

A person wearing a grey and blue shirt, dark pants, and black boots is crouching in a shallow stream. They are holding a long-handled shovel with a white bucket attached to the end. Their right hand is reaching into the water near some rocks. A white bag is on the ground next to them. The stream is surrounded by large, mossy rocks, and water is flowing over them. The background is slightly blurred, showing more rocks and water.

MÉTODOS DE RECOLECCIÓN

CAPÍTULO 2

Métodos de recolección

Alonso Ramírez

Instituto para Estudios de Ecosistemas Tropicales, Universidad de Puerto Rico; alonso.ites@gmail.com

Existe una diversidad de formas para recolectar macroinvertebrados acuáticos. La selección de los métodos varía según el tipo de estudio, el cuerpo de agua, hábitat de interés e incluso el presupuesto disponible. Por ello, es importante conocer las ventajas y limitaciones de los diferentes métodos. En este capítulo discutimos de forma general algunos métodos comunes de trabajo. Aunque damos énfasis a métodos que regularmente se usan en estudios de diversidad y ecología, no existe un consenso absoluto sobre la mejor forma de muestrear. Por ello, proveemos algunas referencias que ayudan al investigador a formar su propia opinión.

Una de las mejores referencias para el estudio de los macroinvertebrados es el trabajo de Merritt *et al.* (2008). Para métodos más específicos para ríos se puede consultar Hauer & Resh (2006), para humedales Rader *et al.* (2001) y para lagos Wetzel & Likens (2000). Además, para estudios de biomonitorio se puede consultar el manual de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (Barbour *et al.* 1999) y el reglamento No. 33903 MINAE-S “Evaluación y clasificación de la calidad de cuerpos de agua superficiales” (La Gaceta 178, 2007) para el caso de Costa Rica.

DISEÑO DEL ESTUDIO

El tipo de metodología y el diseño experimental a utilizar en cualquier estudio con

macroinvertebrados acuáticos debe corresponder claramente con los objetivos del mismo. Por ello, un primer paso debe siempre ser el definir claramente el motivo del trabajo y luego proceder a la selección de métodos. En términos generales podemos diferenciar entre estudios cualitativos y cuantitativos. Los **estudios cualitativos** son generalmente preferidos cuando el objetivo es caracterizar la biodiversidad de un lugar en particular. Por ejemplo, generar un listado taxonómico para una localidad determinada podría solamente requerir recolectar la mayor cantidad de taxa para el lugar. Las caracterizaciones cualitativas generalmente no son apropiadas para hacer comparaciones entre localidades o entre fechas de muestreo. Si parte de la idea es explorar cambios, necesitamos metodologías cuantitativas o semi-cuantitativas. Los **estudios cuantitativos** asocian una unidad de esfuerzo de muestreo a la muestra de macroinvertebrados. Por ejemplo, se pueden recolectar muestras por área o por tiempo de muestreo. El objetivo de hacer un trabajo cuantitativo es minimizar variaciones debido al método y enfatizar cambios que resulten de variaciones en el ambiente. Existen diversos niveles de rigurosidad. Podemos hacer muestreos cuantitativos por área, con repeticiones suficientes para describir la variabilidad del sistema. O bien, hacer muestreos semi-cuantitativos manteniendo constante el tiempo de muestreo (p. ej. 15 minutos por hábitat) y no el área. Diferentes

objetivos requieren distintas metodologías y por ende diferentes cantidades de esfuerzo. Por ello es importante tener claro el objetivo de trabajo desde el inicio.

El diseño experimental también debe tomar en consideración la diversidad de hábitats presentes en los cuerpos de agua. Los distintos hábitats no solo contienen grupos variados de organismos, sino que también requieren técnicas de muestreo diferentes. Algunos estudios prefieren recolectar un solo hábitat y facilitar comparaciones en tiempo y espacio. Sin embargo, algunas veces es importante asegurarse de muestrear por lo menos los hábitats dominantes en cada cuerpo de agua.

Cualquier estudio con macroinvertebrados debe empezar por contestar la siguiente pregunta: ¿Cuál es el objetivo principal de este trabajo? Una respuesta clara es un gran paso hacia un estudio exitoso. Dado el esfuerzo y costo involucrado en la recolecta e identificación del material, debemos tomarnos tiempo en contestarla.

MÉTODOS PARA AMBIENTES DE AGUAS POCO PROFUNDAS

Ambientes de aguas poco profundas incluyen ríos, lagos y otros cuerpos de agua donde podemos alcanzar el fondo con nuestras manos y por ende con redes relativamente pequeñas. Para este tipo de cuerpo de agua, tenemos una diversidad de redes manuales, las cuales se pueden comprar o bien construir con malla fina y resistente. Es importante usar malla fina, ya que muchos macroinvertebrados acuáticos son bastante pequeños. La mayor parte de los estudios usa un tamaño de malla de $500\mu\text{m}$ o menos. Muchos estudios ecológicos prefieren mallas de $250\mu\text{m}$.

Estudios cualitativos utilizarían equipo de muestreo como redes tipo D (Fig. 1), redes manuales diversas e incluso coladores de cocina (Fig. 2). Como el objetivo es registrar la mayor cantidad de taxa, es posible usar varios tipos de redes o recolectar los organismos directamente del sustrato mediante

el uso de pinzas entomológicas. Recolectas directas son importantes para poder obtener aquellos organismos que se encuentran fuertemente adheridos al sustrato, como las larvas de *Petrophila* (Lepidoptera) y varios tricópteros, como Hydroptilidae y Xiphocentronidae (Fig. 3). En áreas con flujo de agua, los muestreos se pueden hacer colocando la red corriente abajo y moviendo el sustrato con las manos o con los pies para dislocar los macroinvertebrados y atraparlos en la red. En áreas sin flujo, la red se empuja dentro del sustrato y se recolecta material del fondo. Los macroinvertebrados se pueden buscar entre el material acumulado en la red. Alternativamente, se pueden colocar en



Fig. 1. Red tipo D, una de los tipos más comunes para recolectar macroinvertebrados. Foto K. Nishida.



Fig. 2. Colador de cocina como instrumento de recolecta. Foto M. Springer.



Fig. 3. Muestreo directo de macroinvertebrados acuáticos. Foto M. Springer.



Fig. 4. Bandeja para separación de individuos de la muestra. Foto M. Springer.

una bandeja de color claro, blanco preferiblemente, con agua (Fig. 4). Los macroinvertebrados tienden a moverse en la bandeja y son más fáciles de observar y recolectar.

Estudios cuantitativos utilizarían equipo de muestreo como las redes de Surber (Fig. 5) o tipo Hess (Fig. 6). Estas redes tienen la característica de muestrear un área determinada del fondo del cuerpo de agua. También se puede usar una red tipo D con una adaptación para controlar el área muestreada. Como queremos asociar los macroinvertebrados recolectados con el área muestreada, es importante usar el mismo tipo de red en cada recolecta, además se pueden emplear distintas redes por hábitat. En áreas con flujo continuo se usa el Surber o la red tipo D y se mueve el sustrato como se describió arriba. En áreas sin flujo se usan redes como la Hess. En este caso, se hace el disturbio en el fondo y se crea una corriente de agua con la mano para que los organismos caigan a la red. Los macroinvertebrados se preservan y se transportan al laboratorio para separarlos del material usando una lupa o un microscopio de disección. Los resultados se expresan en cantidad por metro cuadrado.

Recolectar muestras con métodos cuantitativos, como la red Surber, requiere mayor tiempo de procesamiento en el laboratorio y



Fig. 5. Red tipo Surber. Foto M. Springer.



Fig. 6. Muestreador tipo Hess. Foto K. Rosas.

capturan una parte diferente de la comunidad béntica relativo a otros métodos (Paaby *et al.* 1998). Por ello, se debe resaltar la importancia de definir bien los objetivos del estudio y balancear las ventajas y desventajas de las diferentes técnicas.

En los estudios semi-cuantitativos reemplazamos el factor área por tiempo, o por una combinación de ambos. Generalmente, en estos estudios muestreamos un cuerpo de agua en particular por un periodo de tiempo preestablecido. Por ejemplo, se puede muestrear un sitio por una hora con una red tipo D. Si siempre hacemos el mismo esfuerzo de muestreo, el trabajo es comparable con muestreos hechos en otros sitios o fechas usando el mismo método, pero no necesariamente con estudios en la literatura. Este tipo de muestreo generalmente es útil en estudios de biomonitorio. Es importante resaltar que el muestreo es susceptible a variaciones introducidas por el operador y el tiempo de muestreo. Diferentes personas recolectan de forma diferente y distintos tiempos de muestreo pueden resultar en cantidades variables de macroinvertebrados (Maue & Springer 2008). El tipo de red también juega un papel importante cuando se quiere determinar la composición de macroinvertebrados de un lugar. Las diferencias entre un tipo de red y otro pueden resultar en composiciones que difieren hasta en un 20% del total de la fauna encontrada (Stein *et al.* 2008).

Los sustratos artificiales pueden proveer un diseño experimental útil bajo ciertas circunstancias. Los sustratos consisten en canastas de rocas o paquetes de hojas que se colocan en el fondo de los cuerpos de agua para ser colonizados por la fauna béntica (Fig. 7). Son cuantitativos ya que se pueden expresar los resultados en número por área o bien por gramos de materia orgánica en el caso de las hojas. Los sustratos se anclan al fondo del cuerpo de agua y se dejan colonizar por más de dos semanas antes de removerlos y transportarlos al laboratorio. Es importante tener en cuenta las fluctuaciones hidrológicas del cuerpo de agua. En ríos

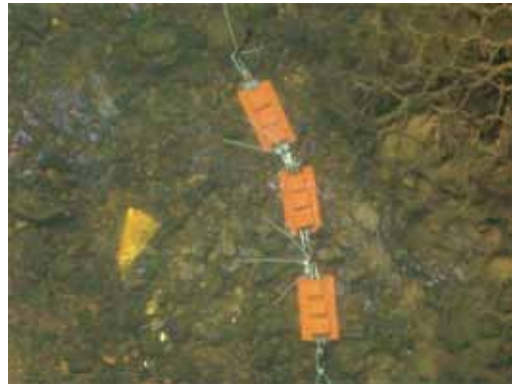


Fig. 7. Sustratos artificiales. Foto A. Ramírez.

se deben insertar varillas en el fondo del río, o bien amarrarlos a un árbol en la orilla, ya que una crecida puede fácilmente desplazarlos río abajo. En sitios profundos, amarrar los sustratos a la orilla facilita su recolecta. Esta técnica también facilita el estudio de ambientes peligrosos donde no es recomendable usar redes manuales. Por ejemplo, se pueden usar sustratos artificiales y trabajar desde la orilla en sitios altamente contaminados o bien lugares con altas poblaciones de cocodrilos.

En ríos se pueden recolectar también los macroinvertebrados en deriva. La deriva se compone de macroinvertebrados bénticos que se dejan ir en la corriente de agua para desplazarse río abajo. Algunas veces, estos macroinvertebrados entran a la corriente por accidente, otras veces lo hacen como forma de desplazarse a otros sitios. La deriva se recolecta



Fig. 8. Red de deriva. Foto D. Solano.

ubicando las redes perpendiculares al flujo de agua (Fig. 8). Los muestreos son cuantitativos, ya que se mide una cantidad de organismos por volumen de agua muestreado. Sin embargo, existe un marcado patrón temporal en la deriva. En ríos donde hay peces, la mayoría de los macroinvertebrados entran a la deriva durante el atardecer o la noche, para evitar la depredación. Por ello, la hora del día es importante a la hora de muestrear con esta técnica. Algunos estudios han encontrado que muestrear deriva resulta en mayor cantidad de taxa relativo a las recolectas bénticas (Pringle & Ramírez 1998).

Las trampas de luz son también una buena herramienta de recolecta (Fig. 9). Algunos grupos de insectos acuáticos, como Coleoptera, son atraídos a la luz y podemos complementar los muestreos usando trampas de luz. Existen trampas aéreas y acuáticas dependiendo del hábitat que nos interese. Los muestreos usando trampas de luz son más bien cualitativos. Sin



Fig. 9. Trampa de luz para recolectar adultos. Foto M. Springer.

embargo, podemos usar la misma cantidad de horas de recolecta o cantidad de trampas por sitio para lograr un diseño semi-cuantitativo que nos permita comparar sitios o fechas de muestreo.

MÉTODOS PARA AMBIENTES DE AGUAS PROFUNDAS

Ambientes de aguas profundas incluyen algunos segmentos de ríos, lagos y embalses, entre otros. Logísticamente, estos sitios nos presentan la limitante de no poder alcanzar el fondo de forma fácil por su profundidad y la textura suave y fangosa del fondo. Los métodos descritos arriba solo se podrían utilizar en las orillas de estos cuerpos de agua. Para muestreos bénticos en sitios profundos podemos utilizar dragas desde un bote, o bien sustratos artificiales. Adicionalmente, en cuerpos de agua lénticos y en algunos lóticos también tenemos la fauna planctónica que puede representar un grupo diverso e importante de macroinvertebrados.

Las muestras bénticas se pueden recolectar con dragas (Fig. 10). Hay diferentes tipos, pero todas estas están diseñadas para utilizarse en sustratos suaves de sedimentos finos. Generalmente, se bajan desde botes o muelles utilizando una soga o cable. Las muestras son cuantitativas, ya que recolectan un área determinada del fondo y una cantidad de sustrato. Diferentes dragas tienen variadas formas de sellar la muestra al subirla a la superficie. Cada



Fig. 10. Draga. Foto M. Springer.



Fig. 11. Red de plancton. Foto de WildCo.

muestra se preserva individualmente y se transporta al laboratorio para su análisis.

Las muestras planctónicas se recolectan con redes de plancton (Fig. 11) que se bajan desde un bote o bien se arrastran detrás del mismo. Las redes recolectan filtrando la columna de agua, por lo que los datos son cuantitativos si conocemos el volumen de agua filtrado. Si la misma no se cuantifica, las muestras serían cualitativas. El volumen de agua filtrado es el resultado del área de la boca de la red multiplicado por la velocidad con que se desplaza y el tiempo, o la distancia que se desplaza la red.

Finalmente, en sitios profundos también podemos colocar sustratos artificiales los que se dejan colonizando por varios días antes de recolectar como se discutió anteriormente. Es importante usar sustratos artificiales que imiten el sustrato natural del sitio. De otra forma, los organismos recolectados serían una fracción que no necesariamente representa la fauna local.

PRESERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de macroinvertebrados acuáticos generalmente se preservan en alcohol al 80% o formalina al 5%. Ambos tienen ventajas y desventajas. El alcohol tiene la ventaja de ser fácil de manejar y no requiere mayores cuidados. Sin embargo, tiene las desventajas de que es inflamable, se requiere un volumen grande de alcohol para preservar apropiadamente las muestras y aumenta la longitud del cuerpo de los organismos. La formalina tiene la ventaja de funcionar eficientemente como preservativo en concentraciones bajas (al 5%), por lo que unos cuantos mililitros son suficientes para preservar una muestra en el campo. Esto hace que preservar en formalina sea práctico cuando la cantidad de muestras es alta. La mayor desventaja de la formalina es su cualidad de carcinogénica. Si usamos formalina, debemos manejarla con guantes, en condiciones ventiladas o en un área especial para el manejo de químicos. Además, se recomienda para estudios que requieren evitar que los insectos cambien de tamaño una vez preservados.

Las muestras de campo generalmente son una mezcla de material béntico y macroinvertebrados y es más fácil colocarlas en bolsas plásticas gruesas, que se puedan amarrar fuertemente para evitar derrames durante el transporte. Idealmente, bolsas largas a las que se les pueda hacer un nudo fuerte con la misma bolsa y usando doble bolsa para evitar derrames. En el campo, se debe agregar alcohol en alta concentración (al 95%) y tratar de que la muestra tenga la menor cantidad de agua posible para evitar diluir el alcohol. Si se usa formalina se puede agregar agua y formalina concentrada a la muestra estimando una concentración final aproximada de 5%. Si se usa alcohol, es importante reemplazarlo una vez que se llega al laboratorio, en especial si la muestra se recolectó con mucha agua. Las muestras en formalina no necesitan este paso, pero se les debe lavar completamente la formalina antes de procesarlas y trabajarlas en agua bajo el microscopio. Es importante etiquetar apropiadamente las muestras en el campo. Se

deben preparar etiquetas en papel escritas con lápiz o con tinta indeleble en alcohol. Se recomienda no rotular las bolsas por fuera, es muy fácil perder la información ya que el alcohol borra los datos fácilmente.

Una vez que se separan los macroinvertebrados del resto del material, se colocan en frascos que sellen herméticamente. Es preferible preservarlos en alcohol al 80% para evitar tener que trabajar en el microscopio con sustancias tóxicas, como la formalina. La mejor forma de mantener el material preservado a largo plazo es utilizando viales de vidrio, las cuales se llenan completamente con alcohol y se cierran con una pequeña bola de algodón. Estos viales, debidamente rotulados, se colocan dentro de frascos grandes, con alcohol, los cuales pueden reunir los viales con los organismos recolectados e identificados de un mismo sitio o cuerpo de agua y fecha, o bien podemos colocar todos de un mismo taxón juntos en un frasco grande (Fig. 12). Cada frasco debe llevar su



Fig. 12. Muestra etiquetada como parte de una colección zoológica. Foto M. Springer.

respectiva etiqueta, escrita en papel con lápiz o con tinta indeleble.

Las etiquetas y la información que estas llevan son sumamente importantes. Una etiqueta completa debe llevar información sobre la localidad de recolecta, fecha de recolecta, recolector, detalles o título del proyecto y

tipo de sustancia utilizada para preservar la muestra, entre otros. Es importante enfatizar que una muestra sin datos de recolecta es una muestra perdida.

INFORMACIÓN IMPORTANTE QUE DEBEMOS REPORTAR

Como parte de cualquier estudio con macroinvertebrados acuáticos debemos reportar una serie de detalles básicos para que los lectores puedan entender e interpretar los resultados que se les presentan. Entre ellos debemos incluir:

- Información sobre la técnica de muestreo: tipo de red, tamaño de malla (tamaño de los hoyos de la malla).
- Datos del diseño experimental: estrategia de muestreo, cantidad de muestras por hábitat.
- Método de separación del material. Si se utilizó un microscopio de disección, una lupa, o se hizo sin ayuda alguna en el campo o en el laboratorio.
- Resolución taxonómica utilizada al identificar el material.
- Referencias usadas en la identificación, y confirmación de las identificaciones.
- Ubicación del material recolectado: si se depositó en una colección oficial se deben incluir los detalles de la misma.

ASOCIACIONES DE LARVAS CON ADULTOS

La mejor forma de asignar un nombre a una larva o ninfa de un insecto acuático es asociándola con el estadio adulto. Las asociaciones de los estadios inmaduros con adultos son importantes para el continuo avance de la taxonomía de los insectos acuáticos. Estas asociaciones permiten identificar el material apropiadamente, desarrollar colecciones de referencia y mejorar claves taxonómicas y manuales, como el que aquí presentamos. La asociación se puede hacer de dos formas,

criando las larvas hasta obtener el adulto o bien utilizando técnicas moleculares.

La cría es el método más simple y de bajo costo. Para ello, necesitamos buscar ninfas o larvas maduras o pupas en el campo, transportarlas al laboratorio, y alimentarlas hasta conseguir el adulto. En el campo debemos buscar larvas prontas a emerger. En algunos grupos hemimetábolos es fácil ver las alas desarrolladas en las ninfas y seleccionar aquellas que estén más desarrolladas. En efemerópteros, las alas se ponen de color negro cuando la ninfa está pronta a emerger. El transporte debe ser lo más rápido posible para evitar pérdidas de especímenes en el camino. Cuando transportamos los organismos, se pueden colocar en frascos con agua y alguna vegetación que les permita sujetarse. Además, debemos colocar

solo unos pocos individuos por frasco (dos a tres). Se debe cambiar el agua cada cierto tiempo y evitar que la misma se caliente. Una vez en el laboratorio, podemos ponerlas en acuarios o bandejas con agua, aeradores y condiciones que imiten las naturales del organismo (Fig. 13). Se debe proveer alimento apropiado. Si no se conoce exactamente de que se alimentan, debemos incluir una diversidad de opciones para maximizar las posibilidades de éxito. Los insectos depredadores se pueden alimentar con larvas de mosquitos o tubifex, los raspadores con rocas con perifiton, y los fragmentadores con hojarasca proveniente del mismo ambiente acuático para que contenga la película de microorganismos que aumenta su valor nutricional.

Los acuarios deben tener una red que los cubra y permita recolectar el adulto emergido. Es preferible tratar de mantener el adulto vivo por la mayor cantidad de tiempo posible, para que se endurezca y tome la coloración de la especie. En el caso de los efemerópteros, es necesario mantener los subimagos vivos para conseguir el imago. Finalmente, la exuvia de la larva se debe colocar en alcohol, rotular debidamente y asociar con el adulto emergido. En el caso de algunos holometábolos, como los tricópteros, es importante conservar el capullo de la pupa, ya que en el mismo se conservan los escleritos del último estadio larval. El adulto se puede colocar en el mismo frasco que la exuvia de la larva, o pupa, o bien asociarlos mediante el uso de un código que relacione ambos especímenes. Es importante etiquetar los especímenes con todos los detalles importantes, como discutimos anteriormente.

El uso de técnicas moleculares también permite asociar los estadios inmaduros con los adultos. Existen varias versiones de la metodología, pero la misma se ha utilizado exitosamente en el pasado (Zloty *et al.* 1993). Para el uso de estas técnicas generalmente se recolectan larvas y adultos en la misma localidad y preferiblemente en las mismas fechas. El material se preserva en alcohol y los análisis se hacen según los requerimientos de la técnica escogida.



Fig. 13. Métodos para criar y asociar los estadios inmaduros con los adultos de insectos acuáticos en (a) el campo y (b) laboratorio. Fotos K. Nishida y M. Springer.

Si nos interesan los inventarios de biodiversidad o queremos mejorar nuestro conocimiento de la fauna de una localidad determinada, se recomienda además la recolección de adultos terrestres. El hacer muestreos de adultos en los alrededores del ambiente acuático estudiado puede ayudar a crear un inventario de especies para un sitio en particular. Esta estrategia ayuda a compensar por el hecho de que la identificación de los estadios inmaduros a nivel específico para muchos grupos es sumamente difícil, si no imposible, por la falta de descripciones y claves.

COLECCIONES ZOOLOGICAS

Al finalizar un estudio es necesario tomar la decisión sobre el destino del material recolectado. Es sumamente importante que los organismos preservados queden depositados en una colección debidamente cuidada y de acceso a otros investigadores. Lo ideal es depositar una colección de referencia del estudio realizado en una colección "oficial", reconocida a nivel nacional e incluso internacional (idealmente en una institución estatal, como una universidad pública o un museo de historia natural). Esta debe contar con curadores capacitados y una estructura y un presupuesto que garanticen el mantenimiento adecuado a largo plazo de la colección. Además, la colección debe contar con un registro adecuado del material que contiene, en forma de un catálogo o una base de datos digital, la cual puede ser consultada por otros investigadores.

La importancia de estas colecciones radica en su utilidad para futuros estudios taxonómicos y genéticos y para obtener datos sobre la distribución, biología y ecología de los diversos grupos taxonómicos o especies. Además, el material depositado constituye el "testigo" de la investigación o del estudio y puede ser de suma importancia para estudios de biomonitorio, impacto ambiental o en caso de denuncias por contaminación acuática. Finalmente,

extensas colecciones zoológicas se han usado para reconstruir la biodiversidad de lugares que han sido alterados y han perdido muchas de sus especies (Reznick *et al.* 1994).

REFERENCIAS

- Barbour, M.T., J. Gerritsen, B.D. Snyder & J.B. Stribling. 1999. Rapid bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers: periphyton, benthic macroinvertebrates and fish. EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water; Washington, D.C., EEUU.
- Hauer, F.R. & V.H. Resh. 2006. Macroinvertebrates, p. 435-464. In F.R. Hauer & G.A. Lamberti (eds.). *Methods in stream ecology*. Academic/Elsevier, Nueva York, EEUU.
- Maue, T. & M. Springer. 2008. Effect of methodology and sampling time on the taxa richness of aquatic macroinvertebrates and subsequent changes in the water quality index from three tropical rivers, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 56 (Suppl 4): 257-271.
- Merritt, R.W., K.W. Cummins, V.H. Resh & D.P. Batzer. 2008. Sampling aquatic insects: Collection devices, statistical considerations, and rearing procedures, p. 15-38. In R.W. Merritt, M.B. Berg & K.W. Cummins (eds.). *An Introduction to the Aquatic Insects of North America*. Kendall/Hunt, Dubuque, Iowa, EEUU.
- Paaby, P., A. Ramírez & C.M. Pringle. 1998. The benthic macroinvertebrate community in Caribbean Costa Rican streams and the effect of two sampling methods. *Rev. Biol. Trop.* 46: 185-199.
- Pringle, C.M. & A. Ramírez. 1998. Use of both benthic and drift sampling techniques to assess tropical stream invertebrate communities along an altitudinal gradient, Costa Rica. *Freshwater Biol.* 39: 359-373.
- Rader, R.B., D.P. Batzer & S.A. Wissinger (eds.). 2001. *Biomonitoring and management of North American freshwater wetlands*. John Wiley and Sons, Nueva York, EEUU.
- Reznick, D., R.J. Baxter & J. Endler. 1994. Long-term studies of tropical stream fish communities: the use of field notes and museum collections to reconstruct communities of the past. *Am. Zool.* 34: 452-462.

- Stein, H., M. Springer & B. Kohlmann. 2008. Comparison of two sampling methods for biomonitoring using aquatic macroinvertebrates in the Dos Novillos Watershed, Costa Rica. *Ecological Management and sustainable development in the humid tropics of Costa Rica. Ecol. Engineer.* 34: 267-275.
- Wetzel, R.G. & G.E. Likens. 2000. *Limnological analyses.* Springer-Verlag, Nueva York, EEUU.
- Zloty, J., G. Pritchard & C. Esquivel. 1993. Larvae of the Costa Rican *Hetaerina* (Odonata: Calopterygidae) with comments on distribution. *Syst. Entomol.* 18: 253-265.