

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 glicerina 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

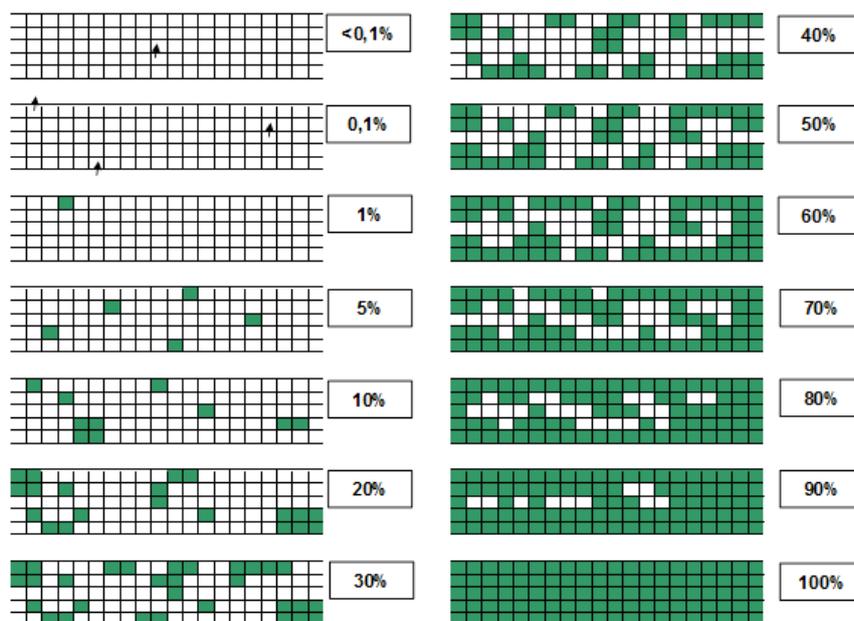
Se recorre el tramo de muestreo en zig-zag (de una orilla a otra) remontando siempre la corriente de aguas abajo a aguas arriba. En ríos anchos (> 10 m) vadeables además será necesario recorrer ambas orillas.

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.

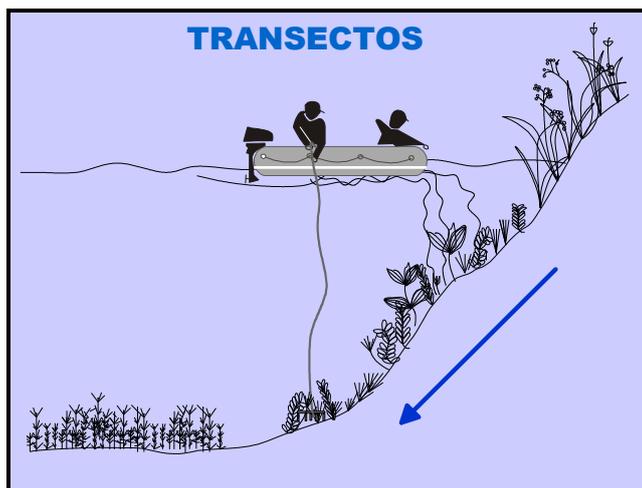
7.2. RÍOS NO VADEABLES

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: _____

CODIGO MUESTRA: _____ Nº DE BOTES: _____ Programa o subprograma: _____

FECHA: ____ / ____ / ____ Hora inicio: ____ : ____ : ____ Hora fin: ____ : ____ : ____ Vigilancia: _____ Operativo: _____ Investigación: _____ Referencia: _____

CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA: Líquido de Kew Formaldehído

Descripción de acceso y localización del tramo: _____

CARACTERÍSTICAS FISCOQUÍMICAS

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: _____

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:

ANEXO II: HOJA DE LABORATORIO

