

*Enrique Andreu Moliner
Antonio Camacho González*



Recomendaciones para la toma de muestras de agua, biota y sedimentos en humedales Ramsar

Recommendations for
sampling water, biota
and bottom sediments
in Ramsar wetlands



MINISTERIO
DE MEDIO AMBIENTE
DIRECCIÓN GENERAL
DE CONSERVACIÓN DE LA
NATURALEZA

Recomendaciones para la toma de muestras de agua, biota y sedimentos en humedales Ramsar

Enrique Andreu Moliner
Antonio Camacho González



MedWet



Prof. Dr. Enrique Andreu Moliner

Catedrático de Ecotoxicología

Director de la Sede para el Estudio de los Humedales Mediterráneos (SEHUMED)

Universitat de València

Dr. Antonio Camacho González

Profesor Titular de Ecología

Universitat de València

CON LA COLABORACIÓN DE

Dr. Carlos Almela Vich

Fiscal.

Coordinador del grupo de Fiscales de medio ambiente

Tribunal Superior de Justicia de la Comunidad Valenciana

Profesor Asociado de la Universitat de València

Dr. Luis Burillo Borrego

Ecotoxicólogo Forense

Generalitat Valenciana

Óscar Andreu Sánchez

Ldo. CC. Ambientales

SEHUMED. Universitat de València

Dra. María José Viñals Blasco

Profesora Titular de Geografía Aplicada

Universidad Politécnica de Valencia

Maryland Morant González

Abogada

SEHUMED. Universitat de València

Emilio José Castaño Martínez

Criminólogo

Dr. Sergi Sabater Cortés

Profesor Titular de Ecología

Universitat de Barcelona

Este documento debe ser citado de la siguiente manera:

© ANDREU MOLINER, E. y CAMACHO GONZÁLEZ, A. (2002). Recomendaciones para la toma de muestras de agua, biota y sedimentos en humedales Ramsar. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid, Spain. 226 pp.

© Ministerio de Medio Ambiente. Dirección General de Conservación de la Naturaleza

Edita: Dirección General de Conservación de la Naturaleza (DGCN)
Secretaría General de Medio Ambiente
Ministerio de Medio Ambiente

ISBN: 84-8014-455-6

NIPO: 311-02-057-8

Depósito Legal: M. 23.677-2003

Fotocomposición e impresión: Closas-Orcoyen, S. L.

Polígono Igarsa. Paracuellos de Jarama (Madrid)

ÍNDICE

PRESENTACIÓN	13
PREFACIO	15

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1. ANTECEDENTES Y FINALIDAD DEL PROYECTO	17
I.2. ÁMBITO TEMÁTICO DEL PROYECTO	17
I.3. INTRODUCCIÓN A LA TOMA DE MUESTRAS	18
I.4. ENTIDADES DE NORMALIZACIÓN DE MÉTODOS.....	19
I.5. BREVE DESCRIPCIÓN DE LA PROBLEMÁTICA QUE INCIDE SOBRE LOS HUMEDALES	21
I.5.1. Eutrofización de las aguas	21
I.5.2. Contaminación por sustancias potencialmente tóxicas.....	22
I.5.3. Vertidos sólidos, aterramientos y desecaciones	22
I.5.4. Daños a la fauna y flora y expoliación de especies protegidas	23
I.6. OBJETIVO DE LA TOMA DE MUESTRAS	23
I.7. REQUISITOS DEL AGENTE MUESTREADOR.REQUISITOS LEGALES Y FORMATIVOS PARA EL MUESTREO	23

CAPÍTULO II. MUESTREO

II.1. COORDINACIÓN DEL MUESTREO	25
II.2. TIPOS DE MUESTRAS. MUESTRAS SIMPLES, COMPUESTAS E INTE- GRADAS	26
II.3. LOCALIZACIÓN DE LAS ESTACIONES Y PUNTOS DE MUESTREO	27
II.3.1. Aguas corrientes.....	28
II.3.2. Aguas retenidas	29

II.4.	FRECUENCIA DEL MUESTREO	30
II.5.	APARATOS PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE AGUA.....	30
II.5.1.	Botellas hidrográficas	31
II.5.2.	Sistemas de bombeo.....	31
II.5.3.	Integradores en profundidad	31
II.5.4.	Muestreadores automáticos.....	31
II.6.	PREPARACIÓN DE LOS APARATOS MUESTREADORES	32
II.7.	ENVASES	33
II.7.1.	Generalidades	33
II.7.2.	Limpieza de los envases.....	34
II.8.	CONSIDERACIONES DE SEGURIDAD	34
II.9.	NÚMERO DE REPLICAS DE LA MUESTRA	35
II.10.	CANTIDAD DE MUESTRA	36
II.11.	MATERIAL GENERAL DE MUESTREO.....	36
II.12.	DETERMINACIONES A REALIZAR <i>IN SITU</i>	37
II. 12. 1.	Temperatura	38
II. 12. 2.	Conductividad	38
II. 12. 3.	Oxígeno disuelto	38
II. 12. 4.	pH.....	39
II. 12. 5.	Transparencia del agua.....	40
II. 12. 6.	Análisis de CO ₂ y cloro residual	41
II.13.	DETERMINACIONES DE CAUDALES, NIVELES PIEZOMÉTRICOS Y LÍMNICOS.....	41
II. 13. 1.	Caudal	41
II. 13. 2.	Medidas del nivel del agua superficial.....	42
II. 13. 3.	Medidas del nivel piezométrico del acuífero	43
II.14.	PROCEDIMIENTO DE TOMA DE MUESTRAS	43
II. 14. 1.	Toma manual.....	43
II. 14. 2.	Muestreo automático.....	44
II. 14. 3.	Procesado	44
II.15.	ETIQUETADO DE LAS MUESTRAS	46
II.16.	LIBRO DE REGISTRO DE CAMPO	46
II.17.	CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA	47
II. 17. 1.	Alteraciones potenciales de la muestra durante el almacenaje	48
II. 17. 2.	Métodos de conservación.....	49
II. 17. 3.	Transporte	50

II.18.	CONTROL Y GARANTÍA DE CALIDAD	51
II.19.	PETICIÓN DE ANÁLISIS Y ENTREGA DE LA MUESTRA AL LABORATORIO	51
II.20.	INFORME DEL MUESTREO	52
II.21.	CADENA DE CUSTODIA	52
II.22.	DESTINO DE LAS MUESTRAS	54

CAPÍTULO III. MUESTREO DE ORGANISMOS

III.1.	INTRODUCCIÓN.....	55
III.2.	MUESTREO PARA ANALÍTICAS MICROBIOLÓGICAS	56
III. 2. 1.	Introducción y generalidades.....	56
III. 2. 2.	Selección del lugar de muestreo	57
III. 2. 3.	Procedimiento de muestreo	57
III. 2. 4.	Conservación, transporte y almacenamiento	58
III.3.	PLANCTON.....	58
III. 3. 1.	Introducción y generalidades.....	58
III. 3. 2.	Selección del lugar de muestreo	59
III. 3. 3.	Procedimiento de muestreo	59
III. 3. 4.	Conservación, transporte y almacenamiento	60
III.4.	PERIFITON.....	61
III. 4. 1.	Introducción.....	61
III. 4. 2.	Selección del lugar de muestreo	61
III. 4. 3.	Procedimiento de muestreo	61
III. 4. 4.	Conservación, transporte y almacenamiento	62
III.5.	DIATOMEAS BENTÓNICAS EN HUMEDALES CONTINENTALES	62
III. 5. 1.	Introducción.....	62
III. 5. 2.	Selección del lugar de muestreo	62
III. 5. 3.	Selección del tipo de sustrato en el área de estudio.....	63
III. 5. 4.	Recolección de muestras sobre los sustratos determinados.....	63
III.6.	PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS COMO INDICADORES	64
III. 6. 1.	Introducción.....	64
III. 6. 2.	Selección del lugar de muestreo	65
III. 6. 3.	Procedimiento de muestreo	65
III. 6. 4.	Conservación, transporte y almacenamiento	65
III.7.	MACRÓFITOS	66

III.8. MACROINVERTEBRADOS BÉNTICOS	67
III. 8. 1. Consideraciones generales.....	67
III. 8. 2. Toma de muestras	68
III.8.2 A. Muestreo en aguas corrientes poco profundas.....	68
III.8.2 B. Muestreo en aguas profundas, estáticas o de corriente lenta	70
III.8.3. Conservación y transporte	72
III.9. PECES	72
III. 9. 1. Consideraciones generales.....	72
III. 9. 2. Toma de muestras	72
III. 9. 3. Conservación y transporte	74
III.10. PRUEBAS DE ECOTOXICIDAD EN EL MEDIO ACUÁTICO.....	74
III. 10. 1. Consideraciones generales.....	74
III. 10. 2. Selección de organismos a ensayar.....	76
III. 10. 3. Recolección de organismos	76
III. 10. 4. Manipulación, mantenimiento y condiciones	77
III. 10. 5. Procedimiento general para el desarrollo de las pruebas.....	77
III. 10. 6. Cálculo de la CL_{50} o de la CE_{50}	79
III. 10. 7. Redacción de informes y comunicación de resultados.....	79

CAPÍTULO IV. LODOS Y SEDIMENTOS

IV.1. GENERALIDADES	81
IV.1.1. Criterios para la selección de muestreadores	81
IV.1.2. Tipos de muestreadores.....	82
IV.2. FRECUENCIA Y TIEMPO DE MUESTREO	84
IV.3. ALMACENAJE, TRANSPORTE Y ESTABILIZACIÓN	84
PÁGINAS WEB	87
ANEXO I. Clasificación de tipos de humedales según el Manual de la Convención de Ramsar (1996)	89
ANEXO II. Glosario.....	93
ANEXO III. Modelos de documentos para la cadena de custodia	97
BIBLIOGRAFÍA	195
FIGURAS	199

PRESENTACIÓN

La creación de espacios naturales protegidos en todo el mundo y el acercamiento del hombre a la naturaleza, unido a la valorización creciente por parte de la sociedad, consciente de las funciones y los valores que reportan los humedales, han hecho que en los últimos años estos ecosistemas hayan sido considerados como uno de los más valiosos de la Tierra.

Pese a que la protección y conservación de los humedales se hace evidente, todavía presentan graves amenazas derivadas de la inapropiada utilización que el hombre ha realizado de sus recursos. Con el fin de evitar esta situación, se debe dotar a los responsables ambientales así como a investigadores, docentes y administradores de los ámbitos público y privado de instrumentos y herramientas con las que hacer frente a esta situación y, así, poder incorporar la evaluación de la calidad ecológica en la planificación y gestión de los humedales.

En este sentido, el presente trabajo, realizado por la Sede para el Estudio de los Humedales Mediterráneos (SEHUMED) de la Universidad de Valencia, cumple con este objetivo, a través del estudio realizado sobre los protocolos para la toma de muestras de agua, sedimentos y biota en las zonas húmedas.

El compromiso de realización de este trabajo surge, fundamentalmente, de dos acontecimientos. El primero, como respuesta española a la resolución presentada por el Ministerio español de Medio Ambiente, referente a la calidad de las aguas en humedales, asumida en la COP 7, celebrada en San José (Costa Rica, 1999), como Resolución VII.25: «Evaluación de la calidad de las aguas en humedales» y, en segundo lugar, la Recomendación 27 del MedWet/Com2 surgida en la reunión celebrada en Valencia (España, 2000): en la que se señalaba la posibilidad de elaborar nuevos títulos de la serie de publicaciones MedWet, uno de los cuales estaba referido a la «Calidad del Agua».

Por otro lado, en los planes estratégicos de los países firmantes de la Convención sobre Humedales se recogen algunas de estas directrices relativas a la calidad de las aguas. Tal es el caso del Plan Estratégico para la Conservación y el Uso Racional de los Humedales, que constituye un marco de referencia en la gestión de los humedales españoles.

Este manual se presenta como innovador, por cuanto en el ámbito de las zonas húmedas no existe, en la actualidad, iniciativa alguna similar cuya metodología pueda ser transferida a países de la cuenca mediterránea.

Inés González Doncel
Directora General de Conservación de la Naturaleza
Ministerio de Medio Ambiente
4 de noviembre de 2002

PREFACIO

La Oficina de la Convención de Ramsar da la bienvenida a la publicación de este manual por parte de SEHUMED. Como se expresa en la introducción a esta publicación, la Convención se interesa cada vez en los asuntos relativos a la cantidad y calidad del agua que es necesaria para mantener las características ecológicas de los humedales. Pero esta preocupación, fundamental como es (¡y de un gran sentido común!), es nueva para la Convención y, en general, para aquellos que se interesan en la conservación y uso sostenible de los sistemas de agua dulce y marino-costeros.

Cuánta agua es suficiente para que un sistema funcione correctamente sigue siendo tema de debate. Por ello debemos trabajar en el desarrollo de metodologías adecuadas que permitan una respuesta rápida a esta pregunta, ya que en muchas ocasiones la presión por utilizar el agua disponible es tal que no hay tiempo para largas elucubraciones. El resultado ha sido, con demasiada frecuencia, unas decisiones mal informadas que han tenido un impacto muy negativo sobre el funcionamiento de los sistemas acuáticos.

Con respecto al otro tema fundamental estrechamente relacionado al de la cantidad de agua, el de su calidad, también necesitamos hacer avances a la mayor brevedad posible. El contar con poca agua puede ser desastroso, pero poca agua, o mucha agua, de mala calidad es igualmente perjudicial.

Este manual para la toma de muestras, cadena de custodia y ensayos ecotoxicológicos en humedales constituye, por lo tanto, una contribución práctica que puede ser de mucha utilidad para los responsables de conservar las características ecológicas de los humedales en general y, en particular, de aquellos que han sido incluidos por los países miembros de la Convención en la Lista de Humedales de Importancia Internacional (la Lista de Ramsar). La Convención ha elaborado y sigue elaborando orientaciones técnicas para ayudar a los países a cumplir con las obligaciones que contraen al incluir sitios en la Lista. Estoy seguro que este manual, si bien no ha pasado por el proceso de revisión del Grupo de Examen Científico y Técnico de la Convención, será muy bien recibido por los técnicos que muchas veces son conscientes de las obligaciones que tienen con respecto a Ramsar, pero se sienten indefensos ante la falta de instrumentos adecuados para cumplir con ellas.

Agradezco sinceramente este esfuerzo de SEHUMED y espero que la Convención pueda seguir contando con aportes tan útiles como éste en el futuro.

Delmar Blasco
Secretario General
Convención sobre los Humedales (Ramsar, Irán, 1971)
2 de octubre de 2002

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1. ANTECEDENTES Y FINALIDAD DEL PROYECTO. REFERENCIA A LA CONVENCIÓN DE RAMSAR

La Convención sobre los Humedales (Ramsar, Irán, 1971) ha ido estableciendo resoluciones y recomendaciones relativas a la calidad de las aguas. En este sentido, la Recomendación 6.14 de la 6ª Reunión de la Conferencia de las Partes Contratantes de la Convención de Ramsar sobre los Humedales (COP6), relativa a los productos tóxicos en los humedales, insta a las Partes a mantener programas de estudio, seguimiento y control sobre dichos productos en los ecosistemas de humedal. Por su parte, fue en la 7ª Reunión de la Conferencia de las Partes Contratantes de la Convención de Ramsar sobre los Humedales (COP7), celebrada en San José (Costa Rica, 1999), cuando se adoptó la Resolución VII.25 de «*Evaluación de calidad de las aguas en Humedales*».

El presente trabajo, realizado por la Sede para el Estudio de los Humedales Mediterráneos (SEHUMED) de la Universidad de Valencia, atendiendo a las indicadas recomendaciones y resoluciones Ramsar, tiene como finalidad la elaboración de una revisión sobre métodos de toma de muestras en agua, sedimentos y biota para la realización de análisis y estudios biológicos y físico-químicos.

I.2. ÁMBITO TEMÁTICO DEL PROYECTO

En este manual se realizan recomendaciones metodológicas para los siguientes protocolos;

- toma de muestras de agua, biota y sedimentos para análisis físico-químicos y/o biológicos.
- toma de muestras para ensayos biológicos de la calidad de las aguas;
- bioensayos de ecotoxicidad en aguas y sedimentos.

Se pretende que el manual sea utilizable en la redacción de estudios e informes, así como en la ejecución de proyectos y programas de actuación sobre calidad de los hábitats

de humedal. Cabe, asimismo, recomendar su uso para el desarrollo de criterios y métodos para la incorporación de la evaluación de la calidad ecológica de los humedales en la planificación medioambiental.

También tiene un uso como herramienta docente en la formación y capacitación de personal técnico especializado.

Está destinado a técnicos y agentes medioambientales, así como a investigadores, docentes, administradores y gestores del medio ambiente, en los ámbitos público y privado.

Por otro lado, el trabajo que se presenta se configura como una herramienta que puede ser utilizada y extrapolada a países de la cuenca mediterránea en el seno de la Iniciativa para los Humedales Mediterráneos (MedWet), creada en Grado (Italia) en 1991. Se trata de una estructura de aplicación de la Convención, a nivel regional, apoyada por una red de centros especializados en humedales, entre ellos SEHUMED.

I.3. INTRODUCCIÓN A LA TOMA DE MUESTRAS

Los humedales son ecosistemas de una extraordinaria importancia, tanto por su relevancia ecológica como por ser depositarios de un gran valor cultural, científico, económico y recreativo. En el manual de la Convención Ramsar publicado en 1996 se recoge una primera aproximación a las características de los humedales:

«Los humedales, en general, son sistemas intermedios entre ambientes permanentemente inundados y ambientes normalmente secos. Muestran una enorme diversidad de acuerdo con su origen, localización geográfica, régimen acuático y químico, vegetación dominante y características del suelo y sedimentos. Puede existir una variación considerable en un mismo humedal y entre diferentes humedales próximos unos a otros, formando no sólo ecosistemas distintos, sino paisajes diferentes.»

Quizá la definición anterior no aclare totalmente lo que es un humedal, más aún si se trata de identificar con ello la amplia lista de tipologías (ver anexo I). En ella se recogen como humedales tanto zonas marinas y costeras como multitud de zonas húmedas continentales. Posiblemente resultaría de mayor utilidad usar una definición más intuitiva donde, manteniendo el criterio amplio, se podría considerar como humedal aquella «zona de terreno que está cubierta de agua de forma temporal o permanente», o en las que «se produce afloramientos de acuíferos hasta zonas muy próximas a la superficie del terreno con lo que determinan las condiciones para los seres vivos que allí habitan». Si se limita en esa definición el espesor de la masa de agua, en el caso de sistemas marinos, a unos escasos metros todavía se mantiene en esta definición diversos tipos de humedales costeros y, además, engloba a todas las zonas húmedas continentales, ríos y lagos incluidos. También incluiría a todo lo que a primera vista se asocia con la palabra «humedal» muy próxima al concepto de zona encharcable o palustre más o menos permanentemente (Figuras 1 a 4). No se debe olvidar que la actividad humana también construye humedales artificiales y un buen ejemplo de éstos puede ser un embalse (Figuras 5 a 7).

Este tipo de consideraciones aproxima a la definición amplia de humedales que adopta la Convención Ramsar para determinar los humedales que se incluyen bajo su protección:

«extensiones de marismas, pantanos y turberas, o extensiones cubiertas de agua, sean éstas de régimen natural o artificial, permanentes o temporales, estancadas o corrientes, dulces, salobres o saladas, incluidas las de agua marina cuya profundidad en marea baja no exceda de seis metros»

Para la evaluación y control de la calidad ecológica de las zonas húmedas resulta imprescindible la toma de muestras tanto de la matriz agua o los sedimentos cubiertos por ésta como de la biota que los habita. La forma en que las muestras son obtenidas resulta determinante para recabar una información verídica sobre el estado ecológico del humedal. Un viejo axioma de la determinación analítica es que «cualquier método analítico, aunque utilice la técnica más sensible, ve limitada su precisión por la representatividad de la muestra analizada».

La muestra, pues, debe representar con exactitud al material del que procede y no debe sufrir alteraciones desde el momento en que es tomada hasta la realización del análisis requerido. Durante la toma de muestras y en el tiempo transcurrido hasta el inicio del análisis pueden producirse alteraciones de las mismas, bien derivadas de una contaminación por una limpieza defectuosa del material utilizado, bien por los propios cambios físico-químicos y biológicos que se producen en ella con el paso del tiempo. Los métodos que se emplean en la analítica han sido normalizados, pero los resultados de los análisis sólo alcanzarán una calidad máxima que viene determinada por la toma de la muestra.

En el presente manual se pretende ilustrar sobre los procedimientos generales y particulares para la toma y conservación de muestras en humedales, tanto de las matrices (agua y sedimento) como de los principales grupos de seres vivos que son utilizados como indicadores de la calidad ecológica de las zonas húmedas. Estos procedimientos se han desarrollado tratando de simplificar al máximo las técnicas sin descuidar los detalles que sean fundamentales. La consulta de este manual permitirá a las personas encargadas de la toma de muestras determinar los procedimientos de muestreo más adecuados para sus aplicaciones específicas, que en su caso pueden ser complementados con la búsqueda en bibliografía más específica. En cualquier caso, la elección de los procedimientos se hará siempre, si la hubiera, siguiendo la normativa legal vigente en el territorio en el que se aplique.

Para evitar la repetición de determinados aspectos en el texto, algunos temas que afectan a diversos apartados se han recogido sólo en alguno de ellos, haciendo referencia en el resto. Por ello, para la obtención de una visión de conjunto se recomienda la lectura completa de este manual, pudiendo consultar posteriormente los apartados específicos en caso de necesidad. Dado que los métodos de muestreo son diferentes en función del material a muestrear, se describen una serie de métodos generales, así como su particularización para la toma de muestras de materiales concretos, divididos en tres tipos: agua, sedimentos y seres vivos (biota).

La gran mayoría de las generalizaciones realizadas en la primera parte son directamente aplicables al caso de muestras de agua, realizándose en capítulos posteriores la particularización para el muestreo de biota (básicamente organismos indicadores) y sedimentos.

I.4. ENTIDADES DE NORMALIZACIÓN DE MÉTODOS

Tanto para algunos de los métodos de muestreo como para todos los analíticos se pueden encontrar protocolos establecidos por entidades de normalización o agencias estatales

o plurinacionales que tienen entre sus objetivos la edición de normas. Entre ellas se encuentra la Organización Internacional de Normalización (International Organization for Standardization, ISO), con sede en Ginebra (Suiza), de la que son miembros las entidades nacionales de normalización y cuyos comités de trabajo dictan métodos normalizados.

En la Unión Europea el organismo encargado de establecer normas europeas (EN) es el Comité Europeo de Normalización (CEN), con sede en Bruselas, que actúa en coordinación con ISO, por lo que las normativas de ambos organismos son similares. Las entidades nacionales de normalización trabajan en los comités internacionales y son las encargadas de transponer al país en cuestión la normativa internacional, como AENOR (Asociación Española de Normalización y Certificación) en España (normas UNE) o AFNOR en Francia.

En España AENOR distribuye, previo pago, la normativa transpuesta. En lo que se refiere al muestreo para la determinación de la calidad de las aguas, algunas de las principales normas ISO actualmente vigentes son las siguientes (AENOR, 1997):

- ISO 5667-1:1980 (UNE-EN 25667-1:1993). Calidad del agua. Muestreo. Parte 1: Guía para el diseño de los programas de muestreo.
- ISO 5667-2:1991 (UNE-EN 25667-2:1993). Calidad del agua. Muestreo. Parte 2: Guía para las técnicas de muestreo.
- ISO 5667-3:1994 (UNE-EN 25667-3:1995). Calidad del agua. Muestreo. Parte 3: Guía para la conservación y la manipulación de muestras.

Además, existen otras normas ISO 5667 (desde la 4 hasta la 18) en las que se recogen características especiales del muestreo en distintos ambientes acuáticos o diferentes tipos de aguas y sedimentos. Para la biota, la normativa ISO hace especial hincapié en el muestreo de macroinvertebrados acuáticos, siendo las principales normas las siguientes:

- ISO 7828:1985 (UNE-EN 27828:1994). Calidad del agua. Métodos de muestreo biológico. Guía para el muestreo manual con red de macroinvertebrados bentónicos.
- ISO 8265:1988 (UNE-EN 28265:1994). Calidad del agua. Concepción y utilización de los muestreadores de macroinvertebrados benthicos sobre substrato rocoso en aguas dulces poco profundas.
- ISO 9391:1993 (UNE-EN 9391:1995). Calidad del agua. Muestreo de macroinvertebrados en aguas profundas. Guía de utilización de aparatos de toma de muestra de colonización cuantitativos y cualitativos.

La Unión Europea, en su Directiva 2000/60/CE, «Marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas» (Unión Europea, 2000), establece que «los métodos empleados para controlar los parámetros de cada tipo serán conformes a las normas internacionales EN-ISO o a cualesquiera otras normas nacionales o internacionales que garanticen el suministro de información de calidad y comparabilidad científica equivalentes».

Por otro lado, la Agencia Ambiental Europea (EEA) tiene elaborados numerosos informes sobre el estado de los ecosistemas y recursos acuáticos en la Unión Europea.

En los Estados Unidos de América existen diversas entidades que han establecido métodos normalizados relacionados con la toma y análisis de muestras ambientales. Una de ellas es la Agencia de Protección Ambiental (USEPA) que tiene publicados diversos manuales sobre muestreos en matrices propias de los humedales y en general sobre el muestreo de agua (USEPA, 1992). Por otro lado, la American Public Health Association (APHA),

en colaboración con la American Water Works Association (AWWA) y la Water Environment Federation (WEF), publican periódicamente el manual «Standard methods for the examination of water and wastewater» (APHA-AWWA-WEF; 1992), en el que se recogen detalladamente todos los métodos normalizados para el análisis de las aguas y que incluye un capítulo referido a la toma de muestras.

La información recogida en las publicaciones de las entidades citadas en este apartado puede resultar de utilidad para el agente muestreador, quien deberá, en último término, atenerse a la normativa legal vigente en el lugar en el que se realiza la toma de muestras. Los contenidos del presente manual se han elaborado considerando dichas publicaciones, complementadas por los conocimientos personales de los autores y el asesoramiento de otros expertos en la materia de reconocido prestigio internacional.

I.5. BREVE DESCRIPCIÓN DE LA PROBLEMÁTICA QUE INCIDE SOBRE LOS HUMEDALES

Aunque la problemática e impactos que inciden sobre los humedales es muy diversa, en las siguientes líneas se recoge, a efectos ilustrativos, una breve descripción de algunos de los principales impactos que sufren estos ecosistemas. Su lectura rápida orientará al agente muestreador sobre determinados impactos a los que deberá prestar atención en el trabajo de campo para dar constancia de su existencia cuando corresponda. No debe olvidarse que los impactos sufridos por los humedales no son siempre puntuales, sino que muchas veces son crónicos y persistentes en el tiempo; no por ello debe dejar de prestarse atención a su tratamiento y estudio.

I.5.1. Eutrofización de las aguas

Es el aumento del nivel trófico del sistema. Esto es, la cantidad de alimento disponible se incrementa. Los seres vivos precisan para su vida, entre otras, de una fuente de nutrientes y de una fuente energética. La materia orgánica, procedente de otros seres vivos, constituye la fuente de ambos para los organismos heterótrofos (quimioheterótrofos). La materia orgánica aportada a los sistemas acuáticos constituye, de por sí, una fuente de alimentos para muchos seres vivos que cuando es aportada en grandes cantidades al medio acuático hace que la abundancia de los mismos pueda aumentar a niveles superiores a los naturales, constituyendo una alteración del ecosistema. Por otro lado, existen organismos cuyas fuentes de nutrientes son inorgánicas y cuyo suministro energético proviene de la luz solar; son los organismos fotoautótrofos, cuyo ejemplo más conocido serían las plantas. Puesto que estos organismos necesitan fuentes inorgánicas de nutrientes, cualquier proceso que aporte cantidades adicionales de estos nutrientes a las aguas favorece su crecimiento más allá de lo que supondrían las condiciones naturales (Figuras 8 y 9).

Entre estos elementos inorgánicos, necesarios para la generación de materia viva por los organismos autótrofos, están el nitrógeno y el fósforo, cuya disponibilidad de forma natural en las aguas suele ser bastante reducida. De esta manera se controla la proliferación excesiva de los organismos fotoautótrofos. Tanto la degradación de la materia orgánica, en la que se liberan sus constituyentes fundamentales (entre ellos nitrógeno y fósforo), como el aporte directo de compuestos con estos elementos, normalmente asociado a las actividades humanas (aguas residuales o depuradas sin tratamiento terciario, fertilizantes, ...), su-

ponen un aumento de sus concentraciones naturales alterando las poblaciones que allí se desarrollan, así como su abundancia. El exceso de materia orgánica, tanto de origen alóctono como autóctono, es depositado en los sedimentos del humedal o exportado a otros sistemas acuáticos, donde sigue alimentando el proceso eutrofizador.

I.5.2. Contaminación por sustancias potencialmente tóxicas

La actividad humana es responsable del aporte al medio ambiente de numerosos productos, normalmente de síntesis o resultantes de procesos de transformación, que pueden producir daños ambientales también en las zonas húmedas. Los productos fitosanitarios (plaguicidas y otros biocidas) y las sustancias derivadas de su degradación pueden producir efectos letales o crónicos en los seres vivos, potenciados por la bioconcentración que se da en la cadena alimentaria desde niveles inferiores hacia los superiores. Los residuos industriales pueden contener materias tóxicas (metales pesados, sustancias orgánicas) que son arrastradas por las aguas acabando en los humedales. Las aguas residuales urbanas y los lixiviados de los vertederos de residuos sólidos urbanos también contaminan las aguas aportando microorganismos patógenos, materia orgánica, nutrientes y moléculas complejas con potencial efecto perjudicial. Incluso las aguas residuales depuradas pueden ser deletéreas sobre la calidad ambiental si el proceso de eliminación de materia orgánica no ha sido completo e incluso, aun siéndolo, si no se acompaña de un tratamiento terciario de eliminación de nutrientes, puede provocar la eutrofización de las aguas. Asimismo, los residuos agrícolas y ganaderos (purines, vinazas, alpechines, estiércol, ...) pueden provocar un efecto similar.

Por otro lado, cada vez es más frecuente el vertido de hidrocarburos, aceites y grasas a los sistemas acuáticos donde forman una película superficial que impide el intercambio de gases entre el agua y la atmósfera, provocando la muerte por asfixia de numerosos seres vivos, además de la toxicidad química y el efecto físico directo sobre la biota.

I.5.3. Vertidos sólidos, aterramientos y desecaciones

En algunos casos los humedales han sido utilizados como vertederos, un lugar donde se abandonaban desechos sólidos y también orgánicos (restos de muebles, escombros, animales muertos, etc.). Esto supone tanto un impacto visual como potencialmente contaminante del humedal.

Los humedales también han sido considerados históricamente como zonas insalubres. Este hecho, unido a la ambición por conseguir terrenos cultivables o urbanizables, ha llevado al aterramiento no autorizado de muchas zonas húmedas en aras a lograr su total desecación. También el encauzamiento desproporcionado de cauces fluviales destruye valiosos ecosistemas de ribera, al igual que los aterramientos y construcciones ilegales pueden provocar un taponamiento del lecho natural causando efectos catastróficos sobre el medio ambiente y la población. Todos estos impactos son tan perjudiciales, o más, para el humedal como pudiera serlo un vertido de aguas residuales.

El uso indiscriminado de los recursos hídricos, tanto superficiales como subterráneos, merma la alimentación y el mantenimiento de los niveles hídricos de los humedales. De igual manera, la derivación de caudales alóctonos hacia los humedales puede provocar

cambios en sus características naturales, por lo que únicamente son aconsejables después del estudio previo de sus posibles efectos.

I.5.4. Daños a la fauna y flora y expoliación de especies protegidas

Los humedales son lugares de extraordinaria importancia como reservas de una elevada diversidad biológica y refugio de seres vivos, incluyendo en muchos casos especies endémicas o en peligro de extinción.

I.6. OBJETIVO DE LA TOMA DE MUESTRAS

El objetivo de la toma de muestras es recoger una porción del material que se desea analizar, suficientemente pequeña para ser transportada adecuadamente y manejada en el laboratorio, mientras todavía represente fielmente el material muestreado. Ello implica que las proporciones relativas y las concentraciones de cada componente de la muestra deben ser las mismas que en el material original, que la muestra debe ser homogénea y debe ser manipulada de manera que no se produzcan cambios significativos en su composición antes del análisis. Una vez tomada la muestra se debe seguir un protocolo de conservación que permita que la muestra llegue sin alteración al laboratorio. Dicho protocolo incluye procedimientos generales y otros particulares para analíticas determinadas.

Los programas de muestreo se diseñan con el objetivo de caracterizar el estado de un determinado ecosistema, controlar su calidad, planificar la gestión o investigar los posibles impactos que pueda sufrir el sistema en cuestión.

Las muestras tomadas se pueden dedicar a la realización de determinaciones de variables físicas, químicas o biológicas. Cada muestra debe ser tratada de forma individualizada dependiendo de las características de la matriz, de los factores que influyan sobre ella y de las sustancias que deban analizarse

I.7. REQUISITOS DEL AGENTE MUESTREADOR. REQUISITOS LEGALES Y FORMATIVOS PARA EL MUESTREO

La persona que realiza la toma de muestras es responsable de la validez de la misma. Para la determinación exacta del protocolo de muestreo debería ponerse en contacto con el laboratorio que va a realizar la analítica, ya que los protocolos de toma y conservación pueden depender del método analítico a utilizar.

La persona que realiza la toma de muestras con efectos legales deberá estar facultada por la autoridad competente, resultando de utilidad la expedición por la misma de un permiso de toma. Su formación deberá estar orientada a conocer aquellos aspectos que pueden incidir en la buena realización del proceso de la toma de muestras, pero deberá estar asesorado por los especialistas oportunos, cuando sea necesario, requiriéndose por lo general una coordinación entre los diferentes profesionales implicados. La realización de cursos, eminentemente prácticos, en los que el agente muestreador pueda adquirir una formación específica en los distintos aspectos de interés en la toma de muestra resulta muy conveniente para el perfeccionamiento del proceso de muestreo.

CAPÍTULO II

MUESTREO

II.1. COORDINACIÓN DEL MUESTREO

La toma de muestras y su posterior análisis es una labor costosa. Por ello, antes de comenzar la recolección sistemática de muestras, debe plantearse qué es lo que se pretende obtener del muestreo y diseñarlo de acuerdo con los objetivos marcados.

En general, el estudio de la calidad ambiental del medio natural requiere la coordinación del trabajo de profesionales de muy diversas disciplinas, por lo que el presente manual y sus recomendaciones puede servir como guía orientativa, pero nunca podrá por sí sólo sustituir al necesario proceso de coordinación para una buena obtención de muestras, en la que se implican la persona que actúa como agente muestreador, el solicitante del análisis, el laboratorio encargado del análisis de las muestras, las autoridades competentes, etc... En cualquier caso es recomendable definir a una persona responsable que actúe como coordinador del proceso, a quien se dirigirán el resto de los miembros del equipo en caso de necesidad, y que deberá estar localizable de manera permanente. Resulta conveniente que el coordinador posea un suplente.

Los protocolos a utilizar en cada caso deberán ser recogidos por escrito, con la mayor precisión posible. Ello permite que, en caso de urgencia, puedan tomarse las muestras siguiendo un protocolo normalizado, sin mayor dilación. En estas ocasiones el agente muestreador debe prestar una atención máxima a la identificación del problema, lo que le permitirá aplicar el protocolo de muestreo adecuado sobre la base de su propio criterio cuando esto sea necesario.

La necesaria coordinación permitirá establecer los objetivos y la planificación del muestreo y el protocolo específico de muestreo en cada caso, incluyendo:

- localización de los puntos de muestreo
- frecuencia del muestreo
- matrices a muestrear
- preferencias en el caso de existir limitaciones
- método de muestreo
- número de muestras

- tipo de muestras a tomar
- cantidad de muestra a tomar
- material específico de muestreo
- envases
- determinaciones a realizar *in situ*
- métodos de conservación
- sistemas de transporte
- medidas de seguridad
- control de calidad
- niveles de sensibilidad requeridos en los análisis
- codificación e información necesaria sobre las muestras.

A efectos de coordinación y diseño del programa de muestreo, puede encontrarse una descripción detallada del mismo en la norma ISO 5667-1:1980 (UNE-EN 25667-1:1993), «Guía para el diseño de los programas de muestreo» (AENOR, 1997). En dicha norma también se pueden encontrar especificaciones sobre la toma de muestras de agua en otros sistemas (aguas industriales, de abastecimiento, subterráneas, residuales urbanas, etc.).

II.2. TIPOS DE MUESTRAS. MUESTRAS SIMPLES, COMPUESTAS E INTEGRADAS

Las muestras pueden ser representativas de un material recogido en un lugar determinado en un momento puntual, del mismo material y sus cambios a lo largo de un período de tiempo, o de una misma matriz tomada en distintos puntos de muestreo más o menos relacionados. En lo que a esto se refiere, la elección de la estrategia de muestreo depende de los objetivos que se persigan, ya que a veces resulta más informativo el análisis de muchas muestras en vez de una sola, mientras que en otros puede ser conveniente mezclar muestras tomadas en distintos puntos o en un mismo punto a diversos tiempos para obtener la información requerida. Así, podemos distinguir entre los siguientes tipos de muestras:

Muestras simples o puntuales. Son representativas de un punto de muestreo concreto en un momento determinado y se toman para su análisis individual. Este tipo de muestras es adecuado para matrices de composición estable en el tiempo, o bien para realizar el muestreo en distintos puntos o a distintos tiempos, obteniendo información sobre la naturaleza y amplitud de variaciones. En ese caso la frecuencia de recogida de muestras deberá ser suficiente para mostrar la variación temporal que pueda producirse.

Muestras compuestas-tiempo. Las muestras compuestas (integradas en el tiempo) consisten en la mezcla y homogeneización, realizada con suavidad, de muestras puntuales recogidas en un mismo punto a lo largo de un período de tiempo. Son apropiadas para evaluar la calidad media de matrices cuya composición presenta variabilidad temporal, reduciendo el número de muestras a analizar, pero también la información obtenida. La contribución de cada muestra a la mezcla debe, por lo general, ser proporcional al caudal; no obstante, varias modalidades de muestreos compuestas: *a)* fijando el intervalo de tiempo y manteniendo constante el volumen de muestra, *b)* fijando el intervalo de tiempo y obteniendo un volumen de muestra proporcional al caudal, *c)* fijando el volumen de muestra y variando el tiempo de obtención proporcionalmente al caudal. La amplitud del intervalo de tiempo durante el cual submuestras puntuales tomadas a diferentes tiempos se pueden integrar en una muestra compuesta-tiempo viene limitada por el tiempo máximo en el que se pueden demorar los análisis a realizar en dicha muestra.

La muestra compuesta más utilizada es aquella que abarca un período de 24 horas, integrando temporalmente la variabilidad diaria de la matriz mediante la toma de cantidades iguales de muestra cada cierto intervalo de tiempo. En ese sentido debe tenerse en cuenta que debido a los ciclos productivos asociados a la actividad humana pueden existir marcadas diferencias entre los días laborables y los fines de semana o períodos vacacionales. También en aquellos puntos de muestreo afectados por vertidos deberá ajustarse la integración temporal al ritmo de las actividades que allí se generan. La utilización de muestreadores automáticos estará condicionada a una adecuada conservación de la muestra durante el período de tiempo en el cual se está muestreando.

Muestras integradas. Consisten en la mezcla de muestras puntuales recogidas simultáneamente en distintos puntos o profundidades de muestreo. Son apropiadas para evaluar la calidad media de matrices en las que existe heterogeneidad en el espacio, aunque con ellas se pierde parte de la información sobre dicha heterogeneidad. La contribución de cada muestra a la mezcla puede ser similar, o proporcional a parámetros como volumen, caudal o la magnitud del espacio del que son representativas. La muestra integrada en profundidad puede ser recogida también de manera unitaria, mediante diversos procedimientos (ver apartado II.5.3). La mezcla de las muestras puntuales para dar la muestra integrada deberá realizarse de manera que se evite la alteración de sus componentes.

Puesto que para determinados análisis, como son los compuestos orgánicos volátiles, aceites, grasas e hidrocarburos totales, el proceso de mezcla y la manipulación de la muestra pueden alterar el resultado del análisis y, además, si se trata de sustancias menos densas que el agua se acumulan en la película superficial, la determinación de estos parámetros se realizará siempre sobre muestras puntuales, tomadas en la superficie.

Por otro lado, existen diversas analíticas que deben hacerse rápidamente en el laboratorio, como los análisis microbiológicos, *in situ*, como la temperatura o la transparencia del agua, o añadiendo un reactivo inmediatamente después de su recolección, tales como los sulfuros que se bloquean con acetato de zinc. Esto hace que resulte inviable la determinación de estos analitos en muestras compuestas o integradas, debiendo tomarse para su determinación muestras simples o medidas directas *in situ*, cuando sea posible.

Además de los analitos ya mencionados, existen otros cuyas concentraciones relativas pueden cambiar como consecuencia de variaciones en los anteriores, por lo que su determinación no podrá realizarse tampoco en muestras compuestas.

Un ejemplo, extensible a la determinación de otros compuestos cuyo estado de oxidación puede ser alterado por el cambio en las condiciones de óxido-reducción, sería el análisis de hierro soluble, ya que la forma reducida del hierro (Fe^{2+}) se mantiene mayoritariamente soluble en el agua, mientras que la oxigenación de la muestra puede provocar la oxidación a hierro trivalente (Fe^{3+}) que forma complejos insolubles; en este mismo ejemplo no habría, en cambio, mayor problema si la determinación a realizar fuera de hierro total.

II.3. LOCALIZACIÓN DE LAS ESTACIONES Y PUNTOS DE MUESTREO

Para la correcta realización de una campaña de muestreo debe recopilarse previamente toda la información posible sobre la zona a estudiar. Este requisito puede ser obviado en el caso de que la urgencia de la actuación exija de un muestreo inmediato. Entre la información que es deseable disponer previamente al muestreo se puede señalar:

- Accesibilidad de la zona, cartografía y posibilidad de acceso con vehículos.
- Personas de contacto: Guardería, agentes de seguridad, lugareños.
- Características naturales de la zona de muestreo.
- Impactos habituales en la zona de muestreo. Uso del territorio y principales actividades económicas en la zona.

Debe establecerse un número de estaciones suficiente para caracterizar las diferencias fundamentales entre las distintas partes del humedal. Si existieran aportes o salidas de agua, algunas estaciones de muestreo deberán recoger su influencia, siendo necesaria también la caracterización de los mismos. Las aguas estancadas presentarán también características diferentes a las aguas corrientes, lo cual establece otro criterio de selección de las estaciones, ya que si se quiere obtener una representatividad total deberán tomarse muestras tanto en las zonas de aguas estancadas como corrientes, si las hubiera. No obstante, si existe una restricción en el número de muestras que es posible obtener y procesar y las zonas de aguas corrientes son dominantes, el muestreo de éstas aporta más información, ya que son más representativas del conjunto de la masa de agua, debiendo optarse por su muestreo preferente. La accesibilidad de la zona también se tendrá en cuenta a la hora de realizar la elección de los puntos de muestreo, aunque no será un criterio preferente.

Deben situarse exactamente los lugares de muestreo, tanto mediante su localización en mapas como incluyendo señales que permitan identificar el punto exacto de la estación de muestreo, asimismo señalando referencias paisajísticas inequívocas de carácter permanente. Estas señales pueden ser mojones u otro tipo de marcas sobre estructuras permanentes, o boyas en el caso de sistemas profundos y extensos. También es posible el uso de los modernos sistemas de información geográfica, como el GPS, para la localización exacta del punto de muestreo, aunque en ese caso cualquier agente muestreador que tuviera en un futuro que muestrear en la misma estación debería ir provisto del mismo sistema de localización; hasta que se produzca la generalización del uso de estos sistemas, sigue siendo preferible el balizado por técnicas clásicas.

II.3.1. Aguas corrientes

En aguas corrientes en las que se sospeche que se produce cualquier tipo de vertidos o, aun sin existir éstos, se desee conocer su estado químico o ecológico deberán establecerse diversos puntos de muestreo.

En todos los casos es recomendable que uno de los puntos de toma se localice aguas arriba de la posible fuente de vertidos, a una distancia suficiente como para no verse afectado por el mismo, otro punto de muestreo se localizará aguas abajo de ese lugar, a la distancia adecuada para determinar la influencia del mismo. Una tercera muestra debe ser representativa del propio vertido, siempre que sea posible su localización y toma directa. Cuando la toma de muestras se realice en alguna estación de cualquier Red (referencia, representativa o de impacto) preestablecida, será suficiente realizar un solo punto de muestreo.

La detección de vertidos y sus zonas de influencia podrá realizarse tanto por su impacto visual como por medidas de determinados parámetros realizadas *in situ* (temperatura, conductividad, etc.). Todas esas tomas se realizarán en zonas donde la mezcla sea homogénea (integral). En el caso de puntos de toma de agua para cualquier otro uso deberá tomarse también una muestra en ese punto. Cuando se tenga que muestrear un cauce tributario, el muestreo se realizará en un punto cercano a la confluencia con el cauce principal.

Las aguas corrientes, como las de los ríos, pueden presentar una mezcla total muy rápida como consecuencia de las turbulencias; por ello, la toma de una muestra a una profundidad de un metro puede ser suficiente, aunque si el curso es profundo resulta conveniente la obtención de una muestra profunda, sin tomar contacto con el fondo. No resulta conveniente la toma de agua directamente de la superficie, salvo que sea para la detección de sustancias o materiales con menor densidad que el agua, en cuyo caso sólo la muestra para la detección de esa sustancia deberá tomarse en superficie. El resto, como se ha indicado, debe tomarse en un punto central de la corriente, siempre por debajo de la capa superficial, incluso si la profundidad no es grande.

Si se dispone de equipo adecuado, por ejemplo, un tubo integrador (ver apartado II.5.3), resulta conveniente la toma de una muestra integrada desde la superficie hasta el fondo.

Cuando en la muestra se vayan a realizar determinaciones de compuestos volátiles se evitarán los puntos de muestreo con elevada turbulencia, ya que dichos componentes pueden perderse parcialmente.

Si las muestras se van a obtener de una fuente de caudal regulado, deberá dejarse que fluya durante el tiempo suficiente como para que ésta sea significativa.

II.3.2. Aguas retenidas

Se entiende como tales aquellas masas de agua en las que no existe un flujo apreciable, como la mayoría de los lagos, embalses, lagunas someras, balsas, etc. En las masas de aguas retenidas, la heterogeneidad horizontal también puede ser importante, por lo que la situación de las estaciones de muestreo deberá tratar de recogerla al máximo, acogiéndose a los criterios marcados en los apartados anteriores. Dicha heterogeneidad puede venir determinada no sólo por los aportes de caudales externos, sino también por otros factores como la morfometría del humedal, la época del año, la acción del viento, etc. Si únicamente se establece un punto de muestreo, éste se localizará preferentemente en una zona central del sistema.

Además de la heterogeneidad horizontal, las masas de agua retenidas pueden, en función de su profundidad y de factores físicos, presentar una heterogeneidad vertical. Por lo general, en zonas poco profundas (1-2 metros) puede ser representativo el muestreo a 0,5 m de profundidad. Si la masa de agua es más profunda, se requiere la toma de más muestras, especialmente si existe una estratificación vertical debida a un gradiente de densidad, no siendo recomendable en este caso la obtención de muestras integradas. En masas de aguas profundas en las que no es posible el acceso a pie el muestreo se realizará desde una embarcación convenientemente anclada para evitar la deriva en la localización del punto de muestreo.

La estratificación vertical de la columna de agua se da cuando diversas partes la masa acuática tienen densidades distintas, de manera que las aguas más densas se sitúan al fondo y las menos densas en la zona más superficial. Estas diferencias de densidad se explican por diferencias de temperatura y/o de contenido en sales disueltas. Puesto que la máxima densidad del agua se da a 4° C, si las aguas superficiales se calientan diferencialmente (como sucede en verano) o se enfrían por debajo de 4° C, su densidad disminuye y éstas permanecen en la zona superficial sin mezclarse con las profundas, apareciendo un gradiente de densidad (picnoclina) originado por dichas diferencias de temperatura (termoclina).

En latitudes medias, como en la Península Ibérica, la estratificación térmica de las aguas suele darse, si la hay, desde primavera hasta principios de otoño. Por otro lado, el aumento de la concentración de sales en el agua también confiere una mayor densidad a ésta, por lo que, a igualdad de temperaturas, un agua de mayor salinidad será más densa y se localizará en las zonas profundas. En consecuencia, para una buena caracterización de la heterogeneidad vertical en la masa de agua, que puede afectar tanto a las características químicas como biológicas, deberán tomarse muestras a diferentes profundidades en función de la situación de la pycnoclina. Ésta puede localizarse mediante la medición de temperatura y conductividad del agua en el perfil vertical, estando la pycnoclina (si existe) en la parte de la columna de agua en las que estas variables varíen considerablemente al aumentar la profundidad (por ejemplo, un descenso de 1°C m^{-1} en el caso de la temperatura). Deberán, pues, tomarse muestras por encima y por debajo de la pycnoclina, así como a diversas profundidades de la misma, basándose el diseño del muestreo vertical en los parámetros previamente medidos *in situ* (fundamentalmente conductividad, temperatura y turbidez o transparencia del agua).

II.4. FRECUENCIA DEL MUESTREO

En las aguas corrientes, en caso de producirse variaciones apreciables en las características de la corriente y del agua fluyente, deberá tomarse el número suficiente de muestras para reflejar la heterogeneidad temporal, ya sea como muestras simples o como muestras compuestas integradas en el tiempo (ver apartado II.2).

En el caso de aguas retenidas, dados los cambios en el metabolismo del sistema asociados al ciclo día-noche, la heterogeneidad temporal a lo largo del ciclo diario podrá reflejarse en la toma de muestras, éstas deberán realizarse, como mínimo, a una hora central del día y poco antes del amanecer, si quiere reflejarse esa heterogeneidad.

Las variaciones estacionales que se dan en los sistemas naturales (estratificación, cambios de flujo, variaciones en el régimen de evaporación, etc.) exigen, para una buena caracterización del humedal, la obtención de muestras en distintos momentos del ciclo anual.

II.5. APARATOS PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE AGUA

Existen diversos aparatos de utilidad para la obtención de muestras; a continuación se refleja una descripción de algunos de los más usados. La parte de estos aparatos que se pone en contacto directo con la muestra debe cumplir los requerimientos especificados en diversos apartados de este manual para otro material usado en el muestreo. Básicamente, sus paredes no deben adsorber o liberar los componentes a analizar, el recipiente no ha de permitir ni provocar la pérdida de componentes y no tiene que contaminar la muestra como consecuencia de una limpieza inadecuada (no deben ser de plástico para la toma de muestras de orgánicos, sino preferentemente de acero, vidrio o teflón). Las características deseables para el aparato muestreador pueden diferir según los parámetros a analizar; por ello, en ocasiones, puede ser necesario el empleo de diferentes aparatos muestreadores para la obtención de determinada muestra.

II.5.1. Botellas hidrográficas

Las botellas hidrográficas son aparatos que permiten la obtención de muestras en lugares de la columna de agua que no se encuentran al alcance de la mano. Normalmente consisten en un tubo cilíndrico con tapones en ambos extremos y accionados por un dispositivo de cierre, unido en su extremo a un cable métrico de longitud variable (Figuras 10 y 11). Por medio del cable, previamente medido, la botella en posición abierta se sitúa a la profundidad deseada. Una vez allí se envía el mensajero (peso que actúa como dispositivo de cierre) que cierra la botella, recogiéndose de esa manera la muestra de agua de la profundidad deseada. Tomada la muestra, se recupera la botella y su contenido se deposita en el recipiente correspondiente mediante un tubo que se coloca en el fondo del muestreador, el cual diferirá en función del tipo de análisis a realizar. Estas botellas pueden utilizarse para la obtención de muestras de agua destinadas tanto para determinaciones físico-químicas como de las poblaciones de microorganismos que viven en suspensión en el agua (plancton).

Un dispositivo similar es el llamado «bailer», cuya diferencia esencial consiste en que el propio empuje del agua lo mantiene abierto durante la bajada, pero se cierra al cambiar el sentido del movimiento cuando deja de bajar y comienza a ascender, colectando el agua de la profundidad máxima a la que se baja (Figura 12).

II.5.2. Sistemas de bombeo

Son sistemas mecánicos que pueden utilizarse para elevar agua profunda hacia la superficie, donde es recogida. Existen de diferentes tipos: manuales, eléctricas, peristálticas, centrífugas y de aire comprimido. Los tubos que se sumergen deben estar lastrados y conectados a una cinta métrica, o bien medidos si no son flexibles. En el extremo sumergido puede acoplarse algún dispositivo que permita afinar la profundidad a la que se toma la muestra. (Figura 13). Todos los componentes que entren en contacto con la muestra (tubos, etc.) deben cumplir las especificaciones necesarias para que no las alteren.

II.5.3. Integradores en profundidad

Un método de utilidad para recoger muestras que integren aguas de diversas profundidades consiste en disponer de un tubo de longitud suficiente como para cubrir la distancia entre la superficie y el fondo o la profundidad deseada; dicho tubo puede introducirse de manera vertical en el agua, taparse posteriormente mediante un tapón que cierre herméticamente la parte superior, y extraerse para recoger su contenido. La muestra integrada se puede recoger en un recipiente suficientemente grande como para poder homogeneizarla; a partir de ella se dispone en envases adecuados para cada uno de los diferentes analitos, procediéndose al tratamiento que corresponda. Tanto el tubo, el tapón y el recipiente de recogida deben cumplir los requisitos generales y particulares especificados para los aparatos muestreadores.

II.5.4. Muestreadores automáticos

Los muestreadores automáticos son aparatos capaces de obtener las muestras de forma autónoma sin necesidad de la presencia del operador. En consecuencia, el muestreador automático debe ser programable para poder especificar las características deseadas del muestreo (cantidad muestreada, frecuencia, etc.). La norma ISO 5667-2:1993 presenta un

anexo en el que se reflejan más detalladamente las características adecuadas para el material de muestreo automático.

Existen muestreadores automáticos en los que la toma puede programarse para ser realizada en función del caudal; la alternativa es programar la toma de muestras para ser realizada cada cierto tiempo. También existen muestreadores automáticos más sofisticados que permiten la separación y conservación en recipientes separados de la parte de la muestra a utilizar para el análisis de diferentes componentes, así como otros que llevan acoplados mecanismos de concentración para permitir el análisis de sustancias presentes en la muestra en concentraciones muy bajas.

La parte del muestreador que entre en contacto con la muestra deberá, al igual que cualquier otro aparato muestreador, estar construida en un material inerte para que no la contamine.

El sistema de muestreo automático deberá disponer de un sistema complementario de conservación de las muestras para que éstas no se alteren hasta el momento de ser recogidas. En ocasiones, los muestreadores automáticos se encuentran en estaciones de control de la calidad del agua, estando asociados a sensores que permiten la determinación de diversas variables. En cualquier caso, tanto el sistema de toma automática como, en su caso, los sensores deberán mantenerse en un adecuado estado de conservación para evitar que alteren la muestra o que las medidas realizadas sean incorrectas.

Puesto que los sistemas automáticos son costosos, deberán tomarse las medidas de precaución adecuadas para evitar que el mismo sufra daños o expoliaciones durante el período de utilización.

II.6. PREPARACIÓN DE LOS APARATOS MUESTREADORES

El material de muestreo, concretamente los aparatos muestreadores, deberán mantenerse en perfectas condiciones de limpieza y funcionamiento. Antes de la salida de muestreo los equipos deben revisarse para comprobar que su funcionamiento es correcto.

Los equipos deben limpiarse siguiendo procedimientos específicos, previamente a la realización del muestreo y también entre diferentes puntos de muestreo. Es preferible utilizar detergentes libres de fosfato y amonio (imprescindible en el caso de tener que analizar compuestos de fósforo o nitrógeno), disolventes como isopropanol y agua destilada del tipo que se usa en la preparación de reactivos.

Al término de cada campaña de muestreo se realizará una limpieza a fondo de los aparatos muestreadores según el siguiente procedimiento:

- Lavado y cepillado en un baño con agua caliente y jabonosa.
- Aclarado con agua del grifo.
- Aclarado con HNO_3 al 10-15% (sólo en equipos no metálicos) o con HCl al 10-15% (cuando se vaya a realizar el análisis de nutrientes inorgánicos).
- Aclarado con agua desionizada.
- Aclarado con isopropanol (sólo si se va a tomar muestras para el análisis de compuestos orgánicos).
- Aclarado con agua destilada para reactivos.
- Secado al aire.
- Envolver en papel de aluminio para el transporte.

El procedimiento de limpieza en el campo, entre puntos de muestreo, incluye:

- Enjuague con agua destilada y agua de la muestra para muestras destinadas a análisis de parámetros inorgánicos.
- Si el equipo está muy contaminado en muestreos de orgánicos, aclarar con acetona y después cepillar y frotar el equipo con agua jabonosa hasta eliminar toda la suciedad, aclarar con agua del grifo, aclarar con agua desionizada y secar al aire.

II.7. ENVASES

II.7.1. Generalidades

Los envases a utilizar para la recogida y almacenamiento de la muestra deberán evitar cualquier alteración de la misma, ya sea por adición o por mermas como la adsorción a las paredes del recipiente o la volatilización. Los envases más utilizados están fabricados en vidrio o en plásticos de diversos tipos, siendo adecuado uno u otro material en función del análisis a realizar. Los recipientes deben ser herméticos y resistentes a alteraciones físicas, químicas o biológicas. Son características necesarias de los envases:

- No desprender sustancias que puedan contaminar la muestra.
- No adsorber los componentes que se desean analizar.
- Estar contruidos en materiales inertes (no reactivos).
- Ser de cierre hermético, de material resistente y de tamaño adecuado.

Los envases de vidrio pueden liberar sílice, sodio y adsorber metales, por lo que no deben utilizarse para las analíticas de los elementos antedichos. El vidrio más utilizado es el de borosilicato. Los envases de vidrio actínico (normalmente de color topacio, ver Figura 14) son especialmente adecuados para las muestras en las que el ataque de la luz pueda provocar alteraciones importantes, como es el análisis de pigmentos fotosintéticos o de plata.

Los envases de plástico más usuales (polietileno de alta densidad o similar) no deben utilizarse para recoger muestras para análisis de compuestos orgánicos y volátiles, ya que éstos pueden reaccionar con el plástico perdiéndose parcialmente o lixiviando sustancias del mismo, o bien perderse a su través. Por ello, para la determinación de sustancias orgánicas se utilizarán envases de vidrio, con tapones de metal o plásticos fabricados con polímeros fluorados como el teflón (politetrafluoroetileno y otros derivados), inertes para estas sustancias. Los tapones de metal nunca se utilizarán cuando se trate de muestras con capacidad de corrosión. Es preferible utilizar un obturador del recipiente, por encima del cual se colocará un tapón de rosca, ambos con las características adecuadas para evitar que se produzcan alteraciones en la muestra.

Podrán tomarse en un mismo envase las muestras para la determinación de aquellos analitos cuyos requerimientos de muestreo, procesado y almacenamiento sean similares. En consecuencia, la muestra para la determinación de cualquier analito que requiera un método de recolección específico o un procesado o almacenamiento particular deberá tener su propio envase. Por ejemplo, no podrá utilizarse el mismo recipiente para las determinaciones microbiológicas (que exigen un recipiente estéril) que para la determinación de metales (que precisan de acidificación de la muestra).

II.7.2. Limpieza de los envases

Resulta obvio que los envases en los que se recoja la muestra, al igual que las partes de los aparatos muestreadores que entren en contacto con la misma, deben estar perfectamente limpios de manera que no aporten ningún contaminante a la muestra.

Si se utilizan detergentes para el lavado de los envases (al igual que para el material de muestreo y análisis), éstos deben ser detergentes especiales para uso en química analítica. Será, en cualquier caso, preferible no utilizar estos detergentes especialmente para las muestras en las que deban analizarse fosfatos, boro, silicio, sulfato, detergentes y agentes de superficie.

Los envases deben ser lavados siempre, aun cuando sean nuevos, ya que incluso éstos pueden aportar contaminantes. Los procedimientos de limpieza que se requieren para los diferentes análisis son los siguientes:

Compuestos inorgánicos. Lavar envases y tapones con agua caliente y jabón libre de fosfato y enjuagar con agua del grifo hasta lograr un aclarado total. Enjuagar envases y tapones con agua destilada para reactivos 3-5 veces. Secar y guardar los envases herméticamente cerrados hasta su uso en el muestreo.

Compuestos inorgánicos de nitrógeno, fósforo y sílice, DBO, DQO y análisis radiológicos. Procedimiento similar al anterior sin usar detergentes, incluyendo el enjuague con HCl al 50% antes de hacerlo con agua destilada para reactivos.

Analíticas microbiológicas. Lavar los envases con agua y detergente, enjuagar con agua destilada, enjuagar con ácido nítrico 10% (v/v) y lavar concienzudamente con agua destilada.

Metales. Procedimiento similar al anterior incluyendo el enjuague con HCl al 50% y después con HNO₃ antes de hacerlo con agua destilada para reactivos.

Compuestos orgánicos extraíbles. Durante el lavado no debe ponerse plástico o goma (cepillos, guantes) en contacto con los envases, incluso hay que evitar que el propio envase del jabón empleado en la limpieza sea de plástico. Lavar con agua caliente y detergente, y enjuagar hasta un aclarado total, posteriormente pasar acetona (cuando el recipiente haya sido utilizado anteriormente se dejará actuar durante 12 horas y se enjuagará con hexano) y enjuagar con agua destilada hasta que no quede olor en la botella (unos 5 enjuagues). Tras los lavados y el secado en corriente de aire purificado, los envases deben permanecer cerrados hasta su uso.

Compuestos orgánicos volátiles. Lavar con agua caliente y detergente y enjuagar con agua hasta un aclarado total. Evitar cualquier contacto del envase con goma y/o plástico, tal como se comenta en el apartado relativo a compuestos orgánicos extraíbles. Enjuagar con metanol y secar los envases en estufa hasta 200° C durante 8 h; posteriormente, dejarlos enfriar en posición invertida y cerrarlos tan pronto como sea posible.

II.8. CONSIDERACIONES DE SEGURIDAD

Siendo importante la obtención de una muestra representativa, aún lo es más la seguridad de la persona que realiza la toma de muestras. Se debe evitar cualquier tipo de riesgos que, como consecuencia del muestreo, puedan derivarse para otras personas o para el

medio ambiente. Respecto a este último punto, el agente muestreador deberá asegurarse que, como consecuencia del muestreo, no se está generando ningún riesgo a terceros o, en su caso, desistir del mismo.

Generalmente los riesgos derivados del muestreo suelen centrarse en el agente muestreador. Las muestras pueden contener compuestos que entrañen un riesgo para la salud de las personas que se exponen a él. Además, algunos de los compuestos utilizados, como conservantes o reactivos de adición inmediata, pueden tener también un efecto dañino. Las sustancias tóxicas pueden absorberse por la piel, por inhalación o por ingestión accidental. Es por ello que la toma y manipulación de las muestras, reactivos y conservantes deberá realizarse con guantes de látex y, siempre que se detecten olores, utilizar una mascarilla. No obstante, como existen sustancias volátiles perjudiciales cuyo olor no siempre es detectable, el uso de la mascarilla es una recomendación de carácter general.

El equipo de protección incluirá también gafas protectoras y ropa especial en el caso de ser necesario. Cuando se tenga sospecha de la existencia de vapores tóxicos la toma de muestra se realizará únicamente en lugares bien ventilados y utilizando un respirador. La manipulación posterior de las muestras se realizará en el laboratorio en una campana de gases. La persona que haya tomado y/o manipulado las muestras deberá lavarse cuidadosamente al finalizar el muestreo, especialmente antes de manipular alimentos o bebidas, y de manera inmediata en caso de haber tomado contacto directo con una muestra potencialmente tóxica. Las muestras que puedan contener sustancias inflamables o explosivas deberán mantenerse lejos del alcance de cualquier chispa, llama o fuente de calor.

Cuando las muestras puedan tener componentes tóxicos, radioactivos o peligrosos se deberá usar siempre el equipo protector adecuado. En cualquier caso, la toma de muestras en las que exista la certeza de la presencia de compuestos tóxicos o peligrosos deberá realizarse siempre por personal especializado bajo la supervisión de un experto en la materia.

Además de los riesgos por exposición a sustancias potencialmente tóxicas, existen riesgos físicos que deben ser evitados. Cuando se esté a bordo de embarcaciones (que deben ser suficientemente seguras) debe llevarse un chaleco salvavidas y abstenerse de llevar botas altas, ya que en caso de caída accidental éstas podrían llenarse de agua dificultando el rescate. Cuando se entre a pie en un medio acuático, excepto cuando se use un equipo autónomo de inmersión, deben usarse botas suficientemente altas para impedir que entre agua en ellas, teniendo sumo cuidado al avanzar, ya que pueden encontrarse de forma inesperada pozas, lodazales, corrientes, fauna agresiva, etc. Nunca se realizará el muestreo descalzo. Deberá prestarse especial atención a las corrientes, puesto que la fuerza del agua podría arrastrar al agente muestreador, por lo que éste no deberá introducirse en cauces cuando las corrientes y profundidad en el mismo puedan entrañar un riesgo, siendo aconsejable la utilización de cuerdas o arneses de seguridad como medida precautoria. También deberá prestarse atención a los riesgos eléctricos derivados del uso de material de muestreo accionado por energía eléctrica.

La propiedad del material de muestreo deberá estar identificada en etiquetas en cada utensilio. Para evitar actos vandálicos o robos, el material se colocará en lugares discretos.

II.9. NÚMERO DE RÉPLICAS DE LA MUESTRA

Puesto que en el muestreo pueden existir variaciones de tipo aleatorio, es necesario la obtención de réplicas de la muestra. El número de réplicas a obtener vendrá marcado por

un análisis estadístico previo (EPA, 1992), que deberá ser considerado por el solicitante del muestreo. En cualquier caso, la obtención de réplicas que puedan ser utilizadas en un contraanálisis supone una práctica recomendable cuando sea posible, aunque en realidad sólo tendría sentido cuando el análisis a realizar no deba ser inmediato.

Cuando la toma de muestras tenga como objeto la apertura de un procedimiento sancionador es conveniente que ésta se realice en presencia de un representante de la empresa o industria presuntamente contaminadora. En este caso, cada muestra se tomará, al menos, por duplicado, debiéndose entregar una a las personas que aparezcan como responsables del vertido o a las que se designen, con el fin de que puedan ejercitar su derecho a analizar dichas muestras y a confrontarlas con los análisis oficiales que se van a realizar.

II.10. CANTIDAD DE MUESTRA

La cantidad de muestra a recoger será la estrictamente necesaria para el cumplimiento de los objetivos del muestreo, incluyendo las réplicas correspondientes, cuando sean necesarias. La muestra se repartirá en diversos recipientes en función de la manipulación y tratamiento que se deba hacer para cada análisis.

II.11. MATERIAL GENERAL DE MUESTREO

Realizar un listado exhaustivo del material necesario para el muestreo en humedales de todo tipo y en cualquier circunstancia resulta de todo punto imposible, por lo que en la preparación del muestreo deberá realizarse una lista específica para cada caso. No obstante, a modo orientativo, se refleja a continuación un listado del material más habitual utilizado en el muestreo de humedales:

- Libro con protocolos de muestreo y manual.
- Agenda con los datos de las personas de contacto.
- Libreta de campo.
- Formularios a cumplimentar.
- Permiso de recogida de muestras expedido por la autoridad competente.
- Aparatos de recogida de muestras (botellas hidrográficas, dragas u otro material para el muestreo de sedimento, sistemas de bombeo, muestreadores automáticos, etc.).
- Redes, mangas de plancton y otro material para muestreos biológicos.
- Pértiga para la obtención de muestras a distancia.
- Integrador de muestras de columna de agua.
- Envases adecuados para depositar las muestras a obtener.
- Aparatos para la medida *in situ* (termómetro, oxímetro, conductivímetro, pH-metro, disco de Secchi, etc.).
- Baterías y pilas para alimentar a los aparatos eléctricos.
- Cargador de baterías.
- Caudalímetro.
- Piezómetro.
- Limnígrafo.
- Papel adhesivo u otro sistema para el precintado de las muestras.
- Conservantes y fijadores (ácido nítrico, ácido clorhídrico, formol, lugol, alcohol, etc.).

- Agua destilada.
- Reactivos.
- Jeringas y portafiltros.
- Filtros de diversos tamaños de poro.
- Probetas de diversos tamaños.
- Sistema de medida para la adición de conservantes y reactivos (pipetas, etc.).
- Sistema de almacenamiento de muestras en refrigeración (nevera eléctrica, neveras de camping, hielo, acumuladores de frío).
- Embarcación, hinchador si la barca es neumática, remos, motor y depósito con combustible.
- Chalecos salvavidas.
- Anclas.
- Material para el balizado (boyas y cuerdas, pintura, estacas, etc.).
- Botas de goma o vadeadores.
- Ropa de repuesto.
- Impermeable y ropa de abrigo.
- Linterna.
- Cuerdas.
- Cinta aislante plástica, precinto y cinta americana.
- Herramientas varias.
- Cinta métrica.
- Pinzas de relojero.
- Guantes de látex, mascarilla, y demás equipo de protección personal.
- Papel aluminio.
- Bolsas de plástico inerte.
- Bolígrafo, lapicero y rotulador indeleble.
- Cámara fotográfica y/o de vídeo, carretes y cintas.
- Cartografía de la zona.
- Reloj con cronómetro.
- Brújula o sistema de información geográfica.
- Calculadora
- Emisora o teléfono móvil.

II.12. DETERMINACIONES A REALIZAR *IN SITU*

Existen algunas determinaciones que pueden (o en la mayoría de los casos deben) ser realizadas *in situ* por parte del agente muestreador, si se dispone de los instrumentos adecuados. La realización *in situ* de estas medidas es opcional en el caso de algunos parámetros, pero obligada en el caso de otros, ya que el resultado se alteraría inevitablemente como consecuencia de la toma y transporte de la muestra. Incluso en el caso de no ser estrictamente necesario por exigencias analíticas, la realización en el campo de todas las determinaciones señaladas en este apartado resulta muy conveniente, pues evita alteraciones y permite disponer de una valiosa información para afinar el muestreo.

El instrumental utilizado para las determinaciones de campo debe mantenerse en buen estado de funcionamiento siguiendo las especificaciones del fabricante. Cuando proceda su calibración se realizará también siguiendo los protocolos establecidos en las instrucciones del aparato. Dado que muchos de estos aparatos funcionan con pilas o baterías internas, debe prestarse especial atención al mantenimiento del buen estado de las mismas y

comprobar su estado de carga antes de iniciar la campaña de muestreo. Existen aparatos específicos para determinar un parámetro concreto, aunque también hay sondas multiparamétricas que permiten la medición simultánea de varios de ellos.

II.12.1. Temperatura

La temperatura siempre se determinará *in situ*. Puede utilizarse un termómetro de mercurio, cuyo bulbo se introducirá en el agua directamente hasta su estabilización. Si se dispone de ello, resulta preferible utilizar un termómetro eléctrico con sonda, que permite determinar el perfil térmico de la masa de agua.

II.12.2. Conductividad

La conductividad eléctrica del agua permite determinar de modo aproximado, y de manera global, la salinidad del agua. La resistencia (inversa de la conductividad) del agua al paso de la corriente eléctrica depende de la concentración y tipo de iones disueltos así como de la temperatura.

La conductividad se mide mediante un conductímetro (Figura 15) que lleva un electrodo con alimentación por pilas y cuyos polos, de 1 cm², están separados por una distancia de 1 cm. La unidad de medida es el $\mu\text{S}/\text{cm}$ ($S = \Omega^{-1}$). Dado que la conductividad depende también de la temperatura, deberá consignarse la misma junto con la medida de la conductividad y se realizará una transformación para estandarizarla a 20 o 25° C, aunque muchos conductímetros realizan la corrección automáticamente. La medida se realizará introduciendo el electrodo en el agua sin necesidad de agitación. Cuando se trate de aguas profundas se obtendrá, si se dispone del material, un perfil vertical de conductividad del agua. La calibración del aparato se efectuará, cuando sea necesario, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Aunque la conductividad no necesariamente tiene que ser medida *in situ*, resulta conveniente realizar esta medida directamente en el agua, ya que junto con la temperatura, la concentración de sales (determinada por medio de la conductividad eléctrica del agua) regula la estratificación de las masas de agua, por lo que su conocimiento es fundamental para determinar las muestras a obtener en profundidad en los sistemas con estratificación vertical de las aguas.

II.12.3. Oxígeno disuelto

La medición del oxígeno disuelto en el agua puede realizarse directamente en el campo utilizando un oxímetro (Figuras 16 y 17), consistente en un electrodo de membrana conectado por un cable de longitud variable a un microprocesador. Alternativamente, puede utilizarse el método de Winkler, más sensible que el anterior, pero que exige el inicio del análisis en el campo y su continuación en el laboratorio, por lo que no permite disponer de los resultados *in situ*.

La determinación del oxígeno disuelto se realiza por polarografía mediante un oxímetro con electrodo tipo Clark con ánodo de plata y cátodo de oro, al que se incorpora un dispositivo para asegurar la medida en agitación, unido todo ello por medio de un cable a un

medidor digital. El aparato presenta normalmente una precisión de 0,1 mg O₂/l de agua. La medida con un electrodo de membrana exige la calibración del aparato en función de los factores que determinan la solubilidad del oxígeno en este medio, a saber: temperatura, salinidad (estimada mediante la conductividad) y presión parcial de oxígeno (estimada mediante la presión atmosférica). Todos los oxímetros están dotados de un termómetro eléctrico, por lo que realizan automáticamente la oportuna corrección ATC (corrección automática de la temperatura). Respecto a la presión y la conductividad, existen oxímetros que tienen sensores para estas medidas y se autocorrijen, mientras que en otros se deben seguir las instrucciones marcadas por el fabricante para que el aparato pueda transformar automáticamente su lectura real (porcentaje de saturación) en la medida que habitualmente se quiere obtener (concentración, mg/l). Si el aparato no dispone de esta última opción, el cálculo de la concentración correspondiente a una determinada saturación deberá hacerse *a posteriori* teniendo en cuenta los valores de los antedichos factores determinantes de la solubilidad. La medida del oxígeno con el electrodo se realizará siempre en agitación (agitando manualmente de forma suave el electrodo o mediante el dispositivo que llevan muchos oxímetros).

Los electrodos polarográficos deberán mantenerse conectados unos 10 o 15 minutos (o lo que especifique el fabricante) para alcanzar la polarización necesaria antes de realizar las medidas.

La membrana del electrodo debe ser sustituida cada cierto tiempo y el electrolito interno renovado. La duración de las membranas aumenta si una vez colocadas en el oxímetro se mantienen en una cápsula con agua destilada o en una cámara húmeda, para impedir que se sequen y resquebrajen. Periódicamente se realizará una comprobación de la calibración del electrodo mediante el método de Winkler.

II.12.4. pH

El pH del agua se define como $-\log [H^+]$ en el agua y da una medida de su acidez o basicidad. En consecuencia, su escala es logarítmica de manera que un pH 6 representa una concentración 10 veces mayor que un pH 7. El pH tiene una gran importancia en la química del agua, puesto que determina el estado de disociación en el que se encuentran muchos compuestos, condicionando también la vida de los organismos acuáticos. Existen diversos procedimientos de medida:

- pHmetro: La medida se realizaba mediante dos electrodos, uno de pH y uno de referencia, aunque actualmente casi todos los equipos incorporan un electrodo combinado acoplado a un medidor del potencial creado al penetrar los protones en el electrodo que da directamente la lectura. El electrodo se agita suavemente durante la medida hasta que la lectura se estabiliza, tomándose entonces el valor. Puesto que el pH varía con la temperatura, estos aparatos suelen llevar acoplada una sonda de temperatura. Los mejores pHmetros suelen tener tres puntos de calibración para calibrar con tampones de pH 4, 7 y 10, aunque si sólo tuvieran dos puntos la calibración se hará a los dos pH más próximos a la muestra (generalmente 7 y 10 en aguas naturales, excepto en aguas ácidas donde la calibración se realizaría a pH 4 y 7). La medida mediante el pHmetro es la preferible.
- Comparador de color. A la muestra se le añade un indicador de pH y el color que ésta adquiere es comparado con la escala de colores de un disco giratorio. El valor de pH se lee directamente sobre el disco. El indicador es específico para cada disco.

- Papel indicador. La medida consiste en comparar el color que adquiere el papel indicador sumergido en el agua de la muestra, con una escala de colores asociada a diferentes valores de pH. Esta medida es sólo aproximada.

II.12.5. Transparencia del agua

La presencia de partículas en suspensión y de sustancias disueltas en el agua, junto con la propia absorción de las moléculas de agua, hace que a medida que la luz penetra hacia capas más profundas, la cantidad que llega sea menor. El aumento de la carga en nutrientes en un sistema acuático suele derivar en un mayor crecimiento del fitoplancton, esto es, de los microorganismos fotosintéticos que viven suspendidos en el agua. En consecuencia, un mayor grado de eutrofización supone un descenso en la transparencia del agua debido a la mayor abundancia de fitoplancton, que absorbe o refleja parte de la luz. El descenso de la transparencia puede deberse a otras causas, por ejemplo, la puesta en suspensión del sedimento o los aportes de materias en suspensión de origen alóctono. El coeficiente de extinción de la luz (k) en una masa de agua nos da una medida de esa transparencia, adquiriendo mayores valores cuanto menor es la misma.

La transparencia del agua debe medirse *in situ*. Existen dos métodos:

- Cuantómetro o radiómetro. (Figura 18). Este aparato realiza la medida de la cantidad de luz que llega a una profundidad determinada de la masa de agua. Para la medida de la penetración luminosa en el agua se utilizan sensores subacuáticos que detectan la radiación fotosintéticamente activa (PAR), conectados a un medidor capaz de almacenar datos.

Se pueden utilizar dos tipos de sensores, uno plano y otro esférico. El sensor de tipo plano permite medir la densidad de flujo fotónico por unidad de área al tratarse de un sensor corrector de coseno que corrige las variaciones debidas al ángulo de incidencia, en él la detección se realiza por un detector fotovoltaico de silicio de alta estabilidad. El sensor esférico permite medir específicamente la tasa de afluencia del flujo de fotones fotosintéticamente activos, la cual se define como los fotones de longitud de onda comprendida entre 400 y 700 nm que inciden por unidad de tiempo en la superficie de una esfera dividido por el área transeccional de dicha esfera captando la radiación fotosintéticamente activa proveniente de todas las direcciones, ya que este sensor dispone de un difusor acrílico, aunque la existencia de la base del sensor provoca una pequeña merma en la respuesta angular. El sensor elegido para realizar la lectura se une por medio de un cable subacuático a un medidor multicanal capaz de almacenar datos, del que se obtiene la medida de densidad de flujo fotónico (en el caso del sensor plano).

Por tanto, lo medido con ambos sensores no es lo mismo, ya que mientras el sensor plano mide la radiación fotosintéticamente activa incidente al sensor desde arriba, la fotocélula esférica detecta también la radiación difusa, ya que capta la proveniente de todos los ángulos. Las unidades de medida utilizadas son los $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, siendo el E (Einstein) un mol de fotones. Por medio de este aparato obtendremos un perfil de penetración luminosa, con valores de la luz que llega a cada profundidad. La extinción de la luz en el agua viene dada por la siguiente expresión:

$$I_z = I_0 \cdot e^{-kz}$$

siendo I_z la cantidad de luz que llega a la profundidad z ,
 I_0 la cantidad de luz incidente en superficie y
 k el coeficiente de extinción.

La transformación logarítmica de esta ecuación da una recta, cuya pendiente corresponde al coeficiente de extinción.

$$\ln I_z = \ln I_0 - Kz$$

- Disco de Secchi. Consiste en introducir en el agua un disco de PVC pintado de blanco, de unos 20 cm de diámetro, con un contrapeso en su parte central inferior para facilitar su hundimiento (Figura 19). Este disco se engancha a un cable y se baja hasta que deja de verse, anotando la profundidad (D_s). Esta medida nos permite hacer un cálculo aproximado del coeficiente de extinción mediante la expresión $\mu = 1,7/D_s$. El factor utilizado en esta ecuación (1,7) puede variar en función del tipo de sistema que se esté estudiando por lo que, además de algunas otras consideraciones, el cálculo del coeficiente de extinción mediante el disco de Secchi siempre será más inexacto.

II.12.6. Análisis de CO₂ y cloro residual

Puesto que el CO₂ es un gas que es producido o consumido en los procesos vitales (respiración y fotosíntesis) y puede intercambiarse con la atmósfera, es precisa su determinación *in situ* mediante una volumetría ácido-base. También debe analizarse *in situ* el cloro residual, ya que se altera inmediatamente, utilizándose técnicas colorimétricas basadas en la adición de N,N-dietil-p-fenildiamina (DPD) y la comparación con una escala de color o la medida con un pequeño espectrofotómetro portátil (Figura 20). Para ambos casos, el laboratorio encargado de los análisis facilitará al agente muestreador los instrumentos, reactivos y protocolos necesarios para realizar las determinaciones en el campo.

II.13. DETERMINACIONES DE CAUDALES, NIVELES PIEZOMÉTRICOS Y LÍMNICOS

La determinación de los caudales y los niveles de agua en humedales y acuíferos resulta de interés en la evaluación de la calidad ecológica de los humedales. La determinación de los caudales resulta imprescindible para evaluar las cargas de sustancias aportadas, ya que en las determinaciones analíticas se obtienen las concentraciones, con lo que para hallar las cantidades absolutas se precisa conocer los caudales circulantes o los volúmenes de agua retenidos. Para calcular este último aspecto, se precisa conocer la morfometría del humedal y la sección del mismo ocupada por agua (dependiente del nivel). Tanto para la determinación de caudales como para la medida del nivel de las aguas superficiales o subterráneas existen diversos métodos. En este apartado se realiza una breve introducción a dichos temas, debiendo consultarse manuales más específicos para la elección adecuada del método a utilizar.

II.13.1. Caudal

El caudal es el volumen de líquido que pasa por un punto dado en una unidad de tiempo. La información relativa a la media y a los valores extremos del caudal es esencial para

la concepción y la realización de las instalaciones de tratamiento de aguas y para el establecimiento de límites racionales de calidad destinados a la preservación de los cursos de aguas naturales.

La determinación del caudal se hace habitualmente determinando la velocidad de la corriente y la sección del cauce por el que circula o, en estaciones de aforo, por medición del nivel. Las medidas de la velocidad se realizan mediante sistemas de flotadores, trazadores (químicos, microbiológicos o radioactivos), molinetes (Figura 21), ultrasonidos, etc. (EPA, 1992).

A modo de ejemplo se reseña a continuación un sencillo procedimiento de medida aproximada de caudales basado en la medida de la sección del cauce en un tramo homogéneo y sin irregularidades y la adición al agua de un colorante, midiéndose la velocidad de desplazamiento del frente de colorante. En primer lugar se realiza el sondeo transversal en el punto de medida para calcular la sección del tramo. A continuación, se introducen ondas coloreadas en la corriente de agua, y se puede evaluar la velocidad de la corriente. Posteriormente, se aplica un coeficiente de corrección según el material y revestimiento del tramo, de acuerdo con la fórmula de Fischer para cauces no torrenciales:

$$V_m = K * V_s$$

Siendo V_m la velocidad media y V_s la velocidad medida, teniendo K los siguientes valores según el tipo de cauce:

Cauce con vegetación	0,55
Cauce con grava y piedras	0,64
Cauce con grava normal	0,71
Cauce de tierra	0,74
Cauce de mampostería	0,78
Cauce de hormigón o enlucido	0,80
Cauce revestido de metal	0,81

No siendo éste el procedimiento más exacto, se incluye aquí por su sencillez, frente a otros métodos que, aunque probablemente son más exactos, tienen un requerimiento instrumental mayor.

II.13.2. Medidas del nivel del agua superficial

Las medidas del nivel de agua son indispensables cuando se practica una gestión hidráulica activa. Se trata de medidas simples y poco costosas. Deben incluirse en los objetivos de seguimiento y en el protocolo de toma de muestras (precisión, frecuencia y localización de medidas) y tenerse en cuenta en el análisis de los resultados. Hay que identificar previamente las diferentes unidades hidrológicas y las comunicaciones entre ellas, puesto que diferentes masas de agua pueden estar en contacto durante un período del año y desconectados en otros períodos.

Se pueden realizar las medidas del nivel de agua de dos maneras: puntuales y visuales o automáticas y en continuo:

- De manera visual, gracias a las miras limnimétricas (reglas verticales graduadas, fijadas sobre un soporte y clavadas al suelo o a las paredes de la cubeta). Su coste varía con la altura y su calidad (resistencia a choques sobre todo). Hay que tener en

cuenta las perturbaciones que pueden sufrir con el fin de elegir un modo de fijación y una calidad adaptadas. Su emplazamiento debe permitir una lectura fácil a distancia (con prismáticos si hace falta) y en toda época (por ejemplo, se debe pensar en la altura de la vegetación circundante en otras épocas). Con este material sencillo se puede realizar un seguimiento riguroso del nivel de agua, normalmente todas las semanas, o más frecuentemente en el caso de eventos excepcionales (inundaciones, entrada o salida de agua inhabitual). Se puede añadir escalas de máximo, que permiten detectar el máximo nivel alcanzado. Si la amplitud de los niveles de agua es más grande que la altura de miras disponibles (el modelo estándar mide 1m), se puede encargar una mira especial o bien disponer más miras suplementarias para los niveles extremos.

- Con un aparato registrador denominado limnógrafo. El coste de este aparato es elevado, por lo que se recomienda colocarlo en el punto más representativo del ecosistema considerado. Existen diferentes modelos de limnógrafos registradores. Se recomienda los limnógrafos mecánicos con medidores flotantes

II.13.3. Medidas del nivel piezométrico del acuífero

La medida del nivel de las aguas subterráneas es relevante en el estudio de los humedales, ya que cuando la alimentación es subterránea el nivel del agua en la superficie del humedal depende, entre otros factores, de los procesos de carga-descarga del acuífero.

Para la medida del nivel del acuífero se utilizan piezómetros. Un piezómetro es simplemente un tubo perforado, se sitúa penetrando el suelo para que el agua del acuífero suba a su interior; se completa con un sistema graduado que permite una lectura fácil y, si es necesario, un sistema para posibilitar la toma de muestras (en cuyo caso deberá procederse a la renovación del agua del piezómetro antes de tomarlas).

Los piezómetros son tubos de longitud variable (algunos metros bastan generalmente) y de 35-50 mm de diámetro interior del tubo. El modelo recomendado está formado por tubos de PVC con un diámetro inferior de 50 mm y borde inferior cortante. La instalación del tubo puede realizarse con la ayuda de un taladro o por simple presión manual si el terreno lo permite. Para evitar la subida de sedimentos en el tubo es conveniente cubrir el extremo inferior con una red de nylon. El extremo superior tiene que cubrirse con el fin de evitar que la lluvia o las partículas entren dentro, pero la protección debe dejar pasar el aire para que el agua pueda subir en el tubo. Los piezómetros se pueden construir también con rejillas a diversos niveles.

Normalmente con un piezómetro no se mide el nivel real del agua, sino el nivel piezométrico, parámetro que integra el nivel del acuífero y su presión. El agua del acuífero sale generalmente bajo presión y sube en el tubo de medida. El nivel medido en el tubo es el nivel piezométrico, a menudo superior al del acuífero.

II.14. PROCEDIMIENTO DE TOMA DE MUESTRAS

II.14.1. Toma manual

Además de las especificaciones realizadas en este apartado hay que tener en cuenta las ya detalladas en el apartado II.3 (localización del punto de muestreo).

Al tomar la muestra, el recipiente muestreador debe lavarse dos veces con agua de la misma muestra, excepto cuando se tome directamente en un envase estéril o que contenga algún conservante o reactivo previamente adicionado, o bien que vaya a destinarse para el análisis de compuestos orgánicos, en cuyo caso la muestra se tomará sin realizar ningún enjuague.

Para evitar tomar agua de la orilla se podrá utilizar una pértiga con una pinza en su extremo, a la que se sujetará el recipiente a utilizar para recoger el agua, que será bien un recipiente de boca ancha o bien el mismo envase en el que se guardará la muestra. Si existiera flujo, la muestra se obtendrá enfrentando el recipiente colector al flujo de agua. Esta toma se realizará, siempre que la profundidad lo permita, por debajo de la superficie excepto cuando se muestree para la determinación de sustancias menos densas que el agua (ej., aceites y grasas), en cuyo caso el muestreo para esta determinación se adaptará para colectar los flotantes.

A fin de evitar la recogida de partículas sedimentadas y la contaminación de las muestras de agua con sedimentos deberá evitarse la remoción del fondo, o en caso de que éste se remueva, tomar la muestra en un punto no afectado por dicha resuspensión. El muestreo para obtener muestras compuestas o integradas se atenderá a lo especificado en el apartado II.2.

Si la toma se realiza directamente, puede, por lo general, realizarse en el mismo recipiente en el que se almacenará, salvo que éste lleve adicionado alguna sustancia, en cuyo caso la toma se realizará en un recipiente de boca ancha sometido al mismo procedimiento de limpieza que el utilizado para los envases y los aparatos de muestreo.

Generalmente el envase se llenará por completo sin dejar aire por encima de la muestra, excepto que el agua tomada sea para determinadas analíticas que, como los análisis microbiológicos, requieren que se deje una cámara de aire en el recipiente. Tampoco se llenarán totalmente los envases que vayan a congelarse. El llenado completo sin burbujeo es especialmente importante en el caso de muestras para el análisis de compuestos orgánicos volátiles y gases disueltos; en este caso se debe rellenar hasta reboso y sellar con teflón y cápsula de aluminio.

Cuando el muestreo se haga desde una embarcación la muestra superficial podrá tomarse directamente sumergiendo el recipiente con la mano (excepto cuando esté adicionado de algún conservante o reactivo), utilizándose aparatos muestreadores para obtener las muestras profundas.

II.14.2. Muestreo automático

La toma de muestras de manera automática utiliza aparatos que son capaces de realizar el muestreo de forma autónoma, permitiendo la toma de muestras en múltiples puntos simultáneamente, si se usan varios aparatos, o bien la toma de muestras compuestas integrándolas en el tiempo sin necesidad de la presencia del operario. Para la realización de estas tareas, dichos aparatos deben cumplir las características especificadas en el apartado II.5.

II.14.3. Procesado

Previamente a la recogida de una muestra debe estar claro qué fracción se va a analizar. Por ejemplo, el análisis de metales se puede efectuar sobre la fracción disuelta, parti-

culada, total o extraíble con ácido. En función de la fracción a analizar, la muestra de agua deberá ser o no filtrada y se trabajará con el líquido filtrado o con lo recogido en el filtro, procediendo o no a una posterior acidificación

En otros casos, para el análisis de la concentración de determinados analitos en el agua es necesario realizar un filtrado previo de la muestra antes de introducirla en el recipiente, ya que de esa manera se retrasan las alteraciones que la muestra pudiera sufrir hasta su llegada al laboratorio, actuando dicha filtración como un procedimiento conservante. Para realizarla se utilizará un filtro de fibra de vidrio. Estos filtros se pueden obtener comercialmente (por ejemplo, filtros tipo GF/F fabricados por Whatman, Gelman u otros fabricantes) y se montan en un portafiltros (por ejemplo, un portafiltro tipo Swinnex, fabricado por Millipore), que se conecta a una jeringa en la que se introduce el agua a filtrar accionando el embolo hasta que todo el volumen se haya filtrado (Figura 22) y recojiéndose el agua filtrada directamente en el recipiente específico para guardar la muestra. Si el volumen filtrado no es suficiente, se separa el portafiltros de la jeringa antes de sacar el embolo de la misma (ya que si no se rompería el filtro por la succión en vacío), se saca el embolo, se vuelve a conectar jeringa y portafiltro y se introduce el volumen adicional a filtrar.

Si se debe añadir algún conservante o reactivo, éste puede ser previamente añadido a la botella en la que se guarda la muestra, o bien mantenerse en un recipiente por separado, a partir del cual deberá tomarse una determinada cantidad para adicionar a la muestra (Figura 23).

Cuando una muestra precise de un tratamiento inmediatamente después de ser obtenida y previo a su transporte al laboratorio, ya sea filtrado, adición de conservantes, reactivos o cualquier otro tipo de tratamiento, deberá venir específicamente señalado por el laboratorio que vaya a realizar el análisis o, en su caso, por la persona que encargue la toma de muestras. Cuando intervengan agentes muestreadores resulta imprescindible la realización de reuniones de coordinación con la dirección técnica o miembro cualificado del laboratorio analítico encargado del proceso de análisis, así como la comunicación por parte de este último de cualquier cambio en el procedimiento analítico que incida sobre el protocolo de muestreo.

Como ejemplo, las muestras que generalmente suelen filtrarse son aquellas que se utilizan para el análisis de algunos compuestos inorgánicos de nitrógeno (amonio y nitrito) o fósforo (fósforo reactivo soluble), ya que con el filtrado se consigue eliminar los microorganismos presentes en el agua que alterarían rápidamente la concentración de estos compuestos. Sin embargo, otras determinaciones de compuestos de los mismos elementos, como el nitrógeno total o el fósforo total, deben realizarse sobre muestras sin filtrar, por ello es importante seguir las especificaciones del laboratorio.

En cuanto a la adición inmediata de reactivos, algunos análisis también lo requieren, como, por ejemplo, la determinación del oxígeno disuelto utilizando el método de Winkler, que precisa la adición de hidróxido de manganeso. La aplicación de conservantes es frecuente en aquellas muestras que sirven para la determinación microscópica de microorganismos propios del medio acuático pero no debe hacerse cuando el método analítico requiera que dichos organismos estén vivos, como es el caso de las analíticas de indicadores microbiológicos de contaminación fecal, en los que se requiere el cultivo.

Antes de abandonar el punto de muestreo se comprobará que se han recogido todos los recipientes necesarios, que se ha realizado el proceso de conservación adecuado y que se

ha anotado en el libro de registro de campo toda la información requerida. En caso contrario se subsanará el error, repitiendo el muestreo si es necesario.

Cualquier impacto que se detecte o características determinadas que puedan ser ilustradas con imágenes se recogerán, en la medida de lo posible, en reportajes fotográficos o de vídeo, dedicando negativos o cintas separadas a cada lugar de muestreo, los cuales serán debidamente etiquetados. Por ello es conveniente el uso de películas o cintas de vídeo de formato reducido (12 fotos, 45 minutos de cinta) para evitar malgastar material; cuando sea necesario se empleará más de un carrete o cinta.

II.15. ETIQUETADO DE LAS MUESTRAS

Cada envase que contenga una muestra deberá ser convenientemente etiquetado, de manera que no exista duda alguna sobre cuál es la muestra que contiene. La marca deberá ser indeleble, sobre todo al contacto con el agua o la matriz en la que se encuentre la muestra. Si se utilizan rotuladores para marcar las etiquetas, éstos deberán ser resistentes al agua. No deben rotularse nunca las etiquetas con un bolígrafo convencional. Conviene escribir dos veces el código de identificación de la muestra por si se borrara.

Como norma general, para mantener la confidencialidad, suele utilizarse una codificación que permita identificar la muestra, el agente muestreador y el laboratorio. Si la etiqueta es suficientemente amplia pueden anotarse en ella otras informaciones que puedan considerarse de utilidad (condiciones meteorológicas, datos de las determinaciones *in situ*, etc.), pero, incluso en ese caso, esa información deberá anotarse también en el libro de registro de campo o en el acta de inspección (ver apartado II.16).

Cuando la muestra vaya a utilizarse en un proceso judicial, el recipiente deberá ser sellado para evitar una posible manipulación o falsificación. Entonces podrán utilizarse sellos adhesivos suministrados por la autoridad judicial o cualquier otro sello que impida la apertura del recipiente y que sea fácilmente identificable por el tomador de la muestra (por ejemplo, un adhesivo en el que figure la firma del tomador).

En las muestras que contengan componentes potencialmente tóxicos o peligrosos, esta circunstancia deberá ser puesta de manifiesto de manera evidente en la etiqueta.

II.16. LIBRO DE REGISTRO DE CAMPO Y EL ACTA DE INSPECCIÓN

Es muy conveniente reflejar toda la información recogida como consecuencia de la toma de muestras en un libro de registro o en actas de inspección.

Esta información deberá incluir para cada punto de muestreo:

- Tipo de humedal muestreado.
- Localización exacta del punto de muestreo, con topónimos, coordenadas y referencias. Ésta se reseñará, de manera adicional, en un mapa a la menor escala posible o bien en un croquis. Para estaciones fijas preestablecidas será suficiente con indicar la referencia de las mismas.
- Descripción del entorno del punto de muestreo, morfometría y geología del lugar.
- Condición aparente de la fauna y vegetación acuática.
- Caudal, si hubiera flujo. Nivel.

- Características morfométricas del cauce o la cubeta.
- Características de los posibles vertidos u otros impactos recibidos por la zona de toma de muestras y, en general, por el humedal. Identificación del presunto causante del impacto.
- Usos del territorio en el entorno (poblaciones, industrias, cultivos, instalaciones turísticas, reservas naturales, etc.).
- Características meteorológicas durante el muestreo (precipitación, temperatura del aire, viento, etc.).
- Incidencias del transporte.

Para cada muestra se incluirá:

- Código de identificación de la muestra.
- Fecha y hora del muestreo.
- Tipo de muestra (simple, compuesta, integrada) y especificaciones en su caso.
- Coordinador del muestreo.
- Personas a contactar para realizar la toma de muestra y modo de localizarlos.
- Personas que intervienen y/o que puedan aportar testimonios.
- Persona que realiza la toma de muestras. Cargo y departamento al que pertenece.
- Matriz muestreada.
- Duración de la toma.
- Profundidad (en su caso) a la que se ha tomado la muestra.
- Procedimiento de muestreo utilizado.
- Número y tipo de envases tomados.
- Tratamientos realizados a las muestras.
- Resultados de las determinaciones realizadas *in situ*.
- Aspecto de la matriz (color, olor, presencia de indicadores de contaminación, etc.).
- Fecha y hora de entrega en el laboratorio.

Además de las anteriores, se incluirá cualquier información que pueda tener interés a la hora de realizar los análisis o en la interpretación de los resultados de los mismos.

La información recogida en el libro de campo o en las actas de inspección se suministrará al laboratorio de análisis o, en su caso, a las personas con competencia legal en la materia, o con la autorización de éstas cuando sea preceptivo, y a otras partes interesadas como el propio laboratorio que realizará el análisis. Debe tenerse en cuenta que el laboratorio necesita, por lo general, conocer determinados parámetros determinados *in situ* para la correcta calibración y adecuación de los métodos analíticos.

Cuando concorra un procedimiento sancionador, resulta conveniente (e incluso imprescindible en los casos de agresiones graves al medio ambiente) la obtención de testimonios gráficos (fotografías, vídeos) que acompañen a la información reflejada en el libro de registro, así como levantar un acta de toma de muestras (ver apartado II.21, cadena de custodia).

II.17. CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

Puesto que la alteración de las muestras es inevitable con el paso del tiempo, las técnicas de conservación tratan de retrasar al máximo los cambios químicos y biológicos que se producen tras la toma de la muestra. Por lo general, cuanto menor sea el intervalo de

tiempo transcurrido entre la toma de muestras y el momento del análisis, menores serán los cambios producidos en la misma.

II.17.1. Alteraciones potenciales de la muestra durante el almacenaje

Los cambios que se pueden producir en la muestra son de naturaleza múltiple.

Una serie de parámetros analíticos sufren un cambio rápido una vez obtenida la muestra, ya sea por procesos físico-químicos o biológicos, por lo que su análisis debe realizarse *in situ*. Tanto la temperatura, el pH, los gases disueltos y el cloro residual pueden cambiar rápidamente en la muestra, por ello deben determinarse directamente utilizando medidores portátiles. En algún caso, alternativamente, se puede iniciar el análisis *in situ* dejando la muestra en un estado en el que el analito se encuentre fijado para evitar su alteración hasta la llegada al laboratorio, como sucede en el análisis de oxígeno disuelto mediante el método de Winkler.

Los compuestos orgánicos volátiles pueden volatilizarse si existe una cámara de aire en el recipiente, por lo que los envases para estas determinaciones (de vidrio, como ya se especificó en el correspondiente apartado) deben llenarse totalmente y cerrar sellados.

Diversos cationes pueden adsorberse al envase si éste es de vidrio. Entre ellos se encuentran el aluminio, cadmio, cromo, cobre, hierro, plomo, manganeso, plata y zinc. Además, el vidrio puede liberar a la muestra boro, sílice y sodio; por esto, para la determinación de estos iones el envase debe ser siempre de plástico. De forma adicional, puesto que varios elementos metálicos presentan una mayor solubilidad a pH bajo, la determinación de los cationes se realizará en una muestra acidificada a pH inferior a 2 mediante la adición de ácido nítrico. Si se requiriera discernir entre las fracciones solubles y particuladas de alguno de estos metales deberá realizarse, previamente a la acidificación, un filtrado de la muestra con un filtro de fibra de vidrio GF/F pasando la fracción soluble, que es recogida en un recipiente de plástico, para acidificarse posteriormente y recogiendo el filtro con la fracción particulada (o determinándose la misma a partir de la diferencia entre la fracción soluble y el total). Dicho proceso deberá realizarse de manera simultánea al muestreo, ya que la oxidación de algunos elementos metálicos (especialmente las formas reducidas de hierro y manganeso) es muy rápida al ponerse en contacto con el aire, dando lugar a compuestos altamente insolubles al oxidarse.

Los cambios de pH pueden afectar a la solubilidad de diversos compuestos, en especial alterando el equilibrio de los carbonatos, dando lugar a la precipitación o redisolución de carbonato cálcico, lo que deberá tenerse en cuenta en la realización de estos análisis.

Las muestras para la determinación de compuestos inorgánicos de nitrógeno (nitrito, nitro y amonio) y fósforo (principalmente ortofosfato soluble) pueden sufrir alteraciones considerables en las concentraciones de estos compuestos como consecuencia de la actividad microbiana. Es por ello que las muestras para la determinación de los compuestos antedichos deben ser filtradas inmediatamente después de ser obtenidas mediante un sistema de filtrado portátil (ver Figura 22). El filtrado a través de un filtro inerte de tamaño de poro entre 0,45-0,8 μm prácticamente elimina los microorganismos responsables de esas alteraciones. Respecto a nitrógeno y fósforo, nunca deberán filtrarse las muestras para la determinación de nitrógeno y fósforo total, ya que éstos integran tanto la fracción soluble como la particulada.

La actividad microbiana puede alterar también la muestra en lo que se refiere a otras determinaciones, como la DBO (demanda bioquímica de oxígeno), o provocar el cambio de estado de oxidación de diversos compuestos como algunos de azufre. Sin embargo, las muestras para estas determinaciones no deben ser filtradas.

Las muestras para determinaciones biológicas pueden alterarse con el paso del tiempo, especialmente aquellas en las que la determinación se realiza por cultivo de los organismos vivos. Es por ello que estas determinaciones, en especial las analíticas microbiológicas, deben realizarse en un breve plazo de tiempo tras la toma de muestra, puesto que el número de microorganismos viables puede cambiar en un lapso breve de tiempo debido a su bajo tiempo de generación y/o a su elevada sensibilidad a unas condiciones ambientales adversas.

II.17.2. Métodos de conservación

Se incluye aquí un breve resumen de los métodos de conservación más utilizados. No obstante, la información completa sobre el tipo de recipiente a utilizar, la técnica de conservación utilizada y el tiempo máximo de conservación recomendado antes del análisis para cada uno de los analitos puede consultarse en la norma ISO 5667-3:1994 publicada en español por AENOR (1997), puede adquirirse la versión completa en la citada entidad. Antes de su aplicación, dichas técnicas deberán ser corroboradas por el responsable del laboratorio o programa de muestreo.

El método de conservación más generalizado consiste en mantener la muestra refrigerada en torno a 4° C y en oscuridad. Con ello se retrasan los cambios químicos y, sobre todo, biológicos, activados o acentuados por la temperatura o por la luz. En consecuencia, las muestras siempre se refrigerarán y mantendrán en la oscuridad, salvo especificación en contrario. En cuanto a la refrigeración, es preferible realizarla en un refrigerador eléctrico a una temperatura constante. Si esto no es posible, puede utilizarse una nevera de camping en la que se colocará hielo (a ser posible en una bolsa o recipiente hermético para que al derretirse no entre en contacto directo con los envases de muestra) o sustitutos, como los acumuladores de frío (no utilizarlos en caso de análisis de sustancias orgánicas). El uso de nieve carbónica para refrigerar está desaconsejado, puesto que puede llegar a congelar la muestra así como a alterar su pH. El refrigerador o contenedor utilizado deberá estar libre de contaminantes que puedan alterar las muestras, especialmente en el caso de compuestos orgánicos volátiles en los que la atmósfera de almacenamiento deberá estar totalmente libre de disolventes orgánicos, por lo que deberá someterse a los mismos procedimientos de limpieza que el material de muestreo.

El filtrado de las muestras usando el filtro adecuado permite la diferenciación de las fracciones solubles y particuladas de diversos elementos, además de eliminar gran parte o todos los microorganismos, evitándose los cambios provocados por éstos. El filtrado no se utilizará cuando pueda retener alguno de los constituyentes a analizar.

La congelación de las muestras sólo es recomendable cuando dicho proceso no vaya a afectar a las concentraciones de los analitos a determinar, lo cual deberá consultarse con el especialista correspondiente.

La adición de conservantes químicos se limitará a las muestras en cuyas determinaciones no interfiera dicho conservante, eligiéndose el mismo en función de los análisis a

realizar, ya que un producto conservante puede ser conveniente para un análisis, pero no para otro. Los conservantes retrasan en los cambios químicos y biológicos que se producirán en la muestra, actuando como bacterioestáticos o manteniendo la muestra en condiciones de pH u óxido-reducción adecuadas para retrasar dichos cambios. Así, por ejemplo, las muestras para el análisis de metales se acidifican con ácido nítrico a un pH < 2 (previamente filtradas si son para el análisis de metales disueltos), excepto para el análisis de mercurio en el que se suele añadir 2 ml por litro de una solución de dicromato potásico al 20% (p/v) preparada en ácido nítrico 1:1. Aunque el cloruro de mercurio y otros derivados de este metal se han utilizado como conservantes, actualmente se desaconseja su uso por la alta toxicidad de las formas solubles del mercurio. En general, en el manejo de cualquier conservante se tomarán las precauciones adecuadas para evitar riesgos derivados de su posible peligrosidad. La adición de conservantes se realizará siempre a partir de soluciones concentradas de los mismos usando volúmenes pequeños, de manera que se reduzca al mínimo su efecto de dilución.

En ocasiones el proceso de análisis puede comenzarse inmediatamente a la recolección de la muestra mediante la adición de un reactivo. Este reactivo reacciona con la sustancia a analizar, dando lugar a un compuesto más estable que permite el transporte de la muestra al laboratorio para proseguir con su análisis. Éste es el caso de la adición de sulfanilamida al agua que ha de servir para el análisis de nitrito, o una sal de manganeso para el análisis de oxígeno disuelto mediante el método de Winkler. No puede considerarse esta práctica como la adición de un conservante, ya que en realidad el compuesto químico añadido corresponde a uno de los reactivos del proceso analítico.

La adición de conservantes o reactivos debe realizarse utilizando generalmente un material específico (pipetas u otros) para cada uno de ellos. La adición se realizará generalmente sin tocar la muestra con la pipeta o cualquier otro dispensador, tapando y homogeneizando suavemente el compuesto añadido con la muestra. Si fuera necesario realizar alguna medida para determinar la cantidad de conservante o reactivo a añadir, esta medida se realizará sobre una alícuota de la muestra dispuesta en otro recipiente. Los conservantes o reactivos se prepararán de nuevo antes de cada campaña de muestreo, salvo aquellos cuya conservación sea prolongada, debiendo asegurarse de que no se encuentran contaminados. La pureza de los productos utilizados para preparar los conservantes será la misma que la de los reactivos a utilizar en el análisis.

Tanto el filtrado, la congelación, como la adición de conservantes o de reactivos a las muestras deberá realizarse de acuerdo con el analista, mientras que la refrigeración y el mantenimiento en la oscuridad son normas generales de aplicación.

II.17.3. Transporte

El transporte de las muestras desde el punto de muestreo al laboratorio se realizará manteniendo las condiciones de conservación especificadas. Como norma general, las muestras se mantendrán refrigeradas y en oscuridad siguiendo las especificaciones del apartado II.17.2. Al colocarlas en los contenedores se evitará ejercer presión sobre los recipientes y también su vuelco. Si éstos fueran de material frágil se realizará un empaquetado que, sin afectar a la representatividad de las muestras, evite la rotura o deformación de los envases. Para impedir su recalentamiento nunca se dejarán las muestras expuestas a la insolación directa ni en vehículos expuestos al sol cuando éstos estén estacionados.

Si el envío de las muestras se va a realizar por un servicio público de transporte, éstas se catalogarán como “material frágil”, debiendo empaquetarse de forma suficiente para resistir posibles impactos y manejos incorrectos sin deteriorarse. Deberá especificarse en el exterior del contenedor en que se envíen que las muestras deben mantenerse en refrigeración y que son de entrega urgente a su destinatario.

II.18. CONTROL Y GARANTÍA DE CALIDAD

El seguimiento de un protocolo adecuado en el muestreo debe dar como resultado una elevada calidad. En este caso se llevarán a cabo los siguientes procedimientos:

- Elaboración de blancos de tres tipos: de equipo, de campo y de transporte:
 - El blanco de equipo es un test para comprobar que el equipo de muestreo no está contaminado. Este blanco se prepara al inicio del muestreo y después cada 20 muestras aproximadamente (si el equipo se va limpiando en el campo). Se llena el equipo de muestreo con agua desionizada y ésta se trata después como una muestra normal. Este control debe hacerse con todos los equipos de muestreo.
 - El blanco de campo se prepara al final del muestreo y tiene por objeto comprobar que los envases y los conservantes no introducen error sobre el análisis. Se trata de llenar un envase para muestra con agua desionizada, añadir los conservantes y tratarlo como el resto de las muestras.
 - El blanco de transporte se utiliza para verificar que no se producen contaminaciones durante el trasiego de los envases desde que salen vacíos del laboratorio hacia el campo hasta que vuelven con la muestra. En cada una de las neveras se coloca uno de estos blancos que consiste en un envase del mismo tipo que los de las muestras lleno de agua desionizada y cerrado. Este tipo de blanco se suele utilizar para muestreo de sustancias orgánicas volátiles.
- Duplicados. Las muestras duplicadas se toman para comprobar la precisión del muestreo; consisten en muestras tomadas en un mismo punto y al mismo tiempo. Se recomienda tomar al menos un duplicado por muestreo.
- Submuestras. Se toman para evaluar la precisión analítica. La muestra se dispone en un recipiente, se homogeneiza y de él se toman dos o varias alícuotas, cada una de las cuales se consideran submuestras. Las submuestras se envían a laboratorios distintos.
- Muestras con adiciones conocidas. En muestras de campo se añaden concentraciones específicas de los parámetros que interesen. Este test se realiza para verificar la calidad del proceso analítico global, incluyendo interferencias con la matriz. Estas muestras tienen un tratamiento similar al de las demás.

II.19. PETICIÓN DE ANÁLISIS Y ENTREGA DE LA MUESTRA AL LABORATORIO

Es conveniente entregar la muestra al laboratorio acompañada de un formulario de petición de análisis, según el modelo utilizado por el demandante del análisis o el laboratorio receptor. Dicho formulario incluirá la información reflejada en el libro de registro de campo así como las especificaciones adicionales que sean necesarias, incluyendo la fecha en la que se necesitan los resultados y a quién deben dirigirse los mismos. También se in-

cluye en la documentación que acompaña a la muestra el impreso de registro de cadena de custodia.

En el formulario de cadena de custodia se reflejará la persona y laboratorio en el que se entrega la muestra, así como las condiciones de la entrega. La persona responsable de la recepción de las muestras deberá comprobar que el número total de recipientes y muestras coincide con lo reflejado en el informe o listado entregado. A partir de ese momento la responsabilidad de la muestra recae sobre el laboratorio y sus responsables, que seguirán sus protocolos previamente establecidos.

II.20. INFORME DEL MUESTREO

Se recomienda realizar un informe del muestreo que incluirá, como mínimo, la información que se refleja en el libro de registro de campo (ver apartado II.16) así como la documentación correspondiente a la cadena de custodia.

II.21. CADENA DE CUSTODIA

Siempre es deseable que todo proceso de investigación científica medioambiental y, en particular, aquellos que se desarrollan en los humedales, sea garantizado mediante una cadena de custodia de todas las evidencias obtenidas. No sólo por su clara utilidad para reconstruir las circunstancias ocurridas durante la investigación e interpretar correctamente los resultados obtenidos posteriormente, sino porque, llegado el momento, podría suponer una valiosa herramienta en el esclarecimiento de episodios de contaminación presentes y futuros. La complejidad de la investigación de delitos medioambientales exige un especial cuidado en la adquisición y gestión de la información relevante en cada caso.

Para asegurar la integridad de la muestra se establece una cadena de custodia desde el momento de su toma hasta la obtención de los resultados analíticos. El seguimiento de dicha cadena se refleja en un formulario cuyas características deben ser establecidas por el organismo de la administración con competencias al respecto. Como norma general, en dicho formulario se refleja el nombre y firma de todas las personas implicadas en el proceso de toma, manipulación y transporte de la muestra, así como el tiempo durante el que la muestra ha estado en poder de cada una de esas personas y los procedimientos de manipulación y almacenamiento de la misma.

La cadena de custodia es necesaria no sólo para garantizar la integridad de la muestra ante un posible uso probatorio de la misma, sino también resulta de utilidad para detectar posibles anomalías en el proceso de toma de muestra que puedan explicar posibles resultados anómalos.

En una cadena de custodia típica cabe resaltar los siguientes aspectos:

— ***Identificación del personal implicado en la investigación***

Al menos el nombre, los apellidos y la firma del personal cualificado que garantiza la autenticidad e integridad de las muestras, así como aquellas personas que actúen como testigos.

— *Seguimiento documental de la toma de muestras*

Se puede definir el seguimiento documental como la parte de la cadena de custodia, dirigida a evitar ingerencias externas que puedan afectar a la muestra. Consiste en una serie de documentos que acompañan todo el proceso, siguiendo un método que a continuación se describe.

El seguimiento está generalmente compuesto por tres tipos de documentos: documento interno, registro de custodia, y actas de inspección y toma de muestras.

— *Documento interno*

El documento interno consiste básicamente en la identificación que acompaña a la muestra. En este documento irán reflejados unos datos diferentes según el tipo de muestra, pero que en líneas generales son:

Número de referencia (código de identificación utilizado) y número de actuación judicial (si procede), tipo de muestra, descripción de la misma (peso, volumen, especie, etc.), origen, fecha y hora de la recogida, forma de recogida y personas que la efectúan, organismo solicitante, condiciones de conservación, tipo de estudio que se solicita y, por último, un apartado destinado a cualquier tipo de observación. Todo esto, protegido con los correspondientes precintos.

El objetivo del precintado es garantizar en lo posible la inaccesibilidad del contenido de la muestra a terceras personas y evitar su contaminación durante el transporte utilizando los medios a disposición de los técnicos encargados de la recogida.

En procedimientos sancionadores administrativos o penales, siempre que sea posible, debería constar de, al menos, dos réplicas destinadas a garantizar diversas características deseables de la prueba.

- Una muestra destinada al análisis por parte del organismo designado por el instructor.
- Una muestra por cada parte implicada que desee realizar sus propias determinaciones

Sean cuales sean las muestras y las réplicas disponibles, todas ellas deben ser obtenidas por la misma persona y conservadas e identificadas del mismo modo hasta el momento de su remisión.

— *Registros de Custodia o Acompañamiento*

Junto con las muestras debe acompañarse una hoja de registro que, junto con los libros de registro de cada uno de los estamentos por los que discurren las muestras, garantiza la no manipulación y la conservación de sus características hasta su entrada en el laboratorio.

En el registro de custodia vienen reflejados los números de referencia de las muestras, las fechas y horas en las que la muestra es recogida y entregada en el laboratorio o depósito de destino, con la firma y nombres de las personas responsables, y las observaciones relativas al modo de transporte y las irregularidades o defectos que se puedan apreciar en el envasado y conservación de las muestras.

En el caso de que la muestra pase por diversos lugares durante la fase de transporte o análisis, debe reflejarse todo el proceso, mediante la fecha, hora y lugar donde se detiene, con los nombres de las personas con acceso a la muestra y por su orden de intervención.

Como último paso, se considera muy conveniente la comunicación entre el lugar de destino y el de origen, para confirmar su recepción y comprobar el estado de la muestra, los precintos, o cualquier otra incidencia relevante.

También es interesante la utilización de libros registro, con todas sus hojas numeradas, en donde quedan anotados los datos referentes al envío: fecha, número de registro, personas que intervienen, breve descripción de la muestra. No existe un modelo unificado pero hoy en día comienza a extenderse el empleo de libros de registro en formato electrónico.

— *Actas de inspección*

No existe un modelo estandarizado para este tipo de documentos y, debido a su diversidad, no puede establecerse un modelo fijo para el caso de la investigación en zonas húmedas.

Habitualmente, toda acta de inspección debe contener con un encabezamiento en el que figuren, junto con la fecha hora y lugar de comienzo, los nombres de los participantes y su profesión o función en la inspección, para continuar con una descripción de toda la información relevante para la descripción de los hechos investigados.

La persona encargada de la redacción del acta debe estar especialmente atenta a las apreciaciones que realice el agente muestreador, reflejando todas sus apreciaciones, especialmente las descripciones de los equipos utilizados, el envase y precinto de las muestras, la hora y lugar concreto de la recogida y el número de registro de la muestra.

Conviene cerrar el acta en hora y fecha definida con la firma de todos los que han intervenido.

En el Anexo III se incluyen varios modelos de actas que pueden servir como ejemplos.

II.22. DESTINO DE LAS MUESTRAS

Una vez terminado el proceso analítico, las muestras deberán tratarse de la manera conveniente para evitar que produzca daños al medio ambiente y la salud pública. Los residuos de/con reactivos y/o conservantes serán procesados según la normativa correspondiente cuando se traten de residuos tóxicos o peligrosos, al igual que los restos de muestras que presenten este tipo de productos. Las muestras deberán conservarse más allá de la emisión del informe cuando así sea requerido por el coordinador del equipo de trabajo o el solicitante del análisis.

En lo que se refiere a muestras biológicas, todos los desechos resultantes deberán ser destruidos de manera conveniente para que no produzcan daños al medio ambiente y a la salud pública. En el caso de animales vivos, únicamente deberán ser retornados a su sistema natural (y sólo al de su procedencia) cuando el efecto del muestreo y el análisis no les impida el desenvolvimiento normal en dicho medio. En el caso de muestras fijadas de animales o plantas, éstas podrán almacenarse en el depósito correspondiente o ser asignadas a una colección científica que muestre interés por su conservación.

CAPÍTULO III

MUESTREO DE ORGANISMOS

III.1. INTRODUCCIÓN

Los seres vivos tienen unos requerimientos ecológicos, esto es, un rango de condiciones en el que pueden vivir y una necesidad de determinados recursos. Conociendo los requerimientos de determinados grupos de organismos vivos, la presencia y abundancia de estos seres vivos puede ser utilizada para evaluar el estado ecológico del medio en el que viven. El conocimiento por parte del agente muestreador de los principales grupos de organismos indicadores le permitirá, con una rápida observación, inferir posibles problemas que estén ocurriendo en el humedal. Por ejemplo, la ausencia de larvas de plecópteros, un indicador de aguas limpias, en un arroyo permanente en el que aparecen habitualmente puede poner en la pista al agente muestreador de un posible vertido, lo que le llevaría a tomar unas determinadas muestras para análisis de contaminantes. Por lo contrario, la presencia de las larvas de estos insectos le indicaría un buen estado de las aguas y ahorraría la obtención de otras muestras.

Puesto que la calidad del agua afecta a las poblaciones de organismos acuáticos, la naturaleza y salud de las comunidades acuáticas son una expresión de la calidad de ese medio.

Entre los métodos biológicos utilizados para evaluar esa calidad, se incluyen la obtención, recuento e identificación de organismos acuáticos así como la toxicidad, bioconcentración y bioacumulación de contaminantes.

La información que se obtiene con este tipo de determinaciones puede servir para:

- ayudar a la interpretación de los análisis químicos
- identificar la naturaleza, alcance y efectos biológicos de la contaminación
- proporcionar datos sobre el estado de un sistema acuático de una forma regular

La naturaleza concreta de un problema y las razones de obtención de las muestras indicarán qué comunidades de organismos acuáticos deben ser examinadas así como la toma de muestras y las técnicas analíticas a emplear.

Como criterio general se pueden considerar los siguientes grupos de organismos acuáticos:

- PLANCTON. Son comunidades de algas (fitoplancton) y animales (zooplancton), que nadan o están suspendidas en el agua, sin motilidad o con motilidad insuficiente para evitar ser arrastrados por las corrientes.
- PERIFITON. Comunidades de algas microscópicas asociadas a las superficies de objetos sumergidos.
- MACROFITON. Las plantas grandes sujetas al fondo o flotando libremente.
- MACROINVERTEBRADOS. Invertebrados de tamaño superior a 200 μm . Generalmente viven en los fondos (bentos)
- PECES. Para estos fines son sólo los peces con aletas.
- ANFIBIOS, REPTILES ACUÁTICOS, AVES Y MAMÍFEROS. Estos vertebrados pueden ser afectados, directa o indirectamente, por vertidos y son útiles en el control de la presencia de sustancias tóxicas en las aguas.

No debe olvidarse que en este caso el muestreo está realizándose sobre organismos vivos, siendo necesario limitar la cantidad de muestra a la estrictamente necesaria para realizar las analíticas deseadas. Puesto que los organismos muestreados pueden ser característicos de la zona de muestreo, debe evitarse su traslado a otras zonas. En consecuencia, no sólo no deben liberarse en otras zonas, sino que el material utilizado en el muestreo deberá estar suficientemente limpio como para garantizar que no se está trasladando fauna o flora de unos lugares a otros. La introducción de organismos alóctonos en un sistema natural puede provocar graves daños a los seres que de manera natural habitan esas zonas, provocando un grave desequilibrio del ecosistema. Así, deberán cumplirse estrictamente todos los requisitos establecidos por la legislación para evitar estas alteraciones y, de forma especial, se deberá ser respetuoso con los seres vivos que habitan la zona de muestreo.

III.2. MUESTREO PARA ANALÍTICAS MICROBIOLÓGICAS

II.2.1. Introducción y generalidades

Los microorganismos son pequeños seres vivos no visibles directamente por el ojo humano. Incluyen bacterias, pequeñas algas, hongos y animales. Algunos de ellos son empleados como indicadores de la calidad del agua, principalmente determinados grupos metabólicos bacterianos, que son utilizados como indicadores de contaminación de origen fecal, esto es, de aguas contaminadas con heces humanas o de otros animales. Estos indicadores lo son porque al formar parte de la flora bacteriana del tracto intestinal de los animales se encuentran siempre presentes en sus heces en cantidades ingentes, de manera que su detección y cuantificación permite detectar la contaminación del agua por dichas heces. Las heces son una potencial fuente de enfermedades, ya que los individuos enfermos y/o portadores pueden excretar con ellas microorganismos patógenos que al contactar con otro individuo, potencialmente infectable, podrían provocarle la enfermedad. Las aguas contaminadas por heces constituyen, pues, el vehículo de transporte de muchas enfermedades. Dado que los microorganismos indicadores son extraordinariamente abundantes en las heces, su ausencia garantizará la ausencia de microorganismos patógenos (al menos los de características relativamente similares), mientras que su presencia alertará de la posibilidad de presencia en las aguas de microorganismos potencialmente patógenos.

III.2.2. Selección del lugar de muestreo

Para la selección del lugar de muestreo se seguirán las directrices del apartado II.3, coincidiendo los puntos de muestreo para los análisis físico-químicos y microbiológicos.

III.2.3. Procedimiento de muestreo

Puesto que en las analíticas microbiológicas se va a determinar la presencia de microorganismos, y dado que éstos no son visibles a simple vista, una de las características principales que son exigibles al muestreo para analíticas microbiológicas es el uso de material estéril (especialmente en lo que se refiere a los envases de almacenamiento de muestras) que no aporte contaminantes que puedan propiciar o inhibir el crecimiento de los microorganismos. Estos recipientes, una vez limpios siguiendo el protocolo general de lavado de envases (ver apartado II.7.2) deberán ser esterilizados previamente a la recogida de las muestras. Pueden utilizarse recipientes previamente esterilizados, como son los frascos para análisis de orina que se venden en farmacias, ya que dichos frascos vienen en el interior de una bolsa y cerrados de manera que las condiciones de esterilidad no se rompen hasta su apertura en el momento de tomar la muestra. También pueden prepararse recipientes de otro tipo si se dispone de algún método de esterilización, que usualmente en los laboratorios suele ser el autoclave con un ciclo de 30 minutos a 121° C. En este caso se recomienda utilizar recipientes de vidrio, ya que muchos tipos de plástico no resisten las condiciones de alta temperatura que se dan en el proceso de esterilización por autoclave.

Los recipientes a utilizar no se abrirán hasta el momento del muestreo y no serán enjuagados con agua de la muestra. Se evitará en todo momento que nada, que no sea la muestra, toque el interior de la botella o la cara interna del tapón, por lo que éste deberá sujetarse con la mano mientras se realiza el muestro, no depositándolo sobre ningún material. Para el muestreo se sumergirá la botella boca abajo, tras lo cual se girará de manera que su boca apunte hacia la corriente (si es que ésta existe), o bien creando dicha corriente por arrastre de la botella en el interior del agua, evitándose el contacto con la orilla o el lecho.

Dado que muchos de los microorganismos que pueden incluirse en el análisis requieren oxígeno para respirar, debe dejarse una porción del recipiente sin llenar, de manera que el aire contenido en esa zona asegure un adecuado suministro de oxígeno para los microorganismos que lo necesitan hasta el momento del análisis. Esta consideración de tipo general sólo deberá ser obviada, esto es, únicamente deberá rellenarse totalmente el recipiente, cuando los microorganismos a determinar sean anaerobios estrictos, lo que deberá especificarse previamente por el solicitante del análisis.

Para la toma de muestras en profundidad existen aparatos especiales que permiten introducir el recipiente estéril hasta la profundidad deseada, donde se abre y obtiene la muestra sin romper la esterilidad del proceso.

El muestreo se realizará preferentemente de manera directa, sin utilizar recipientes intermedios para la toma de muestras, ya que éstos deberían garantizar así mismo la esterilidad. No obstante, en ocasiones esto no es posible cuando la muestra a obtener no se encuentra al alcance directo, debiendo utilizarse dispositivos contenedores que permitan acceder y extraer la muestra deseada. En ese caso la situación ideal sería la utilización de un aparato muestreador especial para la toma de muestras en condiciones de esterilidad o bien la esterilización de un aparato muestreador de los habitualmente utilizados, aunque

esto no siempre es posible. En el caso de que sea factible, se debe intentar que la parte del aparato muestreador que se pondrá en contacto con la muestra esté estéril, aunque el resto del aparato muestreador no lo esté.

Respecto al material utilizado para el muestreo, como podrían ser las botellas hidrográficas, de forma práctica resulta imposible mantener su esterilidad, pero puede ser parcialmente subsanado este impedimento si el aparato se mantiene limpio antes de su uso (puede flamearse con alcohol previamente a su uso, si es de material resistente), y se lava abundantemente con agua de la misma muestra a tomar, preferentemente haciendo circular agua a través del receptáculo contenedor previamente a la toma definitiva de la muestra.

En aguas con presencia de cloro residual debe añadirse un agente desclorante para evitar la acción bactericida del cloro. Como desclorante se puede utilizar tiosulfato sódico añadiendo entre 0,3 y 1 ml (0,3 para aguas cloradas para su potabilización, las cantidades se aumentan hasta un máximo de 1 ml en el caso de cloraciones extremas de aguas residuales) de una solución de Na_2SO_3 al 8,3% (p/p) por cada litro de muestra (o las cantidades correspondientes para volúmenes menores). Si en el agua pueden existir altas concentraciones de metales pesados se añadirá un agente quelante, como la sal disódica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA-Na_2) a las concentraciones indicadas por el laboratorio receptor de la muestra.

III.2.4. Conservación, transporte y almacenamiento

La muestra debe trasladarse en condiciones de refrigeración (alrededor de 4° C) al laboratorio, donde debe analizarse rápidamente (antes de 6-8 horas), ya que el bajo tiempo de generación de los microorganismos y la sensibilidad de muchos de ellos (especialmente los indicadores y patógenos) a las condiciones de conservación (adversas para ellos), hacen que la alteración de las abundancias y viabilidad de las poblaciones microbianas en la muestra se alteren rápidamente.

III.3. PLANCTON

III.3.1. Introducción y generalidades

El plancton lo forman los organismos acuáticos microscópicos que viven en suspensión en el agua (Figuras 24 y 25). Dado que esos organismos tienen unos determinados requerimientos ecológicos, sus ciclos vitales son cortos y responden rápidamente a los cambios ambientales, la determinación de su presencia y abundancia en las aguas puede usarse para evaluar la calidad de las mismas. Por otro lado, algunos de estos microorganismos pueden presentar problemas de toxicidad o producción de sustancias indeseables. Así pues, la determinación de la presencia de especies potencialmente tóxicas resulta de interés en las aguas. El fitoplancton está constituido por algas microscópicas unicelulares, filamentosas o coloniales, generalmente con capacidad fotosintética y que contienen, entre otros, pigmentos clorofílicos. El zooplancton, sin embargo, está formado por animales microscópicos, básicamente microcrustáceos, rotíferos y protozoos.

III.3.2. Selección del lugar de muestreo

Para facilitar la acumulación de información complementaria, la toma de muestras debe realizarse preferentemente en las mismas estaciones señaladas para el muestreo físico-químico y microbiológico, por lo que las especificaciones generales para la elección de los puntos de muestreo son las mismas que las señaladas en aquella sección. No obstante, debe reseñarse que en aguas corrientes parte del plancton que se recoja puede tener su origen en el perifiton o el bentos, o bien de las aportaciones provenientes de zonas con aguas estancadas, donde las condiciones favorecen el desarrollo del plancton.

III.3.3. Procedimiento de muestreo

El procedimiento a emplear difiere en función de que se requiera o no la concentración de las muestras y de si la muestra va a utilizarse para la cuantificación de la abundancia del plancton o si únicamente se pretende obtener datos de presencia/ausencia. Por lo general, dado que la abundancia del fitoplancton es mayor que la del zooplancton, es para el muestreo del segundo para el que, en ocasiones, se requiere la concentración de las muestras o una mayor cantidad de la misma.

Fitoplancton. La muestra se recogerá directamente, sin filtración previa, en un recipiente de vidrio preferentemente de color topacio. Para el muestreo en aguas superficiales fácilmente accesibles puede rellenarse el recipiente de manera directa sumergiéndolo unos 20-25 cm por debajo de la superficie. No obstante, como procedimiento general de muestreo en zonas de mayor profundidad, éste se realizará mediante una botella hidrográfica como las descritas en el apartado II.5.1. El volumen a muestrear variará en función de la abundancia del fitoplancton (que se puede estimar de manera grosera observando la transparencia y coloración –intensidad del color verde– del agua). Así, para aguas oligotróficas y/o pobres en plancton puede ser necesario obtener hasta 5 litros de agua, aunque por regla general suele ser suficiente con una muestra de 0,25-0,5 litros.

Zooplancton. Dado que el zooplancton es, por lo general, menos abundante que el fitoplancton, suele ser necesaria la concentración de las muestras a partir de un volumen grande de agua. Dicha concentración debe hacerse *in situ*, ya que el traslado de los volúmenes a filtrar hasta el laboratorio sería inviable por la gran cantidad de muestra necesaria. Para la concentración existen diversos procedimientos. Uno de ellos, que permite una cuantificación exacta de las densidades poblacionales del zooplancton y la obtención de muestras de una profundidad determinada, es la obtención de muestras con una botella hidrográfica y el filtrado de un volumen conocido a través de una malla de nylon con un tamaño de poro suficientemente pequeño como para retener el zooplancton. Usando una malla de 20-30 μm prácticamente se recogen todos los organismos zooplanctónicos, aunque existen algunos protozoos inferiores a ese tamaño. No obstante, salvo que este grupo de organismos tenga un especial interés en las determinaciones a realizar, no es conveniente utilizar tamaños de poro más pequeños, ya que el filtro se obturaría más rápidamente y el volumen de agua muestreada podría no ser suficiente (en ese caso podrían utilizarse varios filtros reemplazando el obturado por otro). Una vez recolectados los organismos zooplanctónicos, el (los) filtro(s) se colocará(n) en un recipiente y se adicionará el conservante adecuado.

Las botellas hidrográficas a utilizar pueden ser similares a las usadas para el fitoplancton (tipo Ruttner, Niskin), aunque existen botellas hidrográficas más adecuadas en las que los taponos no distorsionan el flujo de agua a través del cilindro, como son las botellas Van

Dorn (Figura 26). Para los organismos zooplanctónicos más grandes, con facilidad para escapar del muestreo con botella, es conveniente utilizar trampas de captura de zooplankton tipo «bailer», como la de Schindler-Patalas (Figura 12).

Cuando únicamente se necesitan datos cualitativos, el muestreo de zooplankton puede realizarse utilizando mangas de plancton (Figura 27). Mediante el uso de mangas se puede muestrear una gran cantidad de agua, lo que las hace de especial utilidad en sistemas en los que la densidad zooplanctónica es baja, aunque tienen el inconveniente de que en las muestras así tomadas no es posible la determinación exacta de las densidades poblacionales (se podría hacer una aproximación para saber el volumen muestreado aproximado sabiendo el diámetro de la boca y la longitud –o profundidad– muestreada). Las redes deben ser preferentemente cónicas con el cono truncado, construidas con nylon y reforzadas con lona en las costuras. Pueden ser de distintos tamaños de poro, aunque una red de 30 μm tendría un poro suficientemente pequeño como para colectar todo el zooplankton. El muestreo con la manga de plancton puede hacerse en profundidad (red vertical), sumergiendo la red hasta la profundidad deseada y recuperándola a una velocidad de aproximadamente 0,5 m/s, o en horizontal en superficie (red de arrastre) arrastrando la red desde una embarcación o bien lanzándola desde la orilla y recuperándola con la cuerda anudada a la boca. Para su mejor conservación la red debe lavarse con agua del grifo tras su utilización y dejarse secar bien antes de guardarla en un lugar seco y en oscuridad.

III.3.4. Conservación, transporte y almacenamiento

Las muestras de plancton pueden ser analizadas vivas o una vez fijadas. Si se requiere una muestra viva los envases no se rellenarán totalmente, sino que se dejará una buena parte del recipiente sin rellenar para evitar el agotamiento del oxígeno y la asfixia de los organismos planctónicos. La muestra viva se mantendrá refrigerada, sin tapar, en la oscuridad y se entregará rápidamente en el laboratorio. Caso de que no se requiera la observación *in vivo* las muestras serán fijadas siendo diferente el conservante recomendado para los distintos tipos de organismos planctónicos.

Para la conservación del fitoplancton el conservante recomendado es la solución de lugol a una concentración entre 3 y 7 ml por litro (mayor cuanto más tiempo de conservación se requiera). Para preparar un litro de esta solución de lugol se disuelven 100 g de yoduro potásico y 50 g de cristales de yodo en un litro de una solución 10% (v/v) de ácido acético glacial (se podría utilizar acetato sódico si se requiere una solución no ácida, como en el caso de determinaciones de cocolitofóridos).

Para el zooplankton, el conservante más utilizado es el formol (formaldehído) tamponado (normalmente tamponado con borato sódico a una concentración de 20 g por litro de formol). Se adiciona formol hasta alcanzar una concentración final en la muestra de un 4-5% (v/v), aunque este porcentaje puede variar en función del tiempo que se vaya a tener almacenada la muestra. Debe tenerse en cuenta que el formol comercial suele venderse a una concentración del 37-40%. También puede conservarse en etanol al 70%, que no daña tanto a los protozoos y además no presenta la toxicidad del primero.

Las muestras fijadas (con lugol, formol o el conservante que en cada caso corresponda) pueden almacenarse sin problemas en un lugar fresco, seco y en oscuridad durante un período de, al menos, 6 meses; transcurrido éste, deberá controlarse que todavía mantienen

el conservante y, en caso contrario, se añadirá más cantidad del mismo. En el laboratorio, las muestras se estudian, tras sedimentación, en unas cubetas especialmente diseñadas (Figura 28), usando microscopios o lupas.

III.4. PERIFITON

III.4.1. Introducción

Se denomina perifiton a las algas microscópicas que crecen adheridas a sustratos sólidos en el medio acuático, ya sean piedras, palos, vegetación acuática, etc. Dado que estas algas permanecen unidas al sustrato de forma permanente, su utilidad como testigo de los procesos ocurridos en el medio acuático es incluso mayor que la del propio plancton, sirviendo igualmente y por las mismas razones como indicadores de la calidad del agua en función de su ausencia o presencia y, en su caso, abundancia. Dentro del perifiton, la tendencia actual es la de utilizar a un grupo de algas, las diatomeas, como indicadoras de calidad, ya que al conocerse de manera precisa los requerimientos ecológicos de una gran cantidad de especies se han propuesto índices de calidad del medio acuático basados en la determinación de las diatomeas que viven adheridas al sustrato. Es por ello que en el apartado III.5 se incluye un protocolo más detallado desarrollado para el muestreo de estas algas, que sirve también como protocolo general para el muestreo de perifiton en sustratos naturales.

III.4.2. Selección del lugar de muestreo

Para la ubicación de las estaciones de muestreo se usarán criterios similares a los reseñados en el apartado II.3. No obstante, puesto que los organismos a muestrear viven adheridos al sustrato, es dicho sustrato y no el agua que lo circunda lo que se va a muestrear. En el apartado III.5 se recogen algunas indicaciones al respecto.

III.4.3. Procedimiento de muestreo

La primera distinción a realizar aquí es si el muestreo se va a realizar sobre sustratos naturales o sobre un sustrato artificial colocado a tal efecto. Para el muestreo en sustratos naturales la metodología a utilizar es la recogida en el apartado III.5.

El muestreo mediante sustratos artificiales consiste en colocar un determinado objeto limpio en el interior del agua, el cual es recogido al cabo de un tiempo determinado una vez colonizado por el perifiton (en torno a dos semanas en verano y hasta unas 5-6 semanas en invierno). Deben tenerse en cuenta los factores estacionales que provoquen variaciones en el caudal. El objeto más utilizado como sustrato de colonización es una lámina portaobjetos rectangular de vidrio, de los utilizados para la observación microscópica. (7,5 x 2,5 cm). Si la corriente es pequeña o nula y la profundidad escasa, los portaobjetos se colocan en el fondo. Si la corriente es alta, deben asegurarse para evitar que sean arrastrados por la corriente. Se colocarán varios portaobjetos por cada estación de muestreo, para aumentar la validez estadística del muestreo. Cuando la turbidez o profundidad sean elevadas los portaobjetos deben colocarse en un soporte flotante de plástico acrílico anclado al fondo.

III.4.4. Conservación, transporte y almacenamiento

La conservación de las muestras se realiza colocándolas en formol al 4%. En el caso de los substratos artificiales se pueden conservar directamente los portaobjetos sumergidos en formol o bien puede rascarse el perifiton desarrollado sobre cada uno ellos y recogerse en un bote con formol, por cada portaobjetos. Las muestras conservadas en formol pueden almacenarse durante al menos 6 meses, siendo recomendable añadir más conservante transcurrido ese período.

III.5. DIATOMEAS BENTÓNICAS EN HUMEDALES CONTINENTALES

III.5.1. Introducción

La siguiente metodología de recolección de muestras de diatomeas es aplicable a comunidades que se desarrollan sobre substratos duros, sumergidos en aguas dulces o salobres del ámbito continental.

El protocolo que sigue puede ser aplicado a espacios incluidos en la Convención Ramsar, excluidos los sistemas marinos y, específicamente, a ríos o arroyos permanentes (o temporalmente fluyentes) y zonas litorales de lagos, lagunas y embalses.

III.5.2. Selección del lugar de muestreo

Es siempre necesaria una visita previa al lugar del muestreo. Esta visita debe preceder a la recogida de las muestras y servirá para determinar el lugar exacto de recolección. Para ello pueden considerarse los siguientes criterios generales:

Para ríos rápidos:

- Evitar pozas y tomar las muestras en zonas de excesiva corriente (rápidos del río).
- Evitar tramos muy sombreados, a no ser que ésa sea una característica distintiva del punto a evaluar.
- Evitar zonas emergidas o que presumiblemente lo hubieran estado en algún momento reciente.
- Evitar áreas demasiado cercanas a las orillas y obtener las muestras 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 del lecho fluvial.

Para ríos lentos:

- Evitar tramos muy sombreados, a no ser que ésa sea una característica distintiva del punto a evaluar.
- Evitar zonas emergidas o que presumiblemente lo hubieran estado en algún momento reciente.
- Evitar áreas demasiado cercanas a las orillas.
- Evitar zonas debajo de puentes o recientemente afectadas por obras de ingeniería.

Para zonas litorales de lagos, lagunas y embalses:

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

III.5.3. Selección del tipo de sustrato en el área de estudio

Es importante determinar el tipo de sustrato en el que se efectuará la recolección de muestras para análisis de diatomeas, puesto que el resultado que se pueda obtener está muy relacionado con este factor. Como criterio general, es recomendable efectuar la recolección de comunidades que se desarrollen sobre sustratos rocosos (rocas, piedras, cantos rodados, gravas, ...). En caso de duda, pueden establecerse los siguientes criterios:

- Determinar cuál es el sustrato más abundante en el punto de muestreo (rocas, piedras, arena, limo, plantas acuáticas).
- Si las rocas o piedras son el sustrato más abundante, éste será el material en el que se efectuará la recolección.
- Si arena o limos son los más abundantes pero existe aproximadamente más de un 10% del total del sustrato que sea roca o piedras, se escogerán preferentemente las rocas o piedras.
- Si no existen más que arenas, limos o plantas acuáticas, se recogerán las muestras de aquellos que sean característicos del punto de muestreo.

III.5.4. Recolección de muestras sobre los sustratos determinados

Una vez seleccionado el punto de muestreo y determinado el tipo de material sobre el que se efectuará la recolección, se podrá proceder a la recolección propiamente dicha. Para ello se deberá seguir el siguiente procedimiento:

- Material necesario para la recolección:
 - Material de protección personal:
 - Botas de agua apropiadas a la profundidad del sistema.
 - Guantes de látex (esencial en aguas sospechosas de contaminación).
 - Material de recolección:
 - Cuchillo de punta roma.
 - Cuchara.
 - Pinzas.
 - Botes de plástico o cristal (viales) de 50 ml de capacidad.
 - Rotulador indeleble.
 - Formaldehído al 4% (tener presente que el formol es una sustancia tóxica, que no debe ser inhalada y que deberá ser manipulada con guantes).
 - Pañuelos de papel (para mantener limpias las superficies a rotular).

- Recolección sobre piedras, rocas, cantos rodados o grava:
 - Seleccionar piedras de morfología similar en el punto exacto de muestreo, no sospechosas de haber sido giradas recientemente.
 - Si se trata de rocas, con tres es un número suficiente; si son cantos rodados, deberán ser cinco; si se trata de gravas, el número debe ascender hasta siete.
 - Las piedras han de ser seleccionadas al azar, pero deben tener una cobertura algal semejante.
 - Rascar profundamente una parte significativa de la cara superior de cada uno de los sustratos tomados del punto de muestreo; el cuchillo puede ser adecuado para obtener el material, pero el recolector puede ayudarse con el pincel o las pinzas.
 - La parte a rascar puede ir desde la totalidad de la superficie superior en el caso de las gravas, hasta una pequeña fracción en el caso de las rocas. Cabe anotar qué fracción se ha obtenido y de qué material.
 - Poner el material obtenido en un único vial.
 - Marcar adecuadamente en el vial la fecha y el punto de muestreo.
 - Añadir un pequeño volumen de formol.
 - Anotar el tipo de sustrato muestreado (rocas, cantos rodados, gravas) y el número de unidades muestreado.
- Recolección sobre arena o limos:
 - Recoger una muestra de la *parte superficial* del sedimento arenoso o limoso mediante una cuchara, estimando el área muestreada.
 - Anotar la profundidad (en centímetros) que comprende la muestra obtenida sobre la arena o el limo.
 - Disponer el material en el vial y añadir un pequeño volumen de formol.
- Recolección sobre plantas acuáticas u otros organismos:
 - Recoger las muestras sobre macrófitos (plantas acuáticas) sumergidas o sobre porciones sumergidas, estimando el área muestreada.
 - Anotar la información de la planta sobre la que se ha recogido la muestra.
 - Proceder como en los sustratos anteriores.

Por último, se debe asegurar, en todos los casos, el correcto cierre de los viales y su adecuado etiquetaje. Las muestras, una vez fijadas, se deben conservar en un lugar apartado de la luz y evitar una prolongada exposición a altas temperaturas.

II.6. PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS COMO INDICADORES

III.6.1. Introducción

Las algas planctónicas (fitoplancton) y bentónicas (perifiton) responden al aumento en la carga de nutrientes inorgánicos, en definitiva a la eutrofización, con un mayor crecimiento y abundancia. Puesto que las algas contienen pigmentos fotosintéticos (Figura 29), como la clorofila, la cuantificación de la concentración de estos pigmentos da una medida cuantitativa indirecta de la magnitud del fenómeno de la eutrofización. Siendo la clorofila-*a* el pigmento común no sólo a todas las plantas que fotosintetizan, sino especialmente a las algas microscópicas, la determinación de la concentración de clorofila-*a* en el agua (en realidad, en el fitoplancton que está en suspensión) sirve para, entre otros parámetros, evaluar el es-

tado trófico de las aguas de un humedal. Es por ello que se ha dedicado un apartado específico a esta determinación, incluyéndose en el apartado de biota, aunque también podría considerarse como un parámetro bioquímico. Esta determinación es aplicable de manera general a las aguas retenidas, donde las condiciones permiten el desarrollo del plancton, mientras que en las aguas corrientes –con escaso plancton– debería utilizarse el perifiton como indicador, aunque es mucho menos utilizado como tal.

III.6.2. Selección del lugar de muestreo

La localización de los puntos y, en su caso, de las estaciones de muestreo se realizan con los mismos criterios señalados en el apartado referido al plancton (III.3.2).

III.6.3. Procedimiento de muestreo

Puesto que se trata de una determinación cuantitativa, el muestreo debe ajustarse a dichas técnicas. La obtención del agua para el análisis de la clorofila planctónica se realizará de la misma manera reseñada en el apartado del muestreo de fitoplancton (III.3.3), aunque los volúmenes de muestra requeridos son mayores que en aquel caso. Por regla general, se requiere en torno a un litro de muestra que se deposita en un recipiente de plástico, aunque en sistemas muy ricos en fitoplancton puede ser suficiente con una cantidad de 250 ml y en sistemas muy pobres en fitoplancton (que se detectan por la alta transparencia del agua) se pueden requerir entre 3 y 5 litros de agua para realizar un análisis adecuado por una técnica espectrofotométrica clásica tras extracción en un solvente orgánico. Si las técnicas de determinación son cromatográficas o fluorométricas, estas cantidades se reducen, pero dicha reducción en el volumen de muestra a tomar deberá ser especificada, en su caso, por el laboratorio.

Si se requiere específicamente, la muestra obtenida por el procedimiento arriba reseñado puede filtrarse *in situ*. Para ello se procederá al filtrado de volúmenes conocidos de muestra a través de un filtro de fibra de vidrio capaz de retener a todos los microorganismos fitoplanctónicos (ver apartado II.14.3). El filtro se monta en un portafiltros tipo Swinnex, que se conecta a una jeringa en la que se introduce el agua a filtrar –previamente se determinará el volumen a filtrar con una probeta– accionando el émbolo hasta que todo el volumen se ha filtrado (Figura 22). Si el volumen filtrado no es suficiente, se separa el portafiltros de la jeringa antes de sacar el émbolo de la misma (ya que, si no, se rompería el filtro por la succión en vacío), se saca el émbolo, se vuelve a conectar la jeringa al portafiltro y se introduce el volumen adicional a filtrar. Esta operación se repite hasta que se ha filtrado un volumen suficiente de muestra, anotándose dicho volumen y recogiendo el filtro tras sacarlo del portafiltros, guardándose en un vial o tubo preferentemente de vidrio. El vial conteniendo el filtro debe recubrirse con papel aluminio para evitar la alteración por la luz y transportarse al laboratorio en congelación.

III.6.4. Conservación, transporte y almacenamiento

Si únicamente se ha tomado la muestra de agua sin filtrar, debe conservarse en refrigeración y en oscuridad. Ha de entregarse en el laboratorio lo más rápidamente posible para que se proceda a su análisis inmediato.

Si la muestra ha sido filtrada *in situ*, el vial conteniendo el filtro puede congelarse, aumentando así la posibilidad de demora hasta el momento del análisis; si éste se retrasa unas horas, debe refrigerarse en un lugar oscuro. No es conveniente añadir el solvente de extracción –generalmente acetona o etanol– hasta el momento del inicio del procedimiento analítico, ya que una vez extraídos los pigmentos su degradación se acelera por efecto de la luz y, en general, por procesos oxidativos.

III.7. MACROFITON

Está constituido por las plantas vasculares acuáticas con flores, pero también incluye musgos, helechos y algas macroscópicas. Una determinación macrofítica incluye la identificación de especies, su localización y cantidad.

Se necesitan varios protocolos de toma de muestras para cubrir las diversas necesidades del estudio. Durante las investigaciones previas a las de campo deben reunirse mapas, planos, fotografías aéreas y claves taxonómicas.

Los métodos de obtención del macrofiton son muy diversos por lo que a continuación se indican los más utilizados.

- Recogida manual: si lo permite la profundidad del agua, su transparencia, temperatura, flujo, etc., deben recogerse las especies manualmente. En condiciones ideales este tipo de recolección permite una evaluación más detallada y amplia de la comunidad macrofítica.
- Cadenas de dragado: se pueden confeccionar cadenas de dragado soldando ganchos en forma de U, afilados, a una cadena corta (0,6 a 1,0 m). Se ha de unir la cadena a una cuerda y tirar de ella a través del agua. La cadena de dragado se puede utilizar fácilmente desde un barco que se mueva lentamente o que esté parado. Es más efectivo para recoger especies macrofíticas sumergidas con formas de crecimiento elevado.
- Rastrillos y pinzas: Los rastrillos con mangos de diversas longitudes y las pinzas para ostras pueden ser útiles para la recogida de macrofitos.
- Tomamuestras de cuchara: Se pueden utilizar dispositivos desarrollados para obtener muestras de organismos bénticos como el tomamuestras de Ekman, Ponar y otros similares (ver apartado III.8.2.B). La cuchara de Ekman es la más recomendada.
- Sondímetros para registro: Se utilizan para determinar la altura y distribución de los macrofitos debajo de la superficie.

Una vez obtenidas las muestras debe procederse a su preparación, montaje e identificación.

- Preparación: Deben utilizarse muestras frescas para identificación, cuando sea posible. Hay que evitar tomar plantas inmaduras o sin flores. Dado que las plantas acuáticas contienen mayor proporción de agua (80-95% en peso) que las terrestres y menor tejido de soporte, se necesitan métodos diferentes de secado, conservación y montaje. Después de su recolección se recomienda envolverlas en varias capas de papel y sumergirlas en agua. Etiquetar las plantas indicando fecha y lugar. Utilizar para su transporte una nevera portátil con hielo picado. Pueden mantenerse durante varios días a 4° C.

- Montaje: El montado húmedo se prepara introduciendo la muestra en un frasco de vidrio con tapa hermética. Como medio conservante debe utilizarse formol al 10% (una parte) y agua (tres partes). Agregar un poco de polvo de cobre. Para conservar las plantas en seco hay que utilizar papel de herbario; una vez escurrecido el exceso de agua se deben envolver con papel encerado para evitar que la planta se adhiera a los secantes. Prensar la planta durante 3-5 días cambiando los secantes cada dos días hasta que esté suficientemente seca.
- Identificación: Se precisa un estereomicroscopio para identificar las hierbas acuáticas y juncos. Observar las estructuras diseccionándolas bajo la lupa. Utilizar tablas de clasificación adecuadas.

III.8. MACROINVERTEBRADOS BÉNTICOS

III.8.1. Consideraciones generales

Se consideran macroinvertebrados bénticos a los invertebrados acuáticos que habitan en el sustrato de lagos, ríos, estuarios y aguas marinas y son apreciables a simple vista. El tamaño límite inferior suele ser de 0,5 mm, pero habitualmente son mayores de 3 mm.

La composición y número de individuos por unidad de superficie (densidad) suele ser estable de un año a otro en medios no alterados. No obstante, las variaciones estacionales pueden producir cambios importantes dentro del mismo año.

La mayor parte de los ecosistemas acuáticos soportan diversas comunidades de macroinvertebrados en las que se suele dar un equilibrio de distribución de las especies entre el número total de individuos presentes. Estas comunidades responden a la calidad cambiante del hábitat por ajustes de la estructura comunitaria.

Las respuestas de la comunidad de macroinvertebrados a las perturbaciones ambientales son útiles para evaluar el impacto de residuos y vertidos, así como de otros usos del suelo sobre los cursos de agua superficiales.

Para valorar el impacto de una fuente contaminante hay que comparar (mediante índices biológicos) las comunidades de macroinvertebrados y sus hábitats en los puntos de influencia de la contaminación con los recogidos en lugares adyacentes no afectados.

El procedimiento incluye la toma de muestras y análisis de ambas comunidades y la determinación para ver si la comunidad supuestamente afectada difiere de la no afectada. Recientemente se ha publicado un protocolo denominado *Ecological Status Rivers Mediterranean* (ECOSTRIMED) para determinar el estado ecológico de los ríos mediterráneos (Prat y otros, 1999) en el que se combinan de forma sencilla dos índices biológicos con macroinvertebrados y un índice de calificación del estado de ribera.

A partir de los datos obtenidos se pueden caracterizar y comparar las comunidades de acuerdo con la estructura comunitaria, densidad, biomasa, diversidad y otros análisis. Es deseable la caracterización de la concentración de oxígeno disuelto, sustrato, profundidad de agua, tipo de sedimento y carbono orgánico total (C.O.T.).

Antes de realizar un estudio deben determinarse los objetivos del mismo, así como la información que se desea hallar. El procedimiento de muestreo dependerá de las características de la estación a muestrear.

Como paso previo a la obtención de las muestras, es preciso identificar los diferentes microhábitats que aparecen en el tramo objeto del muestreo. Estos ambientes se definen en base a diferentes combinaciones de profundidad (somero-profundo), velocidad del agua (rápida, mediana, lenta), naturaleza del sustrato (grandes piedras, piedras decimétricas, gravas, arenas y limos) y presencia de vegetación (hidrófitos o helófitos).

Es conveniente caracterizar las propiedades físico-químicas del sustrato en el que se encuentran los organismos de cada estación (tamaño de las partículas, profundidad del agua, transparencia, contenido orgánico y concentración de tóxico contaminante, temperatura, salinidad, dureza, alcalinidad, oxígeno disuelto, concentraciones de nutrientes, DQO y DBO₅)

Asimismo, ha de establecerse una estación de referencia corriente arriba, en un punto alejado de cualquier descarga contaminante.

III.8.2. Toma de muestras

La toma de muestras de macroinvertebrados se puede realizar de varias formas dependiendo de la profundidad del cauce, la velocidad de la corriente y la composición del lecho fluvial. Si la profundidad es inferior a 1 m y el lecho es arenoso, rocoso o con gravas, se utiliza habitualmente la red de mano, por ser el método más versátil. En el caso de cauces más profundos, con corriente rápida o con lechos fangosos se deben utilizar muestreadores o artefactos para colonizar.

Los equipos deben estar bien limpios antes de iniciar el muestreo. Para asegurar la no contaminación de las muestras entre los diferentes puntos hay que enjuagarlos inmediatamente después de tomar la muestra y repetir la operación con el agua del nuevo punto antes de tomar la muestra siguiente.

Los procedimientos que a continuación se detallan son aplicables al muestreo de todos los hábitats acuáticos tanto en ríos como en arroyos, estanques, estuarios y lagos.

III.8.2.A. Muestreo en aguas corrientes poco profundas

- **Red de mano:** la red manual es la forma más utilizada para el muestreo de macroinvertebrados bénticos en aguas poco profundas (menos de 1 m); está concebida, pues, para tramos vadeables.

La red consiste en un mango y un bastidor (Figura 30) que sostiene una redcilla en la que quedan retenidos los organismos.

Los mangos (de 1,5 a 2 m de longitud) son de metal, madera o plástico reforzado. Los bastidores, de forma rectangular, son de metal. Las dimensiones del bastidor deben estar comprendidas en los siguientes rangos:

- anchura w : 200 - 400 mm
- altura, h : 200 - 300 mm
- espaldón s : 100 - 200 mm

La malla debe estar constituida por un material resistente (Nytal) y ha de tener una luz de 300–500 μ m. El material de la red va cosido a una lona fuerte y ésta se sujeta firmemente al bastidor.

Una vez identificados los microhábitats presentes, el técnico se introducirá en el cauce. En aguas someras y rápidas, se removerán y voltearán las piedras del sustrato, raspándolas a mano; se debe disponer de un salabre de forma que todos los organismos que se vayan despegando, o vayan siendo arrastrados por la corriente, se introduzcan en él. En aguas más profundas esta misma operación se realizará con las botas.

En zonas de remanso o aguas arriba de azudes, la corriente no ayuda a introducir los organismos en el salabre, de forma que se actuará del mismo modo que se especifica en el párrafo anterior, pero moviendo intensamente el salabre para recoger todos los materiales resuspendidos al remover el fondo.

El tiempo de muestreo por microhábitat es variable en función de la abundancia de material y del método empleado; a título orientativo, cada muestreo necesita de unos 5 min.

El contenido de la red se introduce en un envase de plástico donde previamente se ha puesto agua del punto de muestreo; se da la vuelta a la red y se enjuaga con el agua del envase hasta que ésta quede libre de organismos. Antes de fijar la muestra y tapar el envase se pueden retirar piedras, ramas y otros materiales gruesos para facilitar el examen en el laboratorio.

- **Muestreador tipo Surber** (rastrillo de pie cuadrado): este muestreador está constituido por dos marcos de latón cuadrados de 30,5 cm de lado unidos por bisagras. Un marco actúa como delimitador de la superficie a muestrear mientras que el otro soporta la red en la que quedarán retenidos los organismos. En posición de funcionamiento los dos marcos están en ángulo recto mediante dos fijaciones (Figura 31).

La red debe tener aproximadamente 70 cm de longitud y un cuello de material más pesado (p. ej., de lona) para protegerla de la abrasión. La forma de la red puede ser en bolsa o cónica.

Una vez colocada la red y las bridas laterales fijadas, se debe elegir el punto de muestreo. Hay que sumergir el muestreador en el agua dirigiendo la extremidad abierta aguas arriba para que quede dispuesta contra corriente. Se fija bien sobre el fondo asegurándose de que no se agita el sustrato corriente arriba. No dejar huecos bajo los bordes del marco inferior para evitar que pase agua por debajo de la red.

Es necesario raspar con cuidado todas las piedras y gravas grandes incluidas en la superficie delimitada por el marco interior para desprender a los organismos adheridos a ellas. Remover la arena restante con la mano o un pequeño rastrillo hasta una profundidad de 5-10 cm, dependiendo del sustrato.

Cuando las aguas presenten una corriente elevada, el muestreador debe ser usado por dos personas; una para mantenerlo fijo en su sitio y otra para remover el sustrato.

Una vez completada la recogida de los organismos, se retira el muestreador con el lado abierto de la red dirigido aguas arriba. Se lava la red dentro del agua pero sin sumergir la abertura superior para impedir la entrada o salida de organismos. Una vez fuera del agua, se da la vuelta a la malla y se recogen los organismos. Se puede hacer una selección preliminar.

- Muestreador cilíndrico: el muestreador cilíndrico está constituido por un cilindro de acero inoxidable abierto en las extremidades, cuyo borde inferior está coronado con dientes de 1 cm de profundidad. El borde superior puede estar cubierto por un material plástico para evitar salpicaduras. Incorpora unas empuñaduras laterales (Figura 32) para empujar más fuerte sobre el lecho del río.

Para permitir que el agua entre en el muestreador se debe practicar una abertura oval o redonda en uno de los lados del cilindro cerca de la base. Asimismo, para evitar la entrada de posibles organismos a la deriva, la abertura se suele recubrir con un tamiz de acero inoxidable de malla gruesa. En el lado opuesto a este orificio se ha de practicar un segundo ojal provisto de una pequeña ventanilla de salida en la que se fija una red desmontable de, al menos, 50 cm de longitud con un cuello de lona de 5 cm. La red debe ser atada a la ventana de salida mediante una brida.

Pueden utilizarse dos tamaños de cilindros con superficies de 0,05 m² y 0,1 m². La altura de ambos modelos es la misma (45 cm).

Una vez que la red se ha fijado convenientemente al cilindro, se debe introducir en posición vertical sobre el lecho del río, estando el tamiz de entrada del agua frente a la corriente. Hay que empujar el cilindro en el sustrato hasta una profundidad de unos 7 cm, girándolo alternativamente. El operador debe colocarse aguas abajo del muestreador a horcajadas sobre la malla de recogida.

Se deben examinar cuidadosamente las piedras gruesas que queden dentro del muestreador y recoger los animales allí atrapados. Conviene remover las piedrecillas y gravas, así como el sustrato fino, hasta una profundidad de unos 5 cm. Asegurarse de que todos los organismos han sido recogidos.

El agua que pasa por el cilindro transporta a los organismos desprendidos retenidos éstos en la malla. Una vez realizada la toma de muestras, se cierra con la mano la boca de la red y se levanta con precaución; fuera del agua se da la vuelta a la malla y se recogen los organismos como en los procedimientos anteriores.

III.8.2.B. *Muestreo en aguas profundas, estáticas o de corriente lenta*

Los biotopos con una rica fauna de macroinvertebrados suelen estar muy restringidos en los tramos bajos de los grandes ríos debido a las condiciones adversas. Es necesario, pues, utilizar muestreadores adecuados para cada situación.

Existen Normas Internacionales que proporcionan guías para el uso correcto de cada aparato (AENOR, 1997) en función de estudios cualitativos o cuantitativos.

- Aparatos de colonización: permiten evaluar la calidad del agua mediante la recolección de macroinvertebrados. No muestrean la fauna natural, que puede estar restringida, sino la que acepta colonizar un sustrato artificial, aunque pueda ser más selectiva.

El sustrato se deposita en el lecho de ríos profundos y se deja allí durante un período de 3 o 4 semanas. Durante este tiempo el sustrato es colonizado por los organismos.

El equipamiento de muestreo es el siguiente: se utilizan mallas gruesas de poliamida resistentes a la fricción. En su interior se deposita el sustrato, que puede ser de diferentes tipos:

- piezas de filtros biológicos como los utilizados en tratamiento de aguas residuales
- fragmentos de ladrillos refractarios compactos
- bolas de vidrio
- cantos rodados procedentes de canteras de áridos

Generalmente, se introducen en cada bolsa 30 o 40 piezas de sustrato de unas medidas de $4,0 \pm 0,5$ cm.

Una vez preparado el tomamuestras, se deposita en el lecho del curso fluvial sujeto por un sedal de nylon transparente y se fija a la orilla para poderlo extraer después del período de colonización. La ubicación del sustrato debe ser la apropiada para que no quede expuesto al aire en época de sequía ni sea manipulado en actos de vandalismo.

Se recomienda realizar, al menos, tres réplicas cubriendo el mayor número de hábitats.

Después del período de inmersión, se recogen los aparatos evitando la pérdida de organismos y se procede de forma similar a los casos descritos anteriormente.

- Dragas: se pueden utilizar diferentes tipos de dragas.
 - *draga de naturalista*: tiene un marco rectangular resistente que soporta una red colectora de unos 35 cm de longitud. Es adecuada para obtener muestras cualitativas de gravas y sustratos pedregosos, pero no de lodos (Figura 33).
 - *draga Birge-Ekman* (Figuras 34 y 35): es una caja de fondo abierto provista de dos mandíbulas activadas por un mecanismo de descarga. Está recomendada para recoger organismos que viven en lodos y grava fina. Se coloca retirando las mandíbulas y fijándolas al mecanismo de descarga. Se deja caer suavemente y se coloca firmemente en el lugar apropiado. Cuando se dispara el mecanismo hay que retirar inmediatamente la draga y proceder a recolectar los organismos capturados.
 - *draga Ponar*: tiene dos grandes mandíbulas que se cierran mediante una tijera con brazos de palanca (Figura 36). Los brazos se mantienen abiertos mediante una barra transversal que se libera automáticamente cuando la draga se asienta en el fondo del río. Al elevarla, se cierra. Es adecuada para recolectar organismos que viven sobre las gravas finas y piedras pequeñas ($< 1,6$ cm). Dado que la capacidad de excavación depende de su propio peso, la draga debe izarse lentamente mientras las mandíbulas se cierran. Un modelo más pequeño de la misma familia es la Draga de Van Veen (Figuras 37 y 38).

Una vez obtenida la muestra, ésta se dispone sobre una red cónica de Nylal de 300-500 μm (similar a las anteriores) de abertura de poro y, a continuación, se lava con agua del punto de muestreo hasta que los aclarados de la red no desprendan turbidez. El contenido de la misma, del que se ha eliminado toda la fracción arcillosa y limosa, se dispone en el envase de la muestra con agua.

III.8.3. Conservación y transporte

A la muestra recién tomada se le añade formaldehído al 40% hasta conseguir una concentración del 4%. Es aconsejable cerrar herméticamente los envases con un obturador y evitar que se calienten para impedir la evaporación del formol.

Las muestras se conservan así indefinidamente en envases de plástico de 0,2-1 L de capacidad con boca ancha y obturador.

III.9. PECES

III.9.1. Consideraciones generales

Los muestreos de peces se realizan para conocer la composición específica de las comunidades, analizar la demografía de las poblaciones, diagnosticar el estado de los ejemplares y para utilizarlos como indicadores de la calidad de los medios acuáticos.

Los peces son un componente importante de la mayoría de los hábitats acuáticos; por ello los cambios en la composición de las poblaciones de peces pueden ser indicadores de variaciones en el pH, salinidad, temperatura, oxígeno disuelto, niveles de contaminación, etc.

Debido a que los peces son muy llamativos, suelen ser los indicadores primarios de contaminación de ríos y lagos.

III.9.2. Toma de muestras

Las metodologías de muestreo deben adaptarse a los objetivos de cada estudio.

Cuando se toman muestras para la investigación de mortandades, es recomendable recoger ejemplares recién muertos, moribundos y sanos.

- *Redes*: la pesca con red se utiliza en aparejos estáticos (trampas) o activos (barrederas y de arrastre).
- *nasas y redes trampa*: son redes alargadas sostenidas por aros y divididas en secciones secundarias. Permiten la entrada de los peces pero no su salida. Se suelen usar en profundidades menores a 3 m y se mantienen sujetas al fondo. La red básica o de anillo puede transformarse en una nasa añadiendo nuevos paneles a los lados que se denominan alas. Estas redes son eficaces para peces grandes y en captura viva. Las redes trampa están equipadas con una o más láminas cónicas intercaladas y una abertura para recoger los peces. Los dispositivos pequeños pueden colocarse en pozos, cuevas o en lugares de difícil acceso. Son propias de las orillas y del fondo.
- *vertederos*: son trampas estacionarias normalmente instaladas en ríos y arroyos. Tienen como finalidad guiar a los peces hacia un lugar donde se toma la muestra.
- *redes de arrastre*: son redes remolcadas. Están especializadas para funcionar en superficie, en aguas medianas o en el fondo. En la pesca de superficie predominan los dispositivos de flotación; en la de aguas medias la red está equilibrada con pesas y en la de fondo predominan las pesas.

- *trasmallo*: está compuesto por tres paneles de tejido de red calados juntos que capturan al pez enredándolo. Se dispone interceptando el paso de los peces, tanto en las orillas como en el centro de la masa de agua y a diferentes profundidades.
- *Pesca eléctrica*: es particularmente útil en áreas donde los fondos no son uniformes, la corriente es rápida o es imposible utilizar redes. No son selectivas en términos de tamaño y tipo de pez capturado.

Se basa en la creación de un campo eléctrico en el seno del agua mediante la introducción de dos electrodos conectados a una batería o generador de corriente continua (equipo electrógeno más rectificador). Los peces que entran dentro del campo son atraídos hacia el ánodo (galvanotaxia) y sufren una momentánea parálisis que es aprovechada por el muestreador para recogerlos con un salabre. Existen aparatos de pesca eléctrica de dos tipos:

- Los alimentados por un generador que permanece fijo en la orilla, adecuados para muestreos cuantitativos que requieren un gran esfuerzo de pesca. Habitualmente se utilizan grupos electrógenos de tipo monofásico con una potencia entre 2.200 y 3.000 W (hasta 600 V y 2,5 A).
La corriente alterna producida se pasa a continua o continua pulsátil, que es la más utilizada, mediante un rectificador. De él sale el ánodo, en forma de aro y dispuesto al final de una pértiga con la que el técnico explora la masa de agua, y el cátodo que es una rejilla que se deja fija en el agua.
- Los autónomos, que se montan en una mochila, llevan baterías recargables que pueden proporcionar un fuerte voltaje. Éstos son adecuados para muestreos cualitativos en lugares inaccesibles para vehículos.

En ríos y canales vadeables en los que la velocidad de la corriente es elevada el método de muestreo más adecuado es la pesca eléctrica.

Antes de iniciar la pesca hay que medir la conductividad eléctrica del agua para graduar la intensidad de la corriente que sale del rectificador. En aguas de baja conductividad es necesaria mayor intensidad de corriente. Si la conductividad es muy elevada no es posible utilizar este método porque los peces no son afectados por el campo eléctrico (el agua es más conductora que el propio pez). Posteriormente, se debe escoger un tramo suficientemente representativo del sector fluvial objeto del muestreo en el que exista la mayor diversidad de hábitats y barreras naturales que dificulten la huida a los ejemplares de mayor tamaño (esto se puede evitar acotando el tramo con redes).

La persona que va a realizar la toma de muestra (es preferible que vaya acompañada de dos ayudantes) tiene que recorrer el tramo de río seleccionado recogiendo con un salabre todos los peces atraídos por el ánodo. Como la corriente arrastra los peces una vez éstos han quedado inmovilizados, se recomienda que los acompañantes, provistos también de salabres, vayan algo rezagados capturando los ejemplares que derivan.

En ríos profundos con poca corriente, en lagos y en embalses se utilizan trasmallos y nasas. Estas artes se pueden colocar al atardecer y revisar al amanecer o dejarlas 24 h.

Cuanto más tiempo se tarde en revisarlas mayor probabilidad existe de encontrar muertos los ejemplares capturados.

Si se trata de captura sin muerte, con objeto de evaluar la población o el estado sanitario externo de los peces, los ejemplares deberán ser introducidos inmediatamente en recipientes con agua y una fuente de aireación, donde se añade una dosis de tranquilizante (2-Fenoxietanol o etilenglicol) para evitarles el estrés.

Los peces capturados para análisis serán medidos y pesados. Posteriormente se conservarán de acuerdo con el tipo de análisis que deba realizarse.

III.9.3. Conservación y transporte

Independientemente del tipo de estudio, las muestras deben analizarse lo antes posible.

Las principales formas de conservación son:

- Para el análisis de compuestos orgánicos, en cualquiera de los tejidos del pez, se enjuagarán los ejemplares con agua limpia, se envolverán en papel de aluminio y se procederá a su inmediata congelación (-20°C).
- Para la determinación de metales u otros compuestos inorgánicos se introducirán los ejemplares en bolsas de polietileno de un solo uso y se procederá a su inmediata congelación (-20°C).
- La obtención de muestras de tejidos de cerebro, branquias o sangre para la determinación de parámetros específicos deberá ser realizada *in situ*. Estas muestras se mantendrán congeladas (-20°C) en viales de vidrio.
- Los ejemplares para análisis histológicos o de agentes infecciosos deberán mantenerse vivos hasta su llegada al laboratorio o, como mínimo, conservados en hielo entre 2 y 5°C (nunca congelados).
- El sistema de mantener vivos los peces es transportándolos en recipientes llenos de agua hasta la mitad, con inyección de aire o de oxígeno puro.
- Si el muestreo es debido a un episodio de mortandad, se debe estimar el número de ejemplares muertos y afectados.

III.10. PRUEBAS DE ECOTOXICIDAD EN EL MEDIO ACUÁTICO

III.10.1. Consideraciones generales

En la evaluación de la contaminación de las aguas y sus sedimentos son necesarios los estudios de ecotoxicidad, ya que las pruebas físicas y químicas no son suficientes para valorar efectos potenciales sobre la vida acuática que sustentan. Por otra parte, las diferentes clases de organismos acuáticos no son igualmente susceptibles a las mismas sustancias tóxicas, ni su susceptibilidad es igual a lo largo de su ciclo vital.

Las pruebas de ecotoxicidad son útiles para numerosos propósitos: adaptación a las condiciones ambientales, efectos de factores ambientales sobre la toxicidad de una sustancia, sensibilidad de los organismos acuáticos ante ciertos contaminantes, control de vertidos, ...

Hay que utilizar ensayos adecuados para que los análisis de los contaminantes respondan a una normativa legal y sus resultados midan las respuestas biológicas a concentraciones de sustancias en aguas marinas y epicontinentales.

Es importante una cierta uniformidad en los procedimientos y en la presentación de los resultados, por ello el uso de métodos estandarizados asegura una reproducibilidad sin que interfiera en exceso con la adecuación de las pruebas a circunstancias locales.

Los medios, equipamiento y suministro de agua que se necesitan para las pruebas dependen de cada una de ellas; no obstante, existen en el mercado kits (Toxkits™) para utilizar organismos en estado latente (dafnia, algas, artemia, rotíferos, ...), en huevos de resistencia o inmovilizados, que se activan unos días antes de proceder al desarrollo de las mismas. De esta forma no es necesario mantener una colonia estable de organismos, con lo que disminuye el coste económico.

Las pruebas de ecotoxicidad en medio acuático se clasifican en duración corta, media o larga, régimen estático, recirculación, renovación y flujo continuo. Sin embargo, para el control rutinario de calidad de aguas o de contaminantes al medio acuático se utiliza siempre un test (ensayo) de corta duración (agudo) y en régimen estático con el fin de poder obtener una rápida estimación de la toxicidad.

Las pruebas cortas (24 a 96 h, según la especie) determinan la Concentración Letal 50 (CL₅₀) o concentración de tóxico que produce la muerte del 50% de los individuos expuestos. En ocasiones se determina la Concentración Efectiva 50 (CE₅₀) cuando se hace referencia a un criterio distinto al de «muerte» para valorar estos ensayos.

Es necesario ser cauteloso cuando se realizan pruebas estáticas en medios acuáticos no estandarizados (p.ej., aguas naturales) con alto nivel de demanda biológica de oxígeno (DBO). En estos casos, para evitar una caída importante del contenido en oxígeno del medio, se puede incorporar una leve aireación.

Los tóxicos volátiles disminuyen en concentración durante la prueba. Se debe, pues, vigilar su descenso para que la exposición de los organismos no se vea afectada. De igual forma, algunos productos metabólicos (CO₂ o NH₃), nada deseables, pueden aumentar peligrosamente invalidando los resultados. En vertidos industriales se recomienda la utilización de pruebas en régimen de flujo continuo.

Los valores de CL₅₀ o CE₅₀ obtenidos en los ensayos agudos no indican las concentraciones que son seguras o poco dañinas en los hábitats acuáticos sujetos a una contaminación; por lo tanto, estas pruebas sólo representan una fracción muy pequeña de la toxicidad a largo plazo. Sin embargo, el conocimiento de la toxicidad aguda de un residuo o de una sustancia puede ser muy útil en la predicción y prevención del daño agudo a la vida acuática.

Para el estudio de vertidos y de sustancias tóxicas desconocidas es conveniente hallar, previamente a la realización de la prueba definitiva, el intervalo aproximado en el que ese material será tóxico. Se utilizan soluciones que, a partir del vertido puro, cubran varios órdenes de magnitud (1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001) intentando incluir concentraciones que eliminen a todos los organismos y otras que maten a pocos o a ninguno.

Las pruebas definitivas contienen una serie de concentraciones, espaciadas geométricamente, entre la más alta que no mata a organismos y la más baja que elimina a todos. Consultar normas AENOR (1998), OCDE 203 (toxicidad aguda en peces), 202 (toxicidad aguda en dafnia), 201 (inhibición del crecimiento de algas) y ASTM E1440-91 (toxicidad aguda en rotíferos).

III.10.2. Selección de organismos a ensayar

Se deben considerar ciertas características que han de presentar los organismos utilizados en los ensayos de ecotoxicidad:

- Sensibilidad a los cambios ambientales
- Amplia distribución geográfica
- Abundancia
- Disponibilidad durante todo el año
- Importancia reproductiva, económica o ecológica
- Posibilidad de ser cultivados en el laboratorio
- Homogeneidad genética

Cuando se desee estudiar efectos de efluentes sobre el medio acuático se deben seleccionar especies representativas del mismo. Si no se dispone de individuos cultivados en laboratorio se deben hacer pruebas comparativas para relacionar la sensibilidad de los organismos que se van a utilizar con la de aquellos individuos más sensibles, representativos del lugar.

Al diseñar las pruebas, se debe tener en cuenta algunas condiciones especiales a las que hayan estado expuestos los organismos: plaguicidas, vertidos industriales, plantas de tratamientos de residuos, ... (los efectos interactivos con un nuevo tóxico pueden ser graves).

No se deben recoger especies de aguas contaminadas donde estén en malas condiciones, enfermos o con elevada bioacumulación de sustancias químicas.

III.10.3. Recolección de organismos

Muchos invertebrados y peces pequeños pueden ser recogidos cerca de la orilla con redes similares a las descritas anteriormente. Es conveniente utilizar varios tipos de redes para que las especies puedan proceder de diferentes profundidades. Asimismo hay que asegurarse de que los organismos recolectados no han sido dañados.

No se deben capturar demasiados organismos al mismo tiempo ni manipularlos más de lo necesario. Una vez transferidos a un tanque de transporte debe determinarse la temperatura, salinidad, demanda de oxígeno (DO) y pH del agua de dicho tanque. En ningún caso se deben amontonar los organismos durante el traslado.

Se recomienda observar los posibles daños que los individuos puedan haber sufrido durante su recolección.

III.10.4. Manipulación, mantenimiento y condiciones

Después del traslado se deben mantener los organismos en cuarentena por lo menos 7 días para observar posibles enfermedades. Para los invertebrados es suficiente con 2 días.

Si transcurrido ese período inicial se observa una mortalidad superior al 10% de los individuos capturados, hay que rechazar el lote completo. Si es inferior a esta cifra se debe prolongar siete días más el período de observación. Si no se producen más muertes, se acepta el lote. En el caso de superar esta cuarentena se puede disponer de los individuos y pasarlos a los tanques de reserva.

No se debe someter a los organismos a cambios bruscos de temperatura, fotoperíodo o calidad de agua (las variaciones de temperatura del agua deben ser inferiores a 3° C cada 24 h y para especies de aguas profundas la variación debe ser menor). El fotoperíodo habitual es de 12/12 h de luz/oscuridad; no obstante, también pueden adoptarse otros criterios en función de la estación climática.

Los organismos de aguas frías se deben mantener a una temperatura de 12° C y los de aguas templadas a 22° C.

La concentración de oxígeno disuelto en el agua de los tanques debe ser, preferiblemente, a saturación y en ningún caso inferior al 60% de dicha saturación.

Como norma general, se debe utilizar un régimen de flujo continuo para renovar el medio acuático de los tanques. La tasa de flujo oscila entre 6 y 10 volúmenes de tanque/día (o 3 l/día/g para individuos pequeños).

En el supuesto que el mantenimiento se realice en régimen de circuito cerrado, se debe vigilar que las características del agua (pH, CO₂, salinidad, dureza, NH₃) sean las adecuadas, evitando acumulaciones de los productos metabólicos.

Eliminar toda la comida que no se haya consumido dentro de las 24 h. Limpiar los tanques a menudo (dos veces por semana).

Cuando se cultiven peces, tapar los tanques convenientemente en evitación de fugas.

III.10.5. Procedimiento general para el desarrollo de las pruebas

Si se utiliza agua natural la calidad del medio debe ser constante y no debe exceder los siguientes valores en los parámetros que se indican:

— sólidos en suspensión	20 mg/l
— carbono orgánico total	10 mg/l
— amoníaco no iónico	20 µg/l
— cloro residual	0,001 mg/l
— plaguicidas organofosforados	50 ng/l
— plaguicidas clorados y PCBs	50 ng/l

Para la reconstitución de agua dulce o marina, a partir de agua desionizada y filtrada, debe consultarse cualquier fórmula estandarizada (EPA, ASTM, ISO, CE) Como ejemplo de agua reconstituida se propone el siguiente (obtenido de la Directiva 84/449/CEE):

Solución patrón:

— $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (disolver en H_2O desionizada, completar hasta 1 L)	11,76 g
— $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (disolver en H_2O desionizada, completar hasta 1 L)	4,93 g
— NaHCO_3 (disolver en H_2O desionizada, completar hasta 1 L)	2,59 g
— KCl (disolver en H_2O desionizada, completar hasta 1 L)	0,23 g

Agua de disolución:

- Mezclar 25 ml de cada una de las cuatro soluciones patrón y completar hasta 1.000 ml con agua desionizada
- Airear hasta saturación de oxígeno
- El pH debe ser $7,9 \pm 0,3$ (si es necesario ajustarlo con NaOH o HCl)
- Reposar el agua preparada durante 12 h
- La suma de iones $\text{Ca}^{++}:\text{Mg}^{++}$ debe ser igual a 2,5 mmol/l
- La relación de iones $\text{Ca}^{++}:\text{Mg}^{++}$ debe ser de 4:1; la de $\text{Na}^+:\text{K}^+$ debe ser de 10:1
- La alcalinidad total debe ser de 0,8 mmol/l

Las soluciones del tóxico o del efluente deben prepararse utilizando el mismo tipo de agua que en los ensayos. En las pruebas en régimen estático, la adición del tóxico se debe hacer inmediatamente después de su preparación. Los tóxicos o los efluentes deben homogeneizarse adecuadamente en el agua del ensayo.

Si fuese necesario el uso de disolventes para conseguir la mezcla del tóxico con el agua de los tanques, se deberá hacer dos grupos control, uno de ellos sin disolvente y otro con la máxima cantidad de este producto que haya sido utilizada. En cualquier caso no se debe sobrepasar una concentración de disolvente superior a 0,5 mg/l en pruebas estáticas ó 0,1 mg/l en las de flujo continuo.

Los organismos deben ser expuestos en recipientes triplicados evitando las falsas réplicas (como conexiones de agua entre los contenedores). En las pruebas estáticas con peces e invertebrados debe emplearse un total de, al menos, 30 organismos por cada concentración. No se debe incluir en cada tanque o contenedor más de 0,8 g de organismo/litro de medio.

Cada ensayo consta de, al menos, cinco concentraciones de prueba y un control, más otro adicional si se utilizan disolventes. Las pruebas agudas con peces e invertebrados sólo se considerarán aceptables si en los controles la supervivencia ha sido igual o superior al 90%, de lo contrario la prueba se anulará y deberá repetirse.

Las concentraciones de prueba para residuos líquidos deben expresarse en forma v/v; para residuos no acuosos y compuestos químicos individuales en miligramos (mg) o microgramos (μg) por litro de medio. Se recomienda la utilización de series geométricas descendentes a partir de la concentración más elevada (p.ej., multiplicando por un factor constante 0,5 o 0,6) para obtener concentraciones uniformemente espaciadas dentro de una escala logarítmica.

Se deben realizar análisis de tóxicos en los tanques de ensayo al iniciar y finalizar cada prueba. Las muestras de agua deben tomarse del centro del tanque de exposición.

III.10.6. Cálculo de la CL_{50} o de la CE_{50}

Las respuestas a un ensayo de toxicidad se pueden agrupar en dos tipos:

- *respuestas cualitativas*, cuando un organismo manifiesta o no la respuesta estudiada (p.ej., muere o sobrevive)
- *respuestas cuantitativas*, en la que un organismo responde con una intensidad variable (p.ej., crecimiento)

Las pruebas cuantales están diseñadas para obtener la concentración de una sustancia o mezcla de sustancias que afecta al 50% de los individuos ensayados.

Para realizar el cálculo de la CL_{50} o de la CE_{50} en ensayos con peces o invertebrados debe contabilizarse el número de organismos muertos o afectados de cada tanque o contenedor, al menos una vez por día, durante toda la prueba. Con sustancias letales de acción rápida conviene contabilizar los organismos a 1; 1,5; 3; 6; 12; y 24 h del comienzo del test.

Los métodos estadísticos más utilizados para calcular estos valores y sus límites de confianza son: probit, logit, media flotante y Litchfield-Wilcoxon. No son intercambiables, hay que escoger uno de ellos y utilizarlo en todo el estudio. Existen programas informatizados que agilizan los cálculos.

III.10.7. Redacción de informes y comunicación de resultados

En los informes se debe incluir lo siguiente:

- información sobre el organismo utilizado (nombre científico, cepa, lote, proveedor, tamaño y número de individuos sometido a ensayo...)
- lista de concentraciones utilizada y estabilidad del tóxico a esas concentraciones
- descripción del equipo de ensayo
- métodos utilizados en los posibles análisis químicos
- origen del agua de disolución y características principales
- concentraciones de disolventes, si se han utilizado
- detalles del método ensayado
- información sobre la iluminación
- concentración máxima aplicada que no haya causado mortalidad
- concentración mínima aplicada que haya causado el 100% de mortalidad
- mortalidad acumulada para cada concentración y para los controles
- valores de la CL_{50} o CE_{50} en cada uno de los tiempos de observación recomendados (límites de confianza al 95%)
- métodos estadísticos utilizados para calcular la CL_{50} o la CE_{50}
- representación gráfica de los porcentajes de mortalidad en función de las concentraciones al final del ensayo
- pendiente de la curva y límites de confianza al 95%
- concentración de oxígeno disuelto, pH y temperatura de las soluciones de ensayo cada 24 h

CAPÍTULO IV

LODOS Y SEDIMENTOS

IV.1. GENERALIDADES

Los métodos de toma de muestras variarán ligeramente según el ámbito de aplicación donde se realice. Un factor a tener en cuenta es el tipo de contaminación presente en la zona a muestrear. En cualquier caso, como ya se ha comentado, la toma debe ser representativa del medio.

Se hará más de una toma para cubrir al máximo la zona de muestreo siguiendo los siguientes criterios:

- Si la difusión del contaminante se ha realizado superficialmente, a partir de un punto, se muestreará siguiendo bandas concéntricas y tomando como epicentro el punto de vertido.
- Si se desconoce el foco de emisión de la sustancia contaminante se deberá muestrear siguiendo un esquema de cuadrícula o un eje imaginario.
- Además de las muestras presuntamente contaminadas se debe tomar un blanco (sedimento sin contaminar) para determinar la composición original de las mismas.

El volumen de sedimento que se utiliza como muestra suele estar determinado por la cantidad mínima de sustancia contaminante por unidad de peso, a partir del cual se considere el lodo o sedimento como contaminado. Como norma habitual se debería recoger, al menos, 3.000 g, puesto se le suele someter a diversos tipos de análisis físico-químicos, biológicos o de ecotoxicidad. La textura también influye en el volumen a muestrear. Cuanto más pequeño sea el tamaño de grano menos cantidad de muestra se precisa. Cada muestra se debe fraccionar en un número de partes no inferior a tres.

IV.1.1. Criterios para la selección de los muestreadores

Habitualmente los lodos y sedimentos se utilizan para tres tipos de investigaciones:

Investigación química: con ella se puede determinar la naturaleza y concentración de sustancias presentes en el sedimento. Algunas especies químicas se enlazan preferente-

mente a la materia orgánica y a partículas minerales con lo que se incorporan al agua intersticial. Asimismo, para analizar algunos parámetros (p.ej., sulfuros) se requiere mantener la muestra en una atmósfera libre de oxígeno y manipularla o almacenarla bajo presión de un gas inerte.

Investigación física: para este tipo de investigación la estructura, textura y laminación de los sedimentos adquieren importancia. Especialmente es interesante determinar estos parámetros cuando las muestras son arenosas o arcillosas. Asimismo cuando deben utilizarse para estudios geográficos, morfológicos o geotécnicos.

Investigación biológica: habitualmente consiste en clasificar las especies presentes en cada muestra de sedimento. La profundidad de la capa de sedimento no debe superar 50 cm. En ocasiones es interesante un estudio microbiológico cuando se desean datos sobre desnitrificación, liberación de fosfatos o metilación de metales.

IV.1.2. Tipos de muestreadores

Existen diversos tipos de muestreadores, algunos ya se han descrito en el apartado III.8.2. No obstante, a continuación se indican los más habituales.

Palas. Las palas más utilizadas son las denominadas de «tijera» (tipo Van Veen); sin embargo, hay un importante número de variantes. En general, consisten en una bisagra que engarza dos valvas (de 0,5 a 25 litros de capacidad cada una) que se cierran cuando se extrae la muestra. Durante el cierre el sedimento queda retenido en el interior de las mismas (existen modelos estancos que impiden pérdidas de agua y/o partículas). La profundidad de la muestra oscila entre 5 y 50 cm, dependiendo del tamaño y masa de la pala así como de la estructura del sustrato. En la fabricación de los diferentes modelos que existen se utiliza el acero galvanizado o el inoxidable.

Los tamaños pequeños (1 a 10 Kg) pueden ser utilizados manualmente, mientras que para los grandes (hasta 100 Kg) se necesita una cabria o un cabrestante. Para obtener las muestras hay que bloquear la pala de forma que las valvas permanezcan abiertas; de esta forma se arroja al agua y al chocar contra el fondo se libera el seguro y la pala se cierra. Cuando se ha extraído la muestra, la pala se deposita en una cubeta, desde donde pueden obtenerse submuestras, si son necesarias. Después de limpiarla con agua a presión se puede reutilizar de nuevo.

Este tipo de muestreador se utiliza en lodos y en fondos arenosos o con gravas pequeñas. Sin embargo, no se debe utilizar en turberas o los sedimentos arcillosos.

La precisión del equipo es baja, puesto que las muestras sufren alteraciones de estratificación, pueden perder líquidos y la penetración de la pala suele ser desconocida.

Las palas de tijera sirven tanto para aguas someras como profundas así como para corrientes lentas o rápidas.

Cilindros huecos. Son los denominados «corers». Se utilizan para obtener perfiles de sedimentos tanto para ensayos físicos, químicos o biológicos. La obtención de las muestras se puede realizar manualmente (presionando verticalmente el tubo en el lodo o el sedimento) o mediante algún procedimiento vibratorio o por gravedad. Pueden ocurrir compresiones en el interior del cilindro debidas a la fricción de los materiales muestreados

sobre la superficie del mismo; en estos casos hay que comprobar que no se produzcan alteraciones en la estratificación de los materiales.

Los «corers» se recomiendan para fondos poco profundos de tipo arenoso, arcilloso o ligeramente turboso.

Puede suceder el llamado apilamiento «pile-working» dependiendo del diámetro del tubo, la profundidad y la velocidad de penetración. Cuando esto sucede, se observan distorsiones y compresiones en los estratos muestreados. Se debe prestar atención para evitar este inconveniente aumentando el diámetro del tubo o lubricando su interior (consultando al laboratorio que debe procesar la muestra para no utilizar productos que interfieran en el proceso de análisis físico-químico o biológico).

El extrusionado del interior del cilindro se puede obtener con un pistón y posteriormente se secciona en diferentes submuestras, según convenga.

Existen diferentes tipos de cilindros con modificaciones según necesidades específicas, los más usados se describen a continuación:

- Cilindro perforador: Recomendado para investigaciones químicas, físicas y biológicas. Adecuado para lechos de turba o fangos consolidados; sin embargo, no se debe usar en fondos arenosos por la posibilidad de perder parte de la muestra.

Consiste en un tubo de acero inoxidable o plástico transparente que contiene un pistón que se desliza cuando penetra la muestra en el sedimento. Puede presentar problemas de apilamiento; cuando esto sucede se puede tirar del pistón para facilitar por depresión la entrada de la muestra.

Se utilizan extensiones dependiendo de la profundidad del río o lago (pero se recomienda que ésta no sea superior a 3 m). Si se toma la muestra desde una embarcación, se tiene que estabilizar para evitar que el viento o la corriente desplace el pistón impidiendo la entrada de los materiales.

Al extraer el cilindro del fondo se ha de mantener fija la posición del pistón para que se retenga el contenido de la muestra, posteriormente se empuja el contenido del tubo.

- Cilindro guiado por un buzo o un submarinista: Con este sistema el cilindro es guiado y empujado por un buzo. En ocasiones puede ser ayudado por un sistema de bombeo al vacío. Las dimensiones recomendadas para el cilindro son de 70 mm de diámetro externo y 66 mm interno así como 1 a 3 m de longitud. La penetración máxima es de 2 m.
- Otros cilindros que se describen en la Norma ISO 5667-12

Tabla 1.- Tipo de sedimento y muestreador recomendado

Tipo de sedimento	Muestreador ⁽¹⁾
Gravas	Palas. Si el tamaño de la partícula es grande, se requieren palas pesadas
Arenas	Palas y cilindros. En ocasiones es necesario utilizar palas o cilindros pesados cuando la arena está muy compactada
Arcillas	Cilindros. Las palas no suelen ser eficaces
Turbas	Cilindros, en especial de tipo barrena. Es un medio difícil de muestrear
Sedimento consolidado	Palas y cilindros. Con la pala no se puede determinar la profundidad del sustrato muestreado
Sedimento no consolidado	Cilindros. Las palas y los cilindros de caída libre no se recomiendan, ya que la capa de sedimento puede ser muy delgada
⁽¹⁾ El tipo de muestreador puede estar condicionado por la experimentación.	

IV.2. FRECUENCIA Y TIEMPO DE MUESTREO

Hay que recordar que los cambios en la composición de los sedimentos se producen lentamente. Sólo en situaciones de deposiciones rápidas e intensas sería recomendable una frecuencia de muestreo inferior a un año. No obstante, se debe tener en cuenta, adicionalmente, una serie de condiciones importantes que pueden alterar las frecuencias y el tiempo de muestreo.

- Condiciones climatológicas: La temperatura, la dirección del viento y su fuerza pueden ser factores restrictivos cuando debe proceder a un muestreo. De igual forma, fuertes tormentas pueden afectar, momentáneamente, a la composición de los sedimentos.
- Condiciones hidrográficas: En zonas de marea, los cambios en la profundidad del agua, la velocidad y la dirección de la corriente pueden ser factores adversos para la utilización de ciertos instrumentos.

En lagos, estanques y zonas abrigadas las corrientes son muy tenues y las condiciones hidrográficas no suelen presentar problemas para el uso de los aparatos recomendados (manuales en profundidades inferiores a 4 m o mecánicos, para superiores).

IV.3. ALMACENAJE, TRANSPORTE Y ESTABILIZACIÓN

Cuando se transfiere una muestra desde el equipo recolector hasta el lugar de almacenamiento hay que prestar especial atención para que las condiciones anaerobias se mantengan.

El almacenaje de los lodos y sedimentos se puede llevar a cabo en diversos tipos de materiales y envases.

- El vidrio neutro se puede utilizar en casi todos los casos salvo en sedimentos para análisis microbiológico (en que además deberá estar esterilizado). Los envases de vidrio borosilicatado se utilizarán cuando se vayan a analizar gases. Todos los envases serán de color topacio cuando contengan sustancias fotolábiles.
- El polietileno es también un material de uso muy generalizado, pero presenta algunas excepciones. No se debe utilizar cuando el sedimento pueda contener disolventes orgánicos, aceites o grasas. Sin embargo, está especialmente recomendado para tomar muestras en las que se deba determinar elementos alcalinos, metálicos y/o de reactividad.
- El teflón se utiliza en sustitución del polietileno para la mayoría de los compuestos con disolventes orgánicos.

Una vez extraído el material se introducirá en un frasco o en una bolsa procurando que mantenga la misma posición en que se encontraba la muestra en el sedimento. Hay que adecuar la cantidad de material muestreado a la capacidad del envase. En el caso de que la muestra exceda la capacidad del recipiente, se distribuirá en varios siguiendo el criterio de dividirla según los horizontes estratigráficos de arriba abajo.

En ocasiones, dependiendo del equipo utilizado y de las exigencias del análisis posterior, es conveniente mantener las condiciones anaeróbicas.

La utilización de espátulas metálicas o ciertos plásticos en la preparación de submuestras pueden contribuir a generar interferencias en los resultados.

Para proceder al transporte del material se deben colocar los recipientes en una nevera portátil (4° C) de forma que no se vuelquen. Si se utilizan bolsas, no apilarlas. En el caso de que las muestras no vayan a ser procesadas antes de un mes, se recomienda su congelación a -20° C.

Si se elige la congelación como método para preservar las muestras, es esencial que éstas estén completamente descongeladas antes de ser procesadas, puesto que la congelación puede concentrar algunos componentes que habitualmente se encuentran en el líquido intersticial de los lodos o sedimentos pastosos (p.ej., fosfatos o sulfatos).

PÁGINAS WEB

Agencia Ambiental Europea (EEA): <http://www.org.eea.eu.int>

Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (EPA):
<http://www.epa.gov>

Asociación Española de Limnología: <http://www.aelimno.org>

European Water Association (EWA): <http://www.ewaonline.de>

Infoagua. Servicio de información del agua en español: <http://www.infoagua.org>

La Convención de Ramsar: <http://ramsar.org>

Sede para el Estudio de los Humedales Mediterráneos (SEHUMED): <http://sehumed.uv.es>

Sociedad Americana de Limnología y Oceanología: <http://www.also.org>

Sociedad Internacional de Limnología: <http://www.limnology.org>

WWWF – Programa Europeo de Aguas dulces: <http://www.wwffreshwater.org>

ANEXO I

**CLASIFICACIÓN DE TIPOS DE HUMEDALES
SEGÚN EL MANUAL DE LA CONVENCION
DE RAMSAR (1996)**

HUMEDALES MARINOS Y COSTEROS

- A. Aguas marinas someras permanentes de menos de seis metros de profundidad en marca baja; se incluyen bahías y estrechos.
- B. Lechos marinos submareales; se incluyen praderas de algas, praderas de pastos marinos, praderas marinas mixtas tropicales.
- C. Arrecifes de coral.
- D. Costas marinas rocosas; incluye islotes rocosos y acantilados.
- E. Playas de arena o de guijarros; incluye barreras, bancos, cordones, puntas e islotes de arena, y sistemas de dunas.
- F. Estuarios; aguas permanentes de estuarios y sistemas estuarinos de deltas.
- G. Bajos intermareales de lodo, arena o con suelos salinos («saladares»).
- H. Pantanos y esteros (zonas inundadas) intermareales; incluye marismas y zonas inundadas con agua salada, praderas halófilas, salitrales, zonas elevadas inundadas con agua salada, zonas de agua dulce y salobre inundadas por la marea.
- I. Humedales intermareales arbolados; incluye manglares, pantanos de «pipa», bosques inundados o inundables mareales de agua dulce.
- J. Lagunas costeras salobres/saladas; lagunas de agua entre salobre y salada con por lo menos una relativamente angosta conexión al mar.
- K. Lagunas costeras de agua dulce; incluye lagunas deltaicas de agua dulce.

HUMEDALES CONTINENTALES

- L. Deltas interiores (permanentes).
- M. Ríos/arroyos permanentes; incluye cascadas y cataratas.
- N. Ríos/arroyos estacionales/intermitentes/irregulares.
- O. Lagos permanentes de agua dulce (de más de 5 ha); incluye grandes meandros o brazos muertos de río, ciénagas y pantanos.
- P. Lagos estacionales/intermitentes de agua dulce (de más de 8 ha); incluye lagos en llanuras de inundación.
- Q. Lagos permanentes salinos/salobres/alcalinos.
- R. Lagos y zonas inundadas estacionales/intermitentes salinos/salobres/alcalinos.
- Sp. Pantanos/esteros/charcas permanentes salinas/salobres/alcalinas.
- Ss. Pantanos/esteros/charcas estacionales/intermitentes salinas/salobres/alcalinas.
- Tp. Pantanos/esteros/charcas permanentes de agua dulce; charcas (de menos de 8 ha), pantanos y esteros sobre suelos inorgánicos, con vegetación emergente en agua por lo menos durante la mayor parte del período de crecimiento.
- Ts. Pantanos/esteros/charcas estacionales/intermitentes de agua dulce sobre suelos inorgánicos; incluye depresiones inundadas, praderas inundadas estacionalmente, pantanos de ciperáceas.
- U. Turberas no arboladas; incluye turberas arbustivas o abiertas («bog»), turberas de gramíneas o carrizo («fen»), bofedales, turberas bajas.
- Va. Humedales alpinos/de montaña; incluye praderas alpinas y de montaña, charcas temporales originadas por el deshielo.
- Vt. Humedales de la tundra; incluye charcas y humedales temporales originados por el deshielo en la tundra.
- W. Pantanos con vegetación arbustiva; incluye pantanos y esteros de agua dulce dominados por vegetación arbustiva, turberas arbustivas («carr»), arbustales de alisos (*Alnus* sp.) sobre suelos inorgánicos.
- Xf. Humedales boscosos de agua dulce; incluye bosques pantanosos de agua dulce, bosques inundados estacionalmente, pantanos arbolados sobre suelos inorgánicos.
- Xp. Turberas arboladas; bosques inundados turbosos.
- Y. Manantiales de agua dulce, oasis.
- Zg. Humedales geotérmicos.
- Zk. Sistemas hídricos subterráneos en karst o en cuevas.

Nota: «llanuras de inundación» es un término utilizado para describir humedales, generalmente de gran extensión, que pueden incluir uno o más tipos de humedales,

entre los que se pueden encontrar R, Ss, Ts, W, Xf, Xp, y otros (vegas, praderas, sabana, bosques inundados estacionalmente, etc.). No es considerado un tipo de humedal en la presente clasificación.

HUMEDALES ARTIFICIALES

1. Estanques de acuicultura (p. ej., estanques de peces y camarónicas).
2. Estanques artificiales; incluye estanques de granjas, estanques pequeños (generalmente de menos de 8 ha).
3. Zonas de riego; incluye canales de regadío y arrozales.
4. Tierras agrícolas inundadas estacionalmente.
5. Zonas de explotación de sal; salinas artificiales, salineras.
6. Áreas de almacenamiento de agua; reservorios, diques, represas hidroeléctricas, estanques artificiales (generalmente de más de 8 ha).
7. Excavaciones; canteras de arena y grava, piletas de residuos mineros.
8. Plantas de tratamiento de aguas residuales, piletas de sedimentación, piletas de oxidación.
9. Canales de transporte y de drenaje, zanjías.

ANEXO II

GLOSARIO

Analito: Sustancia o grupo de sustancias cuya concentración en la matriz se desea determinar.

Bioindicadores: Organismos cuya presencia, ausencia o distribución está asociada a un factor o a una combinación de factores ambientales particularmente significativa o relevante. Los organismos bioindicadores tienen interés científico en la investigación ecológica y aplicación en el análisis ambiental, por ejemplo, en estudios de contaminación.

Biota: Los seres vivos que viven en una región dada.

Blanco: Material de las mismas características que la matriz sobre la que se va a realizar el análisis pero que no contiene la sustancia a analizar. En los análisis del agua se utiliza como blanco el agua destilada tratada posteriormente de igual manera que las muestras.

Calidad del agua: Condición general que permite que el agua se emplee para usos concretos. La calidad del agua está determinada por la hidrología, la físico-química y la biología de la masa de agua a que se refiera.

Conservación: Mantenimiento sin alteración de las características originales de un material.

Conservante: Sustancia que se añade a una muestra con el objeto de impedir o retrasar la alteración de sus características originales.

Contaminación: Cambio no deseado de las características físicas, químicas o biológicas del aire, agua o tierra que puede o podría afectar peligrosamente a la vida humana o la de otras especies, a nuestros procesos industriales, a las condiciones de vida, a nuestros valores culturales; o que puede o podría desgastar o deteriorar nuestros recursos de materias primas.

Contaminación de las aguas: Alteración de las propiedades físico-químicas y/o biológicas del agua por sustancias ajenas, por encima o debajo de los límites máximos o mínimos permisibles, según corresponda, de modo que produzcan daños a la salud del hombre deteriorando su bienestar o el medio ambiente.

Convención de Ramsar: «Convención relativa a los humedales de importancia internacional; especialmente como hábitat de aves acuáticas». Firmada el 2 de febrero de 1971 en la ciudad de Ramsar (Irán) y que entró en vigor en 1975. Esta Convención es un tratado intergubernamental que ofrece un marco de referencia para la cooperación internacional en pro de la conservación y uso racional de los humedales del mundo y ha establecido una Lista de Humedales de Importancia Internacional.

Ecosistema: Conjunto de seres vivos que viven en un área determinada, los factores que lo caracterizan y las relaciones que se establecen entre los seres vivos y entre éstos y el medio físico. El término fue definido por el botánico inglés Arthur Tansley, en 1935. Lo define como «una unidad funcional básica que incluye tanto a comunidades bióticas como a su ambiente abiótico, en un área determinada, actuando con reciprocidad por ser ambos necesarios para la conservación de la vida».

Envase: Recipiente capaz de contener el material a analizar.

Eutrofización acuática: Enriquecimiento de las aguas con nutrientes a un ritmo tal que no puede ser compensado por eliminación o mineralización total. La eutrofización es un problema de calidad del agua importante en lagos y embalses. Consiste en un proceso de evolución natural en el tiempo, en el que el agua se enriquece de nutrientes provocando un aumento de algas y plantas acuáticas, la transformación en zona pantanosa y, en última instancia, transformación en terreno seco. La eutrofización se puede acelerar mediante la adición de nutrientes por parte del hombre. Por lo general, es un proceso de desajuste inducido por el hombre según el cual los desechos de las aguas residuales, con un contenido en materia orgánica, detergentes (que llevan fósforo, un elemento limitante de la productividad de los ecosistemas acuáticos) y fertilizantes inorgánicos provocan un aumento espectacular de su producción primaria. El aumento de la concentración de nutrientes como nitratos y fosfatos induce cambios en la composición de la comunidad de seres vivos. Más allá de ciertos límites, el proceso reviste características negativas al aparecer grandes cantidades de materia orgánica cuya descomposición microbiana ocasiona un descenso en los niveles de oxígeno. La eutrofización se genera en muchas masas de agua como resultado de los vertidos agrícolas, urbanos e industriales. En lo que se refiere a su grado de eutrofia, los cuerpos de agua se pueden clasificar de forma simplificada en tres grandes tipos: *a*) Oligotróficos (sistemas acuáticos de bajo contenido de nutrientes y producción vegetal mínima). *b*) Mesotróficos (sistemas acuáticos con características intermedias entre oligotrófico y eutrófico) *c*) Eutróficos (sistemas acuáticos de alto contenido de nutrientes y producción vegetal excesiva).

Indicador ambiental: Variable que señala la presencia o condición de un fenómeno que no puede medirse directamente. Por ejemplo, para evaluar el estado de calidad del aire puede observarse la presencia de determinados líquenes o en relación con la calidad de vida puede utilizarse el índice de población servida por redes de agua potable o medios de transporte. Puede ser también un parámetro o valor derivado de parámetros generales, que describe de manera sintética las presiones, el estado, las respuestas y/o tendencias de los fenómenos ecológicos y ambientales, cuyo significado es más amplio que las propiedades asociadas directamente al valor del parámetro.

Indicadores ecológicos: Especies vegetales o animales que se utilizan para medir los niveles de contaminación de un área, basándose en la evaluación del número y distribución de individuos y especies antes y después de un cambio en el medio ambiente.

- Índice biológico:** Expresión matemática que traduce una información contenida en una lista faunística o vegetal en valores de una escala establecida. Permite realizar estudios comparativos y comprobar cambios en la estructura biológica de un ecosistema.
- Limnógrafo:** Dispositivo para indicar magnitud o posición en unidades específicas cuando tal magnitud o posición está sujeta a cambio; como ejemplos de tales magnitudes se pueden citar los siguientes: elevación de la superficie de agua, velocidad del agua, presión del agua, cantidad o intensidad de las precipitaciones y profundidad de la nevada.
- Matriz:** El medio que contiene las sustancias que van a ser analizadas.
- Método normalizado:** Método que permite la repetición del proceso realizado, ya sea por la misma u otra persona, y que garantiza que los resultados obtenidos van a ser estadísticamente similares. El método normalizado presenta un protocolo detallado de aplicación y de él se conocen sus posibles deficiencias y la forma de subsanarlas total o parcialmente.
- Muestra compuesta:** Combinación de muestras individuales tomadas a intervalos predefinidos a fin de minimizar los efectos de variabilidad de la muestra individual. Las submuestras individuales que la componen pueden ser de igual volumen o proporcionales al caudal al momento de extracción de la muestra. Se refiere especialmente a la combinación de muestras individuales recogidas en el mismo punto a diferente tiempo para averiguar el promedio de concentraciones del universo estudiado. Este tipo de muestreo sólo se usa para determinar componentes que no cambian bajo las condiciones de muestreo, preservación y almacenamiento.
- Muestra integrada:** Mezcla de muestras individuales recogidas en diferentes sitios simultáneamente. Cuando las variaciones locales en composición son importantes, es necesario analizar las muestras individuales por separado.
- Muestra puntual:** Muestra tomada al azar en una hora determinada para su análisis.
- Muestra simple:** Muestra recogida en un tiempo y lugar específicos, y puede representar la composición de la fuente sólo en este tiempo y lugar. No obstante, pueden existir casos en los que la composición no cambie y en este caso una muestra simple tomada al azar es representativa. Cuando la fuente varía con el tiempo se debe tomar muestra periódicamente para hacer el estudio de los cambios. Si la variación ocurre con el lugar, se deberán tomar muestras en diferentes sitios.
- Picnoclina:** Gradiente de densidad en un material.
- Piezómetro:** Pozo de observación en el que se mide el nivel freático o altura piezométrica.
- Procesado de la muestra:** Procedimiento posterior a la toma de la muestra, que incluye la aplicación de métodos de conservación y el posterior análisis de la misma.
- Réplica:** Duplicado de un material cuyas características son idénticas al original.
- Residuo:** Cualquier material generado en los procesos de extracción, beneficio, transformación, producción, consumo, utilización, control o tratamiento cuya calidad no permita usarlo nuevamente en el proceso que lo generó.
- Residuo tóxico o peligroso:** Todo material que resulte objeto de desecho o abandono y pueda perjudicar en forma directa o indirecta a seres vivos y/o contaminar el suelo, el agua, la atmósfera o el ambiente en general. Es, por tanto, cualquier residuo o desecho que

sea potencialmente perjudicial para la salud ambiental por su toxicidad, inflamabilidad, corrosividad, reactividad química u otros motivos. Ejemplos de residuos tóxicos y peligrosos son los productos farmacéuticos, los aceites usados o las pilas con mercurio. Los principales componentes que dan a los residuos su carácter peligroso son: residuos radioactivos metales pesados, cianuros, dibenzo-p-dioxinas, biocidas y productos fitosanitarios, éteres, amianto, hidrocarburos aromáticos policíclicos, fósforo y sus derivados, y compuestos inorgánicos del flúor. Las actividades principales que generan este tipo de residuos son la minería, la energía nuclear y la industria en general (papelera, química o siderúrgica, entre otras). Las características de estos residuos se incluyen entre las siguientes: radioactivos; explosivos; líquidos inflamables; sólidos inflamables; sustancias o desechos susceptibles de combustión espontánea; sustancias o desechos que, en contacto con el agua, emiten gases inflamables; oxidantes; peróxidos orgánicos; tóxicos (venenos) agudos; sustancias infecciosas; corrosivos; liberación de gases tóxicos en contacto con el aire o el agua; sustancias cancerígenas. Los sistemas básicos de gestión de los residuos tóxicos y peligrosos son: la incineración, el tratamiento físico-químico, el depósito de seguridad y la recuperación. Cada país en materia legislativa adopta sus correspondientes normativas para la gestión de estos residuos.

Sedimento: Material sólido orgánico o mineral que es transportado desde su lugar de origen por el aire, el agua o el hielo y que se deposita en la superficie de la tierra o bajo las aguas.

Tomamuestras: Dispositivo usado con o sin medidor de flujo para extraer una porción de material para su análisis. Puede estar diseñado para tomar muestras aleatorias, compuestas, continuas o periódicas.

ANEXO III

MODELOS DE DOCUMENTOS
PARA LA CADENA DE CUSTODIA

CUSTODIA DE MUESTRAS

DATOS DE REMISIÓN

Nº Referencia	Oficio de Remisión
Procedimiento	Solicitante

DATOS DE RECOGIDA

Fecha	Hora
Lugar de la toma	Municipio
Envase	Conservación
Responsable de la toma	
Observaciones	

IDENTIFICACION DE MUESTRAS

Nº	Descripción	Tipo envase	Hora

--

CADENA DE CUSTODIA

Remite este documento junto con los resultados al solicitante

INVESTIGACIÓN SOBRE MORTANDAD DE PECES

Título
 D.I.P. N° Registro Municipio UTM
 Fecha Cauce

Análisis del agua Ver aguas

	Color	Olor	Oxígeno	Saturación	T°	pH	Conductividad	NH4	Nitritos	Nitratos
Muestra 1	<input type="text"/>									
Muestra 2	<input type="text"/>									

Descripción Ambiental (Temperatura / Lluvia / Viento / Nublado)

Clima día anterior	Clima noche anterior	Clima inspección
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Caudal	Fuentes contaminantes	
<input type="text"/>	<input type="text"/>	
Orillas	Vegetación	
<input type="text"/>	<input type="text"/>	

Macrófitas Invertebrados Fitoplancton Otros
 Otros datos de interés

Magnitud de la mortandad:

N° muertos Momento en que comenzó
 % de peces muertos Duración Distribución
 Especies implicadas Tamaño

Comportamiento de los supervivientes

Disposición aletas Natación Reflejos

Examen externo

Piel	Branquias
Aletas	Mucus
Ojos	Pigmentación
Boca	Ectoparásitos
Otras observaciones	

Informadores (Nombre / Dirección / Teléfono):

Denunciante

Autor protocolo

Personas con información

RECEPCIÓN DE MUESTRAS

Nº Registro General Nº Registro Sección

Nombre / etiqueta de identificación:

Datos relativos al solicitante:

Recibido Centro:	Fecha <input type="text"/>	Hora <input type="text"/>
Recibido Sección	Fecha <input type="text"/>	Hora <input type="text"/>

Firma:

- Agencia
- Policía Local
- Agente Judicial
- C. Hospitalario
- G. Civil
- Otros

Autor de entrega:

Modo de envío:

Embalaje:	Precinto	Refrigeradas

Número y tipo de envases recibidos:

Muestras de varios asuntos: Sí No

Muestras para:

- | | |
|----------------------|--------------------------|
| LAB. Q. TOXICOLÓGICO | <input type="checkbox"/> |
| LAB. HISTOPATOLOGÍA | <input type="checkbox"/> |
| LAB. HEMOGENÉTICA | <input type="checkbox"/> |
| LAB. ECOTOXICOLOGÍA | <input type="checkbox"/> |
| LAB. BIOLOGÍA | <input type="checkbox"/> |

Traslado a otro centro: Sí No

Conforme:

Observaciones:

Firma y Nombre

REGISTRO GENERAL

Título	<input type="text"/>	N° Registro	<input type="text"/>	
D.I.P.	<input type="text"/>	Provincia	<input type="text"/>	
		Municipio	<input type="text"/>	
		UTM	<input type="text"/>	
Localización	<input type="text"/>		Mapas ref.	<input type="text"/>

Descripción de la zona

Usos del suelo	<input type="checkbox"/> Agrícola	<input type="checkbox"/> Ganadero	<input type="checkbox"/> Industrial	<input type="checkbox"/> Urbano	<input type="checkbox"/> Otros
Especificar	<input type="text"/>				
Descripción del medio natural	<input type="text"/>				

Alteración medioambiental

Tipo	<input type="text"/>	Especificaciones	<input type="text"/>
------	----------------------	------------------	----------------------

Descripción de la intervención

Fecha	<input type="text"/>	Hora	<input type="text"/>
Descripción	<input type="text"/>		
Investigadores implicados	<input type="text"/>		

Autor

Ver Registros de:

REGISTRO DE DATOS SOBRE MUESTRAS DE AGUAS

Diligencias

Título

Municipio

--	--	--

Fecha

U.T.M.

Hora

Altitud

Localización

- | | | | | | | | |
|---------------|--|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| Anchura | <input type="checkbox"/> 0.5 | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 5 | <input type="checkbox"/> 10 | <input type="checkbox"/> 15 | <input type="checkbox"/> 20 |
| Profundidad | <input type="checkbox"/> 10 | <input type="checkbox"/> 20 | <input type="checkbox"/> 50 | <input type="checkbox"/> 100 | <input type="checkbox"/> 150 | <input type="checkbox"/> 300 | |
| Velocidad | <input type="checkbox"/> Muy rápido | <input type="checkbox"/> Rápido | <input type="checkbox"/> Lenta | <input type="checkbox"/> Muy lenta | | | |
| Sustrato | <input type="checkbox"/> Bloques | <input type="checkbox"/> Cantos | <input type="checkbox"/> Gravas | <input type="checkbox"/> Arenas | <input type="checkbox"/> Arcillas | <input type="checkbox"/> Fangos | |
| Secundario | <input type="checkbox"/> Bloques | <input type="checkbox"/> Cantos | <input type="checkbox"/> Gravas | <input type="checkbox"/> Arenas | <input type="checkbox"/> Arcillas | <input type="checkbox"/> Fangos | |
| Orillas | <input type="checkbox"/> Natural | <input type="checkbox"/> Alterada | <input type="checkbox"/> Dragada | <input type="checkbox"/> Artificial | | | |
| Fauna | <input type="checkbox"/> Muy abundante | <input type="checkbox"/> Abundante | <input type="checkbox"/> Escasa | <input type="checkbox"/> Nula | | | |
| Usos | <input type="checkbox"/> Bosque | <input type="checkbox"/> Matorral | <input type="checkbox"/> Cultivo | <input type="checkbox"/> Industrial | <input type="checkbox"/> Urbano | | |
| Contaminación | <input type="checkbox"/> Muy alto | <input type="checkbox"/> Alto | <input type="checkbox"/> Bajo | <input type="checkbox"/> Nulo | | | |

Observaciones

Caracteres Organolépticos:

Color Transparencia Olor

Parámetros Físico-Químicos:

Tª agua <input style="width: 90px;" type="text"/>	Nitrógeno total <input style="width: 90px;" type="text"/>
Oxígeno <input style="width: 90px;" type="text"/>	Fosfatos <input style="width: 90px;" type="text"/>
% <input style="width: 90px;" type="text"/>	Sulfatos <input style="width: 90px;" type="text"/>
pH <input style="width: 90px;" type="text"/>	Alcalinidad <input style="width: 90px;" type="text"/>
Conductividad <input style="width: 90px;" type="text"/>	Dureza <input style="width: 90px;" type="text"/>
Nitratos <input style="width: 90px;" type="text"/>	Otros <input style="width: 90px;" type="text"/>
Nitritos <input style="width: 90px;" type="text"/>	
Amonio <input style="width: 90px;" type="text"/>	

Autor del protocolo:

Ordenante:

