

PROTOCOLO DE MUESTREO, ANÁLISIS Y EVALUACIÓN DE ORGANISMOS FITOBENTÓNICOS EN RÍOS VADEABLES

Noviembre de 2014

Agencia Vasca del Agua / Uraren Euskal Agentzia

Código: RW_FITOBENTOS_URA_V_1.0



1 OBJETO

La Agencia Vasca del Agua mediante este documento pretende establecer un protocolo que permita la evaluación estandarizada de la comunidad de organismos fitobentónicos en masas de agua de la categoría ríos con tipologías presentes en la Comunidad Autónoma del País Vasco.

La comunidad de organismos fitobentónicos forma parte del componente biológico necesario para la clasificación del estado / potencial ecológico de las masas de agua superficial de la categoría ríos según el anexo V de la DMA.

El término fitobentos se refiere a los organismos autótrofos que viven asociados a cualquier sustrato del fondo en los sistemas acuáticos. Engloba algas microscópicas (incluyendo cianobacterias), macroalgas y macrófitos, siendo las diatomeas el grupo más diverso y abundante constituyendo, normalmente, el 80-90% de la comunidad fitobentónica.

Las diatomeas tienen una gran capacidad bioindicadora y muestran sensibilidad frente a la alteración de los parámetros físico-químicos del agua (eutrofización, cambios de salinidad, temperatura, presencia de metales pesados o acidificación), por lo que las comunidades de diatomeas reflejan con gran precisión las condiciones ambientales del medio en que se han desarrollado. Además, se conocen las preferencias ecológicas de muchas especies con respecto a los niveles de nutrientes y de oxígeno disuelto, por lo que son indicadoras de niveles tróficos y sapróbicos. Su uso como indicadores está generalizado en el estudio de los ríos y existen procedimientos de muestreo, análisis y métricas ya estandarizadas.

Las diatomeas tienen como ventaja su fácil manipulación y conservación de las muestras, que se debe a su esqueleto de sílice (frústulo) que es muy resistente y tiene características morfológicas claves para la identificación de las especies. Además son poco sensibles a presiones hidromorfológicas, como por ejemplo la alteración del régimen hidrológico, continuidad del río y condiciones morfológicas del lecho. Su carácter sésil permite realizar estudios de calidad en un punto concreto y sus ciclos de vida cortos hacen que los cambios de calidad se reflejen en pocas horas. En pocos centímetros cuadrados se puede hacer un muestreo representativo de la comunidad y las muestras son fáciles de recoger y conservar.

En el ámbito de aplicación de la Directiva Marco del Agua 2000/60/CE del Parlamento Europeo, y del Consejo de 23 de octubre de 2000 por los que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas, en adelante DMA y su reciente modificación mediante la Directiva 2014/101/UE de la Comisión de 30 de octubre de 2014, que modifica su anexo V, se establece que:

- Deben garantizarse la calidad y comparatividad de los métodos empleados para controlar los parámetros de cada tipo, para efectuar el seguimiento del estado/potencial ecológico del agua con arreglo al artículo 8 de la DMA,
- Desde la publicación de la DMA, el Comité Europeo de Normalización (CEN) ha publicado nuevas normas, algunas de ellas de forma conjunta con la Organización Internacional de Normalización, que se refiere a la toma de muestras biológicas de fitoplancton, macrófitos y fitobentos, invertebrados bentónicos y peces, así como a la evaluación de las características hidromorfológicas.



El objetivo de este documento es, en primer lugar, definir el protocolo de muestreo y de identificación y análisis de diatomeas en ríos que garantice el cumplimiento de los requisitos mencionados anteriormente.

Por ello se incluyen a continuación los siguientes documentos publicados por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), que son los que se establecen como protocolos que permiten la evaluación estandarizada de la comunidad de organismos fitobentónicos en masas de agua de la categoría ríos con tipologías presentes en la Comunidad Autónoma del País Vasco.

- MAGRAMA 2013. Protocolo de muestreo y laboratorio de flora acuática (organismos fitobentónicos) en ríos (Código: ML-R-D-2013).
- MAGRAMA 2013: Protocolo de cálculo del índice de Polusensibilidad específica (Código: IPS-2013).

Finalmente, este documento incluye el sistema de evaluación de estado/potencial ecológico basado en la comunidad de diatomeas bentónicas de ríos acorde con las definiciones normativas del anexo V de la DMA, que incluye la determinación de condiciones de referencia y valores umbrales como herramienta para determinar el grado de cumplimiento de objetivos ambientales de forma coherente con lo requerido por la DMA, para los tipos de ríos presentes en la CAPV y que fue recogido en el documento “Protocolos de muestreo y análisis de organismos fitobentónicos en ríos y valoración del estado según la Directiva 2000/60/CE” (Agencia Vasca del Agua, 2008) e incorporado al R.D. 400/2013 por el que se aprueba el Plan Hidrológico de la parte española de la Demarcación Hidrográfica del Cantábrico Oriental.



2 PROTOCOLO DE MUESTREO Y LABORATORIO DE FLORA ACUÁTICA (ORGANISMOS FITOBENTÓNICOS) EN RÍOS (CÓDIGO: ML-R-D-2013).

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.

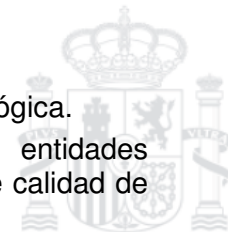
La Directiva Marco del Agua establece que los métodos empleados para controlar los parámetros de cada tipo serán conformes a las normas internacionales o nacionales que garanticen el suministro de información de calidad y comparabilidad científica equivalentes.

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.

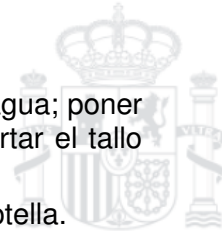
En todo caso se indican los procedimientos de muestreo:

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 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:
------------------------------	----------------------------------	-------------------------

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



3 PROTOCOLO DE CÁLCULO DEL ÍNDICE DE POLUSENSIBILIDAD ESPECÍFICA (CÓDIGO: IPS-2013).

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



4 SISTEMA DE EVALUACIÓN

El Real Decreto 400/2013 establece que el índice de polusensibilidad específica (IPS)¹ es el indicador que sirve para evaluar el estado relativo al indicador de calidad de organismos fitobentónicos en el caso de masas de agua de la categoría ríos (masas de agua artificiales o muy modificadas asimilables a ríos).

El índice IPS se calcula sobre la base de medias ponderadas de los valores de sensibilidad a la contaminación (S_j), valor indicador de contaminación (V_j) y abundancia relativa de la especie (j), y su cálculo se realiza sobre la base del programa Omnidia².

Al igual que en el caso de fauna bentónica de invertebrados relativos a la categoría ríos, en la CAPV al dar traslado del ejercicio de intercalibración a las tipologías presentes, se ha concluido que existen datos sobre condiciones de referencia relativos a organismos fitobentónicos para los tipos 12, 22, 23, 26 y 30 de la categoría ríos.

La falta de sitios de referencia para algunas tipologías de ríos de la CAPV ha imposibilitado la consecución de valores de condiciones de referencia, por lo que se ha hecho una aproximación a juicio de experto y se ha considerado que:

- las condiciones de referencia y los objetivos ambientales establecidos para el tipo 12- Ríos de montaña mediterránea calcárea son trasladables al tipo 15 Ejes mediterráneo-continentales poco mineralizados,
- las condiciones de referencia y los objetivos ambientales establecidos para el tipo 22 Ríos cántabro-atlánticos calcáreos son trasladables a los tipos 32 Pequeños ejes cántabro-atlánticos calcáreos y 29 Ejes fluviales principales cántabro-atlánticos calcáreos,
- las condiciones de referencia y los objetivos planteados para el tipo 9-Ríos mineralizados de la baja montaña mediterránea, se toman de la actual instrucción de planificación hidrológica³ con la consideración de que el valor umbral inferior a aplicar es 3.

Cualquier métrica que participe en la determinación del estado ecológico debe ser transferida a un valor entre 0-1. Es decir, las métricas participan con sus valores EQR. Para métricas cuyo valor disminuye al aumentar la presión (caso del IPS) el valor de EQR se corresponde con la siguiente fórmula: $EQR = (\text{Valor observado} - \text{Umbral inferior}) / (\text{Umbral superior} - \text{Umbral inferior})$.

¹ CEMAGREF. 1982. Étude des méthodes biologiques d'appréciation quantitative de la qualité des eaux. Rapport Q.E. Lyon-A.F. Rhone-Méditerranée-Corse. CEMAGREF, Lyon. 218 pp.

² Lecoite, C; Coste, M; Prygiel. (1993) "Omnidia": software for taxonomy, calculation of diatom indices and inventories management. J. Hydrobiologia 269/270: 509-513, 1993.

³ Orden ARM/2656/2008, de 10 de septiembre, por la que se aprueba la instrucción de planificación hidrológica. (BOE nº 229 del 22 septiembre 2008).



En el caso de organismos fitobentónicos⁴ se ha establecido que existe un valor umbral inferior significativo (IPS=3) y que este valor debe aplicarse en el cálculo de EQR según la siguiente fórmula: $EQR = (\text{Valor observado} - 3) / (\text{Umbral superior o valor de referencia} - 3)$.

En la Tabla 1 se detallan las condiciones de referencia para el índice IPS y los objetivos ambientales como valor umbral Buen estado/ Estado moderado expresado como valores absolutos y como valores EQR de índice IPS.

Tipo	22, 29 y 32	23	30	12 y 15	26	9
Valor absoluto índice IPS						
REF	15,4	17,6	16,6	16,7	17,4	17,5
Umbral MB/B	14,3	16,9	15	16,2	16,1	16,8
Objetivo Ambiental Umbral B/A	11,5	13,4	12	12,9	12,8	13,4
Umbral A/D	8,7	10	9	9,6	9,6	9,9
Umbral D/M	5,8	6,5	6	6,3	6,3	6,5
Valor Umbral inferior	3	3	3	3	3	3

Tipo	22, 29 y 32	23	30	12 y 15	26	9
Ecological Quality Ratio (EQR) del índice IPS						
EQR MB/B	0,91	0,95	0,88	0,96	0,91	0,95
Objetivo Ambiental EQR B/A	0,69	0,71	0,66	0,72	0,68	0,72
EQR A/D	0,46	0,48	0,44	0,48	0,46	0,48
EQR D/M	0,23	0,24	0,22	0,24	0,23	0,24

Tabla 1 Ríos. Organismos fitobentónicos. Índice IPS. Condiciones de referencia (REF); límites entre clases de calidad expresados en valores absolutos y como valores del Ecological Quality Ratio (EQR) del índice IPS: muy bueno (MB), bueno (B), moderado (A), deficiente (D) y malo (M); y objetivos ambientales asociados al componente fitobentos.

De forma transitoria y a falta de estudios al respecto, en el caso de las masas de agua muy modificada asociadas a la categoría ríos⁵, se ha considerado el valor del límite entre las clases de estado Máximo Potencial Ecológico y Buen Potencial Ecológico, así como entre Buen Potencial Ecológico y Potencial Ecológico Moderado como un 85% de los valores EQR establecidos en la tabla anterior.

⁴ Agencia Vasca del Agua (2008). Protocolos de muestreo y análisis de organismos fitobentónicos en ríos y valoración del estado según la Directiva 2000/60/CE. www.uragentzia.euskadi.net.

⁵ Memoria del Plan Hidrológico de la Demarcación Hidrográfica Cantábrico Oriental. 2010-2021. Ámbito de las Cuencas Internas del País Vasco. 2012.