

# **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 bénticos.
- 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 bénticos.
- 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  $\mu\text{m}$  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

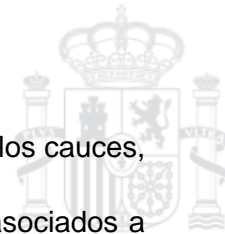
Se recorrerá el punto de muestreo y se realizarán observaciones de la presencia de los hábitats fluviales, así como de las características de las riberas. Este recorrido se realizará por la orilla siempre que sea accesible para evitar el pisoteo del tramo antes del muestreo.

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 m<sup>2</sup>.

## 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 media<sup>1</sup>.
- 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

<sup>1</sup> 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 fina<sup>2</sup>.

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.

<sup>2</sup> 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 <sub>2</sub> /l):
Temperatura del agua (°C):	% Saturación O <sub>2</sub> :
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 (↱)			
Macrófitos sumergidos (*)			
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			

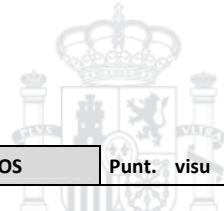
Comentarios sobre el hábitat: \_\_\_\_\_





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





CÓDIGO	ARÁCNIDOS	Punt.	visu	CÓDIGO	EFEMERÓPTEROS	Punt.	visu	CÓDIGO	ODONATOS	Punt.	visu
ACA001SPOR	Acariformes <sup>1</sup>	4		BAE001FAMI	Baetidae	4		AES001FAMI	Aeshnidae	8	
				CAE001FAMI	Caenidae	4		CAL004FAMI	Calopterygidae	8	
				EPH002FAMI	Ephemereilidae	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		<b>CÓDIGO</b>	<b>OLIGOQUETOS</b>	<b>Punt.</b>	<b>visu</b>
HYD008FAMI	Hydraenidae	5							Todos	1	
HYD013FAMI	Hydrochidae	5		<b>CÓDIGO</b>	<b>HETERÓPTEROS</b>	<b>Punt.</b>	<b>visu</b>				
HYD011FAMI	Hydrophilidae	3		APH001FAMI	Aphelocheiridae	10		<b>CÓDIGO</b>	<b>PLECÓPTEROS</b>	<b>Punt.</b>	<b>visu</b>
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	
ASE001FAMI	Asellidae	3		NOT003FAMI	Notonectidae	3		TAE001FAMI	Taeniopterygidae	10	
AST003FAMI	Astacidae	8		PLE004FAMI	Pleidae	3					
ATY001FAMI	Atyidae	6		VEL001FAMI	Veliidae	3		<b>CÓDIGO</b>	<b>TRICÓPTEROS</b>	<b>Punt.</b>	<b>visu</b>
COR003FAMI	Corophiidae	6						BER001FAMI	Beraeidae	10	
GAM001FAMI	Gammaridae	6		<b>CÓDIGO</b>	<b>HIRUDÍNEOS</b>	<b>Punt.</b>	<b>visu</b>	BRA006FAMI	Brachycentridae	10	
OST001CLAS	Ostracoda	3		ERP001FAMI	Erpobdellidae	3		CAL002FAMI	Calamoceratidae	10	
PAL004FAMI	Palaemonidae	6		GLO005FAMI	Glossiphoniidae	3		ECN001FAMI	Ecnomidae	7	
				HIR002FAMI	Hirudidae (=Hirudinidae)	3		GLO004FAMI	Glossosomatidae	8	
				PIS003FAMI	Piscicolidae	4		GOE001FAMI	Goeridae	10	
ANT004FAMI	Anthomyiidae <sup>2</sup>	4						HYD006FAMI	Hydropsychidae	5	
ATH001FAMI	Athericidae	10		<b>CÓDIGO</b>	<b>NEURÓPTEROS</b>	<b>Punt.</b>	<b>visu</b>	HYD012FAMI	Hydroptilidae	6	
BLE001FAMI	Blephariceridae	10		SIA001FAMI	Sialidae	4		LEP008FAMI	Lepidostomatidae	10	
CER006FAMI	Ceratopogonidae	4						LEP004FAMI	Leptoceridae	10	
CHI001FAMI	Chironomidae	2		<b>CÓDIGO</b>	<b>LEPIDÓPTEROS</b>	<b>Punt.</b>	<b>visu</b>	LIM002FAMI	Limnephilidae	7	
CUL001FAMI	Culicidae	2		PYR004FAMI	Crambidae (=Pyalidae)	4		MOL001FAMI	Molannidae	10	
DIX001FAMI	Dixidae	4						ODO001FAMI	Odontoceridae	10	
DOL001FAMI	Dolichopodidae	4		<b>CÓDIGO</b>	<b>MOLUSCOS</b>	<b>Punt.</b>	<b>visu</b>	PHI001FAMI	Philopotamidae	8	
EMP001FAMI	Empididae	4		ANC001FAMI	Ancylidae	6		PHR002FAMI	Phryganeidae	10	
EPH003FAMI	Ephydriidae	2		BIT001FAMI	Bithyniidae	3		POL003FAMI	Polycentropodidae	7	
LIM005FAMI	Limoniidae	4		FER002GENE	Ferrissia <sup>3</sup>	6		PSY002FAMI	Psychomyiidae	8	
PSY001FAMI	Psychodidae	4		HYD005FAMI	Hydrobiidae	3		RHY001FAMI	Rhyacophilidae	7	
PTY001FAMI	Ptychopteridae	4		LYM001FAMI	Lymnaeidae	3		SER001FAMI	Sericostomatidae	10	
RHA004FAMI	Rhagionidae	4		NER001FAMI	Neritidae	6		UEN001FAMI	Uenoidae (=Thremmatidae)	10	
SCA002FAMI	Scatophagidae <sup>2</sup>	4		PHY003FAMI	Physidae	3					
SCI002FAMI	Sciomyzidae	4		PLA003FAMI	Planorbidae <sup>4</sup>	3		<b>CÓDIGO</b>	<b>TURBELARIOS</b>	<b>Punt.</b>	<b>visu</b>
SIM002FAMI	Simuliidae	5		SPH006FAMI	Sphaeriidae	3		DEN001FAMI	Dendrocoelidae	5	
STR003FAMI	Stratiomyidae	4		THI001FAMI	Thiaridae	6		DUG001FAMI	Dugesidae	5	
SYR002FAMI	Syrphidae	1		UNI001FAMI	Unionidae	6		PLA005FAMI	Planariidae	5	
TAB002FAMI	Tabanidae	4		VAL001FAMI	Valvatidae	3					
THA003FAMI	Thaumaleidae	2		VIV001FAMI	Viviparidae	6					
TIP001FAMI	Tipulidae	5									

<sup>1</sup> El superorden Hidracarina ha pasado a ser el superorden Acariformes

<sup>2</sup> Anthomyiidae y Scatophagidae se agrupaban antes como Muscidae

<sup>3</sup> La Familia Ferrissidae ha pasado a ser el Género Ferrissia

<sup>4</sup> Todos los géneros excepto Ferrissia



## **ANEXO III: HOJA DE LABORATORIO**



