

# EL ESFUERZO DE MUESTREO DE MACROINVERTEBRADOS ACUÁTICOS ES DETERMINANTE PARA ESTABLECER EL ESTADO ECOLÓGICO DE RÍOS MEDITERRÁNEOS

Ramos-Merchante, Adrián\* y Prenda, José\*.

*\*Departamento de Biología Ambiental y Salud Pública. Universidad de Huelva (UHU).  
Campus universitario de El Carmen, Avda. Andalucía s/n, 21071, Huelva, España. Proyecto  
Campus E-Agua. jprenda@uhu.es*

## Resumen

La realización de inventarios reales y completos de grupos de fauna con elevado nivel de diversidad, como el de los macroinvertebrados de aguas continentales, es fundamental para el establecimiento objetivo y preciso del estado de calidad de las masas de agua. El uso de curvas de acumulación y modelos no-lineales asintóticos nos permite evaluar estos inventarios para determinar un esfuerzo de muestreo óptimo para la caracterización de localidades con fines conservacionistas y para estudios de calidad ecológica. En un estudio llevado a cabo en el río Múrtigas (cuena del Guadiana, Huelva, España) se ha obtenido una relación entre el esfuerzo de muestreo y algunos índices de estado ecológico basados en invertebrados bentónicos muy populares, como el IBMWP'. Nuestros resultados ponen de manifiesto una gran variabilidad en la eficiencia alcanzada en los inventarios obtenidos en diferentes localidades de un hábitat relativamente homogéneo a través de la aplicación de una metodología estandarizada e idéntica en todas ellas, basada en el más común de los muestreos: el "kick-sampling". Este procedimiento, amplísimamente utilizado en los estudios de calidad ambiental de ríos en aplicación de la Directiva Marco de Aguas (2000/60/CEE), presenta por ello un importante problema debido al gran número de unidades de esfuerzo necesario para alcanzar un inventario completo que genere una imagen real y precisa de la comunidad y por extensión del estado ecológico del medio.

**Palabras clave:** IBMWP', Directiva Marco de Aguas, calidad ambiental de ríos, kick-sampling, metodología de muestreo, Guadiana.

## 1. Introducción

La implementación de Directiva Marco de Aguas (DMA) (WFD, 2000/60/CEE; EC, 2000) requiere el uso de indicadores del estado ecológico para evaluar la calidad de las masas de aguas, que aunque en apariencia son fáciles de aplicar, presentan dificultades insuficientemente comprobadas, desde el punto de vista de alcanzar un grado de precisión mínimo, así como de comparación suficiente entre localidades y ámbitos. Por ello se precisan procedimientos rigurosos, especialmente en los muestreos, bien contrastados científicamente. Uno de los aspectos más importantes en estos procedimientos es el establecimiento de protocolos de aplicación de índices y métricas que permitan la detección y cuantificación real de las perturbaciones antrópicas a partir de las desviaciones que producen respecto a situaciones de referencia no afectadas por la actividad humana. Una evaluación no acorde con la realidad tendrá consecuencias negativas sobre la gestión del medio, sobre cualquier medida de restauración o conservación propuesta con el ánimo de alcanzar el objetivo de buen estado ecológico que propugna la DMA para 2015 (EC, 2000).

Los macroinvertebrados acuáticos, por su reconocido papel como bioindicadores frente al estrés ambiental, son usados para evaluar el estado ecológico de las masas de aguas continentales desde hace más de 100 años (Kolkwitz & Marsson, 1902; Rosenberg & Resh, 1993; Prenda & Gallardo, 1996). Sin embargo, no se ha prestado demasiada atención a los diferentes métodos de muestreo y a sus efectos sobre los valores que adquieren diferentes índices comúnmente empleados en la evaluación de la calidad ambiental, especialmente en ríos mediterráneos. Teniendo en cuenta la importancia que otorga la DMA a la evaluación del estado ecológico por medio de los macroinvertebrados y a las consecuencias de la misma,

desde el punto de vista de la gestión de los ríos, el muestreo requiere una consideración cuidadosa en términos de precisión, reproducibilidad y posibilidad de comparación entre sitios, además debe optimizar el esfuerzo y/o el coste económico (Vlek et al., 2006).

Uno de los métodos de muestreo más empleados, de carácter semi-cualitativo, es el denominado “kick-sampling” (Macan, 1958), que ha sido adoptado como procedimiento habitual en aplicación de numerosos índices de calidad biológica, como el BMWP (Alba-Tercedor et al., 2004). Para evaluar la precisión de cualquier índice basado en un esfuerzo de muestreo relativo, se necesita un inventario taxonómico completo que permita determinar la desviación entre el resultado medido y el "real". En los ríos mediterráneos ibéricos, los macroinvertebrados acuáticos componen uno de los grupos faunísticos más diversos, pero aun insuficientemente conocido (Colwell & Coddington, 1994) y, por tanto, difícil de inventariar de manera completa. La ausencia de una unidad básica de esfuerzo en los protocolos de muestreo empleados para determinar el estado ecológico de los cursos de agua, a su vez sujetos a una gran variabilidad espacio-temporal (Bradley & Ormerod, 2002a; Clarke et al., 2002; Vlek et al., 2006; Feeley., et al 2012), demanda la necesidad de realizar un ejercicio de calibración de los inventarios, que permita acotar los errores de medida, afinar la precisión del método y ajustar los protocolos de muestreo a las condiciones locales. El uso de índices de macroinvertebrados que dependen directamente del número de taxones capturado puede producir resultados erróneos en los estados de calidad ecológicos. Estos deben diferenciar claramente entre la variabilidad natural en la comunidad y el régimen de perturbaciones antrópicas (Armitage et al., 1983; Gotelli & Colwell, 2001). El uso de modelos no-lineales asintóticos nos permite determinar un rango de esfuerzo de muestreo básico (Moreno & Halffter, 2000), así como predecir la riqueza de taxones de los inventarios con gran eficacia y exactitud (Thompson et al., 2003).

En este trabajo se cuestiona la precisión e integridad del esfuerzo de muestreo necesario para obtener el inventario completo de un grupo faunístico muy diverso, como es el de los macroinvertebrados acuáticos. Además, en él se comprueba como en índices dependientes del número de taxones, se generan sesgos de gran magnitud en el establecimiento de los estados de calidad que recoge la DMA. Finalmente se proponen directrices de cómo efectuar los inventarios de macroinvertebrados acuáticos para minimizar estos errores en una serie geomorfológicamente homogénea de localidades de cabecera en un río mediterráneo. Para ello se establece un protocolo de muestreo que mida el estado ecológico del río eficientemente minimizando los costes. Para conseguir estos objetivos, (i) averiguaremos cómo se comportan las curvas acumuladas de riqueza de taxones mediante 20 kicks en este grupo faunístico hiper-diverso, mediante el uso del porcentaje alcanzado según modelos asintóticos no-lineales y extrapolación de las curvas, (ii) estableceremos un rango de unidad de esfuerzo satisfactorio al 90-95% que muestre la variedad dependiente de la heterogeneidad estudiada con el fin de determinar diferentes ajustes en la metodología y rentabilizar los estudios posibilitando su comparación dentro de un mismo río.

## **2. Material y Métodos**

El estudio se realizó en el río Múrtigas (cuenca del Guadiana, Huelva, SO España) de 81 km de longitud y 478 km<sup>2</sup> de cuenca. Discurre por la Sierra de Aracena, entre 200 y 1000 m.s.n.m. hasta. El área posee clima mediterráneo continental templado con una temperatura media anual entre los 14° y los 16°C y una precipitación media entre 800 y 1000 mm, concentrada entre el otoño y la primavera. El muestreo se realizó entre octubre y noviembre de 2010, en 15 localidades distribuidas equitativamente a lo largo del tramo español del río, de 55 km de longitud (Fig. 1).

**Figura 1. Localidades de muestreo de macroinvertebrados en el río Múrtigas (Huelva, España).**



Para evaluar la eficiencia del procedimiento del kicking method y acotar el error que se deriva del esfuerzo de muestreo de los macroinvertebrados se usó un método estandarizado basado en el desarrollado en el proyecto AQEM (Hering et al., 2003). Con este procedimiento intensivo se aumentaban las probabilidades de captura de los taxones más raros.

El “número de kicks” es la unidad de esfuerzo estandarizada en nuestros análisis (Bradley & Ormerod, 2002a). Para cada localidad se calculó la curva acumulada de taxones teniendo en cuenta los 20 kicks. Para grupos hiperdiversos, como los macroinvertebrados, las curvas de acumulación son difíciles de aplicar (Willott, 2001). Sin embargo, es posible encontrar la asíntota de los inventarios incompletos, así como la comparación mediante la extrapolación (Soberón & Llorente, 1993; Colwell & Coddington, 1994; Moreno & Halffter, 2001) mediante el uso de modelos. Dos modelos no-lineales asíntóticos (Thompson et al., 2003; Díaz-Francés & Soberón, 2005; Aranda et al., 2010), definidos como *Modelos de Clench* (CM, Clench, 1979; Soberón & Llorente, 1993; Moreno & Halffter, 2000) y *Modelo de Dependencia Lineal* (LDM, o Exponencial Negativo, Miller & Weigert, 1989; Soberón & Llorente, 1993; Moreno & Halffter, 2000), fueron ajustados a las curvas de acumulación de taxones. El modelo no-lineal apropiado está influenciado por las dimensiones del área muestreada, la heterogeneidad del hábitat y consideraciones temporales (Soberón & Llorente, 1993; Thompson et al., 2003).

Para el ajuste de los modelos se aplicó una regresión no-lineal, usando como método iterativo el procedimiento Simplex & Quasi-Newton, recomendado para evitar problemas de ajustes. Dada la posible influencia del orden en que se efectuaron los kicks en el campo fue necesario aplicar aleatorización para eliminar el sesgo (Colwell & Coddington, 1994). Para ello se aplicaron 100 permutaciones a cada una de las muestras. Esto produce curvas de acumulación de taxones suavizadas (Moreno & Halffter, 2000, 2001; Gotelli & Colwell, 2001; Willott, 2001) mediante promedio de varias aleatorizaciones. Los modelos no-lineales asíntóticos fueron ajustados a las curvas suavizadas del número de taxones.

Debido a que el 100% de taxones requiere de un esfuerzo infinito, se usó el 90 y 95% del total de fauna como un nivel de integridad del inventario conservador, haciendo posible la comparación y estimación del mínimo esfuerzo requerido para alcanzar este nivel (ver Moreno & Halffer, 2000). Con el objetivo de estimar el esfuerzo de muestreo necesario, se determinó un intervalo deducido de ambos modelos, en el que el límite máximo vino dado por el Modelo de Clench y el mínimo por el de Dependencia Lineal (Moreno & Halffer, 2000).

### 3. Resultados

Se capturó un total de 23.821 individuos de macroinvertebrados pertenecientes a 67 familias. Las familias con mayor frecuencia de aparición fueron Caenidae, Baetidae, Chironomidae, Simuliidae e Hydropsychidae. En la tabla 1 los resultados obtenidos muestran el ajuste de los modelos asintóticos no-lineales para cada localidad y el grado de plenitud alcanzada del inventario con el muestreo respecto de la riqueza real esperada. Una gran parte de la fauna fue capturada sin haber superado en la mayoría de los casos el 90% de la fauna real pronosticada y destacando la variabilidad en el porcentaje obtenido en las diferentes localidades con un esfuerzo de muestreo idéntico de 20 kicks (2,5m<sup>2</sup>) en todas ellas (Tabla 1). La riqueza observada por localidad osciló entre 13 y 35 familias. Sin embargo, la asíntota pronosticada por ambos modelos, Clench y Dependencia Lineal, varió entre 12 y 40 familias. Ambos modelos generaron un buen ajuste ( $R^2 > 0,93$ ; Tabla 1, Figura 2), siendo el modelo de Clench el que obtuvo los valores más altos (valor medio de  $R^2 = 0,994$ ). Los porcentajes obtenidos respecto a la asíntota pronosticada por ambos modelos fueron muy altos. Por lo que se capturó una porción significativa de la fauna total, excepto para las localidades 3 y 4 que se mantuvieron por debajo del 80%. Según el modelo de Dependencia lineal el muestreo fue suficiente para extraer una porción representativa de la fauna real presente. Sin embargo, el modelo de Clench predijo que el muestreo fue incompleto, obteniéndose valores entre el 70-90% de la fauna potencial. En ambos casos las localidades 3, 4, 13 y 15 fueron las más discrepantes entre el número de taxones observado respecto al esperado (Tabla 1). La diferencia entre los valores de las asíntotas pronosticadas (Figura 2) indica la similitud o diferencia con un modelo asintótico perfecto para cada localidad. Las localidades 5 y 6 fueron las que obtienen la diferencia menor. Por el contrario, en las localidades 4 y 15 las asíntotas se encontraron más alejadas, quedando el inventario real lejos de los valores observados.

**Tabla 1. Resultados del ajuste de los modelos de Clench y de Dependencia Lineal que describen el crecimiento de la curva de acumulación de taxones respecto al esfuerzo de muestreo de macroinvertebrados acuáticos en 15 localidades en el río Múrtigas (Huelva). Sobs: Riqueza observada; a/b: asíntota;  $R^2$ : coeficiente de determinación; % LDM-%CM: porcentaje alcanzado por la asíntota de cada modelo; LDM: Modelo de Dependencia Lineal; CM: modelo de Clench. Se muestran los valores medios de los resultados por localidad.**

Localidades	Nº Kicks	Sobs	a/b LDM	$R^2$ LDM	a/b CM	$R^2$ CM	% LDM	% CM
1	20	35	34	0,965	40	0,998	104,3	88,5
2	20	34	33	0,969	40	0,995	104,2	85,4
3	20	19	19	0,994	26	0,999	97,9	74,2
4	20	29	30	0,983	39	0,994	98,3	73,7
5	20	13	12	0,969	15	0,996	105,6	87,6
6	20	17	17	0,982	20	0,999	102,6	83,6
7	20	27	25	0,937	31	0,980	106,0	87,6
8	20	26	25	0,971	31	0,995	104,0	84,7
9	20	26	25	0,942	29	0,991	106,0	90,3
10	20	24	23	0,957	27	0,995	105,3	89,3

11	20	23	22	0,961	27	0,992	103,5	86,2
12	20	24	23	0,963	27	0,998	105,1	89,5
13	20	24	23	0,977	29	0,996	103,1	82,1
14	20	25	24	0,971	30	0,995	103,0	84,6
15	20	29	28	0,969	36	0,990	102,6	81,0
Media	20	25	24	0,967	30	0,994	103,4	84,6

Los porcentajes alcanzados por la fauna observada respecto de la esperada (O/E) en cada modelo indica que todos alcanzaron el nivel mínimo satisfactorio establecido del inventario (>90%, Linear Model Dependence). Sin embargo, según el modelo de Clench solo alcanzó este porcentaje la localidad 9. La asíntota pronosticada por Clench representa una diferencia de 5 familias en promedio (rango: 2-10) de O/E para cada localidad. La localidad 4 obtuvo la mayor diferencia O/E en el número de familias (Tabla 1).

**Tabla 2. Resultados obtenidos del intervalo de esfuerzo de muestreo necesario en cada localidad, según cada modelo ajustado. Riqueza de taxones registrados al 90-95% respecto de la asíntota pronosticada por cada modelo y esfuerzo de muestreo (expresado en número de kicks) necesario para obtener una proporción aceptable de la diversidad (90% y 95%, ver análisis de datos en la sección de métodos). Modelo de dependencia lineal (LDM) and Modelo de Clench (CM).**

Sitios	Sobs	Taxones obtenidos (90%)	Taxones obtenidos (95%)	Esfuerzo de muestreo requerido (90%)	Esfuerzo de muestreo requerido (95%)
		Min (LDM) - Max (CM)	Min (LDM) - Max (CM)	Min (LDM) - Max (CM)	Min (LDM) - Max (CM)
1	35	30 – 36	32 – 38	8 – 26	10 – 54
2	34	29 – 36	31 – 38	10 – 36	13 – 75
3	19	17 – 23	18 – 24	15 – 63	19 – 133
4	29	27 – 35	28 – 37	16 – 71	21 – 150
5	13	11 – 13	12 – 14	9 – 31	12 – 66
6	17	15 – 18	16 – 19	10 – 37	13 – 78
7	27	23 – 28	24 – 29	10 – 34	13 – 71
8	26	22 – 28	24 – 29	10 – 37	14 – 79
9	26	22 – 26	23 – 27	8 – 25	10 – 52
10	24	21 – 24	22 – 26	8 – 26	11 – 55
11	23	20 – 24	21 – 25	9 – 31	12 – 66
12	24	21 – 24	22 – 28	8 – 25	10 – 52
13	24	21 – 26	22 – 28	12 – 45	15 – 95
14	25	22 – 27	23 – 23	10 – 35	13 – 74
15	29	25 – 32	27 – 27	13 – 49	17 – 104

Los intervalos de esfuerzos de muestreo (kicks) necesarios para alcanzar un nivel satisfactorio del inventario, correspondientes al 90-95% de la asíntota estimada por los modelos, variaron entre las diferentes localidades, ampliándose en algunas de ellas incluso a niveles poco eficientes (Tabla 2). El esfuerzo mínimo requerido para alcanzar un nivel importante y aceptable de taxones presentes en un lugar determinado, bajo determinadas condiciones, oscila entre 8-16 kicks, para un 90%, y 10-21 kicks para 95% del límite inferior pronosticado (Modelo de Dependencia Lineal). En el caso del límite superior, el mínimo esfuerzo requerido es 25-71 kicks en un 90%, y 52-150 kicks para un 95% del total de inventario pronosticado

(Modelo de Clench; valores redondeados, ver Tabla 2). El esfuerzo de muestreo máximo según el modelo de Clench al 90% supera en todos los casos el esfuerzo aplicado en el muestreo (rango 25-71). Sin embargo, el Modelo de Dependencia Lineal limita al 90% un rango entre 8-16 kicks. Ambos porcentajes satisfactorios propuestos suponen una diferencia de 3 (2-4; 90%) y 1 (1-2; 95%) taxones en promedio sin capturar respecto del total pronosticado en cada localidad (Tabla 2). Aquellas localidades que necesitan un mayor esfuerzo para alcanzar la asíntota o el porcentaje propuesto son aquellas en las que la pendiente es menos fuerte en su inicio y menos cercana a la asíntota en la curva acumulada (Tabla 2).

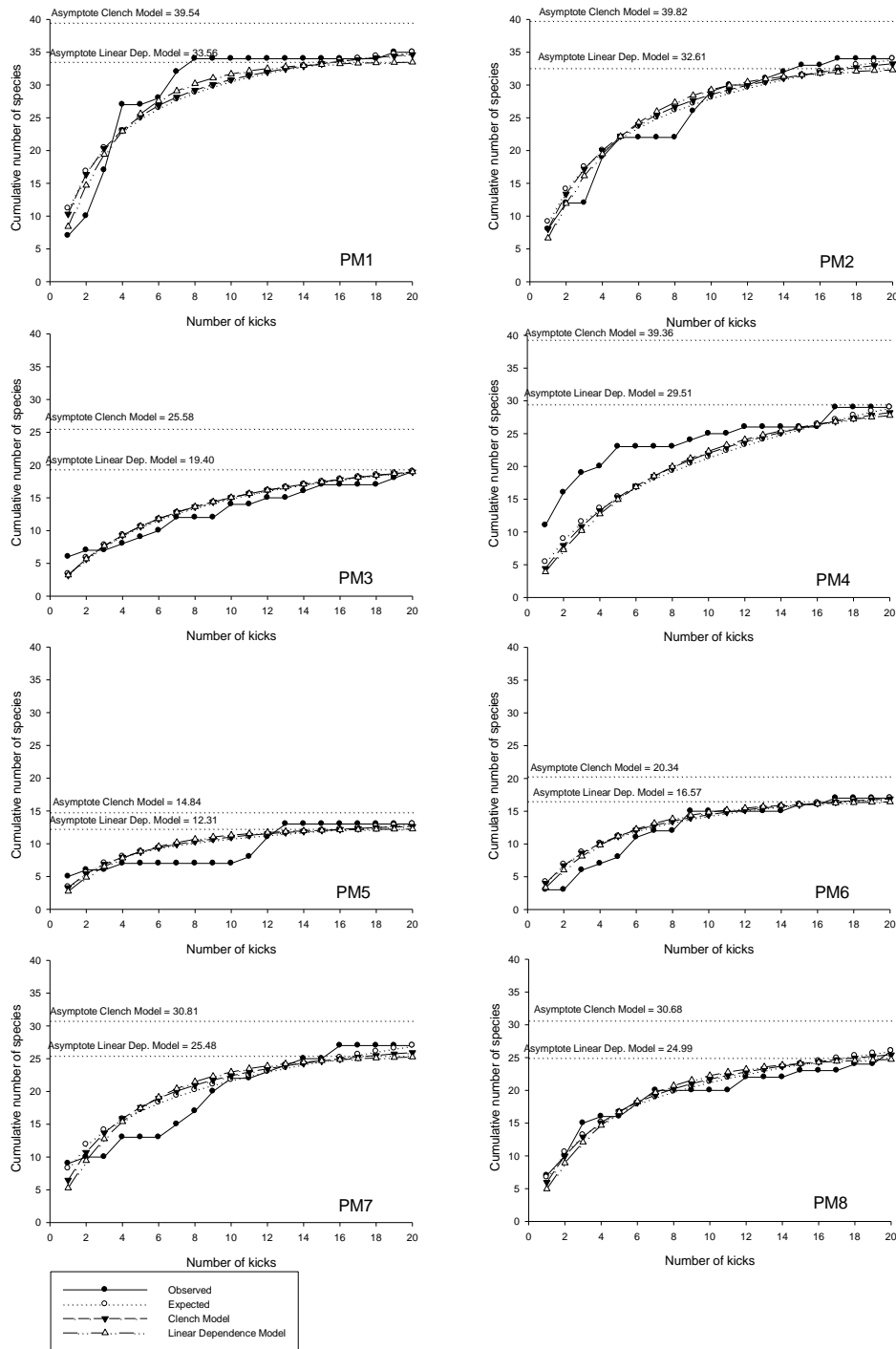
#### 4. Discusión

Las curvas de acumulación de taxones son un método que proporciona un valor fiable y real sobre la fauna (Colwell & Coddington, 1994; Thompson et al., 2007). Conocer el número verdadero de taxones del que dependen los índices de calidad tiene que ser un objetivo prioritario para poder determinar los estados de calidad real y así evitar errores que impliquen medidas inadecuadas o incluso perjudiciales en el ámbito de la gestión y de la conservación (Armitage et al., 1983; Soberón & Lorente, 1993; Moreno & Halffter, 2000; Thompson et al., 2007). Los inventarios de grupos altamente diversos, como el de los macroinvertebrados acuáticos, son difíciles de completar, como se comprueba en los resultados aquí presentados. El ajuste de modelos para predecir el valor real de los inventarios pone de manifiesto que se necesita un esfuerzo de muestreo adicional en la mayoría de los casos o localidades, en ocasiones muy importante. Por ejemplo, el modelo de Clench que mejor ajuste proporcionó, pronosticó siempre asíntotas por encima de los datos observados. Con lo cual, cualquier métrica o índice dependiente del número de taxones observados y del esfuerzo de muestreo, se verá afectado por ello y dará resultados erróneos si el muestreo no se realiza adecuadamente y de manera completa. Además, se puede ver que el esfuerzo de muestreo necesario varía en cada localidad, según sus condiciones físico-biológicas.

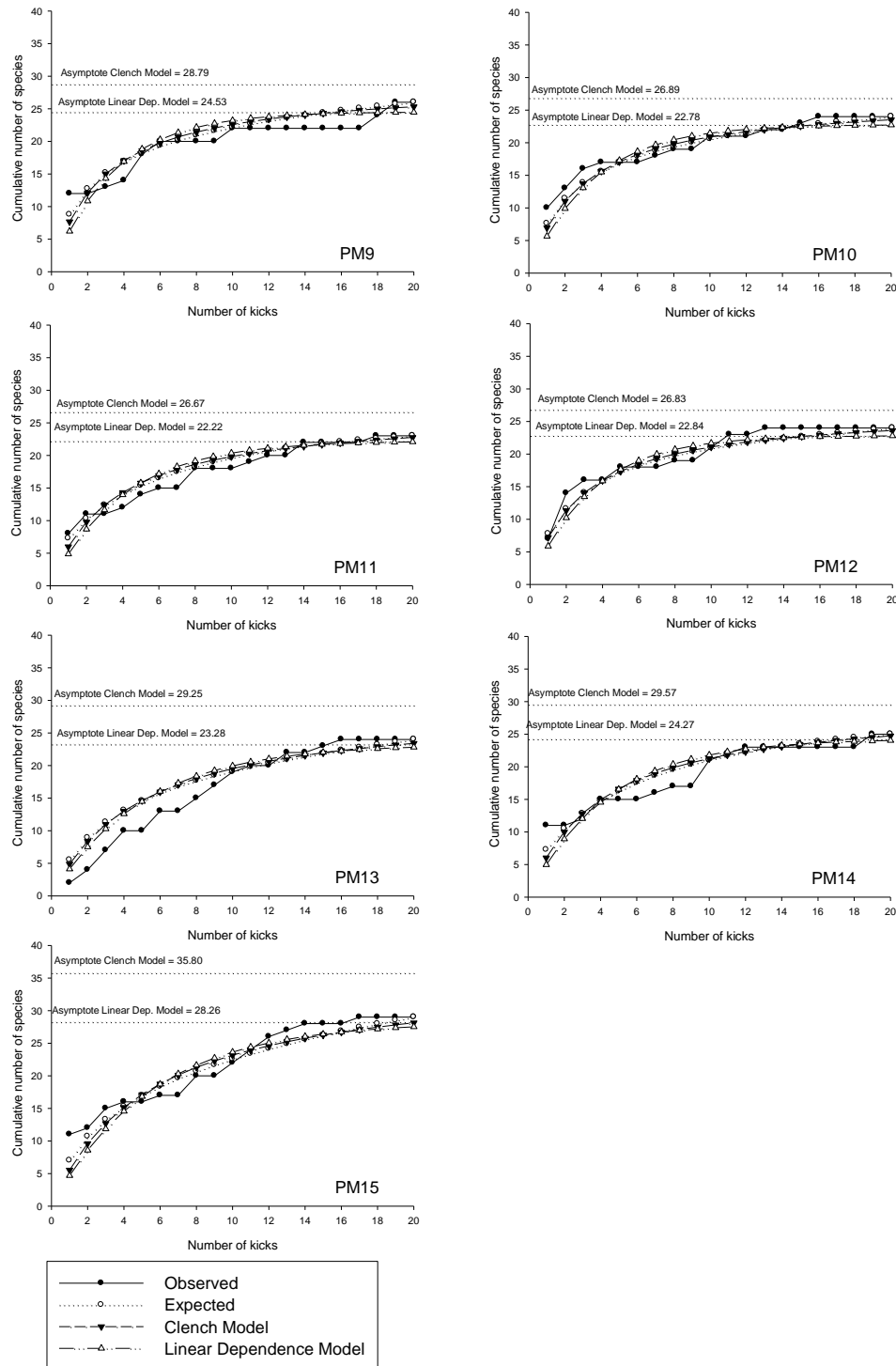
Según las estimas del modelo de Clench la localidad 1 contiene en torno a 40 familias de macroinvertebrados, habiéndose capturado el 88,5% (35 familias). Para alcanzar el 90% sería necesario realizar 5 kick adicionales, lo que supondría el aumento de una sola familia, lejos del total estimado. En estudios completos sería necesario un mayor esfuerzo de muestreo. La probabilidad de capturar un nuevo taxón disminuye al acercarnos a la asíntota (Soberón & Lorente, 1993; Colwell & Coddington, 1994). En otros estudios, por ejemplo, Bradley & Ormerod (2002a) extrajeron el 70 % de la riqueza de taxones en las 5 primeras muestras, y Bady et al., 2005 obtuvieron el 50% con las 10 primeras muestras. En este estudio, 10 kicks proporcionaron alrededor del 70 % de la riqueza total, excepto para las localidades 3, 4, (<60%) y 13, 15 (<70%).

Por tanto, a pesar de que con el esfuerzo realizado en el estudio se registra una gran parte de la fauna presente, para completar el inventario real sería necesario un gran esfuerzo adicional que añada aquellos taxones con menor probabilidad de ser capturados, menos abundantes u ocasionales, espacial y temporalmente. Es importante evaluar en los protocolos de campo el coste añadido que representa para este grupo taxonómico el aumento de unidades de esfuerzo, ya que se pueden alcanzar niveles críticos.

**Figura 2. Curvas de acumulación de especies originales y ajustadas para la diferentes localidades estudiadas. Círculos vacíos: datos observados; círculos rellenos: esperados; triángulos: predicciones del modelo de Clench (relleno) y de Dependencia Lineal (vacío). Las líneas horizontales son asíntotas predichas por cada modelo.**



El inventario se completa rápidamente para las localidades 5 o 6. Este resultado no está afectado tanto por el número de taxones presentes, sino más bien puede deberse a la estructura de la comunidad. En las localidades 3 y 4, un índice de macroinvertebrados aumentará aún más su valor, al incrementarse el esfuerzo para capturar los taxones restantes. Pero ello podría no representar la realidad del estado de perturbación del lugar. La variabilidad en el esfuerzo de muestreo mínimo a utilizar ha de ser tomada en cuenta y la unidad de esfuerzo superará en la mayoría de los casos los 20 kicks debido a la diversidad de los macroinvertebrados acuáticos. Buscar un método que disminuya los costes y el esfuerzo pero que proporcione resultados fiables de los estados de calidad en el sistema acuático es de vital importancia.



Se demuestra aquí, por tanto, que la mera aplicación de un esfuerzo de muestreo equivalente en unas condiciones similares en diferentes localidades puede generar un error no acotado, que para ser solventado exige la aplicación de un esfuerzo de muestreo mínimo variable, ajustado a las condiciones de cada caso. Ante condiciones ambientales similares, la unidad de esfuerzo debe variar en función de la diversidad de partida del lugar (Vleck et al., 2006), por lo que la metodología establecida en los protocolos de “kick-sampling” debería ser modificada de acuerdo a los datos obtenidos en este estudio.



Para determinar la totalidad de los taxones (idealmente el 100% de la fauna) se necesitarían presupuestos inviables y en algunos casos ello podría incluso no generar cambios significativos en los estados de calidad establecidos por la DMA. Un estudio sobre la presencia de taxones “raros” y la estructura de la comunidad, con análisis multivariantes y curvas de acumulación de taxones, sería necesario para averiguar la influencia de ambos factores sobre el esfuerzo de muestreo. Aun así, la propuesta de alcanzar el 90% de la fauna total estimada sería el mejor punto de corte para una unidad de esfuerzo razonable, que no tendría en cuenta los taxones “raros” y proporcionaría para la mayoría de las localidades una gran parte de la taxonomía presente (Moreno & Halffter, 2000; Willot, 2001; Thompson et al., 2007). En otros estudios sobre arácnidos (Sorensen et al., 2002), se recomienda centrarse en unos pocos taxones, desarrollando protocolos específicos de tal manera que el problema de los taxones “raros” se minimice. Incluso el uso de índices de diversidad o las características funcionales proporcionan mayor precisión que el uso directo de la riqueza de taxones para describir la comunidad usando un número pequeño de muestras o bajo esfuerzo de muestreo (Gayraud et al., 2003; Bady et al., 2005).

## 5. Referencias bibliográficas

- Alba-Tercedor, J. y 18 autores más. (2004): Caracterización del estado ecológico de ríos mediterráneos ibéricos mediante el índice IBMWP (=BMWP'). *Limnetica*, 21(3-4), 2002: 175-185.
- Aranda, S. C., R. Gabriel, P. A. V. Borges y J. M. Lobo. (2010): Assessing the completeness of bryophytes inventories: an oceanic island as a case study (Terceira, Azorean archipelago). *Biodiversity and Conservation* 19: 2469–2484.
- Armitage, P.D., Moss, D., Wright, J.F. y Furse, M.T. (1983): The performance of a new biological water quality score system based on macroinvertebrates over a wide range of unpolluted running-water sites. *Water Research* 17(3): 333-347.
- Bady P., Dolédec S., Fesl C., Gayraud S., Bacchi M. y Schöll F. (2005): Use of invertebrate traits for the biomonitoring of European large rivers: the effects of sampling effort on genus richness and functional diversity. *Freshwater Biology*, 50, 159–173.
- Bradley, D. C. y S. J. Ormerod, (2002a): Evaluating the precision of kick-sampling in 594 upland streams for assessment of long-term change: the effects of sampling 595 effort, habitat and rarity. *Archive für Hydrobiologia* 155: 199-221.
- Clarke, R. T., M. T. Furse, R. J. M. Gunn, J. M. Winder y J. F. Wright, (2002): Sampling variation in macroinvertebrate data and implications for river quality indices. *Freshwater Biology* 47: 1735-1751.
- Clench, H. (1979): How to make regional lists of butterflies some thoughts. *J. Lepidopterists Society*, 33 (4): 216-231.
- Colwell, R.K. y Coddington, J.A. (1994): Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical transactions of the Royal society of London, Series B*, 345, 101-118.
- Díaz–Frances, E. y Soberón, J., (2005): Statistical estimation and model selection of species–accumulation functions. *Conservation Biology*, 19: 569-573.
- EC, (2000): Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23rd October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy, *Official Journal of the European Communities L* 327/1, Brussels: European Commission L 327, 22.12.2000: 1-72.

- Feeley HB, Woods M, Baars J-R, y Kelly-Quinn M, (2012): Refining a kick sampling strategy for the bioassessment of benthic macroinvertebrates in headwater streams. *Hydrobiologia* 683: 53-68.
- Gotelli, N. J. y R. K. Colwell. (2001): Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters* 4: 379-391.
- Gayraud S., Statzner B., Bady P., Haybach A., Schöll F., Usseglio-Polatera P. y Bachi M. (2003): Invertebrate traits for the biomonitoring of European large rivers: an initial assessment of alternative metrics. *Freshwater Biology*, 48, 2045–2064.
- Hering, D. et al. (2003): The development of a system to assess the ecological quality of streams based on macroinvertebrates – design of the sampling programme within the AQEM project. *International Review of Hydrobiology*, 88, 345-361.
- Kolkwitz, R. y M. Marsson. (1902): Grundsätzliches fuer die biologische Beurteilung des Wassers nach seiner Flora und Fauna. *Mitt. K. Prüfanstalt. Wasservers. Abwasserbes. Berlin-Dahlem* 1, 33 – 72.
- Macan, T.T. (1958): Methods of sampling the bottom fauna in stony streams. *Mitt. Int. Ver. Limnol.*, 8, 1-21.
- Miller, R. I., y R. G. Weigert. (1989): Documenting completeness, species area relations, and the species-abundance distribution of a regional flora. *Ecology* 70: 16-22.
- Moreno, C. E. y G. Halffter (2000): Assessing the completeness of bat biodiversity inventories using species accumulation curves. *J. Appl. Ecol.*, 37: 149-158.
- Moreno, C. E. y G. Halffter. (2001): On the measure of sampling effort used in species accumulation curves. *J. Appl. Ecol.*, 38: 487-490.
- Prenda, J. y Gallardo, A. (1996): Self-purification, temporal variability and the macroinvertebrate community in small lowland Mediterranean streams receiving crude domestic sewage effluents. *Archiv für Hydrobiologie*, 136 (2): 159-170.
- Rosenberg, D. M. y V. H. Resh. (1993): Introduction to freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates. In: D.M. Rosenberg and V.H. Resh, eds. *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates* p.488. Chapman and Hall, New York.
- Soberón, J. y J. Llorente (1993): The use of species accumulation functions for the prediction of species richness. *Conserv. Biol.*, 7: 480-488.
- Sorensen L. L., J. A. Coddington y N. Scharff. (2002): Inventorying and estimating subcanopy spider diversity using semiquantitative sampling methods in an Afrotropical forest. *Environ. Entomol.* 31: 319-330.
- Thompson G. G., Withers P. C., Pianka E. R. y Thompson S. A. (2003): Assessing biodiversity with species accumulation curves; inventories of small reptiles by pit-trapping in Western Australia. *Aust. Ecol.* 28, 361-83.
- Thompson G. G., S. A. Thompson, P. C. Withers y J. Fraser (2007): Determining adequate trapping effort and species richness using species accumulation curves for environmental impact assessment. *Aust. Ecol.* 32, 570-580.
- Vlek, H. E., F. Šporka y I. Krno, (2006): Influence of macroinvertebrate sample size on 792 bioassessment of streams. *Hydrobiologia* 566: 523-542.
- Willott S. J. (2001): Species accumulation curves and the measure of sampling. *J. Appl. Ecol.* 38, 484-490.