

PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA E DO TRATAMENTO DE DADOS (GT.3)

PROJECTO MIGRANET- “OBSERVATORIO DAS POPULAÇÕES DE PEIXES MIGRADORES NO ESPAÇO SUDOE”

PROGRAMA DE COOPERAÇÃO TERRITORIAL INTERREG IV B SUDOE (2ª CONVOCATORIA) FUNDO EUROPEU PARA O DESENVOLVIMENTO REGIONAL (FEDER) DA UNIÃO EUROPEIA

PROTOCOLO PADRONIZADO DA METODOLOGIA UTILIZADA PARA O ESTUDO DA ENGUIA DE VIDRO



PROTOCOLO PADRONIZADO DA METODOLOGIA
UTILIZADA PARA O ESTUDO DA ENGUIA DE
VIDRO

-GRUPO DE TAREFAS 3- ACÇÃO 1-

Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental

Rua dos Bragas, N° 289, 4050-123 Porto, Portugal

Índice

1. Introdução.....	4
2. Amostragem.....	4
2.1. Material necessário.....	4
2.2. Trabalho de campo.....	5
3. Processamento da amostra no laboratório.....	7
3.1. Material necessário.....	7
3.2. Procedimento.....	7
4. Tratamento de dados.....	15
5. Bibliografia.....	15

1. Introdução

Não é objectivo deste protocolo padronizar a metodologia empregue na captura das enguias de vidro, dado que esta, em rios onde é permitido a captura, está normalmente associada à arte utilizada pelos pescadores. Caso não haja pesca profissional, uma variedade de artes de amostragem pode ser usada, desde a rede de mão à armadilha, e a sua utilização varia em função do estudo que se pretenda desenvolver, principalmente no que diz respeito a dados quantitativos do recrutamento. As características físicas do rio, nomeadamente a profundidade e a hidrodinâmica são factores importantes na opção da técnica de amostragem. A análise biométrica e o estado de pigmentação das enguias de vidro obriga ao conhecimento do seu local de proveniência, dado que são caracteres que variam quer temporal quer espacialmente. O exemplo da técnica de amostragem apresentada refere-se à praticada no rio Minho.

2. Amostragem

2.1 Material necessário

- Barco e palamenta;
- Arte de pesca: Tela ou tela de saco;
 - Tela - rede destinada à captura das enguias de vidro/ meixão (*Anguilla anguilla*). Arte que funciona como barreira, com as seguintes dimensões, comprimento máximo de 10 m na tralha de boias, comprimento máximo de 15m na tralha de chumbos, comprimento máximo de 2.5m de “boca”, altura máxima de 8 metros e uma malhagem mínima de 2 mm de lado, de acordo com as dimensões definidas no Regulamento de pesca do Rio Minho;
 - Tela de saco – Trata-se de uma rede, apenas usada como arte de pesca experimental dado que o seu uso está proibido na pesca comercial, com asas e um saco em forma de funil zona da rede onde as enguias de vidro

e o by-catch se vão concentrar. Esta rede é mais comprida que a tela alcançando os 25 m e atinge os 3.5 m de altura;

- Peneira ou Rapeta – rede em forma de colher com aro de diâmetro máximo de 1,5 m e malha de rede de 2 mm, com tamanho do cabo variável;
- Crivo com malha de 4 mm;
- Crivo com malha de 1-2 mm;
- Botas
- Fatos Oleados/ Impermeáveis;
- Baldes de plástico;
- Sonda multi-paramétrica;
- Correntómetro;
- Sacos plásticos
- Folhas de registo
- GPS

2.2. Trabalho de campo

As capturas são efetuadas na altura da Lua Nova nas áreas do estuário onde se inverte o sentido da corrente, da baixa-mar para a preia-mar. A tela é colocada virada para a foz do rio, durante enchente, de modo a criar uma barreira com a forma do tronco de um cone, mais larga junto ao fundo e estreitando a medida que se aproxima da tralha de boias. É fundeada com dois ferros nas extremidades posteriores ficando a “boca” da rede fixa no barco de modo a se poder proceder à recolha do meixão utilizando a rapeta.

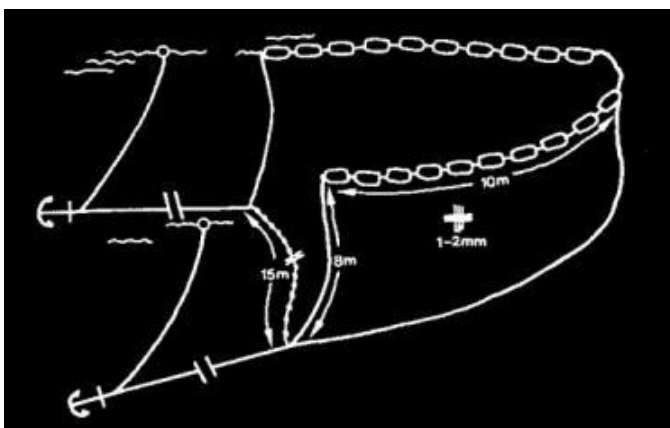


Figura 1. Representação da tela dos meixões fundeada com as respectivas medidas

No caso de se utilizar a tela de saco, ela é fundeada do mesmo modo que a rede anterior existindo nesta uma boia extra que sinaliza a posição do saco, visto que periodicamente, é necessário recolher o material que este acumula.



Figura 2. tela de saco.

O tempo de amostragem (captura) pode variar, em função da maré, podendo atingir 4-5 horas. Os parâmetros físico-químicos que importa registar ao longo da amostragem são: temperatura do ar e da água, salinidade, pH, oxigénio, profundidade, velocidade da corrente, à superfície e no fundo e a cada meia hora do tempo de amostragem. Informação complementar que pode ser adquirida: turbidez, pluviosidade, luminosidade

O material recolhido é passado pelo crivo de 4 mm de modo a separar as frações de meixão (que passa para o crivo de 2 mm) e de by-catch. Os meixões são depois colocados num balde a seco, vivos, para processamento em laboratório. O by-catch, caso interesse analisar, é colocado em sacos de plástico devidamente etiquetados para futura triagem e pesagem.

3. Processamento da amostra no laboratório

3.1. Material necessário

- Balança (0,001 g)
- Régua (0,1 cm)
- Anestésico (MS 222, benzocaína)
- Pinças;
- Folhas de papel absorvente

- Folhas de registo;
- Agulhas de Dissecção;
- Folhas de registo;
- Placas de petri;
- Lupa binocular;
- Guia de identificação dos estados de pigmentação (segundo Elie, 1982)

3.2 Procedimento

No laboratório e até à manipulação, as enguias de vidro devem ser mantidas a baixa temperatura (refrigeração). Para pesar e medir os indivíduos, estes devem ser anestesiados (benzocaína 50 mg/l).

De modo a facilitar o manuseamento dos exemplares e retirar o excesso de água, antes da medição e pesagem, as enguias de vidro devem ser colocadas sobre uma folha de papel absorvente. Os indivíduos são então pesados e medidos, recorrendo a balança e régua milimétrica.

Para análise do estado de pigmentação dos indivíduos, estes devem ser estendidos na placa de Petri e colocados de modo a que se consigam visualizar as várias partes do seu corpo. A placa deve estar húmida, para não secar excessivamente as enguias de vidro quando submetidas à iluminação da lupa binocular. Deve-se registar a correspondente análise biométrica com o respectivo estado de pigmentação.

Para proceder à classificação dos diferentes estados de pigmentação segue-se o guia abaixo descrito:

Estado VB

Estado inicial, onde se começam a encontrar os primeiros vestígios de pigmentação na parte posterior da caixa craniana, bem como na extremidade da barbatana caudal.

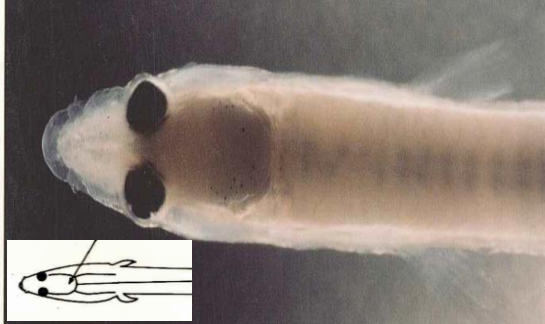


Figura 3. Caixa craniana com os primeiros melanóforos visíveis na região cefálica (Grellier, 1991).

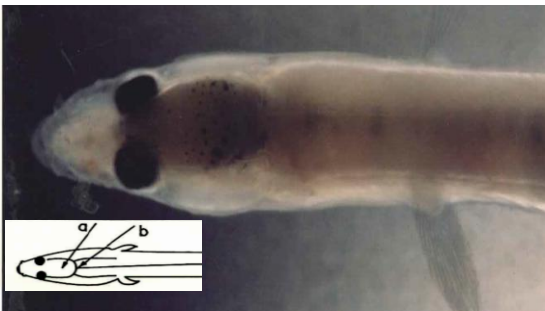


Figura 4. Caixa craniana com melanóforos visíveis na região cefálica sem pigmentação posterior (Grellier, 1991).

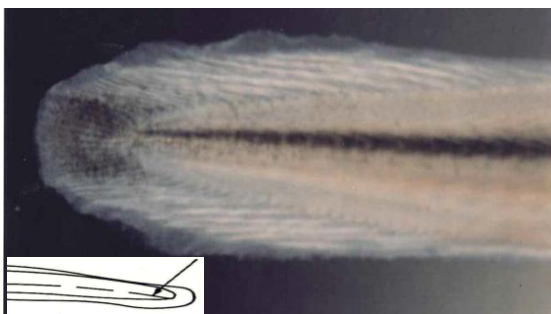


Figura 5. Primeiros melanóforos visíveis na região dorso-lateral da extremidade posterior da cauda (Grellier, 1991).

Estado VIA₀

Estado onde a mancha de pigmentação alastra às áreas laterais da caixa craniana e à região dorso - lateral da barbatana dorsal



Figura 6. Caixa craniana com melanóforos visíveis na região cefálica e na região posterior (Grellier, 1991).



Figura 7. Caixa craniana com melanóforos visíveis na região lateral posterior (Grellier, 1991).

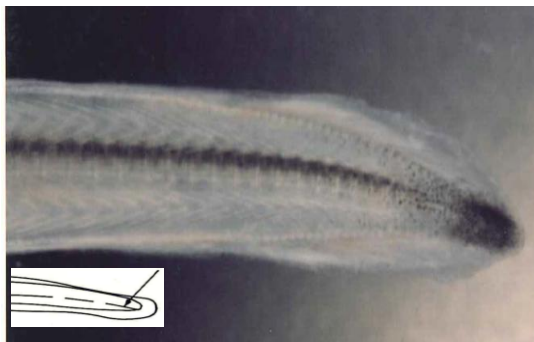


Figura 8. Região dorso-lateral da cauda com a expansão dos melanóforos visível a partir da mancha inicial na extremidade posterior (Grellier, 1991).

Estado VIA₁

Estado onde a dimensão dos pontos de melanina aumentam, recobrimdo as margens posteriores da caixa craniana quase por completo. Pode-se observar também o início da pigmentação do 1º arco branquial. A zona pigmentada expande alcançando a maxila e, a nível dorsal, as manchas de pigmentação provenientes das zonas caudal e cerebral unem-se.

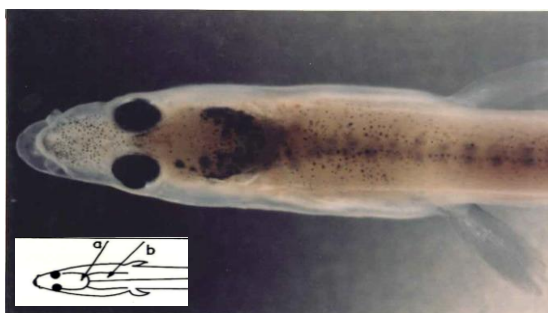


Figura 9. Caixa craniana onde se pode visualizar uma pigmentação de disposição cordiforme (com melanóforos de grandes dimensões), e o aumento da pigmentação ao longo da região dorsal (Grellier, 1991).

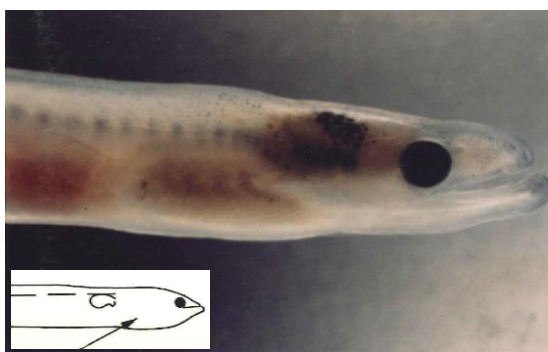


Figura 10. Início da pigmentação dos arcos branquiais (Grellier, 1991).

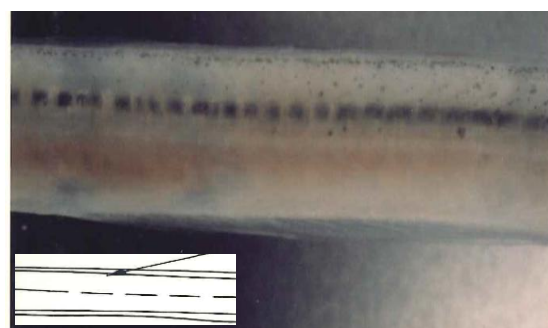


Figura 11. A pigmentação originária da zona posterior da cauda alastra unindo-se à pigmentação da caixa craniana (Grellier, 1991).

Estado VIA₂

Estado onde ocorre o incremento da intensidade da pigmentação a nível cefálico e dorsal. A zona dorso-lateral aparece nesta fase completamente pigmentada assim como todos os arcos branquiais que passam a apresentar pigmentação bem definida



Figura 12. Intensificação da pigmentação ao longo das regiões cefálica e dorsal (Grellier, 1991).

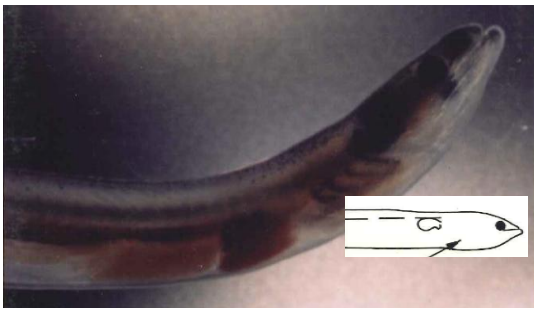


Figura 13. Pigmentação completa dos arcos branquiais (Grellier, 1991).



Figura 14. Pigmentação completa da região dorso-lateral (Grellier, 1991).

Estado VIA₃

Estado onde se dá um novo incremento da intensidade da pigmentação a nível cefálico, ocultando por completo a caixa craniana. Início da pigmentação dos órgãos internos.

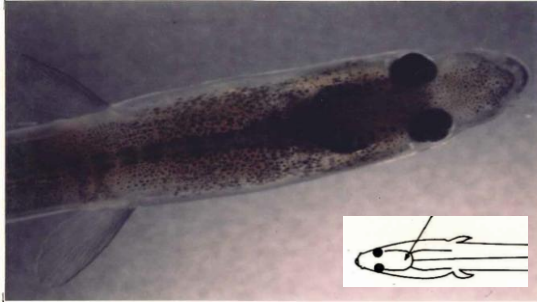


Figura 15. Incremento da pigmentação estando a caixa craniana oculta pela pigmentação dorsal (Grellier, 1991).

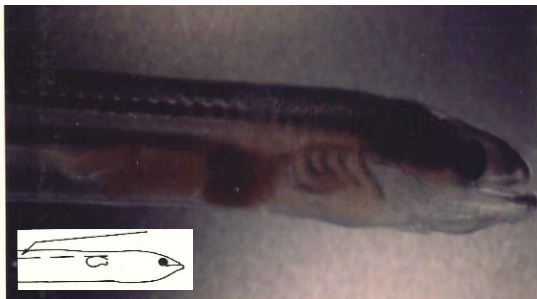


Figura 16. Pigmentação completa da região dorso-lateral desde a barbatana dorsal até às barbatanas peitorais (Grellier, 1991).

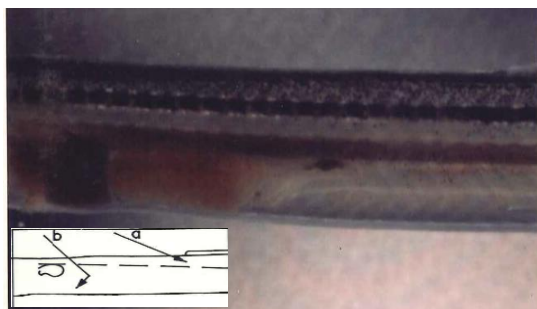


Figura 17. Pigmentação completa da região dorso-lateral mas que não ultrapassa a linha lateral. Início da melanização das vísceras (Grellier, 1991).

Estado VIA₄

Estado onde a parte anterior do meixão se encontra completamente pigmentada excepto as vísceras. Inicia-se a pigmentação abaixo da linha lateral



Figura 18. Região anterior pigmentada excluindo a parte ventral (Grellier, 1991).

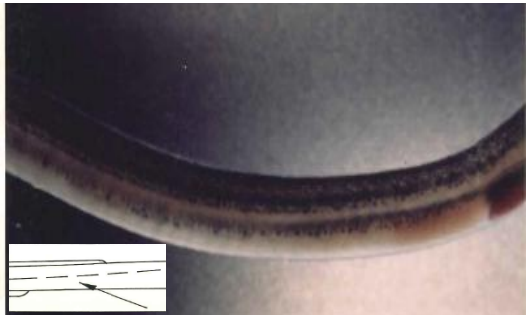


Figura 19. Pigmentação completa da região dorso-lateral ultrapassando a linha lateral. (Grellier, 1991).

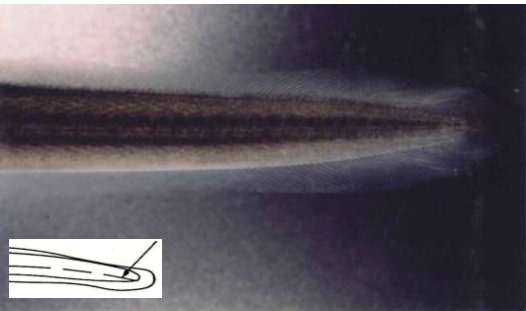


Figura 20. Pigmentação da região posterior é generalizada (Grellier, 1991).

Estado VIB

Estado onde toda a área corporal do mexilhão se encontra completamente pigmentada



Figura 21. Pigmentação dorsal generalizada (Grellier, 1991).



Figura 22. Aparecimento das primeiras manchas de pigmentação na base interna das barbatanas peitorais (Grellier, 1991).



Figura 23. Pigmentação dorsal generalizada, alcançando a zona abaixo da linha lateral. A zona ventral torna-se opaca mas não contém manchas de pigmentação (Grellier, 1991).

4. Tratamento de dados

Obtidos os dados biométricos e de pigmentação e em função da arte de captura (amostragem), pode-se fazer o seguinte tratamento dos dados:

- Relação peso – comprimento
- Relação peso ou comprimento com estado de pigmentação
- Índice de Condição ou de Fulton (K)
- Captura Por Unidade de Esforço (CPUE)

5. Bibliografia

Adam G., Feunteun E., Prouzet P., Rigaud C. (2008) “L’anguille européenne: indicateurs d’abondance et de colonisation.” Coll. Savoir-faire, éditions Quae, Versailles.

Antunes C, Cobo F (coordenadores), Araújo MJ, Braga C, Roleira A, Mota, M, Sanchez J, Vieira R, Servia MJ, Couto MT, Rivas S, Nachón D, Silva S, Morquecho C, Gómez P, Lago L., (2011) “Contribuição para o plano de gestão da enguia-europeia, *Anguilla anguilla* no rio Minho internacional”. In “Valorização dos recursos naturais da bacia hidrográfica do rio Minho.” - Projecto Natura Minho - Miño, relatório final. CIIMAR.

Antunes C., Weber M. (1996) “The glass eel fishery and the by - catch in the Rio Minho after one decade (1981 - 1982 and 1991 - 1992).” Archives of Polish Fisheries, 4, 131 – 139.

Cobo F., Vieira - Lanero R., Servia M.J., Barca S., Couto M.T., Rivas S., Sánchez J., Nachón D., Silva S., Gómez - Sande P., Morquecho C., Lago L. (2010) “Contribución al plan de gestión de la anguila europea (*Anguilla anguilla*): Primeros datos biológicos en los afluentes de la margen española del Baixo Miño.” in Carlos Antunes (eds), 2010, “IV Simpósio Ibérico Sobre A Bacia Hidrográfica Do Rio Minho.” Aquamuseu do Rio Minho, 70 – 77.

Elie P., Lecomte - Finiger R., Cantrelle I., Charlon N. (1982) “Definition des limites des différents stades pigmentaires durant la phase civelle d'*Anguilla anguilla* L.” Vie et milieu, 32, 149 – 157.

Edital N° 27/2010 - Capitania Do Porto De Caminha

Grellier P., Huet J., Desaunay Y.(1991) “Stades pigmentaires de la civelle *Anguilla anguilla* (L.) dans les estuaries de la Loire et de la Vilaine.” IFREMER, DRV, 91,14-RH/Nantes, 18p.

Tesch F.W., (2003) “The Eel.” Blackwell Science, Oxford.

Moriarty C., Dekker, W. (eds.), (1997) “Management of the European Eel.” Fisheries Bulletin, Dublin.

Sérgia Catarina de Amorim Costa Dias (2010) “Ecology and trophic dynamics of the European eel, *Anguilla anguilla* (L.).”- Tese de Doutoramento em Ciência Animal, Especialidade em Morfologia e Fisiologia, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA Y DEL TRATAMIENTO DE LOS DATOS (GT. 3)

PROYECTO MIGRANET- “OBSERVATORIO DE LAS POBLACIONES DE PECES MIGRADORES
EN EL ESPACIO SUDOE”

PROGRAMA DE COOPERACIÓN TERRITORIAL INTERREG IV B SUDOE (2ª CONVOCATORIA)
FONDO EUROPEO PARA EL DESARROLLO REGIONAL (FEDER) DE LA UNIÓN EUROPEA

PROTOCOLO ESTANDARIZADO DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA PARA EL ESTUDIO DE DIATOMEAS



ESTACIÓN DE HIDROBIOLOGÍA
"ENCORO DO CON"



PROTOCOLO ESTANDARIZADO DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA PARA EL ESTUDIO DE DIATOMEAS

-GRUPO DE TAREAS 3 -ACCIÓN 1-

Estación de Hidrobiología “Encoro do Con”, Universidad de Santiago de Compostela.
Castroagudín s/n, 36617 Vilagarcía de Arousa, Pontevedra
Spain.

Tabla de contenido

1. Recolección del material en el campo	5
2. Tratamiento de muestras en el laboratorio	6
2.1. Recomendaciones para tratar las muestras	6
2.2. Material	7
2.3. Método	8
2.4. Posibles problemas	11
3. Estudio de las diatomeas	12
4. Tratamiento de los datos	13
5. Bibliografía	17



1. Recolección del material en el campo

El muestreo se realiza siguiendo la norma UNE-EN 13946: *Guía para el muestreo en rutina y pretratamiento de diatomeas bentónicas de ríos* (AENOR 2004). En esta norma se marca como preferente el muestreo en tramos con corriente, ya que las zonas lénticas o semilénticas contienen frecuentemente especies planctónicas o células muertas procedentes de cursos superiores.

Las épocas propicias para la recogida de estas muestras son la primavera, por ser la época de mayor crecimiento vegetal o durante el estiaje siempre que se asegure que en este momento los caudales de los ríos no regulados son mínimos. El sustrato a muestrear ha de haber permanecido sumergido, como mínimo, durante las últimas cuatro semanas.

La recogida de muestras se realiza mediante raspado, con un cepillo de dientes, de rocas o piedras de un tamaño mínimo de 10 cm² y situadas, preferentemente, en el punto medio del lecho fluvial. Como norma general se utiliza un marco de diapositivas para asegurar la recogida de una muestra representativa, próxima a los 6 cm² por piedra. El raspado termina al alcanzar un tamaño de muestra que pueda ser representativo (3 a 5 piedras) y se procede a su conservación mediante etanol, con una concentración final en la muestra de un 4% (v/v).

2. Tratamiento de muestras en el laboratorio

Una vez en el laboratorio se procede al tratamiento químico de la muestra con una mezcla de ácidos que provoca la digestión de la materia orgánica. Como resultado se obtienen frústulos limpios y de esta forma se puede observar con detalle la estructura y la ornamentación del frústulo, caracteres en los que se basa la taxonomía de las Diatomeas.

2.1. Recomendaciones para tratar las muestras

- Antes de comenzar el tratamiento de las muestras se debe comprobar al microscopio óptico que exista un número elevado de células vivas.
- Se recomienda conservar la muestra original hasta haber sido montada.
- Se recomienda eliminar la materia orgánica con peróxido de hidrógeno o con una mezcla ácida 2:1 (ácido nítrico – ácido sulfúrico), se utilizan 3 ml de mezcla ácida o peróxido de hidrógeno por 6 ml de la muestra de agua. En ambas opciones la reacción debe tener lugar al “baño María”.
- No se recomienda eliminar la materia orgánica a altas temperaturas.
- Si hay material calcáreo en las muestras (o se sospecha de su existencia), es conveniente que se elimine previamente. Se añade ácido clorhídrico diluido, gota a gota hasta que se produzca efervescencia, lo que indica que ha cesado la liberación de dióxido de carbono. A continuación se añade agua destilada, se centrifuga y se descarta el sobrenadante.
- Los restos ácidos que puedan permanecer en la muestra, después del baño María, deben ser eliminados mediante suficientes centrifugados o decantados, recuperando únicamente un precipitado blanquecino del fondo del tubo de ensayo.
- El precipitado obtenido debe ser conservado para montar más muestras (otra alternativa es conservar la muestra original).

- Para montar la muestra se coloca una gota de la resuspensión del precipitado blanquecino sobre el cubreobjetos y se deja secar a temperatura ambiente; la suspensión se puede hacer en alcohol, entonces las células se dispersan más y la gota se seca más rápido.
- Sobre la gota seca se coloca una gota de resina Naphrax®; se une el portaobjetos y el cubreobjetos y la resina excedente se evapora calentándola.
- Se recomienda una densidad de 10-20 células por campo de visión.
- Se deben preparar 2-3 réplicas por cada muestra y etiquetar bien las muestras.
- Se recomienda repasar el rotulado de los tubos de ensayo durante todo el proceso ya que las emanaciones ácidas pueden hacer que se borren.
- No usar la pipeta para retirar el ácido, eliminarlo por vertido.

2.2. *Material*

- Vasos de precipitado.
- Agua destilada.
- Gradilla portatubos.
- Tubos de ensayo (15 - 30 mm de diámetro) resistentes al calor (para la digestión) y con tapas (para la conservación).
- Pipetas Pasteur plásticas.
- Baño María.
- Ácido clorhídrico (HCl) diluido (1 mol/l).
- Ácido nítrico (HNO₃ 65%).
- Ácido sulfúrico (H₂SO₄ 95%).
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂ 33%).
- Alcohol desnaturalizado.



- Resina con coeficiente de refracción > 1.6 (Naphrax, Diphrax, Hyrax).
- Gafas de seguridad.
- Guantes resistentes.
- Etiquetas para portaobjetos, lápices y rotuladores indelebles.
- Placa calefactora.

2.3. Método

Los pasos del 2-8 se deben realizar bajo una campana extractora resistente a las emanaciones ácidas y cumpliendo con las normas sanitarias y de seguridad del laboratorio.

Siempre se ha de tener en cuenta que se deben hacer 2-3 réplicas de la misma muestra.

1. Preparar los tubos de ensayo y la hoja de seguimiento.
2. Preparar el “baño María” llenando el recipiente de agua, teniendo cuidado de que, una vez llenos, los tubos no floten o sean cubiertos por el agua en ningún momento.
3. Preparar la mezcla ácida ($\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$ 2:1) – calcular cuánto se necesitará (3 ml de mezcla ácida por 6 ml de muestra).
4. Remover bien la muestra y con una pipeta Pasteur, verter una submuestra de 6 ml en cada tubo de ensayo (conviene utilizar diferentes pipetas por punto de muestreo o lavar bien la pipeta en agua destilada para evitar la contaminación de las muestras).
5. Colocar los tubos de ensayo, etiquetados, en una gradilla.

6. Con una pipeta Pasteur verter cuidadosamente 3 ml de la mezcla ácida; poner los tubos en la gradilla y ponerlos al “baño María” (recordar que la reacción es exotérmica y bullirá fuertemente).
7. Mantener al “baño María” durante un mínimo de 2 horas. El grado de oxidación después del baño se puede comprobar añadiendo a la muestra 1 ml de peróxido de hidrógeno, ya que las muestras están listas si no se produce una ebullición prolongada.
8. Se debe dejar enfriar y reposar por lo menos una noche (8-10 horas).
9. Se decanta la mezcla ácida y se vierte agua destilada sobre el precipitado.
10. Se centrifuga a 4000 rpm / 10-20 minutos. El decantado, rellenado y el centrifugado se deben repetir 3-4 veces teniendo cuidado de que el precipitado grisáceo, que contiene las diatomeas, no se pierda durante la decantación.
11. El precipitado se puede conservar en agua destilada o alcohol, porque en él no hay materia orgánica que permita alguna actividad biológica.
12. El portaobjetos y el cubreobjetos a utilizar en el montaje de la muestra deben limpiarse con etanol (aunque en el paquete figure que los cristales están limpios).
13. El portaobjetos se debe etiquetar en un extremo con los datos necesarios (fecha, código, lugar y, si se considera relevante para el estudio, el tipo de sustrato).
14. Remover la suspensión muestra y, con una pipeta Pasteur, verter 1-2 gotas sobre el cubreobjetos (la cantidad depende de la densidad de la suspensión). Se recomienda dejar secar la gota al aire, porque el calentamiento puede producir remolinos y la aglutinación de las células.
15. Cuando la gota de muestra está seca, se calienta ligeramente el cubreobjetos con una placa calefactora y se deja caer sobre ella una gota de resina con una varita de cristal.

16. Se calienta ligeramente el portaobjetos, se coloca encima del cubreobjetos y se le da la vuelta a toda la muestra (con cuidado de que la etiqueta quede hacia el lado correcto).
17. El preparado se calienta para que la resina se disperse por toda la muestra y se evapore el excedente. Después se deja enfriar, momento en el que las burbujas de aire desaparecerán.
18. Revisar la calidad del preparado.



Figura 1. Fases de la recogida, tratamiento e identificación de muestras de Diatomeas. (1) Recolección de muestras en el campo utilizando un cepillo de dientes y marcos de diapositivas (para asegurar la recogida de una muestra representativa, próxima a los 6 cm² por piedra); (2) tratamiento físico-químico de las muestras; (3) montaje de las muestras y (4) identificación y recuento al microscopio óptico.



2.4. Posibles problemas

- Si la muestra queda lechosa y turbia, se debe a que la muestra estaba húmeda al añadir la resina. Solución: repetir el montaje prolongando el secado.
- Si la muestra queda líquida o borrosa, se debe a que en la muestra quedó algo de ácido. Solución: repetir el protocolo desde el paso 9.
- Si las burbujas no desaparecieron del todo, puede que la muestra tenga una concentración de frústulos muy elevada. Solución: habría que diluirla más.
- Si las células no se distinguen bien bajo el microscopio o queda aire alrededor de ellas se debe a que la resina no se dispersó bien. Solución: recalentar el preparado para corregir la situación.



3. Estudio de las diatomeas

Para la correcta identificación taxonómica es imprescindible limpiar los esqueletos de sílice de las diatomeas. Para ello se digirió previamente la materia orgánica de las muestras tratándolas con una solución ácida de ácido nítrico y ácido sulfúrico en un baño María durante 3-4 horas. Posteriormente se realizaron preparaciones microscópicas permanentes utilizando como medio de montaje una resina (NAPHRAX®) que presenta un coeficiente de refracción superior a 1'6 y un alto poder de resolución.

La identificación y el recuento se realizaron mediante transectos verticales del cubreobjetos. Cuando sea posible se cuenta un mínimo de 400 individuos, sin hacer diferencias entre si las valvas están unidas o son independientes, ya que en muchos casos es imposible distinguirlo claramente.

El protocolo de observación y recuento de las muestras utilizado es el que contempla la guía estandarizada del comité europeo para la utilización de diatomeas en la evaluación de la calidad del agua de los ríos (CEN 2000, 2001).

La taxonomía y nomenclatura seguidas en este protocolo son las propuestas por las colecciones *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, *Iconographia Diatomológica* y *Diatoms of Europe*. Además, se recomienda también el empleo de otras dos guías como material de apoyo: la *Guía de las diatomeas de la cuenca del Duero* y *An Atlas of British Diatoms*.



4. Tratamiento de los datos

Con los datos obtenidos se calculan tres índices cuyos resultados se ajustan mejor que otros existentes a lo observado en Europa: el *IPS* (Índice de Poluosensibilidad Específica), el *IBD* (Índice Biológico de Diatomeas) y el *CEE* (Índice Europeo, que pretende ser un estándar para toda Europa). Aún así, debido a su uso generalizado y consolidado y a que considera todos los taxones de la muestra, se toma el *IPS* como índice de referencia, como demuestran numerosos estudios en la Península Ibérica (ALMEIDA, 2001; GOMÁ, 2004; ANÓNIMO, 2005; PENALTA-RODRÍGUEZ & LÓPEZ-RODRÍGUEZ, 2007).

Para el cálculo del valor de los tres índices de calidad del agua, anteriormente citados, se utiliza el software Omnidia 5.3.

En general, las diferencias existentes entre las valoraciones de calidad obtenidas tras la aplicación de estos índices diatomológicos se deben a los diferentes conjuntos de especies en los que se basan y en los parámetros autoecológicos que se asignan a cada taxón (BLANCO *et al.*, 2007).

- Cálculo del *IPS* (Coste en CEMAGREF, 1982)

El índice de Poluosensibilidad Específica (*IPS*) está basado en el método de ZELINKA & MARVAN (1961). Se calcula sobre la base de las medidas ponderadas de los valores de sensibilidad a la contaminación (*S*), del valor indicador de contaminación (*V*) y abundancia relativa (*A*) de las especies (*j*) presentes en la muestra.

$$IPS = \frac{\sum(A_j \times V_j \times S_j)}{\sum(A_j \times V_j)}$$

El valor que se obtiene con el cálculo del *IPS* oscila entre 1 y 20, que corresponden respectivamente, a los estadios de mínima y máxima calidad biológica para un determinado tramo fluvial:

VALOR	CALIDAD DEL AGUA
17-20	Muy buena
13-17	Buena
9-13	Moderada
5-9	Deficiente
1-5	Mala

- **Cálculo del *IBD*** (AFNOR 2000)

La elaboración de este índice fue descrita por LENOIR & COSTE en 1995 y desde el año 2000 se utiliza como estándar en Francia. Se basa en el método de ZELINKA & MARVAN (1961), como en el caso del *IPS*, pero en este caso se utiliza una selección de 209 taxones frecuentes en las aguas dulces europeas. Para su cálculo se siguen una serie de pautas:

- Cálculo del porcentaje de la abundancia (“A”) de los taxones presentes y de los taxones asociados.
- Eliminación de los taxones que presentan una abundancia menor que los valores que indica la norma AFNOR NF T 90-354. Así, todas aquellas especies cuya “A” sea inferior al 7.5% no serán tenidas en cuenta en el cálculo de este índice. Es decir, en el caso de identificar 400 individuos, aquellas especies con 3 o menos individuos identificados no se tienen en cuenta para evitar posibles errores por contaminación de la muestra.

- Cálculo de la probabilidad de la presencia de un taxón que sea significativo de la población. Son estos taxones los que se estudian para determinar la calidad del agua, utilizando la siguiente fórmula:

$$F(i) = \frac{\sum(Ax \times Px(i) \times Vx)}{\sum(Ax \times Vx)}$$

Siendo:

- Ax : la abundancia del taxón “ x ” que aparece en el porcentaje.

- $Px(i)$: probabilidad de presencia del taxón “ x ” de la clase de calidad (i).

- Vx : es el valor ecológico del taxón “ x ”.

Así se obtienen siete valores de $F(i)$, cada uno de ellos correspondiente a una clase de calidad del agua. Posteriormente se realiza el cálculo de “ B ” (también denominado IBD), que corresponde a un valor intermedio de los siete anteriores.

$$B = 1 \times F(1) + 2 \times F(2) + 3 \times F(3) + 4 \times F(4) + 5 \times F(5) + 6 \times F(6) + 7 \times F(7)$$

Finalmente, el valor del IBD también se suele presentar como $IBD/20$, donde:

$$IBD / 20 = 4.75 \times IBD - 8.5$$

Donde: el IBD de la derecha de la ecuación corresponde al valor de B .



El resultado del cálculo del “Índice Biológico de Diatomeas” (IBD/20) se encuentra en el rango de valores de 1 a 20, con lo que se puede asignar a uno de los 5 valores de calidad del agua ya indicados para el *IPS*.

- **Cálculo del CEE** (DESCY & COSTE, 1990)

Este índice se estableció con el propósito de ser utilizado en la mayor parte de los ríos de Europa; por tanto, como un estándar europeo. No se calcula (como el *IPS* y el *IBD*) mediante el método de ZELINKA & MARVAN (1961), sino que combina en una tabla de doble entrada grupos de especies con diferente tolerancia a la contaminación, en relación a su distribución a lo largo de los ríos.

Este índice también ofrece valores en el rango de 1 a 20, con lo que se le puede asignar un valor de calidad del agua como en los dos casos anteriores.



5. Bibliografía

- AENOR (2004). Norma española UNE-EN 13946:2004 *Calidad del agua. Guía para el muestreo en rutina y el pretratamiento de diatomeas bentónicas de ríos*. 20 pp.
- AFNOR (2000): *Détermination de l'Indice Biologique Diatomées (IBD)*. NF T 90-354. Juni 2000. Paris (Association Française de Normalisation).
- ALMEIDA, S. F. P. (2001). Use of diatoms for freshwater quality evaluation in Portugal. *Limnetica*, **20(2)**: 205-213.
- ANÓNIMO, (2005). *Metodología para el establecimiento del Estado Ecológico según la Directiva Marco del Agua. Protocolos de muestreo y análisis para fitoplancton, fitobentos (microalgas bentónicas), macrofitos, invertebrados bentónicos e ictiofauna*. Ministerio de Medio Ambiente – Confederación Hidrográfica del Ebro – URS, Zaragoza, 235 pp.
- ANÓNIMO, (2007). *Metodología para el establecimiento del estado ecológico según la Directiva Marco del Agua en la Confederación Hidrográfica del Ebro*. Ministerio de Medio Ambiente – Confederación Hidrográfica del Ebro
- ANÓNIMO, (2010). *Guía de las diatomeas de la cuenca del Duero*. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Confederación Hidrográfica del Duero ISBN: 771-10-005-1. 207 pp.
- BARBOUR, M. T., GERRITSEN, J., SNYDER, B. D. & STRINBLING, J. B. (1999). *Rapid Bioassessment Protocols for use in streams and wadeable rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish*. EPA 841-B-99-002. Environmental Protection Agency, Office of Water. Washington, D.C.
- BARBOUR, M. T., STRINBLING, J. B. & VERDONSCHOT, P. F. M. (2006). The Multihabitat Approach of USEPA's Rapid Bioassessment Protocols: benthic Macroinvertebrates. *Limnetica*, **25(3)**: 839-850.



- BLANCO, S., BÉCARES, E., HERNÁNDEZ, N. & ECTOR, L. (2007). Evaluación de la calidad del agua en los ríos de la cuenca del Duero mediante índices diatomológicos. *Ingeniería civil*, **148**: 139-146.
- CAUGHLEY, G. & SINCLAIR, A. R. E. (1994). *Wildlife ecology and management*. Blackwell Sciences Publishers. Boston. 334 pp
- CEMAGREF, (1982). *Étude des méthodes biologiques d'appréciation quantitative de la qualité des eaux*. Rapport d'étude CEMAGREF LYON – Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée.
- CEN, EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION, (2000). *Water quality. Guidance standard for the routine sampling and pre-treatment of benthic diatoms from rivers for water quality assessment*. European Standard. prEN 13946.
- CEN, EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION, (2001). *Water quality. Guidance standard for the identification and enumeration of benthic diatom samples from rivers and their interpretation*. European Standard. TC 230 WI00230164.
- DESCY, J. P. & COSTE, M. (1990). *Utilisation des diatomées benthiques pour l'évaluation de la qualité des eaux courantes*. Rapport final. Univ. Namur, CEMAGREF Bordeaux CEE-B. 112 pp.
- ELOSEGI, A. & SABATER, S. (eds) (2009). *Conceptos y técnicas en ecología fluvial*. Fundación BBVA. Bilbao.
- EUROPEAN UNION, (2000). Directive 2000/60/EC of the Parliament and of the Council establishing a framework for the Community action in the field of water policy. *Official Journal of the European Communities*, **L372**: 1-72.
- GOMÁ, J. (2004). *Les diatomees bentòniques de la Tordera: diversitat i utilització com a indicadors de la qualitat biològica de l'aigua*. IV Trobada d'Estudiosos del Montnegre i el Corredor. Diputació de Barcelona. 37-45 pp.
- HELLAWELL, J. M. (1986). *Biological indicators of freshwater pollution and environment management*. Elsevier Applied Science Publishers, London. 546 pp



- LENOIR, A. & COSTE, M. (1995). *Development of a practical diatom index of overall water quality applicable to the French national water Board network. Use of Algae for monitoring rivers II*. Innsbruck Austria Studia Student. G.m.b.H.
- LOEB, S. L. (1994). *An ecological context for Biological Monitoring. En: Biological Monitoring of Aquatic Systems*. Loeb SL & Spacie A (eds). Lewis Publishers, Boca Ratón. 381 pp.
- NATIONAL WATER COUNCIL, (1981). *River Quality: the 1980 survey and further outlook*. NWC, London.
- PENALTA-RODRÍGUEZ, M. & LÓPEZ-RODRÍGUEZ, M. C. (2007). Diatomeas y calidad del agua de los ríos del Macizo Central Gallego (Ourense, N.O. España) mediante la aplicación de índices diatomológicos. *Limnetica*, **26**: 351-358.
- PRAT, N., MUNNÉ, A., RIERADEVALL, M., SOLÀ, C. & BONADA, N. (1998). *Ecostrimed. Estudis de la Qualitat Ecològica dels Rius (8)*. Diputació de Barcelona. Àrea de Medi Ambient.
- ZELINKA, M. & MARVAN, P. (1961). Zur prazisierung der biologischen klassifikation des Reinheit fliessender gewasser. *Archiv für Hydrobiologie*, **57**: 389-407.

ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA Y DEL TRATAMIENTO DE LOS DATOS (GT. 3)

PROYECTO MIGRANET- “OBSERVATORIO DE LAS POBLACIONES DE PECES MIGRADORES
EN EL ESPACIO SUDOE”

PROGRAMA DE COOPERACIÓN TERRITORIAL INTERREG IV B SUDOE (2ª CONVOCATORIA)
FONDO EUROPEO PARA EL DESARROLLO REGIONAL (FEDER) DE LA UNIÓN EUROPEA

PROTOCOLO ESTANDARIZADO DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA PARA EL ESTUDIO DE LOS AMOCETES DE LAMPREA



ESTACIÓN DE HIDROBIOLOGÍA
“ENCORO DO CON”

PROTOCOLO ESTANDARIZADO DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA PARA EL ESTUDIO DE LOS AMMOCETES DE LAMPREA

-GRUPO DE TAREAS 3 -ACCIÓN 1-

Estación de Hidrobiología “Encoro do Con”, Universidad de Santiago de Compostela.
Castroagudín s/n, 36617 Vilagarcía de Arousa, Pontevedra
Spain.

Tabla de contenido

1. Documentación	5
2. Recolección del material en el campo	6
2.1. Lista de comprobación de material.....	6
2.2. Trabajo de campo	7
2.2.1. Trabajo previo al muestreo	7
2.2.2. Pesca eléctrica.....	8
3. Procesado del material en el campo	10
3.1. Listado de comprobación del material	10
3.2. Trabajo de campo	10
4. Medidas de seguridad	15
5. Tratamiento de los datos	16
6. Bibliografía	17

1.Documentación

El método de captura de los peces, por medio de la pesca eléctrica, se considera una metodología estandarizada, ampliamente empleada y no perjudicial para los peces si se lleva a cabo correctamente. El procedimiento está basado en las directrices técnicas contenidas en la norma CEN-EN 14011:2003 (*Calidad del agua – Muestreo de peces con electricidad*).



Figura 1. Muestreo de ammocetes mediante un aparato de pesca eléctrica de mochila.

2. Recolección del material en el campo

2.1. Lista de comprobación de material

- Vadeadores y botas.
- Guantes de plástico, látex u otro material que no conduzca la corriente eléctrica.
- Gafas de sol polarizadas.
- Equipo para la pesca eléctrica (generador, transformador, ánodo y cátodo).
- Sacaderas y salabres para capturar los peces.
- Capachos o cubos de plástico (10-20 l) para trasladar los peces desde el lugar de muestreo a la orilla, en donde se realizará el procesado de las muestras.
- Cubetas o contenedores para albergar a los peces en la orilla mientras son procesados. Las cubetas serán lo suficientemente grandes para garantizar el buen estado de los peces capturados, por regla general se emplearán cubetas de capacidad entre 40 y 50 l.
- En el caso de tener intención de llevarse al laboratorio una muestra de peces, se llevarán recipientes y agentes conservadores para el traslado de la muestra.
- Sonda multiparamétrica.
- Cinta métrica.
- Cámara fotográfica.
- Aparato de localización geográfica (GPS).
- Equipo de primeros auxilios.
- Caja de herramientas.
- Aceite para el generador del aparato de pesca eléctrica.
- Recipiente homologado para el transporte de gasolina.



- Extintor.
- Teléfono móvil.

Todo el material usado en el campo deberá estar limpio y convenientemente desinfectado para evitar el transporte y la dispersión de propágulos, parásitos, agentes patógenos o individuos de especies invasoras.

2.2. Trabajo de campo

2.2.1. Trabajo previo al muestreo

En un primer lugar se requiere la identificación del lugar de muestreo, en el caso que nos ocupa, muestreo de ammocetes de lamprea, estos estarán en bancos de arena. Así, la identificación y selección de los hábitats larvarios óptimos y sub-óptimos debe realizarse según lo descrito por HARVEY & COWX (2003). El sustrato óptimo tiene que ser estable, de sedimento fino o arena, situado a más de 15 cm de profundidad, con poca velocidad de corriente sobre este y con presencia de detritos orgánicos; mientras que en el subóptimo, el sedimento está a menos de 15 cm de profundidad, mezclado con sustrato grueso, como el sedimento atrapado por las raíces de un árbol, detritos sobre un lecho pedregoso, lodo o arena (HARVEY & COWX, 2003).

Por regla general los bancos de arena óptimos para la captura de ammocetes se localizan en la orilla, por lo que se recomienda el empleo de un equipo de pesca eléctrica de mochila. Es conveniente llevar de repuesto otro equipo o por lo menos un cátodo y un ánodo.

Una vez establecida la estación de muestreo se toman las coordenadas geográficas con un GPS y se fotografía la zona de estudio. Mientras tanto, otro compañero se encargará de colocar la sonda multiparamétrica para medir los parámetros fisicoquímicos básicos de campo (T^a , pH, oxígeno, conductividad y sólidos en suspensión). Es especialmente importante prestar atención al valor de conductividad, ya



que según este valor se deberá graduar la intensidad del convertidor de corriente del aparato de pesca eléctrica. Como norma general, la intensidad de la corriente necesaria para la pesca eléctrica disminuye a medida que aumenta la conductividad.

Antes de comenzar la pesca, las cubetas y todo el material necesario para el posterior procesado del material (véase epígrafe 3.1) se colocará en la orilla en un sitio llano y protegido del sol.

Se comprueba los niveles de aceite y gasolina del generador y se monta el equipo de pesca eléctrica, es decir, se ancla al equipo el ánodo y el cátodo. A continuación se enciende el equipo y se ajusta la intensidad a la que se va a pescar en función de la conductividad. Finalmente, se comprueba que el aparato de pesca eléctrica funcione correctamente en un lugar diferente del lugar elegido para el muestreo.

2.2.2. Pesca eléctrica

Lo recomendable es que el equipo humano este constituido por cuatro personas. La persona más experta es el encargado de dirigir la pesca eléctrica, pues será el que cargue con el equipo. Otras dos personas, generalmente una a cada lado del aparato de pesca eléctrica, son los encargados de capturar los ammocetes con la ayuda de las sacaderas, y finalmente la última persona es la encargada de llevar el capacho y transportar los ejemplares hasta la cubeta, con más capacidad y ubicada en la orilla, a la espera de que se tomen las medidas biométricas de los ejemplares.

La persona encargada de llevar los ammocetes a las cubetas de la orilla, además, tiene la responsabilidad de controlar que la densidad de peces en las cubetas no sea excesiva y que los peces se encuentren en buenas condiciones, teniendo como cometido: renovar el agua, mantener el contenedor a la sombra, oxigenar el agua, etc.

Para la pesca, el ánodo se coloca a unos 10 cm sobre el sustrato y se procede a prospectar toda la superficie pulsando intermitentemente el interruptor del ánodo, provocando la emergencia de las larvas y permitiendo su recogida con sacaderas. Los ammocetes así capturados se introducen en el capacho que lleva nuestro compañero y

que deberá ir vaciando periódicamente en la cubeta de la orilla. Para estandarizar el esfuerzo de pesca, la duración del muestreo es de 40 minutos de muestreo efectivo (figura 2). Es conveniente moverse suavemente para evitar el enturbiamiento de la zona de muestreo, pues dificulta la captura de ammocetes. Una vez terminado el muestreo, se contabiliza el área total muestreada con una cinta métrica con el fin de expresar los resultados por unidad de superficie.



Figura 2. Muestreo de ammocetes mediante pesca eléctrica.

3. Procesado del material en el campo

3.1. Listado de comprobación del material

- Básculas e ictiómetros para pesar y medir los ammocetes.
- Bandejas blancas para depositar los ejemplares que se vayan a fotografiar.
- Se recomienda el empleo de un aireador cuando los peces van a permanecer mucho tiempo en las cubetas o si la densidad de peces en los contenedores es alta.
- Hojas de campo o estadillos para el registro de datos de la estación y de los ammocetes capturados (véase anexo I).
- Lápices y gomas para cubrir el estadillo.
- En el caso de que fuera necesario llevarse una muestra de ejemplares para analizar en el laboratorio, caben dos posibilidades. Primera: en el caso de transportar los peces vivos, se emplearán botes herméticos bajo refrigeración en nevera portátil. Segunda: si por el contrario los peces se sacrifican en el campo, sería preciso también llevar: botes, alcohol, etiquetas y bolígrafos o rotuladores permanentes.
- Anestésico (benzocaína, MS-222 o eugenol, etc.).

3.2. Trabajo de campo

Una vez finalizada la pesca eléctrica, se procede a anestesiar los ejemplares. En nuestro caso empleamos benzocaína a una concentración de 6 ml de benzocaína cada 10 l de agua para facilitar su manipulación. También se pueden emplear otros anestésicos como el MS-222 o eugenol. Es importante someter a los ammocetes a una correcta concentración y tiempo de exposición del anestésico empleado con el fin de evitar inesperadas bajas.

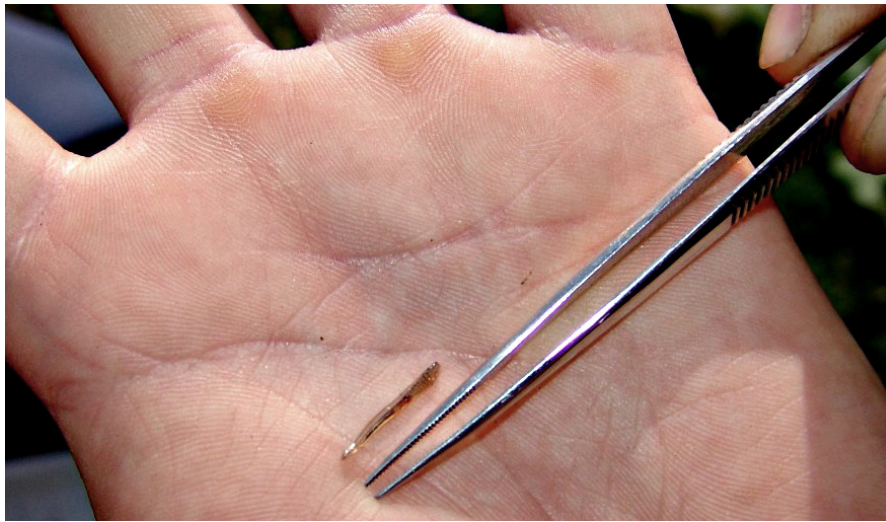


Figura 3. Ammocete de lamprea marina.

A continuación se procede a medir y pesar todos los ejemplares, anotando los datos biométricos en el estadillo (véase anexo I). Para medir la longitud total (desde el extremo anterior hasta el posterior) se recomienda el empleo de un ictiómetro cilíndrico como el que se muestra en la figura 4, lo que reduce notablemente el tiempo de manipulación. Simultáneamente al procesado de los ejemplares (figura 5), se recomienda realizar un reportaje fotográfico representativo de los ejemplares capturados (figura 6).

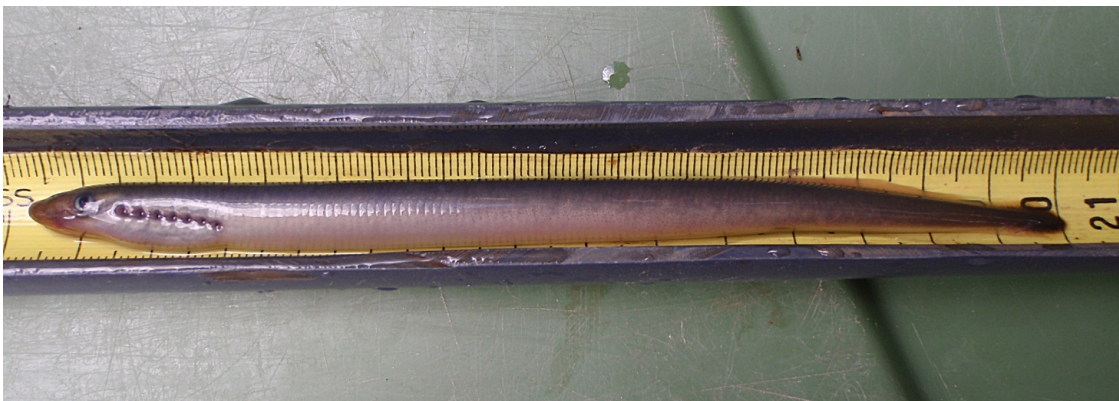


Figura 4. Ictiómetro cilíndrico empleado para medir los ejemplares.



Figura 5. Medición y pesaje de ammocetes.



Figura 6. Diferentes estadios de desarrollo de los ammocetes.

Los ammocetes que acaban de ser medidos y pesados se introducen en otra cubeta o capacho con agua fresca y bien oxigenada para que se recuperen de la anestesia. Una vez que los peces se encuentran perfectamente recuperados, se devuelven al río en el mismo lugar donde fueron capturados, comprobando que se entierran con normalidad (figura 7). En el caso de que algún ejemplar muriera, se procederá a su recuento para realizar una estima de la mortandad debida al muestreo.



Figura 7. Devolución de ammocetes.

Anexo I: ficha de campo para el muestreo de larvas de lamprea (ammocetes)

MUESTREO AMMOCETES DE LAMPREA (Hoja de Campo)

Rio:	Estación/Lugar:	Fecha: / /
Superficie muestreada: m ²	Código Etiqueta:	

Parámetros físico-químicos

pH:	O₂: %	O₂: mg/l	Conductividad: μS/cm	TDS: mg/l	T^a: °C	Turbidez: UN
------------	-------------------------	----------------------------	-----------------------------	------------------	--------------------------	---------------------

Nº	L (cm)	P (g)	Notas	Nº	L (cm)	P (g)	Notas	Nº	L (cm)	P (g)	Notas
1				31				61			
2				32				62			
3				33				63			
4				34				64			
5				35				65			
6				36				66			
7				37				67			
8				38				68			
9				39				69			
10				40				70			
11				41				71			
12				42				72			
13				43				73			
14				44				74			
15				45				75			
16				46				76			
17				47				77			
18				48				78			
19				49				79			
20				50				80			
21				51				81			
22				52				82			
23				53				83			
24				54				84			
25				55				85			
26				56				86			
27				57				87			
28				58				88			
29				59				89			
30				60				90			

4. Medidas de seguridad

Es conveniente tener unas nociones básicas de seguridad para el empleo de la pesca eléctrica como herramienta de trabajo:

- El nivel del agua no debe nunca alcanzar al aparato de pesca eléctrica, por ello se desaconseja su empleo con caudales elevados o de difícil vadeo. En estos casos deberá emplearse un equipo de pesca eléctrica fijo o de orilla.
- No se debe practicar la pesca eléctrica cuando llueve.
- La pesca siempre se realizará como mínimo por cuatro personas.
- Se debe revisar antes de empezar a trabajar el estado del material, para comprobar que no tiene desperfectos (cables pelados, interruptores rotos, etc.).
- Al finalizar el muestreo se desconecta el aparato de pesca eléctrica y se separan las partes del mismo (generador, transformador, ánodo y cátodo) para su transporte y posterior almacenamiento.
- Se tendrá disponible un extintor en la orilla.
- El generador se pondrá en marcha después de que el personal haya sido avisado de que va a comenzar el muestreo.
- El personal que efectúa el muestreo estará provisto de guantes aislantes.
- Todos los recipientes y contenedores usados para depositar los peces serán de plástico.
- Se dispondrá de un equipo de primeros auxilios y un teléfono móvil para pedir ayuda médica en caso necesario.
- Como medida de seguridad se pueden utilizar pértigas con pulsadores de seguridad que interrumpen el campo eléctrico cuando deja de accionarse el pulsador.

5. Tratamiento de los datos

Una vez obtenidos los datos biométricos de los amocetes en el campo se procede a su tratamiento en el laboratorio con el fin de obtener diversos parámetros básicos de las poblaciones como:

- Densidad y biomasa.
- Índice de condición o de Fulton (K).
- Relación longitud-peso.
- Método de Petersen.



6. Bibliografía

- APPELBERG, M. (2000). *Swedish standard methods for sampling freshwater fish with multi-mesh gillnets*. Fiskeriverket Information 2000:1. Göteborg.
- CEN EN 14011. *Water quality- Sampling of fish with electricity*. March 2003.
- ANÓNIMO, (2005). *Metodología para el establecimiento del Estado Ecológico según la Directiva Marco del Agua. Protocolos de muestreo y análisis para fitoplancton, fitobentos (microalgas bentónicas), macrofitos, invertebrados bentónicos e ictiofauna*. Ministerio de Medio Ambiente – Confederación Hidrográfica del Ebro – URS, Zaragoza, 235 pp.
- ELOSEGI, A. & SABATER, S. (eds) (2009). *Conceptos y técnicas en ecología fluvial*. Fundación BBVA. Bilbao.
- FAME, (2001). *Development, Evaluation & Implementation of a Standardized Fish-based Assessment Method for the Ecological Status of European Rivers. A contribution to the Water Framework Directive. WP 10. Comparison of the European Fish Index with the Standardised European Model, The Spatially Based Models (eco-regional and European) and Existing Methods (D16-17)*. Final Report. Quataert P., Breine J. & I. Simoens coordinators.
- FAME, (2002). *Development, Evaluation & Implementation of a Standardized Fish-based Assessment Method for the Ecological Status of European Rivers. A contribution to the Water Framework Directive. Defining Reference Conditions (D3)*. Final Report. Economu, A.N. (Coordinator). <http://fame.boku.ac.at>
- FAME, (2004). *Development, Evaluation & Implementation of a Standardized Fish-based Assessment Method for the Ecological Status of European Rivers. A contribution to the Water Framework Directive (FAME)*. Final Report Scientific achievements Sections 5 & 6. Schmutz, S. (Coordinator). <http://fame.boku.ac.at>
- GAYANILO, F. C. Jr. & PAULY, D. (1997). *FAO-ICLARM Fish Stock Assessment (FISAT) Reference Manual*. FAO Computerized Information Series (Fisheries) 8. Vol. 2. FAO of the United Nations, Rome, Italy. 265p.



- HARVEY, J. & COWX, I. (2003). Monitoring the river, brook, and sea lamprey, *Lampetra fluviatilis*, *L. planeri*, and *Petromyzon marinus*. In: *Conserving Natura 2000 Rivers. Conservation Techniques Series No. 5 English Nature, Peterborough.*
- LOBÓN-CERVIÁ, J. (1991). *Dinámica de poblaciones de peces en ríos: Pesca eléctrica y métodos de capturas sucesivas en la estima de abundancias*. Museo Nacional de Ciencias Naturales. Madrid.
- MINISTRY OF ENVIRONMENT OF BRITISH COLUMBIA (1997). *Fish Collection Methods and Standards version 4.0*. Vancouver.
- PARDO, L. (1952). La pesca con electricidad. *Montes*, **139**.
- PAULY, D. (1983). *Some simple methods for the assessment of tropical fish stocks*. FAO Fish Tech. Pap., No. 234, 52 pp.
- PETERSEN, C. G. J. (1982). Fiskenes biologiske forhold I Holbaek Fjord, 1890–91. *Beret. Danm Biol. St.* **1**: 121–183.
- STANDART METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (1998). APHA, 20^a edición.
- VIBERT, R. (1967). *Fishing with electricity, its application to biology and management*. FAO. Fishing News (Books) Ltd., London. 276 pp.

ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA Y DEL TRATAMIENTO DE LOS DATOS (GT. 3)

PROYECTO MIGRANET- “OBSERVATORIO DE LAS POBLACIONES DE PECES MIGRADORES
EN EL ESPACIO SUDOE”

PROGRAMA DE COOPERACIÓN TERRITORIAL INTERREG IV B SUDOE (2ª CONVOCATORIA)
FONDO EUROPEO PARA EL DESARROLLO REGIONAL (FEDER) DE LA UNIÓN EUROPEA

PROTOCOLO ESTANDARIZADO DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA PARA EL ESTUDIO DE LOS MACROINVERTEBRADOS



ESTACIÓN DE HIDROBIOLOGÍA
“ENCORO DO CON”

PROTOCOLO ESTANDARIZADO DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA PARA EL ESTUDIO DE LOS MACROINVERTEBRADOS

-GRUPO DE TAREAS 3 -ACCIÓN 1-

Estación de Hidrobiología “Encoro do Con”, Universidad de Santiago de Compostela.
Castroagudín s/n, 36617 Vilagarcía de Arousa, Pontevedra
Spain.

Tabla de contenido

1. Normativa	5
2. Recolección material en el campo	7
2.1. <i>Material necesario</i>	7
2.2. <i>Trabajo de campo</i>	8
3. Procesado de muestras en el laboratorio	11
3.1. <i>Material necesario</i>	11
3.2. <i>Trabajo de laboratorio</i>	12
4. Estudio de los macroinvertebrados	14
4.1. <i>Material necesario</i>	14
4.2. <i>Trabajo de identificación</i>	14
5. Tratamiento de los datos	16
5.1. <i>Composición de la comunidad de invertebrados</i>	16
5.2. <i>Abundancia de la comunidad de invertebrados</i>	16
5.3. <i>IBMWP y ASPT</i>	17
5.4. <i>Índices de diversidad</i>	20
5.5. <i>Índice multimétrico específico</i>	22
5.6. <i>Grupos funcionales o estructura trófica</i>	22
6. Bibliografía	24

1. Normativa

La normativa relacionada con este protocolo 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 ARM/2656/2008 por la que se aprueba la Instrucción de Planificación Hidrológica.

El método de muestreo que se describe posibilita obtener representación de todos los taxones relativamente abundantes, estimar su densidad y calcular los índices de diversidad para cada localidad muestreada. Así, este protocolo ha sido elaborado teniendo en cuenta las siguientes normas:

- UNE-EN 28265 (1994). Concepción y utilización de los muestreadores bentónicos sobre sustratos duros en aguas dulces poco profundas.
- UNE-EN 27828 (1994): Guía para el muestreo manual con red de macroinvertebrados bénticos.
- UNE-EN 8689-1 (2000): Guía para la interpretación de los datos relativos a la calidad biológica a partir de estudios de macroinvertebrados bénticos (Parte 1).
- UNE-EN 8689-1 (2000): Guía para la presentación de los datos relativos a la calidad biológica a partir de estudios de macroinvertebrados bénticos (Parte 2).
- UNE-EN 5667-1 (2007): Guía para el diseño de programas de muestreo y técnicas de muestreo (Parte 1).



- UNE-EN 14996 (2007): Guía para el aseguramiento de la calidad de las evaluaciones biológicas y ecológicas en el medio ambiente acuático.
- CEN/TC 230 N620-NWIP (2009): Working Document: prEN Multihabitat. Water Quality –Guidance on pro-rata Multi-Habitat sampling of benthic macro-invertebrates from wadeable rivers.

2. Recolección material en el campo

2.1. *Material necesario*

- Red Surber o red de mano de 250-500 μm de malla. Normalmente se utilizan redes Surber de 30×30 cm, aunque el tamaño de la red Surber puede variar en función del sustrato predominante en el río. También se pueden utilizar otras redes de muestreo como las redes de patada o “kick net”, aunque se recomienda el empleo de la primera.
- Formaldehído (4%) y alcohol etílico de 70°.
- 2 bandejas de PVC.
- Pinzas entomológicas.
- Botes estancos de 1-2 l y boca ancha para el almacenado de las muestras de macroinvertebrados.
- Frasco lavador.
- Sonda multiparamétrica con sensores de temperatura, conductividad, pH y oxígeno disuelto.
- Protocolo de muestreo.
- Hojas de campo o estadillos.
- Lápiz y bolígrafo o rotulador permanente o cualquier otro método para etiquetar las muestras. Si se usan etiquetas deben ser resistentes a la humedad.
- GPS y cartografía adecuada.
- Cámara digital.
- Tijeras.
- Cinta adhesiva y papel de etiquetas para rotular las muestras.
- Recipientes adecuados para el transporte de los botes de muestras y el fijador.



- Botas y vadeadores.

Todo el material usado en campo deberá estar convenientemente limpio y desinfectado para evitar el transporte y la dispersión de propágulos, parásitos, agentes patógenos o individuos de especies invasoras.

2.2. Trabajo de campo

En función de la naturaleza de los datos (cualitativos o cuantitativos) han sido utilizadas diversas técnicas. En este caso lo que se pretende es realizar un muestreo cuantitativo, por lo que debe emplearse una red Surber. Se recomienda la utilización de una red Surber con una luz de malla de 0'5 mm y 0'09 m² de superficie de muestreo.

Una vez establecida la estación de muestreo se toman las coordenadas geográficas con un GPS y se fotografía la zona de estudio. También es recomendable la toma de los parámetros fisicoquímicos básicos de campo (T^a, pH, oxígeno, conductividad y sólidos en suspensión).

La toma de muestras debe adecuarse al tipo de sustrato ya que los macroinvertebrados tienen una distribución contagiosa, por ello se realizarán tres replicas, cada una de ellas en un tipo de sustrato diferente: 1) rocas, cantos rodados o guijarros, 2) sustrato blando, generalmente arena y 3) macrófitos. En cada sustrato se recomienda recoger una muestra, que equivalen a un área de 0'27 m².

La red Surber se coloca contracorriente y se fija bien al lecho del río, una vez fijada, con ayuda de las manos se limpia meticulosamente cada piedra que queda dentro del área de muestreo, y después se remueve todo el sustrato restante comprendido en el área determinada por el Surber (figura 1), pues la corriente arrastrará los macroinvertebrados resuspendidos hacia el interior de la red.



Figura 1. Muestreo de macroinvertebrados empleando una red de Surber.

En el caso de recoger una gran cantidad de restos vegetales, y si se considera oportuno, las muestras así recogidas se vierten sobre unas bandejas de las que se procede a extraer los ejemplares de mayor tamaño, al tiempo que se elimina la fracción inerte más grosera. La fracción más fina se introduce en botes de plástico con cierre hermético y boca ancha junto con los ejemplares de mayor tamaño separados en las bandejas, y se fija con formaldehído al 4% (figura 2).

A continuación, los botes se marcan con dos etiquetas, una de papel escrita a lápiz que se introduce en el interior del bote y otra en el exterior, sobre el bote y nunca en la tapa, 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.



Figura 2. Introducción de la muestra recogida con la red de Surber en un bote de plástico.

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.

Complementariamente al muestreo cuantitativo (red Surber) se recomienda realizar muestreos cualitativos en todas las estaciones. De esta forma, con ayuda de unas pinzas entomológicas y de forma manual se recoge una muestra de la biota presente en el río, con el fin de complementar el listado faunístico. También, es aconsejable la captura de estadios adultos que viven sobre la vegetación de la ribera con una red entomológica. Estos ejemplares tienen un gran interés, pues permiten en algunos casos, identificar por correlación, los estados presentes en el bentos y nos permitirán completar el listado faunístico de la estación.

3. Procesado de muestras en el laboratorio

3.1. *Material necesario*

- Columna de tamices de diferente luz de malla: 1 mm y 0'5 mm.
- Bandejas.
- Pinzas.
- Placas de Petri.
- Material óptico: al menos una lupa (5x) y un microscopio (40x).
- Botes para el almacenamiento de las muestras una vez han sido procesadas.
- Etanol de 70°.
- Eppendorf y botes pequeños para almacenar los ejemplares.
- Hojas de laboratorio.
- Gradilla.
- Rotuladores indelebles y lapiceros.
- Cinta adhesiva y papel para etiquetas.
- Tijeras.

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

3.2. Trabajo de laboratorio

1. Consideraciones previas: aunque las muestras recogidas están conservadas con formaldehído al 4%, es recomendable que el tiempo entre la toma y el análisis de las muestras no sea excesivo. Como norma general el período entre la toma y el análisis de la muestra no superará nunca un año.

2. Tamizado: las muestras recogidas en el campo se vierten, bajo el grifo, sobre una columna de tamices con diferente luz de malla: 1 mm y 0'5 mm, obteniéndose así dos fracciones, gruesa y fina, respectivamente. Este procedimiento facilita tanto la localización de ejemplares como su identificación y recuento.

3. Separación: se procede a separar los animales, primero a simple vista y después mediante lupa binocular utilizando los aumentos necesarios. Las muestras deben separarse en placas de Petri, atendiendo a la similitud morfológica o por categorías sistemáticas (figura 3), y así facilitar la futura identificación de los ejemplares.



Figura 3. Separación de macroinvertebrados en placas de Petri.



4. Conservación: finalmente, los individuos separados por categoría sistemática o similitud morfológica se guardan por separado en eppendorf o botes pequeños con alcohol etílico de 70°. Cada uno de estos eppendorf o botes pequeños se introduce en otro bote de mayor capacidad y con etanol de 70° con su correspondiente etiqueta, para su posterior identificación.

4. Estudio de los macroinvertebrados

4.1. Material necesario

- Pinzas.
- Placas de Petri.
- Eppendorf y botes para el almacenamiento de las muestras una vez han sido identificadas.
- Etanol de 70°.
- Hojas de laboratorio.
- Rotuladores indelebles y lapiceros.
- Cinta adhesiva y papel para etiquetas.
- Tijeras.
- Microscopio binocular estereoscópico (lupa).
- Claves de identificación, se recomienda el empleo de la siguiente bibliografía: SANSONI (1988), TACHET *et al.* (2000) y OSCOZ *et al.* (2011a,b). Así como de otros libros de consulta centrados en los macroinvertebrados (GONZÁLEZ & COBO, 2006; MERRITT *et al.*, 2008; OSCOZ, 2009; RUEDA & HERNÁNDEZ, 2009)
- Parafilm©

4.2. Trabajo de identificación

El nivel de identificación que se requiere para este estudio es el de familia, excepto para Hydrachnidia y Oligochaeta, que se dejan a nivel de clase. Los ejemplares que con anterioridad se almacenaron en eppendorf o botes pequeños con alcohol etílico de 70° por similitud morfológica o categoría sistemática, ahora se identifican hasta el

nivel de familia, excepto los grupos mencionados con anterioridad, con ayuda de las claves de identificación (figura 4).



Figura 4. Identificación de los ejemplares bajo la lupa binocular en el laboratorio.

Una vez identificados todos los ejemplares y separados taxonomicamente, se procede a su recuento para poder conocer la abundancia relativa de cada taxón en la comunidad. Así, los ejemplares una vez identificados y contados, se vuelven a fijar en etanol de 70° y se almacenan en recipientes destinados a este fin, generalmente eppendorf o botes de plástico de pequeño tamaño. Los diferentes eppendorf deben almacenarse en un mismo recipiente hermético y con etanol de 70° y etiquetarse debidamente. Si estos recipientes tienen tapa de rosca se recomienda sellar el recipiente con Parafilm© para evitar, en la medida de lo posible, la evaporación del alcohol.

5. Tratamiento de los datos

El objetivo del procedimiento explicado para la obtención de datos de invertebrados bentónicos es el de obtener información sobre varios parámetros ecológicos: la composición de la comunidad, abundancia relativa de los taxones que conforman la comunidad, índice IBMWP y ASPT, índices de diversidad y grupos funcionales.

5.1. Composición de la comunidad de invertebrados

La composición de la comunidad de invertebrados consiste en un inventario taxonómico de los taxones identificados. Además este listado sirve para analizar la posible incidencia de especies exóticas o invasoras en la comunidad.

5.2. Abundancia de la comunidad de invertebrados

La abundancia de cada taxón se puede expresar como el número de ejemplares de cada categoría. Pero también los resultados se pueden ofrecer como densidad poblacional, expresada en ejemplares/m² y como abundancia relativa de cada taxón (P_i), es decir, el número de individuos de cada taxón se relaciona con el total de macroinvertebrados identificados y se expresa como porcentaje con respecto al total de individuos de todas las categorías.

$$P_i = (\sum S_i / \sum S_i) * 100$$

S_i = N° de macroinvertebrados del taxón 'i' en la muestra.

S_i = N° de macroinvertebrados totales en la muestra.



5.3. IBMWP y ASPT

Los índices bióticos están basados en la ordenación y ponderación de las especies de macroinvertebrados en función de su presencia o abundancia en las aguas siguiendo su grado de tolerancia frente a la contaminación. Cada índice requiere un determinado nivel de identificación, aunque el específico no sea generalmente utilizado, tanto por los problemas derivados de la propia identificación, como por dificultar la cuantificación de los resultados. La ponderación de los taxones, a la hora de interpretar los resultados obtenidos mediante la aplicación de los índices bióticos, se efectúa tomando como base su mayor o menor tolerancia frente a la contaminación orgánica, de manera que los valores altos de éstos índices son indicadores de un buen estado general de los cursos de agua.

El índice IBMWP se trata de una versión modificada del índice llamado BMWP' (Biological Monitoring Working Party) por ALBA-TERCEDOR & SÁNCHEZ-ORTEGA (1988). El BMWP' fue desarrollado entre 1976 y 1978 por el "Department of the Environment" inglés para los ríos de Gran Bretaña.

El índice IBMWP, se fundamenta en el estudio global de la macrofauna béntica que es recolectada mediante un proceso normalizado, limitándose las identificaciones al reconocimiento de las unidades sistemáticas predefinidas (nivel de familia excepto Hydrachnidia y Oligochaeta) y asignándoles a las mismas la puntuación correspondiente a su grado de tolerancia a la contaminación (véase anexo I). Así, el procedimiento para el cálculo del índice IBMWP requiere la identificación previa en campo (visu) y el procesado en laboratorio de las diferentes familias recogidas en el campo, según lo descrito en este protocolo. Una vez procesada y analizada la muestra, el valor del índice se obtiene por la suma de las puntuaciones de cada unidad sistemática que habita en la estación objeto de estudio, para obtener el valor final del IBMWP.

Siguiendo las normas de la Directiva Marco del agua 2000/60/CE y con la puntuación del IBMWP, se procederá a determinar el estado ecológico de la masa de agua. Para esta clasificación se deberán tener en cuenta los límites de estado ecológico

establecidas legalmente para el indicador IBMWP en el tipo de masa de agua que corresponda (Tabla 1).

Puntuación Galicia*	Puntuación P.Ibérica**	Estado ecológico	Significado
<80	<15	Malo	<i>Aguas fuertemente contaminadas</i>
81-120	16-35	Deficiente	<i>Aguas muy contaminadas</i>
121-160	36-60	Moderado	<i>Aguas contaminadas</i>
161-200	61-100	Bueno	<i>Son evidentes algunos efectos de contaminación</i>
>200	≥101	Muy bueno	<i>Aguas no contaminadas o no alteradas de modo sensible.</i>

Tabla 1. Clases de calidad en función de los valores del IBMWP.*Para Galicia, según COBO & GONZÁLEZ (2005).**Para la península Ibérica, según ALBA-TERCEDOR & SÁNCHEZ-ORTEGA (1988) y JÁIMEZ-CUÉLLAR *et al.* (2002).

El índice ASPT es el cociente entre el valor IBMWP y la riqueza específica (*S*) o número de familias presentes en la muestra. Este índice nos informa de la sensibilidad media de los taxones a la contaminación y su significado explica la relación entre taxones sensibles/taxones resistentes.

Anexo I: Hoja de laboratorio para Macroinvertebrados

MACROINVERTEBRADOS											
Rio:		Estación/Lugar:				Fecha: / /					
pH:	O ₂ :	% O ₂ :	mg/l O ₂ :	Conductividad:	µS/cm	TDS:	mg/l	T ^a :	°C	Turbidez:	UN
ARÁCNIDOS	Valor	Nº	EFEMERÓPTEROS	Valor	Nº	ODONATOS	Valor	Nº			
Hydracarina	4		<i>Siphonuridae</i>	10		<i>Lestidae</i>	8				
			<i>Heptageniidae</i>	10		<i>Calopterygidae</i>	8				
COLEÓPTEROS			<i>Leptophlebiidae</i>	10		<i>Gomphidae</i>	8				
<i>Dryopidae</i>	5		<i>Potamanthidae</i>	10		<i>Cordulegasteridae</i>	8				
<i>Elmidae</i>	5		<i>Ephemeridae</i>	10		<i>Aeshnidae</i>	8				
<i>Helophoridae</i>	5		<i>Ephemerellidae</i>	7		<i>Corduliidae</i>	8				
<i>Hydrochidae</i>	5		<i>Prosopistomatidae</i>	7		<i>Libellulidae</i>	8				
<i>Hydraenidae</i>	5		<i>Oligoneuridae</i>	5		<i>Platycnemididae</i>	6				
<i>Clambidae</i>	5		<i>Polymitarcidae</i>	5		<i>Coenagrionidae</i>	6				
<i>Haliplidae</i>	4		<i>Baetidae</i>	4							
<i>Curculionidae</i>	4		<i>Caenidae</i>	4		OLIGOQUETOS					
<i>Chrysomelidae</i>	4					Todos	1				
<i>Helodidae</i>	3		HETERÓPTEROS								
<i>Hydrophilidae</i>	3		<i>Aphelocheiridae</i>	10		PLECÓPTEROS					
<i>Hygrobiidae</i>	3		<i>Veliidae</i>	3		<i>Taeniopterygidae</i>	10				
<i>Dytiscidae</i>	3		<i>Mesoveliidae</i>	3		<i>Leuctridae</i>	10				
<i>Gyrinidae</i>	3		<i>Hydrometridae</i>	3		<i>Capniidae</i>	10				
			<i>Gerridae</i>	3		<i>Perlodidae</i>	10				
CRUSTÁCEOS			<i>Nepidae</i>	3		<i>Perlidae</i>	10				
<i>Astacidae</i>	8		<i>Naucoridae</i>	3		<i>Chloroperlidae</i>	10				
<i>Corophiidae</i>	6		<i>Pleidae</i>	3		<i>Nemouridae</i>	7				
<i>Atyidae</i>	6		<i>Notonectidae</i>	3							
<i>Gammaridae</i>	6		<i>Corixidae</i>	3		TRICÓPTEROS					
<i>Asellidae</i>	3					<i>Phryganeidae</i>	10				
<i>Ostracoda</i>	3		HIRUDÍNEOS			<i>Molannidae</i>	10				
			<i>Piscicolidae</i>	4		<i>Beraeidae</i>	10				
DÍPTEROS			<i>Glossiphoniidae</i>	3		<i>Odontoceridae</i>	10				
<i>Athericidae</i>	10		<i>Hirudidae</i>	3		<i>Leptoceridae</i>	10				
<i>Blephariceridae</i>	10		<i>Erpobdellidae</i>	3		<i>Goeridae</i>	10				
<i>Tipulidae</i>	5					<i>Lepidostomatidae</i>	10				
<i>Simuliidae</i>	5		MEGALÓPTEROS			<i>Brachycentridae</i>	10				
<i>Tabanidae</i>	4		<i>Sialidae</i>	4		<i>Sericostomatidae</i>	10				
<i>Stratiomyidae</i>	4					<i>Psychomyiidae</i>	8				
<i>Empididae</i>	4		MOLUSCOS			<i>Philopotamidae</i>	8				
<i>Dolichopodidae</i>	4		<i>Neritidae</i>	6		<i>Glossosomatidae</i>	8				
<i>Dixidae</i>	4		<i>Viviparidae</i>	6		<i>Ecnomidae</i>	7				
<i>Ceratopogonidae</i>	4		<i>Ancylidae</i>	6		<i>Rhyacophilidae</i>	7				
<i>Anthomyiidae</i>	4		<i>Unionidae</i>	6		<i>Polycentropodidae</i>	7				
<i>Limoniidae</i>	4		<i>Thiaridae</i>	6		<i>Limnephilidae</i>	7				
<i>Psychodidae</i>	4		<i>Valvatidae</i>	3		<i>Helicopsychidae</i>	8				
<i>Sciomyzidae</i>	4		<i>Hydrobiidae</i>	3		<i>Hydroptilidae</i>	6				
<i>Rhagionidae</i>	4		<i>Lymnaeidae</i>	3		<i>Hydropsychidae</i>	5				
<i>Chironomidae</i>	2		<i>Physidae</i>	3							
<i>Culicidae</i>	2		<i>Planorbidae</i>	3		TURBELARIOS					
<i>Thaumaleidae</i>	2		<i>Bithyniidae</i>	3		<i>Planariidae</i>	5				
<i>Ephydriidae</i>	2		<i>Bythinellidae</i>	3		<i>Dugesidae</i>	5				
<i>Syrphidae</i>	1		<i>Sphaeriidae</i>	3		<i>Dendrocoelidae</i>	5				

5.4. Índices de diversidad

Para la descripción de las comunidades del macrobentos, se recomienda la aplicación de una amplia variedad de índices diferentes como medida de la estructura de la comunidad, entre los que se encuentran los índices de diversidad y uniformidad que aportan información imprescindible para la interpretación de los resultados. Así, es importante realizar estimas de la diversidad de especies que encontramos en las muestras, mediante índices de uso frecuente (e.g. índices de Shannon-Wiener, Simpson, Margalef). El uso de los índices de diversidad está relacionado con la idea de que un elevado valor indica una comunidad estable y equilibrada (MERRIT *et al.*, 2008).

- Índice de Shannon-Wiener

Diferentes índices de diversidad pueden resaltar el componente de riqueza taxonómica o el de equidad en diferentes grados. La medida de diversidad más usada normalmente es el índice de diversidad de Shannon-Wiener: $H' = -\sum p_i (\log p_i)$ donde p es la proporción del número total para la especie i . Esto incorpora tanto la componente de riqueza taxonómica como la de equidad.

Elaborado desde la teoría matemática de la información, su aplicación en ecología fue propuesta inicialmente por Margalef. Este índice se mide en bits/individuo y cuando la escala logarítmica utilizada es la base 2, el valor máximo que adquiere en comunidades bióticas que se encuentran en condiciones naturales (no sometidas a la acción antrópica), es de 5'2 bits/individuo. Sin embargo, en el contexto de los ecosistemas fluviales este índice adquiere un valor máximo de 4'5 bits/individuo para las comunidades de macroinvertebrados bentónicos.

- *Índice de Fisher*

El Índice de Fisher permite comparar de forma relativamente fiel la diversidad de especies entre estaciones que, con una misma área, difieren en términos de abundancia. El índice de FISHER (1943) establece de forma explícita que la diversidad depende del número de individuos muestreados. Así, desde el punto de vista matemático, este índice controla y elimina por el tamaño de la muestra el efecto positivo que tiene la abundancia sobre la diversidad, lo que permite determinar si una estación es realmente más "diversa" que otra. El índice viene definido de la siguiente forma: $S = \alpha \ln(1 + N/\alpha)$, donde S = número de especies, N = número de individuos y α = el índice mismo de diversidad.

- *Índice de equidad*

La equidad o uniformidad viene expresada normalmente como el índice de uniformidad de Pielou: $J' = H'_{(observado)} / H'_{max}$, donde H'_{max} es la diversidad máxima posible que se podría lograr si todas las especies fueran igualmente abundantes (es decir, $H'_{max} = \log S$).

- *Índice de dominancia*

La dominancia se puede calcular mediante el índice de Simpson: $\lambda = \sum p_i^2$, siendo p_i la proporción del número de individuos de la especie i con respecto a N . Es un índice estructural de dominancia, siendo posible calcular la diversidad como $1/\lambda$. Expresa la probabilidad compuesta de que dos individuos extraídos al azar de una comunidad pertenezcan a la misma especie. Este índice tiene un rango que va de 0 a 1.

5.5. Índice multimétrico específico

El índice multimétrico específico del tipo característico de la masa de agua está formado por una serie de métricas que barajan las proporciones relativas de taxones característicos de las aguas limpias y de aquellos más resistentes a la contaminación orgánica. Los parámetros que constituyen el índice son:

1. Índice de similitud de Bray-Curtis.
2. El número de familias totales o la riqueza taxonómica (S).
3. El número de familias de Plecópteros y Tricópteros.
4. El índice de Margalef. Calculado como: $R=(S_p-1)/\ln N$, donde N es el número total de individuos en la muestra y S_p es el número de *items*.
5. La frecuencia relativa de los seis taxones dominantes.
6. La diferencia entre la frecuencia relativa de los seis taxones dominantes con la unidad ($1- 6 \text{ Familias Dominantes}$).

Para los ríos Ulla y Umia, consideramos como valores de condiciones de referencia y límites de cambio de la clase de estado ecológico los que figuran en el anexo III de la Instrucción de Planificación Hidrológica para los ejes fluviales principales cántabro-atlánticos silíceos: condición de referencia: 6'182; límite muy bueno/bueno: 0'93; límite bueno/moderado: 0'7; límite moderado/deficiente: 0'5; y límite deficiente/malo: 0'25.

5.6. Grupos funcionales o estructura trófica

Es muy útil conocer algunas características biológicas como los hábitos alimentarios que presentan los diferentes taxones presentes en una comunidad de invertebrados bentónicos. La información obtenida a partir de este análisis, difiere de las



anteriores medidas en que miden aspectos de funcionamiento más que de estructura de la comunidad.

El estudio de la estructura trófica de las comunidades de macroinvertebrados tiene un interés especial para comprender el funcionamiento del ecosistema fluvial. Si asignamos a los organismos identificados en una muestra dentro de cada grupo trófico o grupo funcional (desmenuzadores, raspadores, colectores y predadores), siguiendo la clasificación general establecida por CUMMINS (1973) y completada por TACHET *et al.* (2000), podremos, para cada estación de muestreo, conocer el tipo básico de funcionamiento con relación a la importancia relativa entre los materiales exógenos y endógenos, y comprender las posibles alteraciones en la circulación normal de la energía producidas por los aportes externos.



6. Bibliografía

- ALBA-TERCEDOR, J. & SÁNCHEZ-ORTEGA, A. (1988). Un método rápido y simple para evaluar la calidad biológica de las aguas corrientes basado en el de Hallawell (1978). *Limnetica*, **4**: 51-56.
- ALBA-TERCEDOR, J., JAÍMEZ-CUÉLLAR, P., ÁLVAREZ, M., AVILÉS, J., BONADA, N., CASAS, J., MELLADO, A., ORTEGA, M., PARDO, I., PRAT, N., RIERADEVALL, M., ROBLES, S., SÁINZ-CANTERO, C. E., SÁNCHEZ-ORTEGA, A., SUÁREZ, M. L., TORO, M., VIDAL-ABARCA, M. R., VIVAS, S. & ZAMORA-MÚÑOZ, C. (2004). Caracterización del estado ecológico de ríos mediterráneos ibéricos mediante el índice IBMWP antes BMWP'. *Limnetica*, **21**: 175-185.
- ALLAN, J. D. (1995). *Stream Ecology. Structure and function of running waters*. Chapman & Hall, London, 388pp.
- ALONSO, A. & CAMARGO, J. A. (2005). Estado actual y perspectivas en el empleo de la comunidad de macroinvertebrados bentónicos como indicadora del estado ecológico de los ecosistemas fluviales españoles. *Ecosistemas*, **14**: 87-89.
- ANÓNIMO, (2005). Metodología para el establecimiento del Estado Ecológico según la Directiva Marco del Agua. Protocolos de muestreo y análisis para fitoplancton, fitobentos (microalgas bentónicas), macrofitos, invertebrados bentónicos e ictiofauna. Ministerio de Medio Ambiente – Confederación Hidrográfica del Ebro – URS, Zaragoza, 235 pp.
- ANÓNIMO, (2007). *Metodología para el establecimiento del estado ecológico según la Directiva Marco del Agua en la Confederación Hidrográfica del Ebro*. Ministerio de Medio Ambiente – Confederación Hidrográfica del Ebro
- AQEM CONSORTIUM, (2002). *Manual for the application of the AQEM system. A comprehensive method to assess European streams using benthic macroinvertebrates, developed for the purpose of the Water Framework Directive*. Version 1.0 (www.aqem.de).



- COBO, F. & GONZÁLEZ, M. A. (2005). *Biomonitorización por cambio de comunidades*. En: Hércules de Ediciones S.A. (Ed.), *Ecología (Proyecto Galicia)*. Vol XLVIII *Ciencia y Tecnología Ambientales II*: 376-392. A Coruña.
- CUMMINS, K. W. (1973). Trophic relations of aquatic insects. *Ann. Rev. Entomol.*, **18**: 183-206.
- EUROPEAN UNION, (2000). Directive 2000/60/EC of the Parliament and of the Council establishing a framework for the Community action in the field of water policy. *Official Journal of the European Communities*, **L372**:1-72.
- FISHER, R. A., CORBET, A. S. & WILLIAMS, C. B. (1943). The relation between the number of species and the number of individuals in a random sample of an animal population. *J. Anim. Ecol.*, **12**: 42-59.
- GONZÁLEZ DEL TÁNAGO, M. & GARCÍA DE JALÓN, D. (1984). Desarrollo de un índice biológico para estimar la calidad de las aguas de la Cuenca del Duero. *Limnetica*, **1**: 263-272.
- GONZÁLEZ, M. A. & COBO, F. (2006). *Macroinvertebrados de las aguas dulces de Galicia*. Hércules de Ediciones, A Coruña, 173 pp.
- HERING, D., BUFFAGNI, A., MOOG, O., SANDIN, L., SOMMERHÄUSER, M., STUBAUER, I., FELD, C., JOHNSON, R., PINTO, P., SKOULIKIDIS, N., VERDONSCHOT, P. & ZAHŘÁDKOVÁ, S. (2003). The Development of a System to Assess the Ecological Quality of Streams Based on Macroinvertebrates. Design of the Sampling Programme within the AQEM Project. *International Review of Hydrobiology*, **88(3-4)**: 345-361
- JÁIMEZ-CUÉLLAR, P., VIVAS, S., BONADA, N., ROBLES, S., MELLADO, A., ÁLVAREZ, M., AVILÉS, J., CASAS, J., ORTEGA, M., PARDO, I., PRAT, N., RIERADEVALL, M., SÁINZ-CANTERO, C., SÁNCHEZ-ORTEGA, A., SUÁREZ, M. L., TORO, M., VIDAL-ABARCA, M. R., ZAMORA-MÚÑOZ, C. & ALBA-TERCEDOR, J. (2002). Protocolo GUADALMED (PRECE). *Limnetica*, **21**: 187-204.
- MERRITT, R. W., CUMMINS, K. W. & BERG, M.B. (2008). *An introduction to the aquatic*



insects of North America. 4th edition. Kendall/Hunt Publishing Company, Dubuque Iowa.

MIRANDA, R., OSCOZ, J. & GALICIA, D. (2011). *Invertebrados bentónicos*. En: Taxagua v1.0. Tesoro taxonómico para la clasificación del estado ecológico de las masas de agua continentales. Dirección General del Agua. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.

Oscoz, J. (2009). *Guía de campo: Macroinvertebrados de la Cuenca del Ebro*. Confederación Hidrográfica del Ebro.

OSCOZ, J., GALICIA, D. & MIRANDA, R. (2011a). *Identification guide of freshwater macroinvertebrates of Spain*. Springer, 153 pp.

OSCOZ, J., GALICIA, D. & MIRANDA, R. (2011b). *Clave dicotómica para la identificación de macroinvertebrados de la cuenca del Ebro*. Confederación Hidrográfica del Ebro, 66 pp.

PARDO, I., ÁLVAREZ, M. & GARCÍA, E. (2007). *Asistencia científico-técnica para la aplicación de los anejos II y V de la Directiva Marco del Agua en la Demarcación Hidrográfica del Norte*. Informe Final. 357 pp

PARDO, I., GARCÍA, L., DELGADO, C., COSTAS, N. & ABRAÍN, R. (2010). *Protocolos de muestreo de comunidades biológicas acuáticas fluviales en el ámbito de las Confederaciones Hidrográficas del Miño-Sil y Cantábrico*. Convenio entre la Universidad de Vigo y las Confederaciones Hidrográficas del Miño-Sil y Cantábrico. 68pp. NIPO 783-10-001-8.

RODRÍGUEZ-CAPÍTULO, A., MUÑOZ, I., BONADA, N., GAUDÉS, A. & TOMANOVA, S. (2009). *La biota de los ríos: los invertebrados*. En: Conceptos y técnicas en ecología fluvial. Elosegi, A. & Sabater, S. (eds.): 253-270. Fundación BBVA. Bilbao.

RUEDA, J. & HERNÁNDEZ, R. (2009). *Atlas fotográfico de los invertebrados acuáticos de la Cuenca del río Júcar en la provincia de Albacete*. IEA, Diputación de Albacete. 323 pp.



SANSONI G. (1988). *Atlante per il riconoscimento dei macroinvertebrati bentonici dei corsi d'acqua italiani*. Provincia Autonoma di Trento, 191 pp.

TACHET, H., RICHOUX, P., BOURNAUD, M. & USSEGLIO-POLATERA P. (2000) *Invertébrés d'eau douce (2nd corrected impression)*. Paris: CNRS éditions 608 pp.

WRONA, F. J., CULP, J. M. & DAVIES, R. W. (1982). Macroinvertebrate subsampling: a simplified apparatus and approach. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **39**: 1051-1054.