

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.

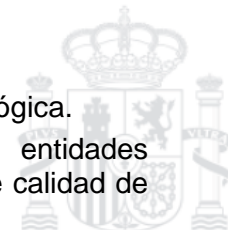
La Directiva Marco del Agua establece que los métodos empleados para controlar los parámetros de cada tipo serán conformes a las normas internacionales o nacionales que garanticen el suministro de información de calidad y comparabilidad científica equivalentes.

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.

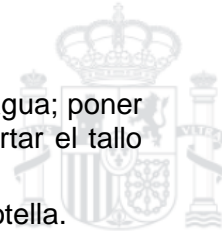
En todo caso se indican los procedimientos de muestreo:

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 deshinchada, 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

