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO	14
7.1 CONSIDERACIONES GENERALES.....	14
7.2. OBTENCIÓN DE DATOS DE RIQUEZA Y ABUNDANCIA EN LOS PUNTOS DE MUESTREO.....	14
7.3. ANÁLISIS DE VARIABLES FISICOQUÍMICAS	17
8. CONSERVACIÓN, ETIQUETADO Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS.....	17
8.1. CONSERVACIÓN DE MACRÓFITOS	17
8.2. ETIQUETADO Y TRANSPORTE	18
ANEXO I: HOJA DE CAMPO PARA MUESTREO	19
ANEXO II: LISTADOS TAXONÓMICOS	27



1. APLICABILIDAD

Este protocolo de muestreo es de obligada aplicación en la explotación de las redes oficiales de evaluación del estado / potencial ecológico en cumplimiento de la Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, que explotan las Confederaciones Hidrográficas (CCHH), bien directamente o a través de contratos de servicios.

Las estaciones en las que se utilizará este protocolo son las pertenecientes al programa de control de vigilancia, programa de control operativo, programa de control de investigación y redes de referencia.

Este protocolo es aplicable para el muestreo de las masas de agua naturales de la categoría lagos (lagos, lagunas y humedales), así como para la obtención de datos en los lagos declarados como muy modificados o artificiales que no sean embalses. Las muestras obtenidas deberán emplearse para la determinación y el cálculo de las siguientes métricas de evaluación del estado / potencial ecológico:

- Presencia / ausencia de hidrófitos típicos
- Riqueza de especies de macrófitos típicos
- Cobertura total de hidrófitos típicos
- Cobertura total de helófitos típicos
- Cobertura total de macrófitos típicos (hidrófitos + helófitos)
- Cobertura de especies de macrófitos indicadoras de condiciones eutróficas
- Cobertura de especies exóticas de macrófitos

Asimismo se podrá aplicar este protocolo de muestreo para el cálculo de otras métricas correspondientes a los macrófitos que se elaboren con posterioridad, salvo especificaciones. Además, los datos obtenidos, que se habrán de incorporar a las correspondientes bases de datos, servirán para mejorar y afinar el sistema de clasificación del estado ecológico para masas de agua de la categoría lago.

Los grupos de macrófitos que se consideran son los siguientes: plantas vasculares (cormófitos), carófitos, briófitos y algas filamentosas.

Las pautas de muestreo definidas para los macrófitos serán aplicables a todos los tipos de lagos, con las debidas especificaciones según los tipos, incluso para aquellos en los que, debido a la deficiencia de información al respecto, no se hayan podido establecer aún ni condiciones de referencia ni valores frontera entre clases de estado ecológico. Únicamente para aquellas masas de agua incluidas dentro de la categoría lago que no tienen macrófitos en condiciones naturales (conforme a la actual tipología española de lagos -Orden ARM/2656/2008 por la que se aprueba la Instrucción de Planificación Hidrológica-, estos son los lagos de los tipos 1-4 que se localicen por encima de los 2.300 msnm y los pertenecientes al tipo 9) no se aplicarán las pautas que se recogen en este protocolo.

Las pautas recogidas en este protocolo son coherentes con la norma UNE-EN 15460, aunque presentan un mayor grado de detalle con el fin de particularizar para los distintos tipos de lagos españoles. Para aquellos aspectos no recogidos en el presente protocolo, se seguirán las directrices establecidas en la norma UNE-EN 15460.

2. OBJETIVO

La Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, establece que los Estados miembros deberán poner en marcha programas de seguimiento. Estos programas de seguimiento deben permitir controlar y evaluar la composición y abundancia del elemento de calidad "otro tipo de flora acuática".



La Directiva Marco del Agua establece que los métodos empleados para controlar los indicadores de evaluación de los elementos de calidad biológicos se ajustarán a las normas internacionales o nacionales que garanticen el suministro de información de calidad y comparabilidad científica equivalentes.

Por lo tanto, el objetivo de este protocolo es establecer un método de muestreo para uno de los dos componentes del elemento de calidad "Otro tipo de flora acuática", concretamente los macrófitos, que garantice el cumplimiento de los requisitos mencionados anteriormente.

3. NORMATIVA DE REFERENCIA

La normativa de referencia de este protocolo es la que se enumera a continuación:

- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- RD Legislativo 1/2001 por el que se aprueba el Texto Refundido de la Ley de Aguas.
- RD 907/2007 por el que se aprueba el Reglamento de Planificación Hidrológica.
- Orden MAM/3207/2006 por el que se aprueba la ITC-MMA EECC-1/06 Instrucción técnica complementaria sobre determinaciones químicas y microbiológicas para el análisis de las aguas.
- Orden ARM/2656/2008 por la que se aprueba la Instrucción de Planificación Hidrológica.
- Orden MAM/985/2006 por la que se desarrolla el régimen jurídico de las entidades colaboradoras de la administración hidráulica en materia de control y vigilancia de calidad de las aguas y de gestión de los vertidos al dominio público hidráulico.

La presente instrucción se ha redactado teniendo en cuenta también las siguientes normas técnicas e informes técnicos:

- UNE EN 15460: 2008. Guía para el estudio de macrófitos en lagos.
- UNE EN 14996: 2007. Guía para el aseguramiento de la calidad de las evaluaciones biológicas y ecológicas en el medio ambiente acuático.
- UNE EN 5667-1: 2007. Guía para el diseño de los programas de muestreo y técnicas de muestreo.
- MAGRAMA (2013). Protocolo de muestreo de fitoplancton en lagos y embalses. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino. Madrid (M-LE-FP-2013).
- CEDEX (2010a): Selección de métricas para la evaluación del estado ecológico de las masas de agua de la categoría "lagos" basadas en el elemento de calidad "composición y abundancia de otro tipo de flora acuática", en aplicación de la Directiva Marco del Agua.
- CEDEX (2010b): Establecimiento de condiciones de referencia y valores frontera entre clases de estado ecológico en masas de agua de la categoría lago para los elementos de calidad "composición, abundancia y biomasa de fitoplancton" y "composición y abundancia de otro tipo de flora acuática", en aplicación de la Directiva Marco del Agua.

4. EQUIPOS, REACTIVOS Y CONSERVANTES

El equipo y los reactivos necesarios para la realización del muestreo son:

4.1. TRABAJO DE CAMPO

Equipos y material para la recolección de muestras de macrófitos

- Rastrillo con mangos extensibles para la toma de muestras de macrófitos en aguas someras.
- Ganchos para la toma de muestras de macrófitos en aguas profundas.



- Draga para la obtención de muestras de macrófitos en aguas profundas.
- Bandejas para depósito y manipulación de las muestras de macrófitos.
- Botellas de plástico de boca ancha que se utilizarán para la recolección de ejemplares de carófitos, u otros hidrófitos en su caso.
- Viales herméticos de vidrio que se utilizarán para la recolección de ejemplares de algas filamentosas.
- Sobres de papel para el depósito de especímenes de briófitos.
- Cartulinas para el depósito de ejemplares de plantas vasculares, correspondientes tanto a hidrófitos como a helófitos. Dado el tamaño de algunos helófitos, cada muestra puede consistir en fragmentos de la planta, que incluirán flores, frutos y hojas. Cada cartulina se colocará entre dos hojas de papel blanco o de periódico y se introducirá en una prensa de campo, colocando varias hojas de periódico o una almohadilla entre ejemplar y ejemplar.
- Prensa portátil con pliegos y almohadillas para la conservación en seco de las plantas vasculares.
- Embarcación que se requerirá para el muestreo de lagos no vadeables (lagos con una profundidad máxima > 1 m) o bien como apoyo en el caso de lagos vadeables (lagos con una profundidad máxima < 1 m) con el fin de servir de soporte para el transporte de instrumental y muestras. Debe incluir el equipo accesorio de navegación¹.
- Chaleco salvavidas.
- Equipo de vadeo adecuado para las condiciones locales, con el equipo de seguridad apropiado.
- Visores subacuáticos utilizados para la observación de las coberturas de las distintas especies de macrófitos y de la cobertura total de macrófitos en cada transecto de muestreo.
- Cámara subacuática utilizada de manera complementaria con el fin de obtener fotografías y grabaciones de vídeo para documentar y afinar las determinaciones de macrófitos realizadas.
- Ecosonda manual con el fin de determinar la zona de muestreo, que abarcará hasta una profundidad máxima de 2 m; y que también servirá, cuando sea posible, para determinar la profundidad máxima de colonización.
- Claves de identificación de los elementos de calidad biológicos: ID-TAX (DGA) y claves visuales complementarias seleccionadas para las plantas acuáticas típicas del tipo de lago a muestrear (anexo II).
- Cinta métrica para delimitar cada uno de los transectos de muestreo cuando sea necesario.
- Cuerdas y boyas para fijar los límites de los transectos cuando sea necesario.
- Solución de etanol al 70 % (concentración final v/v) que se utilizará para la fijación de muestras de carófitos, así como para los briófitos de escaso porte como son los de los géneros *Riella*, *Riccia* o *Ricciocarpus*.
- Solución de formol al 4 % (concentración final v/v) que se utilizará para la fijación de muestras de algas filamentosas.

Equipos y material complementario

- Hoja de campo (anexo I).
- Fundas impermeables para la hoja de campo y lápiz para anotar.
- Rotulador indeleble y lápiz para etiquetar las muestras.
- Cinta adhesiva y papel cebolla para etiquetar las muestras. Si se usan etiquetas, éstas deben ser resistentes a la humedad.
- Guantes de látex y de goma largos (hasta por encima del codo).
- Neveras portátiles.

¹ Únicamente se permite la utilización de motor de gasolina en masas de agua mayores de 50 ha, y ello sólo tras la obtención de los permisos pertinentes, respetando siempre las normas específicas que afecten a cada masa de agua.



- GPS.
- Cartografía adecuada.
- Teléfono móvil.

Todo el material utilizado en campo deberá estar convenientemente limpio y desinfectado para evitar el transporte y la dispersión de propágulos o individuos de especies invasoras. En este sentido, se deberán consultar los protocolos específicos de cada Confederación Hidrográfica o Administración hidráulica autonómica a tal efecto.

Para el trabajo de campo se deberán tomar todas aquellas medidas necesarias para garantizar que los trabajos se desarrollan en unas condiciones adecuadas de seguridad e higiene.

5. SELECCIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PUNTO DE MUESTREO

El procedimiento para seleccionar el punto de muestreo y la evaluación de coberturas se establece en función del tipo de lago y del tipo de macrófitos (helófitos, hidrófitos y anfífitos). Se consideran, además, aspectos relativos a las características del lago tales como profundidad, perímetro y pendiente, entre otros, cuya información deberá incluirse en la hoja de campo (anexo I).

En el caso de masas de agua que sean complejos lagunares, se podrá establecer más de un punto de muestreo (más de una laguna del complejo), eligiendo aquellas lagunas más representativas de las condiciones del conjunto en cuestión, debiendo justificarse en cualquier caso la elección del número, representatividad y localización de las lagunas muestreadas.

Con el objeto de posicionar cada uno de los puntos de muestreo se deberán registrar mediante dispositivos GPS las coordenadas UTM en el punto central de cada rectángulo / franja muestreado. Esta información quedará recogida en la hoja de campo del anexo I.

A continuación se facilitan los criterios aplicables en cada caso.

5.1. TIPOS DE LAGOS 1-16,18, 20-29

Macrófitos sumergidos y/o flotantes (Hidrófitos)

En el caso de los hidrófitos se considerará como variable de determinación su cobertura en las zonas colonizables muestreadas. La determinación y localización de los puntos de muestreo para los hidrófitos se realizará fundamentalmente en función del tamaño, así como de otros criterios como la profundidad de la masa de agua. A estos efectos, se consideran sistemas grandes o medianos aquellos que, en condiciones de máxima inundación normal, ocupen superficies mayores de 50 ha, y sistemas pequeños los menores de ese tamaño.

En cualquier caso, los puntos de muestreo de hidrófitos deberán situarse únicamente en zonas colonizables, esto es, hasta una profundidad de 2 m, excluyéndose además las zonas con sustrato exclusivamente rocoso o pedregoso, o de pendiente superior al 30 %, aspectos, ambos, que dificultan o impiden el enraizamiento natural de los hidrófitos². En el caso de que estas zonas no colonizables superen el 80 % de la superficie de la zona a evaluar (parte de la cubeta con profundidad inferior a 2 m.), se excluirá a los macrófitos como elemento de calidad en la evaluación del estado ecológico de la masa de agua.

Esta información se incluirá en la hoja de campo (anexo I).

² Aunque en zonas de sustrato rocoso podrá darse la aparición de especies de briófitos, para la evaluación del estado ecológico conforme a las métricas de cobertura de hidrófitos no se considerará este tipo de sustratos, si bien estas especies, cuando se encuentren, sí que contabilizarán para la métrica de riqueza de especies.

Aquellas partes de la cubeta y de la zona emergida no colonizadas por hidrófitos por efecto de las afecciones de tipo antrópico (no por las antedichas restricciones) sí serán consideradas como zonas colonizables a efectos de evaluación de las métricas correspondientes y por tanto, podrán ser consideradas como zonas de muestreo.

La elección del número y tipo de puntos de muestreo se realizará en función de las características propias del tipo de lago al que corresponda la masa de agua³, las cuales se deberán confirmar in situ para adecuar el muestreo a las condiciones vigentes en la masa de agua en el momento del muestreo. La elección de dichos puntos de muestreo, en los que se determinará la cobertura de cada especie y la cobertura total de macrófitos (hidrófitos en este caso), tal como se especifica en el apartado 7 y el anexo I de este protocolo, se realizará según los siguientes criterios:

Lagos de profundidad máxima \leq 2 m.

En lagos vadeables (profundidad máxima $<$ 1 m) se muestrea, cuando sea posible, con vadeador y en lagos no vadeables (profundidad máxima $>$ 1 m y \leq 2 m) se muestrea desde embarcación.

- *Lagos pequeños (\leq 50 ha).* Se realizarán dos recorridos longitudinales coincidentes con los ejes mayor y menor del lago, que lo atraviesen en toda su longitud y anchura, respectivamente. Cada uno de los recorridos se dividirá en 5 partes aproximadamente iguales, y en cada una de ellas se muestrearán, al menos, un rectángulo (transecto) de unos 2 metros de ancho x unos 10 metros de largo (total 10 rectángulos de unos 20 m² cada uno, cinco por recorrido). A fin de asegurar, en su caso, el muestreo de las especies con preferencias más litorales, los recorridos en ambos ejes incluirán siempre, como puntos de muestreo inicial y final, un rectángulo de 2 x 10 metros situado inmediatamente aguas adentro de la orilla en cada uno de los extremos del recorrido (figura 1).

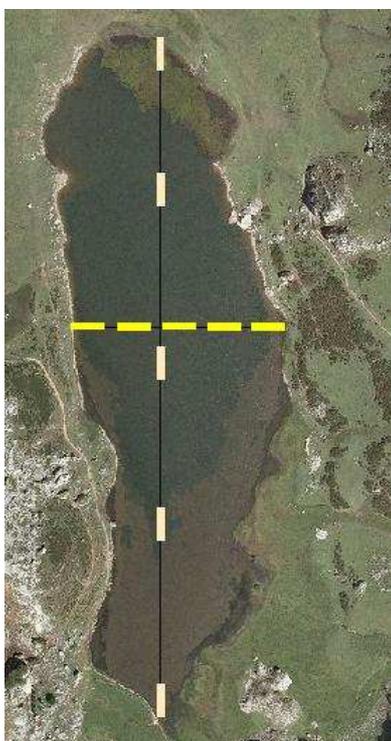


Figura 1 - Recorridos en los ejes y transectos (rectángulos) para el muestreo de hidrófitos en lagos someros y pequeños.

³ Orden ARM/2656/2008 por la que se aprueba la Instrucción de Planificación Hidrológica.

- *Lagos medianos o grandes (> 50 ha)*. Se realizará de igual manera que en el epígrafe anterior, pero en el caso de que alguno de los ejes supere los 500 m. de longitud, este se dividirá en diez porciones discontinuas (al menos una en cada orilla y el resto entre ambas, equidistantes entre sí), y en cada una de ellas se muestreará, al menos, un transecto de unos 2 metros de ancho x unos 10 metros de largo (figura 2).



Figura 2 - Recorridos en los ejes y transectos para el muestreo de hidrófitos en lagos someros medianos o grandes

Lagos de profundidad máxima > 2 m

- *Lagos pequeños (≤ 50 ha)*. Se realizarán 10 transectos (rectángulos) perpendiculares a la orilla, partiendo de ésta hacia aguas adentro. La longitud de cada rectángulo llegará, como máximo, hasta donde se alcancen los 2 m de profundidad (medidos con ecosonda de mano), y la anchura de cada uno de ellos será de unos 2 m, o bien una anchura tal que determine que, para cada rectángulo, la superficie muestreada al multiplicar la anchura por la longitud sea de aproximadamente 20 m². Los puntos de partida de los rectángulos estarán aproximadamente equidistantes entre sí, y se determinarán dividiendo en 10 partes el perímetro del lago, teniendo en cuenta que las zonas elegidas para los transectos deben cumplir, como en todos los casos, las condiciones de colonizabilidad.



Figura 3 - Transectos para el muestreo de hidrófitos en lagos profundos y pequeños

- Lagos *medianos o grandes* (> 50 ha). Se procederá de manera similar al caso anterior, pero se realizarán 20 transectos en lugar de 10.



Figura 4 - Transectos para el muestreo de hidrófitos en lagos profundos medianos o grandes

Macrófitos emergentes de las orillas o asimilables (Helófitos)

En el caso de los helófitos, y dado que estos se desarrollan en las orillas parcial o totalmente emergidos, se considerará como variable de determinación de su cobertura el perímetro del lago que ocupan.

La determinación del número y localización de los puntos de muestreo deberá considerar únicamente zonas que sean colonizables por parte de los helófitos. Se excluyen por tanto de la determinación las zonas con sustrato exclusivamente rocoso o pedregoso, o de pendiente superior al 30 %, aspectos ambos que dificultan o impiden el enraizamiento de estas plantas emergentes.

En caso de que la zona colonizable sea menor del 20% de la superficie de la zona a evaluar (orillas en el caso de los helófitos), se excluirá a los macrófitos como elemento de calidad en la evaluación del estado ecológico de la masa de agua.

Al igual que para los hidrófitos, estas características se indicarán en la hoja de campo (anexo I) para cada masa de agua muestreada.

Cuando existan zonas no colonizadas por helófitos debidas a afecciones de tipo antrópico (no por las antedichas restricciones) sí serán consideradas como zonas colonizables a efectos de evaluación de las métricas correspondientes y, por tanto, podrán ser consideradas como zonas de muestreo.

El muestreo se realizará en las orillas e incluirá una franja de unos 3 m de ancho (salvo que se especifique lo contrario para algún tipo específico de lago, como para los lagos salinos de los tipos 20 a 23⁴) desde la orilla hacia afuera, en la que se determinará la cobertura de cada especie y la cobertura total de helófitos tal como se especifica en el apartado 7 y en el anexo I de este protocolo.

En función del tamaño del lago, la localización y extensión de los puntos de muestreo se determinará de la siguiente manera:

- **Lagos de ≤ 1 km de perímetro.** Se muestreará una franja de unos 3 m de ancho en todo el perímetro del lago.



Figura 5 - Franja para el muestreo de helófitos en lagos con menos de 1 km de perímetro

- **Lagos de > 1 km de perímetro.** Se muestreará al menos 1 km de las orillas, dividiendo el perímetro del lago en 10 zonas, dentro de cada una de las cuales se muestreará al menos una franja de 100 m de longitud y 3 m de ancho.

⁴ “En los lagos salinos de los tipos 20 a 23, la franja de las orillas en la que se determinará la cobertura de helófitos (incluyendo en este caso las especies típicas del salicorniar) será la situada entre la orilla y 10 metros aguas afuera de ésta”

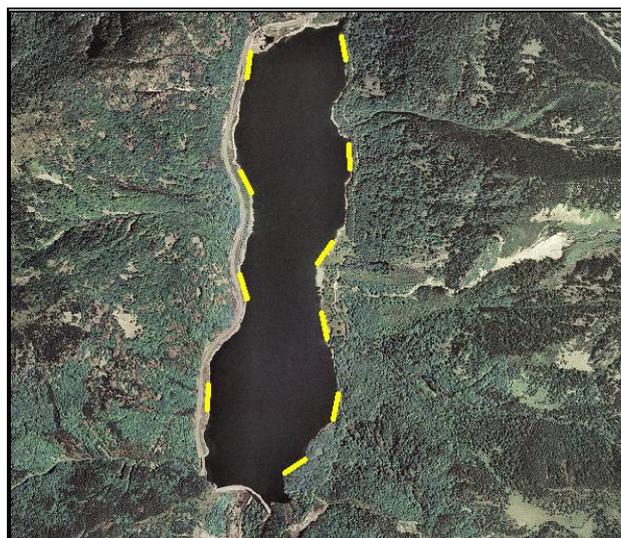


Figura 6 - Zonas de muestreo de helófitos en lagos con un perímetro mayor a 1 km

Macrófitos anfífitos

Los anfífitos pueden vivir tanto en zonas inundadas como emergidas. A efectos de evaluación de las métricas de cobertura, se considerarán hidrófitos cuando se encuentren sumergidos y se asimilarán a helófitos cuando ocupen zonas emergidas, anotándose como tales en la hoja de campo. En el caso de los lagos salinos (tipos 20 a 23), las especies propias del salicorniar se asimilarán a helófitos a efectos de evaluación de la cobertura.

5.2. TIPOS DE LAGOS 17, 19 Y 30

Hidrófitos y helófitos

En estos tipos de lagos la vegetación típica corresponde a todo el conjunto de macrófitos, considerando tanto a los hidrófitos como a los helófitos, ya que estos lagos son temporales y las especies de hidrófitos y helófitos se encuentran habitualmente entremezcladas.

Las especies integrantes de ambos grupos serán muestreadas en toda la extensión inundada de la cubeta mediante transectos, siguiendo las instrucciones fijadas anteriormente para hidrófitos en lagos de profundidad máxima ≤ 2 m (figuras 1 y 2). La información recogida de esta forma se anotará en la parte correspondiente a muestreo de hidrófitos en la hoja de campo, si bien refiriendo que incluyen todos los macrófitos.

Además del interior de la cubeta, se muestrearán también los macrófitos de las orillas, de la misma manera que se especifica para los helófitos en el resto de tipos de lagos (figuras 5 y 6). La información recogida de esta forma se anotará en la parte correspondiente a muestreo de helófitos en la hoja de campo.

La cobertura total de macrófitos (considerando tanto a los hidrófitos como a los helófitos) se estimará considerando el total de esos transectos siguiendo las especificaciones del Protocolo de laboratorio y cálculo de métricas de otro tipo de flora acuática (macrófitos) en lagos (OFALAM – 2013).

6. FRECUENCIA Y ÉPOCA DE MUESTREO

El muestreo deberá realizarse durante el periodo vegetativo. Para este elemento de calidad generalmente se realizarán uno o dos muestreos anuales, excepto en los lagos temporales, en los cuales se realizará únicamente un muestreo al año. Para el resto de tipos de lagos, en el caso de realizar un solo muestreo anual, se escogerá aquella de las dos fechas propuestas en la que la



vegetación macrofítica presente un mayor desarrollo. En caso de que el muestreo corresponda al control de vigilancia se harán coincidir las fechas con el del resto de elementos de calidad, todo ello conforme a lo dispuesto a continuación:

- Lagos permanentes profundos (tipos 1-4, 6-10, 12, 14-15 y 22). Como regla general se realizará un muestreo al año en la primera mitad del periodo estival, en torno al mes de julio. En caso de realizarse dos muestreos, el primero se efectuará aproximadamente en la primera mitad del periodo estival, en torno al mes de julio, y el segundo en la segunda mitad del periodo estival, sobre el mes de septiembre. En ambos casos y cuando se trate del control de vigilancia (en el que se muestrean todos los elementos biológicos), el muestreo de macrófitos se hará coincidir con las campañas de muestreo de fitoplancton.
- Lagos y humedales permanentes someros (tipos 11, 16, 18, 20, 27-29 y los que presenten hidroperiodo permanente de los tipos 24-26). Como regla general se realizará un muestreo al año, aproximadamente a mitad de primavera, haciéndolo coincidir con el muestreo de fitoplancton (en el caso del control de vigilancia). En caso de realizarse dos muestreos, el primero tendrá lugar aproximadamente a mitad de primavera, en torno al mes de mayo, y el segundo en torno a la mitad del periodo estival, haciéndolos coincidir con las campañas de muestreo de fitoplancton.
- Lagos y humedales temporales (tipos 5, 13, 17, 19, 21, 23, 30 y los que presenten hidroperiodo temporal de los tipos 24-26). Se realizará un muestreo al año durante la fase de inundación, en primavera (como mínimo un mes después del comienzo del llenado de la cubeta, o bien al menos un mes después del deshielo en el caso de los del tipo 5), y se hará coincidir con la primera campaña de muestreo de fitoplancton (en el caso de control de vigilancia).

7. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO

7.1. CONSIDERACIONES GENERALES

Los grupos de macrófitos que se consideran son los siguientes: plantas vasculares (cormófitos), carófitos, briófitos y algas filamentosas, siendo el nivel de determinación taxonómica para todos los grupos el de especie, excepto para las algas filamentosas que será el de género.

La identificación in situ únicamente se realizará cuando exista un elevado grado de confianza en la identificación por parte de un experto integrante del equipo de muestreo. Para ello resulta recomendable realizar un trabajo previo de gabinete para determinar los taxones presentes en el tipo de lago y más concretamente en la masa de agua a muestrear, así como recopilar material de apoyo para la identificación en campo (claves ID-TAX, fotografías, descripciones, etc.)

Respecto a todas las especies no identificadas con certeza in situ, se recogerán ejemplares para su posterior identificación, los cuales se guardarán según lo establecido en el apartado 8, y se codificarán en la hoja de campo. La cobertura estimada de cada especie se asociará en la hoja de campo al código de la especie en cuestión hasta que se proceda con la identificación en el laboratorio. En este sentido, los datos agregados definitivos de coberturas por transecto, a efectos del cálculo de las métricas de coberturas totales, se obtendrán tras las determinaciones en laboratorio, una vez se hayan identificado todas las especies. El procedimiento para agregar los datos obtenidos tras la toma de muestras en el campo y la identificación en el laboratorio se especifica en el Protocolo de laboratorio y cálculo de métricas de otro tipo de flora acuática (macrófitos) en lagos (Código: OFALAM-2013).

7.2. OBTENCIÓN DE DATOS DE RIQUEZA Y ABUNDANCIA EN LOS PUNTOS DE MUESTREO

La determinación de las especies y sus coberturas asociadas en cada transecto (que debe estar siempre en zona colonizable) se llevará a cabo de forma visual, contabilizando de forma aproximada el porcentaje de cobertura de cada especie y del total de ellas en el transecto, siendo recomendable



el uso en campo de las claves de identificación elaboradas por la Dirección General del Agua (ID-TAX) y guías complementarias.

Para la determinación de la cobertura se diferenciará entre hidrófitos y helófitos, es decir, la evaluación se hará por separado y el porcentaje de cobertura se referirá a la superficie de proyección basal (proyección sobre el sustrato) ocupada aproximadamente por cada especie en el transecto de su hábitat más característico: la cubeta en el caso de hidrófitos y las orillas en el caso de helófitos (excepto en los tipos 17, 19 y 30 en los que se evaluarán todas las especies presentes en cubeta y orillas sin diferenciar entre ambas).

Por lo tanto, para cada transecto y para cada grupo (helófitos e hidrófitos), se estimará en campo el porcentaje de cobertura total en el transecto y, además, se anotará el porcentaje de cobertura de cada especie en el transecto. Para ello se marcará en la hoja de campo con una X para cada 10 % aproximado de cobertura ocupado por la especie en cuestión. En caso de coberturas menores al 10% se anotará el valor numérico aproximado del porcentaje de cobertura del taxón.

Una vez se hayan identificado en laboratorio todas las especies, se tendrá la certeza de si son especies típicas del tipo o no, si son indicadoras de eutrofia o si son especies exóticas. Con esta información, se procederá a revisar los porcentajes estimados en campo con el fin de obtener los datos agregados definitivos de coberturas por transecto, siguiendo el procedimiento establecido en el Protocolo de laboratorio y cálculo de indicadores de otro tipo de flora acuática (macrófitos) en lagos (Código: OFALAM-2013).

Las muestras de algas filamentosas y briófitos suelen presentar más de una especie, por lo que, a efectos de estimar la cobertura en campo dentro de las zonas colonizables por otro tipo de macrófitos, ésta se asignará a la especie más abundante en la muestra y el resto de las especies se citarán como presentes sin cuantificar su cobertura. En la hoja de campo se indicará la presencia de dichas especies menos abundantes con una "X" en el espacio destinado al porcentaje de cobertura.

Los anfífitos (plantas anfibias, que pueden vivir tanto en zonas inundadas como en zonas emergidas) se considerarán como hidrófitos cuando se encuentren sumergidos y se asimilarán a helófitos cuando ocupen zonas emergidas. En el caso de los lagos salinos (tipos 20 a 23), las especies propias del salicorniar se asimilarán a helófitos a efectos de evaluación de la cobertura.

Macrófitos sumergidos y/o flotantes (Hidrófitos)

Para las métricas de cobertura de especies típicas se considerarán únicamente las especies características del tipo (anexo II), por lo que el nivel de determinación taxonómica requerido será el de especie. Se utilizará un visor subacuático para determinar la cobertura de cada especie en cada transecto, así como la cobertura total de hidrófitos en el mismo. Siempre que no sea posible identificar in situ con absoluta certeza el taxón al nivel de determinación exigido, se extraerán mediante ganchos, rastrillos o dragas, ejemplares de la especie, poniendo especial cuidado en no esquilmar ni dañar la comunidad de macrófitos. Posteriormente, se procederá a identificar la especie en laboratorio y a asociarle los datos de cobertura estimados previamente que le correspondan. Las algas filamentosas se recolectarán siempre, ya que su identificación taxonómica requiere un estudio microscópico.

Frecuentemente los hidrófitos pueden distribuirse en capas multiestratificadas y/o entremezclados sobre una misma superficie (por ejemplo hidrófitos flotantes sobre enraizados). Cuando esto suceda, se deberá anotar mediante una X en la hoja de campo del anexo I, la cobertura de cada una de las especies multiestratificadas, teniendo en cuenta que cada marca equivale a un 10% de cobertura. Las especies multiestratificadas quedarán superpuestas en la misma columna.

Si una misma especie se encuentra tanto en una capa multiestratificada como en solitario, se anotará una o varias X en cada una de estas situaciones en función del porcentaje ocupado (una X por cada 10% de cobertura). En caso de encontrarse en solitario, su cobertura se anotará de forma que no quede superpuesta con otras especies tal y como se indica en el siguiente ejemplo.



Nombre o código especie	TRANSECTO 1									
Especie A - 30 % de cobertura superpuesta	X	X	X							
Especie B - 20% de cobertura superpuesta	X	X								
Especie C - 10% de cobertura superpuesta y un 20% en solitario	X			X	X					

Posteriormente a la determinación de las especies en laboratorio, se realizará una normalización de los porcentajes anotados para obtener los porcentajes que computarán para el cálculo de cada una de las métricas. En el caso de que alguna de las especies superpuestas fuese indicadora de condiciones eutróficas⁵ o una especie exótica⁶, la cobertura de ésta se considerará únicamente a efectos del cálculo de las métricas “Cobertura total de macrófitos indicadores de condiciones eutróficas” y/o “Cobertura total de macrófitos exóticos”. En cualquier caso, los cálculos finales de las diferentes métricas de cobertura se explican en detalle en el Protocolo de laboratorio y cálculo de indicadores de otro tipo de flora acuática (macrófitos) en lagos (Código: OFALAM-2013).

Para el cálculo de la métrica “Riqueza de especies de macrófitos” se deberán registrar todos los taxones típicos del tipo (anexo II) que se encuentren presentes, independientemente de que éstos se presenten superpuestos, e incluso, en el caso de los hidrófitos, cuando se encuentren a una profundidad mayor a la delimitada como zona de muestreo (2 m.). Para ello, en lagos con una profundidad superior a 2 m se determinará también, en cada uno de los transectos, la profundidad máxima aproximada de colonización de los hidrófitos, siempre que ello fuera posible. Para la determinación de las métricas “Presencia/ausencia de hidrófitos” y “Riqueza de especies de macrófitos” se deberán registrar también todas aquellas especies nuevas (que no hayan aparecido antes en estos) de hidrófitos que se identifiquen por debajo de los 2 m de profundidad, si bien no se considerará el valor de sus coberturas asociadas.⁷ En cualquier caso, no se registrará el valor de cobertura (únicamente la presencia a efectos de estimación de las métricas “Presencia/ausencia de hidrófitos” y “Riqueza de especies de macrófitos”) en los siguientes casos:

- Especies de hidrófitos identificadas a una profundidad superior a 2 m.
- Especies de briófitos identificadas sobre sustrato rocoso (no colonizable por otro tipo de macrófitos).

Para los tipos 17, 19 y 30, la estimación de la cobertura total en cada uno de los transectos será la que ocupen conjuntamente los hidrófitos y los helófitos, la cual se utilizará para la estimación de la métrica Cobertura total de macrófitos (hidrófitos + helófitos).

Siempre que sea posible, los datos de cobertura de hidrófitos se acompañarán de fotografías y/o vídeos subacuáticos, que ilustren sobre la cobertura en cada transecto e identifiquen las especies para las que se haya determinado dicha cobertura.

Macrófitos emergentes de las orillas o asimilables (Helófitos)

El nivel de determinación taxonómica de los helófitos será también el de especie, considerándose, para las métricas de cobertura de especies típicas, igual que para los hidrófitos, las especies características del tipo (anexo II). El muestreo será visual y la identificación, cuando pueda ser realizada con absoluta certeza, se hará preferentemente in situ, debiendo tomarse ejemplares para

⁵ Se considerarán especies indicadoras de condiciones eutróficas las que figuran el Anexo II y, como tales, en TAXAGUA

⁶ Se considerarán especies exóticas las que figuran en el Anexo II y, como tales, en TAXAGUA

⁷ Se propone la estimación de la profundidad máxima de colonización, así como de las especies presentes por debajo de 2m de profundidad mediante el uso del visor subacuático y de ecosonda de mano. No obstante, su correcta estimación requeriría, bien del muestreo mediante dragas o ganchos cada cierto intervalo de profundidad, o bien de la utilización de buzos. Ninguna de estas metodologías se contemplan en este protocolo de muestreo, por lo que los valores obtenidos mediante la metodología alternativa propuesta se han de considerar como aproximados y, en todo caso, como el límite inferior observado hasta el cual los macrófitos se extienden en profundidad, dado que en muchos casos, éstos alcanzarán profundidades mayores no perceptibles mediante el uso del visor subacuático.



su clasificación posterior en el caso de que no exista esa certeza, los cuales se codificarán como ya se ha indicado anteriormente para los hidrófitos.

En la hoja de campo se recogerán los nombres de los taxones y códigos de las especies de helófitos identificadas en campo y sus coberturas asociadas, mientras que en el caso de especies que no hayan podido identificarse in situ con un alto nivel de confianza, el nombre del taxón será sustituido por el del código asignado a la muestra que contenga al espécimen en cuestión. Se registrará igualmente el valor de la cobertura total de helófitos en cada transecto (en lagos de perímetro >1km.) o para el conjunto del lago (en lagos de perímetro ≤1km.), según proceda.

En caso de ser necesaria la extracción de taxones para su identificación posterior, el muestreo deberá ilustrarse con fotografías y/o vídeos de cada una de las especies presentes, que permitan resolver cualquier duda taxonómica. Dicha documentación acompañará a los datos de cobertura de cada especie. En el caso de los helófitos, dichas fotografías tratarán de obtener una imagen panorámica de cada uno de los transectos o del conjunto del lago, a efectos de ilustrar la cobertura total en el transecto o en el lago, y deberán incluir, al igual que para los hidrófitos, fotografías de las especies identificadas y/o codificadas para su clasificación en el laboratorio.

7.3. ANÁLISIS DE VARIABLES FÍSICOQUÍMICAS

Las muestras para el análisis de variables físico-químicas, en caso de que sea necesario tomarlas, se recogerán situando el punto de muestreo sobre la parte más profunda de la masa de agua, de acuerdo con lo establecido al respecto en el protocolo de muestreo de fitoplancton en lagos y embalses (Código: M-LE-FP-2013).

Se realizará el muestreo de variables físico-químicas junto con el del elemento de calidad “Otro tipo de flora acuática” en aquellas masas de agua de la categoría lago que se encuentren incluidas dentro del programa de control operativo y en las que éste sea el único elemento de calidad que presente riesgo de incumplimiento. En el resto de masas de agua incluidas en los programas de control de vigilancia y en la red de referencia, el muestreo físico-químico deberá realizarse en las mismas fechas que el del elemento de calidad “composición, abundancia y biomasa de fitoplancton”, siguiendo las especificaciones que vienen recogidas en cuanto a variables físicoquímicas en el protocolo antes mencionado.

8. CONSERVACIÓN, ETIQUETADO Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

8.1. CONSERVACIÓN DE MACRÓFITOS

Hidrófitos

Los ejemplares de cada taxón, que se extraerán cuando su identificación visual en campo no sea posible con absoluta certeza (excepto las algas filamentosas que se deberán extraer en todo caso), se conservarán en recipientes separados para cada especie, procurando recoger el mínimo imprescindible y evitando dañar la comunidad de macrófitos. La conservación se realizará del siguiente modo:

Carófitos

Se guardarán preferentemente en botes de plástico de boca ancha (de distintos tamaños según sea la entidad de la muestra), fijándose inmediatamente después de su recolección con etanol al 70% (concentración final v/v). El recipiente se codificará con el código con el que se haya anotado la abundancia del taxón al determinar su cobertura, así como con el código correspondiente a la muestra (fecha, código de la masa de agua y transecto). Dado que el etanol utilizado en la fijación puede disolver la tinta usada para el etiquetado de la muestra, deberán utilizarse sistemas de etiquetado que eviten el borrado de la misma. Por ello, el etiquetado exterior se podrá complementar con una etiqueta de papel cebolla escrita con lápiz e introducida en el bote para evitar problemas causados por pérdidas o borrado del etiquetado.



Algas filamentosas

Se procederá de igual manera que en el caso anterior, pero las muestras se depositarán en viales herméticos de vidrio y se fijarán con Lugol. En caso de los análisis en laboratorio no se realicen al poco tiempo de tomar la muestra, habrá que llevar a cabo un mantenimiento del conservante, añadiendo Lugol cada cierto tiempo.

Briófitos

Por regla general, no será necesario ni fijarlos con alcohol ni prensarlos, sino que se guardarán en sobres de papel y se dejarán secar, anotando la codificación como en los casos anteriores. Solamente será necesario fijar con etanol al 70% (concentración final v/v) los briófitos de escaso porte, como los de los géneros *Riella*, *Riccia* o *Ricciocarpus*, que también pueden prensarse como se indica para el caso de las plantas vasculares.

Plantas vasculares

Preferentemente se colocarán sobre un papel blanco, tipo cartulina, donde se extenderán convenientemente para que los ejemplares puedan individualizarse, sobre todo en el caso de que sean pequeños. Cada cartulina se colocará entre dos hojas de papel blanco o de periódico y se introducirá en una prensa de campo, colocando varias hojas de periódico o una almohadilla entre ejemplar y ejemplar. Es necesario cambiar los papeles o almohadillas si las muestras están muy húmedas hasta que se sequen totalmente para evitar la aparición de hongos. Hay que cerciorarse de que los ejemplares recolectados tengan flores y/o frutos para su posterior identificación, y de que los pliegos estén debidamente codificados.

Helófitos

En caso de resultar necesario extraer ejemplares, las muestras se prensarán como las de los hidrófitos vasculares, aunque en este caso no es necesario utilizar cartulinas.

Dado el tamaño de algunos helófitos, la muestra podrá constar de fragmentos de la planta, que incluirán hojas, flores y frutos cuando los haya.

8.2. ETIQUETADO Y TRANSPORTE

Etiquetado

Todas las muestras y preparaciones deben estar convenientemente etiquetadas de forma que se identifique:

- código de identificación (uno para cada especie no identificada in situ).
- sustratos de los que procede.
- fijador utilizado.

Se utilizará un rotulador resistente al agua y/o etiquetas interiores escritas a lápiz.

Transporte

Todas las muestras en fresco se transportarán en una nevera con hielo. Los viales y recipientes de muestras fijadas con formol se cerrarán con cinta aislante. Las muestras prensadas se transportarán en la propia prensa. Todas las muestras se preservarán de la exposición a la luz (en cajas cerradas).

ANEXO I: HOJA DE CAMPO PARA MUESTREO



DATOS IDENTIFICATIVOS DEL MUESTREO

NOMBRE DE LA MASA DE AGUA:		TIPO:	CÓDIGO DE LA MASA DE AGUA:	
CÓDIGO DEL PUNTO DE MUESTREO:	COORDENADA X/ COORDENADA Y (ETRS89):		HUSO:	
ORGANISMO/EMPRESA:				
MUESTREADOR:		Programa:	Vigilancia:	
CODIGO MUESTRA:			Operativo:	
FECHA:	____/____/____		Investigación:	
	Hora inicio: ____:____		Referencia:	
	Hora fin: ____:____			
CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA:	<input type="checkbox"/> Etanol <input type="checkbox"/> Lugol <input type="checkbox"/> Otro (indicar)			

Descripción de acceso y localización:

CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS

pH (unidades):	Oxígeno disuelto (mg O ₂ /l):
Temperatura del agua (°C):	% Saturación O ₂ :
Conductividad eléctrica a 20°C (µS/cm):	Profundidad del Disco de Secchi (m):
Observaciones:	

CARACTERÍSTICAS HIDROMORFOLÓGICAS

Nivel del agua respecto a la escala (m):	Profundidad máxima (m):	Perímetro (km):	
Longitud máxima (km):	Superficie (ha):		
Porcentaje de orilla en cada categoría de pendiente media de los taludes en la zona emergida	< 30 %	Porcentaje de tipos de sustrato en la zona emergida de la orilla: (Indicar porcentaje aproximado de los distintos tipos de sustratos)	Rocas: Piedras: Gravas: Arenas: Limos y Arcillas:
	30 - 50 %		
	50 - 75 %		
	> 75 %		
Porcentaje en cada categoría de pendiente media de los taludes en la zona litoral sumergida (< 2 m de profundidad)	< 30 %	Porcentaje de tipos de sustrato en la zona litoral sumergida (<2 m de profundidad) : (Indicar porcentaje aproximado de los distintos tipos de sustratos)	Rocas: Piedras: Gravas: Arenas: Limos y Arcillas:
	30 - 50 %		
	50 - 75 %		
	> 75 %		
% zona somera de la cubeta (<2 m) colonizable por hidrófitos ¹		% zona emergida de la orilla colonizable por helófitos ¹	

¹ Aquellas partes de la cubeta y de la zona emergida de la orilla en las que las condiciones que presentan en el momento del muestreo y que eviten, en su caso, su colonización por macrófitos, sean consecuencia de afecciones de tipo antrópico se considerarán como zonas colonizables tanto en el caso de los hidrófitos como de los helófitos.



CARACTERÍSTICAS DE COMUNIDADES BIOLÓGICAS ASOCIADAS

Cobertura (%) de <i>blooms</i> algales		Cobertura (%) de tapetes microbianos multiestratificados	
Porcentaje de vegetación de ribera	Sin vegetación de ribera	Abundancia de avifauna:	<input type="checkbox"/> Inexistente <input type="checkbox"/> Escasa <input type="checkbox"/> Abundante <input type="checkbox"/> Muy abundante
	Cobertura arbórea		
	Arbustos y hierbas altas		
	Hierbas y pasto		
Especies dominantes de vegetación de ribera			

MUESTREO DE HIDRÓFITOS EN LAGOS

Información general de los puntos de muestreo

Nº transecto ¹	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Punto central del rectángulo (UTM coord X)										
Punto central del rectángulo (UTM coord Y)										
Longitud ²										
Anchura ²										
Profundidad máxima de colonización por macrófitos ²										

¹ En el caso de lagos con un tamaño superior a las 50 ha, se seleccionarán 20 transectos de muestreo en lugar de 10, duplicándose para anotarlos esta hoja de campo. Estos transectos se distribuirán equidistantemente a lo largo del perímetro en el caso de lagos con una profundidad máxima superior a 2 m, y a lo largo de los ejes mayor y menor en el caso de lagos con una profundidad máxima inferior a los 2 m (véase el apartado 5 de este protocolo).

² Sólo para lagos profundos.

ANEXO II: LISTADOS TAXONÓMICOS



En este anexo se relacionan las especies, subespecies y variedades características de macrófitos, tanto de hidrófitos como de helófitos, para los diferentes tipos de lagos agrupados en función de similitudes en sus características ecológicas y su flora acuática. Estos listados deberán ser tenidos en cuenta en la estimación de métricas y agregación de datos de composición y coberturas descritas en este protocolo. Como puede observarse se facilita el código asociado a Taxagua de cada una de las especies contempladas.

Las especies que resultan tolerantes a la eutrofización no se considerarán como especies típicas. Tampoco se considerarán como típicas las especies exóticas.

Otras especies autóctonas que puedan aparecer durante las campañas de las redes biológicas, podrían igualmente considerarse como especies características de estos tipos, aunque esta circunstancia deberá ser debidamente justificada, ya sea mediante publicaciones científicas de acreditado rigor que así lo atestigüen, o bien mediante justificación en un informe escrito realizado por un experto reconocido en macrófitos de lagos y humedales de España. En cualquier caso, la inclusión de nuevos taxones característicos de los diferentes tipos de lagos deberá contar con la validación de la Subdirección General de Gestión Integrada del Dominio Público Hidráulico que es la unidad encargada de coordinar el tesoro taxonómico para la clasificación del estado ecológico de las masas de agua continentales.

En las siguientes tablas se especifican las especies más características de cada uno de los grupos de tipos de lagos que se han considerado, distinguiendo entre hidrófitos y helófitos (los anfítos pueden aparecer vinculados a una u otra categoría, pero se considerarán como especie típica en ambas, es decir, como hidrófitos si están sumergidos o como helófitos si son emergentes).

Asimismo, en el caso de los tipos salinos (tipos 20-23), se han especificado también las especies propias de salicorniar, que se desarrollan en las zonas litorales de sistemas lagunares incluidos dentro de estos tipos. Aunque estas especies no pueden considerarse como helófitos en sentido estricto, se tomarán como tales a efectos de evaluación de su cobertura.

Tabla 1 - Taxones de macrófitos característicos de lagos y humedales de montaña (tipos 1 a 8)

HIDROFITOS		HELOFITOS	
Carófitos		<i>Alopecurus aequalis</i>	ALO002AEQ010
<i>Chara aspera</i>	CHA001ASP001	<i>Alopecurus geniculatus</i>	ALO002GEN019
<i>Chara globularis</i>	CHA001GLO046	<i>Baldellia alpestris</i>	BAL002ALP039
<i>Chara globularis</i> var. <i>virgata</i>	CHA001GLO046 VVI024	<i>Carex rostrata</i>	CAR001ROS016
<i>Chara hispida</i>	CHA001HIS002	<i>Carex leporina</i>	CAR001LEP042
<i>Chara hispida</i> var. <i>major</i>	CHA001HIS002 VMA024	<i>Carum verticillatum</i>	CAR009VER014
<i>Chara vulgaris</i>	CHA001VUL001	<i>Eleocharis acicularis</i>	ELE001ACI012
<i>Nitella flexilis</i>	NIT002FLE030		
<i>Nitella gracilis</i>	NIT002GRA228	<i>Eleocharis palustris</i>	ELE001PAL004
<i>Nitella syncarpa</i>	NIT002SYN007	<i>Eleocharis quinqueflora</i>	ELE001QUI004
<i>Nitellopsis obtusa</i>	NIT005OBT059	<i>Eleocharis uniglumis</i>	ELE001UNI005
Briófitos		<i>Glyceria declinata</i>	GLY001DEC006
<i>Blindia acuta</i>	BLI002ACU129	<i>Glyceria fluitans</i>	GLY001FLU005
<i>Dicranella palustris</i>	DIC016PAL143	<i>Glyceria notata</i>	GLY001NOT027
<i>Fontinalis antipyretica</i>	FON001ANT004	<i>Juncus alpino articulatus</i>	JUN001ALP071
<i>Hamatocaulis vernicosus</i>	HAM002VER089	<i>Juncus bulbosus</i>	JUN001BUL010
<i>Hygrohypnum duriusculum</i>	HYG003DUR006	<i>Menyanthes trifoliata</i>	MEN004TRI165
<i>Hygrohypnum ochraceum</i>	HYG003OCH001	<i>Ranunculus flammula</i>	RAN001FLA002
<i>Hygrohypnum smithii</i>	HYG003SMI019	<i>Ranunculus hederaceus</i>	RAN001HED007
<i>Jungermannia exsertifolia</i>	JUN002EXS007	<i>Schoenoplectus lacustris</i> subsp. <i>lacustris</i>	SCH012LAC100 SLA009
<i>Marsupella emarginata</i>	MAR010EMA010	<i>Sparganium emersum</i>	SPA001EME002
<i>Nardia scalaris</i>	NAR001SCA037	<i>Sparganium erectum</i>	SPA001ERE001
<i>Palustriella commutata</i>	PAL010COM083	<i>Veronica anagallis-aquatica</i>	VER001ANA003
<i>Philonotis ceaspitosa</i>	PHI008CEA001	<i>Veronica beccabunga</i>	VER001BEC001
<i>Scapania undulata</i>	SCA008UND035	<i>Veronica serpyllifolia</i>	VER001SER069



HIDROFITOS		HELOFITOS	
Sphagnum papillosum	SPH016PAP021	Littorella uniflora	LIT012UNI037
Sphagnum denticulatum	SPH016DEN068	Montia fontana	MON021FON036
Sphagnum subnitens	SPH016SUB451		
Straminergon stramineum	STR011STR101		
Warnstorfia exannulata	WAR001EXA009		
Plantas vasculares			
Callitriche platycarpa	CAL006PLA046		
Callitriche brutia	CAL006BRU020		
Callitriche hamulata	CAL006HAM015		
Callitriche lusitanica	CAL006LUS020		
Callitriche palustris	CAL006PAL095		
Callitriche stagnalis	CAL006STA039		
Isoetes echinosporum	ISO006ECH019		
Isoetes lacustre	ISO006LAC115		
Isoetes setaceum	ISO006SET037		
Isoetes velatum	ISO006VEL004		
Isolepis fluitans	ISO012FLU057		
Myriophyllum alterniflorum	MYR002ALT003		
Myriophyllum spicatum	MYR002SPI010		
Polygonum amphibium	POL007AMP004		
Potamogeton alpinus	POT005ALP063		
Potamogeton berchtoldii	POT005BER043		
Potamogeton filiformis	POT005FIL029		
Potamogeton gramineus	POT005GRA017		
Potamogeton natans	POT005NAT004		
Potamogeton pectinatus	POT005PEC002		
Potamogeton perfoliatus	POT005PER009		
Potamogeton polygonifolius	POT005POL073		
Potamogeton praelongus	POT005PRA049		
Potamogeton pusillus	POT005PUS008		
Ranunculus aquatilis	RAN001AQU040		
Ranunculus peltatus	RAN001PEL005		
Ranunculus trichophyllus	RAN001TRI013		
Sparganium angustifolium	SPA001ANG115		
Subularia aquatica	SUB003AQU050		
Utricularia australis	UTR001AUS008		
Utricularia minor	UTR001MIN199		
Utricularia vulgaris	UTR001VUL041		
Zannichellia palustris	ZAN001PAL005		

Tabla 2 - Taxones de macrófitos característicos de los lagos y lagunas cársticas sobre calizas (tipos 10 a 12)

HIDROFITOS		HELOFITOS	
Carófitos		Alisma lanceolatum	ALI001LAN005
Chara aspera	CHA001ASP001	Alisma plantago-aquatica	ALI001PLA018
Chara aspera var. curta	CHA001ASP001 VCU043	Apium nodiflorum	API001NOD001
Chara globularis	CHA001GLO046	Baldellia ranunculoides	BAL002RAN001
Chara hispida	CHA001HIS002	Bolboschoenus maritimus	BOL001MAR182
Chara hispida var. major	CHA001HIS002 VMA024	Carex acutiformis	CAR001ACU077
Chara hispida var. hispida f. polyacantha	CHA001HIS002 VHI005FPO002	Carex cuprina	CAR001CUP008
Chara vulgaris	CHA001VUL001	Carex distans	CAR001DIS135
Chara vulgaris var. crassicaulis	CHA001VUL001 VCR006	Carex elata	CAR001ELA001
Chara vulgaris var. longibracteata	CHA001VUL001 VLO009	Carex hispida	CAR001HIS034
Chara vulgaris var. papillata	CHA001VUL001 VPA088	Carex mairei	CAR001MAI009
Nitella confervacea	NIT002CON221	Carex paniculata	CAR001PAN003
Nitella flexilis	NIT002FLE030	Carex riparia	CAR001RIP003
Nitella hyalina	NIT002HYA031	Carum verticillatum	CAR009VER014
Tolypella glomerata	TOL003GLO058	Cladium mariscus	CLA002MAR006
Briófitos		Eleocharis palustris	ELE001PAL004
Barbula bolleana	BAR004BOL008	Glyceria notata	GLY001NOT027



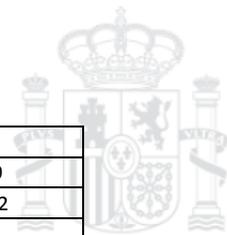
HIDROFITOS		HELOFITOS	
Didymodon tophaceus	DID003TOP001	Iris pseudacorus	IRI001PSE011
Eucladium verticillatum	EUC008VER016	Juncus inflexus	JUN001INF002
Fontinalis antipyretica	FON001ANT004	Juncus subnodulosus	JUN001SUB053
Gymnostomum calcareum	GYM003CAL012	Juncus articulatus	JUN001ART006
Hymenostylium recurvirostre	HYM003REC052	Lycopus europaeus	LYC001EUR004
Rhynchostegium riparioides	RHY002RIP022	Lysimachia ephemerum	LYS001EPH006
Plantas vasculares		Lysimachia vulgaris	LYS001VUL008
Ceratophyllum demersum	CER005DEM001	Lythrum salicaria	LYT001SAL008
Groenlandia densa	GRO002DEN006	Oenanthe lachenalii	OEN001LAC011
Hippuris vulgaris	HIP005VUL016	Phragmites australis	PHR002AUS007
Myriophyllum verticillatum	MYR002VER002	Rorippa nasturtium-aquaticum	ROR001NAS011
Myriophyllum spicatum	MYR002SPI010	Samolus valerandi	SAM001VAL045
Najas marina	NAJ001MAR007	Schoenoplectus lacustris subsp. lacustris	SCH012LAC100 SLA009
Nitella tenuissima	NIT002TEN008	Schoenoplectus lacustris subsp. glaucus	SCH012LAC100 SGL006
Nuphar luteum	NUP002LUT001	Schoenoplectus litoralis	SCH012LIT037
Nymphaea alba	NYM001ALB006	Schoenoplectus supinus	SCH012SUP036
Polygonum amphibium	POL007AMP004	Sparganium emersum	SPA001EME002
Potamogeton coloratus	POT005COL005	Sparganium erectum	SPA001ERE001
Potamogeton densus	POT005DEN061	Triglochin palustris	TRI035PAL156
Potamogeton lucens	POT005LUC001	Typha angustifolia	TYP001ANG009
Potamogeton natans	POT005NAT004	Typha domingensis	TYP001DOM002
Potamogeton pectinatus	POT005PEC002	Typha latifolia	TYP001LAT004
Potamogeton pusillus	POT005PUS008	Veronica anagallis-aquatica	VER001ANA003
Ranunculus peltatus	RAN001PEL005	Veronica anagalloides	VER001ANA018
Ranunculus trichophyllum	RAN001TRI013	Veronica beccabunga	VER001BEC001
Sparganium natans	SPA001NAT024		
Utricularia australis	UTR001AUS008		
Zannichellia contorta	ZAN001CON217		
Zannichellia palustris	ZAN001PAL005		

Tabla 3 - Taxones de macrófitos característicos del tipo 13 (cárstico, calcáreo, temporal)

HIDROFITOS		HELOFITOS	
Carófitos		Alisma plantago-aquatica	ALI001PLA018
Chara vulgaris	CHA001VUL001	Baldellia ranunculoides	BAL002RAN001
Plantas vasculares		Bolboschoenus maritimus	BOL001MAR182
Ranunculus aquatilis	RAN001AQU040	Eleocharis palustris	ELE001PAL004
Ranunculus peltatus	RAN001PEL005	Juncus articulatus	JUN001ART006

Tabla 4 - Taxones de macrófitos característicos de los lagos y lagunas cársticas sobre yesos (tipos 14 y 15)

HIDROFITOS		HELOFITOS	
Carófitos		Alisma plantago-aquatica	ALI001PLA018
Chara aspera	CHA001ASP001	Berula erecta	BER003ERE003
Chara hispida	CHA001HIS002	Bolboschoenus maritimus	BOL001MAR182
Chara aspera var. curta	CHA001ASP001 VCU043	Carex cuprina	CAR001CUP008
Chara canescens	CHA001CAN003	Carex hispida	CAR001HIS034
Chara hispida var. major	CHA001HIS002 VMA024	Carex riparia	CAR001RIP003
Chara vulgaris	CHA001VUL001	Cladium mariscus	CLA002MAR006
Chara globularis	CHA001GLO046	Eleocharis palustris	ELE001PAL004
Chara vulgaris var. contraria	CHA001VUL001 VCO031	Iris pseudacorus	IRI001PSE011
Chara vulgaris var. crassicaulis	CHA001VUL001 VCR006	Lycopus europaeus	LYC001EUR004
Chara vulgaris var. longibracteata	CHA001VUL001 VLO009	Lythrum salicaria	LYT001SAL008
Tolypella glomerata	TOL003GLO058	Oenanthe lachenalii	OEN001LAC011
Plantas vasculares		Phragmites australis	PHR002AUS007
Myriophyllum verticillatum	MYR002VER002	Schoenoplectus lacustris subsp. glaucus	SCH012LAC100 SGL006
Myriophyllum spicatum	MYR002SPI010	Schoenoplectus lacustris subsp. lacustris	SCH012LAC100 SLA009
Najas marina	NAJ001MAR007	Schoenoplectus litoralis	SCH012LIT037
Nymphaea alba	NYM001ALB006	Sparganium erectum	SPA001ERE001



HIDROFITOS		HELOFITOS	
Polygonum amphibium	POL007AMP004	Typha angustifolia	TYP001ANG009
Potamogeton coloratus	POT005COL005	Typha domingensis	TYP001DOM002
Potamogeton lucens	POT005LUC001	Typha latifolia	TYP001LAT004
Potamogeton natans	POT005NAT004	Veronica anagallis-aquatica	VER001ANA003
Potamogeton pectinatus	POT005PEC002	Veronica beccabunga	VER001BEC001
Potamogeton perfoliatus	POT005PER009		
Ranunculus peltatus	RAN001PEL005		
Ranunculus trichophyllus	RAN001TRI013		
Utricularia australis	UTR001AUS008		
Zannichellia palustris	ZAN001PAL005		
Zannichellia pedunculata	ZAN001PED001		
Zannichellia peltata	ZAN001PEL043		

Tabla 5 - Taxones de macrófitos característicos de lagunas y humedales interiores no salinos (tipos 16 a 19, 24 y 26)

HIDROFITOS		HELOFITOS	
Carófitos		Alisma lanceolatum	ALI001LAN005
Chara aspera	CHA001ASP001	Alisma plantago-aquatica	ALI001PLA018
Chara canescens	CHA001CAN003	Alopecurus aequalis	ALO002AEQ010
Chara connivens	CHA001CON017	Alopecurus bulbosus	ALO002BUL031
Chara globularis var. virgata	CHA001GLO046 VVI024	Antinoria agrostidea	ANT009AGR008
Chara galioides	CHA001GAL011	Apium nodiflorum	API001NOD001
Chara globularis	CHA001GLO046	Baldellia ranunculoides	BALO02RAN001
Chara hispida	CHA001HIS002	Bolboschoenus maritimus	BOL001MAR182
Chara hispida var. major	CHA001HIS002 VMA024	Butomus umbellatus	BUT001UMB012
Chara virgata	CHA001VIR069	Carex cuprina	CAR001CUP008
Chara vulgaris	CHA001VUL001	Carex divisa	CAR001DIV051
Chara vulgaris var. contraria	CHA001VUL001 VCO031	Carex riparia	CAR001RIP003
Chara vulgaris var. longibracteata	CHA001VUL001 VLO009	Carum verticillatum	CAR009VER014
Chara vulgaris var. oedophylla	CHA001VUL001 VOE006	Cicendia filiformis	CIC002FIL037
Chara vulgaris var. papillata	CHA001VUL001 VPA088	Damasonium polyspermum	DAM001POL019
Nitella flexilis	NIT002FLE030	Elatine alsinastrum	ELA003ALS001
Nitella tenuissima	NIT002TEN008	Elatine brochonii	ELA003BRO003
Nitella translucens	NIT002TRA004	Elatine hexandra	ELA003HEX003
Tolypella glomerata	TOL003GLO058	Elatine macropoda	ELA003MAC020
Tolypella hispanica	TOL003HIS040	Eleocharis acicularis	ELE001ACI012
Briófitos		Eleocharis multicaulis	ELE001MUL026
Drepanocladus aduncus	DRE002ADU006	Eleocharis palustris	ELE001PAL004
Leptodictyum riparium	LEP015RIP007	Eleocharis quinqueflora	ELE001QUI004
Riccia fluitans	RIC003FLU048	Eleocharis uniglumis	ELE001UNI005
Plantas vasculares		Eryngium corniculatum	ERY004COR023
Apium inundatum	API001INU001	Glyceria declinata	GLY001DEC006
Callitriche obtusangula	CAL006OBT024	Glyceria fluitans	GLY001FLU005
Callitriche brutia	CAL006BRU020	Iris pseudacorus	IRI001PSE011
Callitriche stagnalis	CAL006STA039	Isolepis setacea	ISO012SET032
Ceratophyllum demersum	CER005DEM001	Juncus articulatus	JUN001ART006
Ceratophyllum submersum	CER005SUB041	Juncus bulbosus	JUN001BUL010
Groenlandia densa	GRO002DEN006	Juncus gerardii	JUN001GER028
Hippuris vulgaris	HIP005VUL016	Juncus heterophyllus	JUN001HET008
Isoetes setaceum	ISO006SET037	Littorella uniflora	LIT012UNI037
Isoetes velatum	ISO006VEL004	Lycopus europaeus	LYC001EUR004
Marsilea strigosa	MAR012STR094	Lysimachia vulgaris	LYS001VUL008
Myriophyllum alterniflorum	MYR002ALT003	Lythrum salicaria	LYT001SAL008
Myriophyllum spicatum	MYR002SPI010	Oenanthe fistulosa	OEN001FIS001
Myriophyllum verticillatum	MYR002VER002	Phragmites australis	PHR002AUS007
Najas gracillima	NAJ001GRA226	Rorippa nasturtium-aquaticum	ROR001NAS011



HIDROFITOS		HELOFITOS	
Najas marina	NAJ001MAR007	Samolus valerandi	SAM001VAL045
Najas minor	NAJ001MIN189	Schoenoplectus lacustris subsp. glaucus	SCH012LAC100 SGL006
Nymphaea alba	NYM001ALB006	Schoenoplectus lacustris subsp. lacustris	SCH012LAC100 SLA009
Polygonum amphibium	POL007AMP004	Sparganium erectum	SPA001ERE001
Potamogeton coloratus	POT005COL005	Triglochin laxiflora	TRIO35LAX008
Potamogeton crispus	POT005CRI005	Triglochin maritima	TRIO35MAR203
Potamogeton fluitans	POT005FLU058	Typha domingensis	TYP001DOM002
Potamogeton gramineus	POT005GRA017	Typha latifolia	TYP001LAT004
Potamogeton natans	POT005NAT004	Veronica anagallis-aquatica	VER001ANA003
Potamogeton pectinatus	POT005PEC002	Veronica beccabunga	VER001BEC001
Potamogeton polygonifolius	POT005POL073		
Potamogeton pusillus	POT005PUS008		
Potamogeton trichoides	POT005TRI012		
Ranunculus aquatilis	RAN001AQU040		
Ranunculus peltatus	RAN001PEL005		
Ranunculus penicillatus	RAN001PEN008		
Ranunculus trichophyllus	RAN001TRI013		
Ranunculus tripartitus	RAN001TRI171		
Utricularia australis	UTR001AUS008		
Utricularia vulgaris	UTR001VUL041		
Zannichellia contorta	ZAN001CON217		
Zannichellia obtusifolia	ZAN001OBT060		
Zannichellia palustris	ZAN001PAL005		
Zannichellia pedunculata	ZAN001PED001		
Zannichellia peltata	ZAN001PEL043		

Tabla 6 - Taxones de macrófitos característicos de lagunas interiores salinas⁸ (tipos 20-23)

HIDROFITOS		HELOFITOS		Spp. SALICORNIAR	
Carófitos		Bolboschoenus maritimus	BOL001MAR182	Aeluropus littoralis	AEL002LIT038
Chara aspera	CHA001ASP001	Phragmites australis	PHR002AUS007	Crypsis schoenoides	CRY015SCH128
Chara canescens	CHA001CAN003	Schoenoplectus lacustris subsp. glaucus	SCH012LAC100 SGL006	Glaux maritima	GLA009MAR196
Chara connivens	CHA001CON017	Schoenoplectus litoralis	SCH012LIT037	Inula crithmoides	INU001CRI046
Chara galioides	CHA001GAL011	Typha domingensis	TYP001DOM002	Juncus maritimus	JUN001MAR039
Chara hispida	CHA001HIS002			Juncus subulatus	JUN001SUB495
Chara hispida var. major	CHA001HIS002 VMA024			Juncus gerardii	JUN001GER028
Chara vulgaris	CHA001VUL001			Linum maritimum	LIN008MAR198
Lamprothamnium papulosum	LAM002PAP001			Lythrum flexuosum	LYT001FLE029
Tolypella glomerata	TOL003GLO058			Microcnemum coralloides	MIC041COR145
Tolypella hispanica	TOL003HIS040			Polypogon maritimus	POL008MAR184
Tolypella salina	TOL003SAL070			Puccinellia fasciculata	PUC001FAS034

⁸ A efectos de evaluación de la cobertura, las especies propias del salicorniar se asimilarán a los helófitos.



HIDROFITOS		HELOFITOS		Spp. SALICORNIAR	
Briófitos				Puccinellia pungens	PUC001PUN078
Riella helicophylla	RIE001HEL050			Salicornia europaea	SAL010EUR020
Plantas vasculares				Salicornia ramosissima	SAL010RAM013
Althenia orientalis	ALT001ORI010			Salsola soda	SAL011SOD002
Potamogeton pectinatus	POT005PEC002			Samolus valerandi	SAM001VAL045
Ranunculus peltatus	RAN001PEL005			Schoenus nigricans	SCH013NIG109
Ruppia drepanensis	RUP001DRE001			Suaeda spicata	SUA001SPI136
Ruppia maritima	RUP001MAR178			Suaeda splendens	SUA001SPL026
				Suaeda vera	SUA001VER069

Tabla 7 - Taxones de macrófitos característicos del tipo 25 (interior en cuenca de sedimentación de origen fluvial, tipo llanura de inundación, mineralización alta o muy alta)

HIDROFITOS		HELOFITOS	
Carófitos		Alisma lanceolatum	ALI001LAN005
Chara aspera	CHA001ASP001	Alisma plantago-aquatica	ALI001PLA018
Chara canescens	CHA001CAN003	Baldellia ranunculoides	BAL002RAN001
Chara connivens	CHA001CON017	Bolboschoenus maritimus	BOL001MAR182
Chara galioides	CHA001GAL011	Carex cuprina	CAR001CUP008
Chara hispida	CHA001HIS002	Carex divisa	CAR001DIV051
Chara hispida var. major	CHA001HIS002 VMA024	Carex flacca	CAR001FLA093
Chara vulgaris	CHA001VUL001	Carex riparia	CAR001RIP003
Chara vulgaris var. contraria	CHA001VUL001 VCO031	Carex hispida	CAR001HIS034
Chara vulgaris var. longibracteata	CHA001VUL001 VLO009	Cladium mariscus	CLA002MAR006
Chara vulgaris var. oedophylla	CHA001VUL001 VOE006	Damasonium alisma	DAM001ALI002
Lamprothamnium papulosum	LAM002PAP001	Elatine alsinastrum	ELA003ALS001
Nitella flexilis	NIT002FLE030	Elatine hexandra	ELA003HEX003
Nitella hyalina	NIT002HYA031	Eleocharis palustris	ELE001PAL004
Nitella tenuissima	NIT002TEN008	Glyceria declinata	GLY001DEC006
Nitella translucens	NIT002TRA004	Iris pseudacorus	IRI001PSE011
Tolypella glomerata	TOL003GLO058	Juncus articulatus	JUN001ART006
Tolypella hispanica	TOL003HIS040	Juncus gerardii	JUN001GER028
Tolypella salina	TOL003SAL070	Juncus heterophyllus	JUN001HET008
Briófitos		Juncus subulatus	JUN001SUB495
Riccia fluitans	RIC003FLU048	Lycopus europaeus	LYC001EUR004
Ricciocarpus natans	RIC005NAT028	Lythrum salicaria	LYT001SAL008
Riella cossoniana	RIE001COS061	Oenanthe fistulosa	OEN001FIS001
Riella helicophylla	RIE001HEL050	Phragmites australis	PHR002AUS007
Riella notarisii	RIE001NOT028	Samolus valerandi	SAM001VAL045
Sphagnum inundatum	SPH016INU006	Schoenoplectus lacustris subsp. glaucus	SCH012LAC100 SGL006
Plantas vasculares		Schoenoplectus litoralis	SCH012LIT037
Althenia orientalis	ALT001ORI010	Sparganium erectum	SPA001ERE001
Apium inundatum	API001INU001	Typha domingensis	TYP001DOM002
Callitriche brutia	CAL006BRU020	Typha latifolia	TYP001LAT004
Callitriche obtusangula	CAL006OBT024	Veronica anagallis-aquatica	VER001ANA003
Callitriche stagnalis	CAL006STA039		
Callitriche truncata	CAL006TRU023		
Ceratophyllum demersum	CER005DEM001		
Ceratophyllum submersum	CER005SUB041		
Groenlandia densa	GRO002DEN006		



HIDROFITOS		HELOFITOS	
Lemna trisulca	LEM003TRI182		
Myriophyllum alterniflorum	MYR002ALT003		
Myriophyllum spicatum	MYR002SPI010		
Najas marina	NAJ001MAR007		
Nuphar luteum	NUP002LUT001		
Nymphaea alba	NYM001ALB006		
Polygonum amphibium	POL007AMP004		
Potamogeton crispus	POT005CRI005		
Potamogeton pectinatus	POT005PEC002		
Potamogeton trichoides	POT005TRI012		
Ranunculus peltatus	RAN001PEL005		
Ranunculus peltatus subsp. fucoides	RAN001PEL005 SFU001		
Ranunculus trichophyllus	RAN001TRI013		
Ruppia drepanensis	RUP001DRE001		
Ruppia maritima	RUP001MAR178		
Utricularia australis	UTR001AUS008		
Zannichellia obtusifolia	ZAN001OBT060		
Zannichellia pedunculata	ZAN001PED001		
Zannichellia peltata	ZAN001PEL043		

Tabla 8 - Taxones de macrófitos característicos del tipo 27 (interior en cuenca de sedimentación, asociado a turberas alcalinas)

HIDROFITOS		HELOFITOS	
Carófitos		Althaea officinalis	ALT003OFF011
Chara vulgaris	CHA001VUL001	Bolboschoenus maritimus	BOL001MAR182
Plantas vasculares		Carex hispida	CAR001HIS034
Ceratophyllum demersum	CER005DEM001	Lycopus europaeus	LYC001EUR004
Myriophyllum spicatum	MYR002SPI010	Lythrum salicaria	LYT001SAL008
Potamogeton coloratus	POT005COL005	Phragmites australis	PHR002AUS007
Potamogeton pectinatus	POT005PEC002	Rorippa nasturtium-aquaticum	ROR001NAS011
		Schoenoplectus lacustris subsp. glaucus	SCH012LAC100 SGL006
		Scutellaria galericulata	SCU001GAL033
		Sparganium erectum	SPA001ERE001
		Typha domingensis	TYP001DOM002
		Typha latifolia	TYP001LAT004
		Veronica anagallis-aquatica	VER001ANA003

Tabla 9 - Taxones de macrófitos característicos del tipo 28 (lagunas litorales sin influencia marina)

HIDROFITOS		HELOFITOS	
Carófitos		Alisma plantago-aquatica	ALI001PLA018
Chara aspera	CHA001ASP001	Apium nodiflorum	API001NOD001
Chara braunii	CHA001BRA072	Bolboschoenus maritimus	BOL001MAR182
Chara canescens	CHA001CAN003	Cladium mariscus	CLA002MAR006
Chara globularis	CHA001GLO046	Glyceria notata	GLY001NOT027
Chara hispida	CHA001HIS002	Hydrocotyle verticillata	HYD029VER090
Chara vulgaris	CHA001VUL001	Hydrocotyle vulgaris	HYD029VUL017
Chara hispida var. major	CHA001HIS002 VMA024	Iris pseudacorus	IRI001PSE011
Chara hispida var. baltica	CHA001HIS002 VBA049	Juncus subulatus	JUN001SUB495
Nitella batrachosperma	NIT002BAT014	Lycopus europaeus	LYC001EUR004
Nitella hyalina	NIT002HYA031	Lythrum salicaria	LYT001SAL008
Tolypella glomerata	TOL003GLO058	Oenanthe lachenalii	OEN001LAC011
Briófitos		Phragmites australis	PHR002AUS007
Riccia fluitans	RIC003FLU048	Rorippa nasturtium-aquaticum	ROR001NAS011
Ricciocarpus natans	RIC005NAT028	Samolus valerandi	SAM001VAL045
Plantas vasculares		Schoenoplectus lacustris subsp. lacustris	SCH012LAC100 SLA009



HIDROFITOS		HELOFITOS	
<i>Athenia orientalis</i>	ALT001ORI010	<i>Schoenoplectus litoralis</i>	SCH012LIT037
<i>Ceratophyllum demersum</i>	CER005DEM001	<i>Typha domingensis</i>	TYP001DOM002
<i>Ceratophyllum submersum</i>	CER005SUB041	<i>Typha latifolia</i>	TYP001LAT004
<i>Lemna trisulca</i>	LEM003TRI182	<i>Veronica anagallis-aquatica</i>	VER001ANA003
<i>Myriophyllum spicatum</i>	MYR002SPI010		
<i>Myriophyllum heterophyllum</i>	MYR002HET003		
<i>Najas marina</i>	NAJ001MAR007		
<i>Nymphaea alba</i>	NYM001ALB006		
<i>Potamogeton coloratus</i>	POT005COL005		
<i>Potamogeton fluitans</i>	POT005FLU058		
<i>Potamogeton pectinatus</i>	POT005PEC002		
<i>Ranunculus peltatus</i>	RAN001PEL005		
<i>Ranunculus trichophyllum</i>	RAN001TRI013		
<i>Ruppia maritima</i>	RUP001MAR178		
<i>Utricularia australis</i>	UTR001AUS008		
<i>Zannichellia contorta</i>	ZAN001CON217		

Tabla 10 - Taxones de macrófitos característicos de los tipos 29 y 30 (lagunas en complejos dunares)

HIDROFITOS		HELOFITOS	
Carófitos		<i>Alisma plantago-aquatica</i>	ALI001PLA018
<i>Chara aspera</i>	CHA001ASP001	<i>Apium nodiflorum</i>	API001NOD001
<i>Chara canescens</i>	CHA001CAN003	<i>Baldellia ranunculoides</i>	BAL002RAN001
<i>Chara connivens</i>	CHA001CON017	<i>Bolboschoenus maritimus</i>	BOL001MAR182
<i>Chara galioides</i>	CHA001GAL011	<i>Carex elata</i>	CAR001ELA001
<i>Chara fragifera</i>	CHA001FRA064	<i>Carex laevigata</i>	CAR001LAE008
<i>Chara vulgaris</i>	CHA001VUL001	<i>Carex paniculata</i>	CAR001PAN003
<i>Nitella opaca</i>	NIT002OPA008	<i>Carex pseudocyperus</i>	CAR001PSE027
<i>Nitella ornithopoda</i>	NIT002ORN033	<i>Carum verticillatum</i>	CAR009VER014
<i>Nitella tenuissima</i>	NIT002TEN008	<i>Cicendia filiformis</i>	CIC002FIL037
<i>Nitella translucens</i>	NIT002TRA004	<i>Cladium mariscus</i>	CLA002MAR006
Plantas vasculares		<i>Damasonium alisma</i>	DAM001ALI002
<i>Apium inundatum</i>	API001INU001	<i>Elatine alsinastrum</i>	ELA003ALS001
<i>Callitriche brutia</i>	CAL006BRU020	<i>Elatine hexandra</i>	ELA003HEX003
<i>Callitriche lusitanica</i>	CAL006LUS020	<i>Elatine macropoda</i>	ELA003MAC020
<i>Callitriche stagnalis</i>	CAL006STA039	<i>Eleocharis multicaulis</i>	ELE001MUL026
<i>Callitriche truncata</i>	CAL006TRU023	<i>Eleocharis palustris</i>	ELE001PAL004
<i>Hydrocharis morsus-ranae</i>	HYD021MOR004	<i>Eryngium corniculatum</i>	ERY004COR023
<i>Isoetes setaceum</i>	ISO006SET037	<i>Fuirena pubescens</i>	FUI001PUB001
<i>Isoetes velatum</i>	ISO006VEL004	<i>Glyceria declinata</i>	GLY001DEC006
<i>Isolepis fluitans</i>	ISO012FLU057	<i>Hydrocotyle vulgaris</i>	HYD029VUL017
<i>Lemna trisulca</i>	LEM003TRI182	<i>Illecebrum verticillatum</i>	ILL001VER094
<i>Myriophyllum alterniflorum</i>	MYR002ALT003	<i>Iris pseudacorus</i>	IRI001PSE011
<i>Myriophyllum spicatum</i>	MYR002SPI010	<i>Isoetes histrix</i>	ISO006HIS035
<i>Najas marina</i>	NAJ001MAR007	<i>Isolepis cernua</i>	ISO012CER012
<i>Nymphaea alba</i>	NYM001ALB006	<i>Juncus bulbosus</i>	JUN001BUL010
<i>Polygonum amphibium</i>	POL007AMP004	<i>Juncus heterophyllum</i>	JUN001HET008
<i>Potamogeton lucens</i>	POT005LUC001	<i>Ludwigia palustris</i>	LUD001PAL121
<i>Potamogeton natans</i>	POT005NAT004	<i>Lycopus europaeus</i>	LYC001EUR004
<i>Potamogeton pectinatus</i>	POT005PEC002	<i>Lythrum salicaria</i>	LYT001SAL008
<i>Potamogeton polygonifolius</i>	POT005POL073	<i>Phragmites australis</i>	PHR002AUS007
<i>Potamogeton trichoides</i>	POT005TRI012	<i>Schoenoplectus lacustris</i> subsp. <i>glaucus</i>	SCH012LAC100 SGL006
<i>Ranunculus peltatus</i>	RAN001PEL005	<i>Schoenoplectus lacustris</i> subsp. <i>lacustris</i>	SCH012LAC100 SLA009
<i>Ranunculus tripartitus</i>	RAN001TRI171	<i>Schoenoplectus litoralis</i>	SCH012LIT037



HIDROFITOS		HELOFITOS	
Utricularia australis	UTR001AUS008	Typha angustifolia	TYP001ANG009
Utricularia exoleta	UTR001EXO007	Typha domingensis	TYP001DOM002
Zannichellia obtusifolia	ZAN001OBT060	Typha latifolia	TYP001LAT004

Taxones indicadores de eutrofia.

Se trata de taxones que están asociados de forma inequívoca a elevados niveles de eutrofización, especialmente a elevadas concentraciones de fósforo disuelto. Se pueden encontrar representadas en los diferentes tipos de lagos, pero no se han incluido como especies típicas de éstos porque su presencia se debe fundamentalmente a procesos de eutrofización y, por tanto, no deberían ser relevantes en ellos si estuvieran en buen estado ecológico.

En la siguiente relación de especies se incluyen los códigos de los taxones asociados al Tesoro taxonómico para la clasificación del estado ecológico de las masas de agua continentales (TAXAGUA).

Algas filamentosas

Diferentes especies de los géneros Cladophora CLA001GENE (en especial Cladophora glomerata CLA001GLO015), Klebsormidium KLE001GENE, Mougeotia MOU001GENE, Oedogonium OED001GENE, Spirogyra SPI001GENE, Gloeotila GLO006GENE, Rhizoclonium RHI003GENE. Dentro de estos géneros sería necesario hacer una selección de las especies más propias de aguas eutróficas, pero en tanto dicho estudio no esté disponible se considerará como tales, a efectos de evaluación de esta métrica, a las especies pertenecientes a dichos géneros. A estos hay que añadir el alga laminar Monostroma bullosum MON022BUL033.

Plantas

Se considerarán como especies características de condiciones eutróficas las siguientes:

Tabla 11 - Especies características de condiciones eutróficas

Especies propias de condiciones eutróficas	
Género especie	CÓDIGO
Azolla filiculoides	AZO001FIL024
Eichhornia crassipes	EIC001CRA013
Lemna gibba	LEM003GIB006
Lemna minor	LEM003MIN019
Ludwigia grandiflora	LUD001GRA217
Myriophyllum aquaticum	MYR002AQU035
Salvinia natans	SAL009NAT023
Spirodela polyrrhiza	SPI013POL074
Wolffia arrhiza	WOL002ARR005

Especies cuyo crecimiento se ve beneficiado por la eutrofización

Se incluyen aquí las principales especies autóctonas que experimentan gran desarrollo cuando las aguas incrementan notablemente su grado de eutrofia, llegando a desplazar al resto de hidrófitos en esos casos. Sin embargo, éstas pueden vivir también en aguas que inicialmente no tienen elevadas concentraciones de nutrientes, pero en estos casos la biomasa que producen es mucho menor y no dominan sobre los demás macrófitos acuáticos. Por tanto, y para modular estos aspectos, dichas especies se considerarán como especies típicas a efectos de evaluación de la cobertura y de la riqueza de especies cuando así se señale en los listados de taxones característicos del tipo de lago, pero cuando su abundancia sea alta (cuando ocupen más 50 % de cobertura en la zona ocupada por los hidrófitos), se considerará además, su cobertura, a efectos de evaluación de la métrica "cobertura de macrófitos indicadores de condiciones eutróficas". Se trata de las siguientes especies de plantas vasculares:



Tabla 12 - Especies cuyo crecimiento se ve beneficiado por la eutrofización

Especies cuyo crecimiento se ve beneficiado por la eutrofización	
<i>Ceratophyllum demersum</i>	CER005DEM001
<i>Polygonum amphibium</i>	POL007AMP004
<i>Potamogeton pectinatus</i>	POT005PEC002

Especies exóticas de macrófitos

En este anexo se relacionan algunas de las especies de macrófitos exóticos que se han encontrado en nuestro país, así como sus códigos asociados en el tesoro taxonómico.

Estas especies, agrupadas en hidrófitos y helófitos son las siguientes:

Tabla 13 - Listado de especies de macrófitos exóticos

LISTADO DE ESPECIES DE MACRÓFITOS EXÓTICOS	
Hidrófitos	
<i>Azolla filiculoides</i>	AZO001FIL024
<i>Egeria densa</i>	EGE001DEN012
<i>Eichhornia crassipes</i>	EIC001CRA013
<i>Elodea canadensis</i>	ELO003CAN012
<i>Ludwigia grandiflora</i>	LUD001GRA217
<i>Ludwigia repens</i>	LUD001REP020
<i>Myriophyllum heterophyllum</i>	MYR002HET003
<i>Myriophyllum aquaticum</i>	MYR002AQU035
<i>Pistia stratiotes</i>	PIS006STR085
<i>Salvinia natans</i>	SAL009NAT023
Helófitos	
<i>Arundo donax</i>	ARU003DON001

PROTOCOLO DE CÁLCULO DEL ÍNDICE BIOLÓGICO DE MACRÓFITOS EN RÍOS EN ESPAÑA

CÓDIGO: IBMR-2015



**GOBIERNO
DE ESPAÑA**

**MINISTERIO
DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN
Y MEDIO AMBIENTE**

Este documento pertenece a una serie de protocolos de muestreo, laboratorio y cálculo de índices y métricas para su utilización en los programas de seguimiento del estado de las masas de agua continentales (ríos, lagos y embalses) y en la clasificación del estado ecológico.

Las especificaciones de estos documentos deberán ser tenidas en cuenta por los Organismos de cuenca en la explotación de las redes oficiales de seguimiento del estado y potencial ecológico en las masas de agua superficiales continentales, bien directamente o a través de contratos de servicios. Estos protocolos están sujetos a los cambios que se consideren necesarios en virtud del progreso científico de la materia.



MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE

Edita:

© Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
Secretaría General Técnica
Centro de Publicaciones

Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado:

<http://publicacionesoficiales.boe.es/>

NIPO: 280-15-121-0



INDICE

1. APLICABILIDAD	5
2. OBJETIVO	5
3. NORMATIVA DE REFERENCIA	5
4. CÁLCULO DEL IBMR EN ESPAÑA	6
5. TRATAMIENTO DE LOS DATOS.....	7
ANEXO I: VALORES DE INDICACIÓN Y SENSIBILIDAD DE LOS TAXONES PARA EL CÁLCULO DEL IBMR EN ESPAÑA	8



1. APLICABILIDAD

Este protocolo para el cálculo del Índice Biológico de Macrófitos en Ríos en España (IBMR-2015) es de obligada aplicación en la explotación de las redes oficiales de evaluación del estado / potencial ecológico en cumplimiento de la Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, que explota las Confederaciones Hidrográficas (CCHH), bien directamente o a través de contratos de servicios.

Este protocolo se aplica al cálculo del IBMR en España a partir de muestras tomadas mediante el protocolo de muestreo y laboratorio de macrófitos en ríos (ML-R-M-2015) en las masas de agua de la categoría ríos y en las masas de agua artificiales o muy modificadas asimilables a ríos.

El cálculo del IBMR en España para la clasificación del estado / potencial ecológico mediante el elemento de calidad flora acuática: macrófitos, se realizará mediante la aplicación del presente protocolo.

2. OBJETIVO

La Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, establece que los Estados miembros deberán poner en marcha programas de seguimiento. Estos programas de seguimiento deben permitir controlar y evaluar la composición y abundancia de la flora acuática.

Por lo tanto, el objetivo de este protocolo es establecer un método de cálculo del IBMR en España, de forma que el suministro de información sea de calidad y de comparabilidad científica equivalente entre las Demarcaciones Hidrográficas, garantizando de este modo el cumplimiento de los requisitos mencionados anteriormente.

3. NORMATIVA DE REFERENCIA

La normativa de referencia de este protocolo es la que se enumera a continuación:

- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- RD Legislativo 1/2001 por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas.
- RD 849/1986 por el que se aprueba el Reglamento del Dominio Público Hidráulico que desarrolla los títulos preliminar, I, IV, V, VI, VII y VIII del texto refundido de la Ley de Aguas.
- Orden MAM/985/2006 por la que se desarrolla el régimen jurídico de las entidades colaboradoras de la administración hidráulica en materia de control y vigilancia de calidad de las aguas y de gestión de los vertidos al dominio público hidráulico.
- Orden MAM/3207/2006 por el que se aprueba la ITC-MMA EECC-1/06 Instrucción técnica complementaria sobre determinaciones químicas y microbiológicas para el análisis de las aguas.
- RD 907/2007 por el que se aprueba el Reglamento de la Planificación Hidrológica.
- Orden ARM/2656/2008 por la que se aprueba la Instrucción de planificación hidrológica.

Otra documentación de referencia:

Haury, J., Peltre, M.C., Termolieres, M., Barba, J., Thiebaut, G., Bernez, I., Daniel, H., Chatenet, P., Haan-Archipof, G., Muller, S., Dutartre, A., Laplace-Treyture, C., Cazaubon, A. & Lambert-Servien E. 2006. A new method to assess water trophy and organic pollution: the Macrophyte Biological Index for Rivers (MBIR): its application to different types of river and pollution. *Hydrobiologia* 570: 153-158.



4. CÁLCULO DEL IBMR EN ESPAÑA

Datos de partida

El procedimiento para el cálculo del IBMR en España requiere la identificación y el procesado en laboratorio de los diferentes taxones recogidos mediante el protocolo de muestreo y laboratorio de macrófitos en ríos (ML-R-M-2015) elaborado por la Dirección General del Agua.

La información de partida consistirá en el listado de los taxones y sus porcentajes de cobertura obtenidos en el tramo de muestreo. Las clases de cobertura se transformarán a escalas de abundancia, según la siguiente tabla:

Clases de cobertura	Escala de abundancia IBMR en España
< 0,1-Presencia	1
0,1 - <1%-Raro	2
1 - <5%	3
5 - <10%	3
10 - <20%	4
20 - <30%	4
30 - <40%	4
40 - <50%	4
50 - <60%	5
60 - <70%	5
70 - <80%	5
80 - <90%	5
90 - 100%	5

Cálculo del índice

La puntuación del IBMR en España se obtiene a partir de la fórmula de Zelinka y Marvan (1961), en la que se usan la abundancia de los taxones (K_i , de 1 a 5), los valores de sensibilidad respecto a la eutrofia (C_{si} , de 1 a 20) y la indicación de la estenoicidad (E_i , de 1 a 3) asignados a cada uno de los 51 taxones considerados por este índice:

$$\text{IBMR} = \frac{\sum_{i=1}^n E_i \times K_i \times C_{si}}{\sum_{i=1}^n E_i \times K_i}$$

Dónde:

- E_i : Valor de indicación de la estenoicidad (1-3)
- K_i : estima de abundancia de cada taxón utilizando una escala del 1 al 5
- C_{si} : valores de sensibilidad respecto a la eutrofia (1-20)



Los valores Ei y Csi de cada taxón pueden consultarse en el anexo I y en TAXAGUA.

En relación al trabajo de Haury *et. al* (2006), la aplicación del IBMR en España requiere la eliminación e inclusión de varias especies en la composición de taxones a utilizar, así como pequeñas variaciones en los valores de indicación y sensibilidad de algunas especies para mejorar la evaluación del estado de las masas de agua mediante la utilización de este índice

5. TRATAMIENTO DE LOS DATOS

Con la puntuación del IBMR, obtenida según el procedimiento descrito en el punto anterior, se procederá a determinar el estado / potencial ecológico de la masa de agua. Para esta clasificación se deberán tener en cuenta las fronteras de estado ecológico establecidas legalmente para el indicador IBMR en el tipo de masa de agua que corresponda.

En este sentido habrá que comparar el valor de IBMR obtenido con el valor de referencia establecido para el tipo de masa de agua en cuestión, para obtener un Ratio de Calidad Ecológica (RCE). El valor final del RCE obtenido se compara con los valores frontera del tipo de masa de agua para la métrica IBMR y se clasifica el estado ecológico.

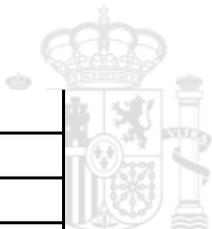
$$\text{Ratio de Calidad Ecológica} = \text{Valor Observado} / \text{Valor de referencia}$$

**ANEXO I: VALORES DE INDICACIÓN Y SENSIBILIDAD DE LOS
TAXONES PARA EL CÁLCULO DEL IBMR EN ESPAÑA**





ID_TAXON	Nombre taxón	Csi	Ei
3166	<i>Alisma plantago-aquatica</i> L.	8	2
40827	<i>Hygroamblystegium fluviatile</i> (Hedw.) Loeske	11	2
40828	<i>Leptodictyum riparium</i> (Hedw.) Warnst.	5	2
3040	<i>Apium nodiflorum</i> L. (Lag.)	10	1
8227	<i>Audouinella</i> sp. Bory de St Vincent	13	2
3588	<i>Bangia</i> sp. Lyngbye	10	2
17422	<i>Batrachospermum</i> sp. Roth	16	2
17497	<i>Brachythecium plumosum</i> (Hedw.) Schimp.	18	3
17501	<i>Brachythecium rivulare</i> Schimp.	15	2
3197	<i>Chara vulgaris</i> var. <i>longibracteata</i> (Kütz.) J. Groves & Bull.-Webst.	19	3
3198	<i>Chara vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i> L.	19	3
7656	<i>Cinclidotus fontinaloides</i> (Hedw.) P.Beauv.	12	2
33002	<i>Cinclidotus riparius</i> (Host ex Brid.) Arn.	13	2
3009	<i>Cladophora</i> sp. Kützing	6	1
33021	<i>Compsopogon</i> sp. Montagne	10	2
7760	<i>Conocephalum conicum</i> (L.) Dumort.	15	2
7828	<i>Cratoneuron filicinum</i> (Hedw.) Spruce	18	3
40494	<i>Draparnaldia</i> sp. Bory de St. Vincent	18	3
2994	<i>Enteromorpha</i> sp. Link	3	2
8167	<i>Eucladium verticillatum</i> (Brid.) Bruch & Schimp.	19	3
40061	<i>Fissidens crassipes</i> Bruch & Schimp. subsp. <i>crassipes</i>	12	2
8398	<i>Fissidens grandifrons</i> Brid.	15	3
33162	<i>Fissidens pusillus</i> (Wilson) Milde	14	2
3082	<i>Fontinalis antipyretica</i> Hedw.	10	1
40126	<i>Hildenbrandia rivularis</i> (Liebmann) Agardh	15	2
9090	<i>Lemanea</i> sp. Bory de St Vincent	15	2
3105	<i>Lemna minor</i> L.	10	1
2316	<i>Melosira varians</i> Agardh	10	1
502	<i>Mougeotia</i> sp. Agardh	13	2
3116	<i>Myriophyllum spicatum</i> L.	8	2
936	<i>Nostoc</i> sp. Vaucher	9	1
31571	<i>Nostoc verrucosum</i> Vaucher	9	1
1153	<i>Oedogonium</i> sp. Link	6	2
958	<i>Oscillatoria</i> sp. Vaucher	11	1
31663	<i>Palustriella falcata</i> (Brid.) Hedenäs	18	3
31662	<i>Palustriella commutata</i> (Hedw.) Ochyra	15	2
31708	<i>Pellia endiviifolia</i> (Dicks.) Dumort.	19	3
960	<i>Phormidium</i> sp. Kützing	13	2
3137	<i>Potamogeton crispus</i> L.	7	2



3140	<i>Potamogeton pectinatus</i> L.	2	2
3233	<i>Ranunculus peltatus</i> subsp. <i>pseudofluitans</i> (Syme) Franco	11	2
32079	<i>Rivularia</i> sp. Agardh	19	3
503	<i>Spirogyra</i> sp. Link	10	1
1168	<i>Tetraspora</i> sp. Link	12	1
32430	<i>Thamnobryum alopecurum</i> (Hedw.)Nieuwl.	15	2
1595	<i>Tribonema</i> sp. Derbès & Solier	11	2
2986	<i>Ulothrix</i> sp. Kützing	10	1
2248	<i>Vaucheria</i> sp. De Candolle	4	1
3162	<i>Veronica anagallis-aquatica</i> L.	11	2
3163	<i>Veronica beccabunga</i> L.	10	1
8589	<i>Zygnema</i> sp. Agardh	13	3

PROTOCOLO DE CÁLCULO DEL ÍNDICE MULTIMÉTRICO ESPECÍFICO DEL TIPO DE INVERTEBRADOS BENTÓNICOS EN RÍOS

CÓDIGO: METI-2015



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN
Y MEDIO AMBIENTE

Este documento pertenece a una serie de protocolos de muestreo, laboratorio y cálculo de índices y métricas para su utilización en los programas de seguimiento del estado de las masas de agua continentales (ríos, lagos y embalses) y en la clasificación del estado ecológico.

Las especificaciones de estos documentos deberán ser tenidas en cuenta por los Organismos de cuenca en la explotación de las redes oficiales de seguimiento del estado y potencial ecológico en las masas de agua superficiales continentales, bien directamente o a través de contratos de servicios. Estos protocolos están sujetos a los cambios que se consideren necesarios en virtud del progreso científico de la materia.



MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE

Edita:

© Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
Secretaría General Técnica
Centro de Publicaciones

Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado:
<http://publicacionesoficiales.boe.es/>

NIPO: 280-15-123-1



INDICE

1.	APLICABILIDAD	4
2.	OBJETIVO	4
3.	NORMATIVA DE REFERENCIA	5
4.	DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ÍNDICE MULTIMÉTRICO ESPECÍFICO DEL TIPO.....	5
4.1.	PROCEDIMIENTO ESPECÍFICO PARA CADA UNA DE LAS MÉTRICAS QUE INTEGRAN EL MULTIMÉTRICO	5
4.2.	PROCEDIMIENTO DE COMBINACIÓN DE LAS MÉTRICAS EN ÍNDICES MULTIMÉTRICOS ESPECÍFICOS DEL TIPO	8
	ANEXO I.....	11



1. APLICABILIDAD

Este protocolo para el cálculo del índice multimétrico de invertebrados en ríos es de obligada aplicación en la explotación de las redes oficiales de evaluación del estado / potencial ecológico en cumplimiento de la Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, que explotan las Confederaciones Hidrográficas (CCHH), bien directamente o a través de contratos de servicios.

Este protocolo se aplica al cálculo del Índice Multimétrico Específico del Tipo (METI-2015) a partir de muestras tomadas mediante el protocolo de muestreo y laboratorio de invertebrados bentónicos en ríos (ML-Rv-I-2013) en las masas de agua de la categoría ríos y en las masas de agua artificiales o muy modificadas asimilables a ríos.

El cálculo del índice multimétrico de invertebrados en ríos para la clasificación del estado ecológico o potencial ecológico mediante el elemento de calidad fauna bentónica de invertebrados, se realizará mediante la aplicación del presente protocolo.

El conjunto de métricas descritas en este protocolo son aplicables a los tipos de masas de agua siguientes: 21, 22, 23, 25, 28, 29, 30, 31 y 32.

MÉTRICAS APLICABLES POR TIPO DE MASA DE AGUA										
Métricas		Tipo de masa de agua								
		21	22	23	25	28	29	30	31	32
Riqueza	Número de familias		x	x		x	x	x	x	x
	Número de familias EPT	x	x	x	x		x	x	x	x
	Número de familias PT					x				
	Número de familias sensibles	x			x			x		
Porcentaje	Porcentaje de familias sensibles	x			x			x		
	Porcentaje de 3 taxones dominantes	x			x			x		
	Porcentaje de 6 taxones dominantes		x	x		x	x		x	x
	Porcentaje de Oligochaeta		x	x			x	x	x	x
Abundancia	Abundancia de clases familias EPT	x	x	x	x		x		x	x
	Abundancia de PT							x		
Bray-Curtis	Índice de disimilitud de Bray – Curtis	x			x	x		x		
Diversidad	Diversidad de Margalef		x	x		x	x		x	x

Tabla 1. Métricas aplicables por tipo de masa de agua

2. OBJETIVO

La Directiva 2000/60/CE, Directiva Marco del Agua, establece que los Estados miembros deberán poner en marcha programas de seguimiento. Estos programas de seguimiento deben permitir controlar y evaluar la composición y abundancia de la fauna bentónica de invertebrados.

Por lo tanto, el objetivo de este protocolo es establecer un método de cálculo del índice multimétrico de invertebrados en ríos, de forma que el suministro de información sea de calidad y de comparabilidad científica equivalente entre las Demarcaciones Hidrográficas, garantizando de este modo el cumplimiento de los requisitos mencionados anteriormente.



3. NORMATIVA DE REFERENCIA

- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- RD Legislativo 1/2001 por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas.
- RD 849/1986 por el que se aprueba el Reglamento del Dominio Público Hidráulico que desarrolla los títulos preliminar, I, IV, V, VI, VII y VIII del texto refundido de la Ley de Aguas.
- Orden MAM/985/2006 por la que se desarrolla el régimen jurídico de las entidades colaboradoras de la administración hidráulica en materia de control y vigilancia de calidad de las aguas y de gestión de los vertidos al dominio público hidráulico.
- Orden MAM/3207/2006 por la que se aprueba la ITC-MMA.EECC-1/06 Instrucción técnica complementaria sobre determinaciones químicas y microbiológicas para el análisis de las aguas.
- RD 907/2007 por el que se aprueba el Reglamento de la Planificación Hidrológica.
- Orden ARM/2656/2008 por la que se aprueba la Instrucción de planificación hidrológica.

Otra documentación de referencia:

- Pardo, I., Abraín, R., Gómez-Rodríguez, C., García-Roselló, E. 2010. Aplicación de los sistemas de evaluación del estado ecológico desarrollados para ríos en la aplicación de la Directiva Marco del agua en las Demarcaciones Hidrográficas del Cantábrico y Miño-Sil. 2010. NIPO 282-12-001-X.

4. DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ÍNDICE MULTIMÉTRICO ESPECÍFICO DEL TIPO

El procedimiento para el cálculo del índice multimétrico específico del tipo, requiere la identificación previa de los distintos taxones recogidos y la determinación de las abundancias de cada uno de ellos, mediante el protocolo de muestreo y laboratorio de invertebrados en ríos (ML-Rv-I-2013).

Una vez identificados los taxones y determinadas sus abundancias (nº individuos), se procede al cálculo de cada una de las métricas que integran el Índice Multimétrico Específico del Tipo al que corresponda la masa de agua. Posteriormente deben integrarse las métricas en el Índice Multimétrico Específico del Tipo que corresponda, tal y como se especifica en este protocolo.

4.1. PROCEDIMIENTO ESPECÍFICO PARA CADA UNA DE LAS MÉTRICAS QUE INTEGRAN EL MULTIMÉTRICO

A continuación se indica el procedimiento de cálculo para cada uno de las métricas que integran el índice multimétrico de cada uno de los tipos. Las métricas se calculan usando el nivel taxonómico de identificación de familia, excepto para los niveles superiores Oligochaeta y Acariformes.

Métricas de riqueza:

- **Número de familias.** Suma del número total de familias y niveles superiores¹ presentes en la muestra.
- **Número de familias EPT.** Suma del número de familias de los órdenes *Ephemeroptera*, *Plecoptera* y *Trichoptera*.
- **Número de familias PT.** Suma del número de familias de los órdenes *Plecoptera* y *Trichoptera*.

¹ Solo para Oligochaeta y Acariformes para los que todas sus familias contabilizan máximo 1 para cada uno



- **Número de familias sensibles.** Suma del número de familias sensibles presentes en cada muestra. Las familias sensibles varían en función del tipo de masa de agua al que pertenezca la muestra que se quiere evaluar. A continuación se ofrece un listado con las familias sensibles aplicables a cada tipo de masa de agua (Tabla 2). Tal y como queda reflejado en la tabla 1, la métrica número de familias sensibles sólo es aplicable a los tipos 21, 25 y 30 según la tipología española de ríos.

Métricas de porcentaje:

- **Porcentaje de riqueza de familias sensibles.** Porcentaje de la riqueza de las familias sensibles frente al total de la riqueza de familias. Las familias sensibles son las especificadas en la tabla 2.
- **Porcentaje de los 3 taxones dominantes.** Suma de la abundancia relativa (porcentaje del número de individuos) de los 3 taxones de invertebrados bentónicos dominantes respecto a la abundancia total de la muestra.
- **Porcentaje de los 6 taxones dominantes.** Suma de la abundancia relativa (porcentaje del número de individuos) de los 6 taxones de invertebrados bentónicos dominantes respecto a la abundancia total de la muestra.
- **Porcentaje de Oligochaeta.** Porcentaje de los individuos pertenecientes a la clase Oligochaeta respecto a la abundancia total de individuos en la muestra.

Familias de invertebrados sensibles	CÓDIGO	Tipo de masa de agua		
		21	25	30
<i>Aphelocheiridae</i>	APH001FAMI			x
<i>Athericidae</i>	ATH001FAMI			x
<i>Brachycentridae</i>	BRA006FAMI	x	x	x
<i>Dixidae</i>	DIX001FAMI	x	x	
<i>Dugesiidae</i>	DUG001FAMI			x
<i>Elmidae</i>	ELM001FAMI			x
<i>Empididae</i>	EMP001FAMI	x	x	
<i>Ephemerellidae</i>	EPH002FAMI			x
<i>Heptageniidae</i>	HEP001FAMI	x	x	x
<i>Hydropsychidae</i>	HYD006FAMI			x
<i>Leuctridae</i>	LEU004FAMI			x
<i>Limoniidae</i>	LIM005FAMI	x	x	
<i>Nemouridae</i>	NEM001FAMI	x	x	x
<i>Perlidae</i>	PER004FAMI	x	x	
<i>Perlodidae</i>	PER006FAMI	x	x	x
<i>Philopotamidae</i>	PHI001FAMI	x	x	
<i>Psychomyiidae</i>	PSY002FAMI			x
<i>Scirtidae</i>	SCI001FAMI	x	x	
<i>Ueonidae</i>	UEN001FAMI			x

Tabla 2. Listado de familias pertenecientes a las especies sensibles (ordenada por orden alfabético) para los tipos nacionales de la categoría ríos.



Métricas de abundancia:

- **Abundancia relativa de familias EPT.** Previamente al cálculo y para obtener esta métrica, las abundancias (nº de individuos) de todas las familias existentes en la muestra deben codificarse teniendo en cuenta la siguiente escala:

Clases de abundancia	Nº de individuos en la muestra
0	n = 0
1	0 < n < 2,5
2	2,5 ≤ n < 10,5
3	10,5 ≤ n < 30,5
4	30,5 ≤ n < 100,5
5	100,5 ≤ n < 300,5
6	300,5 ≤ n < 1000,5
7	1000,5 ≤ n

Una vez codificadas todas las abundancias, se procede con el cálculo de la métrica, que resulta de dividir la suma de las clases de abundancia de las familias correspondientes a los órdenes *Ephemeroptera*, *Plecoptera* y *Trichoptera* (EPT) por la suma de las clases de abundancia de todos los taxones de la muestra.

- **Abundancia absoluta de PT.** Suma del número de individuos de las familias muestreadas correspondientes a los órdenes *Plecoptera* y *Trichoptera* (PT).

Índices:

- **Índice de disimilitud de Bray – Curtis.** Expresa la diferencia entre la composición de taxones de las muestras que pertenecen a localidades de referencia y cualquier muestra con la que queramos compararlas. Este índice se obtiene con el siguiente algoritmo:

$$D_{BC} = \left(\frac{\sum_{i=1}^S |x_{ij} - x_{ik}|}{\sum_{i=1}^S [x_{ij} + x_{ik}]} \right) * 100$$

Dónde:

D_{BC} = medida de disimilitud Bray-Curtis entre las muestras j y k (expresada como porcentaje)

x_{ij} = número de individuos de la especie i en la muestra j



x_{ik} = número de individuos de la especie i en la muestra k

S = número de taxones

El índice de disimilitud de Bray-Curtis sólo se aplica a los tipos 21, 25, 28 y 30 según la tipología nacional de la categoría ríos. En la tabla del anexo 1 se presentan los valores de las medianas de las abundancias de las comunidades biológicas-tipo de referencia para cada uno de los tipos en los que se aplica esta métrica.

▪ **Índice de Diversidad de Margalef**

$$d = S - 1 / \ln(N)$$

Dónde:

S = número de taxones

N = número total de individuos en la muestra

4.2. PROCEDIMIENTO DE COMBINACIÓN DE LAS MÉTRICAS EN ÍNDICES MULTIMÉTRICOS ESPECÍFICOS DEL TIPO

La combinación de las distintas métricas para el cálculo de los índices multimétricos específicos de cada tipo deberá realizarse en dos pasos según el procedimiento descrito a continuación:

1) **Transformación** (sólo en aquellas métricas que sea necesario). La transformación se aplica a las métricas de abundancia absoluta o porcentajes:

- A todas las métricas que expresen datos de abundancia absoluta² se les aplicará una **transformación** logarítmica mediante $\log_{10}(x+1)$.
- Las métricas en forma de abundancia relativa o **porcentaje**³ deben ser expresadas **en tanto por uno**.
- Además, todas aquellas métricas⁴ con una respuesta creciente respecto a los gradientes de presión, deben **invertirse** antes de poder integrarse en el multimétrico. Para ello se transformarán mediante $1 - \text{valor de la métrica}$.

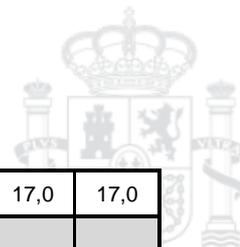
2) **Estandarización**. Es el paso previo a la suma de las métricas. Permite asignar a cada métrica valores comparables (entre 0 y >1), mediante la división del valor de la métrica observado en la muestra test (ya transformado y/o invertido) por el valor de la métrica esperado de la mediana de la referencia (también transformado y/o invertido según corresponda), para cada tipo de río. En las tablas 3a y 3b se facilitan los valores de referencia para cada una de las métricas componentes de los multimétricos.

MEDIANAS DE LAS MUESTRAS DE REFERENCIA										
Métricos		Tipo de masa de agua								
		21	22	23	25	28	29	30	31	32
Riqueza	Número de familias		32,0	32,0		39,0	35,5	33,0	35,5	35,5

² Abundancia de familias PT

³ % Oligochaeta, % familias EPT, % 3/6 taxones dominantes, % familias sensibles y el índice de disimilitud de Bray-Curtis

⁴ % Oligochaeta, % 3/6 taxones dominantes



	Número de familias EPT	16,0	15,0	15,0	16,0		17,0	16,5	17,0	17,0
	Número de familias PT					11,0				
	Número de familias sensibles	7,0			7,0			8,0		
Porcentaje	Porcentaje de familias sensibles	0,2000			0,2000			0,2457		
	Porcentaje de 3 taxones dominantes	0,5689			0,5689			0,5677		
	Porcentaje de 6 taxones dominantes		0,8029	0,8029		0,7988	0,7439		0,7439	0,7439
	Porcentaje de Oligochaeta		0,0037	0,0037			0,0202	0,0078	0,0202	0,0202
Abundancia	Abundancia de clases familias EPT	0,5345	0,5098	0,5098	0,5345		0,5097		0,5097	0,5097
	Abundancia de PT							871,5000		
Bray Curtis	Índice de disimilitud de Bray – Curtis	51,1510			51,1510	52,4660		59,3747		
Diversidad	Diversidad de Margalef		3,7125	3,7125		4,2789	4,0376		4,0376	4,0376

Tabla 3a. Valores de referencia (sin transformar) para cada uno de las métricas componentes de los 5 multimétricos de los tipos nacionales de la categoría ríos.

MEDIANAS DE LAS MUESTRAS DE REFERENCIA										
Métricos		Tipo de masa de agua								
		21	22	23	25	28	29	30	31	32
Riqueza	Número de familias		32,0	32,0		39,0	35,5	33,0	35,5	35,5
	Número de familias EPT	16,0	15,0	15,0	16,0		17,0	16,5	17,0	17,0
	Número de familias PT					11,0				
	Número de familias sensibles	7,0			7,0			8,0		
Porcentaje	Porcentaje de familias sensibles	0,2000			0,2000			0,2457		
	Porcentaje de 3 taxones dominantes	0,4311			0,4311			0,4323		
	Porcentaje de 6 taxones dominantes		0,1971	0,1971		0,2012	0,2561		0,2561	0,2561
	Porcentaje de Oligochaeta		0,9963	0,9963			0,9798	0,9922	0,9798	0,9798
Abundancia	Abundancia de clases familias EPT	0,5345	0,5098	0,5098	0,5345		0,5097		0,5097	0,5097
	Abundancia de PT							2,9408		
Bray Curtis	Índice de disimilitud de Bray – Curtis	0,5115			0,5115	0,5247		0,5937		
Diversidad	Diversidad de Margalef		3,7125	3,7125		4,2789	4,0376		4,0376	4,0376

Tabla 3b. Valores de referencia transformados para cada uno de las métricas componentes de los 5 multimétricos de los tipos nacionales de la categoría ríos

3) Una vez realizados estos procedimientos, las métricas seleccionadas se suman, obteniéndose el valor del **multimétrico**.

4) El estado ecológico de las muestras analizadas en cada tipo, en función de la composición de invertebrados, se expresa mediante un Ratio de Calidad Ecológica (RCE), que se obtiene dividiendo el valor del multimétrico obtenido para la muestra de la masa de agua, por la mediana del valor del multimétrico en las muestras de referencia del tipo. Para la clasificación del estado / potencial ecológico de la masa de agua, se deberán tener en cuenta las fronteras de estado ecológico establecidas legalmente para el indicador METI en el tipo de masa de agua que corresponda.

$$\text{Ratio de Calidad Ecológica} = \text{Valor Observado} / \text{Valor de referencia}$$



ANEXO I

**MEDIANAS DE LAS ABUNDANCIAS DE INVERTEBRADOS EN
LAS ESTACIONES DE REFERENCIA – CÁLCULO ÍNDICE BRAY –
CURTIS**





Familia	Tipos de intercalibración de la categoría de ríos		
	30	21 y 25	28
Aeshnidae	2	0	1
Ancylidae	0	9	91
Aphelocheiridae	0	0	24
Asellidae	0	0	51
Athericidae	33,5	20	11
Baetidae	302	197	477
Brachycentridae	6,5	16	13
Caenidae	0	0	328
Calamoceratidae	0,5	0	28
Calopterygidae	13,5	1	26
Ceratopogonidae	0,5	0	1
Chironomidae	979,5	745	1077
Cordulegastridae	3	1	0
Dixidae	0	1	0
Dytiscidae	1	0	3
Elmidae	418	203	624
Empididae	21,5	8	8
Ephemerellidae	23	8	144
Ephemeridae	0,5	0	0
Erpobdellidae	0	0	10
Gammaridae	0	0	68
Gerridae	0,5	1	4
Glossiphoniidae	0	0	4
Goeridae	0	0	1
Gomphidae	1	0	0
Gyrinidae	0	1	2
Heptageniidae	142,5	169	9
Hydraenidae	5	20	0
Hydridae	0	0	0
Hydrobiidae	1	0	184
Hydropsychidae	152	146	48
Lepidostomatidae	1,5	1	0
Leptoceridae	1	1	8
Leptophlebiidae	116,5	116	1
Leuctridae	197	144	111
Limnephilidae	0,5	1	6
Limoniidae	2	6	0
Lymnaeidae	0	0	106
Nemouridae	72,5	104	0
Oligochaeta	27	43	284
Perlidae	7,5	17	0
Philopotamidae	11	12	0
Planariidae	0	1	0
Planorbidae	0	0	13
Polycentropodidae	1,5	7	22
Rhagionidae	0,5	1	0
Rhyacophilidae	18,5	17	2
Scirtidae	0	1	0
Sericostomatidae	54,5	50	29
Sialidae	0	0	4
Simuliidae	56	61	28
Sphaeriidae	0	0	128