

# Centro de Investigación, Seguimiento y Evaluación del Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama

## Estudio limnológico complementario de las charcas experimentales de tratamiento in situ de la quitridiomycosis

### INFORME



Año 2021

**CONSEJERIA DE MEDIOAMBIENTE, VIVIENDA Y AGRICULTURA**  
DIRECCION GENERAL DE BIODIVERSIDAD Y RECURSOS NATURALES

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN, SEGUIMIENTO Y EVALUACION**  
PARQUE NACIONAL DE LA SIERRA DE GUADARRAMA

*Estudio limnológico complementario de las charcas experimentales de  
tratamiento in situ de la quitridiomycosis*

**Autor principal**

**Ignacio Granados.** CISE

**Equipo de trabajo o colaboradores**

**Ángel Rubio.** CISE

**Coordinación**

**Juan A. Vielva Juez.** Responsable del Centro de Investigación (CISE)

# Estudio limnológico complementario de las charcas experimentales de tratamiento *in situ* de la quitridiomicosis

V3\_noviembre 2022

## Índice

PREFACIO.....	5
1. Antecedentes y justificación .....	6
2. Metodología .....	8
2.1. Selección de charcas y fechas de muestreo.....	8
2.2. Tratamiento con fungicida .....	12
2.3. Análisis hidroquímicos .....	12
2.4. Determinaciones biológicas .....	13
2.5. DECOTABs .....	13
2.6. Análisis estadísticos .....	16
3. Resultados.....	17
3.1. Condiciones ambientales .....	17
3.2. Tebuconazol.....	18
3.3. Físico-química .....	20
3.4. Pigmentos fotosintéticos .....	29
3.5. Biota .....	32
3.6. DECOTABs .....	35
4. Resumen y conclusiones .....	39
5. Bibliografía .....	41

## Figuras

Figura 1. Ubicación de las charcas experimentales .....	9
Figura 2. a) Disposición de las charcas seleccionadas en el sector XVI (Charca Larga y de Las Piedras). Flecha azul charca control, flecha roja charca tratada. b) Charca XVI-01. c) Charca XVI-10 .....	10
Figura 3. a) Disposición de las charcas seleccionadas en el sector XIX (Charcas Calamita). Flecha azul charca control, flecha roja charca tratada. b) Charca XIX-07. c) Charca XIX-12.....	11
Figura 4. a) Disposición de las charcas seleccionadas en el sector XXIV (Charcas de Las Rocas). Flecha azul charca control, flecha roja charca tratada. b) Charca XXIV-03. c) Charca XXIV-05.....	11
Figura 5. Proceso de fabricación de las DECOTABs. ....	14
Figura 6. Preparación de las DECOTABs para su instalación en campo.....	14
Figura 7. DECOTABs en la estufa de desecación tras haber permanecido en campo. ....	15
Figura 8. Precipitación diaria en el Puerto de Los Cotos (1.873 m s.n.m.) y temperatura en Las Hoyas (2.019 m s.n.m.) entre el 1 de junio y el 30 de septiembre de 2021. Las líneas verticales punteadas indican las fechas de trabajos de campo. ....	17
Figura 9. Evolución de la concentración de tebuconazol en las charcas estudiadas (escala logarítmica). Cada sector se muestra en un color y las charcas tratadas se representan con un círculo y línea continua frente a las charcas control (rombo y línea punteada).....	19
Figura 10. Diagrama de caja de la temperatura, la conductividad y la saturación de oxígeno disuelto en charcas control y charcas tratadas. ....	21
Figura 11. Evolución de la temperatura en las charcas estudiadas. Cada sector se muestra en un color y las charcas tratadas se representan con un círculo y línea continua frente a las charcas control (rombo y línea punteada). ....	22
Figura 12. Evolución de la saturación de oxígeno disuelto en las charcas estudiadas. Cada sector se muestra en un color y las charcas tratadas se representan con un círculo y línea continua frente a las charcas control (rombo y línea punteada). ....	22
Figura 13. Diagrama de caja de la alcalinidad, conductividad, nitrato, nitrito, nitrógeno total y fósforo total. ....	24
Figura 14. Evolución de la alcalinidad en las charcas estudiadas. Cada sector se muestra en un color y las charcas tratadas se representan con un círculo y línea continua frente a las charcas control (rombo y línea punteada). ....	26
Figura 15. Evolución de la conductividad en las charcas estudiadas. Cada sector se muestra en un color y las charcas tratadas se representan con un círculo y línea continua frente a las charcas control (rombo y línea punteada). ....	26
Figura 16. Evolución del nitrato en las charcas estudiadas. Cada sector se muestra en un color y las charcas tratadas se representan con un círculo y línea continua frente a las charcas control (rombo y línea punteada). ....	27
Figura 17. Evolución del nitrito en las charcas estudiadas. Cada sector se muestra en un color y las charcas tratadas se representan con un círculo y línea continua frente a las charcas control (rombo y línea punteada). ....	27
Figura 18. Evolución del nitrógeno total en las charcas estudiadas. Cada sector se muestra en un color y las charcas tratadas se representan con un círculo y línea continua frente a las charcas control (rombo y línea punteada). ....	28

Figura 19. Evolución del fósforo total en las charcas estudiadas. Cada sector se muestra en un color y las charcas tratadas se representan con un círculo y línea continua frente a las charcas control (rombo y línea punteada).  
..... 28

Figura 20. Diagrama de caja de la clorofila *a*, *b* y *c* y del índice de carotenoides en charcas control y charcas tratadas.  
..... 30

Figura 21. Evolución de la clorofila *a* en las charcas estudiadas. Cada sector se muestra en un color y las charcas tratadas se representan con un círculo y línea continua frente a las charcas control (rombo y línea punteada).  
..... 31

Figura 22. Índice de Shannon (diversidad- $\alpha$ ) que indica la biodiversidad de macroinvertebrados acuáticos encontrados las charcas experimentales el 13 de julio de 2021..... 34

Figura 23. Sistema de incubación de las DECOTABs en las charcas experimentales, que permite ir retirando secuencialmente un número determinado de réplicas para determinar la pérdida de peso debido a la descomposición microbiana. .... 35

Figura 24. Modelos de decaimiento exponencial calculados a partir de la pérdida de masa de las DECOTABs en cada una de las charcas..... 36

Figura 25. Regresión lineal del porcentaje de DECOTABs restante respecto al tiempo en las distintas charcas. .... 37

## PREFACIO

El informe que se recoge en este documento fue solicitado, por quien suscribe como responsable del Centro de Investigación, Seguimiento y Evaluación del Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama (CISE), al personal especialista en limnología que desarrolla su trabajo en el mismo. El objetivo planteado fue el de conocer la afección de un experimento llevado a cabo por el Dr. Jaime Bosch, investigador del CSIC y colaborador del CISE, cuyos ensayos consistieron en la aplicación de tebunocazol en unas charcas del Macizo de Peñalara. Experimento diseñado ante la necesidad urgente de realizar acciones de mitigación en el medio natural, y concretamente para la desinfección de larvas infectadas dada la situación crítica del sapo partero común en toda su área de distribución.

Es conocido por todos el que la quitridiomycosis es una enfermedad infecciosa que afecta a los anfibios, causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), a quien se le achaca el declive, incluso de la extinción local del sapo partero común.

Para la mitigación del daño, no solo es preciso la detección temprana es la lucha contra este patógenos, sino también la realización de experimentos en campo como lo son los que dan origen a este informe.

No obstante, la necesidad de este tipo de experiencias, se condicionó la extensión de estos ensayos en el Macizo de Peñalara, a que se hiciera, por el CSIC, una primera intervención en tres parejas de charcas (actuación - testigo), hasta que, por el personal del CISE, a través de los análisis que fueran procedentes, se recogiera en un informe los resultados relativos al estado de conservación de estos ecosistemas acuáticos durante la realización del experimento.

Al no poder abordar, por el personal del CISE, la totalidad de los análisis que se estimaron precisos se realizó un encargo, al laboratorio del agua del CEDEX, denominado Análisis hidroquímico de las charcas experimentales de distintos tratamientos en defensa de anfibios en el Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama (Tebuconazol) por HPLC/MS/MS cuyos resultados preliminares son también utilizados por los autores de este informe.

La actuación que se informa cumple además con lo dispuesto en el Plan de Actuación Sobre Humedales Catalogados de la Comunidad de Madrid, y persigue evitar la desaparición de estos anfibios en estos Humedales de Importancia Internacional.

JUAN VIELVA JUEZ

RESPONSABLE DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN SEGUIMIENTO Y EVALUACIÓN.

## 1. Antecedentes y justificación

Los Humedales del Macizo de Peñalara están incluidos en la Lista de Humedales de Importancia Internacional del Convenio Ramsar, por Acuerdo del Consejo de Ministros de 16 de Diciembre de 2005, como representación de los ecosistemas acuáticos de alta montaña mediterránea que presentan un excelente estado de conservación. Además, pertenecen al Inventario Nacional de Zonas Húmedas y al Catálogo de Embalses y Humedales de la Comunidad de Madrid cuyo Plan ha sido aprobado y publicado con fecha 18 de abril de 2020 (BOCM núm. 93) por DECRETO 26/2020, de 8 de abril, del Consejo de Gobierno, por el que se aprueba el Plan de Actuación sobre Humedales Catalogados de la Comunidad de Madrid. En el marco del Plan de Actuación de Humedales contenidos en dicho Catálogo se recogen objetivos generales de conservación y programa de actuaciones incluyendo medidas transversales de protección, uso público, seguimiento, control de la calidad de las aguas, etc. para cada humedal catalogado.

En el caso de los Humedales de Peñalara, los objetivos y actuaciones se han establecido siguiendo los criterios y directrices internacionales para la conservación de la diversidad biológica y el mantenimiento de los componentes, procesos y servicios de los ecosistemas, en el marco de las herramientas de gestión del Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama. Entre los objetivos específicos para este humedal se incluye el de dar continuidad a las líneas de trabajo y de investigación en curso relativas a la lucha contra enfermedades emergentes de anfibios. En este sentido, las enfermedades emergentes de anfibios se han convertido en la amenaza más preocupante para los anfibios de zonas protegidas y, especialmente, de zonas altas de montaña. Las poblaciones de anfibios y la incidencia de la quitridiomycosis se lleva estudiando en la Sierra de Guadarrama desde 1999 (Bosch et al., 2018). El declive del sapo partero común (*Alytes obstetricans*) en Peñalara fue el primer caso documentado de quitridiomycosis en Europa. La especie pasó en pocos años de ser una de las más abundantes del parque, donde se reproducía en al menos 35 masas de agua, a ser la más amenazada, desapareciendo del 86% de las masas de agua en sólo 3 años. En 2008, y ante la posibilidad real de la completa extinción de la población de sapo partero de Peñalara, se puso en marcha el Centro de Cría en Cautividad de Anfibios Amenazados de la Sierra de Guadarrama. A lo largo de estos años se han obtenido resultados muy valiosos para conocer los principales factores que determinan el progreso de esta enfermedad, y se han aplicado medidas pioneras para intentar proteger las poblaciones de anfibios, aunque sólo se ha conseguido paralizar momentáneamente o retrasar el progresivo declive de los anfibios en la Sierra de Guadarrama.

En el marco de la línea *Lucha contra enfermedades emergentes de anfibios* del apartado *mejoras para la fauna y la flora* del Programa de Actuaciones del Plan de Humedales (Decreto 26/2020, de 8 de abril, del Consejo de Gobierno, por el que se aprueba el Plan de Actuación sobre Humedales Catalogados de la Comunidad de Madrid), dentro del Programa de actuaciones para los Humedales del Macizo de Peñalara, y con el objetivo de defender las poblaciones de determinados anfibios en grave riesgo de desaparición del parque nacional, se planteó la

realización de tratamientos de desinfección de las larvas afectadas directamente en el medio natural, para lo cual se realizaría un ensayo en tres parejas de charcas del Macizo de Peñalara. Cada pareja está dividida en una charca experimental y una charca control, donde se trazan por un lado el efecto de una sustancia antifúngica sobre la prevalencia de la quitridiomycosis, y por otro lado que esta sustancia no afecta significativamente a los ecosistemas acuáticos donde se realiza el tratamiento. Este documento recoge los resultados relativos al estado de conservación de estos ecosistemas acuáticos durante la realización del experimento.

## 2. Metodología

### 2.1. Selección de charcas y fechas de muestreo

Para la realización del experimento se han seleccionado 3 parejas de charcas correspondientes a 3 sectores de humedales distintos (Figura 1). Cada pareja (charca control y charca experimental) se ha elegido buscando que fuesen similares en tamaño, profundidad, presencia de vegetación acuática y duración del hidroperíodo. Las parejas elegidas han sido:

- Sector Charca Larga y de Las Piedras:
  - XVI-01: Charca control
  - XVI-10: Charca experimental tratada con fungicida
- Sector Charcas Calamita:
  - XIX-07: Charca control
  - XIX-12: Charca experimental tratada con fungicida
- Sector Charcas de las Rocas:
  - XXIV-05: Charca control
  - XXIV-03: Charca experimental tratada con fungicida

El sector XVI (Charca Larga y de Las Piedras), consta de 24 charcas. Las seleccionadas tienen una superficie relativamente similar, de 16.9 m<sup>2</sup> (XVI-01) y 21.2 m<sup>2</sup> (XVI-10) y una forma aproximadamente rectangular (Figura 2). Están situadas a unos 2.112 m s.n.m. Son charcas bastante someras, con menos de 30 cm de profundidad. El camino a Pájaros pasa por este sector, aunque las charcas seleccionadas se encuentran en la parte más alejada a éste. Se tiene constancia de que es un sector bastante transitado por el ganado.

El sector XIX (Charcas Calamita), consta de 12 charcas. Las seleccionadas tienen una superficie similar, de 60.1 m<sup>2</sup> (XIX-07) y 69.5 m<sup>2</sup> (XVI-10) y una forma algo más irregular que las del sector anterior (Figura 3). Están situadas a unos 2.135 m s.n.m. Este sector está más alejado del camino y por ello apenas es transitado por los visitantes del parque. Tampoco se ha observado una intensa presencia del ganado. Es la pareja de charcas de mayor tamaño tanto por superficie como por profundidad (más de 40 cm), y probablemente por ello también son las de mayor duración del hidroperíodo.

Por último, el sector XXIV (Charcas de Las Rocas), consta también de 12 charcas. Las seleccionadas tienen una superficie relativamente similar, de 18.6 m<sup>2</sup> (XXIV-03) y 24.6 m<sup>2</sup> (XXIV-05). Están situadas a unos 2.142 m s.n.m. Ambas presentan una forma bastante irregular, muy elongada en el caso de XXIV-05 (Figura 4). A pesar de que este sector se encuentra bastante cerca del camino a Pájaros, las charcas son muy poco visibles y apenas recibe visitantes. Dado que la zona es bastante rocosa, tampoco se aprecia un uso ganadero relevante. Son bastante someras, con menos de 25 cm de profundidad. Su mayor interés radica en que es uno de los últimos sectores de donde desapareció el sapo partero debido a la quitridiomycosis.

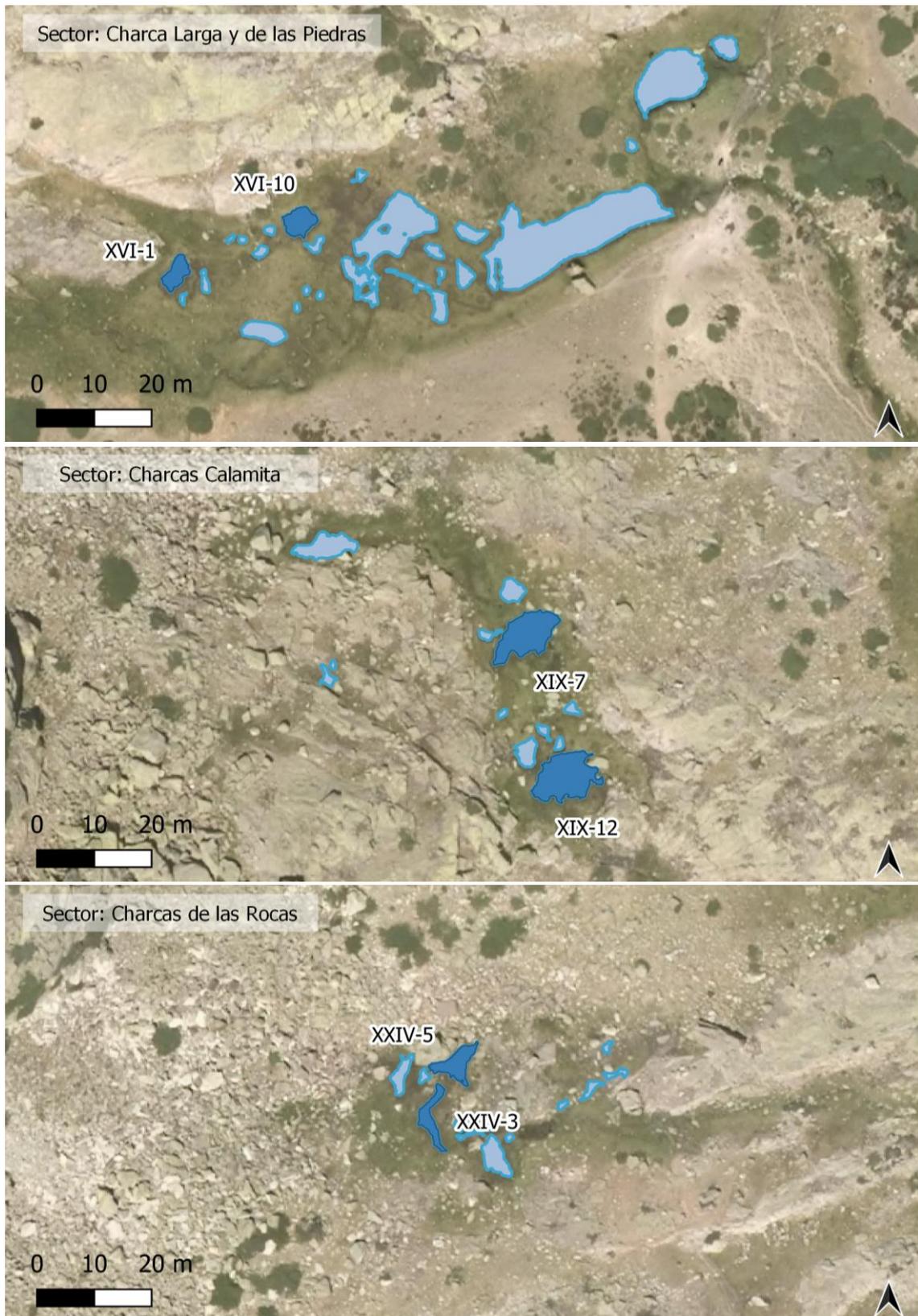


Figura 1. Ubicación de las charcas experimentales

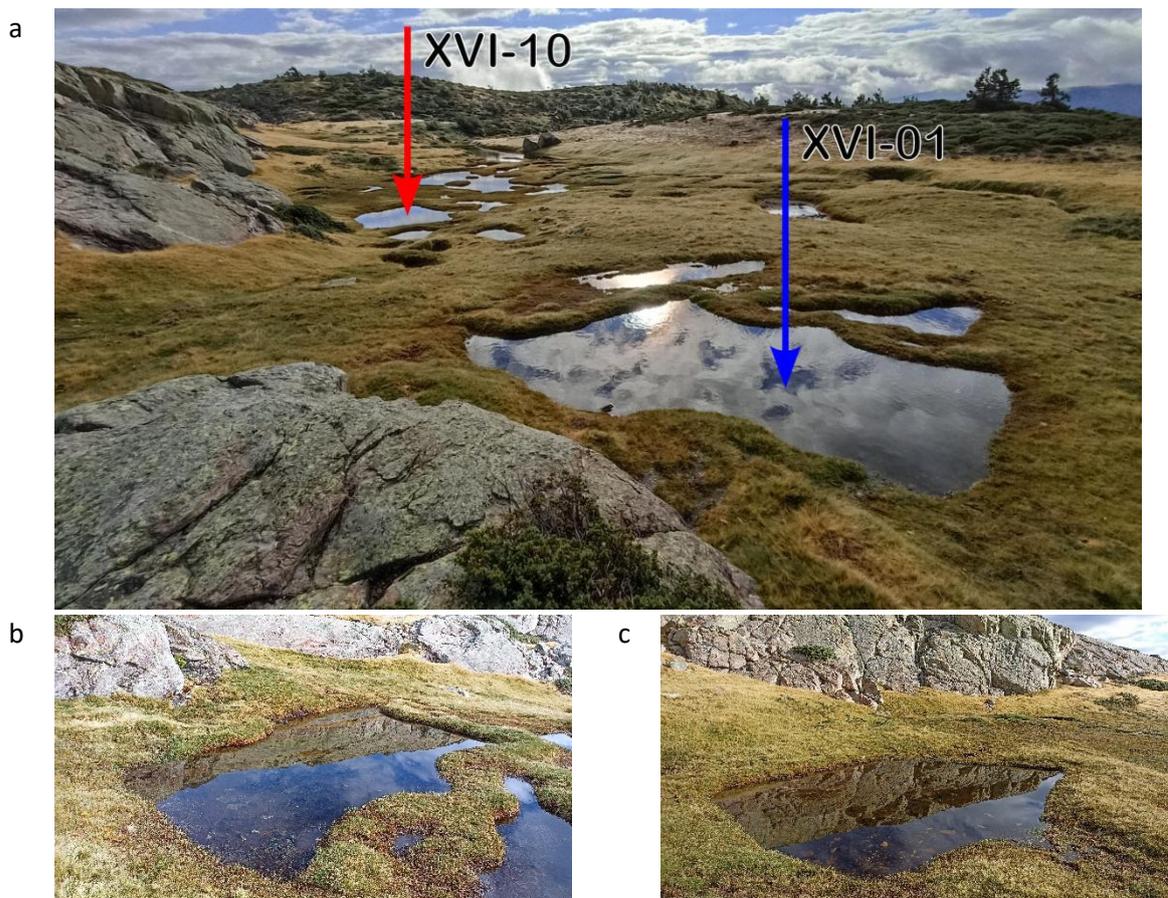


Figura 2. a) Disposición de las charcas seleccionadas en el sector XVI (Charca Larga y de Las Piedras). Flecha azul charca control, flecha roja charca tratada. b) Charca XVI-01. c) Charca XVI-10

El tratamiento experimental comenzó el 21/06/2021, fecha en la que se añadió el fungicida a las 3 charcas seleccionadas para el tratamiento experimental (t=día 1). Las charcas fueron visitadas nuevamente el 29/06/2021 (t=día 9) y el 13/07/2021 (t=día 23). Esa fue la última fecha conocida en la que todas las charcas se encontraban con agua. Posteriormente, se observó que el 22/7/2021 (t=31 días) la charca XXIV-03 se encontraba seca, y el 8/8/2021 (t=día 49) que también estaban secas las charcas XVI-01 y XVI-10. El 11/8/2021 (t=día 52), la charca XXIV-05 apenas tenía unos milímetros de agua, por lo que las DECOTABs (apartado 2.5) quedaban expuestas al aire. En todos estos casos en las que se encontraron charcas secas o prácticamente secas, lógicamente no se tomó ninguna muestra biológica o para hidroquímica pero sí se retiraron las DECOTABs para su posterior análisis en laboratorio. El 25/08/2021 (t=día 66) ante el inminente secado de las charcas se tomó una muestra para el análisis de tebuconazol y se retiraron las DECOTABs de las únicas charcas que aún tenían algo de agua (XIX-07 y XIX-12). Por último, el 20/09/2021 (t= día 92) se procedió a coger nuevas muestras de tebuconazol una vez llenas de agua las charcas tras unas intensas lluvias (Figura 8).

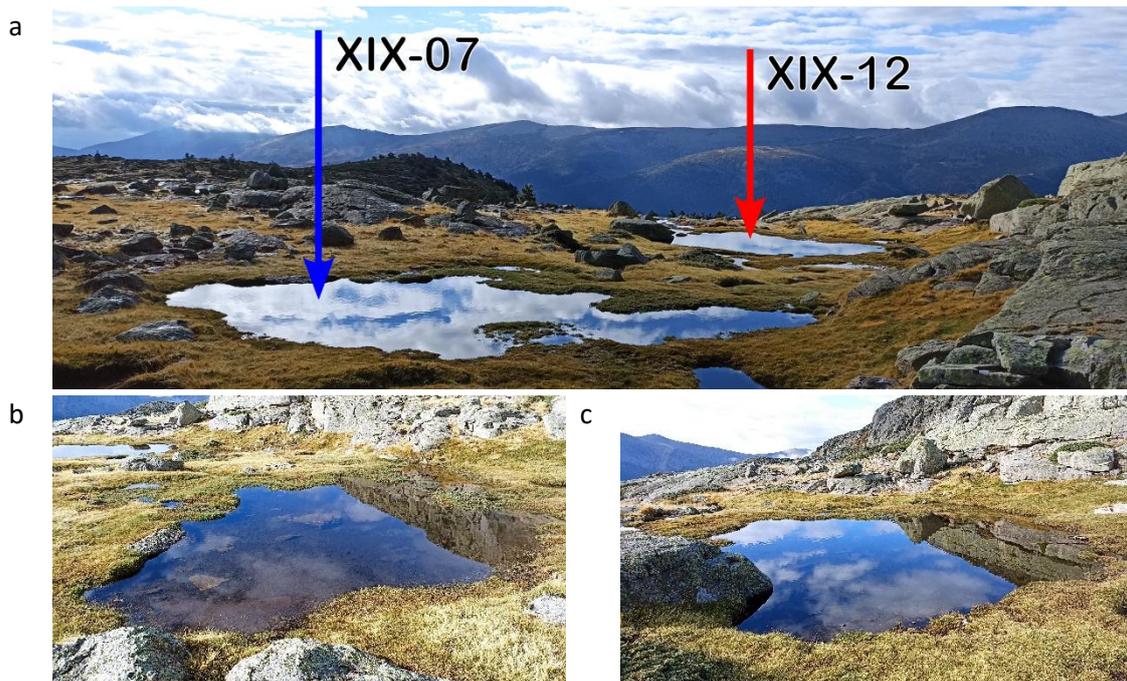


Figura 3. a) Disposición de las charcas seleccionadas en el sector XIX (Charcas Calamita). Flecha azul charca control, flecha roja charca tratada. b) Charca XIX-07. c) Charca XIX-12.

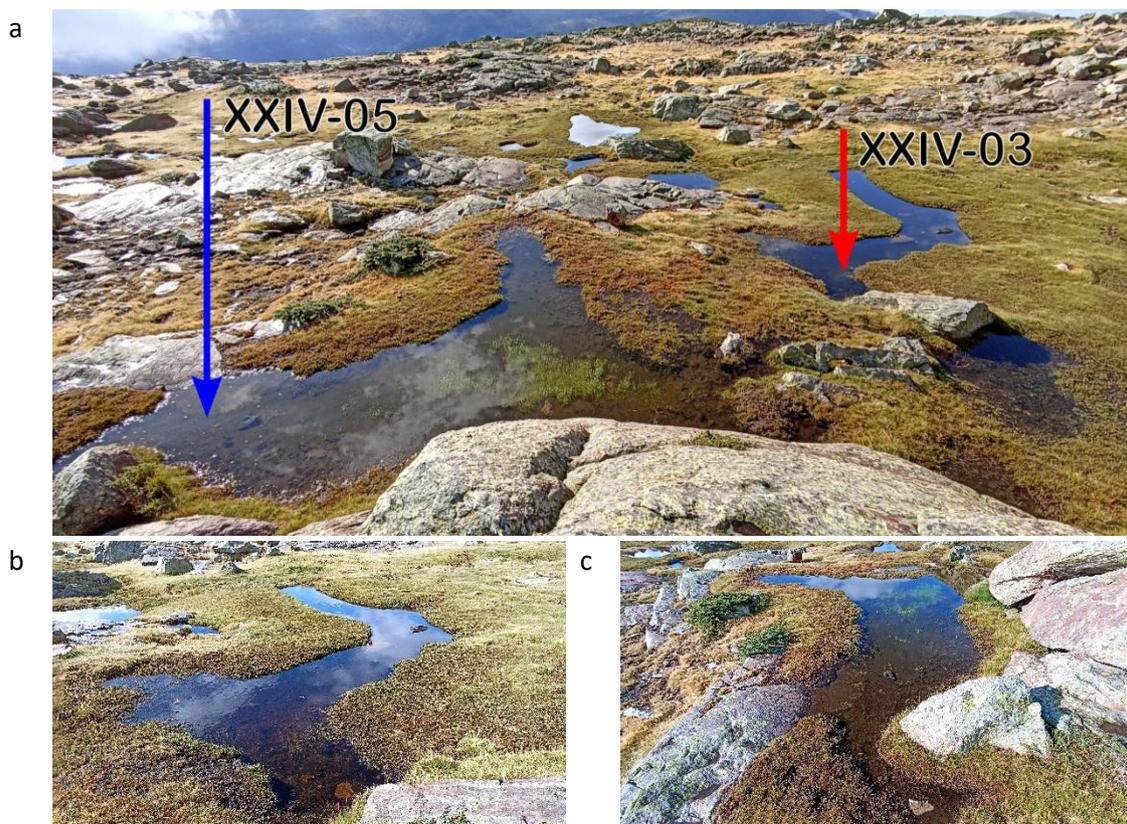


Figura 4. a) Disposición de las charcas seleccionadas en el sector XXIV (Charcas de Las Rocas). Flecha azul charca control, flecha roja charca tratada. b) Charca XXIV-03. c) Charca XXIV-05.

Es importante señalar que, aunque se ha intentado escoger charcas similares, cada una de ellas experimenta a lo largo del hidropereodo una evolución particular y no necesariamente las diferencias observadas entre charcas control y charcas experimentales deben atribuirse al tratamiento con fungicida. En este sentido, los resultados deben interpretarse en el contexto de los valores habituales encontrados en estos humedales someros de alta montaña (Toro y Granados, 1998; Granados, 2020)

Durante la primera campaña de campo (t=día 1), las muestras de hidroquímica se recogieron antes de la adición del fungicida para conocer el estado previo de las charcas, salvo en el caso de la muestra destinada a la determinación de la concentración de tebuconazol, que se recogió unos 15 minutos después de la adición cuando se consideró que ya se había producido una distribución homogénea del fungicida.

## 2.2. Tratamiento con fungicida

El tratamiento con fungicida consistió en la adición de tebuconazol buscando una concentración inicial objetivo de 500 µg/l, para lo cual se estimó el volumen de las charcas experimentales a partir de su superficie (Toro y Granados, 1998) y una profundidad media determinada a partir de 15 mediciones puntuales de la profundidad distribuidas al azar en cada charca. Durante los muestreos también se midió la profundidad máxima de cada charca.

## 2.3. Análisis hidroquímicos

Durante los muestreos se ha determinado *in situ* la temperatura, concentración de oxígeno disuelto y conductividad con una sonda multiparamétrica Aquaprobe® AP-5000 (Aquaread® Ltd, Inglaterra) calibrada para este tipo de agua y altitud.

Las muestras de agua se han tomado desde la orilla de cada charca y han sido transportadas al laboratorio en oscuridad y refrigeradas en neveras portátiles con acumuladores fríos. Salvo para el fósforo y nitrógeno total (TP y TN), las muestras han sido filtradas con un filtro de fibra de vidrio Whatman GF/C (0,7 µm de tamaño de poro). Las muestras se han analizado por orden de prioridad respecto a la capacidad de conservación del analito. En cualquier caso, el fósforo reactivo soluble, el amonio y el nitrito se han analizado en menos de 24 h. Los análisis en laboratorio se han basado en los métodos estándar (APHA-AWWA-WEF, 2017), generalmente utilizando métodos espectrofotométricos. Para el análisis de pigmentos fotosintéticos se han filtrado volúmenes conocidos de agua a través de un filtro Whatman GF/C. Dichos filtros se han introducido en viales Corning con 5 ml de acetona al 90%, y se han transportado refrigerados al laboratorio. Posteriormente se ha procedido a la cuantificación espectrofotométrica de los pigmentos (Jeffrey y Humphrey, 1975).

La metodología empleada en la caracterización físico-química se resume en la Tabla 1.

Tabla 1. Metodologías empleadas en los análisis físico-químicos.

Análisis	Método	Laboratorio
Temperatura	Electrometría	<i>in situ</i>
Conductividad	Electrometría	<i>in situ</i>
Oxígeno disuelto	Sensor óptico	<i>in situ</i>
Alcalinidad	Valoración ácido-base con indicador de pH	CISE
Nitratos	Espectrofotometría. Reducción con Cadmio.	CISE
Nitritos	Espectrofotometría. Método de diazotización.	CISE
Fósforo Reactivo soluble	Espectrofotometría. Azul de Molibdato.	CISE
Fósforo total	Espectrofotometría. Azul de Molibdato, digestión con persulfato	CISE
Nitrógeno total	Espectrofotometría (Digestión $K_2S_2O_8$ )	CISE
Tebuconazol	HPLC/MS/MS	CEDEX

Todos los análisis se han realizado en el laboratorio del Centro de Investigación, Seguimiento y Evaluación del Parque Nacional (CISE), salvo el tebuconazol, que ha sido analizado en el Laboratorio de Orgánicos del Centro de Estudios Hidrográficos del CEDEX.

#### 2.4. Determinaciones biológicas

Durante el muestreo del 23/07/2021 se recogió en todas las charcas (control y tratadas) una muestra de invertebrados bentónicos basado en el protocolo estándar en la determinación del estado ecológico de lagos (MAGRAMA, 2013a; b). Concretamente, en las tres parejas se recogió una muestra para conocer la riqueza de macroinvertebrados con un salabre (red de muestreo) de 250  $\mu\text{m}$  de luz de malla. Adicionalmente en la charcas XVI-01 y XVI-10 se tomó una muestra para la obtención de datos de abundancia de branquiópodos, copépodos y ostrácodos, en este caso con un salabre de 100  $\mu\text{m}$ . Durante la toma de muestras se empleó la misma unidad de esfuerzo en todas las charcas. Las muestras fueron fijadas en campo (con alcohol al 70% para macroinvertebrados y con unas gotas de Lugol para crustáceos), y posteriormente transportadas al laboratorio del CISE para su determinación taxonómica y cuantificación. Además, el 23/07/2021 también se tomó una muestra de fitoplancton en la charcas XVI-01 y XVI-10 para su determinación por parte del laboratorio del Centro de Estudios Hidrográficos del CEDEX (técnica de Utermöhl). El fitoplancton fue fijado en campo con una solución ácida de Lugol.

#### 2.5. DECOTABs

Desde un punto de vista funcional, los hongos tienen un importante papel en el proceso de descomposición de materia orgánica. Por ello, se ha diseñado un experimento con tabletas de descomposición y consumo (*Decomposition and Consumption Tablets, DECOTABs*), que permiten una estandarización mucho mejor y más controlada que las diversas fuentes naturales de materia orgánica (Kampfraath et al., 2012). Las DECOTABs se han fabricado en el laboratorio del Centro de Investigación (Figura 5) a partir de agar-agar y polvo de celulosa (Van der Lee et al., 2020), sin emplear sustancias químicas adicionales (antibióticos, MO natural, PUFA, ...).



Figura 5. Proceso de fabricación de las DECOTABs.

Las DECOTABs se deshidratan a 50 °C durante 48 horas y posteriormente se pesan en una balanza analítica (precisión  $\pm 0.1\text{mg}$ ) para determinar el peso seco inicial de cada una de ellas. Las DECOTABs se disponen en una estructura que permita sumergirlas en el fondo de las charcas de estudio, protegidas dentro de una bolsa fabricada con una red de 400  $\mu\text{m}$  (Figura 6) para evitar el posible consumo por parte de invertebrados y limitar la descomposición a procesos microbianos (hongos y bacterias).



Figura 6. Preparación de las DECOTABs para su instalación en campo.

Las DECOTABs se van progresivamente retirando de las charcas de estudio para evaluar la pérdida de peso a lo largo del tiempo, en este caso con un diseño experimental de 3 cohortes de 5 réplicas. Una vez en laboratorio, las DECOTABs son enjuagadas con agua destilada y se vuelven a pesar en la balanza analítica tras una nueva desecación a 50 °C durante dos días (Figura 7). El resultado se expresa como porcentaje restante de la masa original.



Figura 7. DECOTABs en la estufa de desecación tras haber permanecido en campo.

La pérdida de masa de las DECOTABs es una función del tiempo que llevan expuestas a las condiciones experimentales, y suele aproximarse a un modelo de decaimiento exponencial (Bärlocher, 2020):

$$M_t = M_0 \cdot e^{-kt}$$

Donde  $M_t$  es la masa en el tiempo  $t$ ,  $M_0$  es la masa al comienzo del experimento,  $K$  es el coeficiente de decaimiento exponencial y  $t$  es el tiempo en días. Se han propuesto modelos más complejos, que contemplan experimentos a largo plazo (años), dos compartimentos o tipos de materia orgánica y/o remanentes de materia orgánica no degradables. Para este estudio con DECOTABs (corto plazo, un único tipo de materia orgánica) el modelo de decaimiento exponencial es una muy buena aproximación. El ajuste del modelo exponencial se ha realizado mediante regresión no-lineal iterativa con el software CurveExpert® Basic 2.2.3.

El modelo de decaimiento exponencial puede convertirse a su forma lineal:

$$\ln[M_t] = \ln[M_0 \cdot e^{-kt}]$$

de manera que se puede emplear una regresión lineal de la forma:

$$Y = a + bX$$

Donde  $Y$  es la variable dependiente, correspondiente a  $M_t$ , la variable  $X$  equivale a los días transcurridos, la pendiente  $b$  es el coeficiente de decaimiento exponencial  $k$  y  $a$  es la masa calculada en el instante 0. Esta regresión lineal facilita en gran medida la comparación de las pendientes de cada recta de regresión, realizada utilizando R 4.0.5 (R Core Team, 2017) con el paquete EMMEANS (Lenth, 2021).

## 2.6. Análisis estadísticos

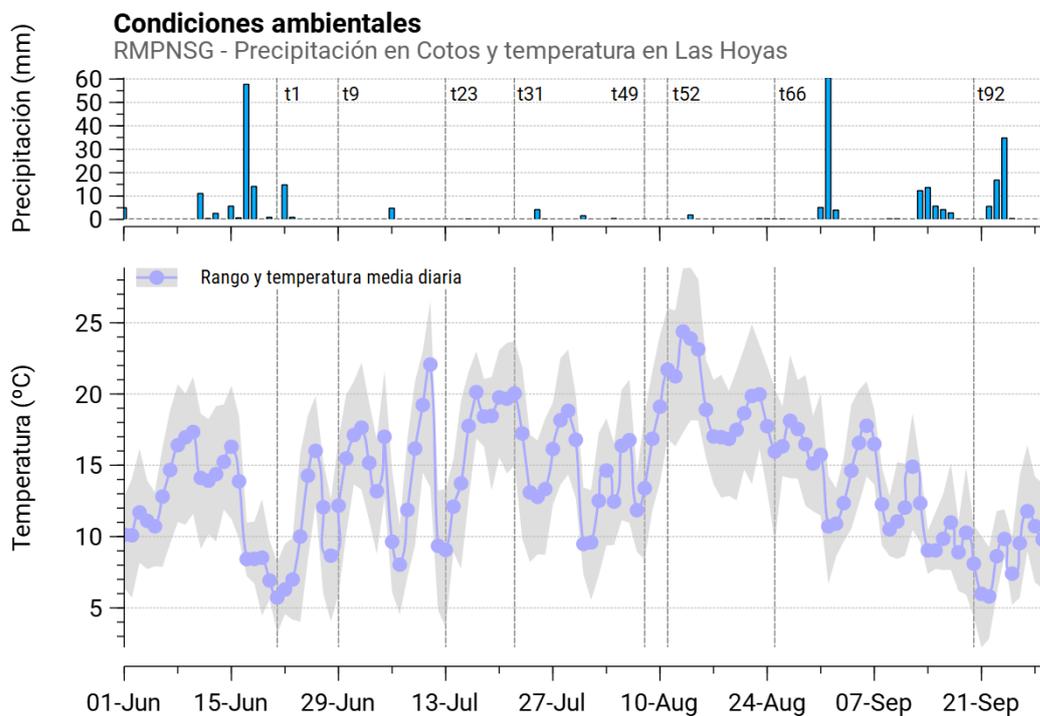
Cuando ha sido posible, se ha realizado un análisis de la varianza de medias repetidas (RM-ANOVA) para determinar si hay diferencias significativas entre las diferentes fechas de muestreo (tiempo), entre la aplicación de tebuconazol (tratamiento) o la interacción de estos dos factores. Se ha empleado R 4.0.5 (R Core Team, 2017).

La diversidad y dominancia de invertebrados acuáticos se ha calculado con *BPMSG Diversity Calculator Excel Template Version 2020-07-05*.

### 3. Resultados

#### 3.1. Condiciones ambientales

La Figura 8 muestra las condiciones meteorológicas a lo largo del experimento (junio-septiembre). El experimento tuvo que iniciarse pocos días después de unas intensas lluvias en el macizo, condicionado por el estado de desarrollo de las larvas de *Alytes obstetricans* que requería su traslado a las charcas experimentales sin mayor demora. Habría sido preferible dejar transcurrir unos días para dar mayor estabilidad a las charcas y, de hecho, justo después de la adición del fungicida se produjo también un episodio de lluvia. También hay que señalar que el inicio del experimento coincidió con un período especialmente frío para el mes de junio.



Fuente: CISE - RMPNSG

Figura 8. Precipitación diaria en el Puerto de Los Cotos (1.873 m s.n.m.) y temperatura en Las Hoyas (2.019 m s.n.m.) entre el 1 de junio y el 30 de septiembre de 2021. Las líneas verticales punteadas indican las fechas de trabajos de campo.

Junio fue un mes algo más húmedo de lo habitual (+40%), al igual que el mes de septiembre (+85%), mientras que julio y agosto fueron más secos de lo habitual. Así, entre el muestro t9 (29-jun) y el t66 (25-ago) apenas se registran precipitaciones y, en consecuencia, se produce gradualmente el vaciado de las charcas. Además, el mes de agosto fue claramente más cálido que la media de la serie histórica (+2.1°C), lo cual contribuyó también al proceso de secado de las charcas. En el resto de meses, las temperaturas medias mensuales estuvieron muy próximas a la media de la serie histórica (aunque con determinados episodios de bajada importante de

temperaturas). Las intensas precipitaciones desde finales de agosto ocasionaron que las charcas experimentales volvieran a tener agua de nuevo.

### 3.2. Tebuconazol

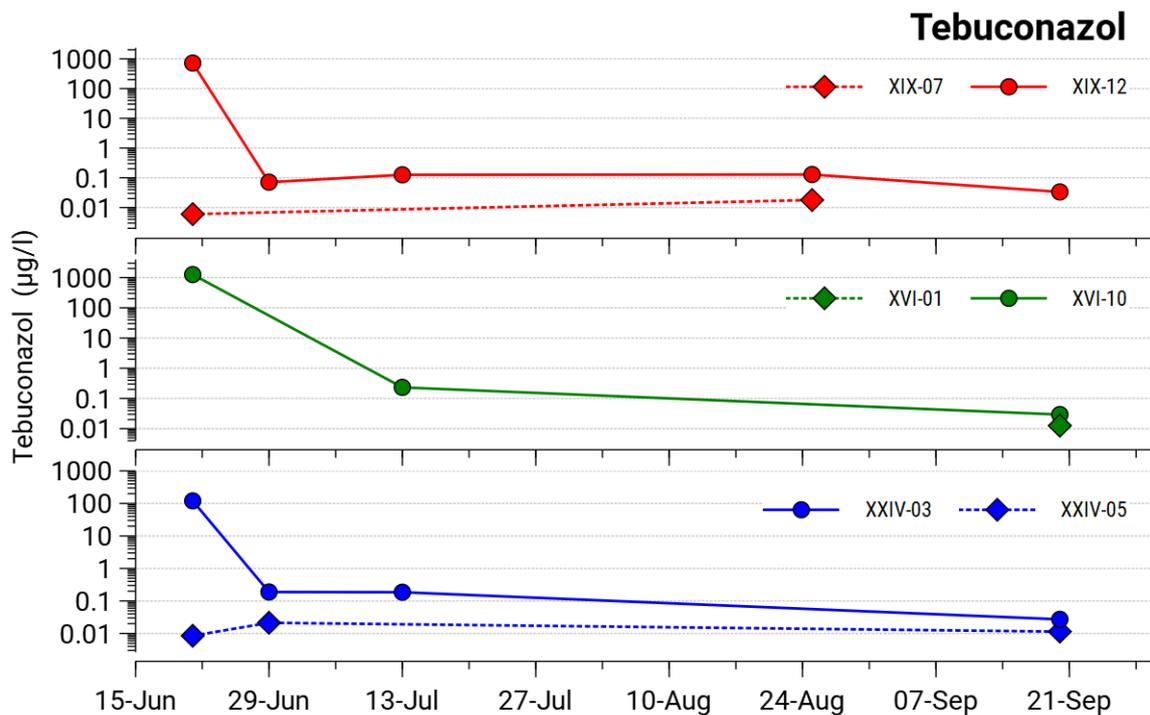
La Tabla 2 muestra la concentración de Tebuconazol encontrada en las charcas analizadas. La diferente distribución de muestras entre fechas y charcas es debido a la limitación del número total de muestras disponible, la prioridad de analizar las charcas tratadas, la disponibilidad de envases adecuados para el muestreo de POPs, el progresivo proceso de secado de las charcas y, en determinados casos, la pérdida accidental de la muestra durante las tareas de traslado al laboratorio.

Tabla 2. Concentración de tebuconazol en las charcas analizadas.

Fecha	Charca	Tratamiento	Tebuconazol (µg/l)	±
21/06/2021	XIX-07	Control	0.0060	0.0003
	XIX-12	Tratada	720	90
	XVI-01	Control	-	-
	XVI-10	Tratada	1260	90
	XXIV-05	Control	0.0085	0.0003
	XXIV-03	Tratada	120	30
29/06/2021	XIX-07	Control	-	-
	XIX-12	Tratada	0.0711	0.0065
	XVI-01	Control	-	-
	XVI-10	Tratada	-	-
	XXIV-05	Control	0.0213	0.0020
	XXIV-03	Tratada	0.1884	0.0135
13/07/2021	XIX-07	Control	-	-
	XIX-12	Tratada	0.1259	0.0108
	XVI-01	Control	-	-
	XVI-10	Tratada	0.2322	0.0197
	XXIV-05	Control	-	-
	XXIV-03	Tratada	0.1856	0.0354
25/08/2021	XIX-07	Control	0.0179	0.0008
	XIX-12	Tratada	0.1286	0.0128
20/09/2021	XIX-07	Control	-	-
	XIX-12	Tratada	0.0334	0.0036
	XVI-01	Control	0.0126	0.0010
	XVI-10	Tratada	0.0293	0.0025
	XXIV-05	Control	0.0114	0.0004
	XXIV-03	Tratada	0.0272	0.0010

La concentración inicial de tebuconazol se situó en el mismo orden de magnitud que la concentración objetivo (500 µg/l), con dos charcas por encima de esta concentración (XIX-12, 720 µg/l; XVI-10, 1260 µg/l) y una por debajo (XXIV-03, 120 µg/l) (Figura 9). Este primer muestreo permitió también determinar la concentración de fondo inicial de tebuconazol, a partir de los datos de las charcas control obtenidos antes de la adición del fungicida. Así, podemos fijar este fondo ambiental en los 6-9 ng/l.

8 días después de la adición del fungicida, en las charcas tratadas se había reducido la concentración de tebuconazol entre el 99.84 - 99.99%, hasta niveles ligeramente superiores al fondo ambiental determinado en el primer muestreo (71 – 188 ng/l). Por el contrario, la charca control analizada esa fecha (XXIV-05) aumentó su concentración de 8.5 a 21.3 ng/l, quizá como consecuencia de un cierto transporte (viento) entre la charca tratada y la charca control, ya que la variación del nivel de la charca XXIV-05 (Tabla 3) no parece suficiente para explicar un posible efecto de concentración por reducción del volumen de agua. En cualquier caso, hay que destacar que estas concentraciones en el orden de las decenas de ng/l son extraordinariamente bajas.



Fuente: CISE

Figura 9. Evolución de la concentración de tebuconazol en las charcas estudiadas (escala logarítmica). Cada sector se muestra en un color y las charcas tratadas se representan con un círculo y línea continua frente a las charcas control (rombo y línea punteada).

A largo plazo, tras volverse a llenar las charcas de agua se mantiene el patrón de una concentración de tebuconazol ligeramente mayor en las charcas tratadas (27-33 ng/l) que en las charcas control (11-12 ng/l), aunque en ambos casos con valores muy próximos al fondo ambiental obtenido al inicio del experimento. Es decir, se puede afirmar que a la semana de

realizar el tratamiento con fungicida apenas son observables niveles de fungicida superiores al fondo ambiental.

### 3.3. Físico-química

Las medidas de nivel máximo, temperatura y oxígeno disuelto realizadas *in situ* se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Nivel máximo, temperatura y oxígeno disuelto en las charcas estudiadas.

Fecha	Charca	Tratamiento	Nivel (cm)	Temp. (°C)	Oxígeno disuelto	
					(mg/l)	%
21/06/2021	XIX-07	Control	55	8.5	9.67	107.5
	XIX-12	Antes tratamiento	47	8.9	9.88	110.0
	XVI-01	Control	26	11.2	9.39	111.0
	XVI-10	Antes tratamiento	29	11.9	9.24	110.8
	XXIV-05	Control	25	7.5	9.79	106.5
	XXIV-03	Antes tratamiento	25	7.4	9.99	108.5
29/06/2021	XIX-07	Control	53	11.0	9.19	107.5
	XIX-12	Tratada	42	12.8	9.08	111.2
	XVI-01	Control	24	15.7	8.22	106.2
	XVI-10	Tratada	28	17.1	8.30	110.8
	XXIV-05	Control	23	11.8	8.52	101.8
	XXIV-03	Tratada	23	11.9	8.87	106.0
13/07/2021	XIX-07	Control	48	12.7	8.66	105.2
	XIX-12	Tratada	40	12.8	8.53	103.9
	XVI-01	Control	23	15.3	8.98	115.2
	XVI-10	Tratada	25	15.8	9.10	118.1
	XXIV-05	Control	21.5	11.2	9.19	107.8
	XXIV-03	Tratada	18	11.2	9.29	109.4

La temperatura es una variable clave en el desarrollo de las comunidades acuáticas, mientras que el oxígeno disuelto en el agua es consecuencia no solo del equilibrio físico-químico con la atmósfera, sino también de los procesos de producción-respiración en las charcas.

La Figura 10 muestra un diagrama de cajas para los valores de la temperatura y la saturación de oxígeno disuelto durante los primeros 3 muestreos (todas las charcas con agua) y agrupadas según el tratamiento recibido (control y adicción de tebuconazol).

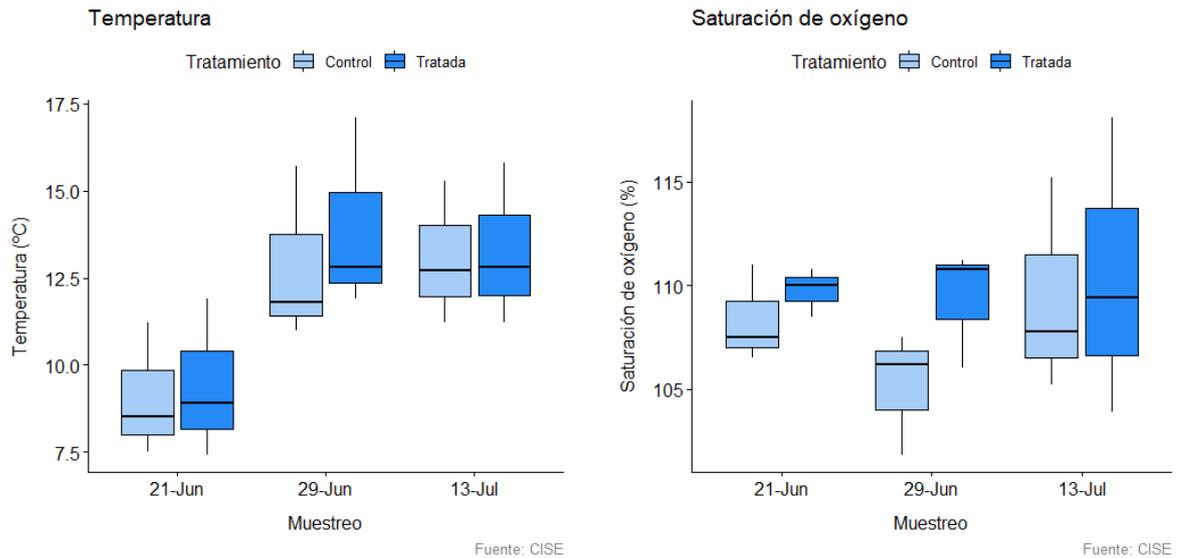
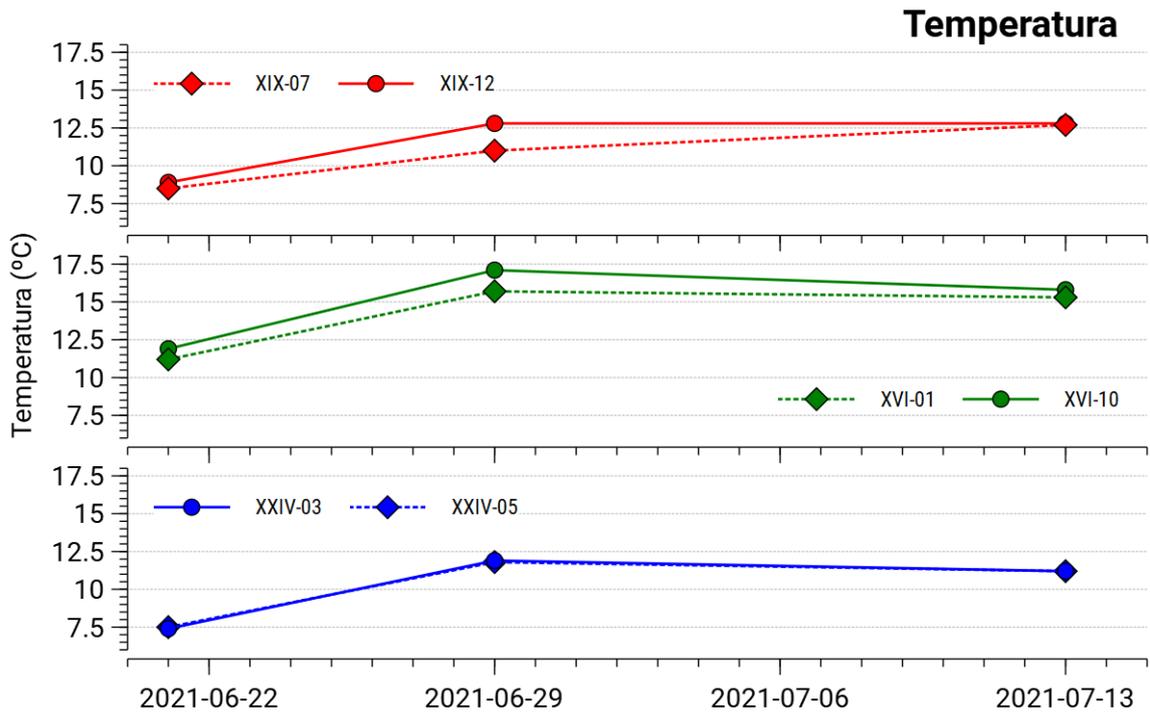


Figura 10. Diagrama de caja de la temperatura, la conductividad y la saturación de oxígeno disuelto en charcas control y charcas tratadas.

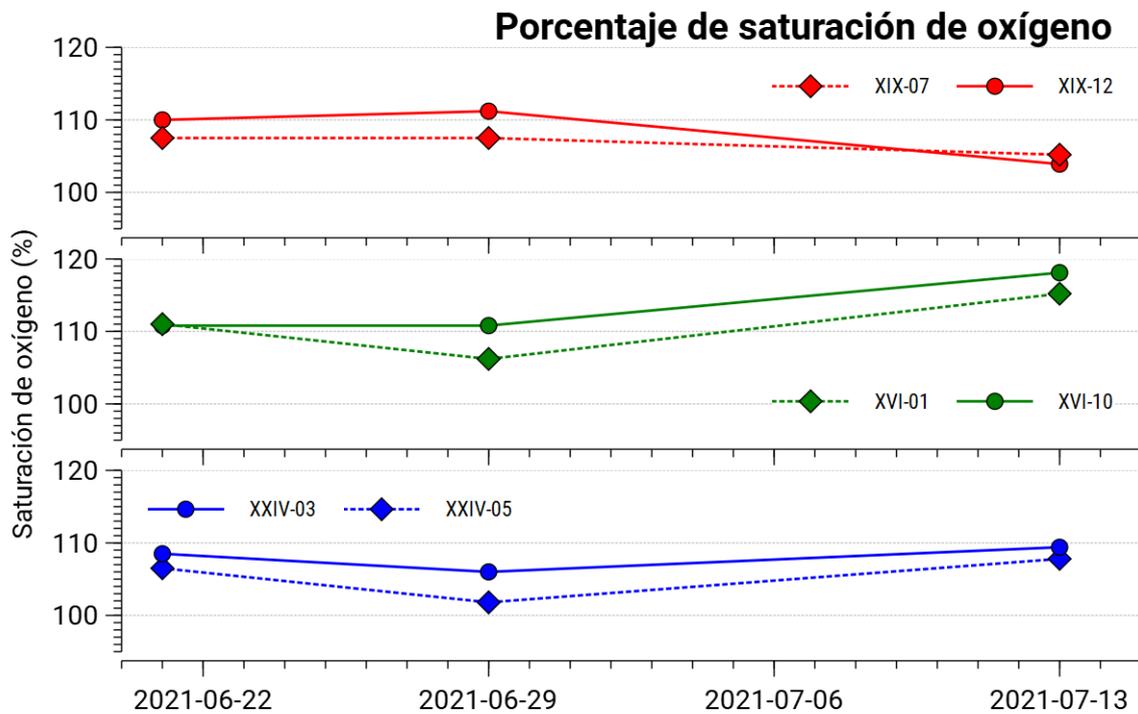
Se ha encontrado una diferencia significativa (RM-ANOVA,  $p < 0.05$ ) en la temperatura a lo largo del desarrollo del estudio (sin diferencias por tratamiento), consecuencia de las mayores temperaturas en los dos últimos muestreos (Figura 11) y que sugieren un escenario más estable y favorable para el desarrollo de las comunidades acuáticas según se van estableciendo las condiciones estivales antes de que las charcas lleguen a secarse. En cualquier caso, no cabría esperar ningún cambio en la temperatura del agua por el mero hecho del tratamiento con fungicida aunque, como se ha comentado, el conocer que estas diferencias no existen es imprescindible para interpretar el resto de parámetros físico-químicos y biológicos.

En la saturación de oxígeno disuelto no se han encontrado diferencias significativas entre las charcas control y las tratadas (RM-ANOVA,  $p > 0.05$ ) ni a lo largo del desarrollo del estudio. En el caso de la saturación de oxígeno, los valores registrados siempre se han situado por encima del 100% (Figura 12), es decir, predominando los procesos de producción primaria oxigénica sobre el consumo de materia orgánica. Este hecho sugiere, más allá de que no se hayan encontrado diferencias entre charcas tratadas y charcas control, que los procesos de producción primaria fitoplanctónica y fitobentónica, así como por parte de los macrófitos acuáticos en el último muestreo, se encontraban funcionando con normalidad. Los valores son ligeramente más elevados de los esperables para charcas oligotróficas, si bien los muestreos se realizaron en momentos en los que se producen valores elevados dentro del ciclo diario (horas centrales de la mañana).



Fuente: CISE

Figura 11. Evolución de la temperatura en las charcas estudiadas. Cada sector se muestra en un color y las charcas tratadas se representan con un círculo y línea continua frente a las charcas control (rombo y línea punteada).



Fuente: CISE

Figura 12. Evolución de la saturación de oxígeno disuelto en las charcas estudiadas. Cada sector se muestra en un color y las charcas tratadas se representan con un círculo y línea continua frente a las charcas control (rombo y línea punteada).

Los resultados analíticos de alcalinidad, conductividad, nitratos, nitritos, nitrógeno total y fósforo total se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Alcalinidad, conductividad, nitratos, nitritos, nitrógeno total y fósforo total en las charcas estudiadas.

Fecha	Charca	Tratamiento	Alc. ( $\mu\text{eq/l}$ )	Cond. ( $\mu\text{S/cm}$ )	$\text{NO}_3$ ( $\mu\text{g N/l}$ )	$\text{NO}_2$ ( $\mu\text{g N/l}$ )	TN ( $\mu\text{g N/l}$ )	PT ( $\mu\text{g P/l}$ )
21/06/2021	XIX-07	Control	16	4	2	3	186	0
	XIX-12	Antes tratamiento	24	4	28	1	99	1
	XVI-01	Control	20	9	0	7	181	0
	XVI-10	Antes tratamiento	36	8	5	1	466	1
	XXIV-05	Control	24	19	6	3	170	0
	XXIV-03	Antes tratamiento	16	12	6	1	225	2
29/06/2021	XIX-07	Control	40	4	4	1	142	2
	XIX-12	Tratada	52	3	6	1	66	2
	XVI-01	Control	48	14	3	1	235	4
	XVI-10	Tratada	48	8	4	1	657	12
	XXIV-05	Control	36	9	5	3	263	10
	XXIV-03	Tratada	36	6	9	2	449	7
13/07/2021	XIX-07	Control	44	3	9	3	203	25
	XIX-12	Tratada	32	5	10	4	290	35
	XVI-01	Control	56	11	5	2	301	11
	XVI-10	Tratada	36	12	6	1	816	19
	XXIV-05	Control	68	19	6	1	570	24
	XXIV-03	Tratada	48	10	7	1	1090	42

La Figura 13 muestra un diagrama de cajas para la concentración de alcalinidad, conductividad, nitrato, nitrito, nitrógeno total y fósforo total. Nuevamente aparecen agrupados por la fecha de muestreo y por el tratamiento experimental.

La alcalinidad refleja la capacidad tampón de estas pequeñas masas de agua. El fósforo reactivo soluble (no analizado) y el nitrato indican la disponibilidad de nutrientes de fácil acceso para los productores primarios, mientras que el nitrito suele ser un buen indicador de contaminación orgánica o de intensos procesos de metabolización de materia orgánica. Los niveles de fósforo y nitrógeno total son un buen indicador de la biomasa presente en el agua de las charcas.

Se ha encontrado una diferencia muy significativa (RM-ANOVA,  $p < 0.001$ ) en la alcalinidad a lo largo del desarrollo del estudio (sin diferencias por tratamiento) y una interacción débil entre tiempo y tratamiento ( $p < 0.1$ ). Es habitual en estos humedales que la alcalinidad aumente según baja la tasa de renovación o disminuye el volumen de la masa de agua, por lo que es un resultado coherente con lo esperado. Los valores obtenidos se sitúan en el rango bajo de los encontrados en el Macizo de Peñalara (Toro y Granados, 1998; Granados et al., 2006; Granados, 2020).

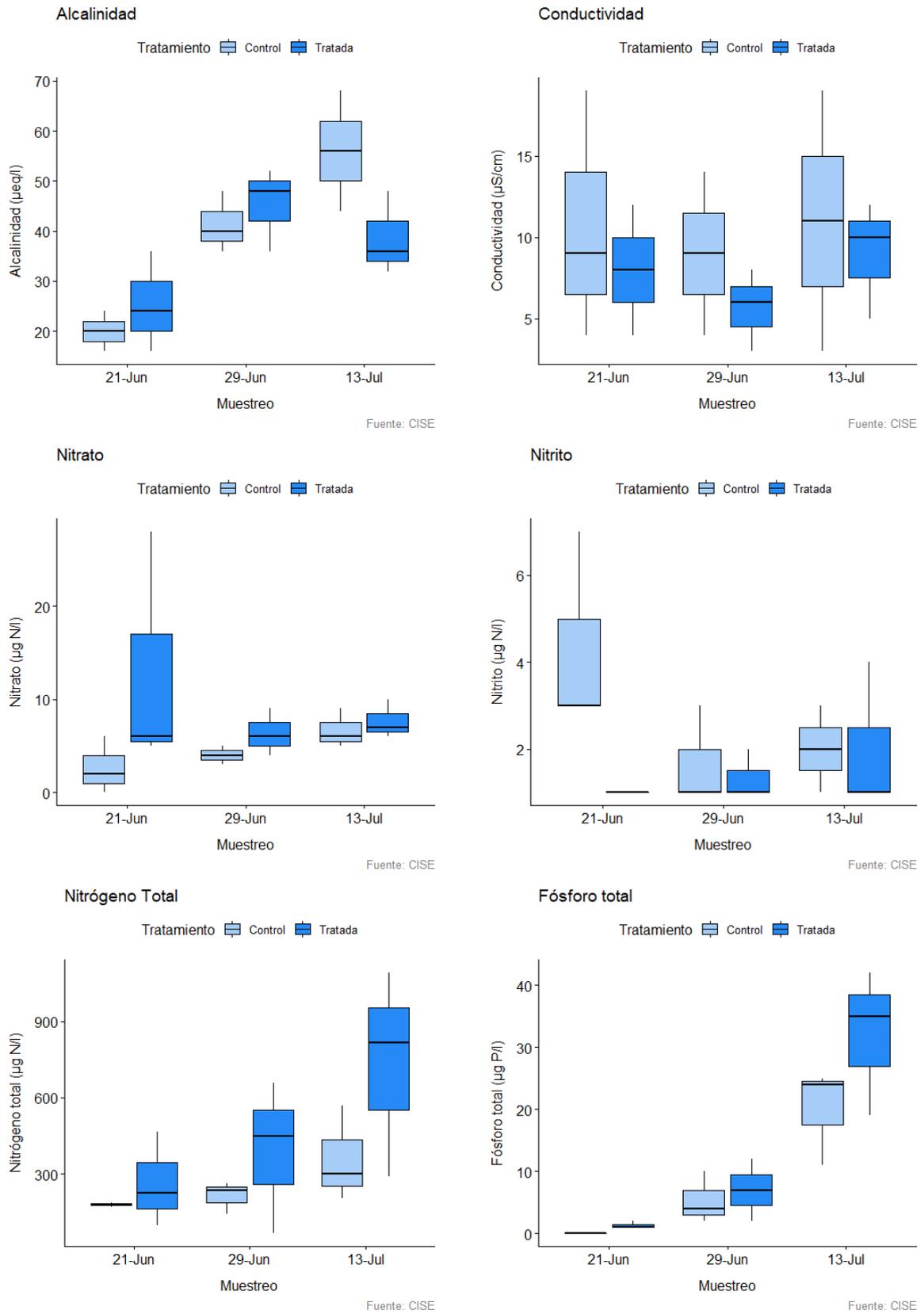
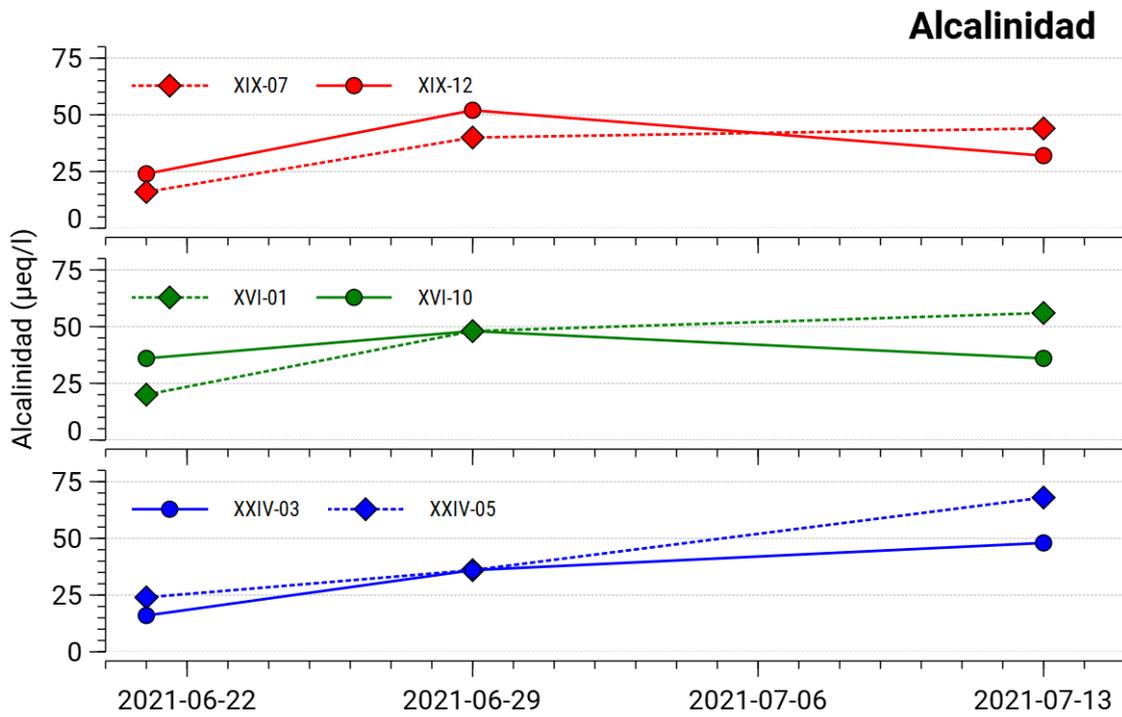


Figura 13. Diagrama de caja de la alcalinidad, conductividad, nitrato, nitrito, nitrógeno total y fósforo total.

En la conductividad no se han encontrado diferencias significativas entre las charcas control y las tratadas (RM-ANOVA,  $p > 0.05$ ) ni a lo largo del desarrollo del estudio. La conductividad se ha mantenido en niveles muy bajos ( $< 20 \mu\text{S}/\text{cm}$ , Figura 15), típico de estos humedales de alta montaña (Toro y Granados, 1998; Granados et al., 2006; Granados, 2020), y que en cierta medida condiciona la comunidad de organismos acuáticos a especies restringidas a aguas poco mineralizadas.

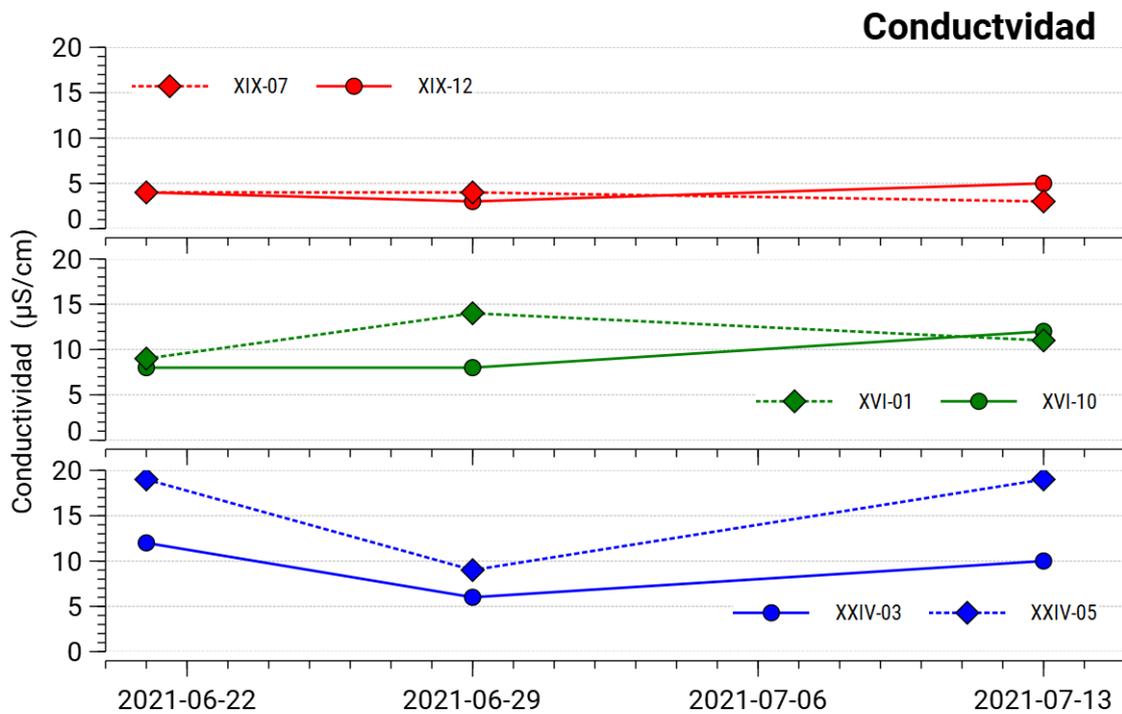
En cuanto al nitrato, tampoco se han encontrado diferencias significativas entre las charcas control y las tratadas (RM-ANOVA,  $p > 0.05$ ) ni a lo largo del desarrollo del estudio. En el caso del nitrito se ha obtenido una relación débil (RM-ANOVA,  $p < 0.1$ ) con el factor tratamiento, relacionado con unos niveles algo mayores (pero en cualquier caso muy bajos) en las charcas control durante el primer muestreo, por lo que en cualquier caso es descartable que pueda ser consecuencia del tratamiento con fungicida. Valores bajos de nitrito como estos (Figura 17) son los habituales en los humedales del Macizo de Peñalara, aunque los valores de nitrato (Figura 16) son muy bajos incluso para los valores habituales de este tipo de humedales.

Para el nitrógeno total se ha obtenido una relación débil (RM-ANOVA,  $p < 0.1$ ) tanto con el factor tratamiento como a lo largo del desarrollo del estudio. El nitrógeno total tiende a incrementarse con el tiempo, y parece hacerlo con mayor intensidad en las charcas tratadas. En el fósforo total se ha encontrado una diferencia muy significativa (RM-ANOVA,  $p < 0.001$ ) a lo largo del desarrollo del estudio (sin diferencias por tratamiento). Es decir, la concentración de fósforo total se ha incrementado claramente a lo largo del tiempo, pero no se han observado diferencias entre las charcas tratadas y las charcas control. Este incremento de nitrógeno total y fósforo total es muy habitual en estos ecosistemas acuáticos según se va produciendo un aumento del tiempo de residencia, un desarrollo de las comunidades planctónicas y una reducción del volumen de agua de la charca, por lo que también se descarta un efecto significativo sobre estos parámetros como consecuencia del tratamiento experimental. Los valores observados se sitúan en el rango medio o, en el último muestreo, en el rango medio-alto de los valores encontrados en el Macizo de Peñalara (Toro y Granados, 1998; Granados et al., 2006; Granados, 2020).



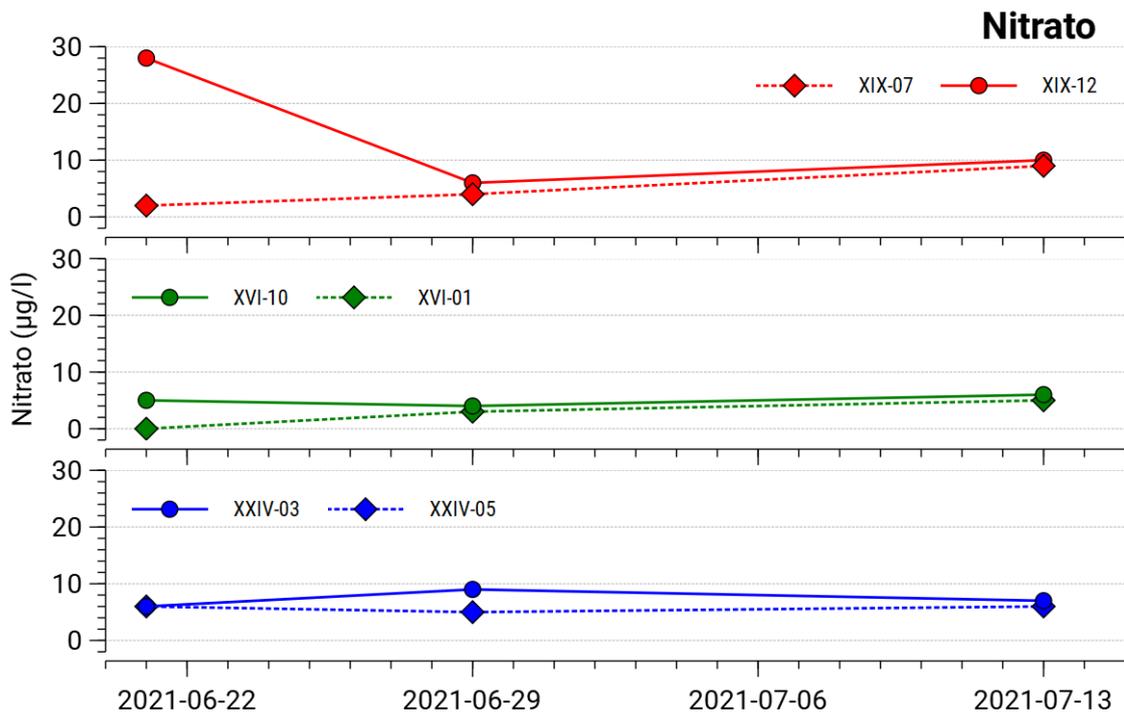
Fuente: CISE

Figura 14. Evolución de la alcalinidad en las charcas estudiadas. Cada sector se muestra en un color y las charcas tratadas se representan con un círculo y línea continua frente a las charcas control (rombo y línea punteada).



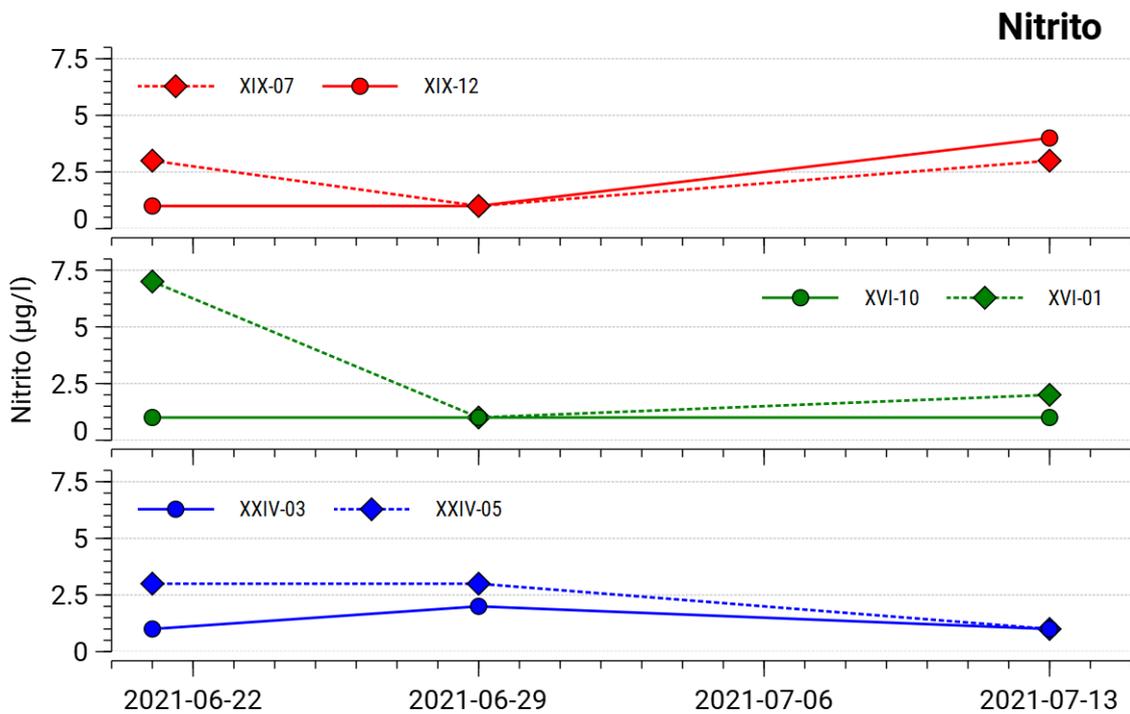
Fuente: CISE

Figura 15. Evolución de la conductividad en las charcas estudiadas. Cada sector se muestra en un color y las charcas tratadas se representan con un círculo y línea continua frente a las charcas control (rombo y línea punteada).



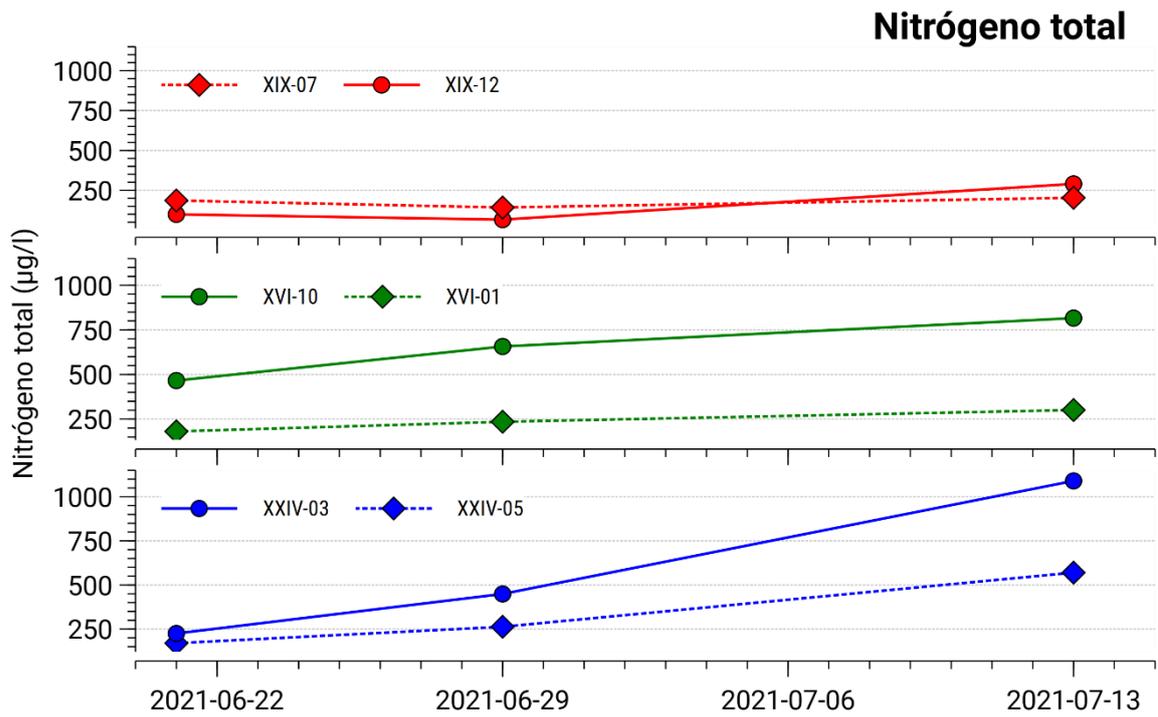
Fuente: CISE

Figura 16. Evolución del nitrato en las charcas estudiadas. Cada sector se muestra en un color y las charcas tratadas se representan con un círculo y línea continua frente a las charcas control (rombo y línea punteada).



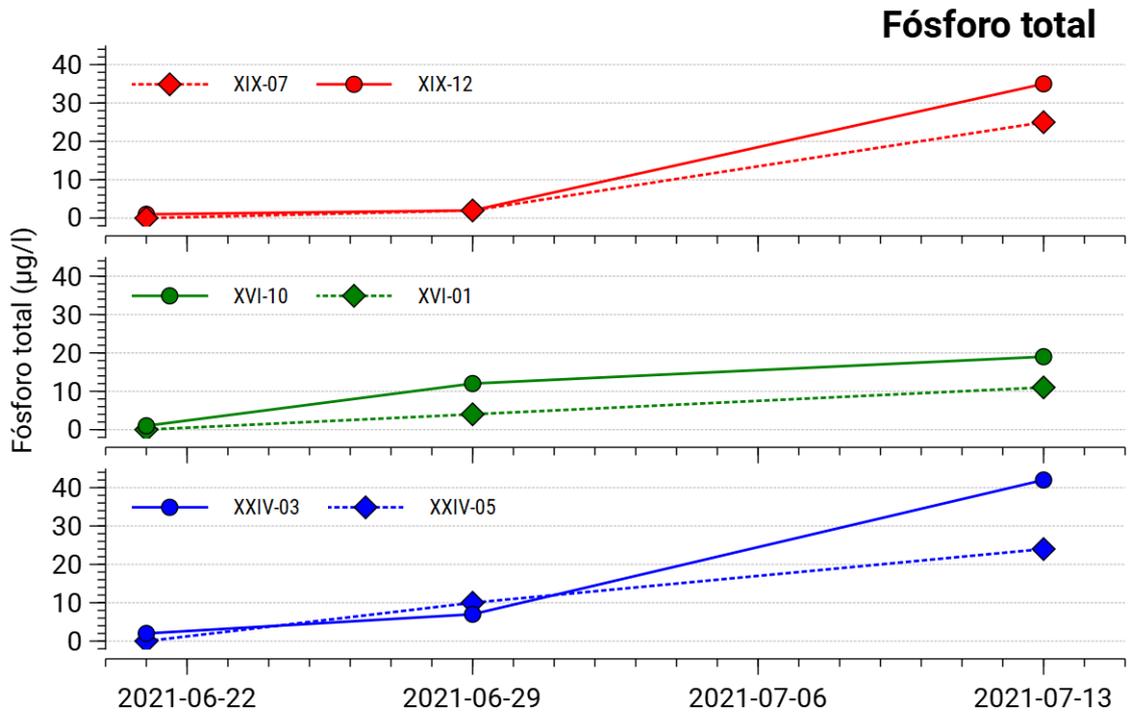
Fuente: CISE

Figura 17. Evolución del nitrito en las charcas estudiadas. Cada sector se muestra en un color y las charcas tratadas se representan con un círculo y línea continua frente a las charcas control (rombo y línea punteada).



Fuente: CISE

Figura 18. Evolución del nitrógeno total en las charcas estudiadas. Cada sector se muestra en un color y las charcas tratadas se representan con un círculo y línea continua frente a las charcas control (rombo y línea punteada).



Fuente: CISE

Figura 19. Evolución del fósforo total en las charcas estudiadas. Cada sector se muestra en un color y las charcas tratadas se representan con un círculo y línea continua frente a las charcas control (rombo y línea punteada).

### 3.4. Pigmentos fotosintéticos

La concentración de pigmentos fotosintéticos se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Concentración de pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, *b* y *c*) e índice de Margalef en las charcas experimentales.

Fecha	Charca	Tratamiento	Chl-a (µg/l)	Chl-b (µg/l)	Chl-c (µg/l)	Índice Margalef
21/06/2021	XIX-07	Control	1.75	0.00	0.00	2.13
	XIX-12	Antes tratamiento	1.31	0.03	0.05	2.39
	XVI-01	Control	1.90	0.00	0.19	2.18
	XVI-10	Antes tratamiento	0.48	0.00	0.00	2.14
	XXIV-05	Control	0.54	0.00	0.00	1.85
	XXIV-03	Antes tratamiento	0.51	0.02	0.00	2.57
29/06/2021	XIX-07	Control	0.85	0.01	0.26	2.09
	XIX-12	Tratada	0.60	0.13	0.00	2.17
	XVI-01	Control	1.75	0.00	0.32	3.73
	XVI-10	Tratada	0.56	0.09	0.00	2.77
	XXIV-05	Control	0.79	0.00	0.00	2.38
	XXIV-03	Tratada	1.13	0.00	0.07	2.88
13/07/2021	XIX-07	Control	1.93	0.46	0.80	2.62
	XIX-12	Tratada	3.34	0.93	1.05	2.23
	XVI-01	Control	1.92	0.80	0.45	2.63
	XVI-10	Tratada	2.13	0.14	0.15	2.35
	XXIV-05	Control	1.87	0.94	0.95	3.10
	XXIV-03	Tratada	3.92	0.68	0.88	2.92

La determinación de la concentración de clorofila *a* es una aproximación al desarrollo del fitoplancton en las charcas estudiadas, aunque no es posible establecer una relación directa con la biomasa. Este pigmento fotosintético es sin duda el más importante, aunque también se ha determinado la clorofila *b* y *c* como posible indicador de cambios en la comunidad fitoplanctónica entre las distintas charcas. También se ha calculado el Índice de Margalef (relación absorbancia 430/663 o carotenoides/clorofila), que suele informar del estado de madurez de la comunidad de fitoplancton.

La Figura 20 muestra un diagrama de cajas para los valores de los pigmentos durante los primeros 3 muestreos (todas las charcas con agua) conforme al tratamiento recibido. La evolución de la clorofila *a* se muestra en la Figura 21.

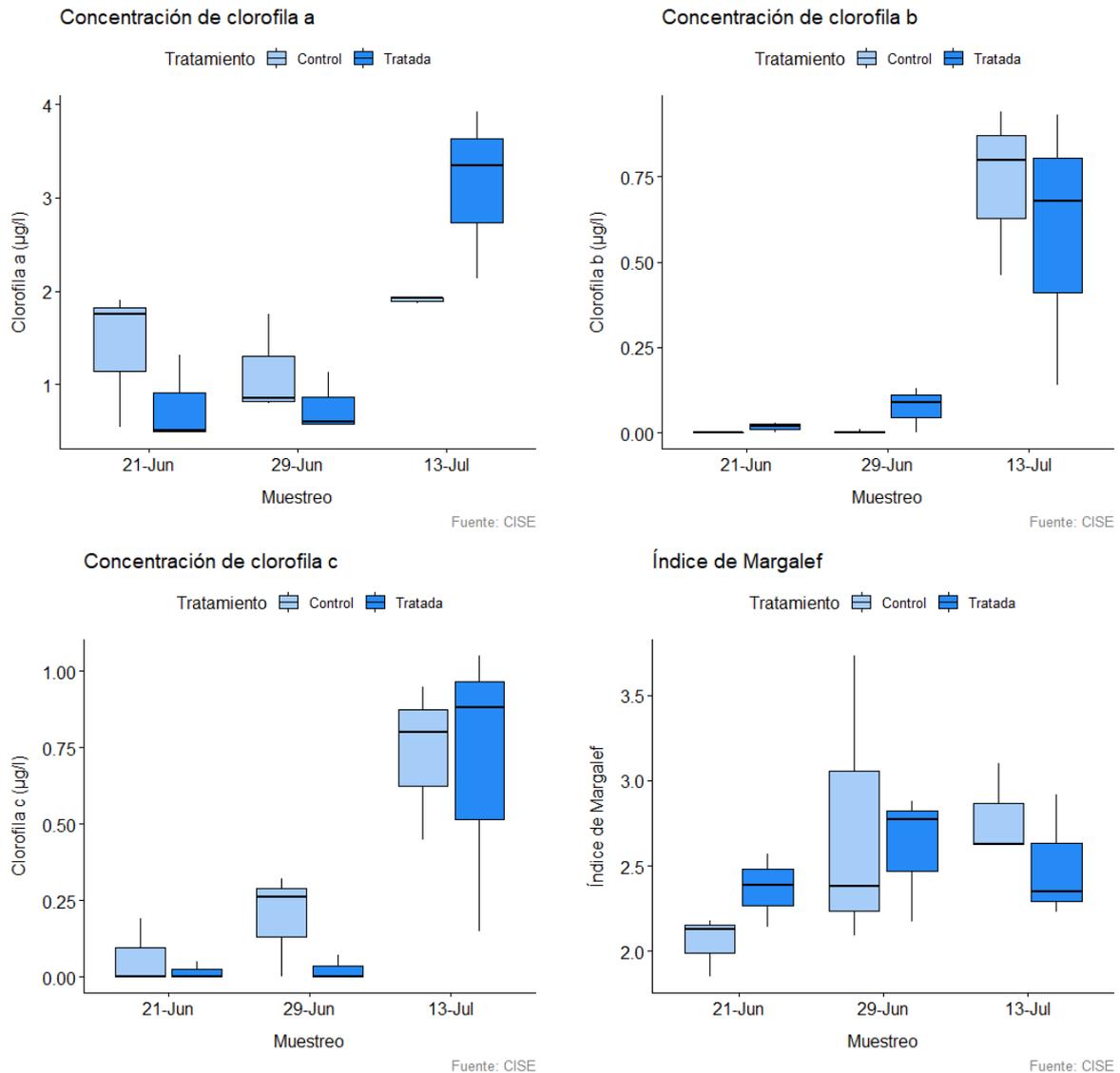


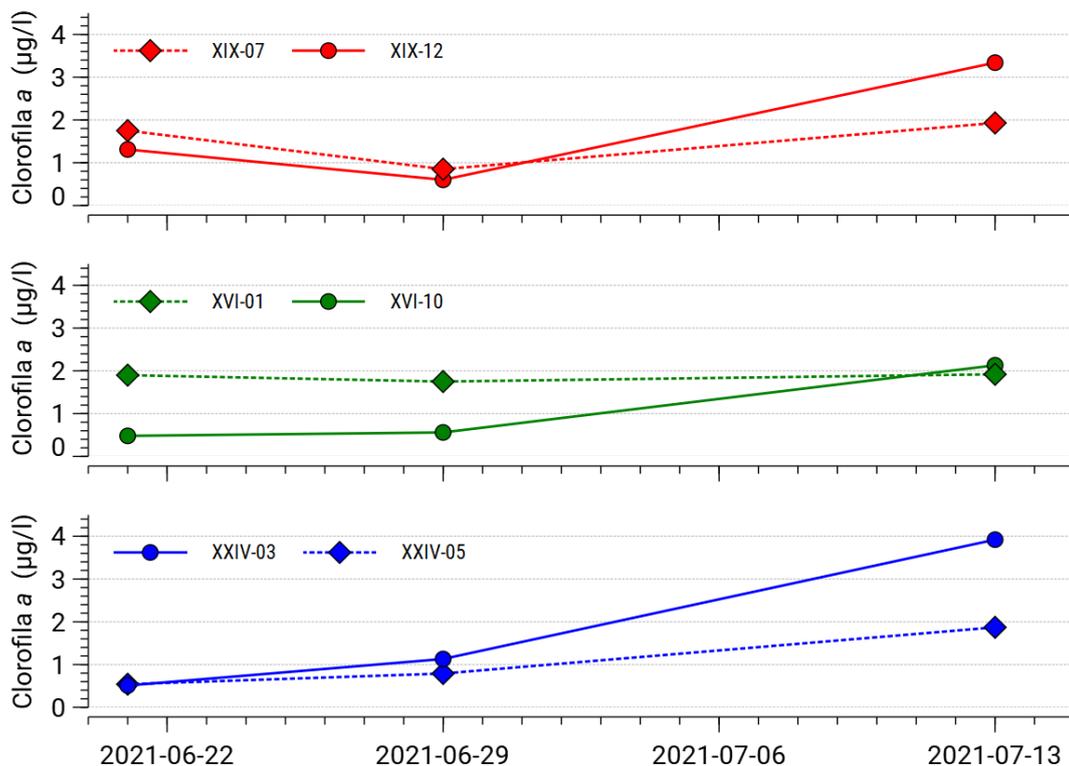
Figura 20. Diagrama de caja de la clorofila *a*, *b* y *c* y del índice de carotenoides en charcas control y charcas tratadas.

No se han encontrado diferencias significativas entre las charcas control y las tratadas para ninguno de los pigmentos (RM-ANOVA,  $p > 0.05$ ), aunque sí existen diferencias muy significativas para todos ellos a lo largo de los muestreos realizados (RM-ANOVA,  $p < 0.001$ ), derivada del hecho de que el muestreo de julio muestra valores claramente más altos en clorofila *a*, *b* y *c* como consecuencia del crecimiento de la comunidad de fitoplancton en unas condiciones más estables, mayor temperatura y un menor volumen de agua. Tan solo hay una interacción significativa (RM-ANOVA,  $p < 0.05$ ) entre el tiempo transcurrido y el tratamiento para la clorofila *a*, si bien es el grupo de charcas tratadas el que presenta mayor concentración de clorofila al final del estudio. Así, los valores encontrados se encontrarían en el rango de la oligotrofia ( $\leq 2.5$  µg/l) o ligeramente mesotrófico (OECD, 1982) en julio en dos de las charcas tratadas.

No existen diferencias en el índice de Margalef (RM-ANOVA,  $p > 0.05$ ) que puedan estar asociadas al tratamiento antifúngico realizado, ni tampoco a la evolución temporal de la charca o a una interacción de ambos factores. Los valores bajos de este índice parecen indicar una comunidad relativamente joven y poco madura, con un ligero incremento según transcurre el verano y que estaría en consonancia con unas condiciones más estables.

## Clorofila a

La clorofila a es el principal pigmento fotosintético presente en el fitoplancton.



Fuente: CISE

Figura 21. Evolución de la clorofila  $a$  en las charcas estudiadas. Cada sector se muestra en un color y las charcas tratadas se representan con un círculo y línea continua frente a las charcas control (rombo y línea punteada).

### 3.5. Biota

Los macroinvertebrados acuáticos de las charcas experimentales se muestran en la Tabla 6

Tabla 6. Número de individuos de macroinvertebrados por unidad de esfuerzo en las charcas el 13 de julio de 2021.

Orden	Familia	Especie	XIX-07	XIX-12	XVI-01	XVI-10	XXIV-03	XXIV-05
<b>Bivalvia</b>								
Veneroida								
	Sphaeriidae							
		<i>Pisidium casertanum</i> <sup>1</sup>	46	38	1			44
<b>Oligochaeta</b>								
		Oligochaeta indet <sup>1</sup>		16	1		2	16
<b>Insecta</b>								
Coleoptera								
Dytiscidae								
		<i>Agabus nebulosus</i> <sup>2</sup>	2	1	4	1	1	
		<i>Agabus bipustulatus</i> <sup>2</sup>	5				9	
		<i>Agabus</i> sp. <sup>1</sup>					1	
		<i>Dytiscus marginalis</i> <sup>1,2</sup>				2	2	
		<i>Dytiscus</i> sp. <sup>1</sup>		6	1			1
		<i>Hydroporus</i> sp. <sup>1,2</sup>		2	3		1	
Elmidae								
		<i>Oulimnius</i> sp. <sup>1</sup>		3				
Helophoridae								
		<i>Helophorus</i> sp. <sup>2</sup>	5	14	9	16	16	4
Hydrophilidae								
		<i>Helochaeres</i> sp. <sup>2</sup>				1		1
		Hydrophilidae indet. <sup>1</sup>		2		2		
Diptera								
Chironomidae								
		Chironomidae indet. <sup>1</sup>	208	264	264	96	224	210
Culicidae								
		<i>Culex</i> sp. <sup>1</sup>					16	
Ephemeroptera								
Baetidae								
		<i>Cloeon dipterum</i> <sup>1</sup>		1				1
Heteroptera								
Corixidae								
		<i>Micronecta</i> sp. <sup>1</sup>	1	2				
		<i>Sigara nigrolineata</i> <sup>2</sup>			1			1
		<i>Sigara</i> sp. <sup>1,2</sup>	2	1	24			
		Corixidae indet. <sup>1</sup>			28	48	28	44
Gerridae								
		<i>Gerris thoracicus</i> <sup>2</sup>				2		3
		<i>Gerris</i> sp. <sup>1</sup>	1					
Notonectidae								
		<i>Notonecta glauca</i> <sup>2</sup>	1		1			
		<i>Notonecta maculata</i> <sup>2</sup>		1	1		2	
		<i>Notonecta</i> sp. <sup>1</sup>	1	2	18	2	2	
Odonata								
Libellulidae								
		<i>Sympetrum</i> sp. <sup>1</sup>			3	10	2	1

<sup>1</sup>Larvas. <sup>2</sup>Adultos.

En términos de densidad relativa, la familia de los quironómidos es el taxón más abundante, oscilando entre el 53 y 76%. Se trata de dípteros que, en general, suponen escasa biomasa dado el pequeño tamaño de los taxones presentes. Por el contrario, los coleópteros están dominados por especies de gran tamaño y constituyen uno de los órdenes más diversos. Cuenta con la presencia de especies cosmopolitas como *Agabus bipustulatus*, o *A. nebulosus*, además del ditíscido *Dytiscus marginalis*. Esta última es la especie de invertebrado de mayor tamaño, y se distribuye en la mitad norte peninsular generalmente asociada a zonas de montaña. Esta especie se ha localizado, en estado adulto, únicamente en dos charcas tratadas: XVI-10 y XXIV-3.

Otro orden muy diverso, y el segundo en términos de abundancia y densidad relativa, son los heterópteros. En general, las especies presentes son típicas en los humedales de montaña. El taxón más abundante ha sido el género *Sigara* sp., de hábitos filtradores, a diferencia del otro género dominante, *Notonecta*, sp., de hábitos depredadores.

Es destacable igualmente el molusco *Pisidium casertanum*, que está ausente en dos charcas tratadas (sectores XVI y XXIV) y está presente en las charcas no tratadas. Sin embargo, en el sector XIX sí está presente en densidades elevadas en las dos charcas, tanto la tratada, como la no tratada con tebuconazol por lo que no se pueden atribuir diferencias evidentes debido al tebuconazol.

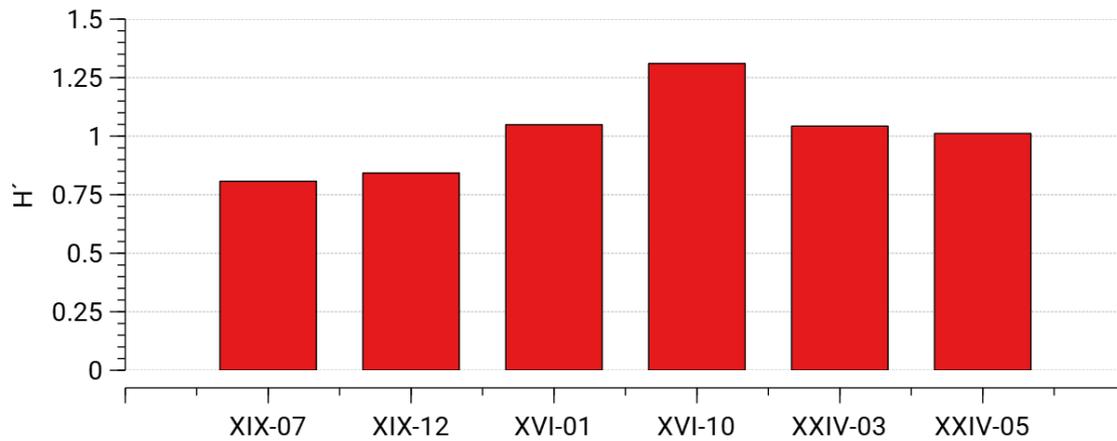
También se ha observado la presencia de odonatos indistintamente en charcas tratadas o charcas control, aunque están ausentes de uno de los sectores (Charcas Calamita).

La Figura 22 muestra la biodiversidad de macroinvertebrados acuáticos encontrados en las charcas experimentales durante el muestreo del 13 de julio de 2021. Hay que señalar que la diversidad real tiene que ser necesariamente mayor, ya que algunos de los grupos taxonómicos solo se han considerado a nivel de orden o familia, pero en cualquier caso esta resolución taxonómica permite comparar la biodiversidad entre las distintas charcas estudiadas. Por esta razón, la diversidad observada es relativamente baja (<1.35). Esto se debe fundamentalmente a la fuerte dominancia de los quironómidos, que se han tratado aquí a nivel de familia por la dificultad de su determinación a nivel de especie aunque se tiene constancia de que en el Macizo de Peñalara hay más de 20 especies. Esto genera que el índice de dominancia de Simpson sea mayor o igual a 0.5 en todas las charcas, salvo en XVI-10 en la que baja a 0.367. En general, la diversidad- $\alpha$  es bastante similar cuando se comparan las distintas parejas de charca tratada y control, estando la mayor diferencia precisamente entre las charcas XVI-01 ( $H' = 1.049$ ) y XVI-10 ( $H' = 1.311$ ). Es más, la diversidad- $\beta$  que calcula el grado de diversidad que presentan las distintas charcas entre sí es muy baja, con un valor de 0.197. O lo que es lo mismo, todas las charcas (tratadas o no) son bastante similares en cuanto a diversidad de macroinvertebrados acuáticos.

En definitiva, el listado de especies y los valores de biodiversidad de macroinvertebrados acuáticos no indican que el tratamiento con tebuconazol haya implicado algún impacto significativo sobre ésta comunidad.

## Índice de Shannon

Biodiversidad de táxones de macroinvertebrados acuáticos (13/07/2021)



Fuente: CISE.

Figura 22. Índice de Shannon (diversidad- $\alpha$ ) que indica la biodiversidad de macroinvertebrados acuáticos encontrados las charcas experimentales el 13 de julio de 2021.

La Tabla 7 presenta el número de individuos de crustáceos zooplanctónicos por unidad de esfuerzo para obtener el índice ABCO en las charcas XVI-01 y XVI-10 el 13/07/2021.

Tabla 7. Número de individuos de zooplancton por unidad de esfuerzo en dos de las charcas el 13 de julio de 2021.

Especie	ID TAXAGUA	XVI-01	XVI-10
<i>Ceriodapnia reticulata</i>	CER023RET027	640	2925
<i>Chydorus sphaericus</i>	CHY001SPH037	24	-
<i>Tropocyclops prasinus</i>	TRO009PRA056	8	194
<i>Chirocephalus diaphanus</i>	CHI009DIA028	-	6

Todas estas especies ya eran conocidas del macizo de Peñalara (Toro y Granados, 1998; Granados et al., 2006). De acuerdo con el listado y distribución conocida de los crustáceos de la Comunidad de Madrid (Bravo Utrera y Baltanás, 2020), *Chydorus sphaericus* aparece ambientes someros así como en la zona litoral de las grandes masas de agua. Sólo aparece, aunque con una proporción baja, en una de las dos charcas (control). *Chydorus sphaericus* es una de las especies consideradas como indicadoras de las condiciones de buena calidad ecológica en las masas de agua de alta montaña (MAGRAMA, 2013b), si bien la aplicación de los índices oficiales del establecimiento de la calidad ecológica presentan graves problemas para su aplicación al Macizo de Peñalara.

El otro cladóceros encontrado, *Ceriodapnia reticulata*, aparece en ambas charcas, aunque en una de ellas (tratada) en una densidad aproximadamente 6 veces mayor que en la otra. También aparece en ambas charcas el copépodo *Tropocyclops prasinus* que, curiosamente, en la Comunidad de Madrid se le asocia principalmente a lagunas de profundidad media o alta (Bravo Utrera y Baltanás, 2020). Además, aparecen algunos ejemplares del anostráceo *Chirocephalus*

*diaphanus* cuya presencia se asocia a charcas temporales poco mineralizadas a cualquier altitud en la provincia de Madrid (Bravo Utrera y Baltanás, 2020). Aparece en la charca tratada XVI-10.

Del análisis de la comunidad zooplanctónica se deduce que el tratamiento con fungicida no ha tenido un efecto de gran impacto para esta comunidad, si bien queda la duda de si la presencia de una especie sensible y característica de las masas de agua de alta montaña solamente en la charca control podría tener relación con el tratamiento experimental. Realmente no es extraño encontrar diferencias en la composición del zooplancton incluso entre charcas muy cercanas.

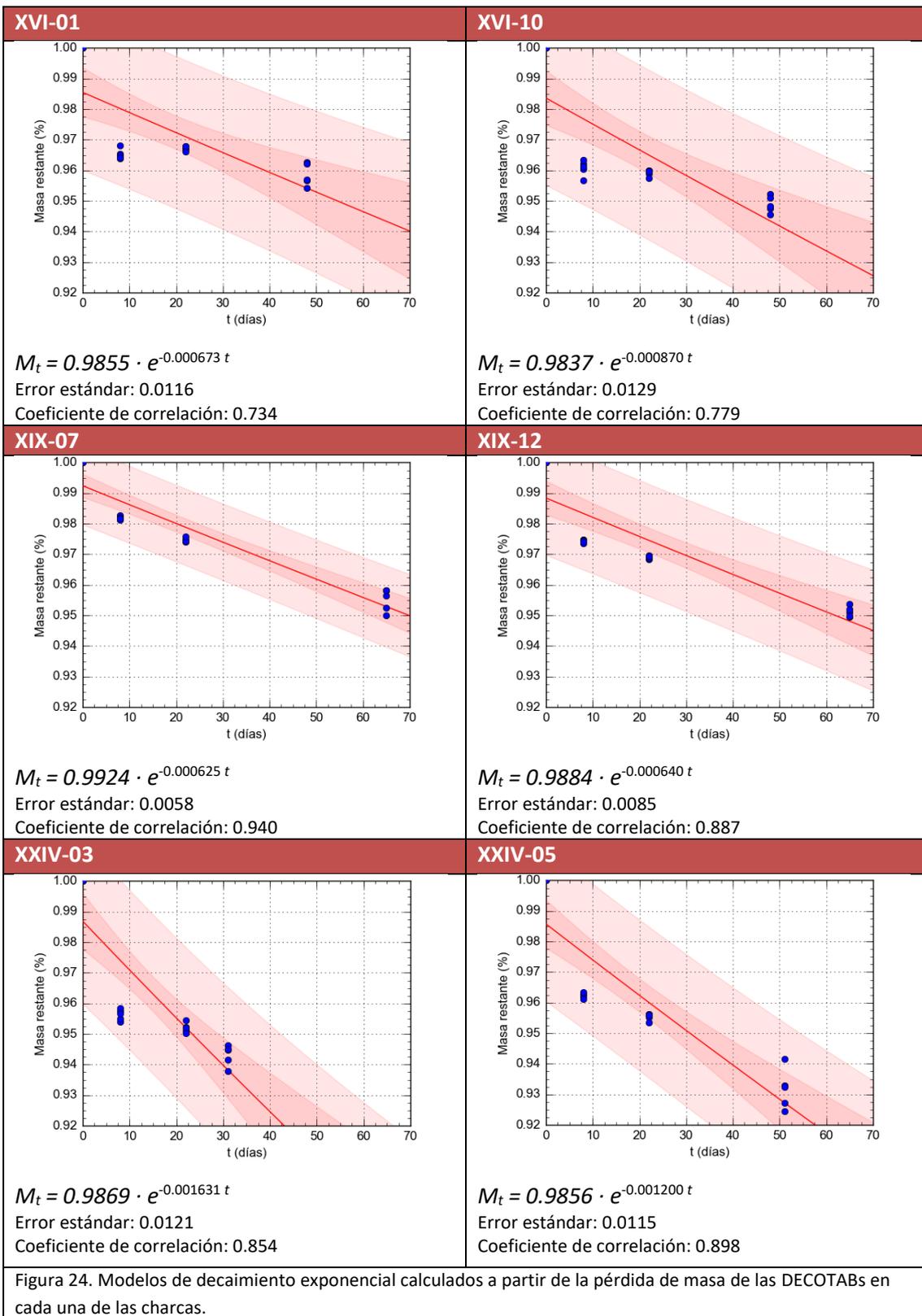
### 3.6. DECOTABs

Como se ha comentado en el apartado 2.5, las DECOTABs (*Decomposition and Consumption Tablets*) son pastillas estandarizadas compuestas por celulosa y agar-agar que al colocarlas en las charcas (Figura 23) durante un tiempo relativamente prologado permiten estudiar el proceso de descomposición microbiana de la materia orgánica.



Figura 23. Sistema de incubación de las DECOTABs en las charcas experimentales, que permite ir retirando secuencialmente un número determinado de réplicas para determinar la pérdida de peso debido a la descomposición microbiana.

La Figura 24 muestra los resultados de los modelos de decaimiento exponencial calculados para cada una de las charcas a partir de la pérdida de peso observada en las DECOTABs.



En todos los modelos la masa inicial calculada es ligeramente menor del 100% ( $p < 0.05$ ), aunque claramente dentro del rango esperado para este tipo de ajustes de decaimiento exponencial (95-105%). Cuando la masa inicial calculada está por debajo del 100%, suele interpretarse como una liberación rápida tras el inicio del experimento de determinados compuestos más lábiles o solubles, aunque esta interpretación en el caso de las DECOTABs es más discutible al tener una variabilidad muy baja de materia orgánica (celulosa y agar-agar).

Los coeficientes de decaimiento exponencial han resultado muy bajos en todos los casos, si bien en el sector de Las Rocas (XXIV-03 y XXIV-05) prácticamente doblan los encontrados en los otros sectores. Las tasas de descomposición están menos estudiadas en charcas y lagunas de alta montaña que en ríos, pero se han observado valores en rangos similares o ligeramente mayores en lagos oligotróficos (Hanlon, 1982; Pope et al., 1999).

Dada esta baja tasa de descomposición, la modelización exponencial es muy similar a la obtenida mediante regresión lineal, por lo que se han comparado las pendientes de las rectas obtenidas para saber si existen diferencias entre las tasas de descomposición entre las distintas charcas (Figura 25).

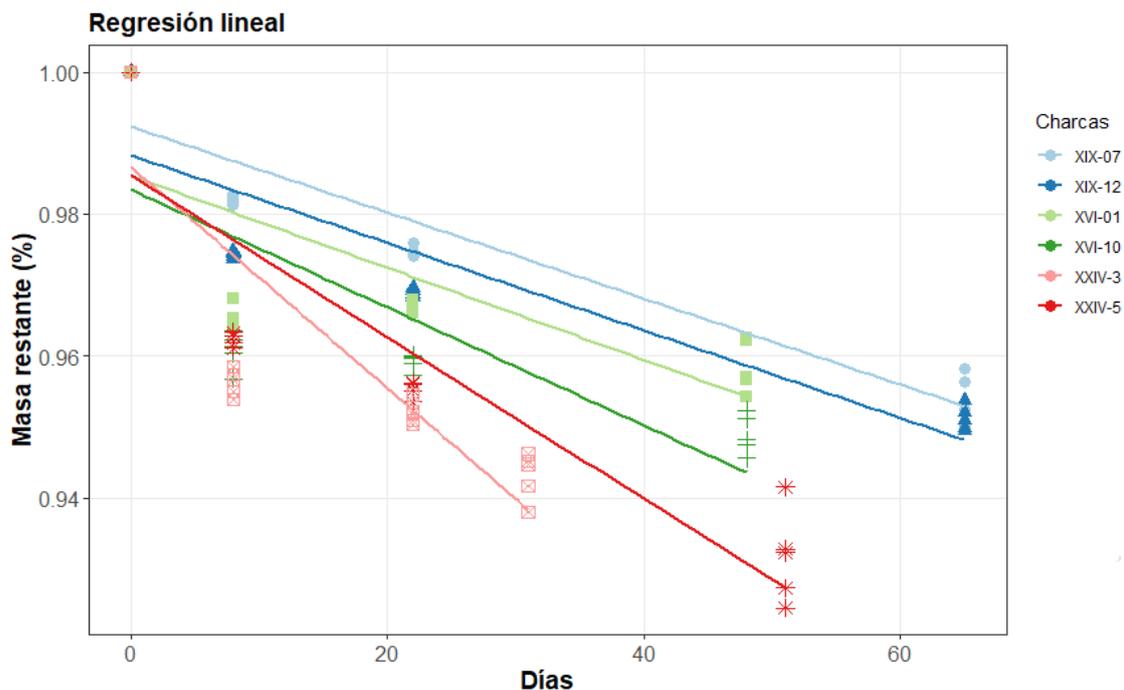


Figura 25. Regresión lineal del porcentaje de DECOTABs restante respecto al tiempo en las distintas charcas.

Tan sólo son diferentes significativamente las pendientes calculadas para las charcas XXIV-03 y XXIV-05 (ANOVA,  $p < 0.001$ ) comparadas con las de las demás charcas, tal como sugería el hecho de tener un coeficiente de decaimiento exponencial de aproximadamente el doble que las otras. Es más, la pendiente de la recta de estas dos charcas no es significativamente distinta cuando se comparan entre ellas (tukey test,  $p > 0.05$ ).

En definitiva, las DECOTABs muestran que la tasas de descomposición de materia orgánica en las charcas de Peñalara es lenta, aunque ligeramente variable entre distintas charcas y, sobre todo, sectores. El hecho de haber sido tratadas con tebuconazol no parece haber causado ningún impacto significativo en el proceso de descomposición de materia orgánica por parte de los hongos acuáticos.

## 4. Resumen y conclusiones

- Se ha diseñado un experimento piloto para evaluar la viabilidad de realizar tratamientos de desinfección con un fungicida (tebuconazol) de las larvas afectadas por quitridiomycosis directamente en el medio natural. Este informe recoge los resultados complementarios sobre el estado de conservación de las charcas estudiadas
- Se han estudiado 3 parejas de charcas correspondientes a 3 sectores de humedales distintos. Cada pareja (charca control y charca experimental) se ha elegido buscando que fuesen similares en tamaño, profundidad, presencia de vegetación acuática y duración del hidropereodo.
- El experimento tuvo que iniciarse pocos días después de unas intensas lluvias en el macizo, condicionado por el estado de desarrollo de las larvas de *Alytes obstetricans* que requería su traslado a las charcas experimentales sin mayor demora. Habría sido preferible dejar transcurrir unos días para dar mayor estabilidad a las charcas, por lo que la meteorología de este año no ha sido particularmente propicia para realizar un experimento de este tipo
- La concentración inicial de tebuconazol se situó en el mismo orden de magnitud que la concentración objetivo (500 µg/l), con dos charcas por encima de esta concentración (720 µg/l y 1260 µg/l) y una por debajo (120 µg/l). El fondo ambiental de tebuconazol se estableció en 6-9 ng/l. A los 8 días de realizar el tratamiento con fungicida apenas son observables niveles de fungicida superiores al fondo ambiental.
- Las variables físico-químicas estudiadas (temperatura, oxígeno disuelto, alcalinidad, conductividad, nitratos, nitritos, nitrógeno total y fósforo total) muestran, en algunos casos, cambios significativos a lo largo de la duración del experimento, pero no se observan diferencias significativas entre las charcas control y las charcas tratadas con el fungicida. En todos los casos se trata de tendencias temporales y concentraciones acordes a lo esperable en los humedales del Macizo de Peñalara.
- Tampoco se han encontrado diferencias significativas entre las charcas control y las tratadas en los pigmentos fotosintéticos, si bien su concentración aumenta claramente conforme se establecen unas condiciones más estables y propias de la parte central del verano.
- A pesar de ciertas diferencias en la composición de especies de macroinvertebrados acuáticos, la riqueza de especies, la diversidad- $\alpha$  y diversidad- $\beta$  indican que todas las charcas (tratadas o no) son bastante similares en cuanto a la comunidad de macroinvertebrados acuáticos.
- Del análisis de la comunidad zooplanctónica se deduce que el tratamiento con fungicida no ha tenido un efecto de gran impacto para esta comunidad. Queda la duda de si la presencia de una especie sensible y característica de las masas de agua de alta montaña solamente en la charca control podría tener relación con el tratamiento experimental, aunque realmente no es extraño encontrar diferencias en la composición del zooplancton incluso entre charcas muy cercanas.

- El estudio realizado para evaluar el posible impacto sobre el proceso de descomposición microbiana de materia orgánica con pastillas estandarizadas de celulosa y agar-agar (DECOTABs) indica que esta tasa de descomposición es lenta y ligeramente variable entre distintas charcas y, sobre todo, sectores. En cualquier caso, la ausencia de diferencias significativas entre la velocidad de este proceso en las parejas de charcas descarta un impacto significativo en el proceso de descomposición de materia orgánica por parte de los hongos acuáticos debido al tratamiento realizado.
- En definitiva, la realización de un tratamiento de desinfección con tebuconazol directamente en el medio natural no parece haber tenido ningún efecto significativo sobre la físico-química de estas charcas, sobre su comunidad acuática o sobre los procesos funcionales de degradación de materia orgánica.

## 5. Bibliografía

- APHA-AWWA-WEF. 2017. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 23th ed. Baird, R. B., Eaton, A. D., Rice, E. W. (eds.), Amer Public Health Assn.
- Bärlocher, F. 2020. Leaf Mass Loss Estimated by the Litter Bag Technique. En Bärlocher, F., Gessner, M. O., Graça, M. A. S. (eds.), *Methods to Study Litter Decomposition: A Practical Guide*, pp. 43-51. Springer International Publishing, Cham.
- Bosch, J., Fernández-Beaskoetxea, S., Garner, T.W.J., Carrascal, L.M. 2018. Long-term monitoring of an amphibian community after a climate change- and infectious disease-driven species extirpation. *Global Change Biology* 24: 2622-2632.
- Bravo Utrera, M.A., Baltanás, A. 2020. Crustáceos. En Álvarez Cobelas, M., Sánchez Carrillo, S. (eds.), *Ecología acuática de Madrid*, Biblioteca de Ciencias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.
- Granados, I. 2020. *Inventario de Humedales del Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama. Ámbito de la Comunidad de Madrid*. Centro de Investigación, Seguimiento y Evaluación del Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama. Comunidad de Madrid.
- Granados, I., Toro, M., Rubio-Romero, A. 2006. *Laguna Grande de Peñalara: 10 años de seguimiento limnológico*. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio de la Comunidad de Madrid.
- Hanlon, R.D.G. 1982. The breakdown and decomposition of allochthonous and autochthonous plant litter in an oligotrophic lake (Llyn Frongoch). *Hydrobiologia* 88: 281-288.
- Jeffrey, S.W., Humphrey, G.F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 167: 191-194.
- Kampfraath, A.A., Hunting, E.R., Mulder, C., Breure, A.M., Gessner, M.O., Kraak, M.H.S., Admiraal, W. 2012. DECOTAB: a multipurpose standard substrate to assess effects of litter quality on microbial decomposition and invertebrate consumption. *Freshwater Science* 31: 1156-1162.
- Lenth, R.V. 2021. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means.
- MAGRAMA. 2013a. *Protocolo de cálculo del índice IBMWP. Código: IBMWP-2013*. Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino.
- MAGRAMA. 2013b. *Protocolo para el cálculo del índice IBCAEL de invertebrados en lagos. código: IBCAEL-2013 Versión 1*. Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino.
- OECD ed. . 1982. *Eutrophication of waters: monitoring, assessment and control*. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- Pope, R.J., Gordon, A.M., Kaushik, N.K. 1999. Leaf litter colonization by invertebrates in the littoral zone of a small oligotrophic lake. *Hydrobiologia* 392: 99-112.

R Core Team. 2017. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Toro, M., Granados, I. 1998. *Inventario, cartografía y caracterización de las charcas y lagunas del Parque Natural de la Cumbre, Circo y Lagunas de Peñalara*. Comunidad de Madrid.

Van der Lee, G.H., Hunting, E.R., Vonk, J.A., Kraak, M.H.S. 2020. Decomposition and Consumption Tablets (DECOTABs). En Bärlocher, F., Gessner, M. O., Graça, M. A. S. (eds.), *Methods to Study Litter Decomposition: A Practical Guide*, pp. 519-525. Springer International Publishing, Cham.