

# Metodología para el establecimiento el Estado Ecológico según la Directiva MARCO del Agua

Protocolos de muestreo y análisis para

## Fitobentos (MICROALGAS BENTONICAS)



OCTUBRE 2005



MINISTERIO  
DE MEDIO AMBIENTE

CONFEDERACIÓN  
HIDROGRÁFICA  
DEL EBRO



# Metodología para el establecimiento el Estado Ecológico según la Directiva MARCO del Agua

## Protocolos de muestreo y análisis para



Este protocolo ha sido realizado por la **Confederación Hidrográfica del Ebro** con la asistencia técnica de **URS** y la colaboración de:

**Jaume Cambra.** Universidad de Barcelona

**Luc Ector.** Centre de Recherche Public Gabriel Lippmann

**Sergi Sabater.** Universidad de Girona



<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	5
<b>PARTE I: GENERALIDADES</b>	
<b>1. DEFINICIONES Y OBJETIVOS</b> .....	9
<b>2. VALOR INDICADOR DE LAS MICROALGAS BENTÓNICAS</b> .....	9
<b>3. MÉTRICAS BASADAS EN MICROALGAS BENTÓNICAS</b> .....	9
3.1. Índices de diatomeas .....	9
3.2. Métricas basadas en otros grupos de algas .....	10
3.3. Métricas basadas en la biomasa .....	10
<b>4. PROPUESTA DE MÉTRICAS PARA LA CUENCA DEL EBRO</b> .....	11
4.1. Ríos .....	11
4.2. Lagos .....	11
<b>5. DIRECTRICES PARA EL CONTROL DE VIGILANCIA Y CONTROL OPERATIVO EN LO REFERIDO AL INDICADOR</b> .....	12
5.1. Selección de los puntos de control .....	12
5.1.1. Control de vigilancia .....	12
5.1.2. Control operativo .....	12
5.2. Frecuencia de muestreo .....	12
<b>PARTE II: PROTOCOLOS</b>	
<b>6. PROCEDIMIENTO PARA EL MUESTREO DE DIATOMEAS BENTÓNICAS</b> .....	17
6.1. Introducción .....	17
6.2. Equipos y reactivos .....	17
6.2.1. Equipos de muestreo .....	17
6.2.2. Reactivos fijadores .....	17
6.3. Procedimiento de muestreo .....	17
6.3.1. Selección del punto de muestreo .....	17
6.3.2. Selección del sustrato .....	17
6.3.3. Directrices para la toma de la muestra .....	18
6.3.4. Conservación y etiquetaje de las muestras .....	20
<b>7. PRE-TRATAMIENTO DE MUESTRAS DE DIATOMEAS BENTÓNICAS</b> .....	21
7.1. Introducción .....	21
7.2. Material de laboratorio .....	21
7.2.1. Equipos .....	21
7.2.2. Reactivos .....	21
7.3. Tratamiento previo a la observación microscópica .....	21
7.3.1. Concentración de las muestras .....	21
7.3.2. Limpieza de las diatomeas .....	21
7.3.3. Elaboración de preparaciones permanentes .....	21

<b>8. IDENTIFICACIÓN Y RECUENTO DE DIATOMEAS</b>	
<b>BENTÓNICAS</b> .....	22
<b>8.1. Introducción</b> .....	22
<b>8.2. Material de laboratorio</b> .....	22
<b>8.3. Protocolo de identificación, recuento e interpretación</b>	
de diatomeas .....	22
8.3.1. Aspectos preliminares a la identificación .....	22
8.3.2. Procedimiento analítico .....	24
8.3.3. Registros de datos, preparaciones y muestras .....	25
<b>9. CONTROL DE LA CALIDAD EN EL MUESTREO, TRATAMIENTO</b>	
<b>E IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS</b> .....	25
<b>9.1. Introducción</b> .....	25
<b>9.2. Directrices para asegurar la calidad durante el muestreo</b> .....	26
<b>9.3. Directrices para asegurar la calidad en los trabajos</b>	
de laboratorio .....	27
<b>9.4. Directrices para asegurar la calidad en el tratamiento</b>	
de datos .....	27
<b>GLOSARIO Y BIBLIOGRAFÍA</b> .....	29
<b>APÉNDICES</b> .....	35
<b>Apéndice 1: Hoja de campo para el muestreo de diatomeas</b>	
bentónicas .....	37
<b>Apéndice 2: Método de limpieza de diatomeas</b> .....	39

## INTRODUCCIÓN

La aplicación de la Directiva 2000/60/CE de la Unión Europea (Directiva Marco del Agua, DMA) y especialmente el desarrollo del Anexo V requiere la identificación de los elementos de calidad biológica, parámetros y métricas que permitan establecer el estado ecológico de las masas de agua epicontinentales.

La Confederación Hidrográfica del Ebro (CHE) ha abordado esta tarea a partir de la realización de las siguientes tareas:

- Selección de los elementos de calidad biológica, parámetros y métricas<sup>1</sup> más adecuados para establecer el estado ecológico en ríos y lagos.
- Identificación de directrices relativas a los elementos de calidad biológica y parámetros seleccionados que faciliten el diseño de las redes de control de vigilancia y control operativo<sup>2</sup>.
- Elaboración de los protocolos de muestreo, identificación y cálculo de métricas.

Los elementos de calidad biológica inicialmente considerados para las categorías de ríos y lagos, de acuerdo con la DMA, son los siguientes:

ELEMENTOS DE CALIDAD BIOLÓGICA (AP. I.1. ANEXO V)	RÍOS	LAGOS
Composición, abundancia y biomasa del fitoplancton	–	■
Composición y abundancia de la flora acuática	■	■
Composición y abundancia de la fauna bentónica de invertebrados	■	■
Composición, abundancia y estructura de edades de la fauna íctica	■	■

Se considera prioritario que la elección de los parámetros y métricas de los elementos de calidad biológica y los procedimientos metodológicos para su aplicación surjan de los estudios que la comunidad científica ha realizado o está desarrollando en las cuencas ibéricas y del resto de Europa, y reflejen las directrices de los estándares europeos existentes (normas y pre-normas elaboradas por la Comisión Europea de Normalización). Con esto se persigue que los trabajos que se presentan sean reflejo de las tendencias metodológicas más recientes y de mayor seguimiento, y que su futura aplicación facilite la comparación de los resultados y el aprovechamiento (siempre que sea posible) de los datos históricos.

Como punto de partida la CHE organizó unos Seminarios dedicados a: fitoplancton, fitobentos (microalgas), macrófitos, invertebrados bentónicos y peces. El objetivo de los seminarios fue la puesta en común de experiencias que permitieran avanzar en la definición de los grupos taxonómicos a considerar como parte de los elementos de calidad biológica para el establecimiento del estado ecológico, y la determinación de los métodos de muestreo y análisis más adecuados.

Este documento está dedicado al fitobentos constituido por microalgas, especialmente diatomeas. Los contenidos incluyen las opiniones y datos recogidos durante la reunión de trabajo mantenida el 22 de octubre de 2004, entre los expertos Jaume Cambra (Dep. Biología Vegetal. Univ. de Barcelona), Luc Ector (Centre de Recherche Public-Gabriel Lippmann; Luxembourg) y Sergi Sabater (Institut d'Ecologia Aquàtica. Univ. de Girona), y técnicos de la CHE (C. Durán y M. Pardos), del Ministerio de Medio Ambiente (J. Ruza y A. Corrochano) y de URS (M. Alonso, G. González e I. Miró).

<sup>1</sup> En el documento se adoptan los siguientes términos y definiciones extraídos de la DMA y de las Guías de monitorización/*Monitoring guides* y ECOSTAT:

- Elementos de calidad biológica: incluye fitobentos, macrófitos, fitoplancton, fauna de invertebrados y peces.
- Parámetros: descriptores de los elementos de calidad biológica (composición, abundancia, presencia de taxones sensibles, etc.).
- Métricas: resultados de las mediciones de los parámetros (nº de taxones, diversidad de Shannon, % de taxones dominantes, diferentes índices, concentración de clorofila, índice de pigmentos, etc.)

<sup>2</sup> Los controles de vigilancia y operativos son requeridos por la DMA (art. 1.3.1 y 1.3.2) para conocer el estado inicial de las masas de agua y completar la evaluación de impacto, y como medidas de seguimiento temporal que permitan establecer los cambios a largo plazo debidos a condiciones naturales o por actividades antropogénicas (*control de vigilancia*), así como para determinar el estado de las masas de agua que se considere que no pueden cumplir sus objetivos medioambientales y para evaluar los cambios en el estado de dichas masas como resultado de los programas de medidas (*control operativo*).

La información obtenida en el Seminario se ha completado con datos obtenidos de fuentes bibliográficas cuyas referencias se indican en la memoria.

La información se presenta según lo siguiente:

### **GENERALIDADES**

- Definiciones
  - Valor indicador de las microalgas bentónicas ante las presiones fisicoquímicas e hidromorfológicas.
  - Métricas existentes.
- Propuesta de métricas para la cuenca del Ebro
- Directrices para el control de vigilancia y control operativo relativos a las microalgas bentónicas.
  - Ubicación de los puntos de control
  - Frecuencia de muestreo

### **PROTOCOLOS**

- Protocolos de muestreo
- Protocolo de tratamiento de muestras
- Protocolo de identificación
- Protocolo de control de calidad.



## PARTE I. Generalidades



## 1. DEFINICIONES Y OBJETIVOS

El término fitobentos se refiere a los organismos autótrofos que viven asociados a cualquier sustrato del fondo en los ecosistemas acuáticos, e incluye cianobacterias, algas microscópicas (microalgas), macroalgas y macrófitos.

El término *perifiton* describe a la comunidad microbótica que vive sobre sustratos sumergidos de diferente naturaleza (sustratos duros, vegetación acuática viva y muerta,...); e incluye microalgas, bacterias, hongos y protozoos. Diferentes grupos de algas forman parte del perifiton (diatomeas, clorofíceas, etc.), así como las cianobacterias.

Los términos *epifiton*, *epifiton* y *epipelon* se refieren a los sustratos que colonizan las algas, que son sustratos pétreos, vegetación acuática y sedimento, respectivamente.

Este documento está dedicado a las microalgas bentónicas de aguas corrientes y de lagos y tiene como objetivo identificar y proponer métricas para el establecimiento del estado ecológico de las aguas fluyentes y estancadas de la cuenca del Ebro, en aplicación de la Directiva 2000/60, y especificar las directrices metodológicas para el muestreo y análisis de las microalgas bentónicas.

## 2. VALOR INDICADOR DE LAS MICROALGAS BENTÓNICAS

El uso de microalgas bentónicas para evaluar la calidad del agua es una práctica habitual en muchos países europeos, y existe abundante bibliografía sobre su capacidad bioindicadora. No obstante la inmensa mayoría de los estudios realizados se refieren a diatomeas, y existe mucha menos información sobre los restantes grupos de algas. Asimismo los ríos han sido objeto preferente de estudio, mientras que en los lagos el uso de las microalgas bentónicas como bioindicadores es más reciente.

En el marco de la aplicación de la DMA, las microalgas se consideran útiles para la detección y seguimiento de las presiones debidas a:

- Eutrofización
- Incrementos de materia orgánica
- Salinidad
- Acidificación

La mayoría de las microalgas son productores primarios y como tales responden a las variaciones de los nutrientes (especialmente del fósforo) en el agua; algunas pueden comportarse como organismos heterotróficos en aguas con aumentos de materia orgánica. Las comunidades de microalgas bentónicas responden al aumento de nutrientes (principalmente P y N) en el agua, mediante cambios en su composición que, en algunos casos, suponen la disminución de la diversidad, y el aumento de la biomasa; de forma que cuando la masa de agua se eutro-



*Cyclotella meneghiniana*.

fiza los sustratos aparecen recubiertos de pátinas verdes o pardas de algas.

Respecto a la acidificación, ésta no es problema en la mayor parte de las cuencas ibéricas cuyas aguas están tamponadas.

Las microalgas bentónicas son poco sensibles a las presiones hidromorfológicas (alteraciones del régimen hidrológico, continuidad del río y condiciones morfológicas del lecho), por lo que no se recomienda su uso para la detección de dichas presiones. Los macrófitos, dentro de los vegetales, son mejores indicadores de las alteraciones hidromorfológicas.

## 3. MÉTRICAS BASADAS EN MICROALGAS BENTÓNICAS

### 3.1. ÍNDICES DE DIATOMEAS

Las diatomeas son el grupo más diverso de las microalgas bentónicas; suelen constituir el 80-90% de la comunidad del perifiton. Son cosmopolitas y sus requerimientos ecológicos son conocidos para muchas de sus especies, y son los mismos en diferentes regiones geográficas. Tienen como ventaja adicional la buena manipulación y conservación de las muestras, lo que se debe, en parte, al esqueleto de sílice —el frústulo— de elevada resistencia y cuyas características morfológicas son la base de la identificación de las especies. Los frústulos que están formados por dos valvas, se acumulan en los sedimentos lacustres y pueden ser analizados en estudios paleolimnológicos.

En los ríos ibéricos los factores más relevantes que afectan a la composición y abundancia de las diatomeas son los nutrientes (principalmente P y N) y la salinidad. Otros factores como la luz, la temperatura, el pH, la velocidad de la corriente y la naturaleza del sustrato pueden también causar variaciones en las comunidades de diatomeas.

Los procedimientos de muestreo y análisis están estandarizados por las siguientes normas y pre-normas

europas (*European Committee for Standardization, 2003, 2004*):

- CEN / TC 230 EN 13946:2003. *Water Quality. Guidance standard for routine sampling and pre-treatment of benthic diatoms from rivers.*
- PrEN 14407: February 2004. *Water quality. Guidance standard for the identification, enumeration, and interpretation of benthic diatom samples from running waters.*

Estas dos normas están ahora incluidas en la legislación española como Normas Españolas (AENOR 2004, 2005).

Existe una amplia variedad de índices de diatomeas (Ector & Rimet, 2005), diseñados por diferentes autores (IPS, CEMAGREF 1986; IBD, Prygiel y Coste, 1998; CEE, H. Lange-Bertalot, 1979; LMI, Leclercq y Maquet, 1987; SLA, Sládecek, 1973; EPI-D, Dell'Uomo, 2004; ROTT, Rott et al., 1997, 1999, 2003). Todos suelen basarse en combinaciones entre la abundancia relativa y el grado de sensibilidad (tolerancia) de un grupo de taxones seleccionados (en general especies). Prygiel et al. (1999), Whitton y Rott (1996) y Whitton et al. (1991) describen y evalúan muchos de los índices utilizados actualmente. Muchos de estos se han desarrollado para usarlos en un área geográfica concreta aunque comprobaciones posteriores han demostrado que algunos tienen una validez más amplia.

En Francia, las Agencias del Agua y el CEMAGREF de Burdeos han elaborado un programa informático (OMNIDIA) que permite el cálculo de un número elevado de índices. Este programa está sometido a sucesivas actualizaciones que permiten la incorporación de nuevas especies y nuevos índices.

Antes de utilizar un índice por primera vez en una masa de agua, es necesario hacer una evaluación previa del índice. Esta evaluación debería de considerar la información autoecológica de los taxones, así como las condiciones fisicoquímicas del lugar concreto. Es importante que los taxones dominantes presentes en la masa de agua estén también representados en el índice.

La correcta aplicación de los índices requiere de la participación de un técnico entrenado en la identificación taxonómica de las diatomeas. Entre los índices más usados se encuentran los siguientes, los cuales se han aplicado en la cuenca del Ebro:

- Índice IPS (Índice de Polusensibilidad eS específica): Se calcula sobre la base de las medias ponderadas de los valores de Sensibilidad a la contaminación ( $S_j$ ), Valor indicador de contaminación ( $V_j$ ) y Abundancia relativa de la especie  $j$ :

$$IPS = \frac{\sum A_j \neq S_j \neq V_j}{\sum A_j \neq V_j}$$

- Índice IBD (índice biológico de diatomeas) (AFNOR 2000): Basado en un número reducido de taxones (250) para los que se conoce su grado de tolerancia (7 grupos de calidad). Su sensibilidad es menor que el

anterior en los ríos cuya composición de diatomeas no incluya parte de las especies del índice.

- Índice CEE (Descy y Coste, 1990): Combina, en una tabla de doble entrada, grupos de especies con diferente tolerancia a la contaminación, en relación con su distribución a lo largo de los ríos.

Los índices de diatomeas se aplican normalmente en ríos, no obstante recientemente se está analizando su posible utilización en lagos (Seele et al, 2000; Kitner y Poulícková, 2003; Blanco et al. 2004, 2005) con resultados favorables. Como ejemplo cabe citar la aplicación de los índices IPS e IBD en muestras de perifiton tomadas sobre tallos de helófitos sumergidos (*Scirpus lacustris* y *Typha latifolia*) en lagos someros de la provincia de León (Blanco et al. 2004). Los resultados muestran una buena correlación entre los resultados de los índices y el estado trófico de los lagos.

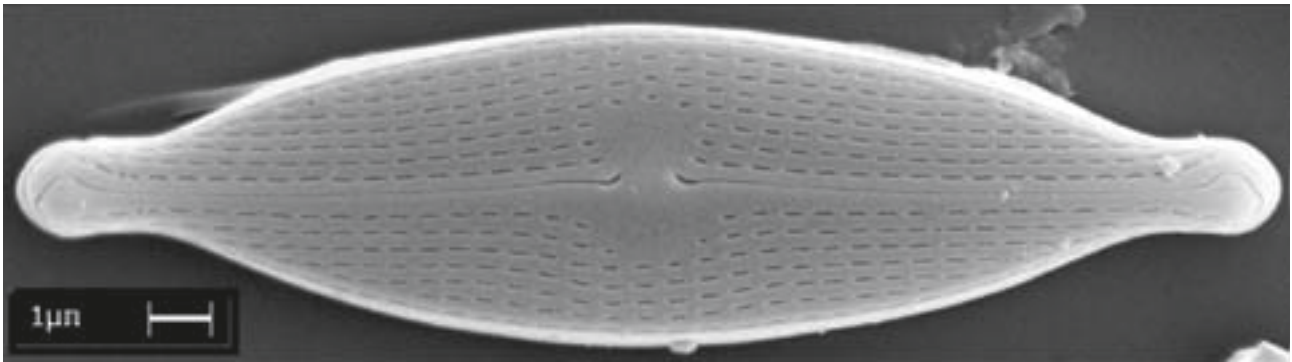
En lagos de Cataluña se aplica un indicador basado en diatomeas (Agència Catalana de l'Aigua, 2003). Este índice (InDia =) se obtiene de ponderar la abundancia relativa de cada especie característica ( $d_j$ ) por un valor indicador ( $a_j$ ). Las especies características varían en cada tipo de lago.

### 3.2. MÉTRICAS BASADAS EN OTROS GRUPOS DE ALGAS

El carácter indicador de otros grupos de algas no diatomeas se ha puesto de manifiesto en diversos estudios de investigación. Por esta razón, en diversos países europeos también se utilizan las microalgas no diatomeas para evaluar la calidad del agua. Así tenemos el índice de los saprobios SLA (Sládecek, 1973), utilizado en la República Checa, el índice E-P/I (Dell'Uomo, 1991) en Italia y más recientemente el índice trófico TI (Rott, 1999) en Austria, que se han construido con bases de datos muy potentes de alrededor de 1000 entradas. Douterelo et al. (2004) analizan las variaciones que presentan las cianobacterias en tramos fluviales sometidos a vertidos de aguas residuales orgánicas, en ríos de la provincia de Madrid; y observan decrementos de la diversidad, cambios de especies y de sus abundancias. Los autores del citado estudio señalan que las cianobacterias podrían usarse como indicadores de calidad en los seguimientos de las redes de control de ríos. No obstante el trabajo debería ampliarse (a otras cuencas) y proceder a estandarizar su muestreo y análisis, lo cual es una tarea que podría desarrollarse en un futuro próximo.

### 3.3. MÉTRICAS BASADAS EN LA BIOMASA

La concentración de Clorofila  $a$  /m<sup>2</sup> puede ser usada como métrica del grado de eutrofia (límite de eutrofia superior a 100 – 150 mg Chl- $a$ /m<sup>2</sup>) (Dodds et al. 1998). No obstante existen opiniones que cuestionan el uso de medidas cuantitativas de biomasa (Clorofila  $a$ ), en el marco de seguimientos rutinarios de eutrofia. Kelly y Whitton (1998) señalan que los valores de biomasa



algas pueden estar influidos por factores independientes a la carga de nutrientes como son avenidas, cambios estacionales y el ramoneo de invertebrados. También existen dificultades para la estandarización del muestreo (estima de la superficie de la que procede la medición, efecto sombra, etc...). Este indicador podría tener interés en el seguimiento de la eutrofia en tramos fluviales seleccionados (control operacional) pero no se considera adecuado para su inclusión en los controles de vigilancia.

#### 4. PROPUESTA DE MÉTRICAS PARA LA CUENCA DEL EBRO

Se presenta una propuesta de métricas principales y complementarias para la determinación del estado ecológico de los ríos y lagos de la cuenca del Ebro.

##### 4.1. RÍOS

Las métricas basadas en las microalgas que se han identificado para el establecimiento del estado ecológico de los ríos de la cuenca del Ebro son las siguientes:

MICROALGAS BENTÓNICAS	
<b>Métricas principales</b> Índice IPS de diatomeas Índice trófico TI (Rott 1999)	<b>Métricas complementarias</b> Índices de cianobacterias (a desarrollar medio y largo plazo). Clorofila <i>a</i> – Seguimientos operacionales (protocolos a estandarizar)

Las diatomeas se consideran el principal indicador dentro de los productores primarios en los ríos de la demarcación del Ebro. Existen trabajos previos y se han obtenido buenos resultados en las experiencias realizadas (Confederación Hidrográfica del Ebro, 2004; C.H. del Duero, 2004; C.H. del Norte, 2005).

La CHE dispone de una Red de diatomeas que comprende cerca de 200 estaciones en la red fluvial, de las que una parte pertenecen a la red provisional de referencia. En estas estaciones se han aplicado los índices IPS, IBD y CEE, y los resultados muestran que el índice IPS

es la métrica que ofrece mejores resultados en la cuenca del Ebro (CHE, 2004).

Se considera adecuado mantener el índice IPS como una de las métricas a usar en el establecimiento del estado ecológico de las masas fluviales de la cuenca del Ebro. No obstante se recomienda realizar mejoras según las siguientes directrices:

- Ampliar el número de estaciones o redistribuir las existentes dentro de las masas de agua fluviales identificadas.
- Asegurar un número suficiente de estaciones de referencia en los tipos que dispongan de ellas. Los resultados del estudio de presiones e impactos en fase de finalización permitirán testar la bondad de las estaciones de referencia provisionales y detectar otras posibles.
- Establecer los valores de referencia del IPS para cada tipo identificado en la demarcación del río Ebro.
- Buscar otras métricas resultantes del análisis de los inventarios de microalgas que puedan ser de interés para completar los resultados que se obtienen con los índices. Inicialmente se recomienda aplicar el índice TI (Rott, 1999).
- Preparar un Atlas iconográfico de las diatomeas presentes en las distintas cuencas para facilitar las identificaciones de las especies.
- Proponer cursos de formación a la taxonomía de las diatomeas y ejercicios de intercalibración entre los técnicos.
- Incluir toda la información (inventario de especies, recuentos, resultados de los índices calculados) en una Base de datos georreferenciada.

El protocolo que se presenta en esta memoria incluye los procedimientos de muestreo (apartado 6), tratamiento de las muestras (apartado 7) y análisis (apartado 8) recomendados para la obtención de métricas basadas en las **diatomeas bentónicas**, que permitan establecer el estado ecológico de los ríos de la cuenca de la demarcación hidrográfica del Ebro.

##### 4.2. LAGOS

Existe poca información, no obstante se considera interesante incluir las diatomeas bentónicas como indi-

cadres del estado ecológico de los lagos, especialmente en los lagos someros. En el protocolo de muestreo de diatomeas (apartado 6) se presentan las directrices metodológicas para su muestreo en lagos.

## 5. DIRECTRICES PARA EL CONTROL DE VIGILANCIA Y CONTROL OPERATIVO EN LO REFERIDO AL INDICADOR

Los objetivos de las redes de control de vigilancia y control operativo se indican en el siguiente cuadro (según Anexo V apartados 1.3.1. y 1.3.2.).

CONTROL DE VIGILANCIA
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Completar y aprobar el procedimiento de evaluación de impacto (análisis de presiones e impactos).</li> <li>• Contribuir al diseño eficaz de los futuros programas de vigilancia.</li> <li>• Evaluar los cambios a largo plazo en las condiciones naturales.</li> <li>• Evaluar los cambios a largo plazo resultantes de actividad antropogénica muy extendida.</li> </ul>
CONTROL OPERATIVO
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Establecer el estado de las masas identificadas en riesgo de no cumplimiento de los objetivos medioambientales.</li> <li>• Evaluar los cambios que se produzcan en las aguas indicadas, como resultado de los programas de medidas.</li> </ul>

En los apartados siguientes se indican algunas directrices relacionadas con las microalgas bentónicas, respecto a su uso en las redes de control de vigilancia y control operativo.

### 5.1. SELECCIÓN DE LOS PUNTOS DE CONTROL

#### 5.1.1. Control de vigilancia

La red de control de vigilancia deberá estar integrada por suficientes masas de agua representativas de las condiciones de la demarcación tanto en términos naturales como de las presiones e impactos identificados.

En la cuenca del Ebro (ríos) se han identificado 697 masas de agua fluviales y existen unos 200 puntos de muestreo de diatomeas. Sería deseable ampliar el número de puntos de muestreo hasta cubrir 400 puntos. Esto es importante en las etapas iniciales de diseño y explotación preliminar de la red de vigilancia y para ajustar el número de puntos final de forma estadística. Para la selección de los puntos de muestreo hay que tener en cuenta que:

- Estén representados tramos de referencia para los tipos que dispongan de ellos (según el estudio de Presiones e Impactos).
- Existan tramos representativos de los diferentes grados de calidad.

– Coincida el punto de la red de diatomeas al menos con el de macroinvertebrados, macrófitos, peces y de calidad fisicoquímica, dentro de lo posible.

Para la localización del punto de control en las masas de agua se recomienda:

- Evitar situar el punto de control muy cerca de puntos de vertido directos, siendo más adecuado localizar el punto en la zona media o al final de la masa de agua fluvial.
- Analizar la posibilidad de muestrear en más de un punto en masas de agua muy extensas. La longitud media de las masas de agua fluviales de la cuenca del Ebro es de 19 km pero existen algunas masas de agua que superan los 40 km y hasta los 80 km (Jalón, Piedra, Manubles). En estos casos se debería disponer de más de un punto de muestreo.

En lagos el número de masas de agua es de 92 y, dado que se carece de datos de diatomeas bentónicas en la mayoría, sería deseable muestrearlas todas si se adopta este indicador para la determinación del estado ecológico. No obstante de las 92 masas sólo un tipo (alta montaña septentrional, dimíctico, aguas ácidas) agrupa un número considerable de lagos (58), mientras que el resto de tipos están representados por cantidades que varían entre 1 y 7 lagos. Por esta razón se recomienda estudiar las diatomeas de todos los lagos (34) que pertenecen a los diferentes tipos (distintos al de montaña) y añadir a éstos una selección del grupo de lagos de montaña (5 ó 6).

#### 5.1.2. Control operativo

Los puntos de control operativo deben cubrir todas las masas identificadas en riesgo de no cumplir los objetivos medioambientales. No obstante, no se han de analizar todos los parámetros indicadores de los elementos de calidad que indica la DMA, sino aquellos más sensibles a las presiones a las que está sujeta la masa.

Las diatomeas epilíticas son especialmente adecuadas para evaluar impactos derivados de la eutrofización e incrementos de materia orgánica en la cuenca del Ebro. También son indicadas para evaluar impactos que ocasionen cambios de salinidad y del pH.

La localización de los puntos de control operativo referidos al uso de métricas basadas en las diatomeas epilíticas debe tener en cuenta que:

- debe permitir evaluar la magnitud e impacto de los procesos de contaminación orgánica y/o salinización de origen difuso y puntual,
- y en caso de existir varios puntos de contaminación puntual, los puntos de control se situarán de modo que sean representativos de la magnitud y el impacto del conjunto.

### 5.2. FRECUENCIA DE MUESTREO

En general, la frecuencia de muestreo de microalgas en los estudios de seguimiento de la calidad del agua varían entre una vez por año (en época de aguas bajas

y estables) a cuatro veces al año (coincidiendo con las estaciones del año). No obstante, los recientes estudios realizados en ríos europeos demuestran que las comunidades de diatomeas integran los cambios de calidad de agua durante un periodo de unos 60 días (Rimet et al., 2005) y entonces indican la calidad de los dos meses anteriores a la fecha del muestreo

#### *Periodos de muestreo*

Algunas directrices a tener en cuenta en la selección de la época de muestreo son:

- Las microalgas responden más rápido a los cambios de la calidad del agua con temperaturas cálidas que frías, luego las épocas favorables son primavera y verano.
- Evitar el muestreo después de periodos de lluvias fuertes; se recomienda esperar hasta 4 semanas después de una tormenta fuerte.

En los **controles de vigilancia** a realizar en ríos se recomienda muestrear las diatomeas epilíticas, 2 veces al año en primavera (periodo de aguas altas) y verano

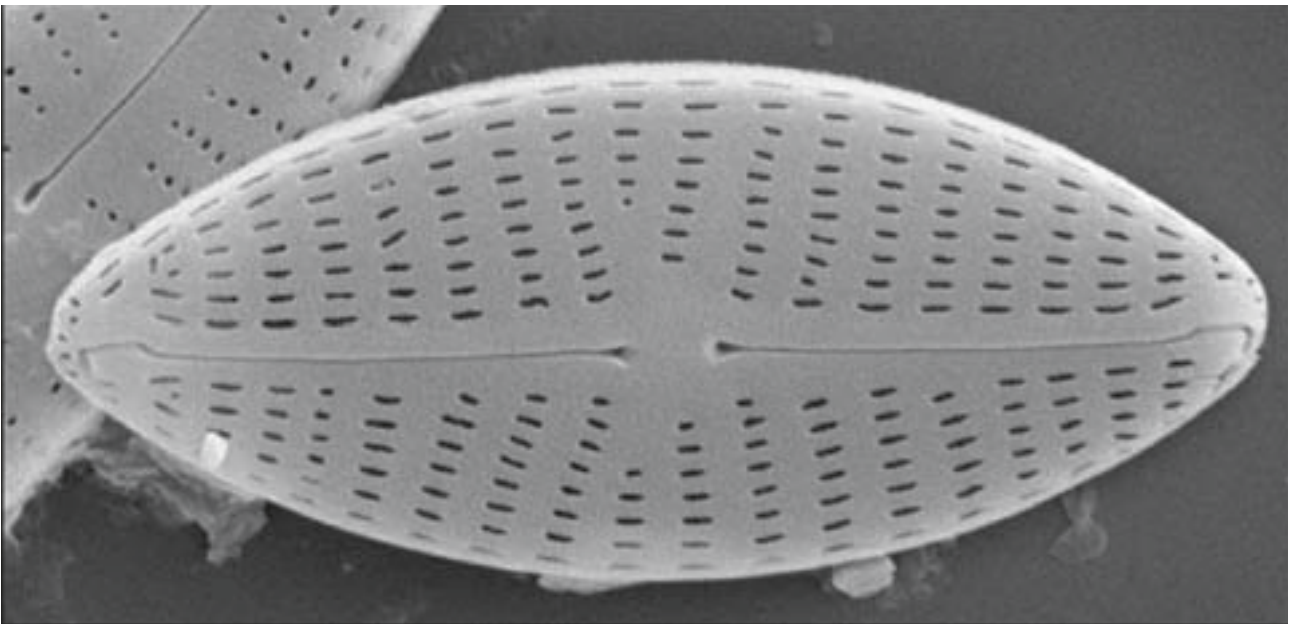
(periodo de aguas bajas); ajustándose los periodos de muestreo en cada tipo fluvial según sus condiciones climáticas. En general los muestreos se realizarán entre mayo y octubre.

En caso de que sólo se programe un muestreo éste se realizará en verano.

#### *Frecuencia de los controles de vigilancia y operativos*

Según la DMA se debe realizar un control de vigilancia durante un periodo de un año dentro del periodo que abarque el plan de cuenca (6 años). No obstante en las primeras etapas de reconocimiento de la demarcación y durante los tres primeros años de funcionamiento de la red de control (2006–2008) sería deseable una mayor frecuencia de muestreo (anual), y en etapas posteriores se recomienda realizar controles de vigilancia cada 3 años.

La frecuencia de muestreo de microalgas bentónicas en los controles operativos y de investigación se determinará de forma específica.



*Navicula antonii.*





## PARTE II. Protocolos

En las páginas siguientes se incluyen los procedimientos destinados al uso de las microalgas bentónicas (diatomeas) en el establecimiento del estado ecológico de las aguas superficiales, los cuales se refieren a los siguientes aspectos:

- Muestreo
- Pre-tratamiento de muestras
- Identificación
- Control de la calidad



## 6. PROCEDIMIENTO PARA EL MUESTREO DE DIATOMEAS BENTÓNICAS

### 6.1. INTRODUCCIÓN

Este procedimiento establece un método para el muestreo de las diatomeas epilíticas y epifíticas utilizadas para evaluar la calidad del agua de ríos y lagos. Los datos obtenidos mediante este método son los más apropiados para obtener los índices de calidad del agua basados en la abundancia relativa de los taxones.

La elaboración del procedimiento se ha basado en los siguientes documentos: Norma CEN /TC 230 EN 13946:2003; Protocolo de la Agencia Catalana del Agua para la evaluación de la calidad biológica de los ríos mediante diatomeas (2003); Protocolo para la recolección de muestras de diatomeas bentónicas en humedales continentales (MMA, 2002).

El procedimiento incluye directrices metodológicas para:

- Identificar el equipo de muestreo requerido.
- Seleccionar los puntos de muestreo en ríos y lagos.
- Seleccionar el sustrato a muestrear.
- Recoger la muestra en los sustratos.
- Conservar la muestra.

### 6.2. EQUIPOS Y REACTIVOS

#### 6.2.1. Equipos de muestreo

- Protección personal
  - Botas o vadeadores de pescador.
  - Guantes de látex (especialmente en aguas sospechosas de contaminación).
- Recolección de muestras
  - Cepillo de dientes duro (u otro instrumento similar) o cuchillo (u otra hoja adecuada).
  - Azada de mango largo con una red fina adherida (por si deben muestrearse 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.
  - Bolígrafo o rotulador permanente (o cualquier otro método para etiquetar las muestras). Si se usan etiquetas, estas deben ser resistentes a la humedad.

#### 6.2.2 Reactivos fijadores

Son necesarios para detener la división celular de las diatomeas y la descomposición de la materia orgánica. No es necesario añadir un conservante si la muestra se procesa pocas horas después de su recogida, siempre que ésta se conserve en frío (4 °C) y a oscuras; la muestra también se puede ultracongelar.

En caso de conservar las muestras se recomienda usar formaldehído tamponado o etanol, especialmente para periodos de conservación de las muestras largos;

las muestras en formaldehído pueden conservarse durante meses o años, siendo recomendable añadir más conservante en periodos de conservación superiores a 6 meses – 1 año.

**a) 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) (la cantidad necesaria dependerá de la cantidad de materia orgánica presente en la muestra).

Dada la naturaleza tóxica de esta sustancia, en caso de utilización se deben tomar precauciones (trabajar en un ambiente bien ventilado, usar guantes).

**b) Etanol 70% (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH):** Puede utilizarse para este propósito.

### 6.3. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO

#### 6.3.1. Selección del punto de muestreo

Debe seleccionarse un segmento del río o del litoral de lago donde puedan encontrarse los sustratos adecuados para la toma de muestras (ver apartado 6.3.2.). 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.

Tiene que hacerse una descripción detallada del lugar de muestreo: localización, anchura, profundidad, tipo de sustrato, presencia y abundancia de macrófitos, grado de sombra, y otros datos de interés ecológico. También se recomienda hacer una fotografía. Toda esta información es valiosa para la interpretación de los resultados y facilita el trabajo de los siguientes muestreos (localización del punto de muestreo, reconocimiento de posibles cambios, mejor reproducibilidad del protocolo de muestreo).

#### 6.3.2. Selección del sustrato

La selección del sustrato es un paso importante ya que las diatomeas se pueden encontrar en muchas superficies sumergidas, y la composición de las comunidades halladas puede variar en función del sustrato escogido. Por esta causa se deben establecer criterios de selección del sustrato a muestrear. Como criterio general, es recomendable muestrear las comunidades (superficies parduzcas resbaladizas) que se desarrollen sobre **sustratos duros estables situados en zonas sumergidas** del lecho fluvial o del litoral de lagos 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 puede 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. También puede muestrearse sobre otras superficies artificiales como ladrillos o tejas, si podemos garantizar su presencia en el agua durante al menos cuatro a ocho semanas<sup>3</sup>; en general, un lapso de tiempo 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 sean 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 muestreo<sup>4</sup>.

En tramos fluviales profundos y en lagos pueden muestrearse los tallos de los helófitos o bien sustratos rocosos. Para uniformizar el muestreo se recomienda muestrear siempre las mismas especies o grupos morfológicamente similares; también pueden usarse sustratos artificiales introducidos en zonas seleccionadas.

### 6.3.3. Directrices para la toma de la muestra

En la toma de muestras tener en cuenta las siguientes indicaciones generales :

#### Ríos

- Evitar muestrear sustratos procedentes de zonas muy sombreadas, a no ser que esta sea la característica distintiva del punto a evaluar.
- Evitar tomar sustratos de zonas emergidas o que presumiblemente lo hubieran estado en algún momento reciente.
- Evitar tomas de sustratos en áreas demasiado cercanas a las orillas, y obtenerlas principalmente del punto medio del río, en zona de corriente.
- Evitar zonas debajo de puentes o recientemente afectadas por obras de ingeniería o de alteración de lecho fluvial.
- Evitar 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).

#### Lagos

- Evitar tomar sustratos en áreas presumiblemente inundadas recientemente (menos de 4-6 semanas).
- Evitar tomar sustratos de zonas emergidas o que presumiblemente lo hubieran estado en algún momento reciente.

### 6.3.3.1. Procedimiento para la toma de las muestras en ríos

#### 6.3.3.1.1. Superficies duras naturales móviles

Las piedras y cantos rodados son el sustrato más idóneo. Seguir el siguiente procedimiento:

- 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 (inundadas permanentemente, en zonas soleadas, y con aguas corrientes si las hay).
- Para realizar el muestreo, es conveniente situarse en el punto de máxima corriente (si es posible) e ir recorriendo el río a contra corriente (aguas arriba), para minimizar el efecto de contaminación de las muestras.
- Eliminar cualquier tipo de contaminación adherida a los sustratos (p.ej. detritus orgánicos) 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) la superficie superior de los sustratos, evitando así las superficies de erosión y sedimentación. Limpiar una zona aproximada de cómo mínimo 10 cm<sup>2</sup> por piedra (20 cm<sup>2</sup> si se toman 5 piedras). La superficie total de muestreo será de unos 100 cm<sup>2</sup>.
- 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 agua<sup>5</sup>. 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 (ver apartado 6.3.4.).

#### 6.3.3.1.2. Superficies verticales de infraestructuras artificiales

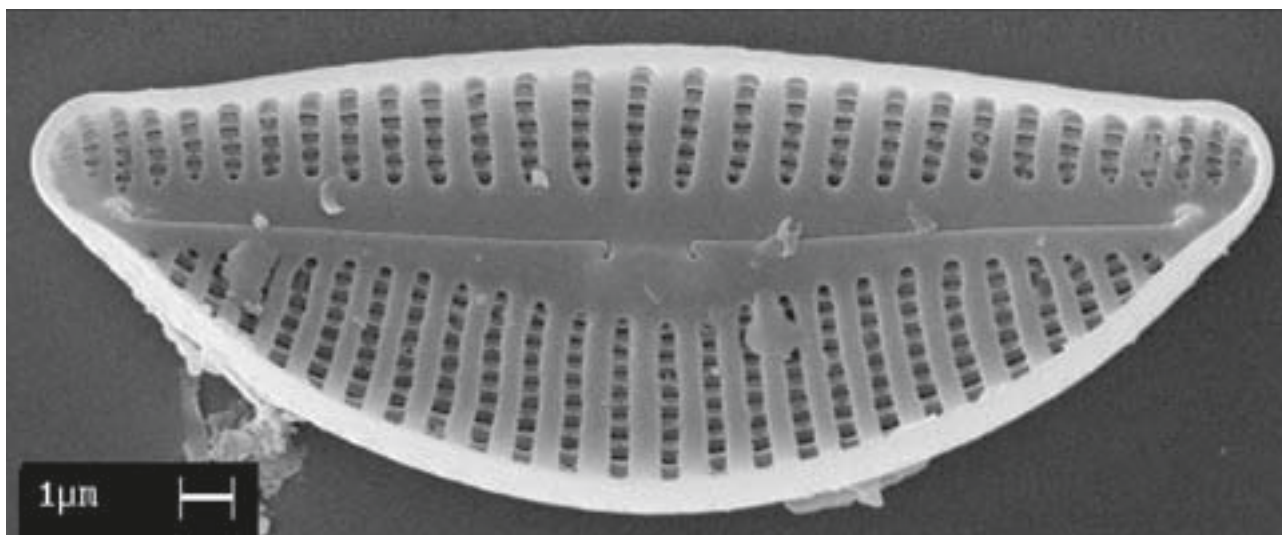
En ríos profundos y navegables pueden muestrearse las paredes verticales sumergidas de infraestructuras hidráulicas (p.ej. azudes, defensas). El procedimiento recomendado es:

- 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 diatomeas planctónicas.
- 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.

<sup>3</sup> No existe consenso en este dato y los expertos consultados dan un periodo mínimo de 4, 7 u 8 semanas.

<sup>4</sup> Si se muestrean diatomeas epifitas se asegurará que proceden de plantas totalmente sumergidas.

<sup>5</sup> 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).



*Encyonema caespitosum*.

- Limpiar, aproximadamente, una superficie de 10 cm<sup>2</sup> 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 según se indica en el apartado 6.3.4.

#### 6.3.3.1.3. Vegetación acuática

En tramos leníticos de ríos con abundante crecimiento de vegetación acuática se puede muestrear la comunidad de diatomeas epifíticas 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 diatomeas que aparece, siendo preferible limitar el muestreo del epilíton en sustratos duros artificiales o naturales.

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 su parte) en una bolsa de plástico. Coger 5 réplicas. Se evitarán las partes sumergidas de las hojas flotantes (nenúfares) 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 (Zimba, 1997) para extraer todas las diatomeas adheridas. 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 diatomeas epifíticas) en el vial de muestreo.

#### Macrófitos emergentes

Las muestras sólo pueden tomarse sobre macrófitos emergentes que contengan porciones que permanezcan permanentemente sumergidas, pero que no estén contaminadas por sedimentos del fondo.

- 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.

#### 6.3.3.1.4. Sustratos artificiales

Son preferibles sustratos con superficies heterogéneas (p. ej.: tejas, cuerdas de propileno deshilachadas) a las superficies lisas (p. ej. portaobjetos de vidrio). Deben dejarse en el río el tiempo suficiente para asegurar que la comunidad esté madura. Como mínimo se recomiendan 7-8 semanas, pero el periodo de exposición depende de las condiciones ambientales, así los periodos de exposición podrían ser más largos bajo algunas circunstancias (p. ej.: condiciones muy oligotróficas, bajas temperaturas, mucha sombra).

Debe cuidarse que el diseño y la ubicación de los sustratos introducidos no interfiera con las actividades legítimas de los usuarios del río y 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

**TOMA DE MUESTRAS DE DIATOMEAS BENTÓNICAS**



Seleccionar un tramo bien iluminado y en zona de corriente.  
 Escoger piedras y cantos rodados sumergidos.  
 Cepillar la superficie del sustrato; limpiar el cepillo en el recipiente con agua.

sustratos estén expuestos a las mismas condiciones, así como también es necesario que el periodo de exposición y la fecha de inicio de la introducción del sustrato sea el mismo.

Para el etiquetado y el transporte al laboratorio se siguen las directrices del apartado 6.3.4.

**6.3.3.2. Procedimiento para la toma de muestras en lagos y zonas húmedas**

Se pueden usar los mismos métodos que se describen para los ríos. No obstante en el litoral de lagos y en zonas húmedas puede existir una cierta dificultad en encontrar rocas o piedras para muestrear las diatomeas. Por el contrario abundan gravas y limos, y en la mayoría de ellos la vegetación acuática.

De cara a uniformizar el muestreo se recomienda el muestreo en los tallos de los helófitos sumergidos. Para ello deben cortarse los tallos de los helófitos que permanecen bajo el nivel del agua y fragmentarlos en porciones

de unos 10 cm de longitud (no deben incluirse en la muestra fragmentos contaminados por los sedimentos del fondo ni que presumiblemente hubieran estado emergidos recientemente); estas porciones se introducen en el bote de muestra y se cubren de agua. Posteriormente se limpian los tallos agitándolos con suavidad.

**6.3.4. Conservación y etiquetaje de las muestras**

Una vez tomada cada muestra se procederá a su etiquetado. Se usará un rotulador resistente al agua, y se indicará un código identificador del muestreo, un código de la estación de muestreo, la fecha de la recolección, los sustratos de los que procede y el fijador utilizado.

Se procederá a conservar la muestra según lo indicado en el apartado 6.2.2.

Las muestras deben guardarse en un lugar oscuro y fresco durante el trayecto hasta el laboratorio.

## 7. PRE-TRATAMIENTO DE MUESTRAS DE DIATOMEAS BENTÓNICAS

### 7.1. INTRODUCCIÓN

Este procedimiento establece los métodos de laboratorio para el estudio de las diatomeas epilíticas y epifíticas utilizadas para evaluar la calidad del agua de ríos y lagos. Incluye los procedimientos de tratamiento de las muestras previas a su identificación y recuento.

La elaboración del procedimiento se ha basado en los siguientes documentos: Norma prEN 14407:2004; Protocolo de la Agencia Catalana del Agua para la evaluación de la calidad biológica de los ríos mediante diatomeas (2003).

El procedimiento incluye directrices metodológicas para lo siguiente:

- Identificación del equipo de laboratorio y reactivos requeridos.
- Pre-tratamiento de las muestras.

### 7.2. MATERIAL DE LABORATORIO

#### 7.2.1. Equipos

- Campana extractora o sistema equivalente.
- Placa calefactora, baño de arena o baño de agua.
- Vasos de precipitados o tubos de ebullición (uno por muestra).
- Medios para medir volúmenes de 20 ml de agentes oxidantes.
- Pipetas Pasteur limpias.
- Centrífuga (opcional)<sup>6</sup> (algunos expertos no son partidarios de utilizar centrífuga, ya que las células grandes o poco silificadas se rompen y se alteran los resultados)
- Tubos de centrífuga (opcional). Estos tubos deberían ser resistentes al ataque de agentes oxidantes o ácidos utilizados para limpiar las diatomeas.

#### 7.2.2. Reactivos

##### 7.2.2.1. Reactivos para limpiar diatomeas

Para limpiar los frústulos de las diatomeas, se debe tratar la muestra con reactivos que permitan la digestión de la materia orgánica. Éstos son los siguientes:

- Solución de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 30% (110 volúmenes).
- Ácido clorhídrico diluido (ex 1 M) (HCl).
- Ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ).
- Permanganato potásico ( $KMnO_4$ ) en cristales.
- Ácido oxálico saturado ( $C_2H_2O_4$ ).

De los reactivos indicados el más recomendable es la **solución de peróxido de hidrógeno**, ya que el resto son sustancias tóxicas cuya manipulación requiere condiciones de seguridad más estrictas.

##### 7.2.2.2. Reactivos para preparaciones permanentes

Se requiere de un medio de montaje con un índice de refracción superior a 1,6. Se recomienda el uso de Naphrax.

### 7.3. TRATAMIENTO PREVIO A LA OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

Las muestras deben guardarse en un lugar oscuro y fresco durante el trayecto hasta el laboratorio y mientras se mantengan almacenadas. El pre-tratamiento incluye la concentración de la muestra, la digestión de la materia orgánica y la realización de las preparaciones microscópicas.

#### 7.3.1. Concentración de las muestras

La separación de las diatomeas del agua de la muestra puede realizarse por uno de los dos métodos siguientes:

- Dejar reposar las muestras 24 horas, como mínimo. Con esto se consigue que el material en suspensión sedimente y se acumule en el fondo del frasco; entonces el sobrenadante se puede retirar con una pipeta.
- Centrifugar la muestra. Previamente para quitar los restos grandes de sustrato o de plantas es preferible pasar la muestra por un colador de cocina. La velocidad y tiempo necesarios para completar la sedimentación de todas las diatomeas (incluyendo las especies pequeñas) dependerá de las características individuales de la centrifugadora utilizada (realizar pruebas preliminares para asegurar que no se dejan diatomeas en el sobrenadante con el tiempo y la velocidad escogidos).

Se recomienda un examen microscópico preliminar de las muestras sin tratar, y anotar cualquier característica inusual que se observe (p. ej. gran cantidad de frústulos vacíos).

Siempre debe guardarse una parte de la muestra, para evitar la pérdida en el caso que haya problemas durante el proceso de preparación.

#### 7.3.2. Limpieza de las diatomeas

Para una identificación adecuada de las diatomeas, es necesario eliminar todo el contenido celular. Esto puede hacerse exponiendo la muestra a agentes oxidantes fuertes. El peróxido de hidrógeno (110 vol.) es el más común y el más recomendado (ver anexo 2).

En aguas ricas en carbonato cálcico, se recomienda eliminar los carbonatos con HCl diluido. Este tratamiento también es necesario para muestras ricas en hierro.

#### 7.3.3. Elaboración de preparaciones permanentes

- *Conseguir la concentración adecuada de diatomeas.* Si la suspensión de muestra que se obtiene después

<sup>6</sup> Si no se dispone de centrifugadora, se puede dejar sedimentar el material sólido durante una noche, después de esto puede vaciarse con cuidado el sobrenadante.

de la digestión de la materia orgánica, se observa lechosa o turbia, debería añadirse agua destilada o desmineralizada para diluir su concentración; también puede utilizarse etanol<sup>7</sup>. La densidad de valvas puede comprobarse rápidamente mediante la evaporación de una gota de la suspensión en un cubreobjetos y observándola al microscopio con un objetivo medio (x40). Si la suspensión está muy diluida, hay que volver a centrifugar la muestra. Si esto falla, se repite el proceso de preparación.

– *Secado de la submuestra de diatomeas.* Agitar el vial que contiene la suspensión de diatomeas limpias. Con una pipeta Pasteur limpia extraer una o dos gotas de líquido (que debería ser turbio) de la parte central del tubo, y depositarlas en un cubre-objetos redondo. Dejar evaporar el líquido, depositando el cubreobjetos en un lugar cálido, resguardado del polvo y sin vibraciones, o bien calentarlo suavemente en una placa calefactora. El resultado tendría que ser una película de color gris que cubre el cubre-objetos.

– *Adición del medio de montaje.* Seguir las instrucciones de los fabricantes en la utilización del medio de montaje. Uno de los más utilizados es la resina Naphrax®. Debe asegurarse que el medio de montaje se expanda hasta los márgenes del cubre-objetos. Dejar enfriar y comprobar en el microscopio. La concentración ideal para el recuento sería aquella que a x1000 se puedan contar de 10 a 15 valvas en un campo. Si la preparación tiene muchas valvas por campo, se repite el proceso con una muestra diluida de las diatomeas limpias de materia orgánica.

– *Etiquetar la preparación.* Indicar como mínimo, los códigos de identificación de la muestra, la fecha y cualquier código necesario para permitir el acceso a la otra información.

## 8. IDENTIFICACIÓN Y RECUENTO DE DIATOMEAS BENTÓNICAS

### 8.1. INTRODUCCIÓN

En este apartado se establece un método para la identificación, recuento y obtención de la frecuencia relativa de las especies de diatomeas presentes en las preparaciones y la interpretación de los resultados para valorar la calidad del agua de ríos y arroyos. Los datos obtenidos con estos métodos son los más apropiados para obtener índices de calidad del agua basados en la abundancia relativa de estos taxones,

La elaboración del protocolo se ha basado en los documentos: Norma prEN 14407:2004 y Protocolo de la Agencia Catalana del Agua para la evaluación de la calidad biológica de los ríos mediante diatomeas (2003).

El procedimiento incluye directrices metodológicas para lo siguiente:

- Criterios para la identificación taxonómica y para los recuentos.
- Identificación de las diatomeas.
- Recuentos.
- Registros de datos y muestras.

### 8.2. MATERIAL DE LABORATORIO

– *Microscopio óptico:* equipado con una platina mecánica y objetivos de grandes aumentos y de inmersión. Se recomienda el contraste de fases o el objetivo con interferencia diferencial (Nomarski). El microscopio ha de estar preparado para poder tomar medidas (p. ej. ocular con micrométrico) con una resolución de 1µm como mínimo. Los aparatos de captura de imagen, video o fotomicroscopía, son útiles para registrar las especies difíciles y puede también ayudar a medir al densidad de estrías, etc.

– *Portaobjetos con escala micrométrica:* Es una preparación que tiene inscrita una distancia conocida, con divisiones y subdivisiones, para poder calibrar el ocular micrométrico, o cualquier otro aparato de medida.

– *Aceite de inmersión* y aplicador.

– *Pañuelos:* para la limpieza de los lentes.

– *Formularios* para anotar el recuento de las especies. Puede contener una lista de taxones con espacios donde anotar el recuento; también puede usarse un programa de ordenador preparado para la entrada directa de datos.

– *Guías de identificación e iconografías:* adecuadas al ámbito de estudio.

– *Medios para verificar la identificación* de las especies de difícil taxonomía: Esto puede hacerse de diversas formas: con dibujos y micro-fotografías de alta resolución; con imágenes de vídeo. También es muy útil localizar el taxón en la preparación usando la escala de Vernier del microscopio.

### 8.3. PROTOCOLO DE IDENTIFICACIÓN, RECUENTO E INTERPRETACIÓN DE DIATOMEAS

Las diatomeas bentónicas, limpias del contenido celular, se montan en un medio con un índice alto de refracción y se identifican y cuentan utilizando un microscopio óptico de alta resolución. Los resultados se interpretan usando uno o más índices de calidad del agua u otros métodos de evaluación.

#### 8.3.1. Aspectos preliminares a la identificación

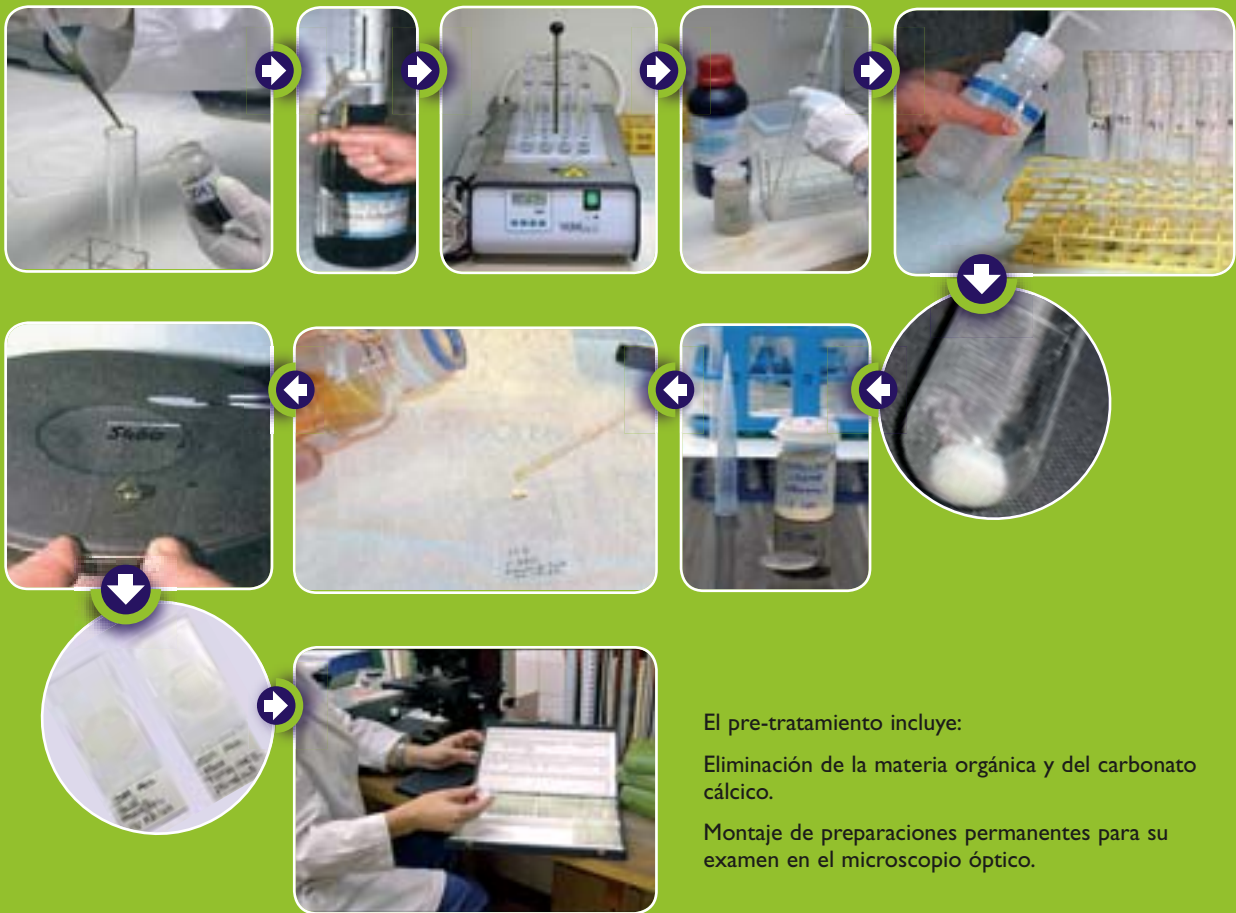
##### 8.3.1.1. Nivel taxonómico de identificación

La mayoría de índices de calidad requieren una identificación a nivel de especie o género. Es importante asegurar la correcta identificación de los taxones, y para ello hay que tener en cuenta los siguientes aspectos:

<sup>7</sup> El etanol ayuda a dispersar las diatomeas uniformemente en el cubre-objetos.



## PRE-TRATAMIENTO DE LA MUESTRA DE DIATOMEAS BENTÓNICAS



El pre-tratamiento incluye:

Eliminación de la materia orgánica y del carbonato cálcico.

Montaje de preparaciones permanentes para su examen en el microscopio óptico.

- Existencia de varios sistemas paralelos de nomenclatura. La nomenclatura definitiva a usar debe establecerse antes de empezar el trabajo. Los autores de los nombres de los taxones deben citarse en todos los casos, ya que existen posibilidades de confusión en la nomenclatura.
- Es recomendable adoptar la nomenclatura de la flora existente en el área estudiada, aunque también es posible utilizar los inventarios de diatomeas nacionales y regionales. Cuando los convenios taxonómicos del índice y los inventarios difieran, los del índice se han de ajustar a aquellos del inventario (*checklist*).
- Es recomendable tener actualizada periódicamente la nomenclatura y la subdivisión taxonómica de las especies.
- Si la identificación y recuento de células va a realizarse entre varias personas, deben acordarse previamente la nomenclatura y la bibliografía taxonómica a utilizar, en especial en lo referente a sinonimias y nuevas combinaciones.

#### 8.3.1.2. Determinación de la unidad de recuento

La unidad de recuento recomendada son las valvas (un frústulo entero = 2 unidades de recuento). Las diato-

meas deben identificarse tanto en vistas valvares como en vistas pleurales (conectivas).

#### 8.3.1.3. Determinación del tamaño de la muestra

Para la aplicación de los índices de diatomeas se requieren recuentos de 400 valvas (mínimo). Valores más pequeños podrían carecer del rigor estadístico necesario para algunas aplicaciones.

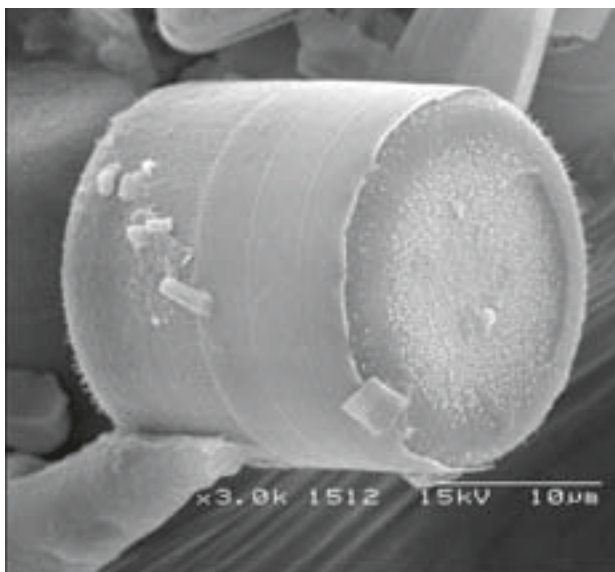
#### 8.3.1.4. Preparación del microscopio

El ocular micrométrico, o cualquier otro aparato de medida, debe calibrarse regularmente con un portaobjetos con escala micrométrica. Una resolución de 1  $\mu\text{m}$  es adecuada para los análisis rutinarios.

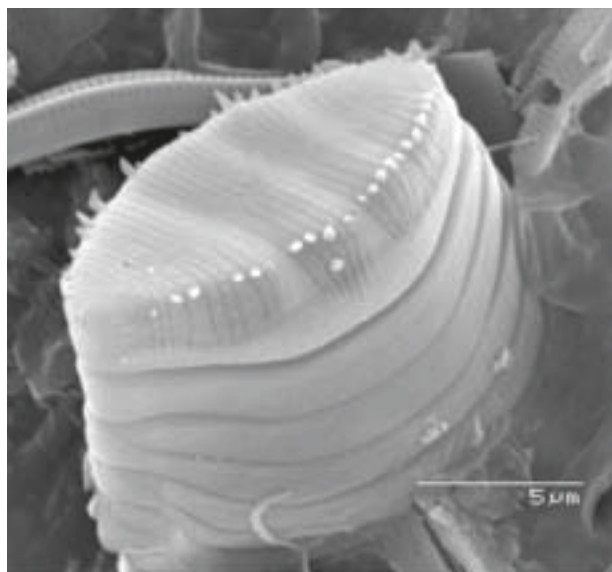
El segundo ocular puede estar equipado con una rejilla para ayudar al recuento; ésta puede ser de distintas formas pero lo importante es que permita seguir un criterio que impida contar dos veces una misma valva.

#### 8.3.1.5. Tratamiento de valvas rotas y diatomeas no identificadas

Para eliminar el riesgo de incluir fragmentos de valvas, debe decidirse un criterio antes de empezar el trabajo. Los criterios posibles son:



*Melosira varians.*



*Diatoma mesodon.*

- Incluir un individuo roto sólo si tiene aproximadamente  $\frac{3}{4}$  partes de la valva.
- Incluir un individuo roto sólo si tiene como mínimo un extremo y la parte central.
- Excluir todos los individuos rotos<sup>8</sup>.

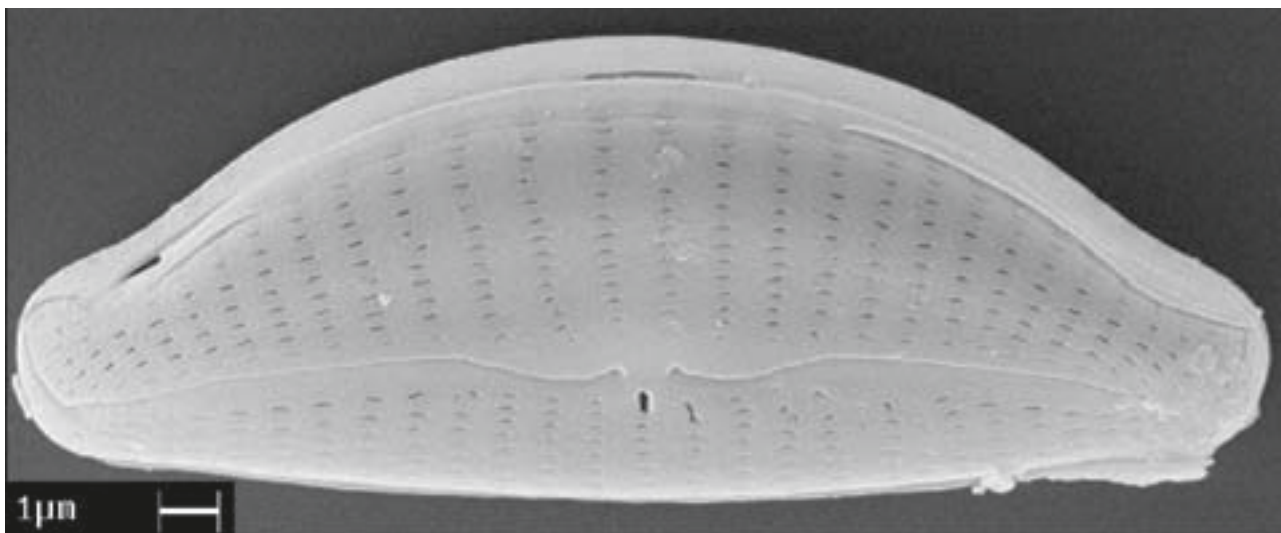
Una diatomea puede no ser identificable por distintos motivos: la diatomea está en posición pleural, la presencia de residuos que impidan una visión clara, o que el taxón no sea reconocido por el identificador. Si el exceso de residuos oculta muchas valvas, entonces debe repetirse la preparación utilizando suspensiones más diluidas para separar las diatomeas de los residuos. Algunos taxones son reconocibles a pesar de encontrarse en posición pleural, porque incluso en esta posición tienen una visión característica (p. ej. *Rhoicosphenia abbreviata*) o porque la visión pleural puede asignarse con seguridad a un taxón en particular identificándolo con la correspondiente visión valvar. A pesar de ello, no siempre es posible y en caso de duda debe hacerse un recuento de las visiones pleurales a nivel taxonómico más pequeño que se le pueda asignar con seguridad (p. ej. *Gomphonema* sp., o diatomea pennada en visión pleural). Este mismo criterio debería aplicarse a cualquier otra valva encontrada en la preparación y que no pueda ser identificada. Un gran número de valvas no identificados puede ser debido a un problema con la preparación o a falta de conocimientos del operador. La resolución que debería tomarse dependerá del método de evaluación propuesto. No todos los taxones necesitan ser identificados para algunos de los índices utilizados. Aunque, para los índices se pide que todos los taxones de la muestra tienen que identificarse, se recomienda que los individuos que no se identifiquen a nivel específico no sean más del 12% del total contado.

### 8.3.2. Procedimiento analítico

- a) Colocar la preparación en la platina del microscopio y anotar la información más importante en la hoja de recuentos o en el programa de ordenador. La información mínima recomendada es: n° de muestra, nombre del río, localidad y fecha de muestreo. Otras información importante es la fecha del recuento y el nombre del analista.
- b) Seleccionar una buena posición de la preparación para empezar<sup>9</sup>. Se recomienda el margen de la “mancha” de muestra seca, pero debemos asegurarnos que no se produzca un “efecto margen” significativo (p.ej. que no se dé un mayor número de individuos en el margen que en cualquier otro punto de la preparación).
- c) Identificar las valvas presentes en el primer campo de visión utilizando un objetivo de 100x.
- d) Si una valva no puede identificarse, se recomienda obtener fotografías, imágenes digitales o dibujos detallados. Debe describirse el taxón: la forma y dimensiones de la diatomea, densidad de estrías, forma y tamaño del área central, nombre y posición de los estigmas y detalles de la finalización del rafe.
- e) Una vez identificadas y contadas las valvas del primer campo, hay que moverse en un desplazamiento horizontal o vertical hasta un nuevo campo de visión.
- f) Para según que propósitos, es útil continuar el estudio de la preparación una vez contadas las 400 valvas, e incluir en el inventario cualquier taxón que no esté identificado en el recuento. También es útil hacer un rastreo con un aumento medio (p.ej. x400) para de-

<sup>8</sup> La presencia de muchos fragmentos de diatomeas puede indicar el arrastre de diatomeas de aguas arriba.

<sup>9</sup> Una variación del método de los transectos es el recuento mediante campo aleatorios. Si se opta por este método, los campos aleatorios se han de localizar mediante la escala de Vernier con los listados de números generados aleatoriamente.



*Cymbella excisa*.

tecar los taxones de mayor tamaño (p.ej. Gyrosigma, Pinnularia) que pueden escapar del análisis con grandes aumentos.

Al final del recuento se retira la preparación de la platina y se limpia de aceite de inmersión.

### 8.3.3. Registros de datos, preparaciones y muestras

Las preparaciones de diatomeas se pueden guardar indefinidamente, hecho que permite revisar los resultados en el futuro. Por eso, es importante que las preparaciones se almacenen de forma correcta, como p.ej. en un herbario. Las preparaciones tienen que etiquetarse con un código que permita identificarlas inequívocamente en una base de datos que contenga otros datos de la localidad: coordenadas geográficas, datos químicos, hidrológicos, etc.

La suspensión de valvas/frústulos limpios también debe etiquetarse y guardar para permitir hacer más preparaciones en el caso de que sean necesarias. Para prevenir el crecimiento microbiano o la disolución química de los frústulos debe añadirse un fijador como el etanol o el formaldehído. También se recomienda guardar las muestra fijadas por si fuera necesario comprobar resultados anómalos.

## 9. CONTROL DE LA CALIDAD EN EL MUESTREO, TRATAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS

### 9.1. INTRODUCCIÓN

La implementación de la Directiva 2000/60/CE requiere que los métodos que se utilicen en el establecimiento del estado ecológico procedan de metodologías estandarizadas (ISO, CEN, o de organismos nacionales de estandarización), que los laboratorios dispongan de programas de aseguramiento de la calidad (EN ISO 17025) y

participen regularmente en ejercicios de intercalibración (*proficiency testing programmes*).

La toma de muestras de diatomeas bentónicas y el pretratamiento de las muestras están estandarizados según la norma EN 13946: 2003. Las tareas de identificación y recuento de diatomeas están estandarizadas por la norma prEN 14407: 2004; no obstante en los apartados siguientes se indican algunas medidas a tomar para asegurar la calidad de los trabajos.

La toma de muestras puede estar influida por el tipo de río y por la pericia del muestreador. En ríos de los tipos de montaña y llanura sedimentaria es fácil encontrar un número determinado de sustratos duros para muestrear las diatomeas, mientras que en los tramos de los tipos de grandes ríos y del eje del Ebro esto puede ser más difícil, y por lo tanto se debe realizar un tipo de muestreo diferente (sobre sustratos vegetales o mediante sustratos artificiales).

El tratamiento de las muestras y la identificación de los taxones son la principal fuente de variabilidad de los resultados según experiencias en otros países (Prygiel *et al.* 2002). Muchas diferencias se deben a errores de identificación que en muchos casos son debidos a inexperiencia del personal pero también a las dificultades taxonómicas que presentan algunos taxones incluidos en los índices, a la falta de buenos manuales de identificación y/o a la diferente potencia y calidad de los equipos de microscopía que se usen.

Todo lo indicado hace necesario la elaboración y aplicación de métodos de control de calidad específicos para las actividades relacionadas con el muestreo e identificación de diatomeas bentónicas.

## IDENTIFICACIÓN DE LAS DIATOMEAS Y CÁLCULO DE ÍNDICES



Identificación de las diatomeas y recuento de valvas  
 Aplicación del programa OMNIDIA para el cálculo del índice IPS  
 Obtención de las clases de calidad para la red de diatomeas de la demarcación del Ebro

## 9.2. DIRECTRICES PARA ASEGURAR LA CALIDAD DURANTE EL MUESTREO

**Objetivo:** Realizar el trabajo de campo y evaluaciones según los procedimientos estándar previamente definidos.

### Medidas

- Preparación de un plan de muestreo específico para los diferentes tipos de ríos que recoja las peculiaridades de los tipos de ríos y/o lagos de la cuenca del Ebro. Elaborar hojas directrices que resuman de forma clara y didáctica las tareas y procedimientos a desarrollar.
- Formar al personal a cargo del muestreo, de forma específica para cada proyecto.
- Documentar los trabajos y usar hojas de campo previamente preparadas. Indicar la localización de la estación de muestreo (coordenadas GPS y esquema del tramo), el número de sustratos muestreados y sus características (tipo, tamaño) y demás datos de interés (grado de sombra, velocidad del agua, análisis físico-químicos, análisis biológicos, etc...).
- Aportar documentación fotográfica de las estaciones de muestreo y detalles de los recubrimientos de microalgas observados. La comparación de fotos realizadas en diferentes años será de gran ayuda para la identificación de tendencias.

### 9.3. DIRECTRICES PARA ASEGURAR LA CALIDAD EN LOS TRABAJOS DE LABORATORIO

**Objetivo:** Asegurar que se siguen rigurosamente los procedimientos de pre-tratamiento de las muestras.

#### Medidas

- Redactar los métodos a usar en el laboratorio de forma clara incluyendo todos los pasos a seguir, e indicar las fuentes de error y los límites de confianza.
- Formar al personal a cargo del muestreo, de forma específica para cada proyecto.
- Realizar entrenamientos al personal en la aplicación concreta de cada procedimiento o uso de equipos.
- Aportar documentación fotográfica de las estaciones de muestreo y detalles de los recubrimientos de microalgas observados. La comparación de fotos realizadas en diferentes años será de gran ayuda para la identificación de tendencias.

**Objetivo:** Asegurar la correcta identificación de las microalgas (diatomeas) y la fiabilidad de los recuentos.

#### Medidas

- La identificación y recuento de las diatomeas son tareas a realizar por personal entrenado. En España, la formación del personal se realiza, en la actualidad, en las universidades y en el marco de los estudios de licenciatura y doctorado. No existen acreditaciones específicas. En otros países europeos (Francia, Luxemburgo) se organizan cursos de capacitación para el análisis y recuento de diatomeas. Sería deseable que la Administración organizara cursos de capacitación para el personal a trabajar en las redes de seguimiento.
- Favorecer la elaboración de documentos (Atlas de diatomeas) y bases de datos que recojan tanto aspectos taxonómicos como de distribución y ecología de las especies.
- Aplicar medidas de control de calidad internos (recuento de una misma muestra por dos operadores, estimas de los niveles de confianza).
- Participar en ejercicios de intercalibración entre laboratorios. Esto es muy importante y es requerido por la DMA.

### 9.4. DIRECTRICES PARA ASEGURAR LA CALIDAD EN EL TRATAMIENTO DE DATOS

**Objetivo:** Control del manejo de datos y análisis de los resultados.

#### Medidas

- Todos los datos de un muestreo específico se deben identificar de forma individual, en la base de datos por medio de códigos.
- La documentación de campo y laboratorio (muestras, estadillos, fotos) se guardará durante un periodo no inferior a 5-6 años.
- Los datos en formato electrónico deberán incluir identificación de su origen (autores, fechas, etc...) y referencias para ampliar la información.
- Los inventarios y recuentos de laboratorio se introducirán en bases de datos y/o ficheros electrónicos y otro operario revisará que no existen errores de transcripción.



## GLOSARIO Y BIBLIOGRAFÍA





## GLOSARIO

- Cianobacterias:** Bacterias que llevan a cabo la fotosíntesis oxigénica gracias a que poseen pigmentos fotosintéticos (clorofila **a**, beta caroteno y ficobilinas).
- Condiciones de referencia:** Para cualquier masa de agua las condiciones de referencia del tipo al que pertenece son un estado ecológico, en el presente o en el pasado, donde los valores de los elementos hidromorfológicos, fisicoquímicos y biológicos corresponden a los que existen en ausencia de alteraciones antropogénicas o de muy escasa importancia (según Guía REFCOND, 2003).
- Diatomeas bentónicas:** Algas diatomeas que viven asociadas a los sustratos naturales o artificiales sumergidos (no suspendidas en el seno del agua).
- DMA:** Directiva Marco del Agua, Directiva 2000/60/CE. Establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- Epifiton:** Comunidad biológica que vive sobre la vegetación acuática sumergida.
- Epiliton:** Comunidad biológica que vive sobre un sustrato pétreo (piedras, rocas, etc.).
- Epipelon:** Comunidad biológica que vive sobre sedimento.
- Escala de Vernier:** Aparato de medida asociado a la platina mecánica del microscopio que permite anotar la posición relativa transversal y longitudinal de la preparación, con una precisión de 0,1 mm.
- Estaciones de referencia:** Estaciones de muestreo en las masas de agua de ríos, lagos y aguas de transición en las que se encuentran condiciones de referencia.
- Estado ecológico:** En el marco de aplicación de la DMA, se define como una expresión de la calidad de la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos asociados a las aguas superficiales.
- Fitobentos:** Organismos fototróficos que viven asociados a cualquier sustrato del fondo de los ecosistemas acuáticos. Incluye cianobacterias, algas microscópicas (microalgas), macroalgas y macrófitos.
- Frústulo:** Cubierta celular silícica de las diatomeas, formada por dos valvas unidas por dos o más bandas pleurales.
- Helófitos:** Plantas anfibias con la parte inferior sumergida en el agua.
- Hidrófitos:** Plantas acuáticas en sentido estricto, es decir, aquellas que completan su ciclo biológico cuando todas sus partes se encuentran sumergidas o flotando en la superficie del agua.
- Individuo:** Término usado en el protocolo para referirse o bien a valvas o a frústulos intactos de las diatomeas.
- Macrófitos:** Plantas acuáticas visibles a simple vista, entre las que se encuentran plantas vasculares (cormófitos), briófitos y macroalgas (algas caráceas y de otros grupos).
- Microscopio de contraste de fases:** Es un microscopio óptico modificado con un condensador y objetivo especial que controlan la iluminación de forma que se ven contrastadas las sustancias de diferente grosor o densidad.
- Objetivo Nomarski:** Objetivo de contraste interferencial que permite la observación de los objetos de la preparación microscópica con un cierto relieve.
- Ocular micrométrico:** Ocular del microscopio dotado de un sistema de medición, que permite obtener medidas absolutas de los objetos de la preparación. La relación entre cada división del micrométrico y el tamaño real del objeto dependerá del aumento del microscopio.
- Perifiton:** Comunidad microbiótica que vive sobre sustratos sumergidos de diferente naturaleza (sustratos duros, vegetación viva o muerta, etc.).
- Preparación microscópica:** Porta-objetos y cubre-objetos entre los que se monta la muestra de diatomeas.
- Sustrato artificial:** Sustrato introducido en el río por un operador especialmente para la colonización de las diatomeas.
- Taxón:** Unidad taxonómica, por ejemplo familia, género o especie.
- Valva:** Componente estructural del frústulo de las diatomeas.

**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 págs.
- AENOR (2005). Norma española UNE-EN 13946:2004 Calidad del agua. Guía para la identificación, recuento e interpretación de muestras de diatomeas bentónicas de ríos. 16 págs.
- AFNOR (2002). Qualité de l'eau. Détermination de l'Indice Biologique Diatomées (IBD). Norme Française NFT 90-354, juin 2000. Association Française de Normalisation, Saint-Denis La Plain: 63 pp.
- Agència Catalana de l'Aigua (2003). Desenvolupament d'un índex integral de qualitat ecològica i regionalització ambiental dels sistemes lacustres de Catalunya. Centre d'estudis Avançats de Banes (CSIC). 88 págs.
- Agència Catalana de l'Aigua (2003). Anàlisi de la viabilitat i proposta d'indicadors fitobentònics de la qualitat de l'aigua per als cursos fluvials de Catalunya. Universitat de Girona (Institut d'Ecologia Aquàtica) y Universitat de Barcelona (Dep. Biología vegetal. Facultat de Biología). 113 págs.
- Blanco S., Ector L. y E. Bécares (2004). Epiphytic diatoms as water quality indicators in Spanish shallow lakes. *Vie et Milieu* 54: 71-79.
- Blanco S., Ector L. y E. Becarés (2005). Muestreo de fitobentos en ríos, lagos y humedales: requisitos y recomendaciones para la Directiva Marco del Agua, con especial enfoque a los trabajos desarrollados sobre diatomeas en la Cuenca del Duero. *Algas* 34 (en prensa).
- CEMAGREF (1982). Etude des methods biologiques d'appréciation quantitative de la qualité des eaux. Rapport Q.E. Lyon, Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse-Cemagref, Lyon, 218 pp.
- CEN. European Committee for Standardization. 2003 /TC 230. *Water Quality. Guidance for routine sampling and pre-treatment of benthic diatoms from rivers*. EN 13946. 14 pp.
- CEN. European Committee for Standardization. February 2004. *Water Quality. Guidance standard for the identification, enumeration, and interpretation of benthic diatom samples from runnings waters*. pr EN 14407.
- Confederación Hidrográfica del Duero (2005). Establecimiento de las bases para la aplicación de las diatomeas como indicadores de calidad en la cuenca del río Duero. Estudio de la situación actual de la calidad de las aguas superficiales mediante índices de diatomeas en la cuenca. – Campaña verano 2004 – Informe final conjunto. S. Blanco, V. Huck, O. Monnier, E. Bécares y L. Ector (Universidad de León y Centre de Recherche Public - Gabriel Lippmann, Luxembourg), 49 p. + anexo.
- Confederación Hidrográfica del Ebro (2004). 2ª Fase del diseño de la red de diatomeas en la cuenca del Ebro. 2003. J. Goma, J. Cambra (Universidad de Barcelona), V. Huck y L. Ector (Centre de Recherche Public Gabriel Lippmann).
- Confederación Hidrográfica del Norte (2005). Diseño de la red de diatomeas de la Cuenca Hidrográfica del Norte. Informe final. R. Ortiz, V. Huck, J. Cambra y L. Ector (Universidad de Barcelona y Centre de Recherche Public - Gabriel Lippmann, Luxembourg), 59 p. + anexos
- Dell'Uomo A. (1991). Use of benthic macroalgae for monitoring rivers in Italy. In: Whitton, B.A., Rott, E. y G. Friedrich (eds). *Use of Algae for Monitoring Rivers*. *Inst. für botanik. Univ. Innsbruck*: 129-137.
- Dell'Uomo A. (2004). L'indice diatomico di eutrofizzazione/polluzione (EPI-D) nel monitoraggio delle acque correnti. Linee guida. A.P.A.T., A.R.P.A.T., 101 p.
- Descy, J.P. y 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 págs.
- Dodds, W.K., Jones, J.R., y E.B. Welch (1998). Suggested classification of stream trophic state: Distributions of temperate stream types by chlorophyll, total nitrogen, and phosphorus. *Water Research* 32: 1455-1462.
- Douterelo I., Perona E. y P. Mateo (2004). Use of cyanobacteria to assess water quality in runnings waters. *Environmental pollution* 127: 377-384.
- Ector L. y F. Rimet (2005). Using bioindicators to assess rivers in Europe: An overview. In S. Lek, M. Scardi, P.F.M. Verdonschot, J.P. Descy y Y.S. Park (eds). *Modelling community structure in freshwater ecosystems*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg: 7-19.
- European Committee for Standardization (2003). *Water quality - Guidance standard for the routine sampling and pretreatment of benthic diatoms from rivers*. European Standard EN 13946. European Committee for Standardization, Brussels, 14 pp.
- European Committee for Standardization (2004). *Water quality - Guidance standard for the identification, enumeration and interpretation of benthic diatom samples from running waters*. European Standard prEN 14407. European Committee for Standardization, Brussels, 12 pp.
- Gomà J., Ortiz R., Cambra J. y L. Ector (2004). Water quality evaluation in Catalanian Mediterranean rivers using epilithic diatoms as bioindicators. *Vie et Milieu* 54: 81-90.
- Gomà J., Rimet F., Cambra J., Hoffmann L. y L. Ector (2005). Diatom communities and water assessment in mountain rivers of the upper Segre basin (La Cerdanya, Oriental Pyrenees). *Hydrobiologia* 551: 1-17.

- Kelly, M.G. y B.A. Whitton (1998). Biological monitoring of eutrophication in rivers. *Hydrobiologia* 384: 55-67.
- Kelly M.G., Cazaubon A., Coring E., Dell'Uomo A., Ector L., Goldsmith B., Guasch H., Hürlimann J., Jarlman A., Kawecka B., Kwadrans J., Laugaste R., Lindstrom E.A., Leitaó M., Marvan P., Padišák P., Prygiel J., Rott E., Sabater S, van Dam H. y J. Vizin. Recommendations for the routine sampling of diatoms for water quality assessments in Europe. *Journal of Applied Phycology* 10: 215-224.
- Kelly M.G., C.J. Penny y B.A. Whitton (1995). Comparative performance of benthic diatom indices used to assess river water quality. *Hydrobiologia* 302: 179-188.
- Kitner M. y A. Poulícková (2003). Littoral diatoms as indicators for eutrophication of shallow lakes. *Hydrobiologia* 506-509: 519-524.
- Lange-Bertalot, H. (1979). Pollution tolerance of diatoms as a criterion for water quality estimation. *Nova Hedwigia* 64: 285-304.
- Leclercq, L. y B. Maquet (1987). Deux nouveaux indices chimique et diatomique de qualité d'eau courante. Application au Samson et ses affluents (Basin de la Meuse Belge). In: Comparaison avec d'autres indices chimiques, biocénétiques et diatomiques. Document de travail n° 38. Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique, Bruxelles, 113 pp.
- Lecointe, C., M. Coste y J. Prygiel (1993). "OMNIDIA": A software for taxonomy, calculation of diatom indices and inventories management. *Hydrobiologia* 269/270: 509-513.
- Moliner E. y A. Camacho (2002). Recomendaciones para la toma de muestras de agua, biota y sedimentos en humedales. Ministerio de Medio Ambiente. Dirección General de Conservación de la Naturaleza.
- Parlamento Europeo de la Unión Europea (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for the Community action in the field of water policy. *Off. J. Eur. Comm.* 327: 1-72.
- Prygiel J. y M. Coste (1998). Progress in the use of diatoms for monitoring rivers in France. In Prygiel J., B.A. Whitton y J. Bukowska (eds). Use of Algae for Monitoring Rivers – III Agence de l'Eau Artois-Picardie, Douai, France. Pp. 165-179.
- Prygiel, J., M. Coste y J. Bukowska (1999). A review of the major diatom based techniques for the quality assessment of rivers – State of the art in Europe. A: Prygiel, J., B. Whitton y J. Bukowska (eds.): Use of algae for monitoring rivers III: Agence de l'Eau Artois-Picardie. Pp 138-144.
- Prygiel, J. y 27 autores más (2002). Determination of the biological diatom index (IBD NFT 90-354): results of an intercomparison exercise. *Journal of Applied Phycology* 14: 27-39.
- Rimet F., L Ector, H.M. Cauchie y L. Hoffmann (2004). Regional distribution of diatoms assemblages in the headwater streams of Luxembourg. *Hydrobiologia* 520: 105-117.
- Rimet F., H.M. Cauchie, L. Hoffmann & L. Ector (2005) Response of diatom indices to simulated water quality improvements in a river. *Journal of Applied Phycology* 17: 119-128.
- Rott E., G. Hofmann, K. Pall, P. Pfister y E. Pipp (1997). Indikationslisten für Aufwuchsalgen in österreichischen Fließgewässern. Teil 1: Saprobienle Indikation Wasserwirtschaftskataster, Bundesministerium f. Land- u. Forstwirtschaft, Wien, 73 pp.
- Rott E., E. Pipp, P. Pfister, H. Van Dam, K. Ortler, N. Binder y K. Pall (1999). Indikationslisten für Aufwuchsalgen in österreichischen Fließgewässern. Teil 2: Trophieindikation (sowie geochemische Präferenzen, taxonomische und toxikologische Anmerkungen). -Wasserwirtschaftskataster herausgegeben vom Bundesministerium f. Land- u. Forstwirtschaft, Wien, 248 pp.
- Rott E., E. Pipp, P. Pfister (2003). Diatom methods developed for river quality assessment in Austria and a cross-check against numerical trophic indication methods used in Europe. *Algol. Stud.* 110: 91-115.
- Sabater S. (2000). Diatom communities as indicators of environmental stress in the Guadimar River, S.W Spain following a major mine tailings spill. *Journal of Applied Phycology* 12: 113-124.
- Seele J., M. Mayr, F. Staab y U. Raeder (2000). Combination of two indication systems in pre-alpine lakes – diatom index and macrophyte index. *Ecological Modelling* 130: 145 –149.
- Sladeczek, V. (1973). System of water quality from biological point of view. *Archiv für Hydrobiologie Beihefte. Ergebnisse der Limnologie*, 7:1-218.
- Sládeček, V. y A. Sládečkova (1996). Atlas of aquatic organisms with respect to the water supply, surface water and wastewater treatment plants. Praga. 351 pp.
- Trobajo, R., Quintana, X. D. y S. Sabater (2004). Factors affecting the periphytic diatom community in Mediterranean coastal wetlands (Empordà wetlands, NE Spain). *Archiv für Hydrobiologie* 160(3): 375-399.
- Van Dam, H., A. Mertens y J. Sinkeldam (1994). A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from the Netherlands. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology* 28: 117-133.
- Wegl, R. (1983). Index für die limnosaprobität. *Wasser und Abwasser* 26: 1-175.
- Whitton B.A., E. Rott y G. Friedrich (1991). Use of algae for monitoring rivers. Proceedings of an International Symposium at Landesamt für Wasser und Abfall Nordrhein-Westfalen. Düsseldorf, Germany, 26-28 May 1991.
- Whitton B.A. y E. Rott (1996). Use of Algae for Monitoring Rivers II. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> European Workshop, Innsbruck, 1995. Universität Innsbruck. 196 pp.
- Zelinka, M. y P. Marvan (1961). Zur Präzisierung der biologischen Klassifikation der Reinheit fließender Gewässer. *Archiv für Hydrobiologie* 57: 389 –407.



# APÉNDICES

## APÉNDICE 1.

Hoja de campo para el muestreo de diatomeas bentónicas

## APÉNDICE 2.

Método de limpieza de diatomeas



# HOJA DE CAMPO DIATOMEAS



Nº ESTACIÓN:	
CÓDIGO MASA AGUA:	
TIPO:	
UTM:	

RÍO:	
LOCALIDAD:	
TÉCNICO:	
FECHA:	
HORA:	

ANCHO APROX. (m):

PROFUNDIDAD APROX. (cm):

## CARACTERÍSTICAS HIDROMORFOLÓGICAS:

<p><b>VELOCIDAD DE LA CORRIENTE:</b></p> <input type="checkbox"/> MUY RÁPIDA <input type="checkbox"/> RÁPIDA <input type="checkbox"/> LENTA <input type="checkbox"/> AGUA ESTANCADA	<p><b>TIPO CAUCE:</b></p> <input type="checkbox"/> RECTO <input type="checkbox"/> CURVADO <input type="checkbox"/> SINUOSO <input type="checkbox"/> MEANDRIFORME <input type="checkbox"/> ANASTOMOSADO <input type="checkbox"/> OTROS
<p><b>VEGETACIÓN ACUÁTICA</b></p> <input type="checkbox"/> AUSENTE <input type="checkbox"/> PRESENTE: <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> &lt; 10%</li> <li><input type="checkbox"/> 10-50%</li> <li><input type="checkbox"/> &gt; 50%</li> </ul>	<p><b>PORCENTAJE DE SOMBRA EN EL CAUCE:</b></p> <input type="checkbox"/> SOMBREADO CON VENTANAS <input type="checkbox"/> TOTALMENTE EN SOMBRA <input type="checkbox"/> GRANDES CLAROS O EXPUESTO
<p><b>TIPO DE SUBSTRATO (dominancia de):</b></p> <input type="checkbox"/> ROCAS <input type="checkbox"/> ROCAS CON PRESENCIA DE CANTOS RODADOS <input type="checkbox"/> CANTOS RODADOS CON ALGUNAS ROCAS <input type="checkbox"/> CANTOS RODADOS <input type="checkbox"/> CANTOS RODADOS Y ARENA GRUESA <input type="checkbox"/> CANTOS RODADOS PEQUEÑOS Y ARENA FINA <input type="checkbox"/> ARENA GRUESA <input type="checkbox"/> ARENA FINA <input type="checkbox"/> LIMOS <input type="checkbox"/> MACRÓFITOS O ALGAS FILAMENTOSAS <input type="checkbox"/> OTROS:	<p><b>ESQUEMA DEL TRAMO:</b></p>

## CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS:

**TRANSPARENCIA DEL AGUA**

<input type="checkbox"/> fondo visible	<input type="checkbox"/> algo turbio
<input type="checkbox"/> poco visible	<input type="checkbox"/> no visible

TEMPERATURA DEL AGUA (°C):

pH (unidades):

CONDUCTIVIDAD (µS/cm):

OXÍGENO DISUELTO:  mg/l  
 %sat

## USO DEL ENTORNO

agrícola   
  ganadero   
  industrial   
  recreativo   
  urbano   
  servicios  
 ninguno

## IMPACTOS

puente   
  pantano   
  azud   
  aforo   
  canal   
  dique  
 áridos   
 vertidos   
 dragados   
 otros:

## COMENTARIOS





## APÉNDICE 2

### MÉTODO DE LIMPIEZA DE DIATOMEAS

Existen diferentes métodos para limpiar diatomeas, todos ellos especificados en la literatura y perfectamente adecuados para los estudios de calidad del agua. A continuación se detalla el método recomendado.

#### MÉTODO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO CALIENTE

##### Aparatos:

- Campana extractora o sistema equivalente.
- Placa calefactora, baño de arena o baño de agua.
- Vasos de precipitados o tubos de ebullición (uno por muestra).
- Medios para medir volúmenes de 20 ml de agentes oxidantes.
- Pipetas Pasteur limpias.
- Centrifugadora (opcional).
- Tubos de centrifuga. Estos tubos deberían ser resistentes al ataque de agentes oxidantes o ácidos utilizados para limpiar las diatomeas.

Nota. Si no se dispone de centrifugadora, las muestras se pueden dejar sedimentar, después el sobrenadante se puede eliminar con cuidado.

##### Reactivos:

- Solución de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 30% (100 volúmenes).
- Ácido clorhídrico diluido (p.ej. 1M) (HCl).

##### Método:

- Homogenizar la muestra agitando y transferir entre 5 ml y 10 ml de suspensión a un vaso de precipitados o a un tubo de ebullición.
- Añadir aproximadamente 20 ml de peróxido de hidrógeno y calentar en una placa calefactora, baño de arena o baño de agua a aproximadamente  $90 (\pm 5)^\circ C$  hasta que toda la materia orgánica se halla oxi-

dato (normalmente unas 3 horas). En las muestras de macrófitos, los restos del material de las plantas, se pueden quitar después de 30 minutos. Se ha de ir con cuidado al añadir el peróxido de hidrógeno en las muestras ricas de materia orgánica y plantas acuáticas, y también durante el proceso de calentamiento.

- Quitar el vaso de precipitados o el tubo de ebullición del calor.

- Añadir unas cuantas gotas de ácido clorhídrico para eliminar el carbonato cálcico.

- Limpiar con agua destilada o desmineralizada.

- Dejar enfriar en una campana de humos.

Nota: No es necesario añadir ácido clorhídrico si la muestra proviene de una región donde es improbable que se encuentren carbonatos presentes.

- Transferir el contenido del vaso de precipitados o del tubo de ebullición a un tubo de centrifuga. Llenar hasta arriba con agua destilada o desmineralizada y centrifugar. (Ver nota para los detalles de centrifugación en el apartado 1.6.4.1).

- Decantar el sobrenadante y resuspender el *pellet* con agua destilada o desmineralizada y repetir la centrifugación.

- El proceso de limpieza de debería de repetir como mínimo 3 veces, o hasta que todas las trazas de peróxido de hidrógeno se hallan eliminado.

- Cuando todas las trazas de peróxido de hidrógeno y ácido se hallan eliminado, resuspender el *pellet* de diatomeas en una pequeña cantidad de agua destilada o desmineralizada y lo transferimos a un vial limpio y pequeño.

- Añadir unas gotas al 4% de formaldehído o etanol par prevenir el crecimiento de hongos.

- La muestra, entonces, se puede almacenar de forma indefinida.





**Confederación Hidrográfica del Ebro. Comisaría de Aguas**

Paseo Sagasta 24-28 • 50071 Zaragoza • Tel. 976 711 000 • Fax 976 214 596 • E-mail: [che\\_calidad@chebro.es](mailto:che_calidad@chebro.es)