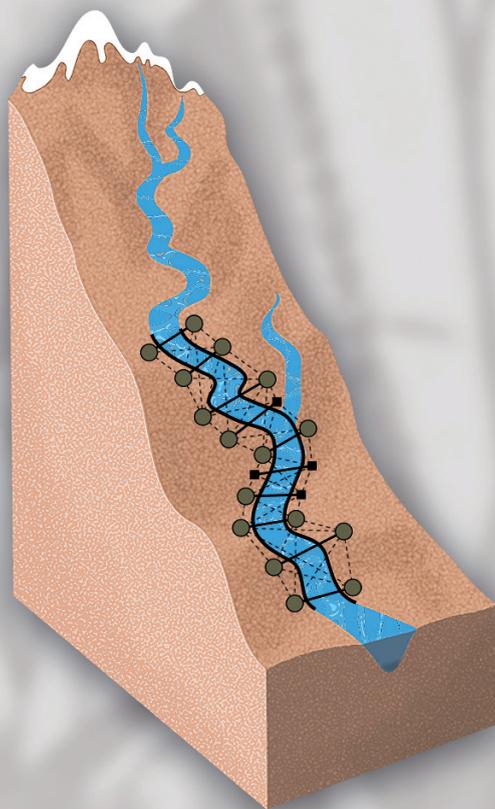


Arturo Elosegi Sergi Sabater (Eds.) Conceptos y técnicas en ecología fluvial



Conceptos y técnicas en ecología fluvial

Conceptos y técnicas en ecología fluvial

Edición a cargo de

ARTURO ELOSEGI

SERGI SABATER

Primera edición: abril 2009

© los autores, 2009

© Fundación BBVA, 2009
Plaza de san Nicolás, 4. 48005 Bilbao
www.fbbva.es

Al publicar la presente obra, la Fundación BBVA no asume responsabilidad alguna sobre su contenido ni sobre la inclusión en la misma de documentos o información complementaria facilitada por los autores.

Edición y producción: Rubes Editorial

ISBN: 978-84-96515-87-1
Depósito legal: B-19 696-2009

Impreso en España – *Printed in Spain*

Impreso por Valant 2003
sobre papel elaborado según las más exigentes normas ambientales europeas.

Prólogo	11
1. Presentación: importancia de los ríos	
1.1. Introducción	15
1.2. Estructura y funcionamiento del ecosistema fluvial.....	17
1.3. Los ríos y la humanidad	18
1.4. Los servicios de los ecosistemas fluviales.....	20
1.5. Bibliografía	21
2. El río como ecosistema	
2.1. Introducción	23
2.2. El río, sistema dinámico y complejo.....	26
2.3. La biota de los ecosistemas fluviales.....	29
2.4. Ensamblar los componentes: funcionamiento de los ecosistemas fluviales	33
2.5. Los problemas que afrontan los sistemas acuáticos continentales ..	35
2.6. Bibliografía	37
3. El marco físico: la cuenca	
3.1. Introducción	39
3.2. Factores, procesos y causas de variabilidad en la cuenca.....	41
3.3. Alteraciones de las relaciones tierra-agua	43
Técnica 1. Estudio morfométrico de cuencas	44
3.4. Bibliografía	48
4. El caudal circulante	
4.1. Introducción	51
4.2. El régimen hidrológico	53
Técnica 2. Retentividad hidráulica	56
Técnica 3. Medición del caudal.....	61
Técnica 3a. Medición mediante adiciones	61
Técnica 3b. Medición mediante correntímetro.....	64
Técnica 4. Análisis de frecuencia de avenidas	65
4.3. Bibliografía	69

5. La estructura física de los cauces fluviales	
5.1. Introducción	71
5.2. Cauce y transporte de sedimentos.....	73
5.3. Clasificación de los tipos de río	75
5.4. Aplicaciones de la geomorfología fluvial.....	77
Técnica 5. Determinación de la morfología del cauce.....	77
Técnica 6. Degradación/agradación del cauce.....	82
5.5. Bibliografía.....	84
6. El transporte de los materiales inorgánicos disueltos y particulados	
6.1. Introducción	85
6.2. Variaciones en los materiales transportados.....	86
Técnica 7. Carga disuelta y carga en suspensión.....	89
Técnica 8. Determinación de la hidrología hiporreica	91
6.3. Bibliografía.....	96
7. La química de las aguas. Los nutrientes	
7.1. Introducción	97
7.2. Las sustancias disueltas en el agua.....	98
7.3. Variaciones en el quimismo de los ríos.....	100
7.4. Muestreo, almacenamiento y conservación de las muestras	102
7.5. Material de laboratorio indispensable.....	104
Técnica 9. Determinación del carbono inorgánico disuelto (CID)..	105
Técnica 9a. Viraje de indicador de pH.....	105
Técnica 9b. Método de Gran.....	106
Técnica 10. Materia orgánica disuelta (MOD).....	107
Técnica 10a. Carbono orgánico disuelto biodegradable (CODB)	108
Técnica 10b. Índice de fluorescencia	109
Técnica 11. Nitrógeno inorgánico disuelto	110
Técnica 11a. Amonio: método del salicilato	110
Técnica 11b. Nitrito: método de la sulfanilamida	111
Técnica 11c. Nitrato: método de la reducción a nitrito	112
Técnica 11d. Nitrógeno total disuelto (NTD).....	113
Técnica 12. Fósforo.....	114
Técnica 12a. Fósforo reactivo soluble (PRS).....	114
Técnica 12b. Fósforo total disuelto (PTD).....	115
7.6. Bibliografía.....	116
8. Retención de nutrientes en ecosistemas fluviales	
8.1. Introducción	117
Técnica 13. Retención de nutrientes.....	120
Técnica 13a. Adición en continuo	120
Técnica 13b. Adición instantánea	126
8.2. Bibliografía.....	131

9. Otros factores físicos de importancia para los seres vivos:	
 luz, temperatura, corriente	
9.1. Introducción	133
9.2. La temperatura del agua	134
9.3. La disponibilidad de la luz.....	134
9.4. La velocidad de la corriente.....	135
Técnica 14. Estima de la luz disponible en un tramo.....	135
Técnica 15. Medición de la corriente	138
Técnica 15a. Velocidad de la corriente a escala de tramo	138
Técnica 15b. Velocidad de la corriente a escalas espaciales reducidas.....	139
9.5. Bibliografía.....	140
10. Dinámica y relevancia de la materia orgánica	
10.1. Introducción.....	141
Técnica 16. Entradas de materia orgánica particulada gruesa al río.....	144
Técnica 17. Retención de hojarasca	149
Técnica 18. Materia orgánica particulada bentónica	151
Técnica 19. Cantidad de madera en el cauce	154
Técnica 20. Descomposición de la hojarasca.....	156
Técnica 21. Balances de materia orgánica particulada gruesa en sistemas fluviales	161
10.2. Bibliografía	165
11. La biota de los ríos: los microorganismos heterotróficos	
11.1. Introducción.....	169
11.2. Toma de muestras de microorganismos heterotróficos fluviales..	171
Técnica 22. Densidad y biomasa de bacterias fluviales	172
Técnica 23. Biomasa de hongos.....	176
Técnica 24. Comunidad microbiana: métodos moleculares de estudio de la diversidad	181
Técnica 24a. Toma, procesado y conservación de muestras ...	186
Técnica 24b. Extracción, purificación y cuantificación del DNA	187
Técnica 24c. Amplificación del DNA (PCR)	191
Técnica 24d. Separación del DNA por DGGE (<i>fingerprinting</i> de la comunidad).....	194
Técnica 24e. Clonación.....	197
Técnica 24f. Secuenciación y asignación filogenética	199
Técnica 25. Evaluación de la diversidad de los hongos acuáticos	200
Técnica 26. Tasa de esporulación	206
Técnica 27. Actividades enzimáticas extracelulares.....	211
11.3. Bibliografía	216

12. La biota de los ríos: los microorganismos autótrofos	
12.1. Introducción.....	219
Técnica 28. Muestreo y observación de algas no diatomeas.....	220
Técnica 29. Tratamiento y análisis de diatomeas.....	224
Técnica 30. Fitoplancton.....	226
Técnica 31. Recolección y análisis de cianobacterias.....	228
Técnica 32. Pigmentos fotosintéticos.....	234
Técnica 32a. Pigmentos fotosintéticos por espectrofotometría	234
Técnica 32b. Estima de la eficiencia fotosintética	
y de la biomasa algal mediante fluorimetría.....	238
12.2. Bibliografía.....	240
13. La biota de los ríos: los macrófitos	
13.1. Introducción.....	243
13.2. Papel de los macrófitos en la dinámica de nutrientes.....	244
Técnica 33. Estructura y biomasa de comunidades macrofíticas	245
13.3. Agradecimientos.....	250
13.4. Bibliografía.....	250
14. La biota de los ríos: los invertebrados	
14.1. Introducción.....	253
Técnica 34. Estudio de la comunidad de macroinvertebrados ...	254
Técnica 35. Estudio de la meiofauna.....	258
Técnica 36. Rasgos biológicos de especies.....	262
14.2. Bibliografía.....	268
15. La biota de los ríos: los peces	
15.1. Introducción.....	271
Técnica 37. Muestreo de peces: pesca eléctrica.....	273
Técnica 38. Muestreo de peces: métodos pasivos.....	276
Técnica 39. Estima de la densidad poblacional.....	278
Técnica 39a. Métodos absolutos: Capturas sucesivas con	
extracción.....	278
Técnica 39b. Métodos absolutos: captura-marcaje y recaptura	283
Técnica 39c. Métodos relativos: capturas por unidad de	
esfuerzo.....	285
Técnica 40. Estado de condición.....	287
15.2. Bibliografía.....	289
16. La biota de los ríos: otros vertebrados	
16.1. Introducción.....	293
Técnica 41. Captura e inventario de anfibios y reptiles.....	295
Técnica 41a. Captura de anfibios a mano.....	296
Técnica 41b. Censo de anuros mediante escuchas.....	298

Técnica 41c. Censo de galápagos basado en observación directa	299
Técnica 42. Censos de aves acuáticas	299
Técnica 42a. Censos de anátidas y aves afines desde estaciones de observación.....	300
Técnica 42b. Censo de martines pescadores y mirlos acuáticos	302
Técnica 43. Muestreo de mamíferos ligados al agua.....	303
Técnica 43a. Búsqueda de rastros de nutria.....	304
Técnica 43b. Trampeo de desmán del Pirineo	305
16.2. Bibliografía	308
17. La vegetación terrestre asociada al río: el bosque de ribera	
17.1. Introducción.....	311
Técnica 44. Criterios para evaluar la calidad ecológica del bosque de ribera.....	313
17.2. Bibliografía	321
18. Flujo de energía en el ecosistema fluvial. Producción primaria y producción secundaria	
18.1. Introducción.....	323
Técnica 45. Determinación de las tasas de fijación autotrófica de carbono en biofilms	324
Técnica 45a. Técnica de incorporación de carbono con ¹⁴ C..	324
Técnica 45b. Técnica de enriquecimiento con ¹³ C.....	328
Técnica 46. Determinación de las tasas de incorporación de nitrógeno inorgánico en biofilms mediante enriquecimiento con ¹⁵ N.....	334
Técnica 47. Determinación de la producción secundaria	336
Técnica 47a. Cálculo por el método del crecimiento instantáneo	336
Técnica 47b. Cálculo por el método de la frecuencia de tamaños	341
18.2. Bibliografía	345
19. Relaciones tróficas en el ecosistema fluvial	
19.1. Introducción.....	347
Técnica 48. Análisis de dietas.....	349
Técnica 48a. Contenidos estomacales en invertebrados	349
Técnica 48b. Contenidos digestivos y análisis de la dieta de peces	351
Técnica 48c. Análisis de la dieta de mamíferos.....	355
Técnica 49. Ecología estequiométrica. Análisis elemental.....	356
Técnica 50. Análisis de la red trófica mediante isótopos estables de C y N.....	359

Técnica 51. Caracterización de la estructura trófica	362
19.2. Bibliografía	365
20. Flujo de energía en el ecosistema. Metabolismo fluvial	
20.1. Introducción	367
20.2. Relevancia y objeto de las distintas aproximaciones en la medida del metabolismo	368
Técnica 52. Metabolismo fluvial: cámaras	370
Técnica 52a. Determinación del metabolismo con cámaras recirculantes	372
Técnica 52b. Determinación del metabolismo con cámaras sin circulación	374
Técnica 53. Metabolismo fluvial: métodos en cauce abierto	375
Técnica 53a. Determinación de la reaireación a partir de la evasión de gases trazadores	379
Técnica 53b. Estimaciones de reaireación según las características hidráulicas y geomorfológicas del tramo de estudio	380
Técnica 53c. Estimaciones de la reaireación según la variación nocturna del oxígeno	381
Técnica 53d. Medida del metabolismo con una estación	382
Técnica 53e. Medida del metabolismo con dos estaciones	384
20.3. Bibliografía	385
21. Uso de ríos artificiales en ecología fluvial	
21.1. Introducción	387
21.2. Tipología	388
21.3. El diseño: consideraciones generales	390
Técnica 54. Diseño de ríos artificiales en laboratorio	392
21.4. Bibliografía	395
22. Diseño experimental y análisis de datos	
22.1. Introducción	397
Técnica 55. Diseño del estudio	400
Técnica 56. Análisis de datos	402
22.2. Bibliografía	411
Apéndices	
A. Preparación de soluciones <i>stock</i> y reactivos (técnica 24)	413
B. Glosario de términos	417
Índice de cuadros y figuras	425
Índice alfabético	433
Nota sobre los autores	437

PRÓLOGO

Los ríos tienen una importancia estratégica tanto para la biodiversidad del planeta como para la sociedad, y su adecuada gestión exige analizar de forma detallada y precisa su estructura y funcionamiento. Este análisis es el objetivo de la ecología fluvial. Los ríos son sistemas íntimamente relacionados con los ecosistemas terrestres modelados por el agua, y para comprenderlos es preciso tener una visión amplia, que incluya aspectos muy diversos y características bien distintas.

El objeto de este libro es describir algunas de las principales técnicas que se aplican en el estudio de los ecosistemas fluviales para analizar sus componentes estructurales y funcionales, y evaluar correctamente su estado. Para ello, se han seleccionado las técnicas más adecuadas de entre las disponibles, huyendo de una excesiva especialización y buscando técnicas estandarizadas pero sencillas en la medida de lo posible. Sin embargo, tampoco se ha querido construir un manual básico o simplificado. Por ello, junto a técnicas básicas se incluyen algunas más complejas aunque necesarias para desarrollar una ecología fluvial de calidad.

Esta obra está pensada y escrita para estudiantes avanzados (maestría, doctorado) e investigadores en ecología fluvial. Ello no es óbice para que pueda, asimismo, tener interés para investigadores en otros campos, o para quien quiera sencillamente adentrarse en la práctica del trabajo en ecología de ríos. Aunque es un manual metodológico, se introducen y discuten los principales conceptos de ecología fluvial. Todo ello está dirigido para que el lector no ejecute las técnicas de manera automática, como si de recetas se tratase, sino de forma que le permita interpretar los rasgos fundamentales de los ríos que encuentre en su entorno para así proceder, de manera más efectiva, a su valoración y conservación.

El libro incluye aspectos sobre hidrología y geomorfología, factores físicos de relevancia para la biota, dinámica de materiales particulados y disueltos, comunidades biológicas (desde las bacterias hasta los peces), medidas funcionales particulares y ecosistémicas, y tratamiento e interpretación de los datos.

Entre los aspectos físicos, se detallan técnicas descriptivas del marco que imprime la cuenca, el caudal circulante, y las relaciones entre cuenca, clima y caudal. En

muchos sistemas fluviales, las riadas y sequías son frecuentes, por lo que se proponen técnicas de análisis de cálculo del período de retorno de crecidas. Se detallan procedimientos de estima del flujo superficial e hiporreico de la carga disuelta y de la carga particulada en suspensión. La hidrología se halla relacionada con la estructura física de los cauces fluviales, lo que se plasma en técnicas para describir la morfología del cauce, el transporte de sedimentos, o bien estimas de la degradación y agradación del cauce.

Un abanico de técnicas están dedicadas al análisis de las concentraciones y transporte de los materiales inorgánicos disueltos y particulados. Se describen procedimientos estandarizados de análisis de nutrientes y también de estima de su dinámica de asimilación y transporte en sistemas fluviales. Se proponen protocolos de determinación de factores físicos de importancia para los seres vivos, tales como la luz y la velocidad de la corriente.

La dinámica y relevancia de la materia orgánica particulada y disuelta es especialmente importante en sistemas forestados de cabecera. Los materiales orgánicos son de gran necesidad para los consumidores en función de sus fracciones disuelta, particulada fina y particulada gruesa. Por ello se incluyen técnicas que describen el análisis de la materia orgánica disuelta, de la materia orgánica particulada del lecho (hojarasca, madera), de la retentividad de materiales particulados, y de la descomposición de la materia orgánica.

La biota de los sistemas fluviales es objeto de especial detalle. Se proponen técnicas específicas para microorganismos heterotróficos, algas, macrófitos, bosque de ribera, macroinvertebrados y peces. En todos estos compartimentos, las técnicas desgranar aspectos de la composición de especies, densidad y biomasa, indicadores fisiológicos y actividades metabólicas más relevantes, como producción y respiración. En los grupos más complejos (macroinvertebrados y peces) se detallan técnicas de caracterización de la estructura trófica, rasgos vitales de las especies, movimiento y producción. Este análisis se extiende a otros vertebrados (anfibios, aves, reptiles y mamíferos) que frecuentan los sistemas fluviales.

Las conexiones tróficas en el ecosistema fluvial y su interacción con las fuentes de energía autóctonas y alóctonas conducen a proponer técnicas en estequiometría, análisis de isótopos estables y metabolismo fluvial. Por último, se proponen técnicas estadísticas adecuadas al diseño experimental y análisis de los datos obtenidos.

La publicación cuenta además con numerosas macros (archivos ejecutables) que han sido producidas por los propios autores, y que se incluyen con la intención de ayudar al tedioso cálculo de algunas estimas. Se incluyen las más relevantes, tales como caudales, longitud de la asimilación de nutrientes, producción, etc.

PRÓLOGO

Para desarrollar el conjunto de aspectos que aborda este libro se ha contado con autores de muy diversa procedencia en los diversos campos de la ecología fluvial, que han expuesto su experiencia y buen hacer. Todos ellos han tenido una enorme paciencia en responder, siempre con presteza y eficiencia, a nuestras prisas y cambios no anunciados. A todos ellos, compañeras y compañeros, amigas y amigos, nuestro más sincero agradecimiento.

Por último, queremos expresar nuestra consideración a la Fundación BBVA por haber creído en este proyecto y haber financiado su edición. En especial a Cathrin Scupin (FBBVA) y a Jaume Estruch (Rubes Editorial) que nos han acompañado y guiado a lo largo de este proceso.

Y, cómo no, a nuestras familias por la inmensa paciencia que tienen con nosotros.

ARTURO ELOSEGI
SERGI SABATER

NOTA TÉCNICA

El manual *Conceptos y técnicas en ecología fluvial* aporta al profesional herramientas prácticas —disponibles en Internet—, que se suman a las técnicas descritas paso a paso en sus páginas. Así, el libro se complementa con numerosas macros, archivos ejecutables que han sido producidos por los propios autores, con el objetivo de ayudar al cálculo de algunas estimas, en especial las más relevantes como caudal, longitud de la asimilación de nutrientes y producción, entre otras.

Diseñadas por especialistas en ecología fluvial, en la elaboración de las macros se ha hecho hincapié en su sencillez y flexibilidad, con el fin de que puedan ser utilizadas por cualquier persona interesada. Por ello se ha optado por un formato universal, en libros Excel, programa ampliamente difundido por todo el mundo y en entornos diversos.

Asimismo, se ha decidido crear hojas de cálculo, con una presentación clara y concisa de contenidos e instrucciones de uso. Los archivos son consultables *on-line*. Además, se ofrece la posibilidad de descargarlos en un equipo de trabajo, en formato abierto, para que puedan ser modificados a voluntad por el usuario, así como adaptarlos a necesidades específicas. Las soluciones que ofrecen estas macros son, a menudo, aproximadas, pero hemos preferido mantener su estructura sencilla y flexible a diseñar un producto demasiado cerrado o cuyo uso requiera entrenamiento específico.

La veintena de macros u hojas de cálculo están disponibles en la página web de la Fundación BBVA (www.fbbva.es).

Presentación: importancia de los ríos

SERGI SABATER Y ARTURO ELOSEGI

1.1. Introducción

El agua le confiere a la Tierra su característica coloración azul y blanca vista desde el espacio: azul por los océanos, que cubren aproximadamente el 70% de la superficie terrestre, y blanca por las nubes que se forman en la atmósfera. El agua o la ausencia de ella son asimismo responsables de la gama de colores que observamos en los continentes, desde los ocres de los desiertos a los verdes intensos de las selvas tropicales. En un planeta modelado por el agua, los ríos sólo albergan una fracción pequeña del total del agua, 2000 km³, cifra menor que la de cualquier otro compartimento hidrológico (cuadro 1.1). Sin embargo, la constante renovación de los ríos hace que casi toda el agua circule antes o después por los cauces fluviales.

	Volumen (millones de km ³)
Océanos	1338
Agua sólida (casquetes polares, glaciares)	24,1
Acuíferos y suelo	8,1
Lagos de agua dulce	0,125
Lagos salados	0,104
Ríos	0,002 (2000 km ³)
Atmósfera	0,013

Cuadro 1.1:

Volumen de agua en los distintos compartimentos por los que discurre el ciclo hidrológico global terrestre

A pesar de la aparente modestia de los caudales que transportan, los ríos tienen una enorme importancia por conectar las cuencas terrestres con la atmósfera y con el mar, funcionando como los auténticos riñones de la Tierra. De esta forma, además de agua, transportan sales, sedimentos y organismos, y las complejas reacciones químicas y biológicas que se producen en los cauces fluviales son responsables en parte de las características químicas del agua retenida en los grandes reservorios, como lagos y océanos. Desde una perspectiva geológica, los ríos han transportado durante millones de años buena parte de los sedimentos que afloran en las orogenias y forman parte del sustrato litológico de las placas continentales. Estos sedimentos provienen de la acción de los agentes erosivos, por lo que los ríos no sólo son cruciales para entender el ciclo hidrológico, sino que su papel va más allá, hasta el ciclo de formación de rocas, la orogenia y la denudación de los continentes. En este contexto, es interesante destacar que los ríos suelen perdurar más que los lagos, ya que éstos tienden a colmatarse de sedimentos y desaparecer.

Los ríos forman una red ramificada y jerárquica, en la que los pequeños arroyos confluyen formando arroyos mayores, éstos confluyen formando ríos de mayor tamaño, y así sucesivamente. El caudal del río depende en último término del tamaño de la cuenca de drenaje y del balance entre la precipitación y la evapotranspiración. En climas húmedos el tamaño de los ríos aumenta aguas abajo, conforme van recibiendo los aportes de afluentes y de aguas subterráneas. Sin embargo, en zonas áridas, el río puede ir perdiendo agua, llegando incluso a desaparecer, como es el caso del célebre río Okavango, que desaparece en el delta del mismo nombre, a las puertas del desierto de Kalahari. Por todo ello, en función de la distancia entre las montañas y el mar, de la pendiente de la cuenca y de las condiciones climáticas, existe una enorme variedad de ríos, desde arroyos cortos y pendientes que nacen a poca distancia de su desembocadura hasta ríos de miles de kilómetros de longitud. Así, las dimensiones de los cauces fluviales abarcan varios órdenes de magnitud: desde unos centímetros hasta varios kilómetros de anchura o desde unos milímetros hasta 50 m de profundidad. El río más largo del mundo es el Nilo, con más de 6600 km de longitud, y el más caudaloso es el Amazonas, que aporta una quinta parte de la cantidad de agua transportada por todos los ríos del mundo al mar. Estas diferencias en las dimensiones determinan grandes diferencias en el tamaño y diversidad de los organismos fluviales. Sin embargo, por la estructura dendrítica de la red de drenaje, los pequeños arroyos dominan tanto en su longitud como en la superficie de cauce acumuladas, por lo que es en ellos donde se dan buena parte de las interacciones entre el medio terrestre y el acuático. Su significado a escala global trasciende su aparente pequeño tamaño.

La larga pervivencia y la estructura dendrítica de los ríos tienen implicaciones interesantes para la biota de los ecosistemas fluviales. Por un lado, algunos ríos tienen millones de años de existencia, lo que ha permitido la adaptación de las

comunidades a las condiciones locales y favorecido la especiación. Este hecho, unido a los marcados gradientes en condiciones ambientales, explica que los ríos y sus márgenes alberguen buena parte de la biodiversidad del mundo (Naiman y Décamps 1990), así como algunas de las zonas de mayor productividad biológica. La biodiversidad de las comunidades fluviales varía mucho de unas zonas a otras, como consecuencia de múltiples factores. Entre estas variaciones puede incluirse la de las condiciones climáticas, así como los factores históricos y biogeográficos que difieren entre zonas del planeta. Sin embargo, la propia dinámica fluvial puede ser responsable en parte de esa biodiversidad, como, por ejemplo, cuando la migración de meandros forma mosaicos extraordinariamente diversos en el paisaje, que promueven una mayor diversidad de organismos.

El carácter unidireccional de la corriente implica que existe una relación asimétrica entre las comunidades de tramos altos y las de tramos bajos. Son estas últimas las que reciben los aportes de alimento y desechos que escapan a las primeras, así como una lluvia constante de propágulos e individuos (Margalef 1983). Por otra parte, en cualquier red fluvial hay numerosos tramos de cabecera pero sólo unos pocos tramos bajos, lo que implica que hay más posibilidades de colonización para los organismos de tramos más altos. Los ríos son sistemas que reciben recurrentemente perturbaciones en forma de avenida o sequía, más o menos regulares según el clima del que se trate. La resiliencia fluvial es paradigmática; la biota es recolonizada desde río arriba o lateralmente y así se recupera fácilmente en los tramos afectados por la perturbación. Sin embargo, la recolonización no es fácil para todos los organismos, y en algunos casos es especialmente complicada, ya que los organismos a menudo deben realizar grandes rodeos a lo largo de la red de drenaje. Las posibles vías de recolonización cambian con el tiempo, cuando los avatares de la tectónica de placas conectan cuencas antes desconectadas, lo que tiene su reflejo en la distribución actual de ciertos grupos de peces.

1.2. Estructura y funcionamiento del ecosistema fluvial

La caracterización ecológica de los ríos puede llevarse a cabo sobre la base de su estructura y funcionamiento (Allan y Castillo 2007). Entendemos por *estructura* de los ecosistemas aquellas características del medio abiótico que forman el escenario en el que se desarrolla el ecosistema, y de las comunidades de organismos que constituyen sus actores principales. Por *funcionamiento* de los ecosistemas, habitualmente se entienden los procesos que ocurren en los mismos, y que están determinados tanto por el medio abiótico como por los organismos. En el caso de los ecosistemas fluviales, su estructura está ligada a la forma y dimensiones del cauce, a la calidad química del agua, a la diversidad de hábitats y a las distintas comunidades biológicas que se establecen en los mismos. Su funcionamiento está ligado

Como todos los ecosistemas, los ríos se pueden caracterizar según su estructura y funcionamiento

a procesos como el transporte y retención de sedimentos, nutrientes o materia orgánica, o por la fotosíntesis de algas y otros productores primarios, por poner unos ejemplos. Hay interrelaciones obvias entre estructura y funcionamiento. Así, el caudal transportado por el río y sus variaciones temporales determinan la configuración geomorfológica y la estructura del hábitat fluvial. Asimismo, el tipo y la cantidad de materiales que llegan al sistema determinan sus características químicas. Finalmente, la biota responde a las dos características anteriores y a elementos históricos, a veces muy lejanos, que son característicos de la cuenca, y puede modificar en buena medida su propio entorno, como cuando retiene nutrientes depurando las aguas.

La integración entre la biota y el medio físico es dinámica, espacial y temporal

Hay numerosas concepciones aceptadas socialmente que no encajan en lo que entendemos como *funcionamiento ecológico* de los sistemas acuáticos. Una, que el agua transportada puede (y debe) ser aprovechada íntegramente. En los viejos libros de texto se hablaba del «agua que se pierde al mar», como razón de atraso secular. Otra concepción socialmente aceptada es que el río es un simple canal que transporta agua, y que debe hacerlo sin interrupciones, sin importar el estado en que éste se encuentre. Sin embargo, en realidad el agua que transporta el río es resultado de lo que acontece en su cuenca (el clima, la vegetación, las actividades humanas) y, así, es resultado de su viaje a través de los suelos, vegetación, y áreas urbanas. Periódicamente, el río llena todo su cauce, lo que le permite regenerarse estructuralmente. La integración entre la biota y el medio físico (hidrológico, geomorfológico, químico) es dinámica, tanto en el sentido espacial como en el temporal. El río, pues, no es sólo el cauce por el que circula el agua, sino también la zona de ribera, sus meandros, la llanura aluvial... y las complejas comunidades de organismos que viven en todos estos compartimentos.

1.3. Los ríos y la humanidad

La humanidad ha estado desde siempre íntimamente ligada a los ríos, como lo demuestran los numerosos hallazgos de homínidos fósiles en África y otras partes del mundo, asociados a menudo a depósitos aluviales. Es de suponer que aquellos ancestros explotarían los recursos disponibles en las ricas llanuras aluviales, como han venido haciendo desde entonces innumerables generaciones de recolectores y cazadores primero, y de agricultores y ganaderos después. La trascendencia social de los ríos tiene, pues, raíces históricas (Moss 1998) y numerosas poblaciones, ciudades e incluso regiones se han organizado a lo largo de los cursos fluviales. Muchas de las primeras civilizaciones se desarrollaron íntimamente asociadas a ríos, como el Tigris y el Éufrates. La civilización del Antiguo Egipto supo aprovechar el papel fertilizador de las crecidas del Nilo para prosperar en una región por lo demás muy árida.

En el mundo existen numerosos tipos de ríos, desde las ramblas temporales mediterráneas o los ríos que atraviesan el desierto, a los arroyos de montaña andinos, pasando por los grandes ríos tropicales como el Amazonas, o los ríos de llanura pampeanos. Cada tipo de río tiene sus características propias, pero también hay una serie de patrones comunes que determinan la distribución y abundancia de las comunidades biológicas, y el funcionamiento del ecosistema en relación con sus comunidades y los factores ambientales. Además de ser fuente de recursos valiosos, como agua, pesca, o suelos fértiles, los ríos han sido utilizados secularmente como vías de transporte. Ya los constructores de Stonehenge supieron aprovechar el cercano río Avon para acarrear las enormes rocas desde decenas de kilómetros de distancia, e innumerables viajeros y exploradores de la historia han viajado a lo largo de los ríos como la forma más fácil de moverse, como hicieron Clark y Lewis en su famosa expedición que cruzó Norteamérica de este a oeste. A menudo, para facilitar su movilidad, el hombre ha alterado profundamente los cursos fluviales. Un caso bien documentado es el de la enorme acumulación de troncos que bloqueaba de forma ininterrumpida 300 millas en el Red River, en Oklahoma, y que sólo pudo ser eliminada tras casi un siglo de trabajo ininterrumpido por parte del Cuerpo de Ingenieros del Ejército de Estados Unidos, lo que da una idea del enorme cambio que debió producir en las características del ecosistema. A mayor capacidad tecnológica mayor ha sido la magnitud de los cambios que ha producido la humanidad en los ríos, de forma que buena parte de los cursos fluviales del mundo se hallan profundamente modificados. Los cauces han sido dragados, rectificados, resecionados, las márgenes protegidas por motas, se han construido grandes esclusas para facilitar la navegación, etc. Así, ríos como el Misisipí, el Rin, el Danubio o el Yangtsé son importantísimas vías de transporte hoy en día. Estos cambios no dejan de producir consecuencias no deseadas como, por ejemplo, el progresivo hundimiento del delta del Misisipí por dejar de recibir los aportes de sedimentos fluviales, y que contribuyó al desastre del huracán Katrina en Nueva Orleans.

Los usos sobre el río incluyen el abastecimiento de agua para consumo o para regadío, la navegación, la pesca y la obtención de energía hidroeléctrica. En muchos países la pesca fluvial es una de las principales fuentes de proteínas, o un recurso económico de primer orden. En otros, paisaje fluvial y pesca deportiva son considerados atractivos turísticos y proporcionan relevantes ingresos. Con el incesante crecimiento de la población humana y del consumo per cápita aumenta la presión humana hacia los ecosistemas fluviales y, a menudo, se producen conflictos, difícilmente compatibles, entre los distintos usos. Ello puede crear problemas ecológicos y sociales, en algunos casos de proporciones alarmantes. El número de conflictos armados producidos en torno a los recursos naturales está aumentando, y es posible que el agua sea una fuente de problemas interna-

Aunque sólo una parte muy pequeña del agua se encuentra en los ríos, éstos tienen una gran relevancia, tanto ecológica como social

cionales en el siglo XXI, posiblemente agravados en algunas áreas por las consecuencias del cambio climático.

Los problemas sociales asociados al uso del agua no son algo nuevo, y comportan consecuencias para los sistemas fluviales. Gran número de patógenos tienen sus vectores en organismos acuáticos, y la baja calidad del agua ha estado asociada a epidemias de enfermedades infecciosas, especialmente en asentamientos humanos densos. Igualmente, la contaminación es un problema muy antiguo. Ya 1000 años antes de nuestra era, las explotaciones mineras en el sur de la península Ibérica produjeron una contaminación aguda por metales en los ríos Tinto y Odiel, y su acumulación en sedimentos estuarinos. La contaminación de los ríos aumentó en gran medida con la revolución industrial, en una época en que los avances tecnológicos parecían mucho más importantes que los daños ambientales que pudieran producirse. Nuevos tiempos trajeron nuevas formas de contaminación, como plaguicidas sintéticos, disruptores endocrinos y productos farmacéuticos. Así, iniciamos el siglo XXI como una época de crisis ambiental global. La huella ecológica humana ha aumentado de forma tal que afecta a todo el planeta, siendo difícil de ignorar incluso por los más escépticos. Urge replantearse nuestra relación con la naturaleza, y las bases mismas de nuestra sociedad deben adaptarse a la realidad de un mundo fuertemente humanizado, cuyos límites están muy cercanos.

1.4. Los servicios de los ecosistemas fluviales

La estrecha relación de muchas civilizaciones con los ríos es un claro indicador de que aquellas utilizan algunos de los servicios que éstos ofrecen. Si se olvidan las complejas conexiones entre estructura y funcionamiento, se puede gestionar inadecuadamente los ríos y poner en peligro los servicios que los ecosistemas fluviales proporcionan a la sociedad de manera gratuita (Anonymous 2005), y de los que nos beneficiamos inadvertida y vorazmente. Por servicios ecosistémicos se entiende aquellas funciones que desarrollan los ecosistemas y que se traducen en beneficios para la calidad de vida de las sociedades humanas. Los servicios pueden cuantificarse, tanto en cuanto a su eficiencia en relación con un proceso concreto, como en cuanto a su coste económico, que no se imputa normalmente (Costanza et al. 1997). Aunque esto no es objeto de discusión aquí, sirva como reflexión para valorar adecuadamente los beneficios que proporcionan los ecosistemas fluviales de manera gratuita, así como las dificultades en evaluarlos (Sabater 2008). Entre los servicios que proporcionan los ecosistemas fluviales (cuadro 1.2) y que mayor repercusión tienen sobre las sociedades humanas se puede citar la disponibilidad de agua de calidad, la protección ante las perturbaciones o la producción de alimentos.

• Disponibilidad de agua
• Producción de comida y otros bienes (pesca, madera...)
• Regulación del clima
• Regulación de gases con efecto invernadero (CO ₂ , metano)
• Regulación de perturbaciones (avenidas)
• Reciclaje de nutrientes (depuración de agua)
• Tratamiento de materiales (sedimentos, materiales orgánicos)
• Turismo y cultura

Cuadro 1.2:

Funciones de los ecosistemas fluviales que pueden traducirse en servicios

El concepto de *servicios* de los ecosistemas tiene su paralelo en el de los *bienes comunes*. Por bienes comunes se entienden aquellos cuya propiedad se comparte entre todos: agua, pastos, pesca... El problema que pueden sufrir los bienes comunes es su uso irracional, motivado precisamente por la ausencia de un propietario claro y por su gratuidad, que promueve su uso intensivo sin preocupación de sostenibilidad. Es lo que Hardin (1968) denominó la *tragedia de los bienes comunes*. Por ello, la eficacia de estos servicios está directamente relacionada con el funcionamiento del ecosistema, con su eficiencia y grado de conservación, y con la posibilidad que el sistema mantenga su dinamismo espacial y temporal.

Los ríos prestan numerosos servicios a la sociedad, algunos de gran valor económico

1.5. Bibliografía

- ALLAN J.D., y CASTILLO M.A. *Stream ecology: Structure and function of running waters*. Dordrecht: Springer, 2007.
- ANONYMOUS. *Ecosystems and human well-being. Synthesis*. Millenium Ecosystem Assessment, 2005.
- COSTANZA R., D'ARGE R., DE GROOT R., FARBER S., GRASSO M., HANNON B., LIMBURG K., NAEEM S., O'NEILL R.V., PARUELO J., RASKIN R.G., SUTTON P., y VAN DEN BELT M. «The value of the world's ecosystem services and natural capital». *Nature* 387 (1997): 253-260.
- HARDIN G. «The tragedy of the commons». *Science* 162 (1968): 1243-1248.
- MARGALEF R. *Limnología*. Omega, 1983.
- MOSS B. *Ecology of freshwaters. Man and medium, past to future*. Londres: Blackwell, 1998.
- NAIMAN R.J., y DÉCAMP S. H. (eds.). *The ecology and management of aquatic-terrestrial ecotones*. Man and Biosphere Series, 4, Parthenon, Unesco, 1990.
- SABATER S. «Alterations of the global water cycle and their effects on river structure, function and services». *Freshwater Reviews* 1 (2008): 75-88.

El río como ecosistema

SERGI SABATER, JHON CHARLES DONATO, ADONIS GIORGI Y ARTURO ELOSEGI

2.1. Introducción

El inglés Tansley acuñó en 1935 el concepto de *ecosistema*, que definió como la porción de naturaleza más pequeña capaz de mantener la vida. Sin embargo, hoy en día se utiliza este término de forma más laxa, para hacer referencia a cualquier parte de la biosfera, sin olvidar que el ecosistema está constituido por numerosos elementos, relacionados mediante una serie compleja de flujos de materia y energía, además de bucles interactivos. En la práctica, se utilizan dos criterios para definir el ámbito físico de los ecosistemas. Uno es puramente metodológico y define los límites del ecosistema en cuanto a métodos de trabajo. Así, se habla de ecosistemas acuáticos continentales, de ecosistemas marinos y de ecosistemas terrestres. El segundo criterio está basado en los flujos de materia. Según éste, los límites de los ecosistemas se establecen en función de las áreas que conforman sistemas más cerrados, es decir, que intercambian menos materia con el entorno. En este sentido, y refiriéndonos a los ecosistemas fluviales, el ecosistema sería el conjunto de la cuenca fluvial, ya que los cauces dependen en buena medida de los aportes de materia (agua, nutrientes, alimentos) de la cuenca. Si bien ésta es la aproximación más rigurosa, que nos recuerda que para entender lo que ocurre en el cauce hay que mirar a menudo lejos de él, también es cierto que las técnicas, el núcleo de este libro, son distintas en los ríos y en sus cuencas, y las aproximaciones son específicas. Por ello, la cuenca será un aspecto a tener en cuenta en algunas variables (como la química de las aguas), pero el cauce bastará para otros.

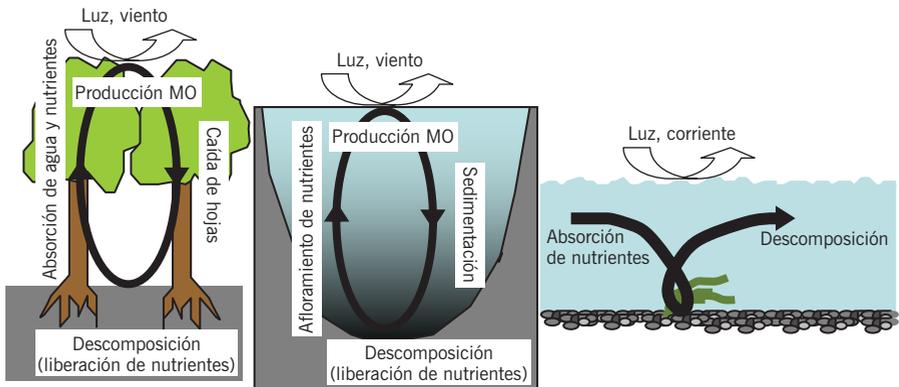
Los ecosistemas consisten en una comunidad de seres vivos y un entorno físico, mutuamente interdependientes

Los ecosistemas están constituidos por su componente abiótico y por la comunidad de seres vivos, que se adaptan a las características ambientales, pero también las modifican; como cuando los microbios consumen oxígeno hasta llevar algunos ríos a estados de anoxia, o los castores cambian de forma drástica la morfología y el funcionamiento fluvial. Los componentes bióticos y abióticos interactúan siguiendo patrones complejos. Por ejemplo, en algunos ríos, al reducirse el caudal disminuye la velocidad del agua y se favorece la colonización de macrófitas; éstas incrementan la sedimentación y reducen aún más la velocidad del agua llegando a modificar la morfología del cauce.

Además, los ecosistemas presentan un funcionamiento, que en su forma más simple se puede describir como un flujo de energía, proveniente en buena medida del sol, que empuja el reciclaje de materia, como el agua de un río empuja la rueda de un molino. Este esquema general es más literal de lo que parece (fig. 2.1) y funciona en todos los ecosistemas (Schlesinger 2000), aunque como veremos en los capítulos correspondientes, en los ríos el reciclado ocurre en espiral, según la materia va siendo arrastrada aguas abajo.

Todos los ecosistemas dependen para su funcionamiento de entradas de energía, especialmente energía lumínica, que las plantas y otros productores primarios utilizan para sintetizar materia orgánica a partir de nutrientes inorgánicos simples. La producción primaria es, por tanto, un paso clave del que depende el presupuesto energético de toda la comunidad biológica. La principal forma de producción primaria es la fotosíntesis, aunque hay otras vías (como la nitrificación o la oxidación de hierro reducido) que, en determinadas condiciones, pueden ser

Figura 2.1:
Esquema del funcionamiento ecológico de un bosque (izquierda), de un lago (centro) y de un río (derecha)



Nota: En todos los casos, los productores primarios utilizan nutrientes inorgánicos y luz para sintetizar materia orgánica. En el caso del lago y del bosque, ésta va acumulándose en el fondo hasta que es descompuesta, liberando nutrientes inorgánicos. La energía del viento y de la corriente remueve estos nutrientes en el lago, poniéndolos a disposición de los productores. En el caso del río, todo esto ocurre conforme la materia va siendo arrastrada aguas abajo.

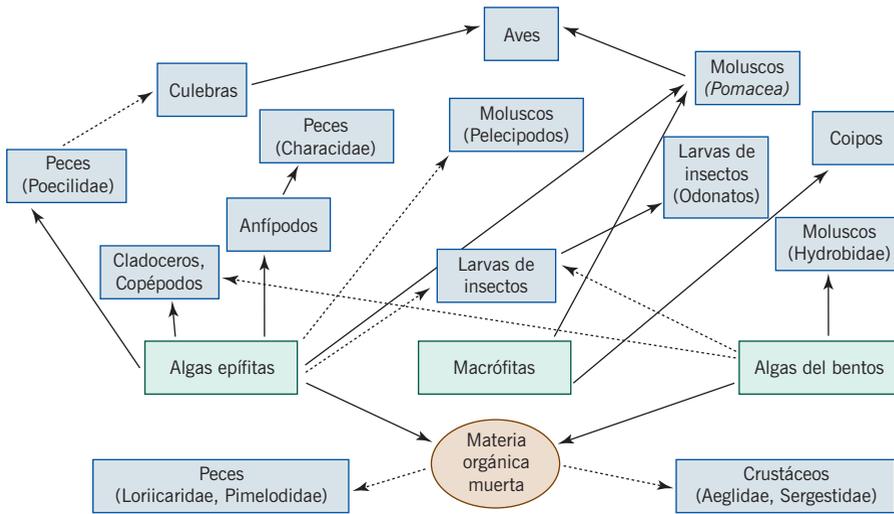


Figura 2.2:
Ejemplo de red trófica en un río pampeano, donde se muestra de un modo simplificado la complejidad de las interacciones tróficas

Fuente: Modificado de Giorgi et al. (2005).

importantes. La materia orgánica sintetizada por los productores es utilizada como fuente de alimento, es decir, fuente de materia y energía, por los heterótrofos: los animales consumidores y los microbios descomponedores. Aunque todos los heterótrofos funcionan de forma similar, los microbios suelen tener una tasa metabólica mucho más elevada, por lo que a menudo dominan la respiración de los ecosistemas, a pesar de su escasa visibilidad.

De esta manera, la energía acumulada por los productores en forma de materia orgánica va siendo utilizada por consumidores y descomponedores. La evolución ha producido innumerables tipos de heterótrofos, con unas dietas muy variadas, de forma que la energía se va canalizando a lo largo de complejas redes tróficas, de plantas a herbívoros, de herbívoros a carnívoros, de éstos a supercarnívoros, etc. A partir de un 100% de energía solar incidente los productores sólo fijan alrededor del 1%, y cada eslabón suele fijar tan sólo el 10% de la energía que recibe (fig. 2.2). Sin embargo, al depender los ríos en gran medida de los aportes externos de materia orgánica, los organismos que viven en ellos no tienen un control tan grande como los terrestres sobre sus fuentes de alimentación, lo que ha llevado a la proliferación de especies oportunistas, con unas dietas muy flexibles en función de la disponibilidad de alimentos.

La importancia de la energía que circula en forma de materia orgánica a través de las redes tróficas es evidente. Además, hay otro flujo de energía que tiene gran importancia, la energía auxiliar o exosomática, que favorece una elevada producción primaria aunque no sea directamente incorporada a materia orgánica. En el caso

de los ríos, la principal fuente de energía exosomática es la turbulencia asociada a la corriente del agua, que renueva constantemente el entorno de cada organismo, trayendo nuevos nutrientes y alimentos, y alejando desechos. Como resultado de esta turbulencia, por ejemplo, las algas de los ríos son capaces de crecer con concentraciones de nutrientes extremadamente bajas. La corriente, por tanto, es una de las características principales de los ecosistemas fluviales. Facilita la renovación de nutrientes, pero a la vez impone fuertes restricciones a los organismos, por lo que ha acabado modelando muchos de sus rasgos vitales.

Todos los ecosistemas cambian con el tiempo, conforme las especies se van sucediendo, y a distinta escala, por las perturbaciones ambientales que puedan acontecer. En los ríos, las perturbaciones más frecuentes suelen ser las riadas o avenidas, que arrastran gran parte de los organismos dejando zonas libres para los colonizadores. Las especies fluviales se han adaptado a estos entornos cambiantes, desarrollando mecanismos que favorecen la recolonización y facilitan una rápida recuperación de la comunidad tras la perturbación. Estos cambios sucesionales, similares a los producidos tras la quema de un bosque en un ecosistema terrestre, ocurren a gran velocidad en los ríos, pero están constreñidos por el hecho de que la colonización es mucho más fácil aguas abajo que aguas arriba. El medio fluvial es una red ramificada y alargada de cauces, y en la red de drenaje de cualquier río hay muchos arroyos de cabecera, bastantes menos tramos medios y muy pocos tramos bajos. Ello provoca un número distinto de cada tipo de hábitat fluvial. Además, la dinámica temporal de las comunidades depende de la conectividad de cada tramo a escala de paisaje; por ejemplo, la recuperación tras una perturbación depende de la extensión del tramo afectado, de la existencia o no de recolonizadores potenciales en las cercanías, y de la movilidad de los mismos a través de la red de drenaje.

2.2. El río, sistema dinámico y complejo

Los ríos son ecosistemas
muy dinámicos y
complejos

Los ríos son ecosistemas extremadamente complejos. Tienen numerosos componentes únicos, especialmente relacionados con la organización física en el eje horizontal (Vannote et al. 1980). Las características geológicas y el clima son los factores clave que explican las diferencias entre ríos de distintas latitudes y biomas. Densidad y tipo de vegetación, meteorización y desarrollo de los suelos, pendiente de la cuenca y caudal circulante son parámetros descriptivos de la cuenca que dependen de la geología y del clima (fig. 2.3). En cuanto al sistema fluvial en su sentido más estricto, el régimen de caudales, las diferencias en la química de las aguas y en las comunidades biológicas, así como el funcionamiento general del ecosistema, no pueden explicarse si no es a partir de las características litológicas y del clima (Allan y Castillo 2007).

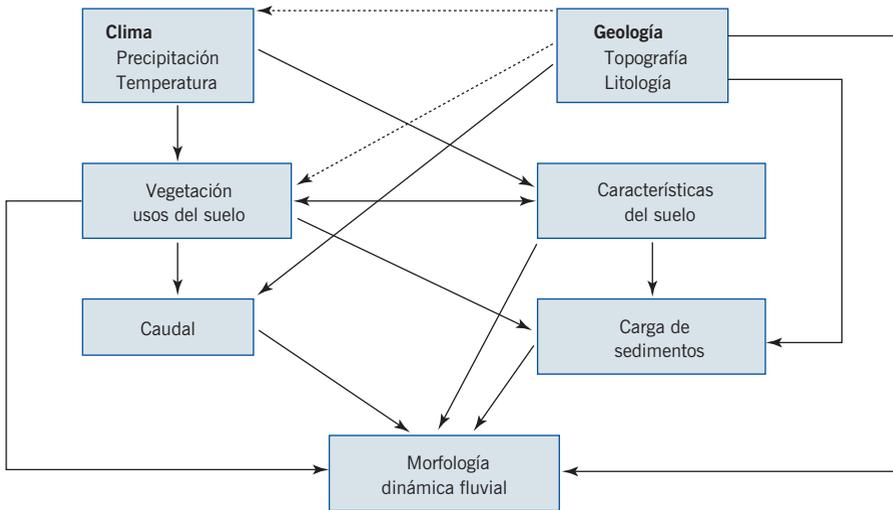


Figura 2.3:
Factores de la cuenca que determinan la morfología y dinámica del sistema fluvial

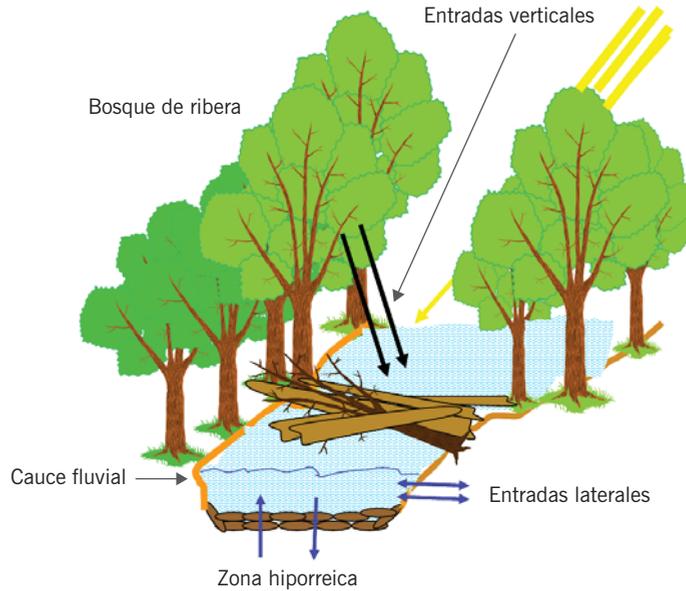
Fuente: Adaptado de Morisawa (1985).

Todo ello hace del río un sistema dinámico y complejo. Su complejidad es evidente si observamos su estructura hidrográfica, organizada jerárquicamente de forma que los afluentes confluyen sucesivamente para formar cauces más y más anchos. La estructura del ecosistema fluvial (el cauce, la zona de ribera, la llanura de inundación, la zona hiporreica; véase fig. 2.4) cambian en tamaño y complejidad como respuesta a la hidrología, que determina el trabajo cinético del agua y la distribución de los sustratos y materiales transportados. El dinamismo fluvial se expresa tanto en el espacio como en el tiempo. Especialmente, esta heterogeneidad marca la gran diferencia entre tramos de cabecera, y tramos medios y bajos, con una pendiente decreciente, mayor anchura, profundidad y caudal.

La gran heterogeneidad espacial de los ríos se corresponde con su elevado dinamismo temporal. Las variaciones de caudal determinan que las comunidades de organismos que habitan en época de aguas altas no sean las mismas que se encuentran en situaciones de aguas bajas. La llegada de materiales disueltos y particulados varía con el tiempo y con las variaciones hidrológicas y los cambios en el medio terrestre circundante, al igual como lo hace la disponibilidad de luz. La composición de la biota responde a la disponibilidad de materiales (materia orgánica y nutrientes disueltos) y de energía (luz, velocidad del agua), con lo cual varía tanto espacial como temporalmente.

La dinámica fluvial se expresa también en el transporte de las sustancias disueltas y particuladas. La carga disuelta proviene en su mayor parte del agua de lluvia y

Figura 2.4:
 Esquema de los
 compartimentos existentes
 en un río de cabecera e
 indicación de algunas de las
 principales interacciones
 entre ellos



de los iones que ésta disuelve del suelo o por meteorización química de la roca madre. La carga particulada corresponde a la erosión y transporte de sedimentos de la cuenca, y comprende materiales que varían en tamaño desde arcillas coloidales hasta rocas, y desde hojas hasta troncos. Las concentraciones de los solutos en los ríos cambian con el caudal y con el origen de las aguas que llegan al río. A medida que aumenta el caudal, las concentraciones disminuyen, puesto que una proporción cada vez mayor del agua proviene de la lluvia, que suele ser pobre en nutrientes.

Uno de los principales elementos del ecosistema fluvial es el *cauce*. A escala de tramo, el cauce suele presentar gran diversidad de formas, con rápidos y pozas, presas de materiales orgánicos, barras de sedimento, etc., que constituyen hábitats donde aparecen comunidades biológicas diferenciadas. Los organismos que viven en rápidos necesitan mecanismos de sujeción, disponen de elevadas concentraciones de oxígeno y los materiales (disueltos y particulados) son renovados de manera continua; los que viven en pozas lo hacen en un medio mucho menos turbulento, pero a menudo deben afrontar bajas concentraciones de oxígeno. El hábitat físico del cauce determina en buena parte el funcionamiento biológico fluvial.

Otro elemento esencial del ecosistema fluvial es la *zona de ribera* y la *llanura de inundación* (fig. 2.4), que suelen quedar cubiertas de agua en períodos de crecida. La vegetación de ribera es una interfase entre los ecosistemas terrestres vecinos, el agua freática y el cauce fluvial. La vegetación de ribera intercepta el paso de sedimentos y nutrientes disueltos. En particular, una franja de un metro de ancho

puede retener hasta el 30% de los nitratos, como consecuencia de su utilización por la vegetación terrestre y de la desnitrificación microbiana en el suelo. Además, la zona de ribera es un auténtico *corredor biológico* y una zona de *reserva* para la flora y la fauna en los ecosistemas terrestres vecinos, hasta el punto que más del 60% de las especies de todo el mundo viven en riberas fluviales. La tala, destrucción y modificación de la vegetación de ribera, reducen la calidad del hábitat fluvial y el funcionamiento del ecosistema, tales como el procesado de materia orgánica, la incorporación de nutrientes, la población de peces, etc.

Además del cauce y de las márgenes, los ecosistemas fluviales tienen un componente subterráneo que no se ve, pero que tiene gran importancia: el *hiporreos*, o río inferior. Efectivamente, buena parte del agua que transportan los ríos no discurre como agua superficial, sino entre los sedimentos (fig. 2.4), donde adquiere particulares características que difieren de las superficiales. En el hiporreos suele haber gradientes marcados en el estado de oxidación-reducción de las aguas, lo que posibilita que ocurran toda una serie de procesos biogeoquímicos acoplados, como la nitrificación, desnitrificación, mineralización de materiales orgánicos, etc. Estos procesos cobran gran importancia, por ejemplo, en la auto-depuración de las aguas, que es especialmente intensa en ríos con un hiporreos bien diferenciado y un hábitat físico complejo.

Tanto las riberas como la llanura de inundación son componentes esenciales de los ecosistemas fluviales

2.3. La biota de los ecosistemas fluviales

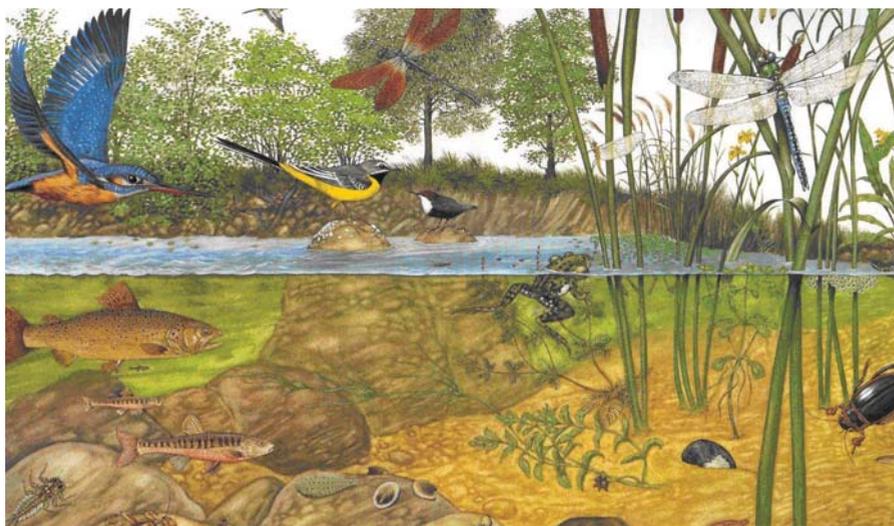


Figura 2.5:
Esquema de la biota típica en un río ibérico. Organismos de aguas rápidas (izquierda) y de aguas lentas (derecha)

Fuente: Ilustración de Ángel Domínguez Gazpio, publicada en *Ríos de Bizkaia* por la Diputación Foral de Bizkaia (2002). Reproducida con autorización.

2.3.1. MICROORGANISMOS: BACTERIAS, HONGOS Y ALGAS

Los microorganismos, planctónicos o bentónicos, tienen gran importancia en el funcionamiento de los ríos

Los microorganismos, fundamentalmente algas, bacterias, hongos y protozoos, son muy abundantes y de gran importancia en todo tipo de ríos. En pequeños arroyos forman el *biofilm*, un amalgamado complejo de organismos imbuidos en una matriz de mucílago, que recubre el lecho del río. En ríos más profundos y lentos se desarrolla una comunidad análoga en la columna de agua (*plancton*). Las comunidades microbianas tienen gran importancia en la dinámica de sustancias disueltas, tanto nutrientes inorgánicos como materia orgánica.

Las bacterias se encuentran tanto en la columna de agua como formando parte del biofilm. La biomasa bacteriana puede llegar a representar hasta un 10% de la biomasa microbiana del biofilm, pero es muy variable en función de los sustratos a los que se adhiere. En los ríos más lentos se desarrolla una comunidad planctónica bacteriana en íntima relación con las partículas que transporta el sistema. Los hongos acuáticos (en particular los hifomicetos) crecen preferiblemente sobre los sustratos orgánicos (hojas, ramas), pero también sobre sustratos inorgánicos del lecho del río. Estos organismos forman filamentos (hifas) y se reproducen mediante la producción de esporas. En ríos forestados, los hongos abundan especialmente cuando la hojarasca se deposita en el lecho, normalmente en otoño. Las bacterias y los hongos realizan la crucial función del reciclaje y reutilización del material orgánico que entra en el ecosistema, tanto el derivado de los productores primarios, como de la hojarasca, ramas y madera. Estos microorganismos sintetizan enzimas que son capaces de descomponer las moléculas orgánicas complejas y de gran tamaño, para así incorporarlas a su organismo como fuente de nutrientes. En general, los hongos tienen una mayor capacidad para la descomposición de material vegetal complejo como la celulosa y la lignina, mientras que las bacterias muestran una mayor capacidad para descomponer polisacáridos y péptidos.

Las algas son microorganismos capaces de realizar la fotosíntesis, usando para ello los nutrientes inorgánicos disueltos en el agua y la energía de la luz solar. La mayoría de sustratos inundados a los que llega la luz (sedimentos, arenas, cantos rodados e incluso plantas acuáticas) acaban recubiertos por una cubierta algal, generalmente de pequeño grosor y coloración variable según la composición mayoritaria de la comunidad. Las algas del biofilm, debido a su rápido crecimiento y ubicuidad, son las principales responsables de la producción primaria en ríos poco profundos. En cuanto a los sistemas fluviales tropicales, la composición y dinámica de los productores primarios suele venir controlada por las variaciones en el caudal (fig. 2.6).

Los productores primarios suspendidos en la columna de agua constituyen el *fitoplancton*. Incluyen algas, protozoos y cianobacterias. La contribución del fito-

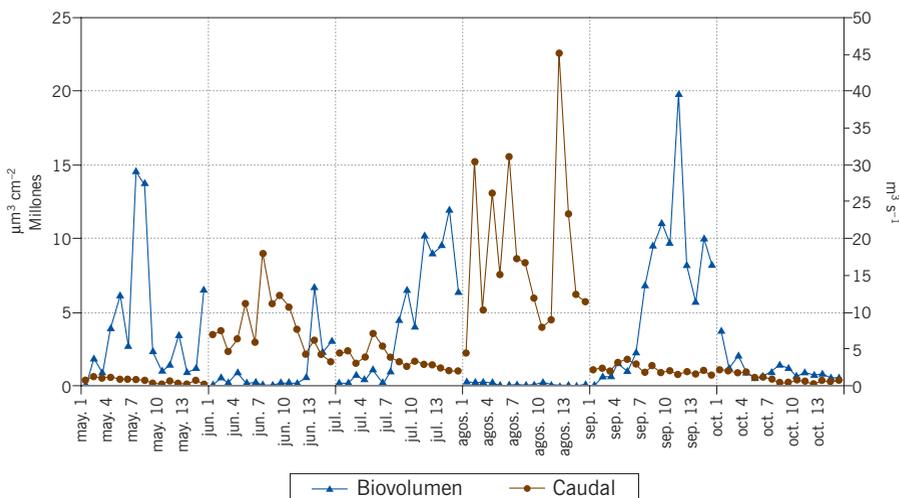


Figura 2.6: Variaciones diarias y mensuales en el biovolumen de la comunidad de diatomeas bentónicas de un río tropical andino y su respuesta al caudal

Fuente: Castellanos y Donato (2008).

plancton a la producción primaria adquiere un papel predominante en los tramos bajos de los ríos, donde la disponibilidad de nutrientes, luz, baja pendiente y velocidad reducida favorecen su crecimiento. Sin embargo, en cursos fluviales altos, el agua discurre excesivamente rápida para permitir el desarrollo de organismos planctónicos.

2.3.2. PRODUCTORES PRIMARIOS DE MAYORES DIMENSIONES: MACRÓFITOS

Con la denominación de *macrófitos* se incluyen algas de grandes dimensiones como los filamentos de *Cladophora*, plantas vasculares como el lirio de agua, líquenes acuáticos, musgos y hepáticas. Las plantas vasculares se desarrollan en aguas poco turbulentas, ya que necesitan sustratos blandos en los que enraizar. Se encuentran macrófitos en pequeños ríos, tramos medios de grandes cursos de agua, y en las márgenes y zonas estancadas de las partes bajas. Los musgos tienen una distribución mucho más restringida, limitada a climas fríos y tramos sombríos de cabecera. Muy a menudo, las comunidades de macrófitos constituyen auténticas áreas de refugio para organismos de pequeñas dimensiones, ya que proporcionan un hábitat estable y protegido. Algunos, simplemente quedan adheridos a sus paredes (epífitos), mientras que otros se desarrollan al amparo de la masa macrofítica. Los macrófitos, por sus dimensiones y estructura, son capaces de interceptar y cambiar las condiciones locales de flujo, con lo que modifican las condiciones del hábitat fluvial. En condiciones adecuadas de iluminación puede desarrollarse gran diversidad de plantas vasculares, algunas sumergidas, otras emergentes y aun otras flotantes.

En aguas lentas los macrófitos estructuran el hábitat fluvial

2.3.3. INVERTEBRADOS

Los invertebrados constituyen uno de los grupos de organismos fluviales más diversos. Se distinguen dos categorías, en función del tamaño: meiofauna y macroinvertebrados

Los invertebrados fluviales se agrupan por conveniencia en dos categorías, en función de su tamaño: meiofauna y macroinvertebrados. La *meiofauna* es un componente poco conocido en el que abundan algunos crustáceos, rotíferos, tardígrados y estadios menores de organismos superficiales. Tiene un relevante papel en el procesamiento del material fino y de los sedimentos. Los *macroinvertebrados* son los principales consumidores de materia orgánica particulada. Se trata de uno de los grupos más diversos y mejor estudiados de los sistemas acuáticos que aparecen en gran abundancia en todo tipo de ríos. Desde la cabecera hasta la desembocadura, los cambios en el río ofrecen múltiples hábitats a los invertebrados. A pequeña escala, la secuencia de rápidos y remansos ofrece un complejo de espacios que acogen a muy diversos grupos biológicos como crustáceos (anfípodos y cangrejos), moluscos (caracoles y bivalvos) y larvas de insectos (dípteros, hemípteros, homópteros y coléopteros). Los lechos cubiertos de gravas, cantos rodados y piedras albergan la mayor variedad de grupos. En cambio, las áreas donde se acumulan partículas de menor tamaño (arenas, limos) son poco estables y la difusión de oxígeno es más limitada. Otras especies viven y se alimentan de la madera en descomposición, especialmente en las cabeceras de ríos forestados. Los musgos y los macrófitos pueden ser también un buen sustrato en el cual vivir, tanto en su superficie como en su interior, excavando pequeñas galerías.

Esta diversidad, en cuanto a ocupación de espacios, concuerda con las variadas estrategias de aprovechamiento de los recursos. Los macroinvertebrados responden a diferentes estrategias alimentarias. Pueden alimentarse de detritus orgánicos como hojarasca, de biofilm que crece sobre las piedras, así como de otros animales. La disponibilidad de alimentos depende del tamaño del río, del tipo de sustrato o de la existencia del bosque de ribera. En los ríos bien iluminados proliferan los productores primarios y, en consecuencia, abundan los ramoneadores. En arroyos forestados, la hojarasca puede ser la principal fuente de alimento. Las hojas que caen al río se colonizan de microorganismos (bacterias y hongos especialmente), que aumentan el valor nutritivo de éstas. Esos materiales son consumidos por invertebrados fragmentadores como crustáceos o insectos, de manera sucesiva hasta casi su completa eliminación.

2.3.4. PECES

Por su papel como consumidores, los peces tienen gran influencia en las redes alimentarias

Los peces son organismos altamente diversificados. Hay especies alguívoras (consumen algas), detritívoras (consumen materia orgánica como hojarasca), insectívoras (consumen insectos), planctófagas (consumen plancton) y piscívoras (consumen otros peces), por citar algunas de las estrategias tróficas más comunes. En grandes ríos tropicales incluso hay especies frugívoras, que explotan el bosque de

ribera en época de inundación. Los peces ocupan desde la columna de agua hasta el fondo de los sistemas, pescan al acecho o contracorriente... Esta gran diversidad les capacita para ocupar múltiples espacios. La presencia y abundancia de peces, e incluso su tamaño (el pez mayor consume más y más activamente), puede causar importantes efectos sobre otros niveles tróficos, y finalmente sobre el funcionamiento del ecosistema. Por ejemplo, la existencia de peces insectívoros que depreden sobre libélulas u otras larvas de insectos grandes favorece el crecimiento de macroinvertebrados de menor tamaño que, al ser más abundantes, inciden más acusadamente sobre los productores primarios del sistema. Se trata de lo que se denomina *cascada trófica*, es decir, el efecto encadenado que producen unos niveles tróficos sobre otros. En este caso, el control se ejerce de arriba hacia abajo (*top-down*), y los peces son los que más incidencia pueden tener. Algunos efectos son poco conocidos, aunque revistan gran relevancia. En un reciente experimento en un sistema tropical, se ha descrito que la retirada de peces detritívoros causó el decremento de la materia orgánica transportada río abajo, así como el incremento de la producción primaria y de la respiración.

Los peces son muy sensibles a las perturbaciones. La detración de caudales compromete la supervivencia de muchas especies, ya que favorece el incremento de la concentración de nutrientes, el calentamiento de las aguas y las oscilaciones de oxígeno asociadas a crecimientos de productores primarios. La simplificación de los hábitats también redundan en su perjuicio, ya que numerosas especies requieren zonas de refugio, zonas de freza y otras áreas diferenciadas de alimentación. La simplificación de la zona litoral, la eliminación de meandros o de lagunas conectadas hidrológicamente con los cauces principales, etc., causan el empobrecimiento de la comunidad piscícola. Finalmente, la interconexión de cuencas favorece el que las especies más resistentes prosperen y las más especializadas (muchas de ellas endémicas) sean arrinconadas y lleguen a desaparecer.

2.4. Ensamblar los componentes: funcionamiento de los ecosistemas fluviales

Los componentes físicos, químicos, hidrológicos y biológicos antes descritos se ensamblan a muy diversas escalas, y las interacciones entre componentes regulan el funcionamiento del ecosistema fluvial, que puede ser muy complejo. Los recursos alimentarios cambian con el tipo de río, pero también a lo largo del año, y con eventos más o menos impredecibles como las riadas. La comunidad biótica responde a esos cambios, proliferando las especies cuyos recursos son más abundantes en un momento determinado y, en consecuencia, reduciendo la disponibilidad de esos recursos. Sin embargo, las poblaciones no pueden cambiar tan rápido como sus recursos, dadas las limitaciones impuestas por el ciclo de vida de

muchos organismos, por lo que a menudo la comunidad refleja más el pasado reciente que las condiciones presentes en un río. A modo de ejemplo, los arroyos bajo bosque caducifolio reciben una gran cantidad de hojarasca en otoño, lo que favorece a la comunidad biológica descomponedora (bacterias, hongos) y detritívora (meiofauna y macrofauna), a no ser que el otoño sea muy lluvioso y el río arrastre la hojarasca aguas abajo. En esta época, además, la ausencia de hojas en los árboles permite una mayor insolación, lo que favorece a los productores primarios. Si el caudal se mantiene bajo, las interacciones entre especies determinarán en buena medida la composición de la comunidad, mientras que si hay riadas frecuentes, la comunidad estará dominada por las especies con mayor capacidad de recolonización, importando menos sus preferencias alimentarias. Así, pues, distintos tramos del río, en distintas épocas del año, o en años distintos, pueden tener una dinámica muy diferente.

Aunque el funcionamiento de los ecosistemas fluviales puede ser extremadamente complejo, hay formas sencillas de estudiarlo, como por ejemplo, midiendo el metabolismo

Una de las formas más sencillas de evaluar de forma integral el funcionamiento de un ecosistema es midiendo su metabolismo. Se denomina *metabolismo fluvial* a la expresión conjunta en términos de balance de oxígeno, de carbono o de biomasa, de distintos compartimentos (biofilm, consumidores, etc.) o del conjunto del ecosistema. Éste se puede estimar mediante cámaras de incubación en las que se mide la variación de oxígeno o de carbono, y hay también métodos que permiten estimar el metabolismo en todo un tramo fluvial, aunque requieren asunciones y aproximaciones más complejas.

El análisis de las *interacciones tróficas* se basa en el estudio de los tractos intestinales en animales y, más recientemente, el uso de los isótopos estables como trazadores. Estas aproximaciones permiten estudiar la dinámica trófica del sistema y determinar las tasas de transferencia entre los distintos componentes. Para tal fin se deben determinar las variaciones isotópicas de los isótopos estables (por ejemplo, ^{13}C frente a ^{12}C) en los distintos compartimentos de la red trófica (biofilm, meiofauna, macroinvertebrados) y en los materiales particulados (hojarasca, ramas, material fino) que caracterizan el tramo fluvial.

Los ríos deben estudiarse considerando una perspectiva de cuatro dimensiones, en la que a la dimensión longitudinal (desde las cabeceras hasta la desembocadura) deben sumársele los movimientos laterales y verticales de agua, materiales, energía y organismos, y la dimensión temporal, resultante de los cambios ambientales, estacionales o no. En el eje fluvial se produce una sucesión continua de cambios desde la cabecera hacia la desembocadura, como hemos descrito anteriormente. La mayor cantidad de materia orgánica proveniente de la ribera en zonas de cabecera favorece la presencia de organismos fragmentadores y el predominio de procesos heterotróficos. A medida que el orden del río aumenta se reduce el material aportado desde la ribera y aumenta la disponibilidad de luz, lo

que posibilita una mayor cantidad de productores y un predominio de los ramoneadores. En estos tramos los procesos autotróficos pueden ser tan intensos o más que los heterotróficos. A estas tendencias halladas en el eje fluvial hay que sumarles las que ocurren en el eje horizontal (llanura aluvial) y el vertical (hiporreos), especialmente en ríos con llanuras aluviales y una zona hiporreica bien desarrollada. En grandes ríos de llanuras aluviales, el pulso de inundación determina que en determinadas épocas las especies acuáticas exploten los recursos acumulados durante meses en las llanuras de inundación. Esto incide en la dinámica, en la productividad y en la diversidad que soporta la zona de transición acuática-terrestre (Junk et al. 1989). Los ríos de orden menor también son importantes en el aporte de carbono a la llanura aluvial (Thorp y Delong 1994).

2.5. Los problemas que afrontan los sistemas acuáticos continentales

Los ecosistemas fluviales se ven afectados por numerosas perturbaciones naturales, tanto hidrológicas (sequías, avenidas) como físicas (aludes, fuegos), respondiendo con un marcado dinamismo (Margalef 1983). Sin embargo, algunas perturbaciones, sobre todo de origen humano, son permanentes y acaban afectando de manera irreversible a los ecosistemas fluviales. Earle B. Phelps, un ingeniero dedicado al saneamiento de los ríos, sostenía en 1944: «Un río es algo más que un accidente geográfico, una línea en un mapa, o una parte fija del terreno. No puede considerársele solamente desde el punto de vista geológico y topográfico. Un río es algo con vida propia, con energía, con movimiento. Algo cambiante».

Muchos ríos están regulados mediante embalses para hacer posible el consumo doméstico, agrícola e industrial, para generar energía hidroeléctrica y para laminar inundaciones. Actualmente un 15% de los caudales mundiales se retiene en 45 000 grandes embalses y un 52% de la superficie de los grandes ríos está modificada por canales, represas, etc. En la península Ibérica existen más de mil grandes embalses, trescientos de los cuales tienen capacidad de más de 10 hm³ (Sabater et al. 2008). Ríos de la cuenca mediterránea como el Júcar y el Segura llegan completamente secos al mar. En ríos americanos se han citado fenómenos de incremento del material transportado, que producen una rápida colmatación de embalses. Los efectos del cambio climático (aumento de temperatura e irregularidad de precipitaciones; IPCC 2007) reforzarán, sin duda, la presión para construir embalses.

La mayor parte de los ríos del mundo están afectados por actividades humanas como embalses, cambios morfológicos, contaminación, o especies exóticas

Las presas de los embalses rompen la conectividad longitudinal del río, forman barreras para el movimiento de los peces e impiden la migración de especies como los salmónidos. Con ello se producen importantes pérdidas económicas en

biodiversidad, y sufren muchas culturas nativas y regionales. Además, los embalses afectan al régimen térmico y la calidad del agua en el río. La mayoría de las presas desembalsan agua del fondo del embalse, que en verano es más fría y en invierno más caliente que el agua del río, con lo que se reduce la amplitud de los cambios de temperatura diarios y estacionales. Las especies vegetales y animales que viven aguas abajo del embalse, adaptadas como estaban al régimen térmico natural, ven afectada su supervivencia, desarrollo y reproducción. Por si eso fuera poco, el agua de fondo del embalse a menudo tiene poco oxígeno y muchos metales y fósforo, lo que contribuye al estrés químico.

A estas alteraciones hidrológicas hay que añadirles el impacto de actividades agropecuarias, o de la eliminación de zonas de humedales y meandros a favor del desarrollo de nuevas áreas cultivables y urbanizaciones. El exceso de nutrientes o la continua aparición de productos químicos pueden causar efectos perniciosos en el ecosistema fluvial, ya que muchos organismos fluviales se encuentran adaptados a bajas concentraciones de nutrientes (a un *óptimo de pobreza*). El exceso de nutrientes produce un fenómeno bien conocido que se denomina *eutrofización*. En estas condiciones, el río disminuye la eficiencia en la captación de nutrientes, se satura y pierde gran parte de su capacidad de autodepuración. En estos sistemas, aumenta la biomasa de algas y macrófitos, y los niveles nocturnos de oxígeno caen, a menudo, hasta valores letales para peces y otros animales. El impacto que causan los nutrientes también está relacionado con sus proporciones relativas.

Además de los nutrientes, los ríos reciben una enorme cantidad de sustancias de naturaleza muy variada, incluyendo compuestos de elevada toxicidad y persistencia. Entre éstos se cuentan pesticidas, disolventes, derivados de los hidrocarburos, fenoles o metales pesados. Todos estos compuestos causan impactos en los ecosistemas fluviales, máxime cuando se bioacumulan a través de la red alimentaria. Los residuos agrícolas y ganaderos (fertilizantes, pesticidas) habitualmente llegan a los ríos de manera difusa, mientras que las aguas residuales urbanas e industriales generalmente se producen de forma puntual, es decir, a través de colectores.

Todas estas afecciones comprometen la salud de los ríos, reduciendo la biodiversidad de los organismos que en ellos habitan. Entre los más afectados se encuentran los peces, de los que se considera que existen 35 000 especies, y se describen cien nuevas especies cada año. Otros vertebrados como anfibios, reptiles y aves se relacionan con lagunas, humedales y ríos, principalmente en períodos de nidificación y cría. Muchos de los hábitats utilizados para estas funciones han desaparecido por los cambios producidos en la ribera y llanura aluvial, y por el dragado de los cursos de agua. Esto ha producido una gran fragmentación de hábitats y una dramática reducción de las zonas de reproducción de muchas especies. Efectos semejantes se han citado para la fauna de invertebrados, sin duda más diver-

sa que la de peces, ya que se le supone, al menos, un orden de magnitud mayor. La mayoría de los estudios sólo examinan los invertebrados más abundantes, aunque en un estudio realizado en un pequeño arroyo de Alemania se encontraron más de mil especies de invertebrados. En cuanto a las algas microscópicas, el número de especies en algunos ríos llega hasta el medio millar. Otros organismos microscópicos, como los integrantes de la meiofauna, suelen ser muy diversos pero poco estudiados.

2.6. Bibliografía

- ALLAN J.D., y CASTILLO M.A. *Stream ecology: Structure and function of running waters*. Dordrecht: Springer, 2007.
- CASTELLANOS L., y DONATO J. «Biovolumen y sucesión de diatomeas en un río andino (río Tota, Boyacá, Colombia)». En J. Donato, ed. *Ecología de un río de montaña de los Andes colombianos*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 2008.
- GIORGI A., FEIJÓO C., y TELL G. «Primary producers in a Pampean stream: Temporal variation and structuring role». *Biodiversity and Conservation* 14 (2005): 1699-1718.
- IPCC. *Climate change 2007: Impacts, adaptation and vulnerability. Working group II. Fourth assessment report*: UNEP, 2007.
- JUNK W.J., BAYLEY P.B., y SPARKS R.E. «The flood pulse concept in river-floodplain systems». *Dodge DP Can Spec Public Fish Aquatic Sci* 106 (1989): 110-127.
- MARGALEF R. *Limnología*. Barcelona: Omega, 1983.
- MORISAWA M.E. *Rivers. Form and processes*. Londres: Longman, 1985.
- SABATER S., FEIO M.J., GRAÇA M.A.S., MUÑOZ I., y ROMANÍ A. «The Iberian rivers». En K. Tockner, C. Robinson, y U. Uhlinger, eds. *Rivers of Europe*. Amsterdam: Elsevier, 2008.
- SCHLESINGER W.H. *Biogeochemistry. An analysis of global change*. San Diego: Academic Press, 1997.
- THORP J.H., y DELONG M.D. «The riverine productivity model». *Oikos* 70 (1994): 305-306.
- VANNOTE R.L., MINSHALL G.W., CUMMINS K.W., SEDELL J.R., y CUSHING C.E. «The river continuum concept». *Can J Fish Aquat Sci* 37 (1980): 130-137.

El marco físico: la cuenca

JESÚS POZO Y ARTURO ELOSEGI

3.1. Introducción

Los ríos aparecen como cursos de agua con límites netos respecto a su entorno. Ello podría causar la errónea impresión de que entre agua y tierra no existe vínculo alguno. Nada más lejos de la realidad. Los sistemas acuáticos tienen estrechas relaciones con el medio terrestre que les rodea, pero también con el aire. El agua que circula está en tránsito, proviene del lavado superficial de los suelos o de la alimentación desde el acuífero subterráneo. Pero también en esos lugares está en tránsito. El agua se mueve de un lugar a otro y de un estado a otro a través del ciclo hidrológico (fig. 3.1). En su transcurrir impregna y se impregna de otros elementos, interfiriendo con factores y procesos físicos, químicos y biológicos.

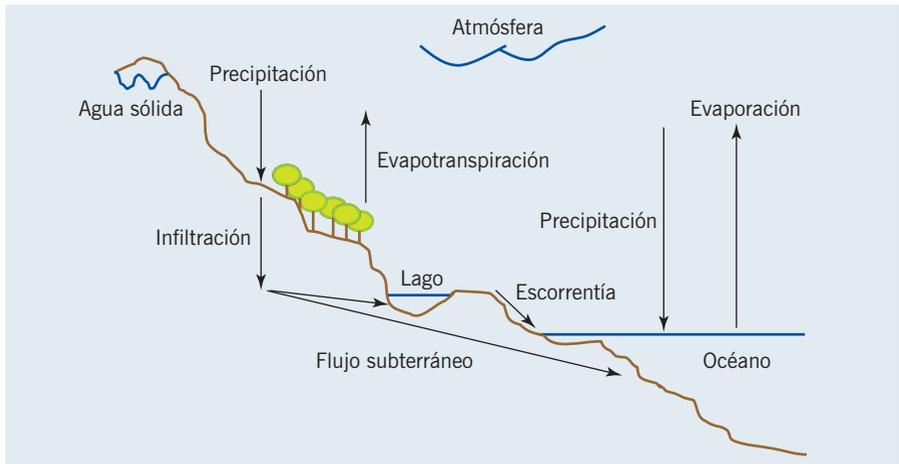
El tránsito por el medio terrestre se produce en las cuencas de drenaje, cada una de las partes del territorio que conduce sus aguas a un río, a un lago o al mar, aunque hay excepciones. Así, en regiones áridas hay cuencas arreicas, es decir, que no poseen ríos. En otras regiones se encuentran cuencas endorreicas, donde el agua llega tan sólo por la lluvia y se pierde por infiltración o evaporación.

Los límites de una cuenca vienen marcados por las divisorias de agua impuestas por el relieve, líneas que unen entre sí los puntos de máxima cota del territorio y dividen las aguas conduciéndolas a ríos diferentes. Aunque hay cuencas de todos los tamaños, desde unas cuantas hectáreas a miles de kilómetros cuadrados, los

Los ríos modelan el paisaje y reflejan las características de su cuenca

Los ecosistemas fluviales forman una red jerárquica y ramificada

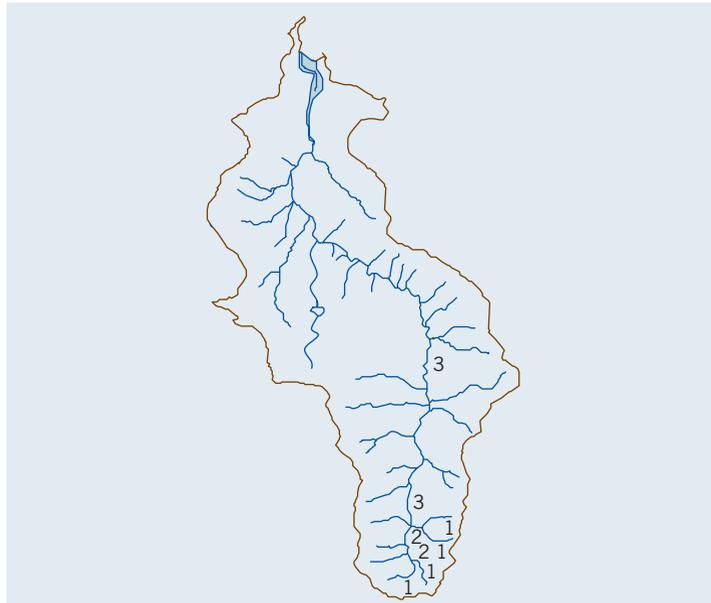
Figura 3.1:
El ciclo hidrológico



gestores están interesados especialmente en cuencas de gran tamaño, constituidas por otras más pequeñas, formando un sistema jerárquico (fig. 3.2).

La confluencia de cursos de agua cada vez de mayor entidad constituye la red de drenaje de la cuenca, a partir de la cual se han establecido sistemas de clasificación, como el de *orden de río*. Según la jerarquía establecida por Strahler (1964), los cursos que no reciben tributarios tienen asignado el orden 1; cuando confluyen

Figura 3.2:
Cuenca hidrográfica



Nota: Se señala el orden de río, según Strahler (1964), en varios segmentos fluviales.

dos arroyos de orden 1 forman uno de orden 2; cuando lo hacen dos de orden 2 forman otro de orden 3, y así sucesivamente. La confluencia de dos ríos de diferente orden genera un curso que mantiene el orden del mayor de los afluentes. La abundancia de precipitaciones, unida a un tipo de sustrato geológico poco permeable y difícilmente erosionable, conduce a redes de drenaje muy densas, en las que la mayor parte de los ríos son de pequeño orden (Cushing y Allan 2001). Por el contrario, en zonas donde la precipitación es escasa y la percolación está facilitada, el número de cursos fluviales es bajo. En definitiva, se pueden distinguir diferentes modelos de red de drenaje, tanto por su forma como por su densidad de cauces (dendrítica, paralela, radial... Véase, por ejemplo, Gordon et al. 1992).

El paisaje de una cuenca suele aparecer como un mosaico de manchas de tamaño y color diversos, fruto de los usos a los que se destina el territorio. Las que ofrecen una imagen más uniforme son aquellas que menos han sufrido la influencia del hombre, mostrando esencialmente el tipo de vegetación dominante en equilibrio con el clima de la región.

3.2. Factores, procesos y causas de variabilidad en la cuenca

La estructura y el funcionamiento de la cuenca son reflejo de un conjunto amplio de factores y procesos geológicos, topográficos, climáticos y bióticos. Su descripción forma lo que Heathcote (1998) denomina *inventario de la cuenca* (cuadros 3.1 y 3.2).

Factor	Significado o repercusión
Clima	Disponibilidad de agua y tipo de vegetación, escorrentía, erosión y modelado del paisaje
Geología	La litología determina el tipo de suelo y la composición química del agua. La estructura (fallas, pliegues, ...) condiciona la distribución del agua (superficial, subterránea)
Vegetación	Junto con el sustrato y el clima definen el tipo de suelo. Depende de, e influye en, la cantidad de agua. Estabiliza las márgenes, favorece la diversidad de hábitats y alimenta a los ríos con materia orgánica
Caudal	El régimen hidrológico y la diversidad hidráulica influyen sobre las comunidades acuáticas
Agua subterránea	Contribuye al mantenimiento de un caudal basal. La pérdida y la contaminación de los acuíferos son los problemas más graves del agua
Estética y características singulares	La estética de una cuenca puede producir impactos económicos por su pérdida de interés para el turismo o la recreación. También son importantes aspectos singulares, como elementos geológicos o históricos
Sistemas sociales y económicos	Son parte integrante del ecosistema cuenca, que afectan a la salud de los ríos. Comprenden acciones económicas y actitudes a la hora de gestionar la cuenca

Cuadro 3.1:
Factores de cuenca que tienen especial relevancia sobre los ecosistemas fluviales

Cuadro 3.2:
Características de los ríos especialmente ligadas a los factores de cuenca

Características	Significado o repercusión
Caudal fluvial	Es importante tanto la diversidad hidráulica dentro del cauce como la estabilidad de los patrones hidrológicos
Agua subterránea	Contribuye al mantenimiento del caudal basal. La pérdida y la contaminación de los acuíferos son los problemas más graves del agua
Temperatura del agua	Determina la distribución de los organismos. Muy variable, tanto en el espacio (por ejemplo, cobertura riparia), como en el tiempo (variación nictemeral, estacional...)
Oxígeno disuelto	Uno de los factores más importantes para los organismos
Carga de materiales inorgánicos disueltos	La conductividad, la dureza y la alcalinidad aumentan, a la vez que su inercia química, a medida que lo hace el área drenada
pH	Refleja el tipo de sustrato geológico y la actividad biológica. Aumenta cuando las tasas fotosintéticas son altas y disminuye en condiciones de intensa descomposición
Nutrientes	Elementos esenciales para los organismos. Muchas actividades humanas son fuente de nutrientes (eutrofización cultural). En cuencas de vegetación tupida, el fósforo limita más que el nitrógeno
Sólidos en suspensión	Proviene de la erosión, restos orgánicos de origen muy diverso y plancton. Afectan a los organismos, alteran sus hábitats y limitan el uso del agua para diversos fines
Materia orgánica	Condicionada por las entradas desde zonas riparias, la producción en el cauce y el transporte. Las alteraciones de la cuenca pueden cambiar su origen, composición y abundancia
Tóxicos	Metales pesados y otras sustancias tóxicas usados por el hombre se acumulan en las aguas y en los organismos
Productores primarios	Macrófitos y perifiton están condicionados por la luz, velocidad de la corriente, nutrientes y sustrato
Animales	Los macroinvertebrados tienen un papel en la transferencia de energía y son indicadores de la salud del sistema acuático. Su distribución refleja cambios de las fuentes de alimento disponible. Entre los vertebrados, los peces tienen repercusión económica y recreativa. La distribución de sus comunidades a lo largo del río está influida por la temperatura, el oxígeno disuelto y la velocidad de la corriente
Agentes patógenos	Muchos organismos pueden afectar a la salud humana (virus, bacterias y parásitos). Proviene particularmente de aguas no tratadas. Sus niveles en las aguas son muy variables y difíciles de correlacionar con otros indicadores biológicos

La cuenca influye en muchas características de los ríos

Para poder discernir la potencialidad de funciones o usos de los recursos hídricos dentro de una cuenca es necesario evaluar la situación en la que se encuentran, y los impactos de las actividades humanas actuales o previstas. Todo ello pasa por un entendimiento de los factores y procesos que gobiernan los sistemas fluviales, así como de las causas de su variabilidad, tanto naturales como en respuesta a las perturbaciones (Allan y Castillo 2007).

3.3. Alteraciones de las relaciones tierra-agua

La mayoría de las aguas corrientes dista mucho de encontrarse en situación prístina, por lo que los procesos que ocurren en los cauces están condicionados por las modificaciones que introduce el hombre en la cuenca. Como es obvio, el grado de alteración depende del nivel de actividad humana a través de acciones ligadas a la agricultura, la ganadería, la explotación forestal y, sobre todo, al desarrollo urbano e industrial. Estas dedicaciones del territorio modifican las características físicas y químicas, tanto de los cauces como de las aguas, influyendo fuertemente en la biota y en el funcionamiento de los sistemas fluviales (cuadro 3.3). Las perturbaciones generadas en las zonas altas de la cuenca pueden repercutir río abajo, lo que recalca la idea de la cuenca como un sistema integral, y la necesidad de estudiar el río en el marco de su cuenca (Hynes 1975).

Actuaciones como el aprovechamiento forestal, los prados y los cultivos pueden incidir en la naturaleza de los aportes de hojarasca a los ríos y en el destino de éstos (procesado, almacenaje o transporte río abajo). Asimismo, se traducen en cambios de los patrones hidrológicos o de la carga de sedimentos. La descarga de contaminantes, por su parte, provoca modificaciones en la calidad del agua y, en general, en la biodiversidad, una vez superado el umbral de lo que los ecosistemas fluviales son capaces de procesar. Las aguas residuales, en concreto, contienen un elevado contenido de materia putrescible (contaminación orgánica) cuya mineralización conlleva un fuerte consumo de oxígeno, originando en algunos

Las actividades humanas en la cuenca, como la ganadería, la agricultura y las urbanas, afectan a los ecosistemas fluviales

Actividad	Efecto
Empleo de fertilizantes	Eutrofización
Fuego y pastoreo	Erosión, aumento de sedimentos
Residuos ganaderos y agrícolas	Elevada demanda de oxígeno
Construcción de pistas	Aumento de material en suspensión tras las lluvias
Tala y extracción de madera	Cambios en escorrentía, sólidos en suspensión, luz incidente, temperatura del agua, nutrientes, entradas de hojarasca...
Plantaciones forestales	Cambios en cantidad y calidad de entradas de hojarasca y en productividad Cambio en estructuras retentivas y en disponibilidad de hábitats
Vertidos urbanos e industriales	Pérdida de calidad del agua y disminución de la biodiversidad
Embalses	Cambios en los regímenes hidrológico y térmico, características químicas y transporte de sedimentos, y barreras a la dispersión
Canalizaciones	Pérdida de hábitats

Cuadro 3.3:
Actividades humanas y principales efectos en la cuenca

casos problemas de desoxigenación. Estas alteraciones se alejan de lo que debería ser un uso sostenible de los recursos y hacen incompatible el desarrollo socioeconómico con el mantenimiento de los procesos ecológicos.

La explotación de la cuenca siempre supone alterar la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas que se explotan. La magnitud de los efectos depende del tipo de gestión. Una consecuencia importante de la existencia de lazos estrechos entre cuenca y río es que cualquier actividad humana acaba afectando al agua y, por ende, a las comunidades fluviales. El mayor o menor impacto que esas actividades puedan generar depende de la intensidad y duración de la perturbación, así como de la entidad del río.

Técnica 1. Estudio morfométrico de cuencas

El moldeado y apariencia final de una cuenca de drenaje es consecuencia de un conjunto de procesos geológicos y biológicos en función del tiempo, a los que hay que añadir, más recientemente, la influencia humana (por ejemplo, deforestación, agricultura, introducción de especies exóticas, construcción de presas, urbanismo, contaminación, etc.).

Es esencial realizar una detallada descripción de la relación entre el río y su cuenca

Como ha quedado de manifiesto anteriormente, tanto desde el punto de vista de la gestión como de la investigación, la cuenca es la unidad fundamental, con independencia de si se trata de una cuenca elemental con un único curso de agua, o si es una cuenca de gran tamaño dentro de la cual quedan incluidas multitud de subcuencas. En cualquiera de los casos se pueden aplicar metodologías comunes para describirlas y compararlas, utilizando la escala conveniente. Tamaño, sustrato geológico, red de drenaje y usos de suelo de la cuenca son los objetos esenciales sobre los que se aplica la metodología para describir las cuencas fluviales. La divisoria topográfica define el tamaño, el cual, unido a la naturaleza del sustrato geológico, el clima y la vegetación, influye sobre la cantidad de agua y sobre el número y entidad de los ríos. Allí donde dominan las rocas graníticas, el agua tiende a correr superficialmente, mientras que en zonas calizas el agua se puede infiltrar y circular subterráneamente, lo que se traduce en una reducción de la densidad de drenaje. A su vez, los usos a los que se destina el territorio de la cuenca y las actividades que en ella se desarrollan repercuten en el estado ecológico de sus aguas, que debe ser controlado mediante el análisis periódico en estaciones de seguimiento distribuidas convenientemente en la red de drenaje.

La herramienta básica para un análisis morfométrico de cuencas son los mapas, las fotografías aéreas y las imágenes de satélite. Si se trabaja con pares de foto-

grafías aéreas con un estereoscopio, se aprecia el relieve de la cuenca. Sin embargo, las fotografías aéreas tienden a deformar la imagen en los bordes, por lo que no pueden ensamblarse. Cada vez más se utilizan ortofotografías, en las cuales se ha corregido la deformación y, por tanto, pueden utilizarse sobre una base cartográfica. A partir de estas herramientas se puede determinar, por ejemplo, la distribución y el tipo de vegetación, que informan sobre las fuentes de energía de los ríos. La disponibilidad de ortofotos es libre en muchas Administraciones Públicas.¹ También se puede acceder libremente a través de Google Earth,² aunque la definición cambia mucho de unas zonas a otras. Las series temporales de imágenes aéreas permiten realizar seguimientos de los cambios en los usos del suelo y de los propios cauces.

Las alternativas digitales proporcionan un medio para examinar el territorio con gran detalle. Con las aplicaciones informáticas adecuadas y mediante ordenador, la topografía puede quedar reducida a una base de datos digital (Sistemas de Información Geográfica, SIG), a partir de la cual se pueden producir imágenes tridimensionales de cualquier cuenca digitalizada, así como establecer relaciones entre variables al presentarlas en capas superpuestas (Longley et al. 2005).

La metodología que aquí se expone se refiere a algunas variables geomorfométricas básicas. El lector puede obtener información adicional en numerosas fuentes (por ejemplo, Strahler 1964, Romero y López Bermúdez 1987, Gordon et al. 1992, Wetzel 2001, Naiman et al. 2005, Stanford 2006).

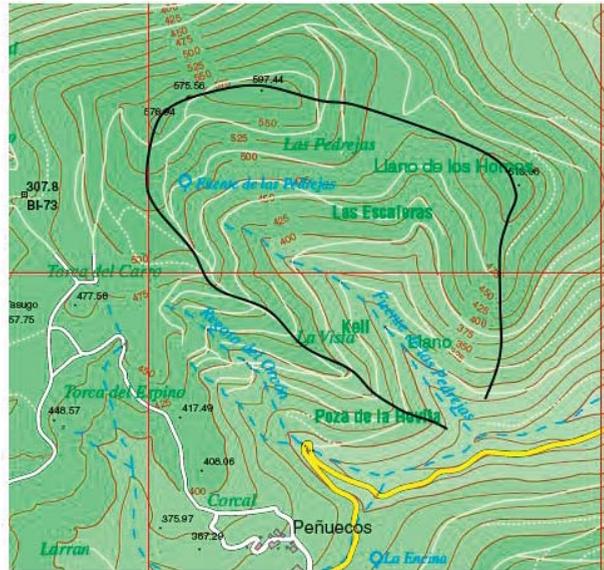
MATERIAL

- Mapas topográficos de la región a varias escalas. Son adecuados los mapas topográficos de escala 1:25 000 o 1:50 000, del Instituto Geográfico Nacional, en el caso de España.
- Mapas geológicos.
- Mapas de vegetación.
- Series de pares fotográficos aéreos y/u ortofotos y/o imágenes digitales.
- Curvómetro.
- Planímetros o plataforma digital y ordenadores.
- Papel vegetal.
- Tijeras.
- Balanza de precisión.
- Estereoscopios para interpretación de fotografía aérea.

¹ En España, por ejemplo, existe el Visor SIGPAC, de libre consulta. Más información en www.mapa.es/es/sig/pags/sigpac/intro.htm

² Véase <http://earth.google.com>

Figura 3.3:
Trazado del contorno (en negro) de una cuenca de drenaje sobre un mapa topográfico



Nota: Para detalles, véase el texto.
Fuente: Obtenido en www.bizkaia.net.

PROCEDIMIENTO

1. Seleccionar un mapa que abarque toda la cuenca.
2. Dibujar los límites de la cuenca siguiendo las crestas que aparecen en los mapas topográficos. Ir colina abajo y cortar perpendicularmente las curvas de nivel que se encuentran (fig. 3.3).
3. Determinar el área de la cuenca con ayuda de un planímetro. Si no se dispone de planímetro se puede seguir alguno de los siguientes métodos: a) superponer un enrejado de superficie de cuadrícula conveniente para la escala del mapa y contar el número de cuadrículas, determinando el área como el producto de la superficie de una cuadrícula por el número de cuadrículas contenidas; b) trazar los límites de la cuenca sobre papel vegetal, recortar el área dibujada y pesarla; a continuación pesar una cuadrícula de papel vegetal de superficie conocida, determinar el área de la cuenca dividiendo el peso del recorte de la cuenca entre el peso de la cuadrícula y multiplicando el resultado por la superficie de la cuadrícula; alternativamente, se puede acceder libremente a ciertas aplicaciones y bases de datos de muchas Administraciones Públicas (por ejemplo, www.idee.es), que permiten calcular de manera sencilla distancias y áreas y que se pueden aplicar a cualquier superficie del territorio. Se debe tener en cuenta que la diferencia entre área planimétrica y área real puede ser importante en zonas de fuerte pendiente.



Fuente: Ortofotografía obtenida en www.bizkaia.net.

Figura 3.4:

Trazado del contorno (en magenta) de una cuenca de drenaje (véase fig. 3.3) sobre una ortofotografía

4. Los mapas topográficos aportan cierta información sobre los tipos y distribución de bosques y otras formaciones vegetales. Comparar esa información con los datos que proporcionan los mapas de vegetación de la zona, si existen, o sobre la fotografía aérea (fig 3.4), o mediante prospecciones de campo.
5. Determinar el tamaño y área de diversos usos en la cuenca, distinguiendo entre los diferentes tipos de vegetación mediante los pares fotográficos y un estereoscopio. Esto permite discernir posibles influencias sobre procesos ecológicos en los ríos. Hay que tener en cuenta que los mapas de vegetación se realizan con distintos criterios, que no siempre son acordes con los objetivos del ecólogo fluvial. A menudo se necesita crear nuevas categorías de vegetación. Por ejemplo, si para un estudio concreto se considera irrelevante el tipo de bosque, habría que combinar todos los tipos que aparezcan en el mapa en sólo dos categorías: bosque y no bosque.
6. Diferenciar cauces intermitentes y permanentes en la cuenca seleccionada. Los cursos fluviales aparecen en azul en el mapa, algunos de ellos como líneas discontinuas (fig. 3.3), lo que indica que son ríos de flujo temporal (sólo circula agua en alguna época del año) o intermitente (alternancia de tramos con y sin flujo a lo largo de su recorrido). Este tipo de ríos es frecuente en regiones secas o donde el sustrato geológico es muy permeable.
7. Identificar áreas potenciales de aguas subterráneas comparando los mapas topográficos con los geológicos.

Sobre la ortofotografía se delimita la cuenca y los tipos de vegetación que interesa distinguir

8. Determinar el orden de cada uno de los cursos de agua mediante el modelo de confluencia (fig. 3.2).
9. Utilizando un curvómetro, medir la longitud máxima de la cuenca, así como la del cauce principal y la de todos los cauces de la cuenca, siguiendo la línea del río, y comparar las longitudes totales obtenidas sumando los segmentos de cada orden. Alternativamente usar alguna aplicación disponible en la red que permita el cálculo de distancias (por ejemplo, la ya mencionada www.idee.es).
10. Calcular la densidad de drenaje, dividiendo la longitud total de ríos entre el área de la cuenca.
11. Calcular la razón de bifurcación, como el número de segmentos de un orden dado entre el número de segmentos del siguiente orden mayor. Esta razón varía entre 2 y 5 y tiende a aumentar para cuencas alargadas.
12. Determinar las altitudes máxima y mínima de la cuenca, así como la del nacimiento del río sobre el mapa topográfico. Alternativamente, utilizar alguna aplicación para el análisis del relieve, como la disponible en el Ministerio de Fomento de España (www.idee.es), que permite consultar los modelos digitales del terreno (MDT) 1:200 000 y 1:25 000 y obtener altitud máxima, mínima y media de la zona visible, así como la de cualquier punto sobre el que se coloque el cursor.
13. Realizar un gráfico del perfil longitudinal del río principal de la cuenca, desde el nacimiento hasta la desembocadura, situando en el eje de ordenadas la altitud y en el de abscisas la distancia. Utilizar tantos puntos como veces intercepte el río curvas de nivel en el mapa. Identificar tramos de máximo gradiente y zonas aluviales (mínima pendiente).
14. Calcular la razón de relieve, como el cociente de la diferencia de elevación entre la boca de la cuenca y el punto más elevado de la divisoria de aguas y la máxima longitud de la cuenca. La razón de relieve influye en la densidad de drenaje y en la pendiente.
15. Calcular la pendiente media del cauce. Ésta es igual a la diferencia de elevación entre el nacimiento y la desembocadura dividida por la longitud del río, y constituye uno de los factores que controlan la velocidad del agua. Muy frecuentemente se expresa en porcentaje (%).

3.4. Bibliografía

- ALLAN J.D., y CASTILLO M.A. *Stream ecology: Structure and function of running waters*. Dordrecht: Springer, 2007.
- CUSHING C.E., y ALLAN J.D. *Streams: Their ecology and life*. San Diego: Academic Press, 2001.
- GORDON N.D., MCMAHON T.A., y FINLAYSON B.L. *Stream hydrology: An introduction for ecologists*. Chichester, Reino Unido: John Wiley and Sons, 1992.
- HEATHCOTE I.W. *Integrated watershed management: Principles and practice*. Nueva York: John Wiley and Sons, 1998.

- HYNES H.B.N. «The stream and its valley». *Verhandlungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 19 (1975): 1-15.
- LONGLEY P.A., GOODCHILD M.F., MAGUIRE D.J., y RHIND D.W. *Geographic information systems and science*. Toronto: John Wiley and Sons, 2005.
- NAIMAN R.J., DÉCAMPS H., y MCCLAIN M.E. *Riparia: Ecology, conservation, and management of streamside communities*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005.
- ROMERO M.A., y LÓPEZ BERMÚDEZ F. «Morfometría de redes fluviales: revisión crítica de los parámetros más utilizados y aplicación al Alto Guadalquivir». *Papeles de Geografía Física* 12 (1987): 47-62.
- STANFORD J.A. «Landscapes and riverscapes». En F.R. Hauer, y G.A. Lamberti, eds. *Methods in stream ecology*. Amsterdam: Academic Press, 2006: 3-21.
- STRAHLER A.N. «Quantitative geomorphology of drainage basins and channel networks». En V.T. Chow, ed. *Handbook of applied hydrology*. Nueva York: McGraw-Hill, 1964: 4.39-4.76.
- WETZEL R.G. *Limnology: Lake and river ecosystems*. San Diego: Academic Press, 2001.

El caudal circulante

ARTURO ELOSEGI, ANDREA BUTTURINI Y JOAN ARMENGOL

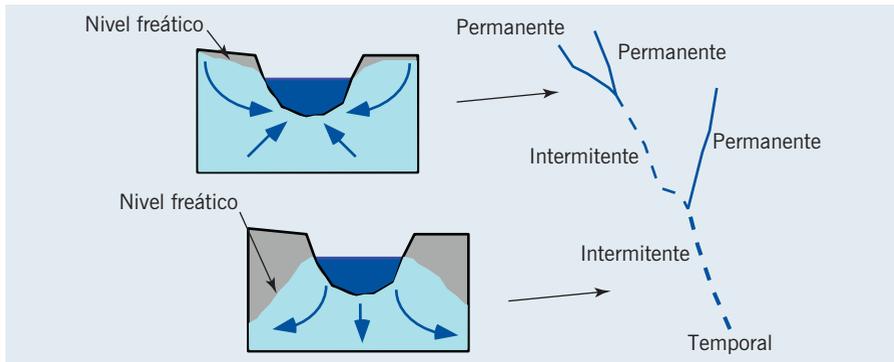
4.1. Introducción

El agua que cae en forma de lluvia, nieve o granizo puede seguir tres caminos: evaporarse nuevamente, infiltrarse en la tierra, o si la precipitación excede a la capacidad de infiltración, correr por encima del suelo en forma de escorrentía. La capacidad de infiltración depende de la estructura y humedad del suelo, pero también de su pendiente y de la cobertura vegetal. Los suelos arenosos son muy permeables al agua, mientras que en suelos arcillosos la infiltración es muy baja. Así, una precipitación reducida apenas moja el suelo, ya que la mayor parte del agua vuelve a evaporarse, una cantidad algo mayor moja el suelo, pero los ríos cercanos no cambian su caudal, mientras que un evento de precipitación muy acentuado provoca una fuerte escorrentía y un aumento del caudal fluvial. De todas formas, aparte de la cantidad de lluvia también influye su intensidad: a igual cantidad de precipitación, un chaparrón fugaz produce más escorrentía que una lluvia fina prolongada, ya que las gotas grandes sellan los poros más superficiales del suelo, reduciendo la infiltración.

El caudal de los ríos es alimentado por el agua de lluvia, ya sea directamente, por escorrentía, o bien por flujo subterráneo

Una parte del agua que penetra en el suelo vuelve a la atmósfera mediante la transpiración por la vegetación, que puede ser muy importante, como demuestra lo rápido que disminuye el caudal de los arroyos cuando los árboles se visten de hojas en primavera. El resto se moverá a través de los poros del suelo, a merced de la capilaridad y la gravedad. El agua infiltrada puede atravesar el suelo y la zona vadosa, en

Figura 4.1:
 Esquema hipotético de un río árido con la cabecera en clima húmedo, que alterna tramos perennes con otros intermitentes y temporales, y tramos ganadores y perdedores de agua



la que los poros están llenos de aire y sólo hay agua en finas películas alrededor de las partículas, y llegar al nivel freático, que marca el límite superior de los acuíferos, es decir, de los conjuntos rocosos saturados de agua. Si llega mucha agua por infiltración, el nivel freático sube, y la presión hidrostática empuja el agua en el acuífero. En las zonas en las que el nivel freático llega hasta la superficie del suelo encontramos fuentes a través de las cuales se descarga el acuífero a los cauces fluviales. De esta forma, en épocas en las que no ha llovido, la mayor parte del caudal circulante por los ríos proviene directamente del freático. Así, hay ríos o tramos de río que ganan agua directamente del freático, mientras que otros la pierden, y los hay que alternan fases de ganadores y perdedores, conforme el nivel freático sube o baja en función de la climatología de la región. En zonas áridas, por ejemplo, es común que las cabeceras sean zonas más húmedas, con lo que los arroyos pueden ser perennes, mientras que aguas abajo el río se va convirtiendo primero en intermitente, es decir, con alternancia de tramos con agua y tramos secos, y más abajo aún temporal, ya que el agua sólo circula en época de fuertes lluvias en las montañas (fig. 4.1).

A una escala más fina, los patrones de circulación del agua en los cauces cobran gran importancia ecológica. Los cauces fluviales suelen ser sistemas hidrológicos altamente heterogéneos y complejos, en los que numerosas estructuras dificultan y alteran el flujo de las aguas río abajo. El agua retenida de forma transitoria en estas estructuras (*Zonas de Retención Transitoria*, ZRT) se entretiene durante un tiempo superior al tiempo medio de residencia de la masa de agua que se mueve libremente en el cauce. Desde la perspectiva de la morfología fluvial, estas estructuras retentivas corresponden a los relieves del lecho fluvial, la sinuosidad del cauce, las balsas y, sobre todo, a los sedimentos hiporreicos. La importancia de estas zonas de retención momentánea hidráulica en la dinámica de nutrientes y los procesos metabólicos fluviales han impulsado notablemente el estudio de estos compartimentos hidrológicos.¹

¹ Para una lista de referencias, véase: http://smig.usgs.gov/SMIG/transtor_reader2.html

4.2. El régimen hidrológico

La variabilidad estacional habitual en el caudal de un río se denomina régimen hidrológico. Como hemos visto, hay ríos perennes que nunca se secan, otros temporales, que se secan prácticamente todos los años, incluso los hay efímeros, que sólo llevan agua muy de vez en cuando. Aparte de la presencia o ausencia de agua, su cantidad puede variar mucho temporalmente, en función del origen del agua. Así, los ríos alimentados por agua subterránea tienden a presentar una variabilidad temporal muy reducida; los ríos con régimen nival, es decir, alimentados por nieve, suelen presentar caudales máximos en primavera o verano, coincidiendo con el deshielo; los ríos bajo glaciares tienen caudales mínimos en invierno, y en verano presentan grandes fluctuaciones entre el día (deshielo y crecida) y la noche (menor caudal), etc. Esta clasificación simple raramente es suficiente, y encontramos en la naturaleza gran variedad de situaciones intermedias, como algunos arroyos alimentados por acuíferos en los que el caudal puede ser virtualmente constante durante años, y que río abajo se hacen más variables conforme incorporan afluentes alimentados por agua de lluvia. Además, la distribución de épocas lluviosas y secas durante el año cambia mucho en función del clima. En zonas de clima marítimo es habitual la ausencia de estación seca, mientras que el clima mediterráneo se caracteriza por fuertes sequías estivales, lo que produce regímenes hidrográficos y funcionamientos ecológicos marcadamente diferentes (Sabater et al. 2008).

El régimen hidrológico es la variabilidad estacional en el caudal de un río. Tiene gran importancia ecológica

Igual que el conocer el clima de una región dice poco del tiempo que hará un día, el régimen hidrológico general de un río tiene poco que ver con el caudal que circula en un momento determinado. De vez en cuando se producen tormentas o fuertes chaparrones que producen crecidas en los arroyos. En una crecida, típicamente se observa un aumento rápido del caudal, y una disminución más lenta conforme el agua de escorrentía va desapareciendo. Los hidrogramas de tormenta (fig. 4.2) muestran la variación de caudal durante una crecida y cómo circula el agua en la cuenca. En los ríos se pueden distinguir dos tipos de caudal: el *caudal basal*, que es el que circula cuando hace tiempo que no ha llovido,

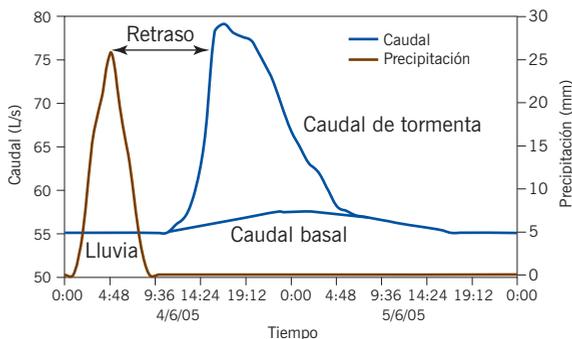


Figura 4.2: Hidrograma de tormenta idealizado. Una tormenta produce un evento de lluvia en una cuenca, y el agua llega con un retraso determinado a la estación de aforo, donde produce un aumento rápido del caudal y una disminución más pausada hasta volver al caudal basal

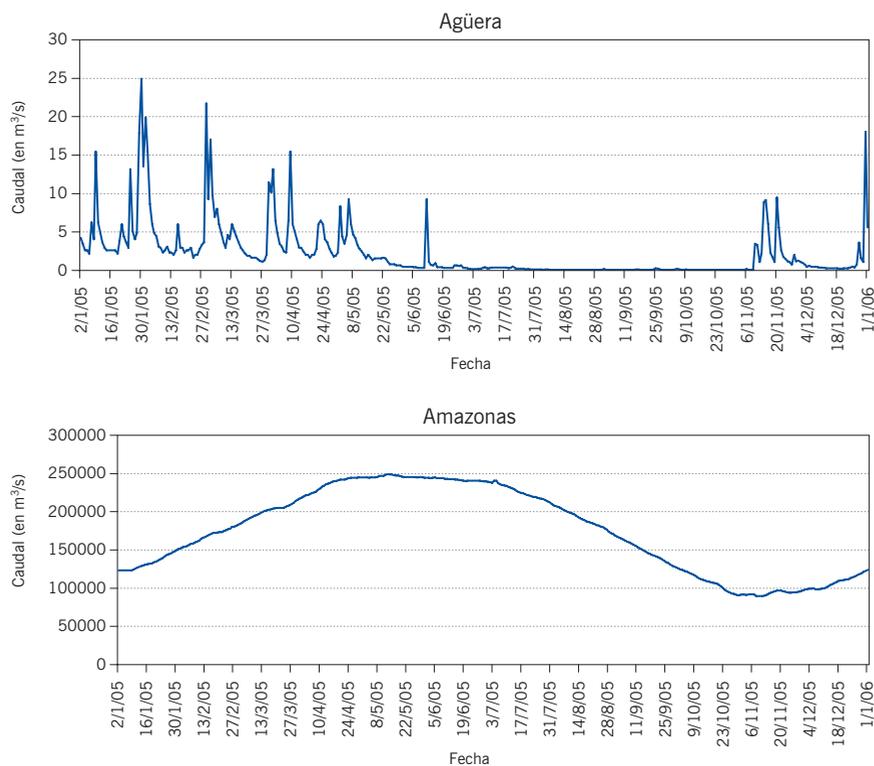
y está constituido fundamentalmente por agua freática, y el *caudal de tormenta*, que llega directamente por escorrentía en momentos de fuertes lluvias o de fusión de las nieves. Por supuesto, el caudal circulante en un momento determinado puede ser una combinación de ambas fuentes.

Las crecidas en los arroyos arrastran organismos y materiales aguas abajo. En los grandes ríos son más predecibles y definen los cambios estacionales en el funcionamiento del ecosistema

El papel ecológico de las crecidas puede ser bastante diferente en arroyos y en grandes ríos. Las cuencas pequeñas y pendientes suelen ser muy torrenciales, y mostrar crecidas repentinas que desaparecen en cuanto cesan las lluvias, mientras que los grandes ríos de llanura suelen tener un ciclo de crecidas mucho más predecible (fig. 4.3). Los hidrogramas de los grandes ríos suelen ser más complicados que los de arroyos pequeños, ya que en estos últimos cuando llueve lo hace en toda la cuenca que, por tanto, presenta una respuesta más homogénea. Como consecuencia de ello, el efecto principal de las crecidas en los arroyos es perturbar las comunidades, arrastrando organismos y recursos aguas abajo, aunque también son cruciales para algunas especies, como por ejemplo, para peces que sólo pueden migrar a sus zonas de freza en aguas altas. Por otro lado, en los grandes ríos de llanuras aluviales, éstos tienen un ciclo de expansión y contracción asociado a su hidrograma, que es a la vez muy acentuado y predecible, y al que se han adaptado los ciclos de vida de numerosos organismos. En estos ríos, el pulso de nutrientes que ocurre cada vez que se inunda la llanura aluvial adquiere gran importancia para muchas especies, como es el caso de peces frugívoros en grandes ríos tropicales. En un sentido más general, gran parte del funcionamiento del ecosistema está condicionado por este ciclo de expansión y contracción (Junk et al. 1989).

La frecuencia, magnitud, y duración de las crecidas y sequías, así como su predecibilidad, constituyen una de las variables ambientales de mayor importancia biológica en los ríos. De hecho, tanto las crecidas como las sequías están entre las principales perturbaciones para la biota fluvial, por lo que buena parte de los rasgos vitales observables en las comunidades de organismos se pueden interpretar como modeladas por este componente del hábitat físico a través de la evolución (Townsend et al. 1997). Por ejemplo, numerosas especies adaptan sus ciclos vitales al ciclo hidrológico, evitando que sus fases vitales menos resistentes (por ejemplo, primeros estadios larvarios) coincidan con las épocas de mayor riesgo de perturbación por avenidas (Lytle y Poff 2004). Por otra parte, desde un punto de vista más aplicado, puede ser crucial determinar la probabilidad de que un edificio sea inundado en un período determinado, o la incidencia de las sequías en una región agrícola, lo que ha hecho que se desarrollen numerosas técnicas estadísticas para analizar el hidrograma, es decir, la distribución temporal del caudal de un río (Knight y Shamseldin 2006).

Por todo lo dicho, el régimen hidrológico es fundamental a la hora de estructurar los ecosistemas fluviales, y modela tanto sus comunidades como su funcionamiento. Sin embargo, numerosas actividades amenazan con alterar ese régimen. Un gran

**Figura 4.3:**

Caudales diarios durante 2005 de dos ríos muy diferentes: Agüera, pequeño río en la península Ibérica, y Amazonas en Óbidos, Brasil, la mayor estación de aforo del mundo

Nota: Obsérvese la mayor torrencialidad del Agüera, como corresponde a su menor superficie de cuenca (145 frente a 4 622 624 km²) y a su menor longitud (32 frente a 3869 km). Datos cedidos por la Confederación Hidrográfica del Norte (España) y por la Agencia Nacional del Agua (Brasil).

porcentaje de los ríos del mundo están afectados por grandes embalses, que perjudican de manera drástica el régimen hidrológico aguas abajo (Nilsson et al. 2005). Los embalses para abastecimiento urbano o agrícola detraen gran cantidad de agua, contrayendo el hábitat fluvial y, además, eliminan la mayor parte de las crecidas, con lo que frenan la movilidad de peces y alteran el ciclo biológico de otros organismos. Los embalses para producción hidroeléctrica alternan grandes crecidas en las horas de demanda punta de electricidad con sequías repentinas fuera de esas horas, creando un hábitat especialmente difícil. Además, las extracciones de agua subterránea han hecho disminuir el nivel freático en muchas zonas, con lo que ríos que eran ganadores de agua se convierten en perdedores, y en algunos casos llegan a secarse. A todas estas presiones hay que añadirles el efecto del cambio climático, que amenaza con modificar seriamente el balance hídrico de muchas zonas y cambiar la torrencialidad en otras. Por si eso fuera poco, en algunas regiones está aumentando la torrencialidad como consecuencia de la impermeabilización de las cuencas por infraestructuras humanas (carreteras, edificaciones, etc.). Todo ello ilustra claramente el complejo efecto del cambio global sobre los ecosistemas fluviales.

La macro 4.1 permite calcular algunos parámetros de retención hidráulica en base a adiciones

Técnica 2. Retentividad hidráulica

Como hemos mencionado, los patrones de circulación del agua en los cauces, la distribución de sus velocidades y la capacidad del cauce de retener agua tienen gran importancia ecológica, tanto en la distribución de organismos (como se abordará en los capítulos 11 a 15), como en procesos ecológicos (por ejemplo, retención de nutrientes, en el capítulo 8). En esta sección se describe una técnica para identificar la importancia de las ZRT en un tramo fluvial y los pasos necesarios para estimar un conjunto de parámetros hidrológicos que permiten cuantificarla.

MATERIAL

- Cinta métrica.
- Estacas o cinta adhesiva y rotulador para marcar los puntos de muestreo.
- Bidón de 20-50 L para preparar la solución.
- Probeta de 2 L para preparar la solución.
- Reactivos de adición: sal común de cocina (NaCl) o tinta fluorescente (por ejemplo, fluoresceína).
- Bomba peristáltica con batería.
- Cronómetro.
- Probeta de 25-50 mL para medir el flujo de adición.
- Conductivímetro; mejor si tiene *datalogger*.
- Frascos para muestrear agua.

TIPO DE ADICIÓN

La técnica de campo consiste en una adición controlada de un trazador hidrológico (un soluto totalmente inerte) en un punto del cauce y en seguir la dinámica temporal de su concentración en uno o más puntos aguas abajo. El trazador se puede verter al río bien haciendo una *adición en pulso*, bien una *adición a flujo constante* durante un determinado período. Con ambos tipos de adición se puede obtener la información requerida, pero en esta sección nos centraremos especialmente en las adiciones a flujo constante, que son idénticas a las que se utilizan para estimar la retención de nutrientes (véase capítulo 8). En cualquier caso, en el apartado «Procedimiento» también se describen los pasos para ejecutar una adición en pulso.

En una adición a flujo constante, la concentración de trazador en el río aumenta gradualmente hasta aproximarse a un valor de equilibrio (meseta). Esto implica que, si no hay entradas laterales, en todo el tramo de estudio habrá la misma concentración de trazador. A partir de este momento, la adición se interrumpe para poder seguir la caída temporal de la concentración del trazador, hasta que

vuelva a los valores basales previos a la adición. El seguimiento detallado de la cola de esta curva es fundamental para estimar la ZRT (fig. 4.4).

La gráfica de la dinámica temporal del trazador en el punto de observación tiene la forma aproximada de un pulso rectangular. El grado de alejamiento de la curva observada respecto de esta forma primaria refleja la influencia de a) la dispersión longitudinal (D , en m^2s^{-1}) del soluto en su transporte aguas abajo, y b) la cantidad de soluto que se entretiene de forma transitoria en las de ZRT. Por comodidad denominaremos a esta gráfica la *curva de ADRT (advección-dispersión y de retención transitoria)*; véase fig. 4.4).

Matemáticamente, la curva de ADRT se puede simular mediante un sistema de dos ecuaciones. Una (ecuación 4.1) describe la dinámica temporal del soluto que fluye libremente en el canal y la otra (ecuación 4.2) fija el soluto retenido transitoriamente en la ZRT:

$$\frac{\partial C_s}{\partial t} = -v \frac{\partial C_s}{\partial x} + D \frac{\partial^2 C_s}{\partial x^2} + k_1(C_{ZRT} - C_s) \quad (4.1)$$

$$\frac{\partial C_{ZRT}}{\partial t} = k_2(-C_{ZRT} + C_s) \quad (4.2)$$

donde C_s : concentración del soluto en el cauce; C_{ZRT} : concentración del soluto en la ZRT; v : advección del agua (m/s); D : dispersión (m^2/s); y k_1 y k_2 : tasas de intercambio de agua (s^{-1}) entre el cauce fluvial y la ZRT; parámetros que permiten cuantificar la retentividad hidráulica.

LOS TRAZADORES

La elección de los trazadores es fundamental para el desarrollo de estos experimentos. Los más utilizados son el cloruro de sodio (NaCl) y las tintas fluorescentes. El NaCl tiene la ventaja de ser detectado casi al instante mediante un conductivímetro, permitiendo así estimar rápidamente los parámetros hidrológicos básicos (caudal, velocidad, tiempo de residencia). Sin embargo, tiene la desventaja de que se necesita mucha cantidad para las adiciones a flujo constante, resultando inviable en ríos con caudales que superen los centenares de litros por segundo. Por otro lado, las tintas fluorescentes necesitan un fluorímetro de campo (mucho más caro que el conductivímetro), pero tienen la ventaja de su bajo límite de detección (Kilpatrick y Wilson 1989). Esta condición es básica para trabajar en ríos grandes, y es muy importante para poder detectar pequeñas ZRT.

Aquí detallaremos el protocolo que hay que seguir para ejecutar una adición de sal común. Si se opta por otro tipo de trazador, el protocolo es casi idéntico.

SELECCIÓN DEL TRAMO

En el punto de adición es esencial que haya turbulencia, y que el trazador se mezcle rápidamente con el agua fluvial. Este requisito es indispensable cuando el trazador es NaCl, porque la densidad del agua de adición puede ser tan alta que en lugar de ser arrastrada por la corriente se quede casi inmóvil en el lecho fluvial, invalidando así cualquier resultado. La distancia que tiene que recorrer el trazador para que se mezcle perfectamente con el agua fluvial depende de la turbulencia, y se puede calcular mediante formulas empíricas (Kilpatrick y Wilson 1989).

Se deben evitar tramos fluviales con evidentes entradas laterales. Si el interés se centra en las ZRT, es importante integrar un tramo suficientemente largo que las pueda incluir (del orden de centenares de metros). Obviamente, eso implica que, aunque técnicamente la adición dure unas pocas horas, el seguimiento de la curva puede durar mucho más.

REQUISITOS HIDROLÓGICOS

Además de los límites impuestos por el caudal y la elección del trazador, es importante que el caudal sea estable durante las adiciones, ya que las ecuaciones 4.1 y 4.2 asumen que los flujos de agua entre el cauce y la ZRT están en equilibrio. Formalmente esto significa que:

$$k_1 V_S = k_2 V_{ZRT} \quad (4.3)$$

donde V_S : volumen de agua de agua en el cauce; y V_{ZRT} : volumen de agua en la ZRT.

Siendo en el tramo de estudio:

$$V_S = A_{Sup} x \quad (4.4)$$

$$V_{ZRT} = A_{ZRT} x \quad (4.5)$$

donde A_{Sup} : sección transversal del agua superficial en el cauce; A_{ZRT} : sección transversal del agua en la ZRT; y x : longitud del tramo de estudio.

De aquí que la ecuación 4.3 se modifica en:

$$k_1 A_{Sup} = k_2 A_{ZRT} \quad (4.6)$$

La ecuación 4.6 es válida únicamente si el caudal no varía durante la adición. En esta ecuación el único parámetro que se conoce es A_{Sup} (que se obtiene midiendo

el caudal y la velocidad de la corriente). La estima indirecta de k_1 y k_2 que se detalla a continuación permite estimar A_{ZRT} y cuantificar así el tamaño de la ZRT.

ELABORACIÓN DE LOS DATOS. ESTIMA DE LOS PARÁMETROS DE RETENTIVIDAD

Se pueden utilizar dos aproximaciones metodológicas para estimar las tasas k_1 y k_2 ; ambas necesitan tener toda la curva de ADRT.

Una aproximación consiste en intentar simular las ecuaciones 4.1 y 4.2 hasta que se ajusten lo mejor posible a los datos reales. El programa OTIS (Runkel y Chapra 1993), elaborado expresamente con esta finalidad, se puede descargar gratuitamente desde la página web del Servicio Geológico de Estados Unidos (<http://webserver.cr.usgs.gov/otis/>) con toda la información necesaria para su uso. Brevemente, en esta aproximación el primer paso es ajustar el valor de v , sucesivamente el de D y finalmente se cambia el parámetro k_1 hasta ajustar la cola de la curva ADRT simulada lo mejor posible a la cola de la curva real.

La segunda aproximación fue propuesta por Hart (1995). Su ventaja es que permite estimar k_1 y k_2 sin necesidad de ajustar visualmente una curva teórica a los datos empíricos. Este método omite la estima de la dispersión D , que en algunos casos puede ser muy laboriosa.

Según Hart, el valor de k_2 se estima utilizando exclusivamente los datos reales de la parte final de la cola de la curva ADRT, que se obtienen a partir del tiempo (t^*):

$$t^* > T + x/v \quad (4.7)$$

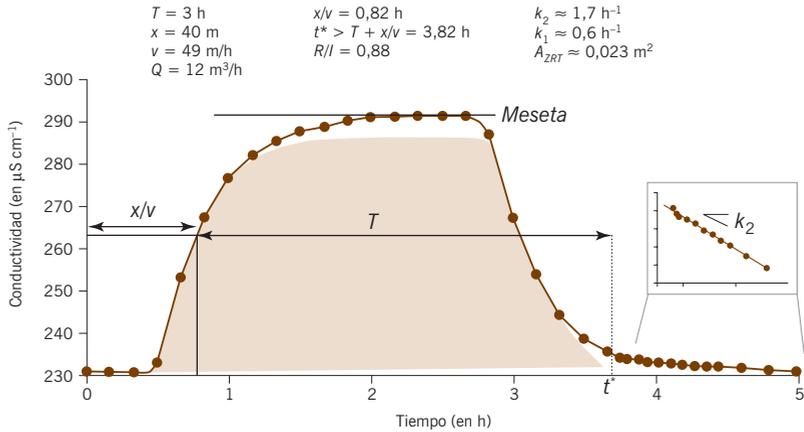
donde T : duración de la adición (s); x : longitud del tramo de estudio (distancia entre el punto de seguimiento y el punto de adición, en m); v : velocidad del agua en el cauce (m/s; luego x/v es el tiempo de residencia del agua en el tramo de estudio).

Se supone que a partir del tiempo t^* la presencia del trazador en el agua fluvial se debe exclusivamente a la entrada de agua proveniente de la ZRT, que sigue llevando un poco de trazador. La relación entre el logaritmo de las concentraciones del trazador en el cauce respecto al tiempo t^* debería ajustarse a una recta con una pendiente k_2 . Si la concentración del trazador en el tiempo t^* es nula, k_2 será cero.

El valor de k_1 se estima mediante la ecuación 4.8, utilizando toda la curva ADRT:

$$k_1 \approx -\frac{v}{x} \ln\left(\frac{R}{I}\right) \quad (4.8)$$

Figura 4.4:
Ejemplo de una curva de advección-dispersión y de retención transitoria (ADRT) obtenida durante una adición a flujo constante y utilizada para estimar los valores de los parámetros de retentividad (k_1 , k_2 y A_{ZRT})



Nota: En el recuadro se detalla la caída temporal del trazador durante la cola de la curva de ADRT. Para más detalles, véase el texto.

T: duración de la adición; *x:* longitud del tramo de estudio; *v:* velocidad de la corriente; *Q:* caudal del río; *I:* área total de la curva de ADRT; *R:* porción del área de la curva ADRT (sombreada) que no ha estado en contacto con la ZRT.

donde *I:* área de la curva ADRT ($g L^{-3} s$); *R:* una porción del área *I* ($R \leq I$), que describe la cantidad de trazador que fluye en el cauce sin haber estado en contacto con la ZRT. El área *I* se calcula integrando la curva de ADRT:

$$I = \int_{i=0}^{\infty} C_t dt \tag{4.9}$$

El punto crítico es estimar la subárea *R*. Según Hart, los límites del área *R* se diferencian de los límites del área *I* en los puntos en que la curva ADRT presenta cambios de pendiente (fig. 4.4). Si estos cambios de pendiente no se detectan, $R = I$, y en consecuencia $k_j = 0$.

METODOLOGÍA DE CAMPO

Para ejecutar una adición a flujo constante, una vez elegido el tramo de estudio y determinados los puntos de la adición y de monitorización, hay que seguir estos pasos:

1. Preparar la bomba peristáltica y calcular su flujo mediante un cronómetro y una probeta graduada.
2. Preparar la solución madre disolviendo la sal en un depósito de unos 10-20 L de agua del río.
3. Recoger tres partes alícuotas (20 mL) de la solución madre y ponerlas en tres viales de vidrio. Anotar el valor de la conductividad, que tiene que ser de tres órdenes de magnitud mayor que la conductividad basal del río.

4. Poner el tubo de succión de la bomba en el depósito con la solución madre y el de inyección en medio del cauce, donde haya turbulencia.
5. Medir la distancia entre el punto de adición y el de monitorización. Esta distancia (del orden de centenares de metros) depende de las características hidrológicas y morfológicas, tal como se ha detallado anteriormente.
6. Colocar en el punto de monitorización un conductivímetro conectado a un *datalogger* y recoger unas cuantas muestras de agua.
7. Poner en marcha, simultáneamente, la bomba peristáltica, el conductivímetro y un cronómetro (se necesitan al menos dos personas).
8. Esperar, en el punto de muestreo a que la conductividad llegue a un valor constante (meseta). Mientras tanto, ir vigilando que la bomba peristáltica funcione correctamente.
9. Recoger unas cuantas muestras de agua fluvial en la meseta.
10. Interrumpir la adición y anotar su duración.
11. Esperar a que la conductividad en el punto de muestreo vuelva al valor basal previo a la adición.

Las muestras recogidas sirven para analizar la concentración de cloruros, y así convertir la curva de conductividad en curva de cloruro y estimar la masa de cloruro vertida al río.

Técnica 3. Medición del caudal

Técnica 3a. Medición mediante adiciones

Las técnicas de dilución de un soluto inerte en un punto del cauce y el posterior análisis de su transporte y dispersión río abajo permiten calcular el caudal y la velocidad de la corriente de los arroyos. Se pueden utilizar indistintamente las adiciones a flujo constante y las adiciones en pulso. A continuación se detallarán los pasos metodológicos de una adición en pulso porque es mucho más rápida, simple y económica. El cálculo del caudal mediante una adición a flujo constante se puede encontrar en Hauer y Lamberti (2006).

La macro 4.2 permite calcular el caudal en función de las adiciones

En las adiciones en pulso se vierte una solución con una alta concentración de un trazador (NaCl) de forma instantánea en un punto turbulento del cauce. El trazador se diluirá, transportará y dispersará gradualmente aguas abajo. En el punto de monitorización, situado aguas abajo, se registran los cambios de conductividad eléctrica generados por el pulso de trazador. De esta manera se obtiene la gráfica de la dinámica temporal del trazador (denominada gráfica de AD), que tiene la forma aproximada de un triángulo. Matemáticamente, la curva de AD se puede simular mediante la ecuación 4.1 de advección y dispersión,

ilustrada anteriormente (véase la primera ecuación del sistema en el que se asume que $k_i = 0$).

SELECCIÓN DEL TRAMO

En el punto de la adición tiene que haber turbulencia para favorecer la mezcla inmediata entre la solución y el agua fluvial. Si no se encuentra un punto con estas características, se puede agitar enérgicamente el agua fluvial con las manos en el momento de echar la solución madre al río. A diferencia del método de la retentividad hidráulica, es preferible que en el tramo seleccionado no haya zonas en que el agua se pueda almacenar de forma transitoria. De aquí la preferencia por tramos cortos (de unas decenas de metros) y sin entradas laterales (Kilpatrick y Wilson 1989).

ELABORACIÓN DE LOS DATOS. ESTIMA DEL CAUDAL

Una vez obtenida la curva AD de conductividad en el punto de monitorización y convertidos los valores de conductividad de la solución y de la curva AD en concentraciones de cloruros, la estima del caudal (L/s) se obtiene mediante la relación entre la masa de Cl^- vertida al río (M_{SM}) y el área de la curva AD:

$$Q = \frac{M_{SM}}{\int_{i=0}^{\infty} Cl_i dt} + \frac{M_{SM}}{\sum_{i=0}^{\infty} Cl_i \Delta t} \quad (4.10)$$

donde Cl_i : concentración de cloruros en el punto de monitorización en el instante i ; y Δt : frecuencia de recogida de datos mediante el *logger* (del orden de unos pocos segundos).

De la ecuación 4.10 se deduce que para calcular M_{SM} hay que conocer la concentración de cloruros y el volumen de la solución madre.

Si se conoce la distancia entre el punto de la adición y el de medición (ΔX) y está bien sincronizada la curva AD respecto al instante en que empieza la adición, se puede calcular fácilmente la velocidad media (V_m , en m/s) de la corriente en el cauce:

$$V_m = \frac{\Delta X}{\Delta t} \quad (4.11)$$

donde Δt es el intervalo de tiempo que necesita la conductividad eléctrica para llegar al pico de la curva AD.

METODOLOGÍA DE CAMPO

Una vez elegido el tramo de estudio con los puntos de la adición y de monitorización, hay que seguir los siguientes pasos:

1. Preparar la solución madre disolviendo la sal en una botella de unos 2-5 L de agua del río.
2. Recoger tres partes alícuotas (20 mL) de la solución madre y ponerlas en tres viales de vidrio. Anotar el valor de la conductividad (tiene que ser de tres órdenes de magnitud mayor que la conductividad del río).
3. Calcular el volumen exacto de la solución que se tirará al río y ponerla en un cubo.
4. Seleccionar los puntos de la adición y el punto de monitorización e instalar el conductímetro con el *logger*.
5. Medir la distancia entre el punto de adición y de monitorización. Esta distancia (de unas decenas de metros) depende de las características hidrológicas y morfológicas del tramo de estudio.
6. Verter de golpe la solución al río en el punto de adición y simultáneamente poner en marcha el conductímetro y el cronómetro (se necesitan dos personas como mínimo).
7. Esperar en el punto de muestreo que la conductividad llegue a un valor máximo y recoger unas cuantas muestras de agua.
8. Esperar a que la conductividad en el punto de muestreo vuelva al valor inicial.

Material	Tipo de adición	
	A flujo constante	En pulso
Bomba peristáltica de campo (a 12 V)	✓	
Batería ¹ de 12 V	✓	
Cronómetro	✓	
Conductímetro ²	✓	✓
Sal (NaCl) 2-4 kg	✓	✓
Depósito de 10-30 L	✓	✓ ³
<i>Datalogger</i> conectado a un conductímetro	✓	✓
Probeta graduada ⁴	✓	
Cinta métrica	✓	✓

Cuadro 4.1:

Lista de material necesario para la ejecución de una adición a flujo constante y a pulso

¹ El número de baterías depende de la duración de la adición. Si se puede alimentar la bomba peristáltica con la red eléctrica, la batería es superflua.

² Si no dispone de un *logger* es necesario apuntar los valores de conductividad a mano. En este caso el cronómetro es indispensable también en la adición instantánea.

³ En este caso el depósito puede ser un simple cubo de unos 5 litros.

⁴ Necesaria para calcular in situ el flujo de la bomba peristáltica.

La macro 4.3 está diseñada para facilitar el cálculo del caudal mediante correntímetro

Técnica 3b. Medición mediante correntímetro

La corriente del agua es una de las variables ambientales que más influyen sobre los organismos fluviales (capítulo 9), por lo que el correntímetro es un instrumento de gran uso en ecología de ríos. Una de sus aplicaciones más inmediatas es la medición directa de caudal. Hay numerosos modelos de correntímetros, de distinto tamaño, precio y prestaciones, pero los más habituales son los de hélice. En éstos, es crítico elegir el tamaño apropiado de hélice: las hélices grandes son más precisas a velocidades bajas y funcionan mejor en ríos profundos, las hélices pequeñas permiten mayor precisión en arroyos rápidos y someros. En los arroyos vadeables y a caudal basal, éste es relativamente fácil de medir, pero para ríos profundos es necesario utilizar embarcaciones y correntímetros de mucho peso y sujetos mediante fuertes cables.

MATERIAL

- Cinta métrica.
- Correntímetro.
- Regla o bastón para medir profundidades.

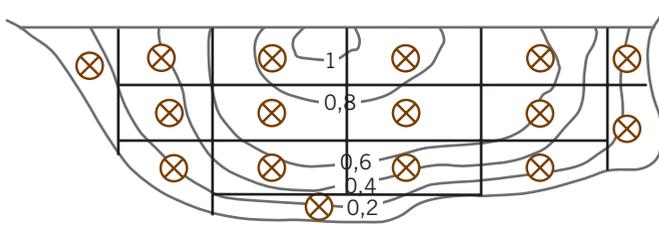
PROCEDIMIENTO DE CAMPO

Selección del punto de medida

La precisión en las determinaciones de caudal mediante correntímetro depende mucho de la selección del punto de medida. Los correntímetros habituales tienden a dar más problemas a velocidades bajas que a altas, por lo que conviene buscar zonas de rápidos, a ser posible en las que el cauce esté constreñido por orillas bien marcadas, y donde el agua fluya con flujo más o menos laminar. En algunos ríos una buena parte del caudal puede circular por el hiporreos, por lo que convendría seleccionar puntos en los que aflora la roca madre. A ser posible, deben evitarse zonas en las que haya remolinos en el cauce (por ejemplo, debajo de grandes bloques o en la entrada a una poza). En ríos pequeños, realizar un poco de trabajo de acondicionamiento (por ejemplo, quitar unas piedras que crean remolinos) puede hacer mejorar ostensiblemente la precisión de la medida.

Realización del aforo

1. Medir la anchura húmeda del cauce con la cinta métrica.
2. A intervalos regulares, medir la profundidad. Para arroyos muy estrechos (menos de 4 m) conviene tomar medidas cada 0,25 m, para ríos más anchos cada metro.
3. Medir la corriente a intervalos regulares con el correntímetro. Las determinaciones pueden coincidir exactamente con las de profundidad, pero eso no

**Figura 4.5:**

Ejemplo de sección fluvial en la que se han tomado 16 medidas de velocidad (círculos con aspa), y asignación de la superficie a cada medida (m/s)

siempre es necesario. Si la profundidad supera en más de cinco veces el diámetro de la hélice, conviene determinar la velocidad a dos o más profundidades.

Cálculos

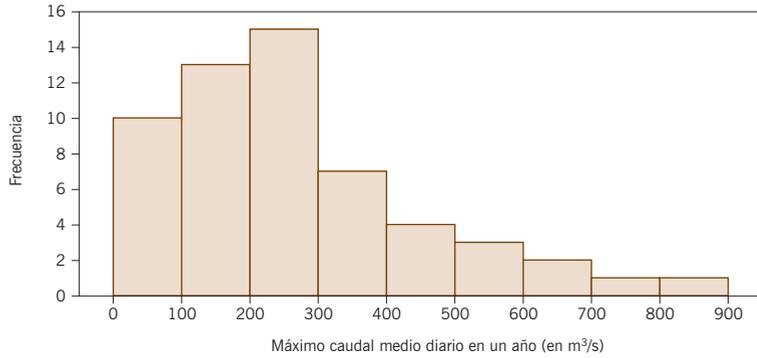
1. Sobre la base de los datos de anchura y profundidad, se calcula la sección del río. Esto se puede hacer gráficamente, en papel milimetrado, o mediante una hoja de cálculo.
2. Partir la sección del río en tantos trozos como determinaciones de caudal tengamos (fig. 4.5).
3. Calcular la sección de cada trozo, y multiplicándola por la velocidad, calcular el caudal de agua que circula por esa sección.
4. Sumar el caudal de todas las secciones para obtener el caudal total del punto.
5. Si se va a estudiar una estación repetidamente, conviene realizar una *curva de gastos*, es decir, analizar la relación entre el nivel del agua y el caudal. Para ello se puede fijar una regleta a la estación, anotar el nivel cada día que midamos el caudal, y realizar una regresión para calcular el caudal a partir del nivel. Posteriormente se puede utilizar sólo el dato de nivel basado en la regleta, siempre que la geometría del cauce no haya variado.

Técnica 4. Análisis de frecuencia de avenidas

Una de las aplicaciones de las series temporales de caudal en ríos es predecir la intensidad o la probabilidad de que se produzcan crecidas de una magnitud determinada. Esta información se puede calcular mediante el análisis de frecuencias de series temporales de caudales extremos, máximos o mínimos anuales, según los casos. Su aplicación más sencilla consiste en asignar una probabilidad a cada evento de una determinada magnitud. Así, la probabilidad de que en un año determinado ocurra una crecida de magnitud Q de tiempo de recurrencia T es:

$$p = 1/T \quad (4.12)$$

Figura 4.6:
 Histograma de frecuencias de los máximos caudales medios diarios que han pasado durante un año natural por la estación de aforo de Roda de Ter, en el río Ter (España), durante el período 1950-2007



Fuente: Datos proporcionados por la Confederación del Ebro.

El valor de p indica la probabilidad de que se alcance o exceda un determinado caudal. Es muy importante destacar que el método se basa en la asignación de probabilidades a cada evento, puesto que una crecida con un período de retorno de 50 años no indica, necesariamente, que se produzca cada 50 años sino que tiene una probabilidad de $1/50 = 0,02$ de producirse en un año determinado. Aunque en un año se produzca una crecida de esta magnitud, al año siguiente vuelve a haber una probabilidad de $0,02$ de que vuelva a producirse, y así sucesivamente para todos los años. Por este motivo, el método se basa en la construcción de una curva de frecuencias de eventos hidrológicos para un determinado intervalo de tiempo (fig. 4.6) a la que se ajusta una función de distribución.

Aunque se han propuesto diferentes funciones, como la de Gumbel y Cunnane, entre otras (Gordon et al. 2004), en ecología se ha utilizado preferentemente la función de Weibull, que parece ser la más adecuada cuando se trabaja en ríos de poco caudal y con valores mínimos anuales. Según dicha función, la probabilidad de que se produzca un evento que iguale o supere un caudal Q es:

$$p = m / (n + 1) \quad (4.13)$$

donde n : longitud de la serie; m : número de rango, siendo el caudal de mayor magnitud igual a 1, y así sucesivamente hasta el mínimo valor de la serie, que valdrá n .

En la figura 4.7 se puede observar la distribución de probabilidades obtenida según la ecuación 4.13 y para una serie de máximos caudales medios diarios para cada año en una serie de 58 años (1950 a 2007). Aunque este tipo de series no sigue una función estadística determinada se ha intentado ajustarla a alguna de las más conocidas, a efectos de realizar inferencias. La forma más simple es el método gráfico utilizando papel probabilístico o, aún más sencillo, hacer interpolaciones entre eventos. No obstante, se han realizado aproximaciones a algunas de las

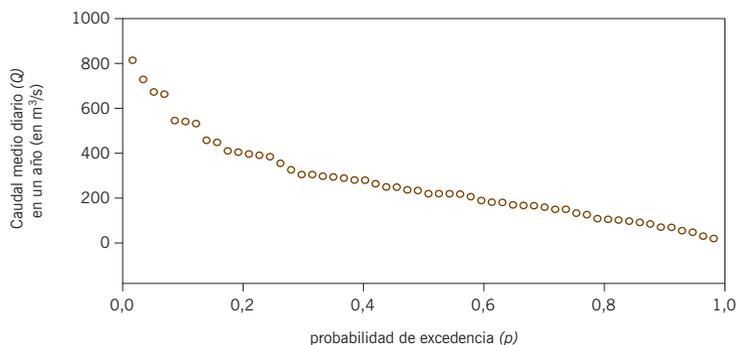


Figura 4.7: Función de distribución de probabilidad de excedencia de un determinado caudal máximo anual para la serie de valores medios diarios en un año natural, para el período 1950-2007 en el río Ter, a la entrada del embalse de Sau

distribuciones estadísticas más comunes, y cómo no, entre ellas la distribución normal o de Gauss. Como se puede ver en la figura 4.7, las funciones de distribución raramente tienen la forma de campana de Gauss, entre otras cosas porque difícilmente se tienen valores máximos anuales de cero y porque los eventos extremos son raros y confieren a la función de distribución una forma fuertemente asimétrica hacia el lado derecho. De todas formas, cuando se obtienen ajustes estadísticamente significativos con alguna función de distribución, el nivel de predictibilidad aumenta con respecto a métodos gráficos o de interpolación entre eventos.

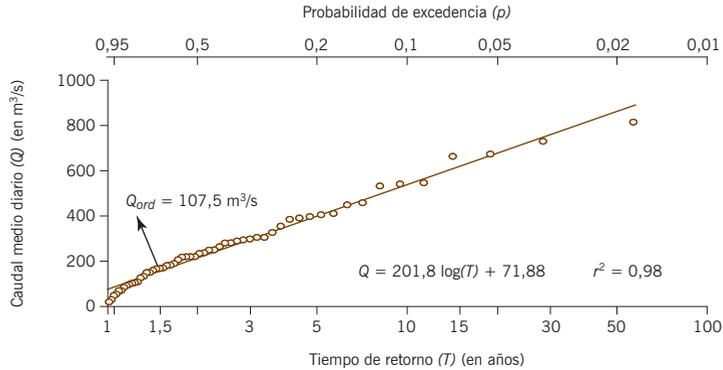
La investigación sobre ajustes entre funciones de distribución de caudales con funciones estadísticas conocidas es un campo abierto y en continuo debate, entre otras razones porque las características hidrológicas de cada río se ajustan mejor a unas o a otras. A modo de ejemplo, en Estados Unidos y Australia las agencias federales utilizan la distribución *log Pearson III*, la cual incluye la distribución *log-normal* como caso especial. Por el contrario, en el Reino Unido y en ingeniería civil, parece tener mayor predicamento la *distribución general de valores extremos (GEV)*, dentro de la cual la distribución de Gumbel, o de doble distribución exponencial, es un caso particular (Gordon et al. 2004). Como se ha señalado anteriormente, en ecología se ha aplicado de forma preferente la distribución de Weibull (Allan 1995, Hauer y Lamberti 2007) y ésta es la distribución aplicada a la serie de datos del río Ter para el período 1950-2007 (fig. 4.7).

El punto de partida de un análisis de frecuencia de caudal es una serie temporal de eventos extremos, ya sean máximos o mínimos anuales. En el caso de los máximos, es preferible utilizar el valor del pico de la máxima crecida que se ha producido en un año, y cuando no se dispone de esta información se puede sustituir por el máximo caudal medio diario, también para un año, como se ha hecho con la serie de caudales del río Ter. Hay que señalar que ambas series no dan resultados iguales para ríos de bajo número de orden o cuencas pequeñas, como es el caso del Ter, y tienden a converger cuando la superficie de la cuenca aumenta.

La macro 4.4 muestra cómo realizar el análisis de frecuencia de caudales sobre la base de los datos históricos del río Ter

Figura 4.8:

Análisis de frecuencias para los valores máximos de caudales medios diarios medidos durante un año natural en Roda de Ter, durante el período 1950-2007



Nota: La distribución se ha ajustado de forma significativa ($p < 0,001$) a una función semilogarítmica, lo que permite realizar inferencias, tanto de la probabilidad de excedencia como del período de retorno, dentro del rango de variación de los caudales medidos. A modo de ejemplo se ha calculado el caudal ordinario (Q_{ord}).

Es conveniente que una vez obtenida una función de distribución, a partir de una serie de datos, se intente buscar ajustes estadísticos significativos. Cuando se consigue, se puede realizar una generalización de los resultados dentro del rango temporal estudiado y, con ciertas limitaciones, su extrapolación a períodos un poco más largos. En el caso de la serie de datos del río Ter, y utilizando el método de Weibull, se ha obtenido un ajuste estadístico significativo ($p < 0,001$) mediante una transformación semilogarítmica (fig. 4.8), lo que permite utilizar la recta de regresión obtenida para algunas aplicaciones, como el cálculo del caudal ordinario o *bankfull*.

El método de predecir tiempos de retorno está lejos de ser perfecto, independientemente de cuál sea el utilizado para obtener la función de probabilidad. Algunas de las críticas se centran en la dificultad de tener series largas, que además incluyan los eventos puntuales, el pico de la crecida, y no la media diaria. También hay que tener en cuenta que los eventos de baja probabilidad son raros y esto hace difícil que las series usadas los incluyan. Otras veces ocurre lo contrario, nuestra serie tiene un acontecimiento extremo con período de retorno mucho más largo que la que hemos acumulado, y esto altera la función de probabilidad. En los últimos años la actividad humana en muchas cuencas ha sido drástica, con deforestación, incremento de la superficie agrícola, así como cambios en la morfología del río por encauzamientos, puentes, embalses, etc. De todos modos, en la cuenca del río Ter ha ocurrido el caso contrario. El abandono de campos de cultivo o de la explotación forestal ha facilitado el desarrollo de la masa forestal. En este caso el efecto ha sido el de disminuir la escorrentía superficial y aumentar la evapotranspiración, dando lugar a una reducción en el caudal del río, que en los últimos 40 años ha disminuido en torno al 40%.

En los últimos años la posibilidad de disponer de información detallada de la cuenca a través de sistemas de información geográfica ha abierto las puertas a la modelización hidrológica. Cuando se dispone de modelos con los que simular los efectos de un amplio rango de precipitaciones, buena parte de los inconvenientes de las series temporales más o menos largas desaparecen y el problema se limita a realizar una buena calibración del modelo para la cuenca. En el caso de la cuenca del río Ter se han obtenido excelentes resultados mediante la utilización del modelo *Hydrological Simulation Program-Fortran* (HSPF) (Marcé et al. 2008).

4.3. Bibliografía

- ALLAN J.D., y CASTILLO M.A. *Stream ecology: Structure and function of running waters*. Dordrecht: Springer, 2007.
- GORDON N.D., MCMAHON T., FINLAYSON B.L., GIPPEL C.J., y NATHAN R.J. *Stream hydrology, an introduction for ecologists*. Chichester: Wiley, 2004.
- HART D.R. «Parameter estimation of stochastic interpretation of the transient model for solute transport in streams». *Water Resources Research* 31 (1995): 323-328.
- HAUER F., y LAMBERTI G. *Methods in stream ecology*. Londres: Elsevier Academic Press, 2006.
- JUNK W., BAYLEY P., y SPARKS R. «The flood pulse concept in river-floodplain systems». *Dodge DP: Can Spec Publ Fish Aquat Sci* 106 (1989): 110-127.
- KILPATRICK F.A., y WILSON JR. J.F. «Measurement of time of travel in streams by dye tracing: Techniques of water-resources investigations of the United States Geological Survey». En *Book 3. Applications of hydraulics*, 1989: 27.
- KNIGHT D.W., y SHAMSELDIN A.Y., eds. *River basin modeling for flood risk mitigation*. Londres: Taylor and Francis, 2006.
- LYTLE D.A., y POFF N.L. «Adaptation to natural flow regimes». *Trends in Ecology and Evolution* 19 (2004): 94-100.
- MARCÉ R., RUIZ C.E., y ARMENGOL J. «Using spatially distributed parameters and multiresponse objective functions to solve parametrization of complex applications of semi-distributed hydrological models». *Water Resources Research* 44 (2008): W02436, doi: 10.1029/2006WR005785.
- NILSSON C., REIDY C.A., DYNESIUS M., y REVENGA C. «Fragmentation and flow regulation of the world's large river systems». *Science* 308 (2005): 405-408.
- RUNKEL R.L., y CHAPRA S.L. «An efficient numerical solution of the transient storage equations for solute transport in small streams». *Water Resources Research* 29 (1993): 211-215.
- SABATER S., ELOSEGI A., ACUÑA V., BASAGUREN A., MUÑOZ I., y POZO J. «Effect of climate on the trophic structure of temperate forested streams. A comparison of Mediterranean and Atlantic streams». *The Science of the Total Environment* 390 (2008): 475-484.
- TOWNSEND C., DOLÉDEC S., y SCARSBROOK M. «Species traits in relation to temporal and spatial heterogeneity in streams: A test of habitat templet theory». *Freshwater Biology* 37 (1997): 367-387.

La estructura física de los cauces fluviales

ARTURO ELOSEGI Y JOSERRA DÍEZ

5.1. Introducción

Todos los ríos del planeta tienen una serie de características comunes que se derivan de la corriente del agua, pero también numerosas particularidades en función de las características climáticas y de la cuenca que drenan: área, geología, suelos, topografía, usos del suelo, cubierta vegetal, impactos humanos, etc. De hecho, los cauces fluviales pueden ser muy diferentes entre sí, desde estrechos cañones de montaña hasta grandes ríos de llanuras aluviales (fig. 5.1). La estructura física de los cauces es una de las características que más influyen tanto en la estructura como en el funcionamiento del ecosistema fluvial y, por tanto, su descripción tiene gran interés. Por ejemplo, en una escala de tiempo reducida, los ríos que atraviesan cañones suelen ser muy sombríos y tener escasa producción primaria, mientras que los ríos trenzados de piedemonte suelen ser mucho más abiertos, aunque menos estables.

Los cauces de los ríos pueden ser muy diferentes y su estructura física influye en el funcionamiento fluvial

La geomorfología fluvial es una disciplina científica que ha ido acumulando un gran volumen de conocimiento, que no pretendemos recoger aquí. En este capítulo nos limitaremos a esbozar los conceptos básicos que mayor incidencia pueden tener en el funcionamiento del ecosistema. Los lectores que deseen profundizar en la geomorfología fluvial pueden consultar libros excelentes, como el clásico de Strahler (1986), los más específicos de Rosgen (1996) y Kondolf y Piégay (2002), o para temas más relacionados con la conservación, Petts y Calow (1996) y FISRWG (1998).

Figura 5.1:

*Diversos tipos de río:
a) gran río de llanura, b) río
trenzado de piedemonte,
c) río temporal de desierto,
d) arroyo de montaña,
e) arroyo de lecho arenoso y
f) arroyo travertínico*

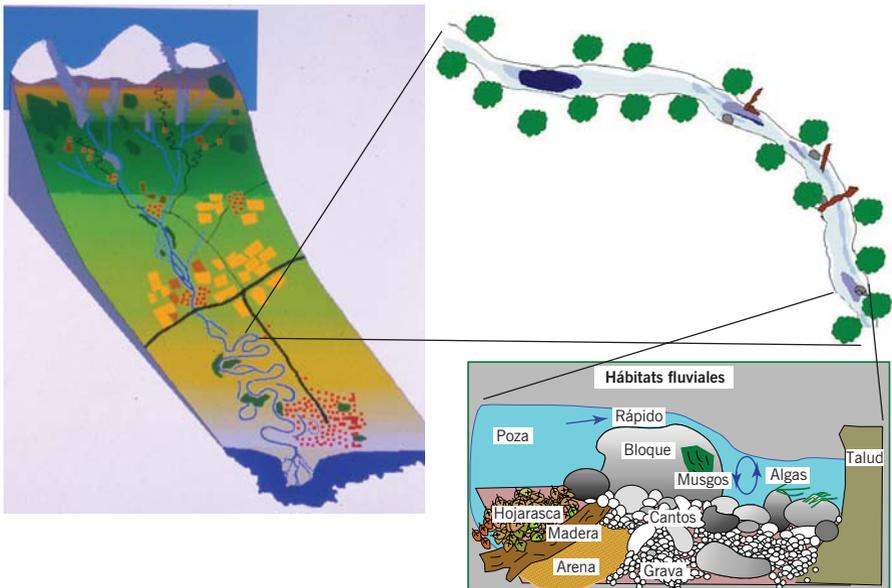


Nota: a) Danubio (Hungria), b) Tagliamento (Italia), c) Nuevo México (Estados Unidos), d) Agüera (España), e) Landas francesas; obsérvese que los escasos sustratos estables en el cauce, fundamentalmente troncos, aparecen cubiertos por algas, y f) Urederra (España).

La forma del cauce tiene implicaciones biológicas a múltiples escalas (fig. 5.2). A escala macroscópica, de kilómetros a centenares de kilómetros, la morfología fluvial determina la distribución y abundancia de hábitats y refugios, y las posibilidades de dispersión para las especies de mayores requerimientos espaciales, como los peces migratorios. A escala de tramo o sección fluvial, es decir, entre

Figura 5.2:

*Tres escalas a las que es
significativo el papel
biológico de la morfología
fluvial*



unas decenas de metros y 1 km de cauce, la heterogeneidad de formas en el lecho, como la abundancia de rápidos y pozas, determina la diversidad de hábitats, y en consecuencia, la diversidad de organismos. A escala de unos pocos metros a centímetros, la distribución de distintos tipos de sedimento influye en las conexiones entre el agua superficial y la hiporreica, o en la estabilidad y crecimiento del biofilm. En cada una de estas escalas, la pendiente, la rugosidad del cauce, el caudal y la velocidad de la corriente establecen condiciones acordes al gradiente fluvial, desde la cabecera hasta la desembocadura.

5.2. Cauce y transporte de sedimentos

Cada río es un sistema de transporte donde la pendiente, por lo general, va disminuyendo con el gradiente fluvial. La capacidad de arrastre de sedimentos depende del caudal y de la pendiente, y el tipo de cauce que se forma depende, además, del tamaño del sedimento y de lo erosionable que sea el sustrato. De esta forma, los ríos normalmente tienen en cabecera tramos erosivos en los que el cauce se va encajando en los terrenos adyacentes, por lo que en estas circunstancias se suelen encontrar cauces rectilíneos y constreñidos, es decir, sin apenas posibilidad de migración lateral (fig. 5.3). En los tramos de mayor pendiente, el cauce suele presentar cascadas, mientras que en tramos de pendiente algo menor, es típica una estructura de escalones y pozas. Si la pendiente es aún menor suele haber alternancia de rápidos y pozas.

Los ríos de montaña suelen acarrear gran cantidad de sedimentos. En su salida a la llanura del piedemonte, la capacidad de arrastre disminuye, por lo que se de-

El tipo de cauce que se forma depende del caudal, de la pendiente y de la erosibilidad del sustrato



Figura 5.3:
Un arroyo de montaña de cauce constreñido. El sustrato geológico consiste en estratos horizontales, lo que unido a la elevada pendiente favorece la creación de estructuras con escalones y pozas

Figura 5.4:
*Río trezado en el
 piedemonte del Pirineo
 (España)*



Nota: Obsérvense las amplias graveras no colonizadas por la vegetación; ello indica la inestabilidad de esas áreas, que son perturbadas por cada crecida.

positan los sedimentos transportados. Éstos, a menudo, obstaculizan el cauce, que se ve forzado a migrar, formándose lo que se denominan *ríos trezados* o *anastomosados* (fig. 5.4). En ambos casos suele haber múltiples cauces, pero así como en los trezados éstos son muy inestables, con lo que suelen estar rodeados de amplias zonas con gravas desnudas, los ríos anastomosados acostumbran ser más estables, y las áreas entre los cauces suelen estar colonizadas por la vegetación.

Aguas abajo, la pendiente del valle disminuye aún más, con lo que se reduce la capacidad de acarreo de sedimentos. Los ríos pasan a tener lechos arenosos o limosos, y normalmente adquieren un cauce meandriforme que discurre en medio de una amplia llanura de inundación (fig. 5.5). En esta llanura, el sustrato está conformado por arenas o limos depositados en el pasado por el propio río, lo que hace que las márgenes sean poco estables, y favorece la propensión de los meandros a migrar. Antiguos meandros abandonados forman una serie de lagos en herradura, que pueden reconectarse periódicamente con el cauce principal durante las crecidas, o bien pueden mantener conexiones a través de hiporreos. Los ríos meandriformes pueden tener una extraordinaria diversidad de hábitats físicos.

Finalmente, los ríos que desembocan en lagos o mares pueden formar deltas, en los que cada crecida deposita sedimentos que fuerzan a la constante migración de la red de cauces.

El transporte de sedimentos y, por tanto, los cambios en la morfología del cauce, suelen ser bastante episódicos, y ocurren principalmente durante las crecidas. Aunque las grandes crecidas con períodos de retorno elevados pueden reestruc-



Figura 5.5:
Río meandriforme en las montañas Rocosas (Estados Unidos)

Nota: Obsérvese el complejo entramado de cauces activos y meandros abandonados y cómo han estabilizado las márgenes para construir el puente.

turar el cauce de forma acusada, las crecidas más influyentes suelen ser aquellas más pequeñas, con un período de retorno de uno o dos años, que llenan todo el cauce y están a punto de desbordar a la llanura de inundación. Esto es lo que se llama *caudal dominante* o *bankfull*.

5.3. Clasificación de los tipos de río

Este esquema general se complica mucho, puesto que no todos los ríos tienen un mismo perfil longitudinal. Hay ríos que nacen en zonas de altiplano, caen después en cascadas vertiginosas, atraviesan cañones, vuelven a zonas de llanura, incorporan afluentes cargados de sedimentos, etc. En cualquier caso, la morfología fluvial muestra cuál es el balance entre la erosión, el transporte y la deposición de sedimentos en cualquier tramo y, además, determina en gran medida los organismos que habitan en un determinado tramo, así como el funcionamiento del ecosistema (fig. 5.6). Hay numerosos métodos de clasificación de la morfología fluvial, pero uno de los más populares es el de Rosgen (1996), que se basa fundamentalmente en la forma del cauce, en el nivel de encajamiento, en el tipo de sustrato y en la pendiente (fig. 5.7).

Cualquiera que sea el tipo de río, debemos tener en cuenta que su morfología es fruto de un equilibrio dinámico entre la carga de sedimentos que recibe y su capacidad de transporte. Por tanto, el río ajustará su morfología ante cualquier cambio en alguna de estas variables. Por ejemplo, si aumenta la erosión aguas arriba (por ejemplo, por efecto de la deforestación) llegarán sedimentos en exceso que el río no podrá arrastrar, con lo que el cauce se *agradará*, es decir, irá su-

La forma del cauce es fruto del equilibrio entre los sedimentos que recibe y su capacidad de transporte

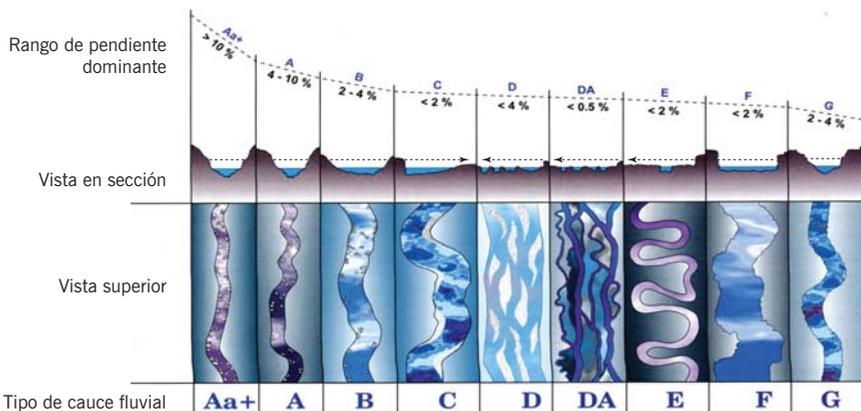
Figura 5.6:
Algunos tipos
especiales de río



Nota: a) Cascada formada por una falla geológica, b) cañón excavado por aguas frías durante la última glaciación, c) surgencia calcárea en zona de descarga de un gran acuífero, d) arroyo estepario sobre sustrato rico en yesos y sales, e) arroyo de llanura en zona deforestada cubierto por macrófitas, f) río de rocas en el piedemonte de un valle de gran erosibilidad, y g) arroyo de montaña en valle glaciar en forma de U.

biendo el nivel del lecho. En casos extremos puede cambiar la tipología, por ejemplo, de un río de cauce único a uno trenzado. Por el contrario, si aumenta la capacidad de transporte, como ocurriría si aumentara el caudal, el río perdería sedimentos, con lo que el cauce se *degradaría*, es decir, el lecho iría encajándose. Por ejemplo, los ríos de llanura de zonas agrícolas frecuentemente se encuentran degradados, ya que los diques laterales de protección de las tierras de cultivo hacen que durante las crecidas el río no desborde, con lo que la velocidad del agua se hace tan grande que el río excava su lecho, y éste queda desconectado de la llanura de inundación.

Figura 5.7:
Tipología fluvial, según
Rosgen (1996)



Nota: Se muestran las vistas longitudinal, en sección y superior.

Fuente: Adaptado de Rosgen (1996).

5.4. Aplicaciones de la geomorfología fluvial

La geomorfología fluvial es de sumo interés, pues describe el marco de estudio y explica buena parte del funcionamiento del ecosistema. Además, en muchas partes del mundo las alteraciones de la morfología del cauce son los principales impactos humanos sobre los ecosistemas fluviales, por lo que es importante conocerlas, y en los casos en los que sea posible, restaurar la morfología original. Dado que en muchos ríos y arroyos esa tarea es muy difícil, al menos se debe posibilitar que el río desarrolle una dimensión estable en sus formas y perfiles, de modo que se mantengan las características del cauce y el sistema no agrade ni degrade.

Las alteraciones del cauce son uno de los impactos más frecuentes que sufren los ríos

Entre las afecciones más comunes se encuentran cambios en la forma del cauce, canalizaciones, revestimientos de *ingeniería dura*, diques laterales, pequeñas presas o azudes que alteran la dinámica de sedimentos, ocupaciones de la llanura de inundación, etc. Otras afecciones comunes están ligadas a cambios en la cantidad de sedimentos exportados debidos a modificaciones en los usos del suelo o prácticas indebidas en la cuenca, así como a cambios en la resistencia de las orillas a la erosión (capítulo 17). Estas últimas son motivadas por la desaparición de la vegetación de ribera, canalización, perturbaciones en el lecho fluvial, presas, compactación del suelo, sobrepastoreo, eliminación de restos de madera en el cauce, etc. Todas estas afecciones ocasionan fuertes impactos en la biodiversidad y funcionamiento del ecosistema, aunque para el ojo no entrenado pueda resultar poco obvio que ese tramo con agua tan limpia y de aspecto tan agradable es, en realidad, un río fuertemente modificado.

Técnica 5. Determinación de la morfología del cauce

Esta técnica se emplea para describir el cauce de un río en un momento determinado. En caso de estar interesados en cambios temporales en la morfología y en las variaciones en la composición del sustrato (técnica 6), es importante repetir los transectos exactamente en los mismos sitios. Para ello hay que marcar puntos que se vayan a mantener fijos durante años, preferentemente árboles o rocas, y en su ausencia estacas metálicas clavadas en las orillas. Hay que tener en cuenta que el viento, el vandalismo y otros factores seguramente harán desaparecer algunas de las referencias, por lo que conviene tener muchas referencias alternativas.

MATERIAL

- Cinta métrica de 50 m.
- Cuerdas de nailon blanco marcadas a intervalos de 50 cm.
- Regla o jalón extensible.

Figura 5.8:
Ejemplo de marca



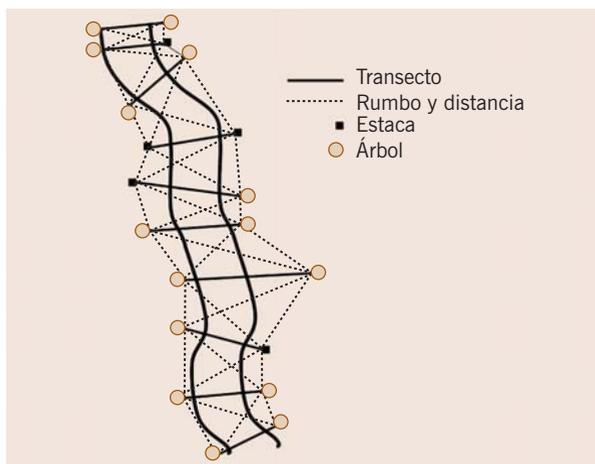
- Correntímetro.
- Brújula.
- Clinómetro o nivel láser. (El nivel láser puede adquirirse en almacenes de bricolaje y su coste no es elevado.)
- Trípode.
- Chapas metálicas numeradas.
- Clavos.
- Estacas de hierro.
- Martillo.
- Maza.

SELECCIÓN DEL TRAMO DE MUESTREO

El tramo del río o arroyo seleccionado debe ser vadeable. Es preferible que el inicio y el final del tramo sean rupturas claras en la geomorfología fluvial, a ser posible estrechamientos. No obstante, no es necesario que todos los tramos tengan exactamente la misma longitud. Marcar claramente y de forma no perecedera los extremos del tramo, por ejemplo, mediante chapas numeradas clavadas a árboles (fig. 5.8).

PROCEDIMIENTO

El procedimiento más seguro es establecer una red de referencias fijas, comenzando por el extremo inferior del tramo, y determinar sus posiciones relativas por triangulación (fig. 5.9). No es importante que todos los transectos se encuentren a la misma distancia. Sin lugar a dudas, el primer muestreo es el más laborioso, pero el trabajo se agiliza mucho en visitas subsiguientes.

**Figura 5.9:**

Ejemplo de red de transectos y rumbos a tomar en un tramo

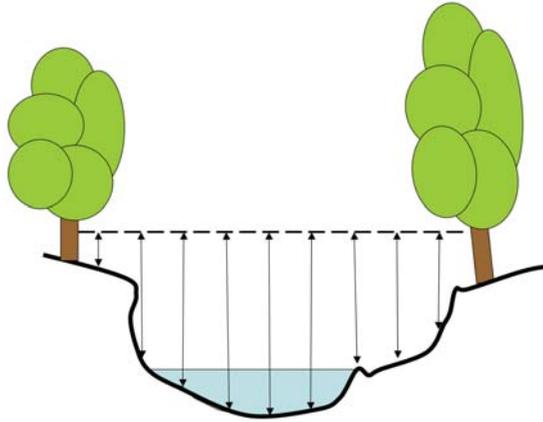
Establecimiento de una red de puntos y transectos

1. Situar en una orilla en el extremo inferior del tramo. Clavar un clavo en un árbol (o una estaca metálica en la orilla). Apoyar sobre él el nivel láser y buscar un punto a la misma altura en el árbol/estaca de enfrente. Clavar otro clavo.
2. Sujetar un trozo de la cuerda marcada, atándola tensamente a ambos clavos. Es importante que la cuerda esté tensa y bien nivelada.
3. Hacer lo mismo en otro transecto, río arriba, distanciando al menos un par de veces la anchura media del tramo. Unir a su vez con cuerdas marcadas la diagonal resultante entre las orillas opuestas de dos transectos consecutivos.
4. Con la brújula y la cinta métrica, determinar el rumbo y las longitudes de ambos transectos, los de las diagonales, y los rumbos y distancias entre los clavos de cada orilla (fig. 5.9).
5. Colocar el nivel láser en el trípode, inmediatamente aguas abajo de la cuerda del primer transecto y apuntando río arriba. Con la regla, medir la altura desde el haz láser hasta la misma.
6. Sin mover el láser, medir con la regla la altura desde el haz hasta la segunda cuerda.
7. Calcular el desnivel entre las cuerdas de ambos transectos.
8. Establecer unos ocho transectos más a lo largo del tramo, determinando el desnivel da cada cuerda respecto a la primera, y los rumbos de todas las líneas entre clavos. Esto se puede hacer de una vez o, mejor, conforme se va determinando la granulometría de los transectos.

Realización de los transectos

1. Empezando siempre en la misma orilla, cada 50 cm medir con la regla la distancia de la cuerda al lecho y la profundidad del agua (figs. 5.10 y 5.11). Determinar el punto en el que empieza y acaba el cauce. En tramos con anchu-

Figura 5.10:
Ejemplo de transecto



ras superiores a los 15 m, la medición de la distancia de la cuerda al lecho se puede realizar cada metro (1 m).

2. En los mismos puntos, determinar el tipo de sustrato del lecho (cuadro 5.1), y si las hubiere, la especie y altura de las macrófitas existentes.
3. En los mismos puntos, y aproximadamente a media columna de agua, medir la velocidad del agua con el correntómetro.
4. Con el clinómetro, medir la pendiente de la zona de ribera en ambas márgenes.

Figura 5.11:
Midiendo el desnivel entre las cuerdas de dos transectos



Nota: En primer plano, el nivel láser y una cuerda marcada y, en segundo plano, buscando el haz láser con un jalón extensible.

Tipo de sustrato	Diámetro (mm)	Detalles
Roca madre	-	Incluir también bloques mayores de 1 m
Bloques	> 250	Mayores que la palma de la mano
Cantos	60 – 250	Entre un puño y una palma
Guijarros	20 – 60	Entre una uña de pulgar y un puño
Grava	0,2 – 20	Menor que la uña del pulgar
Arena	0,006 – 0,2	Tacto áspero, no mancha
Limo	< 0,006	Tacto suave, mancha

Cuadro 5.1:

Tipos de sustrato, según la escala de Wentworth (1922)

Trabajo de gabinete

1. Teniendo en cuenta los rumbos, las distancias y los desniveles entre ellos, calcular por triangulación las coordenadas XYZ de todos los clavos.
2. Calcular las coordenadas XYZ de todos los puntos de los transectos.
3. Calcular la superficie total del cauce y la superficie húmeda (cubierta por agua).
4. Calcular la sección transversal del agua en cada tramo.
5. Calcular la profundidad hidráulica dividiendo la sección transversal por la anchura del cauce húmedo.
6. Calcular el número de Froude (*Fr*) en cada transecto. El *número de Froude* es un parámetro adimensional que indica la intensidad de la corriente:

$$Fr = \frac{v}{\sqrt{g D}} \tag{5.1}$$

donde *Fr*: número de Froude; *v*: velocidad del agua (m/s); *g*: fuerza de la gravedad (m/s²), y *D*: profundidad hidráulica (m).

Valores de *Fr* < 1 indican corriente subcrítica, valores superiores a 1, corriente supercrítica (aguas rápidas).

7. Calcular el número de Reynolds (*Re*) en cada transecto. El *número de Reynolds* es un parámetro adimensional que indica el grado de turbulencia del agua:

$$Re = \frac{v D}{\nu} \tag{5.2}$$

donde *Re*: número de Reynolds; *v*: velocidad del agua (m/s); *D*: profundidad hidráulica (m), y *ν*: viscosidad cinemática (cuadro 5.2), que depende de la temperatura.

Valores de *Re* < 500 indican flujo laminar; mayores que 2000, flujo turbulento.

8. Calcular el porcentaje de cauce cubierto por cada tipo de sustrato. Diferenciar el cauce húmedo del seco.

La macro 5.1 ayuda en el cálculo de coordenadas XYZ de los transectos

La macro 5.2 calcula algunas variables físicas, como el número de Reynolds

Cuadro 5.2:
Viscosidad cinemática
del agua, según
Gordon et al. (1992)

Temperatura agua (T) (°C)	Densidad (ρ) (kg/m ³)	Viscosidad cinemática (ν) (m ² /s)
0	999,9	1,792 10 ⁻⁶ (0,01792 Stokes)
4	1000,0	1,568 10 ⁻⁶
10	999,7	1,308 10 ⁻⁶
15	999,1	1,141 10 ⁻⁶
20	998,2	1,007 10 ⁻⁶
25	997,1	0,897 10 ⁻⁶
30	995,7	0,804 10 ⁻⁶
40	992,2	0,661 10 ⁻⁶

Técnica 6. Degradación/egradación del cauce

Esta técnica está diseñada para determinar la ocurrencia de fenómenos de agradación y degradación del cauce en un tramo determinado. Comparte el procedimiento de la técnica 5 y consiste en la comparación, en función del tiempo, de la cartografía obtenida (y, por tanto, la absoluta certeza de disponer de transectos perdurables en el tiempo o puntos fijos de referencia en su defecto).

La estructura física del cauce no suele cambiar mucho salvo que ocurran eventos de crecida de cierta magnitud. Por ello, no es necesario medirla muy frecuentemente. Al cambiar el caudal se producen cambios en las características hidráulicas (profundidad, velocidad, etc.), así como cambios en la composición y distribución del sedimento, pero lo laborioso de los muestreos y lo impredecible de los cambios de caudal hacen impracticable un seguimiento temporal adecuado. En su lugar se pueden utilizar modelos hidráulicos,¹ para predecir las características hidráulicas en función de la forma del cauce, del tipo de sustrato y del caudal.

Conociendo la diferencia de altura entre transectos consecutivos, es posible realizar una estima del volumen de sedimento acumulado o erosionado en el tramo de estudio. A su vez, los datos correspondientes al *thalweg* (zona de máxima profundidad del cauce en un transecto concreto) entre transectos contribuyen a optimizar las estimas.

MATERIAL

El empleado en la técnica 5.

¹ Por ejemplo mediante la aplicación HecRas (<http://www.hec.usace.army.mil/software/hecras/>).

SELECCIÓN DEL TRAMO DE MUESTREO

Los tramos corresponden necesariamente a los cartografiados mediante la técnica 5.

PROCEDIMIENTO

Transcurridos uno o más episodios de crecida, se debe repetir el procedimiento desgranado en la técnica 5.

La determinación del *thalweg* consiste en localizar el punto de máxima profundidad del agua a lo largo de numerosos puntos dentro del tramo a caracterizar. Para ello, y comenzando en el primero de los transectos ubicados aguas abajo, es necesario georreferenciar el punto de máxima profundidad y relativizar su profundidad respecto al punto inmediatamente anterior y posterior.

Una vez en el gabinete, el trabajo consiste en comparar los transectos obtenidos inicialmente con los de la última cartografía (fig. 5.12). De ese modo, se han de detectar cambios en la morfología, en el perímetro húmedo, así como en la cantidad de sedimentos existentes entre dos transectos determinados y su naturaleza granulométrica.

Al calcular nuevamente el porcentaje de cauce cubierto por cada tipo de sustrato (diferenciando también en esta ocasión el cauce húmedo y el seco), se puede obtener una estima indirecta de la movilidad del sustrato. Simultáneamente a

La macro 5.3 calcula volúmenes de sedimento ganados o perdidos en base a transectos

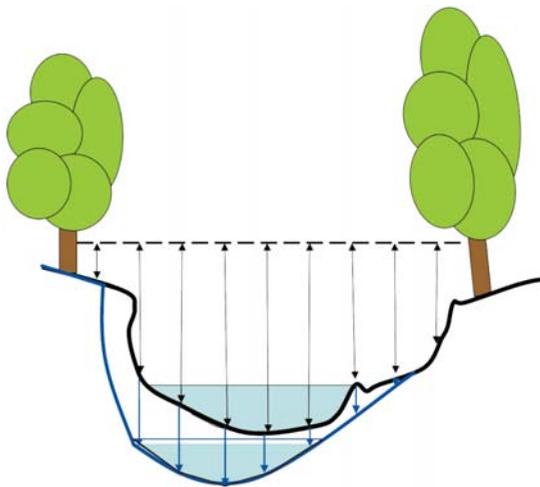


Figura 5.12:
Ejemplo de cartografía obtenida en un transecto, según Gordon et al. (1992)

Nota: En negro, se han dibujado las distancias determinadas inicialmente y, en azul, las nuevas referencias obtenidas transcurrido un tiempo.

partir de datos es posible detectar ciertas anomalías, como por ejemplo la abundancia de sedimentos finos (arenas y limos), motivada por actividades que provocan fenómenos erosivos en algún punto de la cuenca vertiente aguas arriba del tramo de muestreo.

5.5. Bibliografía

- FISRWG. *Stream corridor restoration. Principles, processes and practices*. EEUU: The Federal Interagency Stream Restoration Working Group, 1998.
- GORDON N.D., MCMAHON T., y FINLAYSON B.L. *Stream hydrology, an introduction for ecologists*. Chichester, Wiley and Sons, 1992.
- KONDOLF G., y PIÉGAY H. *Tools in fluvial geomorphology*. Nueva York: Wiley, 2002.
- PETTS G., y CALOW P., eds. *River flows and channel forms*. Oxford: Blackwell, 1996.
- ROSGEN D. *Applied river morphology*. Pagosa Springs, Colorado: Wildland Hydrology, 1996.
- STRAHLER A.N. *Geografía física*. Barcelona: Omega, 1986.
- WENTWORTH C. «A scale of grade and class terms for clastic sediments». *Geology* 30 (1922): 377-392.

El transporte de los materiales inorgánicos disueltos y particulados

ARTURO ELOSEGI Y ANDREA BUTTURINI

6.1. Introducción

Los ecosistemas fluviales canalizan, transportan, redistribuyen, intercambian, transforman y disipan materia y energía, y modulan activamente su entorno. Su función como vehículo de transporte de materia y energía desde las cabeceras hacia los tramos bajos se hizo evidente en trabajos en pequeñas cuencas experimentales a partir de los años sesenta del pasado siglo (Likens y Bormann 1995). Estos trabajos subrayaron la dependencia del sistema fluvial con su cuenca, de forma que la composición del agua sintetiza las características químicas y bióticas y los procesos que ocurren en ella (capítulo 3). Aunque esta aproximación considera el río como un conducto inerte, lo que está lejos de ser cierto, ha abierto un amplio abanico de enfoques en los estudios de ecosistemas fluviales como, por ejemplo, hacer balances de entrada y salida de materia y energía.

Desde el punto de vista del transporte de materiales, tiene interés determinar cómo circula el agua de la lluvia entre compartimentos hidrológicos, qué componentes arrastra o disuelve, cuál es el tiempo de residencia del agua y de otros materiales en la cuenca, o qué papel desempeñan las interfases de ribera e hiporreicas en la retención y/o liberación de solutos.

A medida que el agua de lluvia cae y se infiltra en el suelo va disolviendo los elementos más solubles que encuentra a su paso, con lo que su composición quími-

Los ríos transportan materiales disueltos y particulados que provienen de la cuenca de drenaje

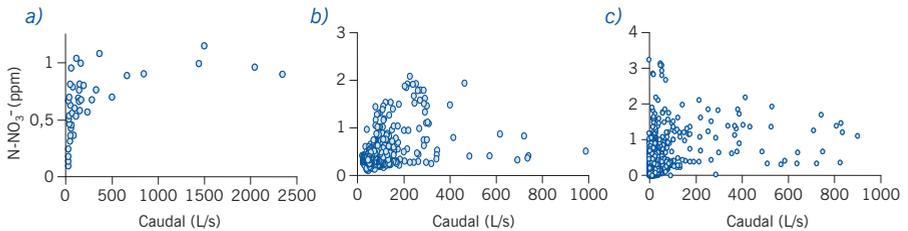
ca se va alterando conforme recorre caminos de diferentes longitudes y velocidades. A lo largo de estas tortuosas trayectorias el agua interacciona incesantemente con los componentes abióticos y bióticos de la cuenca y modifica su quimismo, de forma que para entender las características químicas de un río debemos tener siempre en cuenta la hidrología (capítulo 4). Por ejemplo, si en una cabecera relativamente prístina, el agua fluvial tiene mucha materia orgánica disuelta, nitratos y sedimentos finos, pero baja conductividad eléctrica, indica que el agua ha circulado rápidamente por la superficie del suelo sin apenas contacto con el sustrato geológico. En cambio, un agua rica en solutos inorgánicos pero pobre en materia orgánica disuelta sugiere su origen freático y su desplazamiento lento por el acuífero antes de llegar al cauce fluvial.

6.2. Variaciones en los materiales transportados

La relación concentración de solutos/caudal cambia de un río a otro e indica los procesos que ocurren en la cuenca

Como hemos visto, el quimismo del río depende de la contribución relativa de las masas de agua que incorpora (escorrentía, agua subsuperficial y agua freática), pero también de complejas interacciones entre numerosos condicionantes (capítulo 3). Entre éstos cabe destacar la magnitud, intensidad y frecuencia de las lluvias, el contexto climático previo a las precipitaciones, la extensión y conectividad de las zonas de ribera e hiporreicas, la heterogeneidad espacial del entramado fluvial, las propiedades drenantes de la cuenca, el tipo de suelo o la estructura de la cobertura vegetal. En definitiva, la dinámica de un determinado soluto no se explica exclusivamente con los cambios de caudales, lo que implica unas relaciones caudal/concentración complejas. La figura 6.1 muestra la relación caudal/nitrato en tres ríos de cabecera. En el río Agüera (fig. 6.1a) la concentración del nitrato incrementa rápidamente con el caudal, llegando a una meseta a caudales más altos, lo que indica que el contenido en nitrato del agua de escorrentía es alto y relativamente constante. En la Riera Major (fig. 6.1b) también se observa un aumento de nitrato con el caudal, aunque mucho más gradual y disperso, indicando que las aguas de escorrentía llegan lentamente al cauce, y que su contenido de ni-

Figura 6.1: Gráficos de dispersión de la concentración de nitrato en tres pequeños ríos de cabecera en cuencas forestadas



Nota: a) Río Agüera (norte de España). Datos obtenidos mediante muestreo quincenal-horario durante dos años. b) Riera Major (nordeste de España). Datos obtenidos con muestreo semanal-horario durante tres años. c) Fuirosos (nordeste de España). Datos obtenidos de un muestreo semanal-horario durante cuatro años.

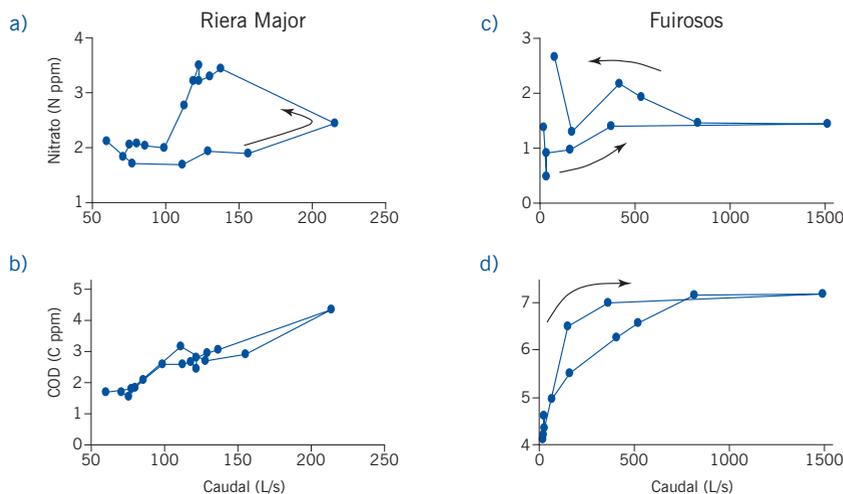


Figura 6.2:
Ejemplo de respuestas C-Q durante crecidas para el nitrato y el COD (carbono orgánico disuelto) en dos ríos mediterráneos

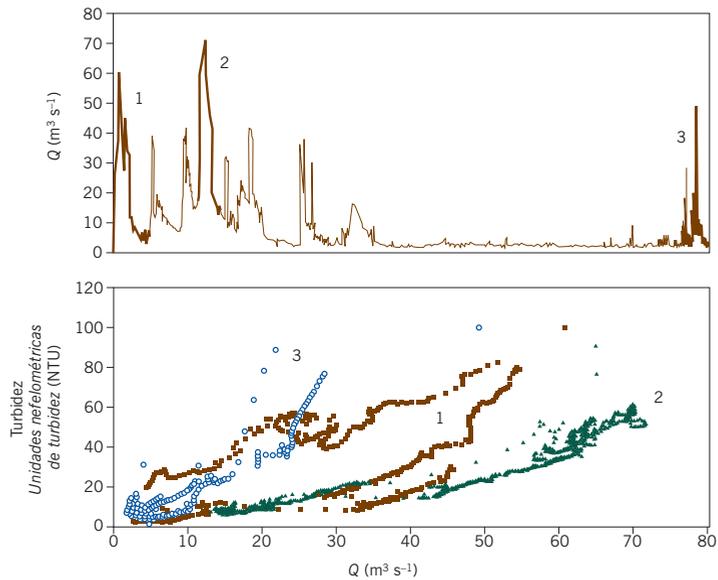
Nota: Las flechas indican el sentido rotacional de los patrones de histéresis. En los gráficos a y c, el sentido rotacional de las histéresis es antihorario y el pico de concentración posterior al pico de caudal. En el d, el sentido rotacional de la histéresis es horario, y la concentración del soluto incrementa rápidamente durante la fase inicial de la crecida. En el b, la respuesta C-Q es lineal y la histéresis no aparece. En todos los casos la frecuencia de muestreo es horaria.

trato puede ser muy variable; la dispersión de puntos desaparece a caudales elevados, y las relativas bajas concentraciones indican dilución del nitrato a causa de la escorrentía (Butturini y Sabater 2002). Finalmente, en Fuirosos (fig. 6.2c) se difumina la relación caudal/nitrato, apareciendo picos de concentración a caudales relativamente bajos, y gran dispersión de puntos en todo el espectro de caudales. Este patrón indica que o bien no hay mezcla de aguas con diferentes orígenes, o bien otros compartimentos (como por ejemplo la zona de ribera) aportan un ruido importante a caudales bajos (Butturini et al. 2005).

Con un muestreo más frecuente se puede seguir el comportamiento de solutos y partículas durante crecidas individuales, lo que aporta información sobre la causa de la dispersión de puntos. Esta dispersión puede deberse a un comportamiento no lineal (*histéresis*) de las relaciones concentración/caudal (respuestas C-Q), que cambian de la rama ascendente a la rama descendente del hidrograma (Wood 1977, Johnson y East 1982, Williams 1989, Evans y Davies 1998). Las dinámicas de histéresis cambian de río a río (fig. 6.2., Butturini y Sabater 2002, Butturini et al. 2008) y, por si eso fuera poco, también con la duración e intensidad de las tormentas, incluso con el orden en el que éstas se suceden (fig. 6.3).

La concentración, tanto de solutos como de partículas, tiene gran importancia ecológica y socioeconómica. Sin embargo, en algunos casos nos interesa no sólo la concentración, sino también la *carga* que transporta el río, es decir, la masa total por unidad de tiempo, que es función del caudal y de la concentración. Se lla-

Figura 6.3:
 Arriba, caudal en el río
 Urumea (País Vasco)
 durante el año 1999. Abajo,
 dinámica de la turbidez en
 tres episodios de avenida



Nota: Obsérvese que hay una relación directa entre el tiempo de estiaje previo a la avenida y el arrastre de sedimentos, expresado aquí como turbidez para un determinado caudal. La frecuencia de muestreo es de diez minutos y en todos los casos la dinámica de histéresis es antihoraria.

ma *carga disuelta* a la cantidad de solutos transportados (g/s), mientras que en la *carga particulada* se pueden distinguir la carga en suspensión de la carga de fondo. La *carga en suspensión* consiste en las partículas más finas o más livianas, que no decantan mientras que la turbulencia no baje de un umbral mínimo. La *carga de fondo* consiste en partículas de mayor tamaño que van dando tumbos por el lecho del río, sin permanecer mucho tiempo en suspensión. Otra clasificación adicional de la carga en suspensión es entre materia particulada fina (< 1 mm), cuantitativamente más importante (Benke et al. 1988), y materia particulada gruesa (> 1 mm). Frecuentemente las crecidas pueden contribuir entre un 40 y 80% de la carga anual de fósforo, nitrógeno y carbono totales (orgánicos + inorgánicos, disueltos + particulados) exportados por una cuenca. Por todo ello, adquiere gran relevancia conocer el patrón de las relaciones concentración/caudal y cuantificar las masas de materias en movimiento en todas las condiciones hidrológicas.

Como se ha mencionado anteriormente, el ecosistema fluvial no se limita a transportar agua y materiales originados en la cuenca de drenaje. También tienen lugar procesos de transformación, retención y reciclado de nutrientes (capítulo 8) en el cauce mismo, o en las zonas de interfase entre el río y la cuenca. Los pasos previos para cuantificar la magnitud de estos procesos implica efectuar balances de masas en determinados tramos fluviales (técnica 7) o determinar la hidrología subterránea de las zonas de ribera e hiporreica (técnica 8).

Técnica 7. Carga disuelta y carga en suspensión

El material que transporta un río se puede distinguir entre disuelto y sólido. La separación entre estos dos tipos de material no es absoluta; en la práctica se distingue por filtración, utilizándose normalmente filtros de 0,45 μm de tamaño de poro (capítulo 7). En la carga particulada, se pueden distinguir la *carga en suspensión* de la *carga de fondo*. En todos los casos, las cargas se determinan multiplicando la concentración de determinado material por el caudal circulante.

Los ríos transportan materiales en forma disuelta, como partículas en suspensión, o como carga de fondo

Para hacer balances de masa durante un período prolongado (por ejemplo, un año), es necesario planificar un muestreo temporal que incluya la variabilidad temporal de las concentraciones y de la hidrología. Esto implica que el muestreo debería amoldarse a las características hidroquímicas del caso de estudio. Las crecidas provocan el transporte inmediato (en el intervalo de unas pocas horas a unos días) de ingentes masas de solutos y sedimentos, por lo que se debe incluir el muestreo de estos eventos para los balances.

No existe un criterio universal que permita establecer *a priori* una frecuencia de muestreo que optimice la relación entre la precisión de la estima del balance con el esfuerzo de muestreo. Lo que sí hay son pautas generales que pueden ayudar a establecer un muestreo para obtener balances razonablemente correctos. Por ejemplo, si se conoce de antemano que el elemento de estudio (solutos o partícula) típicamente incrementa su concentración durante las crecidas y que las mismas suelen durar entre 3 y 10 días, un muestreo semanal puede ser más que suficiente. Si, en cambio, las crecidas son de menor duración, la frecuencia de muestreo tiene que ser más alta (por ejemplo diaria), obligando al investigador a un notable esfuerzo de muestreo. Si el interés se sitúa en las mismas crecidas, entonces la frecuencia de muestreo tiene que ser horaria, porque la fase inicial de una crecida suele ser muy rápida y abrupta y, por tanto, muy difícil de capturar. En todos estos casos es muy ventajoso poder utilizar muestreadores automáticos. Si la variación temporal del soluto estudiado no tiene relación alguna con la hidrología, la frecuencia de muestreo puede ser más laxa (por ejemplo, quincenal).

Como se ha descrito anteriormente, la carga transportada puede ser disuelta o particulada, pero los cálculos que se ejecutan para la estima de los dos tipos de cargas son idénticos. Los sólidos totales son la suma de los sólidos disueltos totales, o sólidos que atraviesan el filtro, más los sólidos totales en suspensión, que son los retenidos por el filtro. Su determinación se realiza mediante gravimetría. También se pueden distinguir los sólidos fijos de los volátiles, que son los que desaparecen por calcinación, y corresponden en gran medida (pero no totalmente)

a la materia orgánica (APHA 2005). A continuación se detalla cómo medir la concentración de partículas sólidas en un río. Si nos proponemos hacer balances de masas entre dos o más puntos del mismo río, obviamente el esfuerzo de muestreo se multiplica, pero la técnica es la misma.

MATERIAL

- Material para medir el caudal, bien mediante adiciones (técnica 3a), bien mediante correntímetro (técnica 3b).
- Botes de polietileno de 250-500 mL.
- Muestreador automático (si la frecuencia de muestreo es muy alta y mantenida en el tiempo).
- Nevera portátil.
- Matraces aforados.
- Equipo de filtración al vacío.
- Filtros Whatman GF/F calcinados y pesados individualmente, y guardados en desecador hasta su utilización.
- Vasos de precipitados calcinados y pesados individualmente, y guardados en desecador hasta su utilización.
- Crisoles calcinados y pesados individualmente, y guardados en desecador hasta su utilización.
- Balanza de precisión.
- Estufa a 105 °C.
- Horno a 500 °C.
- Desecadores.

PROCEDIMIENTO

1. Medir el caudal instantáneo (técnicas 3a y 3b).
2. Tomar una muestra de agua en un bote de polietileno (capítulo 7) y llevarla al laboratorio en la nevera portátil. Una vez allí, agitar bien el bote para resuspender cualquier material que hubiera decantado, medir una parte alícuota (por ejemplo, 100 mL) y filtrarla al vacío a través de un filtro prepesado.
3. Recoger el filtrado en un vaso de precipitado prepesado, y el filtro en un crisol prepesado.
4. Secar el vaso de precipitado y el filtro en la estufa. Para secar el vaso de precipitado, debe ajustarse la temperatura inicialmente a 95 °C para evitar que el agua hierva, y cuando toda el agua se haya evaporado, secar a 105 °C durante una hora más. Secar el filtro durante una hora a 105 °C.
5. Introducir en el desecador los vasos y filtros, y dejarlos enfriar a temperatura ambiente. Pesarlos.

CÁLCULOS

La concentración de *sólidos totales disueltos* (*STD*, en mg/L) se calcula mediante la ecuación 6.1:

$$STD = \frac{Pv_2 - Pv_1}{V} 1000 \quad (6.1)$$

donde Pv_2 : peso del vaso con el residuo que queda tras la filtración (mg), Pv_1 : peso inicial del vaso (mg), y V : volumen de agua filtrada (mL).

La concentración de *sólidos totales en suspensión* (*STS*, en mg/L) se calcula mediante la ecuación 6.2:

$$STS = \frac{Pf_2 - Pf_1}{V} 1000 \quad (6.2)$$

donde Pf_2 : peso del filtro con el residuo que queda tras la filtración (mg), Pf_1 : peso inicial del filtro (mg), y V : volumen de agua filtrada (mL).

Para calcular la concentración de sólidos volátiles, tras la pesada descrita, los vasos de precipitado y los filtros se calcinan en la mufla (horno) durante media hora a 500 °C, y se vuelven a pesar. La concentración de sólidos volátiles se calcula a partir de la diferencia entre la segunda (a 105 °C) y tercera (a 500 °C) pesadas.

La concentración de sólidos totales se calcula como $STD + STS$, y la carga se obtiene multiplicando la concentración (mg/L) por el caudal (L/s).

Técnica 8. Determinación de la hidrología hiporreica

La zona hiporreica es un compartimento hidrológico subsuperficial, es decir, por debajo del cauce fluvial, que corresponde al agua que circula a través de los sedimentos fluviales con un intercambio con el cauce fluvial lento pero incesante. Desde la perspectiva hidrobiogeoquímica, es el sistema de interfase por excelencia, en el cual confluyen los ecosistemas terrestres y fluviales, y donde se desarrollan procesos hidrológicos y químicos muy importantes para el conjunto del ecosistema lótico (Alley et al. 2002). Por tanto, una caracterización hidrológica de la zona hiporreica constituye un paso fundamental para conocer las interacciones biogeoquímicas entre el río y su entorno más próximo. La caracterización hidrológica consiste en estimar la dirección y velocidad del agua, y en determinar la permeabilidad de los sedimentos. Para estas estimas se necesita conocer la presión hidráulica, los gradientes hidráulicos verticales y horizontales y la conductividad hidráulica de los sedimentos.

Un aporte considerable del caudal del río circula entre sedimentos en la zona hiporreica

La forma más directa para caracterizar la hidrología hiporreica se basa en la utilización de pequeños piezómetros clavados en los sedimentos adyacentes al cauce, o directamente dentro del mismo. Los piezómetros son tubos de metal o de PVC (policloruro de vinilo) de unos pocos centímetros de diámetro con una extremidad puntiaguda que facilita su colocación en el sedimento, agujereados cerca de su extremo (fig. 6.4). Dentro del piezómetro se coloca una malla porosa de plástico o acero que restringe la entrada del sedimento, y un tubo más fino y flexible que permita muestrear el agua hiporreica. En piezómetros de diámetro superior a los 2,5 cm se pueden insertar sondas de nivel o de conductividad eléctrica. Una vez colocados los piezómetros se pueden estimar los siguientes parámetros.

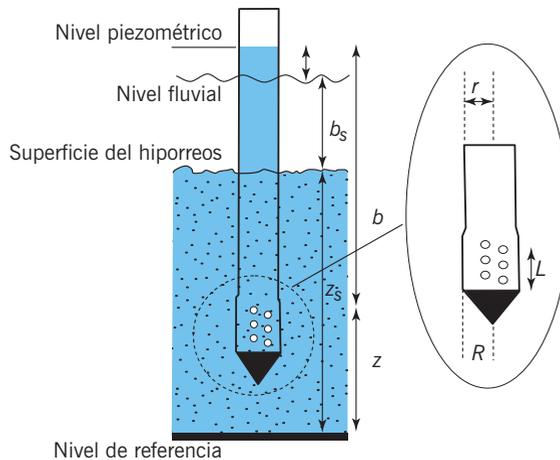
Los piezómetros permiten conocer la hidrología hiporreica

La *presión hidráulica* (h , en metros) es la suma de la altura de la columna de agua en el piezómetro (b , en metros) y la elevación del fondo del piezómetro respecto a un *datum* de referencia fijo (z , en metros) (fig. 6.4).

El *gradiente hidráulico horizontal* (GHH , adimensional) es la pendiente del nivel del agua en el hiporreos entre dos piezómetros (P_1 y P_2); permite identificar la dirección del flujo hidrológico, y se calcula dividiendo la diferencia entre las dos presiones hidráulicas (en metros) por la distancia lineal entre los dos piezómetros (en metros; véase fig. 6.5).

El agua se mueve, desde el piezómetro con mayor presión hidráulica al piezómetro con menor presión hidráulica, más rápido cuanto mayor sea el gradiente hidrológico horizontal.

Figura 6.4:
Características de un piezómetro que permite estimar las propiedades hidráulicas del medio hiporreico



Nota: A la derecha se detallan aquellas características necesarias para estimar la conductividad hidráulica, mediante el método de Hvorslev (véase texto para más detalles). El dibujo no está a escala.

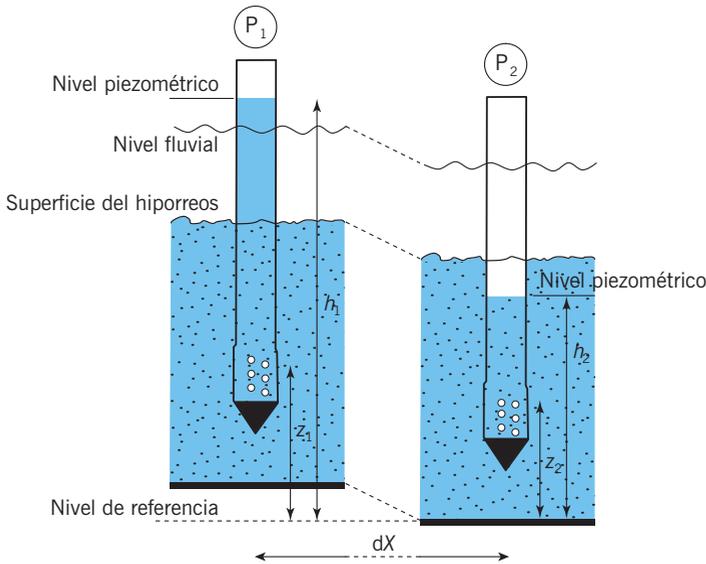


Figura 6.5:
Ejemplo de cálculo de la VGH entre dos piezómetros

Nota: Véase el texto para más detalles. El dibujo no está a escala.

$$GHH = \frac{dh}{dX} \tag{6.3}$$

donde $dh = h_1 - h_2$ (las dos presiones hidráulicas en P₁ y P₂), y dX : distancia horizontal entre los piezómetros. Si $h_1 > h_2$ el agua subterránea se mueve desde el P₁ hacia el P₂.

El *gradiente hidrológico vertical* (GHV, adimensional) se calcula como el GHH, aunque respecto a la distancia vertical entre los dos piezómetros (dZ , en metros):

$$GHV = \frac{dh}{dZ} \tag{6.4}$$

donde, $dZ = z_2 - z_1$ (fig. 6.5).

El interés del GHV reside en que permite identificar zonas en las cuales el agua fluvial alimenta el hiporreos o viceversa. En este caso uno de los dos piezómetros se sustituye por el nivel del agua en el cauce fluvial (fig. 6.4):

$$GVH = \frac{h - h_s}{dZ} \tag{6.5}$$

donde $h_s = z_s + b_s$, $dZ = z - z_s$, y $h = b + z$.

z_s y b_s son, respectivamente, la elevación del lecho fluvial respecto a un punto de referencia y la altura de la columna de agua en el río. Si el GHV es negativo, el agua fluvial alimenta el hiporreos (zona de hundimiento o *downwelling*). Si el GHV es positivo, el agua hiporreica alimenta el cauce fluvial (zona de afloramiento o *upwelling*). El primer caso se puede visualizar en el piezómetro P_2 (fig. 6.5), mientras que el segundo caso aparece en la figura 6.4 y el piezómetro P_1 de la figura 6.5.

Una vez identificada la dirección del flujo hidrológico subterráneo (mediante los parámetros GHH y GHV) el siguiente paso es cuantificar su velocidad mediante la *ecuación de Darcy*:

$$v = k \cdot GHH \quad (6.6)$$

donde v : velocidad ideal (o velocidad de Darcy) del agua subterránea (metros/tiempo), y k : conductividad hidráulica del sedimento saturado de agua (metros/tiempo; para su estima véase a continuación).

La *ley de Darcy* es una ley empírica macroscópica que asume que las moléculas de agua siguen una dirección rectilínea y no el camino tortuoso que en realidad recorren al sortear las partículas del sedimento. La velocidad real del fluido se obtiene dividiendo v por la porosidad del sedimento n . La porosidad del sedimento depende obviamente de las características litológicas del mismo. Rangos de porosidades se pueden encontrar en Custodio y Llamas (1983) y Nelson (2004). Si se conoce la sección transversal A (m^2) por la cual fluye el agua y se multiplica por la ecuación 6.7 se obtiene el caudal subterráneo (m^3 /tiempo).

La conductividad hidráulica se calcula midiendo el tiempo que se necesita para recuperar el nivel piezométrico

Los piezómetros se pueden utilizar para estimar in situ la conductividad hidráulica k . Existen diferentes métodos. A continuación se detalla el *método de Hvorslev* (Batu 1998) (véase también Freeze y Cherry 1979 y Fetter 1994), que es uno de los más utilizados. Este método, que supone que el medio es homogéneo e isotrópico, se basa en interpretar la recuperación del nivel del agua dentro de un piezómetro después de haberlo bajado o subido artificialmente. El nivel piezométrico se puede bajar extrayendo agua rápidamente con una bomba peristáltica, y se puede elevar adaptando a la boca del piezómetro un recipiente de volumen conocido. Cuando se trabaja con piezómetros de unos pocos centímetros de diámetro la opción más fácil es bajar el nivel piezométrico. Es recomendable vaciar al menos el 50% del nivel del agua en el piezómetro.

Para estimar k se aplica la siguiente fórmula:

$$k = \frac{r^2 \ln(L/R)}{2LT_{37\%}} \quad (6.7)$$

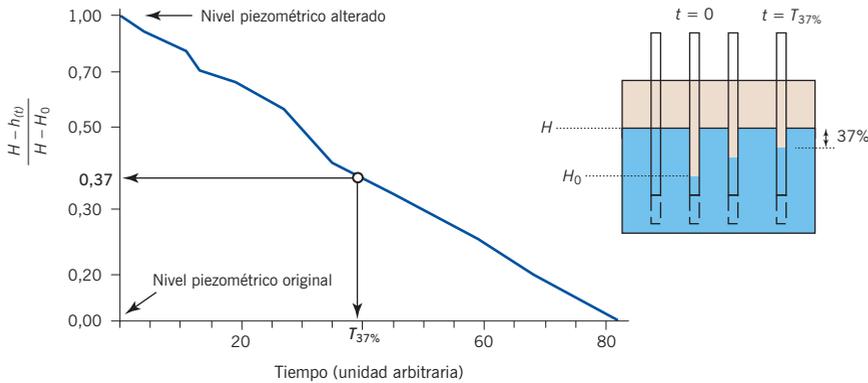


Figura 6.6: Gráfico semilogarítmico que ilustra la recuperación de un piezómetro después de haberlo vaciado

Esta gráfica permite calcular el tiempo de demora característico ($T_{37\%}$) y sucesivamente la conductividad hidráulica, k , con la ecuación 6.6.

H : nivel piezométrico original; H_0 : nivel piezométrico alterado justo antes que empiece su recuperación ($t=0$); h_{0t} es el nivel piezométrico en cada instante t durante su recuperación.

donde r : radio del piezómetro (cm), L : longitud de la parte perforada del piezómetro (cm), R : radio del piezómetro en la zona perforada (cm) (en muchos casos, pero no siempre, $r = R$) (fig. 6.4). Para unas medidas correctas de k es indispensable que $L/R > 8$, y $T_{37\%}$: tiempo de demora característico, o tiempo necesario para que al nivel piezométrico le falte sólo el 37%, del desnivel creado artificialmente, para volver al nivel original (fig. 6.6).

La macro 6.1 sirve para calcular la conductividad hidráulica

INSTALACIÓN DE LOS PIEZÓMETROS, EQUIPAMIENTO Y APARATOS

En los estudios del medio hiporreico, los piezómetros suelen estar instalados a muy poca profundidad, entre unos pocos centímetros y dos metros. La localización, profundidad y número de piezómetros depende de los objetivos de cada estudio y de las propiedades litológicas del sistema seleccionado. En tramos con arena y grava es más fácil instalar manualmente los piezómetros en el punto escogido siguiendo, por ejemplo, los pasos descritos en Baxter y Woessner (2003). En esencia, consiste en insertar en el sedimento, a una profundidad determinada, un cilindro con el piezómetro en su interior y luego retirar el cilindro externo dejando el piezómetro clavado en el sedimento. Los piezómetros se pueden utilizar únicamente para muestrear el agua y medir el GHH y el GVH , o también para estimar la k . Si se trata de estimar la conductividad hidráulica en la zona hiporreica con el método de Hvorslev, es fundamental construir los piezómetros de acuerdo con los criterios detallados anteriormente. Es esencial que la zona perforada, por donde entra el agua (L), se halle totalmente hundida dentro del sedimento. Por ejemplo, si $L = 20$ cm es aconsejable introducir el piezómetro a una profundidad de un mínimo de 25-30 cm para evitar que entre agua fluvial en el tubo y altere la estima de k .

Hay que asegurarse de que el piezómetro sólo permita entradas de agua hiporreica

El mantenimiento de los piezómetros es mínimo. Si se prevé no utilizarlos durante mucho tiempo y se quiere evitar que se llenen de sedimento, una opción es insertar en el piezómetro un tubo que se ajuste a su diámetro interno. De esta manera no entrará ni agua ni sedimento. Para la estima de la k mediante el método de Hvorslev se necesita una sonda de nivel de agua conectada a un *logger* que vaya recogiendo datos a intervalos regulares que permitan, luego, generar una estima análoga a la de la figura 6.6. Para vaciar el piezómetro se puede utilizar una bomba peristáltica de campo alimentada con una batería de 12 V (disponibles comercialmente).

6.3. Bibliografía

- ALLEY W.M., HEALY R.W., LABAUGH J.W., y REILLY T.E. «Hydrology - flow and storage in groundwater systems». *Science* 296 (2002): 1985-1989.
- APHA. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association, 2005.
- BATU V. *Aquifer hydraulics: A comprehensive guide to hydrogeologic data analysis*. Nueva York: John Wiley, 1998.
- BAXTER C., y WOESSNER F.H.W. «Measuring groundwater-stream water exchange: New techniques for installing minipiezometers and estimating hydraulic conductivity». *Transaction of American Fisheries Society* 132 (2003): 493-502.
- BENKE A., HALL C., HAWKINS C., LOWE-MCCONNELL R., STANFORD J., SUBERKROPP K., y WARD J. «Bioenergetic considerations in the analysis of stream ecosystems». *Journal of the North American Benthological Society* 7 (1988): 480-502.
- BUTTURINI A., ALVAREZ M., BERNAL S., VÁZQUEZ E., y SABATER F. «Diversity and temporal sequences of forms of DOC and NO_3^- discharge responses in an intermittent stream: Predictable or random succession?» *Journal of Geophysical Research* 113 (2008): G03016.
- BUTTURINI A., BERNAL S., y SABATER F. «Modeling storm events to investigate the influence of the stream-catchment interface zone on stream biogeochemistry». *Water Resources Research* 41 (2005): 8418-8418.
- BUTTURINI A., y SABATER F. «Nitrogen concentrations in a small Mediterranean stream: 1. Nitrate 2. Ammonium». *Hydrology Earth System Sciences* 6 (2002): 539-550.
- CUSTODIO E., y LLAMAS R. *Hidrología subterránea*. Barcelona: Omega, 1983: 2359.
- EVANS C., y DAVIES T.D. «Causes of concentration/discharge relationship hysteresis and its potential as tool for analysis of episode hydrochemistry». *Water Resources Research* 34 (1998): 129-137.
- FETTER C.W. *Applied hydrogeology*. Nueva Jersey: Prentice Hall, 1994.
- FREEZE R.A., y CHERRY J.A. *Groundwater*. Nueva Jersey: Prentice Hall, 1979.
- JOHNSON F.A., y EAST J.W. «Cyclical relationships between river discharge and chemical concentration during flood events». *Journal of Hydrology* 57 (1982): 93-106.
- LIKENS G.E., y BORMANN F.H. *Biogeochemistry of a forested ecosystem*. Nueva York: Springer-Verlag New York, 1995.
- NELSON P.H. «Permeability-porosity data sets for sandstones». *The Leading Edge* 23 (2004): 1143-1144.
- WILLIAMS G.P. «Sediment concentration versus water discharge during single hydrologic events in rivers». *Journal of Hydrology* 11 (1989): 89-106.
- WOOD P.A.S. «Controls of variation in suspended sediment concentration in the river Rother, West Sussex, England». *Sedimentology* 24 (1977): 437-445.

La química de las aguas. Los nutrientes

ANDREA BUTTURINI, SERGI SABATER Y ANNA M. ROMANÍ

7.1. Introducción

La química de las aguas es un factor esencial en los ecosistemas fluviales. La composición del agua, en sus componentes mayoritarios y en componentes traza, refleja su origen y vías de transporte, además de determinar la composición y abundancia de las comunidades y el funcionamiento del ecosistema fluvial. Desde una perspectiva más aplicada, las características químicas limitan los usos a que se puede destinar el agua, y la contaminación de ríos y acuíferos es una de las principales preocupaciones ambientales de muchos gobiernos, además de una fuente de graves problemas de índole sanitario y social.

La ecología necesita analizar de forma detallada las dinámicas y transformaciones de los solutos para comprender las interacciones entre los organismos fluviales y su entorno químico. De aquí la relevancia de los estudios biogeoquímicos en ecología fluvial, como ya se ha mostrado en los capítulos 4 y 6. En el marco de la biogeoquímica, el carbono, nitrógeno y fósforo tienen un protagonismo destacado porque son elementos esenciales para la biota y porque la alteración de sus concentraciones como consecuencia de la actividad humana tiene unas implicaciones socioeconómicas y sanitarias que van más allá de las estrictamente ecológicas. Sin embargo, aunque este capítulo se centra en los nutrientes, no podemos olvidar que, en la naturaleza, el agua es una disolución extremadamente compleja, con infinidad de sustancias disueltas, muchas de las cuales pueden tener relevan-

cia biológica, ya sea por influir directamente en algunos organismos, por su toxicidad, por afectar a la solubilidad de otros compuestos, o simplemente por su efecto global en las relaciones osmóticas (Margalef 1983).

7.2. Las sustancias disueltas en el agua

Se dice a menudo que el agua es el disolvente universal, ya que es capaz de disolver tanto sustancias polares como apolares. Por ello, y dado que el ciclo hidrológico pone el agua en contacto con muy diversos sustratos (las rocas de los acuíferos, el mantillo del suelo, los compuestos orgánicos de los sedimentos...) y con organismos de todo tipo, el análisis exhaustivo de cualquier muestra de agua refleja un largo listado de sustancias inorgánicas, y otro habitualmente aún mayor de sustancias orgánicas disueltas. Ello hace imposible describir con exactitud la química de las aguas fluviales sobre la base de parámetros químicos como constantes de solubilidad, potencial redox o pH (Manahan 1994). Ante la imposibilidad de una caracterización total de ese tipo, el investigador en ecología fluvial se ve limitado a medir un determinado conjunto de variables que permitan una descripción somera del medio (por ejemplo, la conductividad eléctrica como reflejo de la cantidad total de sales disueltas), o que ofrezcan información de interés sobre algún aspecto parcial del ecosistema, como ocurre, por ejemplo, cuando se estudian ciertos contaminantes. Es habitual hacer la distinción entre elementos conservativos, cuyas concentraciones apenas se ven afectadas por la actividad biológica, y elementos no conservativos, básicamente los nutrientes de mayor relevancia biológica (macronutrientes).

Entre los gases disueltos en el agua, tienen especial importancia el oxígeno y el CO_2 . Además de determinar la posibilidad o no de presencia de innumerables organismos en las aguas, la concentración de oxígeno influye en la solubilidad de otras muchas sustancias, como hierro, manganeso o fósforo, y su disponibilidad es fundamental en la regulación de solutos como el amonio y el nitrato. El dióxido de carbono disuelto en el agua forma ácido carbónico, que tiene un papel fundamental en la disolución de las rocas. Además, el ácido carbónico puede perder protones y formar iones bicarbonato y carbonato. Estos dos ácidos débiles conforman el sistema carbónico-carbonato, que controla la alcalinidad de las aguas continentales, es decir, la capacidad de tamponar el pH ante la llegada de protones al medio.

El metal más abundante
en aguas fluviales es el
calcio

Las aguas fluviales incorporan numerosos elementos disueltos del grupo de los metales, que normalmente aparecen ligados a otras especies químicas (por ejemplo, como hidróxidos, o quelados a compuestos orgánicos), y no como cationes aislados. El metal más abundante es habitualmente el calcio, que proviene, entre otros, de la disolución de rocas carbonatadas y determina (junto con el magnesio) la dureza del agua. El calcio es un componente en los esqueletos de numerosos organismos acuá-

tos, por lo que su concentración es una variable química de interés biológico. Otros metales, como el magnesio, aluminio o el hierro, son micronutrientes necesarios para los organismos, pero en condiciones ácidas su solubilidad aumenta de forma que pueden producir efectos tóxicos. El sodio y el potasio son nutrientes de gran importancia, pero que rara vez son limitantes en ríos. Entre los metaloides, el silicio (habitualmente en forma de silicato) es uno de los elementos más abundantes, y se halla asociado a sustratos silicatados, como areniscas. Su relevancia biológica es significativa para grupos específicos, como las algas diatomeas. Entre los no metales cabe destacar el nitrógeno y fósforo, importantes macronutrientes que trataremos más adelante, el cloro, que habitualmente forma ion cloruro, o el azufre, que en condiciones anaeróbicas da lugar a interesantes rutas metabólicas.

Aparte de las sustancias inorgánicas que hemos mencionado, en las aguas fluviales se encuentra gran número de sustancias orgánicas disueltas. El más importante es el carbono orgánico disuelto, que incluye moléculas muy diversas en cuanto a su peso molecular y biodisponibilidad: glucosa, celulosa, hemicelulosa... También otras moléculas de lípidos, fosfolípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Las sustancias orgánicas fluviales muestran un amplio espectro, desde compuestos simples, como aminoácidos o azúcares sencillos, a polímeros complejos como algunas sustancias húmicas, o incluso a sustancias coloidales, en la frontera entre la materia disuelta y la particulada. Algunas de estas sustancias son liberadas directamente de los seres vivos como, por ejemplo, por lavado de hojarasca o por excreción extracelular del fitoplancton, otras se forman en complejas reacciones a partir de precursores más sencillos. Otras muchas provienen directamente de la lisis celular.

Además, un gran número de materiales orgánicos sintéticos llega a las aguas fluviales como resultado de la acción humana. Su diversidad va aumentando conforme las nuevas sustancias sintéticas creadas por la actividad del hombre van siendo utilizadas y vertidas al medio ambiente, lo que hace de las aguas continentales un cóctel de creciente complejidad. Algunas sustancias orgánicas tienen importantes efectos biológicos a concentraciones muy bajas, del orden de partes por trillón o incluso inferiores. Un aspecto que está causando preocupación es la disrupción hormonal, o efecto de sustancias que actúan como hormonas al ser absorbidas. Por ejemplo, la concentración de estrógenos humanos en aguas fluviales cercanas a las grandes ciudades se está convirtiendo en un problema de enorme trascendencia (Petrovic et al. 2002). Igualmente preocupante es la presencia de plaguicidas, sobre todo como el DDT, de larga persistencia y cuya concentración aumenta a lo largo de las redes tróficas por bioacumulación.

La concentración de estrógenos humanos en aguas fluviales cercanas a las grandes ciudades se está convirtiendo en un problema de enorme trascendencia

Las propiedades químicas del agua de los ríos son altamente variables. Ejemplos de la diversidad de la composición química de diferentes sistemas continentales naturales pueden hallarse en numerosos libros y artículos (Drever 1997, Van der

Leeden et al. 1991, Meybeck 1987, Gaillardet et al. 1999). La presencia y abundancia de un soluto en un determinado río y momento depende de complejas interacciones entre condicionantes. Entre ellas se pueden indicar el conjunto de propiedades litológicas y geográficas de la cuenca de drenaje, su régimen climático e hidrológico, la actividad biótica tanto en la cuenca como en el cauce fluvial y, finalmente, las complejas interacciones entre los mismos solutos.

La principal fuente de solutos en las aguas fluviales es el sustrato litológico por el que fluye el agua antes de entrar en el cauce. La litología de la cuenca influye en la concentración de SiO_2^- , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , CO_3^{2-} , HCO_3^- , SO_4^{2-} , Cl^- , y en el grado de acidez, alcalinidad y fuerza iónica de las aguas. Por ello, las características químicas de las aguas difieren mucho entre cuencas, mostrando algunos ríos tipos de agua muy especiales y valores extremos en variables químicas (Margalef 1983). El agua almacenada en acuíferos profundos está en condiciones de baja temperatura y elevada presión, condiciones en las que aumenta su capacidad de disolver carbonatos. Al manar por las fuentes, su temperatura y presión se equilibran con las exteriores, lo que implica cambios en la carga disuelta, por ejemplo, precipitación de carbonatos en los arroyos travertínicos. En su transporte longitudinal, el agua entra en contacto durante tiempos variables con los sedimentos fluviales y/o estructuras físicas que ralentizan su movimiento y activan reacciones de oxidorreducción en presencia de materia orgánica. Además, se producen complejas reacciones de intercambio iónico con los sedimentos, especialmente en el caso de arcillas, cuya gran relación superficie-volumen las hace especialmente activas.

El clima es un factor importante en la definición del quimismo de las aguas circulantes. La temperatura regula, entre otras cosas, la solubilidad de O_2 y CO_2 en el agua y acelera la disolución de minerales. La evaporación concentra las sales minerales en el agua restante. La lluvia es ligeramente ácida, por lo que en escalas de tiempo geológicas contribuye a disolver y erosionar el sustrato litológico. A más acidez, más disolución de minerales. Se especula que cambios en la acidez de la lluvia pueden alterar incluso la movilización de la *materia orgánica disuelta* (MOD). A menor acidez menor MOD en las aguas continentales. En zonas costeras, la influencia marina se manifiesta con la llegada de lluvias y aguas fluviales ricas en Cl^- y Na^+ .

7.3. Variaciones en el quimismo de los ríos

Los cambios hidrológicos tanto estacionales (sequías, deshielos) como repentinos (crecidas) determinan unos cambios biogeoquímicos que pueden aportar información sobre el funcionamiento del sistema fluvial y sus interacciones con la cuenca. Así, en una cuenca forestada, durante las crecidas los aportes terrígenos en el agua de escorrentía causan incrementos en las concentraciones de MOD y

de nitratos, mientras que el pH y la concentración de sales minerales pueden disminuir bruscamente. Por otro lado, durante las sequías la concentración de sales, MOD y amonio puede dispararse, mientras que el oxígeno y nitrato pueden desaparecer por actividad microbiana.

La actividad biótica tanto en la cuenca como en el cauce fluvial modula la disponibilidad de carbono, nitrógeno, fósforo y otros elementos. Por ejemplo, cambios de usos del territorio, a raíz de la actividad humana, pueden inducir cambios en la concentración de HCO_3^- en los freáticos y aguas de escorrentía, y las actividades fotosintéticas y de respiración influyen en la concentración de oxígeno, del carbono inorgánico disuelto (y por tanto en la alcalinidad) y del pH.

En este capítulo nos proponemos describir las principales técnicas de recogida y preservación de muestras de aguas fluviales, así como algunas de las técnicas analíticas básicas más utilizadas en su caracterización. El conjunto de técnicas que aparece a continuación se centra en las analíticas del carbono, nitrógeno y fósforo, tanto inorgánicos como orgánicos (cuadro 7.1). Hemos creído conveniente incluir algunas técnicas específicas básicas relativas a la caracterización tanto cuantitativa como cualitativa de la MOD, porque el acrónimo MOD integra una compleja mezcla de compuestos húmicos (ácidos húmicos y fúlvicos y otras moléculas no totalmente caracterizadas) y no húmicos (sustancias grasas, carbohidratos, polisacáridos, aminoácidos, proteínas y resinas) de diferentes tamaños y composiciones, que refleja sus diferentes orígenes y disponibilidad para los microorganismos. En consecuencia, en muchas ocasiones interesa conocer no solamente el contenido de carbono, nitrógeno y fósforo orgánico disueltos (COD, NOD y POD, respectivamente) sino su calidad, que puede aportar información muy valiosa en lo que se refiere a los procesos de descomposición y transformación del material orgánico.

Las características químicas de las aguas y la biota se influyen mutuamente

Elemento	Soluto	Método	Referencia	
Carbono	Orgánico	MOD	Carbono orgánico disuelto biodegradable Índice de fluorescencia	Servais et al. 1989 McKnight et al. 2001
	Inorgánico	CID	Viraje de un indicador de pH Método de Gran	Mackereth et al. 1978
Nitrógeno	Total	NTD	Método de la oxidación	Adaptado de Koroleff 1983
	Inorgánico	NO_2^-	Método de la sulfanilamida	Mackereth et al. 1978
		NH_4^+	Método del salicilato	Reardon et al. 1966.
		NO_3^-	Método de la reducción a nitrito	Adaptado de Mackereth et al. 1978
Fósforo	Total	PTD	Método de la oxidación	Adaptado de Koroleff 1983
	Inorgánico	PRS	Método del molibdato	Murphy y Riley 1962

Cuadro 7.1:
Lista de los solutos y métodos analíticos descritos en este capítulo

Cuadro 7.2:
Peligrosidad específica de los reactivos utilizados en este capítulo.

Sustancia	Nivel de peligrosidad		
Cd			
NaNO ₂			
H ₂ SO ₄ ; HCl; NaOH			
C ₃ Cl ₂ N ₃ NaO ₃ ·2H ₂ O; CuSO ₄ ; C ₄ H ₄ O ₇ SbK			
HgCl ₂ ; NaN ₃			
K ₂ O ₈ S ₂			
NH ₄ Cl; C ₁₂ H ₁₆ Cl ₂ N ₂			
KNO ₃			

Nota: Los demás reactivos descritos en los diferentes métodos no mencionados en esta lista no constituyen un peligro ni para el analista ni para el medio ambiente.

Las técnicas que se describen no pretenden abarcar el universo de la química analítica. Este capítulo es un texto introductorio a la química analítica aplicada a la biogeoquímica fluvial, y un primer paso hacia textos más específicos (véanse referencias bibliográficas). Asimismo, no se mencionan las técnicas de medida rutinarias, de campo o laboratorio mediante aparatos específicos (como oxígeno, pH y conductividad), ya que sus detalles técnicos varían de uno u otro aparato. Hemos intentado describir técnicas analíticas que no precisen instrumentación sofisticada y costosa, aunque sí es necesario un laboratorio equipado con el material básico, que para algunas técnicas requerirá de campana extractora, espectrofotómetro, fluorímetro y analizador de carbono orgánico disuelto (COD). Por último, se recomienda a los que deban efectuar los análisis que consideren las medidas de seguridad adecuadas para el analista y para el medio ambiente (cuadro 7.2).

7.4. Muestreo, almacenamiento y conservación de las muestras

Es esencial tomar y almacenar las muestras de manera adecuada

Para gran parte de los análisis, las muestras pueden almacenarse en botellas de polietileno. Son botellas ligeras que no se rompen fácilmente y bastante inertes (a excepción del fosfato), resultando así particularmente apropiadas para la recolección de muestras in situ. Se puede optar por envases más inertes como el cuarzo o el borosilicato, pero son más caros. Aunque dichos materiales son imprescindibles si el interés se centra en el fosfato (para utilizar botellas de polietileno, véase Mackereth et al. 1978).

Las botellas necesitan un mínimo de mantenimiento para limitar al máximo los problemas de contaminación. Hay que limpiar las botellas nuevas con ácido (por ejemplo, una solución al 10% de HCl). Antes de recoger la muestra es indispensable limpiar las botellas unas cuantas veces en el campo con la misma agua que se quiere muestrear. Si se muestrean de forma repetida ríos con marcadas dife-

rencias químicas, es aconsejable utilizar siempre las mismas botellas para cada sitio y evitar así una contaminación cruzada. El último paso consiste en eliminar las partículas en suspensión (orgánicas o inorgánicas y vivas o muertas) que pueden alterar las características químicas de las muestras antes de llegar al laboratorio. En consecuencia, si las condiciones lo permiten, es muy recomendable filtrar inmediatamente las muestras en el campo. Se pueden recoger las muestras con una jeringa equipada con un portafiltros y verter la muestra filtrada directamente en la botella. Si se necesita un volumen importante, la filtración se puede ejecutar mediante bombas peristálticas de campo (existen modelos comercializados alimentados con batería de 12 V). Si no pudiese realizarse in situ, la filtración se debe efectuar lo más rápidamente posible en el laboratorio.

La filtración es un paso fundamental en la fase de muestreo y almacenamiento de las muestras. Se utilizan mucho los filtros de fibra de vidrio (por ejemplo los GF/F de Whatman). Aunque tienen una porosidad no totalmente definida ($\sim 0,7 \mu\text{m}$) y pueden dejar pasar bacterias, poseen numerosas ventajas porque son inertes, permiten una filtración bastante rápida y se pueden calcinar previamente en una mufla a $450 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 4 horas para eliminar trazas de sustancias orgánicas. Si se necesita eliminar totalmente las bacterias del agua, los filtros de nailon de porosidad $0,2 \mu\text{m}$ representan una solución válida, aunque no son totalmente inertes. Para filtrar en el campo se aconseja utilizar filtros de 47 mm de diámetro, ya que se colmatan más lentamente que los de 25 mm. Además, son muy útiles los portafiltros transparentes que permitan ver el estado del filtro durante el proceso. Es fundamental manipular siempre los filtros con pinzas. Los filtros de fibra de vidrio calcinados se envuelven previamente en papel de plata para facilitar su transporte e impedir su contaminación.

Las muestras se deben filtrar, a ser posible en el campo

Una vez filtradas, las muestras están listas para su análisis y se pueden almacenar unas horas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Si por cuestiones logísticas la analítica no puede llevarse a cabo inmediatamente, es indispensable preservar las muestras. No existe una técnica universal de conservación de muestras que sea efectiva para todos los solutos. Además, añadir algún conservante químico implica manipular las muestras (abrir y cerrar botellas y utilizar pipetas) y aumentar así los riesgos de una contaminación imprevista. Seguramente la técnica de conservación menos agresiva es la congelación, siempre y cuando no interese cuantificar gases, *carbono inorgánico disuelto* (CID), pH, fósforo y calcio (Mackereth et al. 1978). Acidificar las muestras hasta $\text{pH} = 2$ es también otra solución parcial y obligatoria para la analítica del COD. Inevitablemente, el uso de un ácido impide siempre la ejecución de algún tipo de analítica. Por ejemplo, acidificar las muestras con ácido nítrico o clorhídrico altera las concentraciones de nitrógeno y cloro respectivamente. Además cualquier tipo de acidificación impide la analítica del CID. Para conservar la materia orgánica disuelta y evitar el crecimiento bacteriano se utilizan el cloruro de mercurio (HgCl_2) o la azida de sodio (NaN_3), pero el mercurio es un elemento altamente

Las muestras que no se pueden analizar inmediatamente deben ser preservadas

tóxico y los residuos líquidos que contienen trazas de este elemento necesitan un tratamiento especial. La azida también es muy tóxica, puede traspasar la piel y contamina las muestras de nitrógeno y sodio.

7.5. Material de laboratorio indispensable

El cuadro 7.3 detalla el material de laboratorio, tanto inventariable como fungible, indispensable para la ejecución de las técnicas descritas en este capítulo. En el cuadro se especifican cubetas de diferente longitud para las lecturas con el espectrofotómetro y el fluorímetro. La longitud de las cubetas puede variar dependiendo de

Cuadro 7.3:
Material de laboratorio necesario para el desarrollo de las técnicas analíticas descritas

Material de laboratorio	Técnicas							
	CID	MOD	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NTD	PRS	PTD
Espectrofotómetro		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Fluorímetro		✓						
Analizador de COD		✓						
Campana extractora							✓	✓
Horno-mufla		✓						
Autoclave						✓		✓
pH-metro	✓							
Cubetas de cuarzo (1, 5 o 10 cm)		✓				✓		
Cubetas de vidrio (1, 5 o 10 cm)			✓	✓	✓		✓	✓
Agitador magnético	✓							
Estufa	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Balanza de precisión	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓
Dispensador de precisión	✓							
Micropipetas (0,1-10 mL)		✓		✓	✓	✓	✓	✓
Pipetas repetidoras (1-10 mL)		✓		✓	✓	✓	✓	✓
Erlenmeyer de 100 mL	✓							
Matraces aforados (1000, 100, 50 y 25 mL)		✓		✓	✓	✓	✓	✓
Frascos de Pyrex de 250 mL		✓						
Frascos de vidrio ámbar (100-1000 mL)	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓
Botellas de polietileno (1000 mL)							✓	✓
Bureta de vidrio de 50 mL					✓			
Tubos (con tapones) de teflón + cinta de teflón						✓		✓
Viales de vidrio de 25 mL		✓	✓	✓	✓		✓	✓
Cuentagotas de vidrio	✓							
Espátula					✓			
Filtros Whatman GF/F	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Filtros de nailon de 0,2 mm de poro		✓						
Pinzas	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

PRS: fósforo reactivo soluble.

las concentraciones esperadas. Para concentraciones bajas utilizar cubetas de 10 cm. En el caso del COD, la cubeta de 1 cm de cuarzo suele ser suficiente. Las pipetas automáticas se pueden sustituir por pipetas normales, aunque ello redundaría en una menor cantidad de muestras analizadas por unidad de tiempo. La campana extractora es indispensable durante la fase de preparación de un reactivo de la analítica del fósforo reactivo soluble (PRS), que desprende vapores durante su elaboración.

Técnica 9. Determinación del carbono inorgánico disuelto (CID)

En las aguas naturales, la forma predominante de CID es el ion carbonato ácido (ion bicarbonato). Este soluto es un ácido débil que viene hidrolizado en el agua con la consecuente producción de iones hidróxido y el incremento de pH. La concentración de iones carbonato ácidos se puede estimar mediante un proceso de titulación con un ácido de concentración conocida que sustrae los iones hidróxidos y transforma el ion carbonato ácido en ácido carbónico o anhídrido carbónico disuelto. Esto se verifica a un pH de 4,5. La cantidad de ácido que se necesita añadir a la muestra para llegar a este pH se corresponde, aproximadamente, con los equivalentes de carbonato ácido que contenía la muestra antes de empezar la titulación. En definitiva, mediante la titulación con el ácido se mide la alcalinidad en equivalentes de la muestra, aunque a la alcalinidad del agua pueden contribuir otros ácidos débiles, además de los bicarbonatos, como ácidos orgánicos, silicatos y fosfatos.

El carbono inorgánico es un importante nutriente para las plantas, además de tamponar el pH de las aguas

En este apartado se ilustran dos técnicas de medida de la alcalinidad de una muestra: mediante el viraje de un indicador de pH = 4,5 (el verde de bromocresol) y mediante el método de Gran. El primer método es muy apropiado para estimar la alcalinidad en el campo, mientras que el segundo es más preciso, e indicado para aguas de baja alcalinidad y/o alto contenido en materia orgánica.

Técnica 9a. Viraje de indicador de pH (Mackereth et al. 1978)

PROCESADO DE LAS MUESTRAS

1. Verter 80 mL de muestra filtrada en un matraz Erlenmeyer de 100 mL al que se le introduce un agitador magnético a la mínima velocidad del aparato.
2. Añadir 4-5 gotas de solución de verde de bromocresol (indicador de pH = 4,5) con un cuentagotas. La muestra adquiere un color azul-verdoso.
3. Empezar la titulación añadiendo, poco a poco, y mediante un dispensador de precisión una solución de H_2SO_4 0,02 N hasta que el color de la muestra pase a ser rosa pálido. El cambio de color indica que el pH de la solución ha llegado a 4,5. Apuntar el volumen de ácido utilizado.

4. Calcular la alcalinidad (*Alk*) de la muestra en meq/L mediante la siguiente fórmula:

$$CID \approx Alk = \frac{V_A \cdot N_A}{V_M} 1000 \quad (7.1)$$

donde V_A : volumen de ácido utilizado durante la titulación (mL), N_A : normalidad del ácido, y V_M : volumen inicial de la muestra.

MATERIAL NECESARIO

Véase el cuadro 7.2.

- El matraz de Erlenmeyer de 100 mL es adecuado para poder agitar la muestra sin que el líquido vierta al exterior.
- La solución de H_2SO_4 se coloca en un frasco de vidrio de 1000 mL con un dispensador de precisión que indica el volumen de ácido añadido.
- La botella de vidrio de unos 200 mL se necesita para el indicador verde de bromocresol.

Reactivos necesarios

- Solución de 1 L de H_2SO_4 0,02 N (guardada en botella de vidrio).
- Agua desionizada.
- Indicador de color a pH = 4,5. Se puede utilizar el indicador de verde de bromocresol sal de sodio ($C_{21}H_{13}O_5Br_4SNa$). Diluir 100 mg de bromocresol en 100 mL de agua destilada.

Es importante estimar la normalidad exacta del ácido antes de valorar las muestras. La estandarización del ácido se establece midiendo la alcalinidad de una solución de normalidad conocida siguiendo los pasos descritos anteriormente. La normalidad del ácido (N_A , en meq/L) se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$N_A = \frac{V_{SA} \cdot N_{SA}}{V_A} 1000 \quad (7.2)$$

donde V_{SA} : volumen de la solución alcalina (mL), N_{SA} : normalidad de la solución alcalina, y V_A : volumen del ácido utilizado durante la titulación (mL).

Técnica 9b. Método de Gran (Mackereth et al. 1978)

En este método la muestra se acidifica hasta un pH $\leq 3,5$; se necesita disponer de un pH-metro y un dispensador muy precisos.

PROCESADO DE LAS MUESTRAS

1. Verter 80 mL de muestra filtrada en un matraz de Erlenmeyer de 100 mL al que se le introduce un agitador magnético a la mínima velocidad del aparato. Colocar el pH-metro dentro de la muestra.
2. Añadir el ácido previamente estandarizado hasta llegar a un pH de 4,3, y anotar el volumen de ácido utilizado.
3. Añadir dos gotas más de ácido y apuntar el valor de pH de la muestra y el volumen del ácido utilizado.
4. Repetir el paso anterior de cinco a siete veces hasta llegar a un pH de 3,5.
5. Del conjunto de datos de pH y de volumen de ácido añadido (V_A , en mL) se calcula el valor F mediante la siguiente fórmula:

$$F = [\text{anti log}(5 - pH)](V_M - V_A) \quad (7.3)$$

donde V_M : volumen inicial de la muestra (mL), y V_A : volumen de ácido utilizado en la titulación (mL).

6. Representar la recta que relaciona el valor F (eje y) con el volumen de ácido añadido (eje x) y calcular el valor de V_A cuando $F = 0$.
7. Calcular la alcalinidad mediante la ecuación 7.1 y utilizar en la fórmula el valor de V_A estimado en el paso anterior.

MATERIAL NECESARIO

Véase el cuadro 7.2. La solución de H_2SO_4 se coloca en un frasco de vidrio de 1000 mL con un dispensador de precisión que indica el volumen de ácido añadido. Es fundamental utilizar un pH-metro bien calibrado y sensible a los cambios de pH bajos.

Reactivos necesarios

- Agua desionizada.
- Solución de 1000 mL de H_2SO_4 0,02 N, dispuesta en botella vidrio.

Técnica 10. Materia orgánica disuelta (MOD)

En muchos estudios biogeoquímicos y microbiológicos es preciso analizar una cantidad muy elevada de muestras, para lo que puede ser interesante disponer de técnicas que indiquen la calidad de la MOD sin requerir grandes equipos analíticos. A continuación se describen dos técnicas con esta finalidad: el análisis del *carbono orgánico disuelto biodegradable* (CODB) y el análisis del índice de fluorescencia.

Una parte importante de la materia orgánica disuelta consiste en formas refractarias, de escasa utilidad para los descomponedores

Técnica 10a. Carbono orgánico disuelto biodegradable (CODB) (Servais et al. 1989)

Este análisis consiste en un pequeño bioensayo de laboratorio que permite cuantificar el consumo de carbono orgánico disuelto (COD) mediante una incubación de las muestras durante 28 días. Para su desarrollo es preciso disponer de un analizador de COD. Este bioensayo debe realizarse en cuanto sea posible, con las muestras frescas y transportadas a 4 °C para evitar cualquier proceso de degradación microbiana de la materia orgánica previa al análisis. Se recomienda analizar cinco réplicas de cada muestra, ya que es fácil que aparezca alguna contaminada.

PROCESADO DE LAS MUESTRAS

1. Filtrar la muestra mediante filtros Whatman GF/F previamente muflados y luego por filtros de 0,2 µm de poro (por ejemplo, de nailon). Así se eliminan las partículas y la mayor parte de bacterias.
2. Verter 200 mL de muestra filtrada por 0,2 µm en un frasco de vidrio Pyrex de 250 mL previamente muflado (4 horas a 450 °C).
3. Añadir en el frasco 2 mL de muestra filtrada por filtros Whatman GF/F previamente muflados. Estos 2 mL serán el inóculo de bacterias de la misma agua muestreada y, por tanto, los responsables del proceso de mineralización de la MOD contenida en la muestra.
4. Tapar el frasco con tapón de rosca y agitar suavemente.
5. Tomar dos muestras de 20 mL (en viales de vidrio muflados) del frasco para determinar el contenido de COD inicial. Fijar con 100 µL de azida sódica 2,7 mM y acidificar con 100 µL de ácido clorhídrico 2 N. Guardar las muestras para analizarlas juntamente con las muestras finales.
6. Incubar el frasco durante 28 días en lugar seco, a oscuras y a una temperatura constante (18-20 °C).
7. Tomar dos muestras de 20 mL (en viales de vidrio muflados) del frasco para determinar el contenido de COD final. Fijar con 100 µL de azida sódica 2,7 mM y acidificar con ácido clorhídrico.
8. Analizar el contenido de carbono en las dos muestras iniciales y las dos muestras finales con el analizador de COD, añadiendo las muestras patrón necesarias.
9. Calcular el contenido CODB mediante la diferencia entre el COD inicial y final. Si se conoce el COD de la muestra se puede calcular también el porcentaje de CODB y el complementario, el porcentaje de CODR (*carbono orgánico disuelto recalitrante*).

MATERIAL NECESARIO

Véase el cuadro 7.3.

Reactivos necesarios

- Ácido clorhídrico 2 N.
- Azida sódica (NaN_3) 2,7 mM: disolver 1,76 mg en 100 mL de agua desionizada. Guardar en un frasco de vidrio en la nevera.

Técnica 10b. Índice de fluorescencia (McKnight et al. 2001)

Esta técnica se basa en las características fluorescentes de la materia orgánica, especialmente del material húmico, y requiere el uso de un fluorímetro. Es un índice que se desarrolló para aguas dulces y que permite tener una indicación del origen de la MOD: terrestre (con más contenido de anillos aromáticos en los compuestos húmicos) o microbiano. La técnica es sencilla y permite tratar un número elevado de muestras; consiste en hacer dos mediciones de fluorescencia. Actualmente este campo metodológico está en fase de expansión. Por ejemplo, en lugar de hacer mediciones puntuales se pueden realizar espectros de fluorescencia (barrido de un rango de longitudes de onda de excitación y de emisión), lo que permite tener una idea más detallada de las propiedades de la MOD.

La materia orgánica de origen terrestre se puede distinguir por su mayor contenido en anillos aromáticos

PROCESADO DE LAS MUESTRAS

1. Filtrar de 5 a 20 mL de muestra (Whatman GF/F previamente muflados).
2. Acidificar la muestra hasta $\text{pH} = 2$ con ácido clorhídrico 2 N.
3. Preparar el blanco (patrón de concentración cero) con agua Milli-Q acidificada hasta $\text{pH} = 2$.
4. Medir la fluorescencia en cubeta de cuarzo de la muestra y del blanco a 370 nm de excitación y 450 y 500 nm de emisión (si el fluorímetro permite hacerlo, escanear la fluorescencia de emisión entre 400-700 nm fijando la excitación a 370 nm, para comprobar que el máximo de fluorescencia ocurre aproximadamente a los 450 nm de emisión).
5. Corregir la fluorescencia de la muestra con el blanco.
6. Calcular el índice de fluorescencia como el cociente entre la fluorescencia a 370/450 nm de excitación/emisión y a 370/500 nm de excitación/emisión.
7. El índice de fluorescencia adquiere habitualmente valores de entre 1,2 y 2. Valores en el extremo superior del rango indican un mayor contenido de MOD de origen microbiano y valores en el extremo inferior, un mayor contenido de MOD de origen terrestre.

MATERIAL NECESARIO

Véase el cuadro 7.3.

Reactivos necesarios

— Ácido clorhídrico 2 N.

Técnica 11. Nitrógeno inorgánico disuelto

El *nitrógeno inorgánico disuelto* (NID) en aguas naturales está formado principalmente por iones nitrato (NO_3^-), amonio (NH_4^+) y nitrito (NO_2^-).

Técnica 11a. Amonio: método del salicilato (Reardon et al. 1966)

Es importante analizar el amonio cuanto antes y evitar la contaminación de las muestras

Técnica colorimétrica que consiste en añadir a la muestra dos reactivos que reaccionan con el amonio disuelto en el agua, proporcionando a la muestra un color característico cuya intensidad es función de la concentración del amonio. Es indispensable preparar una serie de patrones de concentración conocida de amonio y un blanco (patrón de concentración cero) que permita convertir las lecturas de absorbancia en concentraciones. Los patrones se procesan como las muestras. El amonio es un soluto que hay que analizar lo antes posible. Si la analítica no se puede ejecutar rápidamente puede considerarse el congelar las muestras. Cuando se añaden los reactivos es importante que las muestras no estén en contacto durante mucho tiempo con el aire, ya que éste puede ser una fuente de contaminación.

PROCESADO DE LAS MUESTRAS

1. Colocar 10 mL de muestra filtrada en un vial de vidrio de 25 mL.
2. Añadir a la muestra 1 mL de reactivo 1. Agitar. Esperar un minuto.
3. Añadir a la muestra 1 mL de reactivo 2. Agitar.
4. Colocar la muestra a la oscuridad y esperar una hora.
5. Medir la intensidad del color de la muestra mediante un espectrofotómetro a la longitud de onda de 690 nm.
6. Anotar la absorbancia.
7. Calcular la concentración en función de la recta patrón.

MATERIAL NECESARIO

Véase el cuadro 7.3.

Reactivos necesarios

— Reactivo 1. Disolver 3,4 g de salicilato sodico ($\text{HOC}_6\text{H}_4\text{COONa}$), 4 g de citrato trisódico dihidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y 0,04 g de nitroprusiato de sodio dihidratado ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en 100 mL de agua desionizada.

- Reactivo 2. Disolver 1 g de hidróxido de sodio (NaOH) y 0,08 g de sal de sodio del ácido dicloroisociamina ($\text{Cl}_2\text{Na}(\text{NCO})_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en 100 mL de agua desionizada.
- Solución madre de ion amonio de 1000 mg/L de $\text{NH}_4\text{-N}$: disolver 3,821 g de NH_4Cl en 1000 mL de agua desionizada. Conservar en la nevera en la oscuridad.

Técnica 11b. Nitrito: método de la sulfanilamida (Mackereth et al. 1978)

La siguiente técnica es colorimétrica. El procesado de las muestras es idéntico al método del amonio descrito anteriormente. Es indispensable preparar una serie de patrones de concentración conocida de nitrito y un blanco (patrón de concentración cero) que permita convertir las lecturas de absorbancia en concentraciones. Los patrones se procesan como las muestras. El nitrito es un soluto muy inestable y suele detectarse a concentraciones muy bajas, por lo cual se debe analizar lo antes posible. Es adecuado congelar las muestras si la analítica no se puede ejecutar rápidamente.

El nitrito debe analizarse lo más rápidamente posible o congelar las muestras

PROCESADO DE LAS MUESTRAS

1. Colocar 20 mL de muestra filtrada en un vial de vidrio de 25 mL.
2. Añadir a la muestra 0,4 mL del reactivo 1. Agitar.
3. Esperar 5 minutos.
4. Añadir 0,4 mL de reactivo 2. Agitar.
5. Colocar la muestra en la oscuridad y esperar 30 minutos.
6. Medir la intensidad del color de la muestra mediante un espectrofotómetro a la longitud de onda de 543 nm.
7. Anotar la absorbancia.
8. Calcular la concentración en función de la recta patrón.

MATERIAL NECESARIO

Véase el cuadro 7.3.

Reactivos necesarios

- Reactivo 1. Disolver 1 g de sulfanilamida ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) en 100 mL de una solución al 10% de ácido clorhídrico (10 mL de HCl en 90 mL de agua desionizada).
- Reactivo 2. Disolver 0,1 g de dihidrocloruro de N-1-naftil-etilendiamina ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2$) en 100 mL de agua desionizada.
- Solución madre de nitrito de 100 mg/L de $\text{NO}_2\text{-N}$: disolver 0,492 g de NaNO_2 en 1000 mL de agua desionizada. Conservar en la nevera.

Técnica 11c. Nitrato: método de la reducción a nitrito (adaptado de Mackereth et al. 1978)

El nitrato se reduce a nitrito al atravesar una columna de cadmio

Técnica colorimétrica que consiste en reducir previamente el nitrato a nitrito mediante cadmio. Posteriormente, la analítica es idéntica a la detallada anteriormente para el nitrito (técnica 11b). Este método mide la suma de nitrato + nitrito. Si la concentración de nitrito es relevante, la estima del nitrato se hace por diferencia. El uso del cadmio complica notablemente el procesado de las muestras, sobre todo si se necesita analizar muchas muestras manualmente. Esta misma técnica es mucho más cómoda y rápida si se dispone de un autoanalizador.

PROCESADO DE LAS MUESTRAS

1. Añadir 2 mL de cloruro de amonio concentrado a 50 mL de muestra filtrada.
2. Hacer pasar la muestra por la bureta con cadmio activado. Desechar los primeros 25 mL de muestra.
3. Guardar 20 mL de la segunda parte alícuota de la muestra que ha pasado por la bureta; añadir los reactivos restantes a este volumen.
4. A partir de este momento, seguir los mismos pasos detallados para el análisis del nitrito descrito en la técnica 11b.

Reactivos necesarios

- Cadmio granular de 0,3-1,6 mm de diámetro. Tratamiento: antes de utilizarlo, el cadmio necesita ser activado. La activación es un proceso que consiste en eliminar impurezas en la superficie del cadmio mediante una sucesión de soluciones de acetona y ácido clorhídrico hasta que el metal adquiere un color plateado-metálico bastante brillante.
 1. Mezclar el cadmio con acetona para eliminar partículas orgánicas adheridas en la superficie del metal. Agitar y dejar reposar 15 min.
 2. Purgar la acetona usada y limpiar el cadmio con agua desionizada.
 3. Purgar el agua y reponer nueva acetona. Repetir los pasos 1 y 2 tres veces.
 4. Mezclar el cadmio con una solución 6 N de HCl. Agitar y dejar reposar 15 min.
 5. Purgar la solución ácida usada y limpiar el cadmio con agua desionizada.
 6. Purgar el agua y reponer nueva solución ácida. Repetir los pasos 4 y 5 tres veces.
 7. Mezclar el cadmio con una solución de sulfato de cobre al 2%. Agitar 5 min.
 8. Purgar la solución del sulfato de cobre usada y limpiar el cadmio con agua desionizada.
 9. Repetir los pasos 7 y 8 tres veces hasta obtener un cadmio de color plateado brillante y el agua desionizada sin impurezas. Introducir el cadmio limpio en 25 mL de una solución de cloruro de amonio diluida. Colocar la so-

lución en una bureta de vidrio de 50 mL. Vigilar que no haya burbujas de aire entre las partículas de cadmio dentro de la bureta. La bureta con el cadmio está lista para el procesado de las muestras.

[El cadmio es un metal tóxico. Los residuos líquidos generados a través de la activación del cadmio necesitan un tratamiento específico.]

- Solución 6 N de HCl: 0,5 L de HCl en 0,5 L de agua desionizada.
- Solución diluida de cloruro de amonio: 5 g de NH_4Cl en 1 L de agua desionizada.
- Solución concentrada de cloruro de amonio: 200 g de NH_4Cl en 1 L de agua desionizada.
- Solución al 2% de sulfato de cobre: 20 g de CuSO_4 en 1 L de agua desionizada.
- Reactivos 1 y 2 de la analítica del nitrato.
- Solución madre de nitrato de 100 mg/L de $\text{NO}_3\text{-N}$: disolver 7,22 g de KNO_3 en 1000 mL de agua desionizada. Conservar en la nevera.

MATERIAL NECESARIO

Véase el cuadro 7.3. Para este análisis se necesita específicamente: una espátula para ir removiendo el cadmio durante el proceso de la activación, y una bureta de vidrio de 50 mL donde se colocará el cadmio activado inmerso en solución de cloruro de amonio diluida.

Técnica 11d. Nitrógeno total disuelto (NTD) (adaptado de Koroleff 1983)

La medida del nitrógeno total disuelto requiere convertirlo a nitrato mediante una oxidación básica a alta presión. Posteriormente, la concentración del nitrato se estima mediante lectura espectrofotométrica. Este método mide la suma del nitrógeno inorgánico y orgánico disueltos (NID + NOD). Si interesa cuantificar la concentración del NOD será necesario haber estimado anteriormente las concentraciones de las diferentes formas del NID. En esta técnica se utilizan patrones de nitrato y es indispensable también preparar blancos con agua desionizada para restar la influencia de los reactivos de oxidación en la lectura espectrofotométrica.

PROCESADO DE LAS MUESTRAS

1. Colocar 20 mL de muestra filtrada en un tubo de teflón.
2. Añadir 2 mL de reactivo de oxidación.
 1. Cerrar el tubo y agitar.
4. Autoclavar los tubos durante 90 minutos a 110 °C.

5. Una vez enfriada, agitar la muestra y disponer en una cubeta de cuarzo. Medir la absorbancia a 275 (A_{275}) y a 220 nm (A_{220}).
6. Estimar la diferencia de las dos absorbancias: $A_{220} - A_{275}$ (A_{275} debe ser menor del 10% de A_{220}). La lectura a 275 sirve para restar la interferencia que pueda tener la materia orgánica a la lectura a 220 nm.

Reactivos necesarios

- Solución de NaOH a 0,375 M: 15 g de NaOH en 1 L de agua desionizada. Esta solución se puede almacenar durante meses a la nevera en una botella de polietileno.
- Reactivo de oxidación: disolver 5 g de peroxidisulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) y después 3 g de ácido bórico (H_3BO_3) en 100 mL de la solución de NaOH preparada previamente. No invertir el orden de los reactivos en la preparación del reactivo de oxidación.

MATERIAL NECESARIO

Véase el cuadro 7.3. Se necesita específicamente: un autoclave o una olla a presión de dimensiones apropiadas. Se precisa asimismo tubos de teflón con tapones que se puedan autoclavar. La cinta de teflón sirve para poder sellar bien los tubos antes de ponerlos en el autoclave. Por último, se requiere un frasco de polietileno para guardar la solución de NaOH.

Técnica 12. Fósforo

Técnica 12a. Fósforo reactivo soluble (PRS) (método del molibdato de Murphy y Riley 1962)

Técnica colorimétrica que consiste en hacer reaccionar molibdato con el fósforo, proporcionando a la muestra un color azul. Los patrones se preparan con fosfato y se procesan como las muestras. La preparación de los patrones es la misma descrita para las analíticas anteriores. Si las muestras no se pueden analizar inmediatamente se aconseja congelarlas.

PROCESADO DE LAS MUESTRAS

1. Colocar 20 mL de muestra filtrada en un vial de vidrio de 25 mL.
2. Añadir a la muestra 2 mL de reactivo 1. Agitar.
3. Añadir inmediatamente 0,4 mL de reactivo 2. Agitar.
4. Colocar la muestra a la oscuridad y esperar 45 minutos.
5. Medir la intensidad del color de la muestra mediante un espectrofotómetro a 880 nm.

Reactivos necesarios

- Reactivo 1. Para la preparación de este reactivo se aconseja una campana extractora que elimine los vapores generados. Es un reactivo muy estable que se puede conservar en frasco, en nevera a 4 °C, siempre y cuando no tenga un color azulado, que indica la contaminación por fósforo.
 1. Pesar 0,2 g de tartrato de potasio y antimonio ($C_4H_4O_7SbK$) y ponerlos en un matraz de 1 L.
 2. Añadir 500 mL de agua desionizada
 3. Añadir, muy lentamente, 111 mL de ácido sulfúrico. Rellenar hasta cerca de 800 mL con agua desionizada.
 4. Sucesivamente, pesar 11,2 g de molibdato de amonio tetrahidratado [$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$], y diluirlos poco a poco en la solución. Agitar continuamente para facilitar la completa disolución del molibdato.
 5. Una vez enfriada, enrasar la solución hasta 1 L.
- Reactivo 2. Disolver 27 g de ácido ascórbico en 500 mL de agua desionizada. Se puede conservar en la oscuridad, en la nevera, mientras no adquiera un color rosado. También se puede congelar en una botella de polietileno durante meses.
- Solución madre de fosfato de 1000 mg/L de $PO_4\text{-P}$: pesar 4,390 g de fosfato diácido de potasio KH_2PO_4 y diluirlos en un matraz hasta 1000 mL de agua desionizada. Conservar en oscuridad, en la nevera.

MATERIAL NECESARIO

Véase el cuadro 7.3. Se necesita específicamente una campana extractora.

Técnica 12b. Fósforo total disuelto (PTD) (adaptado de Koroleff 1983)

El fósforo total disuelto se digiere mediante el mismo proceso de oxidación que se ha descrito para el NTD. En la digestión todo el PTD se oxida a fosfatos y sucesivamente se cuantifica su contenido mediante el método del molibdato detallado anteriormente (técnica 12a).

El fósforo total disuelto incluye el fósforo reactivo soluble y el fósforo orgánico disuelto

Este método mide la suma del PRS y del fósforo orgánico disuelto (POD). Si interesa cuantificar la concentración del POD será necesario estimar anteriormente la concentración de PRS. Se utilizan patrones de fosfato, como en la analítica del PRS, y es indispensable también preparar unos blancos con agua desionizada para restar la influencia de los reactivos de oxidación en la lectura espectrofotométrica.

PROCESADO DE LAS MUESTRAS

La fase de la digestión es idéntica a la descrita para el NTD (técnica 11d). Una vez oxidadas las muestras se procede a analizar el PRS siguiendo el método del molibdato descrito anteriormente (técnica 12a).

Reactivos necesarios

Se preparan los mismos reactivos necesarios para las analíticas del NTD y del PRS.

MATERIAL NECESARIO

Véase el cuadro 7.3. Se necesita el mismo material utilizado para las analíticas del NTD y del PRS.

7.6. Bibliografía

- DREVER J.I. *The geochemistry of natural waters: Surface and groundwater environments*. Nueva Jersey: Prentice Hall, 1997.
- GAILLARDET J., DUPRÉ B., LOUVAT P., y ALLÈGRE C.J. «Global silicate weathering and CO₂ consumption rates deduced from the chemistry of large rivers». *Chemical Geology* 159 (1999): 3-30.
- KOROLEFF F., y WEINHEIMER F. «Simultaneous oxidation of nitrogen and phosphorus compounds by persulfate». En K. Grasshoff, M. Eberhardt, y K. Kremling, eds. *Methods of seawater analysis*. Berlín: Verlag Chemie, 1983: 168-169.
- MACKERETH F.J.K., HERON J., y TALLING J. *Water analysis*. Cumbria, Reino Unido: Freshwater Biological Association, Scientific publication n.º 36, 1978.
- MANAHAN S.E. *Environmental chemistry*. Boca Raton: CRC Press, 1994.
- MARGALEF R. *Limnología*. Barcelona: Omega, 1983.
- MCKNIGHT D., BOYER E., WESTERHOFF P., DORAN P., KULBE T., y ANDERSEN D. «Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity». *Limnology and Oceanography* 46 (2001): 38-48.
- MEYBECK M. «Global chemical weathering of surficial rocks estimated from river dissolved loads». *American Journal of Science* 287 (1987): 401-428.
- MURPHY J., y RILEY J. «A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters». *Analytica Chimica Acta* 27 (1962): 31-36.
- PETROVIC M., SOLÉ M., LÓPEZ DE ALDA M.J., y BARCELÓ D. «Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: Integration of chemical analysis and biological effects on feral carp». *Environmental Toxicology and Chemistry* 21 (2002): 2146-2156.
- REARDON J., FOREMAN J.A., y SEARCY R.L. «New reactants for the colorimetric determination of ammonia». *Clinica Chimica Acta* 14 (1966): 403-405.
- SERVAIS P., ANZIL A., y VENTRESQUE C. «Simple method for determination of biodegradable dissolved organic carbon in water». *Applied Environmental Microbiology* 55 (1989): 2732-2734.
- VAN DER LEEDEN F., TROISE F.L., y TODD D.K. *The water encyclopedia*. Boca Raton: Lewis Publishers, Inc., 1991.

Retención de nutrientes en ecosistemas fluviales

EUGÈNIA MARTÍ Y FRANCESC SABATER

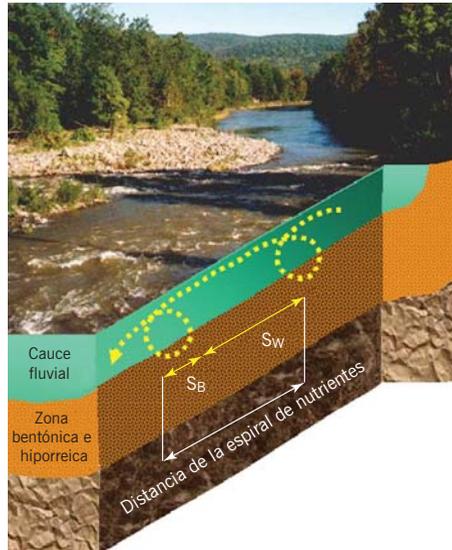
8.1. Introducción

Los ecosistemas fluviales son sistemas abiertos expuestos a una entrada continua de materiales particulados y disueltos procedentes de la cuenca de drenaje. Parte de este material es procesado por los organismos. En concreto, estos ecosistemas se caracterizan por su elevada capacidad de transformar y retener nutrientes (Peterson et al. 2001). Webster y Patten (1979) propusieron un nuevo concepto para describir la dinámica de nutrientes en ríos, acuñando el término *espiral de nutrientes*, que combina la retención y el transporte (fig. 8.1). Este nuevo concepto incidía en que el ciclo de un nutriente en un sistema fluvial no ocurre en un mismo tramo, sino que se cierra aguas abajo. Así, la forma de la espiral depende de la velocidad de reciclaje del nutriente y de la velocidad a la que es transportado aguas abajo (Newbold 1992). Por tanto, el acoplamiento entre la retención biótica y el transporte se puede llegar a cuantificar en unidades de longitud, de modo que la espiral de nutrientes se describe como la longitud de una espira a través de los dos compartimentos fluviales, la biota y la columna de agua (fig. 8.1). Esta longitud es la suma de dos distancias: la distancia de asimilación (S_w) y la distancia de retorno (S_b) (Newbold et al. 1981). La *distancia de asimilación* es la que corresponde al promedio que recorre un nutriente en su forma disuelta a lo largo del río hasta que es asimilado por la biota, y la *distancia de retorno* es la que recorre un átomo en el compartimento biótico hasta que es regenerado de nuevo al agua. En general, la mayor parte de la longitud de la espiral de nutrientes corresponde a la distancia de asimilación (Newbold et al. 1981).

A diferencia de los ecosistemas lacustres, en los ríos los nutrientes se reciclan conforme el agua circula hacia abajo, formando así una espiral de nutrientes

Figura 8.1:

Ilustración esquemática de la espiral de nutrientes (línea de puntos) y los dos componentes de la distancia de la espiral: la distancia de asimilación (S_w) y la distancia de retorno (S_B)



Estas distancias son el resultado de las distintas tasas de procesamiento y de retención de nutrientes del ecosistema fluvial (Stream Solute Workshop 1990). Así pues, la distancia de asimilación indica la eficiencia de retención de un nutriente por el ecosistema fluvial, es decir, la tasa de retención relativa al flujo del nutriente. Distancias cortas indican que el nutriente disuelto es retenido eficientemente. A su vez, la distancia de retorno nos indica la retentividad (es decir, capacidad de asimilación y transferencia a la red trófica) por parte de la biota fluvial, por lo que distancias de retorno largas indican que el ecosistema fluvial tiene una elevada retentividad.

La espiral de nutrientes informa de la afinidad del ecosistema por un nutriente determinado

Como el reciclado de nutrientes es, en gran medida, un proceso biótico, la forma de las espiras a lo largo de un río es el resultado de la relación entre la eficiencia de asimilación y la retentividad de los nutrientes por parte de la biota (Sabater y Martí 2000). De tal modo, la estructura jerárquica de los ríos determina cómo varía el reciclaje de nutrientes en función de las comunidades que se suceden a lo largo del gradiente fluvial. En los ríos, la mayor parte de la actividad biológica está asociada a los organismos bentónicos, que a su vez están influenciados por las concentraciones de nutrientes y por el tiempo de residencia de éstos en la columna de agua (Elwood et al. 1983). Y por supuesto, la capacidad de asimilación varía con el tipo de comunidad fluvial, ya que depende de las estrategias vitales, de la fenología y de la complejidad de la estructura trófica.

Las comunidades fluviales retienen una fracción de los nutrientes disponibles y los transfieren a través de las redes tróficas, de modo que reducen temporalmente la carga de nutrientes aguas abajo. Así, el flujo de nutrientes en los ríos depende de la rela-

ción entre la retención y la regeneración de nutrientes, y de la entrada continua de nutrientes procedentes de la cuenca de drenaje. Por tanto, considerando la variación longitudinal de dichos factores a lo largo del gradiente fluvial, puede esperarse que la longitud total de la espira tienda a incrementarse río abajo (Sabater y Martí 2000).

Hay distintas métricas para expresar la retención de nutrientes en ríos, pero todas derivan de la distancia de asimilación (Stream Solute Workshop 1990). Entre ellas destacan la velocidad de asimilación y la tasa de asimilación por unidad de superficie. La *velocidad de asimilación* (m/s) es aquella en que una molécula de nutriente se mueve desde la columna de agua al sedimento, y es un índice de la demanda biológica de nutrientes (Hall et al. 2002). La *tasa de asimilación* (mg/s·m²) es la masa de nutriente retenida por unidad de superficie y por unidad de tiempo, e indica la capacidad de retención de nutrientes por parte del río. Estas dos métricas permiten caracterizar diferentes aspectos de la retención de nutrientes en ríos y aportan información complementaria (Webster y Valett 2006). La velocidad y la tasa de asimilación permiten corregir el efecto del flujo de nutrientes sobre la distancia de asimilación, ya que, como hemos dicho, la distancia de la espira depende de la velocidad de la corriente y de la carga de nutrientes. De esta manera, la velocidad de asimilación corrige el efecto del caudal sobre la retención, y la tasa de asimilación corrige el efecto de la carga basal de nutrientes. Así, estas dos métricas permiten comparar la retención de nutrientes entre ríos distintos.

El estudio de la retención de nutrientes en ríos se ha abordado tradicionalmente a partir de la adición de nutrientes en tramos fluviales de centenares de metros. La adición se puede realizar a *flujo constante* durante un tiempo suficiente para asegurar que la concentración añadida esté repartida homogéneamente por todo el tramo de estudio, o de *forma instantánea*. Los resultados del primer método permiten calcular directamente la distancia de asimilación a partir de la obtención de una tasa de retención por unidad de longitud de río. Con los resultados derivados del segundo método se obtienen tasas de retención por unidad de tiempo. No obstante, las tasas obtenidas a partir de las dos técnicas son intercambiables a partir de la velocidad promedio del agua (véase ecuación 8.10, en la página 130) (Runkel 2007). Recientemente, el uso de isótopos estables en adiciones a flujo constante ha permitido no sólo medir la distancia de asimilación, sino también la distancia de retorno (es decir, el flujo de nutrientes a través de la red trófica, Mulholland et al. 2000). Todas estas técnicas sólo se pueden aplicar a ríos pequeños o medianos (con caudales menores de 500 L/s) debido al volumen de adición necesario. La retención de nutrientes en ríos más grandes se suele estimar a partir de un balance de masas entre las entradas y las salidas en un tramo de río. En este caso y, a diferencia de los valores obtenidos con la adición de nutrientes, el valor de retención se obtiene del balance neto entre la retención y la regeneración de nutrientes y, además, es dependiente de la longitud de tramo considerado.

La retención de nutrientes se puede medir mediante balance de masas, o mediante adiciones, en continuo o instantáneas

Técnica 13. Retención de nutrientes

Técnica 13a. Adición en continuo

La macro 8.1 permite calcular las disoluciones a realizar, y las métricas de retención, tanto para adiciones en continuo como a flujo constante

Este método permite estimar la retención de nutrientes en los ríos a partir del cálculo de la distancia de asimilación y los parámetros derivados de ésta (velocidad de asimilación y tasa de asimilación). Para ello, se incrementa ligeramente la concentración basal de nutrientes añadiendo, a flujo constante, una solución concentrada, y se cuantifica la tasa de retención por unidad de longitud del río a partir del patrón de variación de la concentración de nutriente en un determinado tramo. Para que esta tasa obtenida refleje la tasa de retención del ecosistema en condiciones basales de nutrientes, la adición no debe aumentar la concentración de nutrientes hasta saturar el sistema. Esta tasa es independiente de la longitud de tramo seleccionado para realizar el experimento.

Es importante no saturar el tramo de nutrientes

Para la adición en continuo hay que seleccionar un tramo de río de unos centenares de metros, e identificar un número de estaciones de muestreo distribuidas en progresión geométrica. Al inicio del tramo se añade un nutriente (o una combinación de varios) junto con un trazador hidrológico (por ejemplo, véase técnica 2) a flujo constante hasta que la solución añadida se haya mezclado completamente

Figura 8.2:

Esquema de la puesta a punto del tramo experimental para la realización de una adición de nutrientes en continuo



Nota: La figura muestra dos opciones para añadir la solución de nutrientes y trazador hidrológico a flujo constante: una bomba peristáltica y una botella Mariotte. Los puntos de muestreo a lo largo del tramo se indican con estrellas. El gráfico muestra la variación de la conductividad durante el transcurso de la adición al final del tramo; indicando el incremento inicial debido a la advección, las condiciones de meseta (es decir, mezcla completa de la solución a lo largo del tramo) y el decremento debido al cierre de la adición.

con el agua de todo el tramo (fig. 8.2). Antes de la adición, y también una vez se ha alcanzado una mezcla completa de la solución en el tramo, se recogen muestras de agua en cada uno de los puntos de muestreo para el posterior análisis de la concentración tanto del trazador como del nutriente. Los cambios en la concentración del nutriente a lo largo del tramo (corregidos por las concentraciones basales) son debidos tanto a factores físicos (dilución) y químicos (precipitación) como biológicos (asimilación, nitrificación, desnitrificación). Por otra parte, los cambios en la concentración del trazador hidrológico sólo son debidos a factores físicos. Por ello, los datos del trazador hidrológico se utilizan para corregir el efecto de dilución sobre la concentración de nutrientes y así poder cuantificar la tasa de cambio asociada sólo a procesos de retención bióticos o químicos.

Junto con la adición, conviene tomar medidas de parámetros ambientales (luz, temperatura, retención hidráulica) y biológicos (biomasa del biofilm, materia orgánica bentónica), ya que éstos influyen en la retención de nutrientes.

CONSIDERACIONES PREVIAS A LA ADICIÓN

Consideraciones espaciales

Los tramos deben ser representativos de las características morfológicas del río para poder extrapolar los datos a la respuesta del río. La longitud del tramo está en función del caudal y tamaño del río. El tramo seleccionado ha de ser suficientemente largo para poder detectar variaciones longitudinales en la concentración de nutrientes entre los distintos puntos de muestreo, pero suficientemente corto para evitar entradas laterales o verticales de agua. Por ejemplo, para caudales menores de 50 L/s se aconseja un tramo de entre 100-150 m, mientras que para caudales hasta 100 L/s el tramo debería ser de entre 200-300 m. Dentro del tramo seleccionado se definen un mínimo de 5 puntos de muestreo, separados siguiendo una distribución geométrica. El primer punto de muestreo se debe colocar a una distancia del punto de adición que asegure la mezcla completa entre la solución añadida y el flujo del río.

Consideraciones temporales

La adición debe prolongarse hasta que la solución añadida llegue a condiciones estacionarias (meseta) al final del tramo. Esto indica que la solución se ha mezclado homogéneamente a lo largo del mismo. Una manera de saber que se han alcanzado estas condiciones es midiéndolo en continuo la conductividad (como indicadora del trazador hidrológico, fig. 8.2) al final del tramo. Una vez la solución esté bien mezclada en el tramo, la conductividad se mantendrá constante al final del mismo. En condiciones de meseta se deben recoger las muestras de agua en todos los puntos de muestreo en el mínimo tiempo posible para evitar que parte del nutriente retenido vuelva de nuevo a la columna de agua.

Una vez alcanzadas las condiciones de mezcla hay que tomar muestras en el menor intervalo posible

Consideraciones técnicas

Es muy importante mantener el flujo de adición constante, y por tanto, es necesario asegurar el buen funcionamiento de la bomba peristáltica y de su fuente de alimentación o, alternativamente, de la botella Mariotte. Se recomienda medir varias veces el flujo de adición al inicio y al final del experimento. Es importante situar el punto de adición en una zona del río angosta y con turbulencia suficiente para que la solución se mezcle rápidamente con el agua del río. Si dichas características no se encuentran en el tramo de estudio, se debe introducir algún mecanismo que facilite la mezcla.

Se aconseja elevar la concentración de nutrientes hasta superar en dos o tres veces la concentración basal

La cantidad de nutriente añadida debe ser suficiente para poder detectar cambios entre las concentraciones basales y las de meseta. No obstante, la concentración resultante no debería ser muy elevada si se quiere estimar la retención de nutrientes en condiciones basales. El incremento debería estar dentro del rango de respuesta lineal entre la concentración de nutrientes y la tasa de asimilación (Mulholland et al. 1990, Payn et al. 2005). Si no se dispone de dicha información, incrementos de dos o tres veces la concentración basal suelen ser aceptables. Para calcular la cantidad de reactivo necesario para elevar la concentración resultante al nivel deseado se supone que el flujo de nutrientes resultante (F_r) debe ser igual a la suma del flujo de nutrientes en el agua del río (F_a) y el flujo añadido mediante la adición de la solución (F_s). El flujo de nutrientes se define como el producto de su concentración (C) por el caudal (Q), con lo que el balance de masas se puede expresar mediante las siguientes ecuaciones:

$$F_r = F_s + F_a \quad (8.1)$$

$$C_r(Q_r + Q_s) = (C_s Q_s) + (C_a Q_a) \quad (8.2)$$

donde C_r : concentración resultante en el río, C_s : concentración de la solución añadida, C_a : concentración basal del río, Q_r : caudal del río, y Q_s : caudal de la adición de la solución.

A partir de esta ecuación, la concentración de nutrientes en la solución para obtener un incremento de X veces la concentración del agua del río se calcula de la siguiente manera:

$$C_s = \frac{[XC_a(Q_r + Q_s)] - (C_a Q_a)}{Q_s} \quad (8.3)$$

La concentración estimada de nutriente en la solución depende del caudal y de la concentración basal de nutrientes en el río en el momento de la adición. Por ello, si la solución se prepara en el laboratorio, puede ser que el valor resultante final

no sea el deseado, y la única alternativa posible sea la de variar el flujo de la bomba si ésta lo permite. Para evitar este problema, es recomendable calcular la cantidad de nutrientes de la solución en el campo después de haber hecho una estimación rápida de caudal (técnicas 3a y 3b) y de la concentración de nutrientes en el río utilizando un kit analítico de campo.

MATERIAL NECESARIO

- Cinta métrica.
- Estacas o cinta adhesiva y rotulador para marcar los puntos de muestreo.
- Bidón de 20-50 L para preparar la solución.
- Probeta de 2 L para preparar la solución.
- Reactivos de adición: sales de compuesto conservativo (NaCl, NaBr) y sales de compuestos reactivos (NH_4Cl , NaNO_3 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).
- Balanza de campo para pesar los reactivos de la solución (precisión 0,5 mg).
- Bomba peristáltica con batería, o botella Mariotte (véase fig. 8.2).
- Cronómetro.
- Probeta de 25-50 mL para medir el flujo de adición.
- Conductímetro, mejor si tiene *datalogger*.
- Frascos para muestrear agua.
- Filtros Whatman GF/F y portafiltros para filtrar directamente en el campo las muestras (recomendable para evitar contaminación).
- Viales para guardar las muestras de agua. El número total depende de los puntos de muestreo que se seleccionen a lo largo del tramo y del número de réplicas analíticas por punto que se desee tomar (mínimo tres para la concentración basal y meseta).
- Nevera portátil.

PROTOCOLO DE CAMPO

1. Seleccionar el tramo de estudio y medir su longitud.
2. Seleccionar el punto de adición, donde el agua fluya en un solo canal estreñado y turbulento para facilitar la mezcla. Si es necesario, añadir piedras o alguna estructura artificial para incrementar la turbulencia.
3. Definir seis puntos de muestreo distribuidos a lo largo del tramo. Marcar los puntos. Anotar las distancias de los puntos en relación al punto de adición, y medir la anchura del río en cada uno.
4. Mezclar los reactivos (trazador hidrológico y nutrientes) ya pesados con un poco de agua del río en el bidón para preparar la solución. Asegurar que se mezclen bien. Terminar de llenar el bidón con agua hasta llegar al volumen deseado de solución. Evitar que el agua añadida sea turbia. Recoger una muestra de la solución final para su posterior análisis y medir su conductividad.

Es importante analizar la solución vertida

5. Instalar la bomba peristáltica y la batería en el punto de adición. Comprobar que funcione bien utilizando sólo agua del río.
6. Medir el flujo de adición utilizando una probeta de 25-50 mL y un cronómetro. Repetir la medida al menos tres veces.
7. Instalar un conductivímetro en el último punto de muestreo del tramo. Colocar la sonda en el punto central del río. Anotar la conductividad inicial.
8. Recoger muestras de agua (tres réplicas) en el punto central del tramo para cada uno de los puntos de muestreo antes de iniciar la adición. Estas muestras servirán para medir las concentraciones basales de trazador y nutrientes en el tramo. En cada punto medir también la conductividad basal y la temperatura. Evitar pisotear o remover el cauce del río durante la recogida de muestras.
9. Poner en marcha la bomba y empezar a verter la solución al río. Poner en marcha el cronómetro y anotar la fecha y la hora de inicio de la adición. Asegurarse que el flujo de adición es constante.
10. Anotar los cambios de conductividad en el último punto del tramo a intervalos de tiempo regulares (por ejemplo, cada 5 o 10 segundos). Alternativamente, el conductivímetro puede estar conectado a un *datalogger* y programado para recoger y almacenar datos automáticamente cada cierto tiempo.
11. Una vez los valores de conductividad se mantengan estables (condiciones de meseta) esperar unos 15 minutos y recoger tres muestras de agua en cada uno de los puntos.
12. Una vez recogidas las muestras, cerrar el flujo de adición y anotar la hora.
13. Seguir anotando los cambios de conductividad al final del tramo hasta que la conductividad vuelva a las condiciones basales. Este punto sólo será necesario si se quieren obtener medidas hidráulicas.
14. Filtrar las muestras de agua y guardarlas en una nevera para su transporte al laboratorio.
15. En el laboratorio, guardar las muestras de agua en el refrigerador si se realizan los análisis químicos antes de 48 horas, o congelarlas hasta su análisis.

CÁLCULO DE PARÁMETROS

Los resultados de las concentraciones de nutrientes y del trazador hidrológico (o en su caso, la conductividad) obtenidos a partir de la adición permiten el cálculo directo de una de las tres métricas de retención de nutriente, la distancia de asimilación (S_w), (véase fig. 8.3). El cálculo de las otras dos métricas, la velocidad de asimilación (V_p) y la tasa de asimilación (U), derivan de la primera.

El cálculo de S_w se basa en la variación, a lo largo del tramo, de la concentración de nutriente añadida (es decir, concentración a meseta menos concentración basal), corregida por la variación del trazador hidrológico añadido (o lo que es

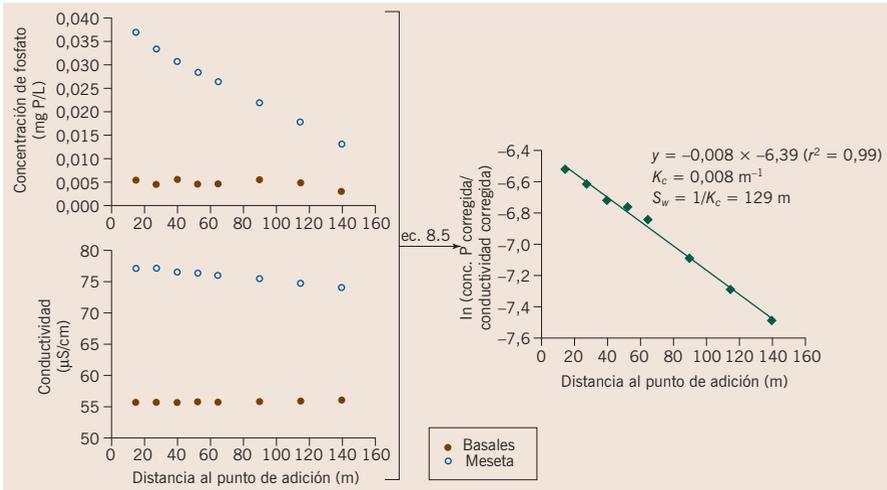


Figura 8.3: Variación longitudinal de la conductividad y la concentración de fosfato en el tramo experimental a partir de la realización de una adición a flujo constante de nutrientes y trazador hidrológico

Nota: Los gráficos muestran los valores en condiciones basales y en meseta. La figura también muestra la variación longitudinal de la relación entre la concentración de nutriente y de trazador hidrológico (calculada a partir de la ecuación 8.5) y la obtención de la tasa de retención por unidad de longitud de río (K_c) y de la distancia de asimilación (S_w).

lo mismo, la variación de caudal (Q) entre puntos (fig. 8.3). Si asumimos que la tasa de retención de nutrientes es constante a lo largo del tramo, el patrón de variación resultante puede ser caracterizado por la siguiente ecuación de primer orden:

$$C_x \left(\frac{Q_x}{Q_0} \right) = C_0 e^{-K_c x} \tag{8.4}$$

donde C_0 : concentración de nutriente añadida en el punto de muestreo inicial, corregidas por la concentración añadida de trazador hidrológico o la variabilidad en el caudal, C_x : concentración de nutriente en cada uno de los puntos restantes, K_c : tasa de retención de nutrientes por unidad de longitud de río (m^{-1}), y X : distancia de cada punto de muestreo al punto de adición (m).

La K_c es la pendiente de la función lineal obtenida al transformar la ecuación exponencial a logarítmica (fig. 8.3):

$$\ln \left(C_x \frac{Q_x}{Q_0} \right) = \ln(C_0) - K_c x \tag{8.5}$$

K_c se obtiene a partir de una regresión lineal entre el logaritmo neperiano de la concentración de nutrientes añadida para cada punto de muestreo y la distancia de cada uno de estos puntos al punto de adición. El inverso de K_c es S_w (m).

La velocidad de asimilación (V_f , en m/s) y la tasa de asimilación por unidad de superficie (U , en mg/m²s) se calculan a partir S_w utilizando las siguientes ecuaciones:

$$V_f = \frac{h v}{S_w} \quad (8.6)$$

$$U = \frac{C_b Q}{S_w w} \quad (8.7)$$

donde h : profundidad media (m), v : velocidad media (m/s), w : anchura media (m), Q : caudal (L/s), y C_b : concentración basal del nutriente en el tramo de estudio (mg/L).

La concentración basal se obtiene a partir del valor medio de la concentración basal medida en los diferentes puntos de muestreo. Los parámetros hidráulicos v y Q se pueden estimar a partir de la curva de variación de conductividad durante la adición registrada al final del tramo (técnica 3a). La anchura media del río en el tramo de estudio se puede estimar a partir de las anchuras medidas en los diferentes puntos de muestreo seleccionados. Finalmente, h se puede inferir a partir de los valores de v , w y Q .

Técnica 13b. Adición instantánea

La macro 8.1 permite calcular las disoluciones a realizar, y las métricas de retención, tanto para adiciones en continuo como a flujo constante

Esta técnica se basa en la adición instantánea de un volumen conocido de una solución de nutriente y trazador hidrológico en un punto del río y el posterior seguimiento de la pluma de nutrientes que se genera aguas abajo a una distancia conocida del punto de adición. A diferencia de la técnica anterior, en ésta no se alcanzan condiciones homogéneas a lo largo del tramo, lo que la hace menos aconsejable. Dado que el nutriente añadido no se reparte por igual por todo el tramo y el tiempo de contacto con el sustrato es mucho menor, cabe esperar que la tasa de asimilación resultante sea menor que con la técnica anterior, y sólo se aproxime en el caso de que la velocidad y el caudal sean bajos.

La adición instantánea es una opción aceptable en tramos de caudal más elevado

No obstante, esta metodología es una alternativa a tener en cuenta cuando el caudal o las concentraciones de nutrientes del río son muy elevados. En estas condiciones, la cantidad de solución necesaria para llegar a condiciones de meseta utilizando una adición en continuo es impracticable. La adición instantánea es algo más sencilla que la adición en continuo, ya que sólo requiere preparar la solución en un bidón y colocar el conductímetro y las botellas para recoger muestras al final del tramo. No obstante, el esfuerzo de muestreo es más intenso y se suele generar un mayor número de muestras para su posterior análisis.

En general, las consideraciones preliminares expuestas en la técnica anterior también sirven para esta técnica. No obstante, el cálculo de la cantidad de reactivo necesaria para preparar la solución difiere de la técnica anterior. En este caso, la cantidad de reactivo a añadir se estima a partir de la adición previa de un trazador hidrológico (por ejemplo, NaCl), que permita evaluar el factor de dilución en el punto final del tramo midiendo la concentración del soluto respecto al tiempo. A partir de esta curva, y conociendo la concentración basal de nutriente, se recalcula la curva teórica para obtener un incremento máximo deseado de concentración de nutriente en este punto final mediante un balance de masas. Con esta curva se calcula la masa de reactivo que debe añadirse a partir de la integración de la curva teórica. Esta masa de nutriente es la que se utilizará para preparar la solución de la adición.

MATERIAL NECESARIO

- Cinta métrica.
- Bidón de 20-50 L para preparar la solución.
- Probeta de 2 L para preparar la solución.
- Reactivos de adición: sales de compuesto conservativo (NaCl, NaBr) y sales de compuestos reactivos (NH_4Cl , NaNO_3 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).
- Balanza de campo para pesar los reactivos de la solución (precisión 0,5 mg).
- Cronómetro.
- Conductímetro, mejor si tiene *datalogger*.
- Botellas para muestras de agua.
- Filtros Whatman GF/F y portafiltros para filtrar directamente en el campo las muestras (recomendable para evitar la contaminación).
- Nevera portátil.

PROTOCOLO DE CAMPO

1. Seleccionar el tramo de estudio y medir su longitud.
2. Llenar el bidón de la solución con un poco de agua y añadir las sales de nutrientes y del trazador hidrológico. Mezclar la solución hasta que los reactivos estén completamente disueltos. Una vez la solución esté mezclada, añadir el resto de agua del río hasta el volumen de adición estimado.
3. Anotar la cantidad de reactivos añadidos y el volumen total de la solución. Medir la conductividad y recoger una muestra de agua para su posterior análisis. No olvidar este paso antes de verter la solución al río, los datos son necesarios para los cálculos posteriores.
4. Instalar un conductímetro al final del tramo. Colocar la sonda en el punto central del río. Anotar la conductividad inicial. Si se dispone de *datalogger*, conectarlo, anotar la hora y empezar las mediciones.

5. Recoger tres muestras de agua al final del tramo para medir la concentración basal de nutrientes.
6. Preparar los botes para tomar las muestras de agua al final del tramo.
7. Verter la solución del bidón lo más rápidamente posible al inicio del tramo, en un punto donde se pueda mezclar fácilmente con el agua del río y empezar a cronometrar el tiempo. Anotar la hora de adición.
8. Si no se dispone de *datalogger*, iniciar la lectura de los valores de conductividad al final del tramo. Esta lectura manual se puede realizar a intervalos regulares o cada vez que la conductividad varíe. La frecuencia de las lecturas debe adecuarse para poder describir la curva del paso del pulso de la adición al final del tramo.
9. A la vez que se inician las medidas de conductividad, iniciar la recogida de muestras de agua en el punto final del tramo. La frecuencia de muestreo debe ir en paralelo a la recogida de datos de conductividad. Es importante anotar el tiempo de recogida de cada muestra.
10. Finalizar la recogida de muestras cuando el valor de conductividad vuelva a las condiciones basales.
11. Anotar la duración total del muestreo.
12. Medir la anchura y profundidad del río en cinco puntos a lo largo del tramo.

CÁLCULO DE PARÁMETROS

La concentración de nutrientes y la conductividad al final del tramo se utilizan para estimar la tasa de retención por unidad de tiempo (K_p , en s^{-1}). A partir de este valor se calcula la distancia de asimilación (S_w) y el resto de métricas de retención derivadas de ésta.

K_r se calcula comparando la curva en función del tiempo, de las concentraciones de nutrientes analizadas con las concentraciones de nutrientes estimadas a partir de la concentración del trazador hidrológico (o en el caso de Cl^- , de la conductividad) (fig. 8.4). Las concentraciones estimadas asumen que los nutrientes son transportados como un elemento conservativo (y, por tanto, son afectados sólo por procesos de advección, dispersión y dilución), mientras que la variación de la concentración de nutrientes observada está influenciada, además, por procesos de retención biológicos y químicos. Por tanto, la concentración estimada en diferentes momentos (N_{et}), durante el experimento, se calcula a partir de la siguiente ecuación (fig. 8.4):

$$N_{et} = \left(\frac{Cl_t - Cl_b}{Cl_s} N_s \right) + N_b \quad (8.8)$$

Esta ecuación asume que los cambios en la concentración de nutrientes (corregida por los niveles basales, $N_t - N_b$) en relación con la concentración de la solu-

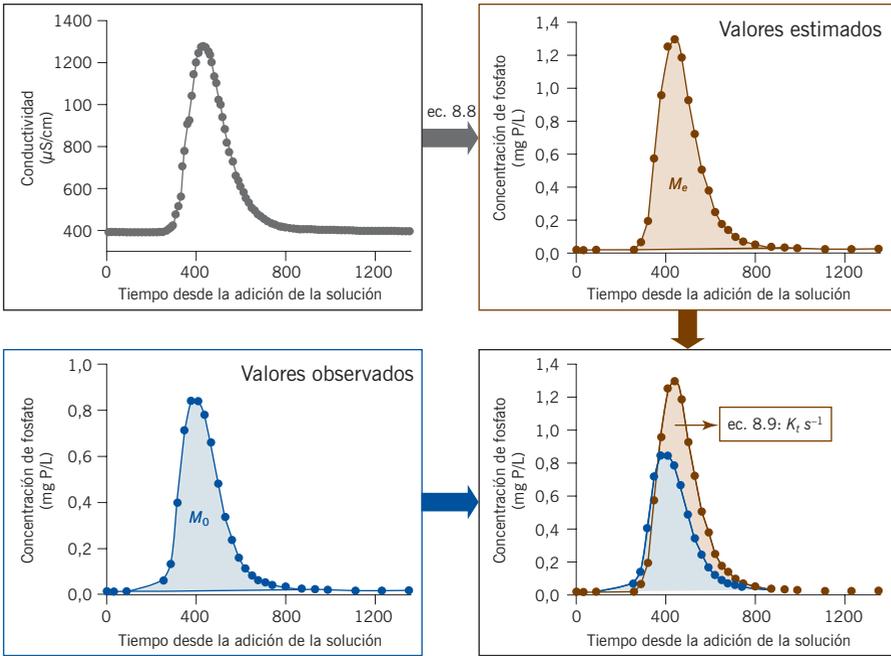


Figura 8.4: Curvas de conductividad y concentración de fosfato obtenidas al final del tramo, después de una adición instantánea de nutrientes junto con un trazador hidrológico

Nota: La figura también muestra la curva de concentración de fosfato estimada a partir de los valores de conductividad tras aplicar la ecuación 8.8, e ilustra cómo se obtiene la tasa de retención por unidad de tiempo (K_t) mediante la ecuación 8.9.

ción añadida (N_i) son iguales a los cambios en la concentración del trazador (corregida por los niveles basales, $Cl_i - Cl_b$) en relación con la concentración del trazador de la solución añadida (Cl_e). Si los nutrientes añadidos son retenidos a lo largo del tramo, las concentraciones estimadas deben ser más elevadas que las concentraciones observadas (fig. 8.4). La diferencia entre las dos áreas integradas de las curvas, en función del tiempo, de las concentraciones estimadas y observadas, multiplicado por el caudal, es la masa de nutriente retenida en el tramo durante el experimento. Sobre la base de estos valores, la tasa de asimilación por unidad de tiempo (K_t) se calcula a partir de la siguiente ecuación (Wilcock et al. 2002):

$$K_t = \frac{\ln(M_e/M_o)}{\tau} \tag{8.9}$$

donde, M_o : masa de nutriente calculada a partir de las concentraciones observadas, M_e : masa de nutriente calculada a partir de las concentraciones estimadas, y τ : tiempo requerido para que pase el pulso de adición al final del tramo (fig. 8.4).

S_w se calcula a partir de K_i mediante la ecuación:

$$S_w = \frac{v}{K_i} \quad (8.10)$$

donde, v : velocidad promedio del agua.

Finalmente V_f y U se calcularán a partir de S_w como se ha indicado en la técnica 13a.

Alternativamente al cálculo empírico de K_p , este parámetro también puede estimarse a partir de modelos unidimensionales de transporte de solutos que incluyen tanto el efecto del almacenaje hidrológico del agua, como el de la retención sobre el transporte de solutos. Estos modelos consideran dos compartimentos, el cauce principal y la zona de retención transitoria, que están conectados hidrológicamente y que pueden influenciar el transporte de solutos con tasa de retención por unidad de tiempo diferenciadas. En estos modelos, la dinámica del soluto añadido en un punto determinado del tramo se describe a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -\frac{Q}{A} \frac{\partial C}{\partial x} + \frac{1}{A} \frac{\partial}{\partial x} \left(AD \frac{\partial C}{\partial x} \right) + \frac{q_L}{A} (C_L - C) + \alpha (C_S - C) - \lambda C \quad (8.11)$$

$$\frac{\partial C_S}{\partial t} = \alpha \frac{A}{A_S} (C - C_S) - \lambda_S C_S \quad (8.12)$$

Estas ecuaciones son similares a las expuestas en la técnica 2, pero en este caso describen la variación de la concentración de un soluto biorreactivo (nutriente) y, por tanto, incluyen un componente que tiene en cuenta los procesos de retención de éste. La primera ecuación describe la variación del nutriente en función del tiempo en el cauce principal ($\partial C/\partial t$) y la segunda ecuación representa la variación de éste en la zona de retención transitoria ($\partial C_S/\partial t$).

Los términos de la primera ecuación describen los procesos de: a) advección, b) dispersión, c) entradas laterales, d) intercambio con la zona de retención transitoria, y e) la retención del soluto debida a procesos bióticos y químicos en el cauce principal, siendo λ la tasa de retención en el cauce principal.

Los términos de la segunda ecuación describen los procesos de: a) intercambio con el cauce principal y b) la retención del soluto debida a procesos bióticos y químicos en la zona de retención transitoria, siendo λ_S la tasa de retención en la zona de retención transitoria.

Existen diversos programas de software que incluyen estos modelos y que permiten obtener los distintos parámetros para una base de datos determinada.¹ En este caso, se recomienda primero parametrizar el modelo para los parámetros hidráulicos (advección, dispersión, sección de la zona de retención transitoria y coeficiente de intercambio entre la columna de agua y esta zona) utilizando los datos de la curva de conductividad o de la concentración del trazador hidrológico (técnica 2). Una vez obtenidos estos parámetros e incluyéndolos en el modelo, se parametriza de nuevo el modelo para obtener las tasas de retención en función del tiempo en el cauce principal (λ , en s^{-1}) y en la zona de retención transitoria (λ_s , en s^{-1}), utilizando los datos de variación de la concentración de nutrientes durante la adición. Una vez conocidas λ y λ_s , la suma de ambas tasas es equivalente a K_i obtenida a partir de la ecuación 8.9. Más detalle de la aplicación de este modelo y el posterior desarrollo de los cálculos se puede encontrar en Runkel (2007).

El programa OTIS permite obtener los parámetros hidráulicos principales a partir de los datos de adiciones instantáneas

8.2. Bibliografía

- ELWOOD J.W., NEWBOLD J.D., O'NEILL R.V., y VAN WINKLE W. «Resource spiralling: An operational paradigm for analyzing lotic ecosystems». En T.D. Fontain III, y S.M. Bartell, eds. *Dynamics of lotic ecosystems*. Ann Arbor: Ann Arbor Science, 1983: 3-27.
- HALL R.O., BERNHARDT E.S., y MEYER J.L. «Relating nutrient uptake with transient storage in forested mountain streams». *Limnology and Oceanography* 47 (2002): 255-265.
- MULHOLLAND P.J., STEINMAN A.D., y ELWOOD J.W. «Measurements of phosphorus uptake length in streams: Comparison of radiotracer and stable PO_4 releases». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 47 (1990): 2351-2357.
- MULHOLLAND P.J., TANK J.L., SANZONE D.M., WOLLHEIM W.M., PETERSON B.J., WEBSTER J.R., y MEYER J.L. «Nitrogen cycling in a forest stream determined by a N^{15} tracer addition». *Ecological Monographs* 70 (2000): 471-493.
- NEWBOLD J.D. «Cycles and spirals of nutrients». En P. Calow, y G.E. Petts G.E., eds. *The rivers handbook. Vol. 1*. Oxford: Blackwell, 1992: 379-408.
- NEWBOLD J.D., ELWOOD J.W., O'NEILL R.V., y VAN WINKLE W. «Measuring nutrient spiralling in streams». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38 (1981): 860-863.
- PAYN R.A., WEBSTER J.R., MULHOLLAND P.J., VALETT H.M., y DODDS W.K. «Estimation of stream nutrient uptake from nutrient addition experiments». *Limnology and Oceanography: Methods* 3 (2005): 174-182.
- PETERSON B.J., WOLLHEIM W.M., MULHOLLAND P.J., WEBSTER J.R., MEYER J.L., TANK J.L., MARTÍ E., BOWDEN W.B., VALETT H.M., HERSHEY A.E., MCDOWELL W.H., DODDS W.K., HAMILTON S.K., GREGORY S., y MORRALL D.D. «Control of nitrogen export from watersheds by headwater streams». *Science* 292 (2001): 86-90.
- RUNKEL R.L. «Toward a transport-based analysis of nutrient spiralling and uptake in streams». *Limnology and Oceanography: Methods* 5 (2007): 50-62.
- SABATER F., y MARTÍ E. «Towards a holistic view of nutrient dynamics in fluvial ecosystems». *Verhandlungen Internationale Vereinigung Limnologie* 27 (2000): 3111-3116.

¹ Uno de los programas más utilizados es OTIS, disponible gratuitamente en <http://co.water.usgs.gov/otis/>

- STREAM SOLUTE WORKSHOP. «Concepts and methods for assessing solute dynamics in stream ecosystems». *Journal of the North American Benthological Society* 9 (1990): 95-119.
- WEBSTER J.R., y PATTEN B.C. «Effects of watershed perturbation on stream potassium and calcium dynamics». *Ecological Monographs* 1979 (1979): 51-72.
- WEBSTER J.R., y VALETT H.M. «Solute dynamics». En F.R. Hauer, y G.A. Lamberti, eds. *Methods in stream ecology*. San Diego: Academic Press, 2006: 169-185.
- WILCOCK R.J., SCARSBROOK M.R., COSTLEY K.J., y NAGELS J.W. «Controlled release experiments to determine the effects of shade and plants on nutrient retention in a lowland stream». *Hydrobiologia* 485 (2002): 153-169.

Otros factores físicos de importancia para los seres vivos: luz, temperatura, corriente

SERGI SABATER Y ARTURO ELOSEGI

9.1. Introducción

La energía radiante proveniente del Sol aporta luz (un recurso fundamental para llevar a cabo la fotosíntesis), radiaciones ultravioletas (altamente perjudiciales para la biota) y radiaciones infrarrojas, que influyen en la temperatura del agua. Por tanto, la relevancia de la energía radiante no se limita a los productores primarios, sino que se extiende a toda la biota fluvial (Kelly et al. 2003).

Luz, temperatura y corriente son factores ambientales que afectan a todos los organismos de los ríos

La temperatura es un factor regulador del metabolismo de todos los organismos (Gillooly et al. 2002). El aumento de la temperatura, hasta un límite tolerable, estimula las tasas de producción primaria y de respiración de productores y heterótrofos. Estos efectos de aceleración (altas temperaturas) o limitación (bajas temperaturas) son detectables a escala estacional en un mismo río, y también entre ríos de distintas latitudes. Asimismo, la temperatura determina el ciclo vital de la vegetación de ribera que, a su vez, influye en la cantidad de luz que llega al cauce. Aunque los productores primarios se adaptan a la luz disponible (por ejemplo, aumentando su concentración de clorofila), la cantidad total de luz sigue siendo un elemento clave para determinar las tasas de producción primaria bruta en los ríos. En cambio, la intensidad de luz difícilmente afecta a las tasas respiratorias en el sistema, al menos de manera directa, aunque sí indirectamente, al causar una mayor abundancia de biomasa de los pro-

ductores primarios. Por todo ello, la estima directa de la luz disponible es clave para comprender la dinámica de los productores primarios en los ecosistemas fluviales.

Otro de los factores que más determina la distribución de los organismos en ecosistemas lóticos es la velocidad de la corriente. Los macroinvertebrados, algas, e incluso peces, presentan numerosas adaptaciones anatómicas y fisiológicas a la turbulencia y velocidad del agua (Statzner y Holm 1982). Esto permite que organismos con fuertes demandas de oxígeno persistan en medios turbulentos en presencia de abundante materia orgánica, que de acumularse en sistemas menos turbulentos consumiría irremisiblemente el oxígeno disponible para la biota. La velocidad de la corriente limita la biomasa de productores primarios que se pueden acumular en el lecho fluvial, las formas de crecimiento de algas y macrófitos, su respuesta fisiológica (producción y respiración), e incluso las interacciones algas-herbívoros.

9.2. La temperatura del agua

Registadores en continuo permiten medir la temperatura del agua fluvial durante meses

La manera más simple de medir la temperatura del agua es mediante un termómetro de mercurio o mediante termistores. La precisión de los primeros suele ser de 0,5 °C, mientras que los segundos consiguen precisiones de 0,1 °C. Muchos aparatos de medida (para obtener, por ejemplo, el pH, la conductividad o el oxígeno) tienen termistores acoplados que permiten una estima rutinaria de la temperatura, con una fiabilidad aceptable. Por último, hay termistores con capacidad de almacenamiento de miles de datos, de precio razonable y tamaño apenas mayor que una moneda. Estos termistores se pueden programar y mantener durante meses en el río, midiendo la temperatura a intervalos predeterminados, y los datos almacenados son fácilmente transportables a ordenadores en el campo o en el laboratorio.

9.3. La disponibilidad de la luz

La fracción de luz fotosintéticamente activa tiene gran interés biológico

La cantidad de luz incidente varía mucho durante el día y a lo largo del año, por lo que las medidas puntuales suelen ser muy poco representativas. Además, la luz se extingue al atravesar medios de distinta naturaleza o con cierta cantidad de partículas. De toda la luz que llega desde el Sol, en ecología fluvial es especialmente interesante disponer de medidas de la radiación fotosintéticamente activa (*photosynthetic active radiation*, PAR), incluida en las longitudes de onda entre 400-700 nm, ya que es la que se usa por los productores primarios en la fotosíntesis. A estas medidas nos referiremos en la técnica que se describe a continuación.

9.4. La velocidad de la corriente

La velocidad de la corriente estimula procesos como la fotosíntesis, la asimilación de nutrientes y la respiración, y determina la distribución de los organismos en los hábitats fluviales. Por tanto, es importante medir esta variable en sistemas fluviales. Hay muchas aproximaciones para medir la velocidad, en función de las necesidades que tengamos. Determinar la velocidad en relación con la dinámica química del sistema, o en cuanto a la distribución de grandes organismos (por ejemplo, los peces), requiere aproximaciones más simples que en otros casos. Determinar la extensión de la capa límite precisa métodos sofisticados, pero ello sólo es indispensable en el caso de medidas finas realizadas sobre el biofilm o en pequeños invertebrados.

La velocidad de la corriente se puede medir a escalas muy diferentes, en función de los objetivos del trabajo

Técnica 14. Estima de la luz disponible en un tramo

La alternativa más fiable para estimar el PAR (radiación fotosintética activa), que llega a un punto determinado, es utilizar en continuo un piranómetro (que mide la luz en el rango 400-1100 nm) o un cuantómetro (que mide solamente la luz visible, 400-700 nm). Mientras que los primeros proporcionan lecturas en $W m^{-2}$, los segundos las proporcionan como moles de fotones por metro cuadrado y unidad de tiempo (o $\mu E m^{-2} s^{-1}$). Existen cuantómetros con acumulador de datos de precio asequible, que registran en continuo y autónomamente la irradiancia durante semanas, y pueden ser interesantes si no hay riesgo de que desaparezca el material instalado en el campo. La frecuencia de registro de medidas depende del objeto del estudio; medidas cada 5 minutos y promediadas cada media hora, pueden ser suficientes en casos de estimas de producción primaria; en otros casos, las medidas pueden recogerse más laxamente. Sin embargo, en ríos forestados o espacialmente complejos un solo cuantómetro es insuficiente, y hay que contar con varios para poder estimar la disponibilidad del PAR a escala de tramo.

La luz se puede medir en $W m^{-2}$ o en $\mu E m^{-2} s^{-1}$

La luz que atraviesa la columna del agua no es la misma que se recibe en superficie, ya que parte de esta última es reflejada, y parte es absorbida o dispersada por el agua. Se debe, por tanto, estimar las variaciones entre la luz incidente y la que atraviesa al agua, para lo que es necesario disponer de un cuantómetro que permita simultáneamente recoger medidas aéreas y bajo el agua. Aunque el agua sea transparente, hay que considerar que la luz disminuye con la profundidad. Si la absorción de luz por el agua es importante, hay que determinar la extinción de la luz en la columna del agua, para lo cual hay varios métodos. Uno de ellos, apropiado para ríos profundos, es el clásico disco de Secchi, un disco blanco de unos 20-30 cm de diámetro. Mediante éste se puede estimar el *coefi-*

ciente de extinción (μ) a partir de la profundidad a la que deja de verse el disco (DS). Se estima empíricamente que la relación entre ambos es $\mu = DS/1,7$. Para arroyos turbios hay que usar un sensor de irradiancia sumergible. La relación entre las medidas en superficie (inmediatamente sumergido) y en profundidad (sobre el sustrato) permite estimar la extinción de la luz y aplicar los factores correspondientes a las estimas de entrada de luz, una vez corregidas por la cobertura. Estos factores pueden ser aplicados después de manera rutinaria a medidas globales.

La luz se puede medir directamente, o estimarse en función de la cobertura del tramo

Una posibilidad alternativa a los cuantómetros es utilizar los registros continuos de luz de alguna estación meteorológica no muy lejana al punto de estudio. En caso de no hallarse, la radiación extraterrestre global que llega al río puede estimarse en cualquier punto de la superficie terrestre; existen programas que permiten determinar este valor (<http://www.nrel.gov/midc/solpos/solpos.html>). Los modelos permiten estimar la radiación horaria, diaria, mensual y anual que recibe un punto determinado basado en su situación. Los datos que se precisan son solamente la latitud y longitud del punto, el día del año y el momento del día (si se requiere un momento concreto). Además se debe proporcionar la presión atmosférica del día en cuestión, la temperatura exterior, la orientación del tramo respecto al Sol (hacia N, S, E, W), y la inclinación respecto a la horizontal. La cobertura del tramo (véase más adelante) es esencial para determinar la luz que llega al cauce. Frecuentemente los datos se dan en calorías y se pueden transformar a moles de fotones por metro cuadrado y segundo mediante el siguiente cociente: $\mu\text{moles de fotones/cal} = 17,65$ (Guasch & Sabater 1998), al que deben añadirse las transformaciones adecuadas de factores de tiempo.

Las estimas visuales de cobertura suelen ser engañosas, ya que incluso en los bosques con cobertura «total» no suele haber oscuridad total. La cobertura es posible estimarla mediante fotografías tomadas en el tramo. Sin embargo, bajo todos los bosques se dan entradas puntuales de luz de alta intensidad (*sunflecks*) que tienen una gran relevancia en el comportamiento fotosintético de los productores primarios, y cuya distribución espacial es aleatoria.

MEDICIÓN DE LA COBERTURA

Material necesario

- Cámara fotográfica, a ser posible digital, y con objetivo gran angular (equivalente a 35 mm, o mejor, a 28 mm).
- Trípode.
- Ordenador con software de tratamiento de imagen (por ejemplo, Photoshop).

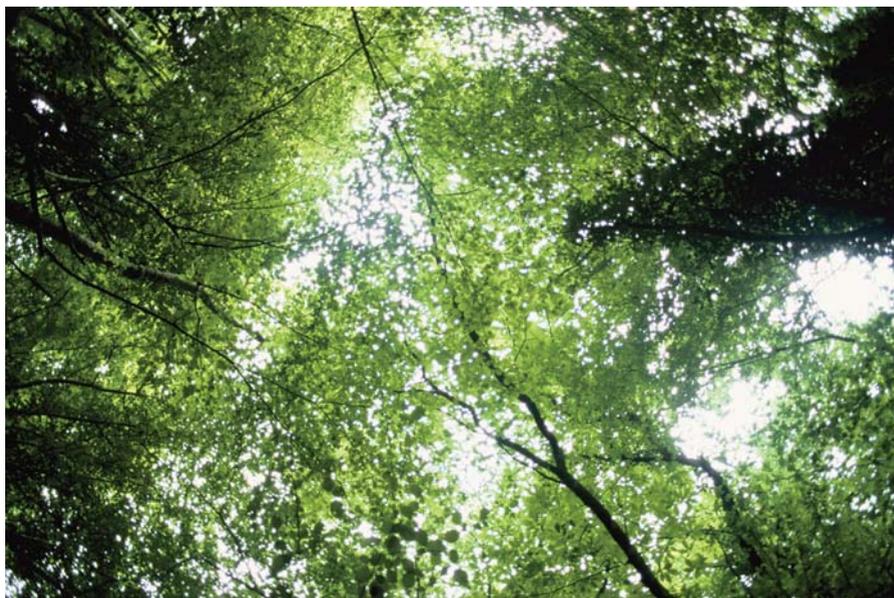


Figura 9.1:
*Foto cenital tomada sobre
un arroyo forestado*

Procedimiento

Se trata de tomar entre 10 y 15 fotos a lo largo del tramo, todas apuntando al cenit. Para ello, se coloca la cámara sobre el trípode en la mitad del cauce, tan cercana a la superficie del agua como sea razonable. Realizar la foto, mover el trípode algunos metros aguas arriba, hacer otra foto, etc. Las fotos cenitales suelen tener un aspecto similar al de la figura 9.1.

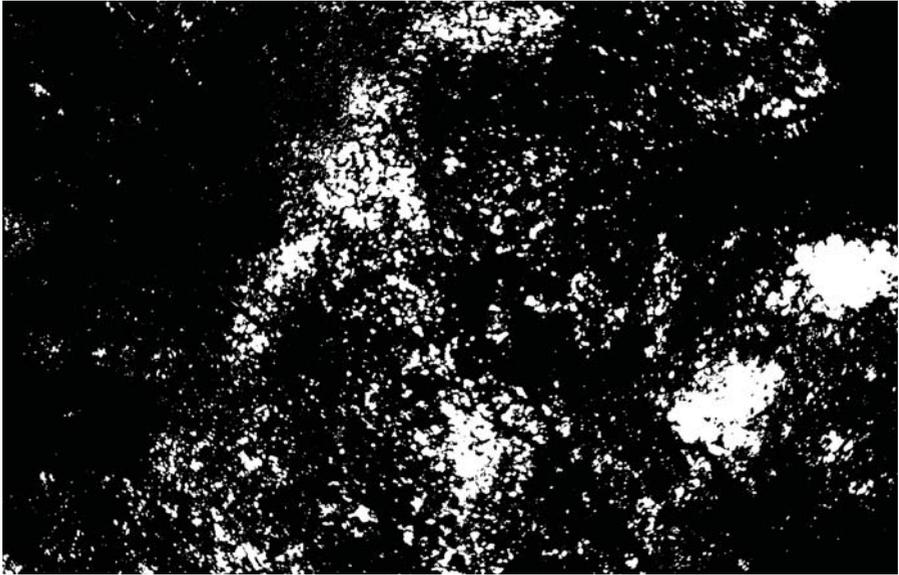
La cobertura se puede
medir fácilmente
mediante fotos cenitales

Una vez en el gabinete, hay que abrir la foto con Photoshop y jugar con el balance de color y con los mandos de brillo y contraste hasta convertir todo el cielo en blanco y todas las hojas en negro (fig. 9.2). Guardar la foto. Medir el porcentaje de cobertura en función de la proporción de blancos y negros en la foto, por ejemplo, mediante el programa NIH Image (US National Institutes of Health). Repetir con todas las fotos de cada tramo y calcular la cobertura media. Corregir los datos de irradiancia obtenidos de la estación meteorológica (como se ha descrito anteriormente) en función de la cobertura.

OTRAS CONSIDERACIONES EN LA MEDICIÓN DE LA COBERTURA

La cobertura puede variar durante el año en función del tipo de bosque, sobre todo si es caducifolio. En ese caso es necesario repetir las fotos, al menos en invierno y en verano. No es necesario que las fotos se tomen exactamente en los mismos sitios.

Figura 9.2:
Foto cenital tratada para
medir la cobertura



Técnica 15. Medición de la corriente

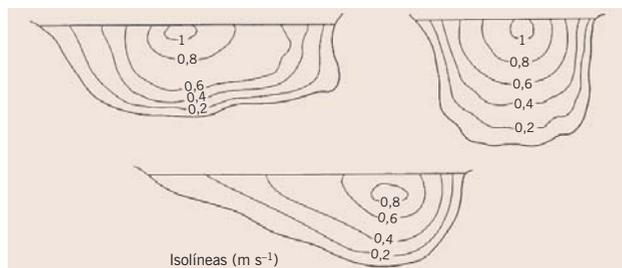
Técnica 15a. Velocidad de la corriente a escala de tramo

La velocidad media se
halla a 0,6 veces la
profundidad del tramo

Una de las medidas más comunes es la de la *velocidad media* del cauce fluvial. Estimaciones independientes de la velocidad punta y velocidad media pueden derivarse de la dinámica de los solutos (capítulo 4). Sin embargo, en ríos de dimensiones medias o grandes, las estimas de la velocidad deben realizarse directamente. En estas circunstancias, es necesario disponer de un correntímetro lo más sensible posible, y con dimensiones del rotor ajustadas a la profundidad del agua que se vaya a medir.

La distribución de velocidades en la columna de agua es bastante característica, máxima en superficie y mínima en el fondo (fig. 9.3). Para trabajos rutinarios se mide la velocidad media a 0,6 veces la profundidad en el punto de medida.

Figura 9.3:
Distribución transversal de
velocidades en ríos



Técnica 15b. Velocidad de la corriente a escalas espaciales reducidas

Los correntímetros disponibles comercialmente no permiten medir la velocidad en escalas de milímetros o menores. Ello es necesario si se quiere determinar la velocidad del agua en las cercanías de un sustrato, ya que la velocidad va disminuyendo conforme nos acercamos a éste. Esta disminución sigue una distribución vertical exponencial negativa, llegando la velocidad de la capa de agua en contacto con el sustrato a cero. Se define como *capa límite* la capa de agua que se halla entre el sustrato y la columna de agua. Su extensión y profundidad depende de las dimensiones del río, y su forma de la velocidad de las capas superiores. A escala centimétrica la fricción interna del agua rivaliza con la mezcla turbulenta, y en la capa límite se tiende a crear una *subcapa viscosa* sobre el sustrato (fig. 9.4). A una distancia al sustrato aún más pequeña (micrómetros), se forma la *subcapa difusiva* (Boudreau y Jørgensen 2001). En su conjunto, la capa límite tiene una gran importancia, ya que en esta zona tienen lugar procesos importantes como la disipación de la turbulencia, o del calor, y es el lugar de intercambio de gases y materiales disueltos. En esta capa se producen, pues, procesos fisicoquímicos relevantes. La profundidad de esta capa en relación con el tamaño corporal es relevante para los organismos que viven adheridos al sustrato, ya que determina la posibilidad de ser arrastrado o de permanecer en un medio turbulento. Por ello, medir la distribución vertical de velocidades en la capa límite puede tener relevancia para establecer los límites de esta propia capa y comprender los procesos de oxidación-reducción que ocurren en las cercanías de los sustratos, o para determinar cuestiones relativas a la microdistribución de los organismos, especialmente algas y macroinvertebrados, en el lecho fluvial.

Para trabajos de microdistribución de organismos hace falta determinar la velocidad del agua a pequeña escala

Existe una variedad de métodos para medir la velocidad a escalas reducidas. De todas las disponibles y, a pesar de su precio, razonablemente económico en relación con otros métodos, los más fiables son los denominados *sensores de film caliente*. Éstos permiten medidas a escalas de milímetros e incluso menores, aunque son intrusivos (interfieren con su presencia en el flujo) y su límite inferior de velocidad es de unos 3 cm/s.

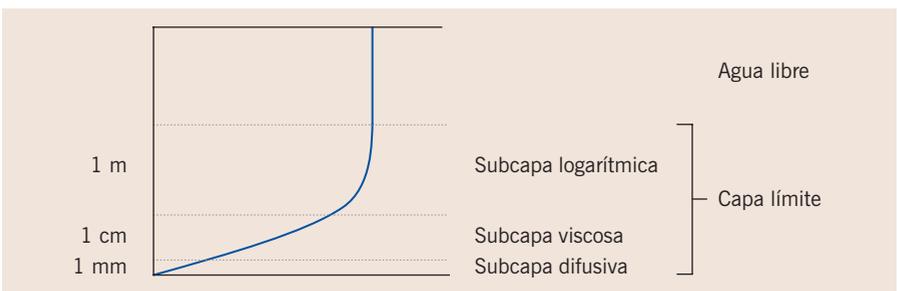


Figura 9.4: Distribución de la velocidad en las distintas capas de agua que van del agua libre a la que interactúa con un sustrato sólido

Nota: Obsérvese que la escala que se usa en la representación es logarítmica.

9.5. Bibliografía

- BOUDREAU B.P., y JØRGENSEN B.B. *The benthic boundary layer: Transport processes and biogeochemistry*. Nueva York: Oxford University Press, USA, 2001.
- GILLOOLY J.F., CHARNOV E.L., WEST G.B., SAVAGE V.M., y BROWN J.H. «Effects of size and temperature on developmental time». *Nature* 417 (2002): 70-73.
- GUASCH H., y SABATER S. «Estimation of the annual primary production of stream epilithic biofilms based on photosynthesis-irradiance relations». *Archiv für Hydrobiologie* 141 (1998): 469-481.
- KELLY D.J., BOTHWELL M.L., y SCHINDLER D.W. «Effects of solar ultraviolet radiation on stream benthic communities: An intersite comparison». *Ecology* 84 (2003): 2724-2740.
- STATZNER B., y HOLM T.F. «Morphological adaptations of benthic invertebrates to stream flow — an old question studied by means of a new technique (laser doppler anemometry)» *Oecologia* 53 (1982): 290-292.

Dinámica y relevancia de la materia orgánica

JESÚS POZO, ARTURO ELOSEGI, JOSERRA DÍEZ Y JON MOLINERO

10.1. Introducción

Muy frecuentemente, al hablar de materia orgánica se sobreentiende que se trata de materia orgánica muerta o detritus, ya que para la fracción viva se utiliza el término biomasa. La materia orgánica muerta representa la mayor parte de la energía química presente en los ecosistemas. En cualquier eslabón de la cadena trófica, la biomasa que no es consumida tarde o temprano muere y pasa a formar parte del detritus, un conjunto de restos vegetales, animales, microbianos y productos de sus metabolismos, en grado variable de descomposición. El detritus es aprovechado por los detritívoros y por los descomponedores que, finalmente, lo mineralizan (fig. 10.1). La descomposición de la materia orgánica representa, pues, la vía de mineralización en los ecosistemas fluviales.

La materia orgánica muerta constituye el reservorio de energía más abundante en los ecosistemas

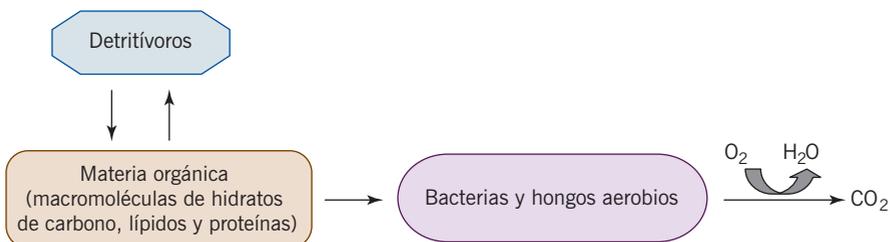


Figura 10.1: Modelo simplificado de interacción detritus-detritívoros-descomponedores en el procesado y mineralización de la materia orgánica en ríos bien oxigenados

Figura 10.2:
 Acumulación de hojarasca
 en un lecho fluvial, el
 recurso más aprovechado
 por detritívoros y
 descomponedores



Desde el punto de vista de la persistencia, en la materia orgánica se pueden distinguir dos grupos de sustancias (Wetzel 2001). Unas son fáciles de degradar (lábil) por el sistema enzimático hidrolítico de los microorganismos. Se trata de un conjunto amplio de carbohidratos, proteínas y otros compuestos de bajo peso molecular. Otras, las más abundantes, son de elevado peso molecular y resistentes a la degradación microbiana, como la celulosa o la lignina, o inhibitorios de la actividad bacteriana y fúngica, como los fenoles.

En función de su tamaño se distingue la materia orgánica disuelta, la particulada fina y la particulada gruesa

Por convención práctica, la materia orgánica se suele dividir en tres categorías atendiendo a su tamaño: la *materia orgánica disuelta* (MOD) es aquella que atraviesa un filtro de $0,45 \mu\text{m}$ de tamaño de poro; la *materia orgánica particulada gruesa* (MOPG) es la que queda retenida por un filtro de 1 mm; entre ambas se sitúa la *materia orgánica particulada fina* (MOPF).

Muchos arroyos discurren bajo un dosel arbóreo que limita fuertemente la entrada de luz, con pendiente elevada, y escasez de nutrientes, lo que dificulta el crecimiento de los productores primarios. En estas circunstancias, la comunidad de heterótrofos depende del alimento externo o *alóctono* (por ejemplo, Wallace et al. 1999), principalmente material vegetal en forma de hojas, frutos, ramas, etc. (figs. 10.2 y 10.3). Esta MOPG ingresa en el tramo por transporte desde aguas arriba o desde el medio terrestre circundante, poniendo de manifiesto la importancia del bosque ripario para el ecosistema fluvial (Naiman et al. 2005).

La importancia de la vegetación riparia para la energética del río ha sido reconocida desde hace tiempo (por ejemplo, Minshall 1967). Las hojas de los árboles

**Figura 10.3:**

Restos de madera en el cauce de un río, un recurso alternativo a la hojarasca del que no todos los organismos pueden hacer uso. Se aprecia el efecto sobre la retención de otros materiales y la heterogeneidad que genera en el cauce

representan una cantidad relevante de ese material (por ejemplo, Pozo et al. 1997a), y son rápidamente utilizadas por los descomponedores y por los detritívoros. Otros aportes orgánicos terrestres, como los restos de madera, pueden presentarse localmente en gran cantidad (fig. 10.3), y tienen importancia en el flujo de energía (Elosegi et al. 2007), a la vez que un papel estructural.

La cantidad y el tipo de materiales orgánicos disponibles para los organismos varía de unos ríos a otros y estacionalmente, sobre todo en función de la cobertura arbórea riparia, pero también dependiendo del régimen hidrológico (González y Pozo 1996, Sabater et al. 2001, Gonçalves et al. 2006, Mathuriau et al. 2008) y de la capacidad retentiva de los cauces (Larrañaga et al. 2003).

La madera muerta, además de ser una fuente de alimento para algunos organismos, influye en la estructura física del cauce

Además de materia orgánica particulada (MOP), los ríos reciben aportes de materia orgánica disuelta (MOD) provenientes del lavado de los suelos, siendo ésta la fracción mayoritaria. Por término medio, la concentración de carbono orgánico de los ríos es de unos 7 mg C/L, con una razón disuelto/particulado en torno a 3:1 (Wetzel 2001).

El origen alóctono de la mayor parte de la materia orgánica en ciertos tramos o ríos determina el carácter heterotrófico de estos sistemas (Vannote et al. 1980), que disponen de una base energética mucho más amplia para consumidores y descomponedores que la que proporciona la fotosíntesis dentro del río. Sin embargo, la materia orgánica alóctona no tiene la misma importancia en todos los tramos. Así, donde se elimina la vegetación riparia arbórea (fig. 10.4), la producción primaria autóctona puede llegar a convertirse en la principal fuente de energía para la comunidad fluvial.

Figura 10.4:

En los ríos desprovistos de vegetación arbórea riparia, la producción primaria puede suplir por sí sola las necesidades energéticas de la comunidad. Son sistemas autotróficos



A fin de cuantificar las distintas partidas y estudiar el destino de la materia orgánica en el ecosistema se construyen balances, aunque es difícil que incluyan y cuantifiquen los diferentes compartimentos y flujos de energía (Cebrián 1999). En este capítulo se describen los métodos más habituales en el estudio de la MOPG, desde su ingreso en los ríos, su retención o transporte, su disponibilidad en el lecho, y su utilización por los organismos. Por último, se aborda la elaboración de un balance de este recurso en un tramo fluvial. La mayor parte del material que entra es hojarasca, aunque la madera puede ingresar en cantidades incluso mayores, pero más circunstancial y puntualmente. Se requieren metodologías específicas para su respectiva cuantificación, por lo que ambos componentes deben ser tratados separadamente. De hecho, la denominación MOPG habitualmente excluye restos de madera de más de 1 cm de diámetro (Pozo et al. 1997a). Información adicional sobre técnicas relativas al estudio de la materia orgánica en los ríos se puede encontrar en Hauer y Lamberti (2007).

Técnica 16. Entradas de materia orgánica particulada gruesa al río

La cantidad de materia orgánica que la corriente arrastra en un tramo se ve afectada por el caudal

Un río de cabecera en medio forestal puede recibir al año varios cientos de gramos de materia orgánica particulada gruesa (MOPG) por metro cuadrado desde el bosque ripario, tanto por vía directa (verticalmente desde la vegetación), como indirecta (lateralmente desde los materiales depositados en el suelo) (Elosegi y Pozo 2005). Por otro lado, el transporte hace que la columna de agua de ese mis-



Figura 10.5:
Barrera de malla fija para retener la MOPG transportada. Una gran cantidad de sedimento también queda retenida, lo que dificulta la recogida del material

mo metro cuadrado sea atravesada por cantidades mucho mayores a lo largo del año. Es precisamente esta partida la más difícil de cuantificar, al estar condicionada por el caudal, que tiende a ser muy variable, con eventos de crecida impredecibles. Debido a ello, la MOPG transportada tiende a subestimarse, sobre todo si el período para el que se hacen las extrapolaciones es largo.

Aunque el muestreo en continuo mediante estructuras de filtración permanentes sería el más deseable, los problemas derivados de la acumulación de otro tipo de materiales arrastrados (fig. 10.5) y el esfuerzo necesario para la separación de los componentes orgánicos no compensan la información obtenida por ese procedimiento. Por ello se describe una técnica basada en el muestreo discreto del transporte de MOPG utilizando redes de deriva de 1 mm de poro (fig. 10.6).



Figura 10.6:
Red de deriva para el muestreo discreto de MOPG transportada

Figura 10.7:

Trampa para recogida de aportes verticales de MOPG



Las entradas directas (verticales) desde el ambiente ripario se miden por medio de trampas de malla (por ejemplo, $0,25 \text{ m}^2$ de boca de captación y malla de 1 mm de poro), a modo de cestos elevados por medio de cuerdas atadas a árboles o por una estructura soporte (fig. 10.7). Las indirectas, mediante trampas ubicadas en las orillas, ancladas mediante estacas y con la abertura ($0,5 \text{ m}$ de anchura) orientada al ambiente terrestre (fig. 10.8).

MATERIAL

- Balanza.
- Bolsas de plástico con autocierre.
- Cinta métrica.

Figura 10.8:

Trampa que permite la recogida de MOPG depositada en el suelo, removilizada por el viento u otras causas y que, finalmente, entra en el cauce



- Congelador (opcional).
- Correntímetro.
- Crisoles de porcelana.
- Cubetas de papel de filtro o de aluminio.
- Cubetas de plástico.
- Cuerdas.
- Desecador.
- Estacas para anclaje.
- Estufa.
- Horno.
- Maza.
- Redes de deriva.
- Regla rígida.
- Rotulador.
- Tabla de números aleatorios.
- Trampas para recogida de aportes verticales.
- Trampas para recogida de aportes laterales.

PROCEDIMIENTO

1. En un arroyo vadeable de zona boscosa, seleccionar un tramo de entre 50 y 100 metros, sin tributarios.
2. Medir la longitud del tramo.
3. Medir la anchura del cauce varias veces y calcular la anchura media.
4. Determinar el área del tramo (m^2).
5. Con la tabla de números aleatorios y usando un sistema cartesiano (coordenadas x,y con respecto a un punto de referencia, por ejemplo un árbol) colocar aleatoriamente las trampas de captación de los aportes verticales. Si se trata de un río estrecho cubierto por la bóveda vegetal, el cauce recibirá aportes semejantes a los del suelo circundante, por lo que las trampas se pueden colocar en las márgenes.
6. Seleccionar aleatoriamente, a lo largo de ambas orillas del cauce, los puntos donde ubicar las trampas para captación de entradas laterales y fijarlas con el marco inferior de la boca a ras del suelo (fig. 10.8).
7. Con ayuda de la cinta métrica, de la regla y del correntímetro, determinar la sección superior del segmento fluvial, así como el caudal (técnica 3).
8. En cada ocasión de muestreo, colocar una o varias (depende de la anchura del cauce) redes de deriva, de forma que capturen la mayor parte del caudal en la sección superior del tramo. Dejar actuar durante 4 horas, o hasta que la red se sature por el material retenido. Medir la sección de cada red que es atravesada por el agua y su velocidad al inicio y al final del tiempo que esté colocada. Transferir el material a una bolsa con autocierre y etiquetar.

En arroyos pequeños las trampas verticales se pueden colocar indistintamente encima del cauce o en las orillas

9. Recoger el material acumulado por cada trampa vertical desde el muestreo precedente, transferir a una bolsa con autocierre y etiquetar.
10. Con la misma frecuencia que se muestrean las trampas verticales, recoger el material retenido por las horizontales, transferir a bolsas con autocierre y etiquetar.
11. Los muestreos deben realizarse al menos una vez al mes, aumentando la frecuencia (por ejemplo, semanalmente) en las épocas de mayores aportes de hojarasca.
12. Trasladar las muestras al laboratorio. En el caso de no poder procesarlas de inmediato, congelarlas hasta el momento de su análisis.
13. Depositar cada muestra en una cubeta de plástico.
14. Separar la MOPG en categorías, por ejemplo, hojas (pueden separarse a su vez en especies), ramitas, corteza, frutos, flores y material no identificado. Colocar cada categoría en una cubeta de aluminio o de papel de filtro previamente pesada.
15. Secar en estufa a 70 °C durante 72 h, enfriar en desecador y pesar, obteniendo así su *peso seco* (PS).
16. Transferir el material de cada cubeta a un crisol de porcelana previamente pesado. Si la muestra es muy grande puede utilizarse una alícuota de la misma y extrapolar después al conjunto.
17. Para determinar el *peso de las cenizas* (PC) introducir los crisoles en el horno y calcinar a 500 °C durante 4 horas, enfriar en desecador y pesar.
18. Calcular el *peso seco libre de cenizas* (PSLC), o fracción orgánica de cada componente de la MOPG, restando del peso seco (PS) el peso de las cenizas (PC). Sumar los valores de todos los componentes para determinar el PSLC total de cada muestra.
19. Calcular el volumen de agua filtrado por cada red de deriva multiplicando la sección de la red por la velocidad del agua que la atraviesa.
20. Calcular la concentración de MOPG transportada dividiendo la masa retenida por la red entre el volumen de agua filtrado. Realizar las correcciones pertinentes si se han utilizado varias redes de deriva.
21. Calcular la entrada de MOPG por transporte multiplicando su concentración por el caudal del río y por el tiempo transcurrido entre muestreos. Dividir el resultado anterior por el área del tramo fluvial para expresar los resultados en $\text{g PSLC m}^{-2} \text{d}^{-1}$.
22. Calcular la entrada vertical de MOPG dividiendo la masa recogida en cada trampa por la superficie de captación y por el tiempo transcurrido entre muestreos, expresándola en términos de $\text{g PSLC m}^{-2} \text{d}^{-1}$.
23. Para calcular las entradas laterales, primero dividir la masa de la muestra por la anchura de la boca de la trampa y por el número de días transcurridos ($\text{g PSLC m}^{-1} \text{d}^{-1}$); después multiplicar el resultado anterior por 2 y dividirlo por la anchura media del cauce para poder expresar los resultados por unidad de superficie del lecho fluvial ($\text{g PSLC m}^{-2} \text{d}^{-1}$).

Es importante expresar las entradas verticales, laterales y por transporte en las mismas unidades: $\text{g PSLC m}^{-2} \text{d}^{-1}$

Técnica 17. Retención de hojarasca

En arroyos de bosques caducifolios, la hojarasca entra al río en grandes cantidades durante el otoño y puede acumularse in situ o ser arrastrada aguas abajo, y en consecuencia perderse para los organismos del tramo. Por ello, la retención del cauce es importante para la productividad del ecosistema fluvial (Bilby y Likens 1980, Pozo et al. 1997b). Los cauces estrechos y de fondo rugoso suelen ser más retentivos (Webster et al. 1994), especialmente si hay troncos formando presas (Díez et al. 2000). En época de crecidas, la retención disminuye, ya que aumentan la profundidad, la anchura y la potencia hidráulica (Larrañaga et al. 2003).

La corriente tiende a llevarse gran parte de la hojarasca que entra al río, por lo que la capacidad de retención del cauce tiene gran importancia ecológica

Para medir la capacidad de los cauces para retener hojas se pueden utilizar cuatro tipos de materiales: 1) hojas naturales pintadas en colores brillantes, preferentemente en una banda estrecha a lo largo del nervio central (haz y envés), 2) hojas exóticas que sean fácilmente reconocibles (por ejemplo, *Ginkgo biloba*), recogidas en otoño y conservadas secas, 3) hojas de plástico artificiales (poco recomendable: aunque se parecen a las reales pueden tener un comportamiento muy diferente) y 4) cualquier material fácil de reconocer que se comporte de forma parecida a las hojas (por ejemplo, tiras de loneta plastificada de 3 × 10 cm). Dado que no siempre es posible recuperar todas las hojas que se echan al arroyo, proponemos utilizar hojas de *Ginkgo biloba* para trabajos rutinarios. En arroyos pequeños, y durante el estiaje, la mayor parte de las hojas son retenidas en apenas unos metros (Larrañaga et al. 2003) por el primer obstáculo que se encuentran. Por ello, es recomendable marcar tres tramos, cada uno diez veces más largo que la anchura del cauce húmedo (Lamberti y Gregory 1996), y realizar tres experimentos consecutivos. En época de aguas altas la distancia recorrida por las hojas suele ser mayor, por lo que el punto de suelta no es tan crítico.

MATERIAL

- Hojas de *Ginkgo biloba* recogidas recién caídas y puestas a secar entre hojas de papel absorbente. Guardar en grupos de 50 hojas.
- Red de 1 o 2 cm de malla, más ancha que el cauce.
- Cinta métrica.
- Cuerdas para atar la red.

Antes de usarlas las hojas de ginkgo deben ser remojadas durante horas para favorecer su distribución en la columna de agua

PROCEDIMIENTO

Trabajo de campo

1. La víspera del experimento, poner las hojas en remojo durante toda la noche (fig. 10.9).
2. Colocar la cinta métrica a lo largo de la orilla del tramo.

Figura 10.9:
Hojas de ginkgo listas para
su uso



3. Bloquear el punto inferior del tramo experimental con la red.
4. Soltar las hojas en el extremo superior del tramo, una a una, y distribuyéndolas a lo ancho del cauce húmedo.
5. Una hora después de liberar las hojas, recoger y contar las que han quedado en la red. Mantener la red en posición.
6. Caminar por el cauce, aguas arriba, recogiendo todas las hojas. Marcar la distancia recorrida por cada una (precisión = 1 m) y anotar el tipo de estructura que retuvo la hoja (rápido, poza, margen, raíces, madera, macrófitos, arena, grava, cantos, bloques).
7. Tras recoger todas las hojas, quitar la red.

Cálculos

1. Expresar el número de hojas en transporte (L_d) frente a la distancia recorrida (d), y ajustar al modelo exponencial (Young et al. 1978):

$$L_d = L_0 e^{-kd} \quad (10.1)$$

donde L_0 : número total de hojas liberadas (o recuperadas), e : base de los logaritmos neperianos, y k : tasa de retención (m^{-1}).

2. Para ajustar los datos al modelo, calcular la regresión entre el logaritmo neperiano del número de hojas en transporte y la distancia. La pendiente de la regresión equivale a la tasa de retención k .
3. La distancia media recorrida (m) se calcula como $1/k$ (Newbold et al. 1981).
4. Para calcular la eficiencia relativa de retención de cada tipo de estructura, dividir el porcentaje de hojas que ha retenido una estructura por el porcentaje de cauce húmedo que cubre esa estructura.

La macro 10.1 calcula la
tasa de retención de
hojarasca

Técnica 18. Materia orgánica particulada bentónica

La materia orgánica particulada gruesa (MOPG) es la principal fuente de alimento para las comunidades fluviales de zonas boscosas (por ejemplo, Hall et al. 2000), probablemente porque es más fácilmente retenida en el lecho que otras fracciones más finas. Este material alóctono es aportado por el bosque ripario en grandes cantidades (Abelho 2001) e incluye restos de madera, frutos, flores y, sobre todo, por su cantidad y regularidad, hojas (por ejemplo, Pozo et al. 1997a).

La distribución de la *materia orgánica particulada gruesa bentónica* (MOPGB) es bastante gregaria y está sometida a una gran variabilidad temporal (Molinero y Pozo 2004), principalmente debida a la fenología de los aportes y al régimen hidrológico. Por otra parte, las alteraciones en la vegetación riparia (eliminación del bosque ripario o sustitución por plantaciones de especies exóticas) modifican la cantidad, la calidad y la fenología de las entradas, así como su acumulación en el lecho fluvial (Molinero y Pozo 2004).

Las cantidades de MOPG bentónica son muy variables de unos estudios a otros (Abelho 2001), poniéndose de manifiesto, además, la escasez de estudios en el hemisferio sur (cuadro 10.1).

Existen varios métodos para cuantificar la MOPGB: muestreo al azar del cauce húmedo (González y Pozo 1996), muestreo de transectos al azar (Golladay et al.

Las hojas suelen constituir la fracción más abundante de la MOPG bentónica

Localidad	Latitud	Vegetación	Orden de río	MOPGB (g PSLC m ⁻²)	Referencia [*]
Alaska, EE.UU.	65 °N	Taiga	2	8	1
Québec, Canadá	50 °N	Píceas y bosque caducifolio	1	968	2
			2	317	2
			5	456	2
Oregón, EE.UU.	45 °N	Coníferas	1	1012-5117	3
			3	388	3
			5	61	3
España	43 °N	Bosque caducifolio Plantación de eucaliptos	1	91	4
			1	140	4
Virginia, EE.UU.	37 °N	Bosque mixto	1	1730	5
Carolina del Norte, EE.UU.	35 °N	Bosque caducifolio	1	391	6
		Bosque caducifolio talado	2	286	6
Victoria, Australia	37 °S	Bosque de eucaliptos	4	105	7

Cuadro 10.1:

Materia orgánica particulada gruesa bentónica (MOPGB) (exceptuando restos grandes de madera) en varios ríos

* 1: Irons y Oswood (1997); 2: Naiman y Link (1997); 3: Webster y Meyer (1997); 4: Molinero y Pozo (2004); 5: Smock (1990); 6: Webster et al. (1990); 7: Treadwell et al. (1997).

Fuente: Modificado de Pozo y Elosegí (2005).

Figura 10.10:

Red de tipo Surber modificada, con la que se recoge la MOPG del lecho fluvial



Es recomendable realizar transectos transversales al azar para estimar la MOPG bentónica

1989) o a intervalos regulares a lo largo del cauce (Wallace et al. 1995), y muestreo estratificado al azar (Mulholland 1997). Uno de los utensilios más utilizados es una red de tipo Surber (fig. 10.10). Dependiendo de la entidad del río, puede seleccionarse un tramo de entre 50 y 100 metros de longitud que sea lo más homogéneo posible atendiendo a la vegetación riparia, la morfología fluvial y el sustrato.

MATERIAL

- Balanza.
- Bolsas de plástico con autocierre.
- Cinta métrica.
- Congelador (opcional).
- Crisoles de porcelana.
- Cubetas de papel de filtro o de aluminio.
- Cubetas de plástico.
- Desecador.
- Estufa.
- Horno.
- Jarra.
- Pala pequeña.
- Red de tipo Surber (superficie de muestreo de $0,25 \text{ m}^2$; tamaño de poro de la red de 1 mm).
- Rotulador.
- Tabla de números aleatorios.
- Tamices de 1 y 10 mm de poro.

PROCEDIMIENTO

1. Utilizando una tabla de números aleatorios, seleccionar cinco puntos que puedan ser localizados longitudinalmente con ayuda de una cinta métrica. En cada punto trazar un transecto de 0,5 m de ancho, de orilla a orilla del cauce, incluido el cauce seco (fig. 10.11).
2. Anotar la anchura del cauce en cada transecto.
3. Si en un transecto todo el cauce es húmedo seguir sólo el procedimiento b de este apartado. En el caso de existir una parte seca en el cauce, seguir los dos procedimientos que se indican a continuación:
 - a) Recoger todo el material de la parte seca del transecto con ayuda de una pala pequeña hasta una profundidad de 5 cm. Retirar las piedras de la muestra. Colocar el material recogido sobre un conjunto de tamices: 10 mm arriba, 1 mm abajo. Lavar la muestra con una jarra y agua del río, desechando todo el material inorgánico que se pueda, así como los restos de madera de más de 1 cm de diámetro. Introducir el resto en una bolsa de plástico con autocierre y etiquetar convenientemente con un rotulador.
 - b) En la parte de cauce húmedo, muestrear la MOPG del lecho con ayuda de una red de tipo Surber. Remover manualmente y con la pala el sustrato hasta una profundidad de 5 cm, permitiendo que la corriente transporte la materia orgánica resuspendida hasta la red. Lavar el contenido de la red sobre el tamiz de 10 mm, retirando piedras y grava y las piezas de madera de más de 1 cm de diámetro. Repetir el proceso hasta muestrear todo el transecto. Introducir la muestra en una bolsa con autocierre y etiquetar. En el caso de haber muestra de a, puede reunirse en la misma bolsa con el material recolectado aquí.
4. Proceder del mismo modo con los otros transectos.

Para la estima de la MOPG bentónica se debe muestrear tanto el cauce húmedo como el seco

Aunque se recojan varias redes Surber por transecto, el conjunto de todas ellas constituye una única réplica



Figura 10.11:
Tramo fluvial donde se señalan una serie de transectos de 0,5 m de anchura elegidos al azar donde se recogerá la MOPG bentónica

5. Trasladar las muestras al laboratorio. En el caso de no poder procesarlas de inmediato, congelarlas hasta el momento de su análisis.
6. Si el estudio contempla varios muestreos en el tiempo, pueden realizarse con una frecuencia mensual, aumentándola (por ejemplo, a dos veces al mes) en las épocas de mayores entradas.
7. Una vez en el laboratorio, abrir cada bolsa y verter su contenido sobre un tamiz de 1 mm, lavando con agua de grifo para acabar de eliminar los materiales inorgánicos (arenas, limos...). Depositar la muestra de MOPG en una cubeta de plástico.
8. Separar la MOPG en categorías, por ejemplo, hojas (pueden separarse a su vez en especies), ramitas, corteza, frutos, flores y material no identificado. Colocar cada categoría en una cubeta de aluminio o de papel de filtro previamente pesada.
9. Medir el peso seco (PS) tras secar en estufa a 70 °C durante 72 horas y enfriar en desecador.
10. Transferir el material de cada cubeta a un crisol de porcelana previamente pesado. Si la muestra es muy grande puede utilizarse una parte alícuota de la misma y extrapolar después al conjunto.
11. Medida del peso de las cenizas (PC): introducir los crisoles en el horno y calentar a 500 °C durante 4 horas, enfriar en desecador y pesar.
12. Determinar el peso seco libre de cenizas (PSLC) de cada componente de la MOPG restando del peso seco (PS) el peso de las cenizas (PC). Sumar los valores de todos los componentes para determinar el PSLC total de cada muestra.
13. Calcular la superficie (m^2) de cada transecto multiplicando la anchura del cauce (m) por 0,5 m.
14. Para expresar los resultados por unidad de superficie del lecho fluvial ($g\ PSLC\ m^{-2}$), dividir en cada caso la cantidad de material por la superficie del transecto.

Técnica 19. Cantidad de madera en el cauce

La madera muerta gruesa tiene un papel estructural más importante que la madera fina

La madera muerta es un componente que puede llegar a ser muy abundante en muchos arroyos y ríos (Harmon et al. 1986, Gregory et al. 2003). Los restos leñosos en el cauce retienen agua, sedimentos y materia orgánica, estabilizan el cauce, reducen el impacto de las crecidas sobre la biota, proporcionan hábitat para invertebrados y peces, mejoran la calidad del agua, etc. (Gregory et al. 2003). La cantidad de madera muerta depende no sólo de la composición y estructura del bosque adyacente y de la morfología del río en cada tramo, sino también de las actividades humanas en el cauce y en sus riberas (Díez et al. 2001). Sin embargo, la madera suele presentar una distribución de contagio, por lo que los métodos clásicos de determinación del tipo de sustrato son inadecuados para medir su abundancia. Habitualmente se distingue entre madera muerta gruesa (restos mayores de 5 o 10 cm de diámetro, > 1 m de longitud) y madera fina, que tiene un papel estructural me-

nos importante (Harmon et al. 1986). Determinar la cantidad de madera en un tramo puede ser poco o muy costoso, en función de la cantidad y disposición, y del tamaño mínimo que se quiera considerar. Medir los troncos grandes es relativamente sencillo, según su abundancia y disposición, pero medir todos los palos pequeños resulta más complicado. Aquí se propone realizar un censo total de todos los restos de madera mayores de 5 cm de diámetro, dada su mayor influencia sobre el cauce.

Además de cuantificar la cantidad de madera en el cauce, resulta de interés observar su dinámica temporal de movimiento en el cauce, sobre todo desde el punto de vista de su manejo. Para ello se suelen marcar los troncos, se ubican en la cartografía, y se revisa periódicamente su posición.

MATERIAL

- Cinta métrica de 50 m.
- Calibre forestal o, en su defecto, cinta métrica de 2 m.
- Regla de 2 m.
- Martillo.
- Clavos.
- Chapas metálicas numeradas.
- Cartografía del tramo (técnica 5).

PROCEDIMIENTO

Trabajo de campo

1. Empezando en el extremo inferior del tramo, identificar y ubicar en la cartografía todos los restos leñosos con un diámetro superior a 5 cm que se encuentren en el cauce (fig. 10.12).
2. Para restos ubicados íntegramente dentro del cauce, medir el diámetro (o el perímetro) de los dos extremos y la longitud del tronco. Para troncos ramificados, determinar los diámetros y longitud de cada rama.
3. Para restos parcialmente fuera del cauce, medir el diámetro y la longitud del trozo dentro del cauce, y lo mismo con el trozo fuera del cauce.
4. Medir la altura del tronco respecto del lecho.
5. Marcar el tronco con una chapa numerada y anotar su posición con 1 m de precisión.

Se miden y se localizan todas las piezas de madera muerta gruesa

Cálculos

1. Calcular el volumen de cada tronco aplicando la fórmula del troncocono:

$$V = \pi l \frac{(R^2 + r^2) + (Rr)}{3} \quad (10.2)$$

Figura. 10.12:
Medición del diámetro
de un tronco



donde V : volumen (cm^3), l : longitud (cm), R : radio del extremo más grueso (cm), y r : radio del extremo más delgado (cm).

2. Sumar el volumen de todos los troncos, y dividirlo por la superficie del cauce del tramo. Expresar el volumen de madera en $\text{cm}^3 \text{m}^{-2}$ de cauce, o en $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$ de cauce.

Otras consideraciones

La cantidad de madera muerta suele variar muy poco con el tiempo, por lo que un muestreo anual suele ser suficiente si no ocurren eventos imprevistos.

Además de calcular el volumen de madera, se puede determinar su masa. Para ello hay que recoger algunas muestras (15 o 20 trozos son suficientes), determinar su volumen, y medir su masa por gravimetría, como se hace con el resto de la MOPG (por ejemplo, técnica 18).

Técnica 20. Descomposición de la hojarasca

El término *descomposición* se ha usado en la literatura para referirse a dos procesos diferentes: 1) la desintegración mecánica de los materiales vegetales hasta un estado en el que la estructura celular no es reconocible, y 2) la mineralización de los compuestos orgánicos hasta formas inorgánicas. La descomposición de la materia orgánica se lleva a cabo por un diverso conjunto de organismos, detritívoros, como muchos invertebrados fluviales, y descomponedores, como hongos y bacterias. La actividad microbiana pone en marcha una maquinaria enzimática extracelular hidrolítica y oxidativa que despolimeriza las celulosas, las hemicelulosas y las ligninas en compuestos más fácilmente asimilables (Graça et al. 2005), que después se utilizan para construir estructuras y como fuente de energía (técnica 27).

Cuando un resto orgánico cae al agua algunos de sus componentes se pierden rápidamente por un proceso físico de lixiviación, disolución o arrastre por el agua (Bärlocher 2005). Al mismo tiempo se inicia una colonización microbiana (bacterias y hongos) que acondiciona el material, aumentando su palatabilidad para los detritívoros y desencadenando un período de intensa actividad biológica. Además de la fragmentación debida a los detritívoros, la abrasión física, causada por la corriente, y la producción de heces contribuyen a aumentar la superficie de detritus susceptible de ser usada por los descomponedores. El producto es un material cada vez más difícil de descomponer, porque pocos microorganismos disponen de las enzimas necesarias para romper los enlaces más refractarios.

Factores físicos, como la temperatura, o químicos, como la concentración de nutrientes en los materiales y en el agua, son los principales condicionantes de la actividad biológica y de la velocidad a la que se descompone la materia orgánica muerta.

La tasa de descomposición de la materia orgánica aumenta con la temperatura, por lo que varía estacionalmente (fig. 10.13). Debido a ello, y con objeto de poder comparar tasas corrigiendo el efecto de la temperatura, las pérdidas se suelen expresar en función de *grados-días*, un concepto que representa una cantidad de calor acumulado en un cierto periodo de tiempo. El valor de grados-días se calcula como la suma de las temperaturas medias diarias durante un periodo determinado.

La tasa a la que desaparece el material por la acción de descomponedores y detritívoros depende, además, de su calidad, que se puede medir en términos de textura, composición bioquímica y contenido en nutrientes. La hojarasca que posee un elevado contenido en componentes estructurales refractarios, como celulosas y ligninas, es de poco valor nutricional para los detritívoros que carecen de las enzimas apropiadas para la degradación de esos compuestos y, por lo tanto, se descompone lentamente.

La descomposición de la hojarasca es uno de los procesos más estudiados en ríos pequeños donde los aportes vegetales terrestres son abundantes. Más información acerca de las metodologías aplicadas se puede encontrar en Graça et al. (2005).

La descomposición incluye la fragmentación física, los cambios químicos, y la actividad de los detritívoros y descomponedores

La tasa de descomposición depende de la temperatura y de la calidad de la materia orgánica

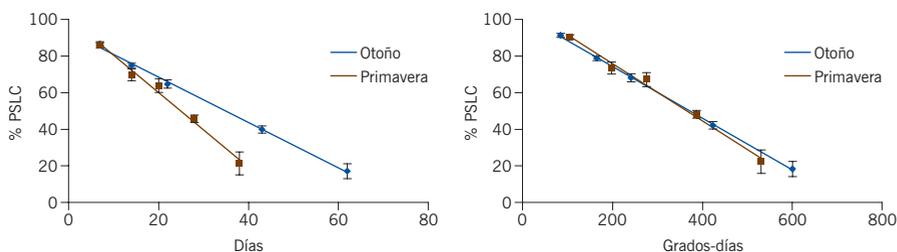
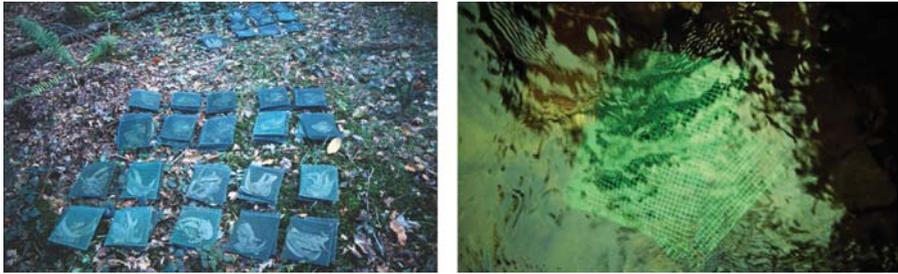


Figura 10.13: Pérdida de masa en función del tiempo (izquierda) y de los grados-días (derecha) de la hojarasca de aliso en un arroyo del norte de España

Figura 10.14:
Bolsas de malla de 5 mm de poro preparadas para depositar (izquierda) o ya sumergidas en el río (derecha). Para asegurarlas se pueden atar a piedras o a barras de hierro clavadas en el lecho



MATERIAL

- Balanza (precisión: 0,01 g).
- Barras de hierro (aproximadamente 10 mm de diámetro y 0,50 m longitud).
- Bolsas de incubación confeccionadas con malla plástica comercial de 5 mm de poro (fig. 10.14).
- Bolsas de plástico con autocierre.
- Cajas metálicas con paredes agujereadas y cable para sujeción.
- Cubetas de papel de filtro o de aluminio.
- Estufa.
- Etanol al 70%.
- Etiquetas de identificación de las muestras. Deben soportar los efectos del agua.
- Sedal fuerte de pesca.
- Horno.
- Maza.
- Pulverizador de jardinería.
- Rotulador.
- Sensores de medición de temperatura en continuo.
- Tamiz (0,2 mm de poro).
- Tijeras.
- Viales para conservar los invertebrados.

PROCEDIMIENTO

Se deben recoger hojas recién caídas, enteras y sin manchas

1. Recolectar hojas de la especie a estudiar inmediatamente después de su abscisión, preferentemente de una sola localidad. Desechar las hojas en mal estado, con manchas, carentes de pecíolo o que presenten signos de actividad fúngica o material mineral adherido.
2. Una vez en el laboratorio, mezclar bien el conjunto y extender las hojas en un lugar bien aireado, sobre una superficie limpia, para agilizar la pérdida de humedad. Remover diariamente para evitar el desarrollo de hongos, sobre

todo si las hojas venían muy húmedas del campo. El material puede estar listo para su utilización al cabo de unos siete días.

3. Para llevar a cabo las incubaciones, introducir una cantidad de hojas, previamente pesada, de la especie de interés, en bolsas de malla inerte (por ejemplo, Pozo 1993) (fig. 10.14). Confeccionar bolsas de unos 20 x 25 cm con malla plástica verde comercial de 5 mm de poro, suficiente para permitir el acceso a las hojas de la mayor parte de los invertebrados bentónicos. Si se usan bolsas de diferentes tamaños de poro se puede estudiar el efecto de la exclusión de algunos invertebrados discriminando por su tamaño. En función del tamaño de los fragmentadores locales se puede usar un tamaño de malla u otro.
4. Establecer un calendario de muestreo para la retirada de las bolsas del río. La frecuencia de recogida depende de la velocidad a la que desaparece el material, pudiendo ser semanalmente para las especies de descomposición rápida, o cada dos semanas o mensualmente para especies de más lento procesado. Se puede establecer un calendario interactivo después de un primer muestreo a los siete días, de manera que las fechas se van determinando (por ejemplo, T_{50} , tiempo estimado para una pérdida del 50% del material) en función de la velocidad del proceso (basada en los muestreos precedentes al próximo) y asumiendo que la dinámica de la pérdida de masa se ajusta a un modelo de regresión exponencial negativo. Realizar cinco muestreos, retirando cinco réplicas en cada ocasión.
5. Pesar entre 5 y 10 ($\pm 0,25$) g de hojas secadas al aire (Pa) y colocarlas en una bandeja junto con la etiqueta de identificación.
6. Humedecer las hojas de las bandejas con un vaporizador de jardinería para evitar su fragmentación cuando se manipulen. Usar agua del río.
7. Introducir el material y cerrar cada bolsa con el sedal sobrante.
8. Transportar las bolsas al río, distribuirlas en conjuntos de cinco réplicas en rápidos seleccionados aleatoriamente, o en función de las posibilidades de espacio que ofrezca el río si es pequeño. Clavar una barra de hierro en el lecho, con la ayuda de una maza, para cada conjunto de cinco réplicas. Atar las bolsas con sedal, comenzando a trabajar desde el extremo superior del tramo y continuando aguas abajo. Dibujar un esquema de la situación de las barras.
9. En cada tramo, emplazar al menos un sensor de temperatura en continuo, protegido por una caja metálica agujereada, y fijado de forma segura, de modo que quede protegido de la acción directa de la luz solar, de daños mecánicos y de curiosos.
10. Utilizar al menos cinco réplicas extras, sumergirlas en el tramo de estudio (evitar pozas con renovación deficiente), sin que entren en contacto con el lecho. Al cabo de 24 horas retirar estas cinco bolsas y devolverlas al laboratorio. Determinar el peso seco de cada una de las cinco réplicas tras secar en estufa (70 °C, 72 h), dejar enfriar en desecador y pesar. Dividir cada uno de esos pesos entre el correspondiente peso seco al aire (Pa). El valor medio

Aunque normalmente se usan bolsas de 5 mm, la malla se puede cambiar en función del tamaño de los fragmentadores de cada río

de esas cinco determinaciones es el coeficiente (S) para estimar el peso seco a estufa (Pe) inicial a partir del peso seco al aire (Pa) de cada una de las muestras preparadas para el experimento, corregidas para el efecto de la manipulación (preparación de bolsas, transporte...) y para el lixiviado.

$$Pe = Pa S \quad (10.3)$$

11. Utilizar las mismas cinco réplicas para calcinar el material en mufla (500 °C, 4 h). Dejar enfriar en desecador y pesar. Calcular el peso seco libre de cenizas ($PSLC$) de cada réplica como la diferencia entre el peso introducido en el horno y el peso de las cenizas; dividirlo por el peso introducido en el horno y determinar el coeficiente (C), como la media de esos cinco valores, para estimar el *peso seco libre de cenizas inicial* ($PSLCi$) de cada muestra a partir de su peso seco a estufa (Pe).

$$PSLCi = Pe C \quad (10.4)$$

Alternativamente,

$$PSLCi = Pa S C \quad (10.5)$$

12. Realizar la primera recogida a los siete días después del implante. Los sucesivos muestreos se determinan sobre la base de los datos de los muestreos precedentes como se indicó anteriormente. Ir muestreando río arriba, recogiendo una bolsa de cada barra, hasta totalizar cinco réplicas. Transferir inmediatamente cada réplica a un bolsa de plástico con autocierre con un pequeño volumen de agua y etiquetarla convenientemente. Colocar en nevera portátil con hielo para su traslado al laboratorio.
13. En cada muestreo tomar un volumen suficiente (aproximadamente 5 L) de agua del río pasada por un tamiz de 0,2 mm, para usarla después en el lavado del material en el laboratorio.
14. La forma de proceder con las bolsas en el laboratorio depende del número de variables que se vayan a analizar. Abrir cada bolsa y verter su contenido sobre un tamiz de 0,2 mm de poro. Si se van a estudiar los invertebrados asociados, verter y limpiar adecuadamente sobre el tamiz el contenido de la bolsa de plástico donde se transportaba la réplica.
15. Limpiar las hojas con agua del río mediante el pulverizador de jardinería para separar los animales y las partículas minerales adheridas. Depositar las hojas lavadas en una bandeja de papel de filtro convenientemente etiquetada.
16. Separar, si es el caso, los macroinvertebrados retenidos en el tamiz, conservándolos directamente en etanol al 70%.
17. Secar el material de cada réplica en estufa (70 °C, 72 h). Enfriar en desecador y pesar con precisión de 0,01 g, obteniendo el *peso seco remanente* (Pr).

18. Calcinar la muestra seca en mufla (500 °C, 4 h), dejar enfriar en desecador y pesar para determinar el *peso seco libre de cenizas remanente (PSLCr)*.
19. Determinar el porcentaje de material remanente en términos de *PSLC* de cada muestra (*%PSLCr*).

$$\%PSLCr = (PSLCr/PSLCi)100, \text{ o } \%PSLCr = (PSLCr/PSLCi)100,$$

si se parte de valores iniciales post lixiviado.

20. La pérdida de masa se puede ajustar a algún modelo de regresión, aunque el más común de la literatura es el exponencial negativo:

$$M_t = M_0 e^{-kt} \quad (10.6)$$

donde M_t : masa en el tiempo t (g), M_0 : masa inicial, k : tasa de pérdida diaria (día^{-1}), y t : tiempo (días).

21. La tasa de descomposición, k , es la pendiente de la regresión entre el $\ln \%PSLCr$ y el tiempo, en días, y representa una fracción constante de pérdida de la cantidad de material que va quedando. Si se desea corregir el efecto de la temperatura, en lugar del tiempo como variable independiente se pueden utilizar la temperatura acumulada (grados-días).

La macro 10.2 permite calcular la tasa de descomposición de hojarasca

Técnica 21. Balances de materia orgánica particulada gruesa en sistemas fluviales

Un balance es un conjunto de cálculos relativos a entradas (E) y salidas (S) en un sistema. Para el conjunto de la materia orgánica en un ecosistema fluvial es difícil construir un balance por la complicación de vías de circulación y conversiones que se producen, principalmente en las fracciones fina y disuelta, y por las interacciones tierra-agua-sedimentos, que hacen enormemente laborioso el trabajo (Cummins et al. 1983). El balance básico de MOPG en un tramo fluvial en particular se construye determinando las entradas verticales y laterales desde el medio terrestre circundante, el transporte desde río arriba, la acumulación en el cauce y las salidas, tanto por transporte río abajo como por efecto del consumo y la descomposición (fig. 10.15).

El balance es un resultado de las entradas verticales laterales y por transporte, y las salidas por transporte, consumo y descomposición

La ecuación general de un balance de MOPG en un tramo fluvial determinado puede expresarse como:

$$S = E + \Delta B \quad (10.7)$$

donde S : salida de material en un determinado tiempo, E : entrada de material en un período, e ΔB : variación en la acumulación de MOPG bentónica en ese mismo período.

Figura 10.15:
Componentes de un balance
de materia orgánica
particulada gruesa (MOPG)
en un tramo fluvial



Fuente: Modificado de Pozo (2005).

Esa expresión se puede desglosar así:

$$B_t = B_0 + E_T + E_V + E_L - S_T - S_D \quad (10.8)$$

donde B_t : cantidad de MOPG en el lecho en un tiempo t , B_0 : cantidad de MOPG en el lecho en el tiempo 0 (o previo), E_T : entrada por transporte, E_V : entrada vertical (directa) desde el medio terrestre circundante, en el período entre 0 y t , E_L : entrada lateral (indirecta) en el mismo período, S_T : salida por transporte, y S_D : pérdida genérica por descomposición (procesado), que incluye pérdidas por abrasión física, consumo y descomposición.

El balance como mínimo
debe corresponder
a un año

No es habitual medir todas las vías de flujo, y algunas se determinan por diferencia. Es importante referir las medidas a una unidad de superficie (m^2), lo que permite comparar entre tramos o entre ríos, con independencia de su tamaño. En cuanto a la extensión temporal del balance, las series temporales largas producen mejores resultados, aunque los balances más frecuentes corresponden a períodos de un año o inferiores (Webster y Meyer 1997). La cantidad y fenología de los aportes vegetales desde el medio terrestre, la acumulación y las salidas por transporte y por procesado dependen de la especie, por lo que el conocimiento cuantitativo de las vías de flujo y reservorios de materia orgánica en el sistema permite determinar eficiencias que son útiles como indicadores de impactos en el funcionamiento fluvial, por ejemplo, por cambios en la vegetación riparia. El cuadro 10.2 muestra tasas de renovación de la MOPG en varios ríos del mundo.

Localidad	Latitud	Vegetación	Orden de río	Renovación (año ⁻¹)	Referencia*
Alaska, EE.UU.	65 °N	Taiga	2	7,6	1
Québec, Canadá	50 °N	Píceas y bosque caducifolio	1	0,8	2
			2	0,9	2
			5	0,1	2
Oregón, EE.UU.	45 °N	Coníferas	1	0,3-0,7	3
			3	1,9	3
			5	12,0	3
España**	43 °N	Bosque caducifolio	1	7,9	4
			Plantación de eucaliptos	1	4,0
Virginia, EE.UU.	37 °N	Bosque mixto	1	0,3	5
Carolina del Norte, EE.UU.	35 °N	Bosque caducifolio	1	1,6	6
			Bosque caducifolio talado	2	1,5
Victoria, Australia	37 °S	Bosque de eucaliptos	4	6,0	7

* 1: Irons y Oswood (1997); 2: Naiman y Link (1997); 3: Webster y Meyer (1997); 4: Molinero y Pozo (2004); 5: Smock (1990); 6: Webster et al. (1990); 7: Treadwell et al. (1997).

** Sólo hojas.

Fuente: Modificado de Pozo y Elosegí (2005).

Cuadro 10.2:

Tasas de renovación (entradas terrestres/acumulación en el lecho) de la materia orgánica (exceptuando restos grandes de madera) en varios ríos

Esta técnica puede aplicarse al conjunto de la MOPG o a cualquiera de sus componentes (especies de hojas, ramas, frutos), ya que su separación se puede realizar con facilidad. Si el período considerado es de un año, el muestreo debe realizarse al menos una vez al mes, aumentando la frecuencia (al menos quincenalmente) en las épocas de mayores aportes de hojarasca.

MATERIAL

- Equipamiento para determinación de las entradas por transporte, así como de las directas e indirectas desde el entorno ripario (técnica 16).
- Equipamiento utilizado en la técnica 18 para determinar la MOPG del lecho fluvial.
- Equipamiento utilizado para determinar la tasa de descomposición (técnica 20).

PROCEDIMIENTO

1. Seleccionar un pequeño río o un tramo vadeable sin tributarios de entre 50 y 100 metros de longitud en una zona boscosa.
2. Medir, además de la longitud del tramo, la anchura media del cauce a partir de varias medidas de anchura.
3. Determinar las secciones superior e inferior del tramo, así como la descarga (técnica 3).
4. Determinar las entradas terrestres (directas e indirectas) siguiendo la técnica 16.

5. Determinar las entradas por transporte a partir del material retenido por las redes de deriva colocadas en la sección superior del segmento fluvial siguiendo la técnica 16. Las salidas por transporte pueden ser calculadas por diferencia en la ecuación del balance.
6. Determinar la MOPG del lecho siguiendo la técnica 18.
7. Determinar las tasas de descomposición, k , del, o de los componentes de la MOPG siguiendo la técnica 20.
8. Expresar las entradas verticales (E_v) de MOPG en términos de g PSLC $m^{-2} d^{-1}$, dividiendo la cantidad de material en el cesto entre el producto de la superficie de captación y el número de días entre dos muestreos consecutivos.
9. Expresar las entradas laterales (E_L) de MOPG en términos de g PSLC $m^{-2} d^{-1}$ mediante la expresión:

$$E_L = 2M_L / lWt \quad (10.9)$$

donde M_L : cantidad de MOPG en la trampa lateral (g), l : anchura de captación (longitudinal al río) de la trampa (m), W : anchura media del cauce (m), y t : tiempo transcurrido entre muestreos (d).

10. Expresar las entradas y/o salidas por transporte (E_T, S_T) en términos de g PSLC $m^{-2} d^{-1}$, dividiendo la cantidad de material que ingresa diariamente por el área del segmento fluvial estudiado, A , la cual se calcula multiplicando W por la longitud del segmento, L .
11. La variación de la MOPG del lecho del río, ΔB , se puede expresar en términos de g PSLC $m^{-2} d^{-1}$, dividiendo la diferencia de almacenamiento entre muestreos (g PSLC m^{-2}) por el número de días transcurridos.
12. Calcular la tasa de renovación (R , en d^{-1}) de la MOPG del lecho como el cociente entre la entrada total de MOPG (E) y la acumulación media de MOPG bentónica (B) en el período considerado (por ejemplo, un año).
13. Si se aplica la tasa de descomposición, k , de un componente de la MOPG a su acumulación media en el lecho en un período determinado (por ejemplo, un año), las salidas por descomposición se calculan como:

$$S_D = Bk \quad (10.10)$$

14. Asimismo, se puede calcular la eficiencia de utilización de la MOPG que ingresa desde el bosque ripario:

$$D = S_D / (E_v + E_L) \quad (10.11)$$

15. Resumir los cálculos del balance para un determinado período (por ejemplo, un año) (cuadro 10.3).

La macro 10.3 permite establecer un balance de materia orgánica a nivel de tramo

La eficiencia de utilización indica la capacidad que tiene el río para descomponer el material orgánico que recibe

Entradas	Verticales Laterales Transporte Total	g PSLC m ⁻² a ⁻¹ g PSLC m ⁻² a ⁻¹ g PSLC m ⁻² a ⁻¹ g PSLC m ⁻² a ⁻¹
Acumulación en el lecho	Stock medio	g PSLC m ⁻²
Salidas*	Procesado Transporte Total	g PSLC m ⁻² a ⁻¹ g PSLC m ⁻² a ⁻¹ g PSLC m ⁻² a ⁻¹

Cuadro 10.3:
Balance anual de MOPG

* Las salidas por transporte podrían calcularse por diferencia, si se ha medido la descomposición y se considera que el sistema está en equilibrio.

10.2. Bibliografía

- ABELHO M. «From litterfall to breakdown in streams: A review». *The Scientific World* 1 (2001): 656-680.
- BÄRLOCHER F. «Leaching». En M.A.S. Graça F.B., y M.O. Gessner, eds. *Methods to study litter decomposition: A practical guide*. Dordrecht: Springer, 2005: 33-36.
- BILBY R.E., y LIKENS G.E. «Importance of organic debris dams in the structure and function of stream ecosystems». *Ecology* 6 (1980): 1107-1113.
- CEBRIÁN J. «Patterns in the fate of production in plant communities». *The American Naturalist* 154 (1999): 449-468.
- CUMMINS K.W., SEDELL J.R., y SWANSON F.J. «Organic matter budgets for stream ecosystems: Problems in their evaluation». En J.R. Barnes, y G.W. Minshall, eds. *Stream ecology: Application and testing of general ecological theory*. Nueva York: Plenum Press, 1983: 299-353.
- DÍEZ J.R., ELOSEGI A., y POZO J. «Woody debris in north iberian streams: Influence of geomorphology, vegetation and management». *Environmental Management* 28 (2001): 687-698.
- DÍEZ J.R., LARRAÑAGA S., ELOSEGI A., y POZO J. «Effect of removal of wood on streambed stability and retention of organic matter». *Journal of the North American Benthological Society* 19 (2000): 621-632.
- ELOSEGI A., DÍEZ J., y POZO J. «Contribution of dead wood to the carbon flux in forested streams». *Earth Surface Processes and Landforms* 32 (2007): 1219-1228.
- ELOSEGI A., y POZO J. «Litter input». En M.A.S. Graça, y M.O. Gessner, eds. *Methods to study litter decomposition: A practical guide*. Dordrecht: Springer, 2005: 3-12.
- GOLLADAY S.W., WEBSTER J.R., y BENFIELD E.F. «Changes in stream benthic organic matter following watershed disturbance». *Holarctic Ecology* 12 (1989): 96-105.
- GONÇALVES J.F.J., FRANÇA J.S., y CALLISTO M. «Dynamics of allochthonous organic matter in a tropical Brazilian headstream». *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49 (2006): 967-973.
- GONZÁLEZ E., y POZO J. «Longitudinal and temporal patterns of benthic coarse particulate organic matter in the Agüera stream (Northern Spain)». *Aquatic Sciences* 58 (1996): 355-366.
- GRAÇA M.A.S., BÄRLOCHER F., y GESSNER M.O., eds. *Methods to study litter decomposition: A practical guide*. Dordrecht: Springer, 2005.
- GREGORY S.V., BOYER K.L., y GURNELL A.M., eds. *The ecology and management of wood in world rivers*. Bethesda: American Fisheries Society, 2003.
- HALL R.O.J., WALLACE J.B., y EGGERT S.L. «Organic matter flow in stream food webs with reduced detrital resource base». *Ecology* 81 (2000): 3445-3463.

- HARMON M.E., FRANKLIN J.F., SWANSON F.J., SOLLINS P., GREGORY S.V., LATTIN J.D., ANDERSON N.H., CLINE S.P., AUMEN N.G., SEDELL J.R., LIENKAEMPER G.W., CROMACK K., y CUMMINS K.W. «Ecology of coarse woody debris in temperate ecosystems». *Advances in Ecological Research* 15 (1986): 133-302.
- HAUER F.R., y LAMBERTI G.A., eds. *Methods in stream ecology*. San Diego: Academic Press, 2007.
- IRONS J.G., y OSWOOD M.W. «Organic matter dynamics in 3 subarctic streams of interior Alaska, USA». *Journal of the North American Benthological Society* 16: 23-28, 1997.
- LAMBERTI G.A., y GREGORY V. «Transport and retention of CPOM». En F.R.H. Lamberti, ed. *Methods in stream ecology*. San Diego: Academic Press, 1996: 217-229.
- LARRAÑAGA S., DíEZ J.R., ELOSEGI A., y POZO J. «Leaf retention in streams of the Agüera basin (Northern Spain)». *Aquatic Sciences* 65 (2003): 158-166.
- MATHURIAU C., THOMAS A.G.B., y CHAUVET E. «Seasonal dynamics of benthic detritus and associated macroinvertebrate communities in a neotropical stream». *Fundamental and Applied Limnology* 171 (2008): 323-333.
- MINSHALL G.W. «Role of allochthonous detritus in the trophic structure of a woodland springbrook community». *Ecology* 48 (1967): 139-149.
- MOLINERO J., y POZO J. «Impact of a eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill.) plantation on the nutrient content and dynamics of coarse particulate organic matter (CPOM) in a small stream». *Hydrobiologia* 528 (2004): 143-165.
- MULHOLLAND P.J. «Organic matter dynamics in the west fork of Walker Branch, Tennessee, USA». *Journal of the North American Benthological Society* 16 (1997): 61-67.
- NAIMAN R.J., DÉCAMP H., y MCCLAIN M.E. *Riparia: Ecology, conservation, and management of streamside communities*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005.
- NAIMAN R.J., y LINK G.L. «Organic matter dynamics in 5 subarctic streams, Québec, Canada». *Journal of the North American Benthological Society* 16 (1997): 33-39.
- NEWBOLD J.D., ELWOOD J.W., O'NEILL R.V., y VAN WINKLE W. «Measuring nutrient spiralling in streams». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38 (1981): 860-863.
- POZO J. «Leaf litter processing of alder and eucalyptus in the Agüera stream system (North Spain) I. Chemical changes». *Archiv für Hydrobiologie* 127 (1993): 299-317.
- POZO J. «Coarse particulate organic matter budgets». En M.A.S. Graça, F. Bärlocher, y M.O. Gessner, eds. *Methods to study litter decomposition: A practical guide*. Dordrecht: Springer, 2005: 43-50.
- POZO J., y ELOSEGI A. «Coarse benthic organic matter». En M.A.S. Graça, F. Bärlocher, y M.O. Gessner, eds. *Methods to study litter decomposition: A practical guide*. Dordrecht: Springer, 2005: 25-32.
- POZO J., GONZÁLEZ E., DíEZ J.R., MOLINERO J., y ELOSEGI A. «Inputs of particulate organic matter to streams with different riparian vegetation». *Journal of the North American Benthological Society* 16 (1997a): 602-611.
- POZO J., GONZÁLEZ E., DíEZ J.R., y ELOSEGI A. «Leaf-litter budgets in two contrasting forested streams». *Limnetica* 13 (1997b): 77-84.
- SABATER S., BERNAL S., BUTTURINI A., NIN E., y SABATER F. «Wood and leaf debris input in a Mediterranean stream: The influence of riparian vegetation». *Archiv für Hydrobiologie* 153 (2001): 91-102.
- SMOCK L.A. «Spatial and temporal variation in organic matter storage in low-gradient, headwater streams». *Archiv für Hydrobiologie* 118 (1990): 169-184.
- TREADWELL S.A., CAMPBELL I.C., y EDWARDS R.T. «Organic matter dynamics in Keppel Creek, Southeastern Australia». *Journal of the North American Benthological Society* 16 (1997): 58-61.
- VANNOTE R.L., MINSHALL G.W., CUMMINS K.W., SEDELL J.R., y CUSHING C.E. «The river continuum concept». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37 (1980): 130-137.

- WALLACE J.B., WHILES M.R., EGGERT S., CUFFNEY T.F., LUGTHART G.J., y CHUNG K. «Long-term dynamics of coarse particulate organic matter in three Appalachian Mountain streams». *Journal of the North American Benthological Society* 14 (1995): 217-232.
- WALLACE J.B., EGGERT S.L., MEYER J.L., y WEBSTER J.R. «Effects of resource limitation on a detrital-based ecosystem». *Ecological Monographs* 69 (1999): 409-442.
- WEBSTER J.R., COVICH A.P., TANK J.L., y CROCKETT T.V. «Retention of coarse organic particles in the Southern Appalachian Mountains». *Journal of the North American Benthological Society* 13 (1994): 140-150.
- WEBSTER J.R., GOLLADAY S.W., BENFIELD E.F., D'ANGELO D.J., y PETERS G.T. «Effects of forest disturbance on particulate organic matter budgets of small streams». *Journal of the North American Benthological Society* 9 (1990): 120-140.
- WEBSTER J.R., y MEYER J.L. «Stream organic matter budgets». *Journal of the North American Benthological Society* 16 (1997): 3-4.
- WETZEL R.G. *Limnology: Lake and river ecosystems*. San Diego: Academic Press, 2001.
- YOUNG S.A., KOVALAK W.P., y DEL SIGNORE K.A. «Distances travelled by autumn leaves introduced into a woodland stream». *American Midland Naturalist* 100 (1978): 217-222.

La biota de los ríos: los microorganismos heterotróficos

ANNA M. ROMANÍ, JOAN ARTIGAS, ANTONIO CAMACHO,
MANUEL A.S. GRAÇA Y CLÁUDIA PASCOAL

11.1. Introducción

En los ecosistemas fluviales se pueden encontrar microorganismos heterótrofos tanto en el bentos como en el plancton. En el bentos, las bacterias, hongos y protozoos, juntamente con algas y cianobacterias, y dentro de una matriz mucilaginoso de polisacáridos y proteínas, forman el biofilm, que se desarrolla sobre los distintos sustratos del lecho (piedras, rocas, granos de arena, limo, hojarasca, macrófitos, madera). En arroyos de orden 1 a 4, la comunidad bentónica microbiana es la principal responsable de procesar la materia orgánica, siendo su biomasa mucho más significativa que la planctónica (Pusch et al. 1998). En ríos mayores (orden 5-8) se desarrolla una comunidad planctónica en la que encontramos bacterias, ciliados y flagelados.

Las bacterias bentónicas colonizan especialmente rocas, cantos rodados y sedimentos blandos. La densidad y diversidad de bacterias se ve afectada por múltiples factores, tanto químicos y físicos (disponibilidad de materia orgánica, temperatura, nutrientes, tamaño de grano del sedimento, oxígeno) como biológicos (desarrollo de la comunidad algal, actividad bacterívora de protozoos). Las bacterias pueden llegar a representar hasta un 10% del total de la biomasa microbiana bentónica en condiciones de luz (donde la mayor parte de la biomasa es algal), y hasta un 70% en el sedimento hiporreico. La densidad de bacterias en el bentos fluvial varía entre 10^6 - 10^9 células por cm^2 , y en el plancton entre 10^4 - 10^6 células por mL. La diver-

Entre los microorganismos heterotróficos de sistemas fluviales se cuentan bacterias, hongos y protozoos

sidad de la comunidad bacteriana y la variedad de sus capacidades metabólicas le otorgan un papel clave en los procesos ecológicos fluviales.

La forma de vida de los hongos acuáticos es muy distinta de la de las bacterias, ya que forman filamentos (hifas) y se reproducen mediante esporas. Los hongos acuáticos crecen preferiblemente sobre sustratos orgánicos (hojas, ramas, madera), llegando hasta el 90% de la biomasa microbiana en la hojarasca (mientras que las bacterias pueden representar sobre esos sustratos un 10% de la biomasa microbiana). Los hongos acuáticos más estudiados y más relevantes desde el punto de vista ecológico son los hifomicetos. Éstos desempeñan un papel fundamental en la descomposición de la materia orgánica de los ríos (Pascoal y Cássio 2008). Los hifomicetos acuáticos son conocidos por producir un elevado número de esporas (conidios), lo que contribuye a su dispersión y colonización en ambientes acuáticos (Gessner et al. 2003). Las extremidades de los conidios de los hifomicetos acuáticos producen mucílago que facilita la adhesión sobre los sustratos que colonizan y descomponen, en particular hojas provenientes de la vegetación ripariana (Gessner et al. 2007).

Los hongos y las bacterias son los principales descomponedores de materia orgánica de los ríos. Además hay numerosos microorganismos patógenos

Tanto bacterias como hongos realizan la crucial función de reciclar el material orgánico que entra en el ecosistema, ya sea éste de origen autóctono (producción primaria en el lecho del río) como alóctono (material de origen terrestre, hojarasca, ramas, madera). Estos microorganismos sintetizan enzimas extracelulares capaces de descomponer las moléculas orgánicas complejas y de gran tamaño, para incorporarlas en su organismo como fuente de C, N y P. En general, los hongos tienen mayor capacidad para descomponer material vegetal complejo como la celulosa y la lignina (enzimas celulolíticas y ligninolíticas como la celobiohidrolasa y la peroxidasa). Gracias a esta capacidad, los hongos rompen los tejidos vegetales y colonizan fácilmente el material vegetal y la hojarasca. En cambio, las bacterias tienen una mayor capacidad para descomponer polisacáridos simples y péptidos (enzimas polisacáridicos y peptídicos como la β -glucosidasa y las peptidasas) (Romaní et al. 2006). El proceso de descomposición microbiana por hongos y bacterias es esencial para la posterior utilización del material por parte de los macroinvertebrados. Además de su importante papel ecológico, algunos microorganismos fluviales adquieren relevancia como agentes patógenos. Entre los microorganismos causantes de enfermedades los hay autóctonos, como *Legionella*, pero la gran mayoría son consecuencia de la contaminación fecal (como virus, bacterias y protozoos parásitos). La monitorización de la concentración de agentes patógenos es esencial para el control de la calidad del agua y su potencial efecto infeccioso para la salud humana.

En este capítulo se describen algunas de las técnicas básicas que pueden permitir estudiar la estructura y el funcionamiento de las comunidades de bacterias y hongos fluviales. Se incluyen dos técnicas básicas de análisis de biomasa bacteriana y fúngica (técnica 22 y técnica 23), y otras dos técnicas adecuadas para el análisis de

la diversidad microbiana (técnica 24 y técnica 25). Como medida de la actividad de estos microorganismos y su papel en el ecosistema fluvial se incluyen la tasa de esporulación en hongos (técnica 26) y las medidas de las actividades enzimáticas extracelulares (técnica 27). Estas técnicas permiten entender aspectos cruciales de la ecología microbiana en los sistemas fluviales. Sin embargo, no se han incluido en este capítulo otras técnicas, tales como la medida de producción microbiana mediante la incorporación de acetato, glucosa, timidina o leucina marcados radiativamente (técnicas que pueden hallarse en multitud de manuales específicos), ni técnicas microscópicas que permiten el análisis de la arquitectura de la comunidad microbiana bentónica, como sería el uso de la microscopia confocal o de rastreo.

11.2. Toma de muestras de microorganismos heterotróficos fluviales

Para evitar la contaminación, la toma de muestras para el estudio de microorganismos heterótrofos debe realizarse utilizando material previamente esterilizado (lavado con etanol al 96% y agua Milli-Q o autoclavado). Por lo que respecta al muestreo y procesado de las muestras, podemos distinguir entre los microorganismos planctónicos y bentónicos. En función del estudio y de las características del río, interesará la comunidad microbiana planctónica o bien la bentónica. Dentro de un mismo tramo fluvial, las condiciones ambientales de corriente, oxigenación y luz pueden variar entre microhábitats y afectar significativamente a la biomasa, diversidad o actividad metabólica de la comunidad microbiana. El cuadro 11.1 resume las técnicas básicas de muestreo, que se concretan más adelante en cada técnica específica.

El muestreo de microorganismos debe hacerse con material estéril

Hábitat	Método de muestreo
Agua fluvial (comunidad planctónica)	Recoger un volumen de agua en viales de vidrio estériles
Rocas, cantos, guijarros (comunidad epilítica)	Sustratos artificiales de vidrio o cerámica de 1-4 cm ² , incubados en el río durante un mínimo de 6-8 semanas Rascar una superficie conocida mediante bisturí o cepillo previamente esterilizados con etanol y agua Milli-Q
Grava, arena, limo (comunidad epipsámica)	Corers de arena (tubo de metacrilato o polietileno de 2-6 cm de diámetro), submuestras (de aproximadamente 1-2 mL) con una jeringa cortada en su extremo Para el sedimento blando, pipeta de vidrio de 10 mL con soporte tipo embudo de goma en su extremo. Se recoge un volumen de material equivalente a una superficie de sedimento conocida
Hojarasca	Recoger hojarasca y cortar con un sacabocados (fig. 11.3, técnica 23) una superficie conocida de hoja (1-4 cm ²)
Macrófitas (comunidad microbiana epifítica)	Recoger una fracción de macrófitas, ocupando un área conocida de río.

Cuadro 11.1:
Procedimiento de muestreo para la comunidad microbiana en distintos hábitats fluviales

Técnica 22. Densidad y biomasa de bacterias fluviales

Para muestras planctónicas, el método más comúnmente utilizado es la tinción de una muestra líquida con DAPI (4,6-diamidino-2 fenilindol), la filtración con filtros de 0,2 μm de color negro y la observación y conteo con el microscopio de epifluorescencia (Porter y Feig 1980). Para muestras bentónicas, el método requiere primero separar las bacterias del sustrato y obtener una muestra homogénea en suspensión. El DAPI tiñe todo el DNA, el de células activas y no activas. Actualmente existen técnicas alternativas que permiten distinguir las bacterias activas de las inactivas o muertas, como se indica al final de la técnica.

MATERIAL Y PREPARACIÓN

- Viales de vidrio de 15-30 mL limpios con ácido, mejor si son autoclavados, especialmente para las muestras de agua (o viales estériles de poliuretano tipo Falcon de 15 mL).
- Material específico para muestreo en función de las muestras a recoger (cuadro 11.1).
- Equipo de filtración previamente autoclavado.
- Agua destilada Milli-Q autoclavada (100-200 mL).
- Micropipetas automáticas y puntas de pipeta autoclavadas.
- Filtros Whatman GF/C de 1,4 μm de diámetro de poro.
- Filtros de nailon, de 0,2 μm de diámetro de poro.
- Filtros negros de policarbonato, de 0,2 μm de diámetro de poro.
- Aceite de inmersión de baja fluorescencia (por ejemplo, de Panreac o Leica).
- DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol). Se pueden guardar soluciones madre de DAPI de 0,1 mg/mL en el congelador (mejor guardar pequeños volúmenes, 5-20 mL, para evitar que se degrade cada vez que lo descongelamos para ser utilizado). La luz y el calor hacen perder fluorescencia al DAPI.
- Portaobjetos y cubreobjetos para montar las preparaciones.
- Pinzas.
- Formol al 40%.
- Microscopio de epifluorescencia equipado con filtro UV, excitación 340-380 nm.

PROCEDIMIENTO

Toma de muestras

1. Muestrear según se indica en el cuadro 11.1. Las muestras bentónicas se guardan en agua del río filtrada por filtros de nailon de 0,2 μm para evitar contaminar la muestra con bacterias planctónicas, con un volumen suficiente para que queden cubiertas. Para las muestras planctónicas será suficiente un volumen de 20 mL.

2. Fijar las muestras bentónicas o planctónicas con formol al 2% y guardar en viales herméticos estériles. Las muestras se guardan en la oscuridad hasta su preparación y conteo.

Extracción de la muestra

Para todas las muestras bentónicas será necesario obtener una suspensión previamente a la tinción y, por ello, tendremos que extraer la comunidad microbiana adherida al sustrato. En función del tipo de muestra (grosor del biofilm, material muy/poco adherido al sustrato) se pueden utilizar distintos métodos de separación:

Los microorganismos se separan del sustrato mediante sonicación, raspado o adición de pirofosfato

- a) *Sonicación*. Las muestras se sonicán en un baño de ultrasonidos (40 W de potencia y frecuencia de ultrasonidos de 40 kHz). Sonicar dos veces sucesivas, dos minutos cada vez. Un tiempo más largo de sonicación podría producir la ruptura de las células bacterianas. Durante la sonicación hay que mantener las muestras refrigeradas en hielo. En caso de arenas y limos puede ser necesario dejar sedimentar la muestra unos minutos para disminuir el contenido de partículas que puedan interferir en la observación y conteo (fluorescencia amarilla). En este caso, el tiempo de sedimentación debe ser siempre igual para todas las muestras del estudio, que permita optimizar al máximo la visión en el conteo pero sin perder bacterias.
- b) *Raspado de la muestra* con un «raspador celular» (*cell scraper*) estéril para obtener una suspensión del biofilm. El raspado se puede combinar con la sonicación para la correcta extracción de la muestra del sustrato.
- c) *Adición de pirofosfato sódico* hasta una concentración final de 0,05 mmol/L y dejarla reposar durante 30 minutos. El pirofosfato sódico disgrega la muestra y evita la formación de agregados, facilitando el posterior conteo.

Estos tres métodos se pueden combinar. Es importante utilizar para un estudio siempre el mismo método de extracción de la muestra del sustrato. La eficiencia de extracción se debe comprobar mediante técnicas microscópicas (por ejemplo, microscopía óptica y microscopía electrónica de rastreo).

Alternativamente, y para muestras de comunidades muy delgadas sobre sustratos artificiales, se puede teñir directamente el sustrato. Este procedimiento permite, además, identificar la posición de las bacterias en la comunidad bentónica y su distribución en la superficie.

Tinción y preparación de la muestra para su observación al microscopio

1. *Dilución*. Es posible que sea necesario diluir la mayoría de las muestras previamente a la tinción con DAPI. La dilución debe hacerse con agua Milli-Q (o agua del río filtrada por 0,2 μm de poro) autoclavada. Habitualmente las

muestras de arena y sedimento se diluyen entre diez y cien veces, las muestras sobre piedras, hojarasca o macrófitos se diluyen de cinco a diez veces. Hay que determinar la dilución adecuada y decidir el factor de dilución para todas las muestras del estudio. Es recomendable tomar un volumen de la suspensión y diluir hasta un volumen final de 5 mL.

2. *Tinción.* Las submuestras diluidas se tiñen con $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DAPI (añadir $100 \mu\text{L}$ de la solución madre concentrada de DAPI al volumen de 5 mL) durante 10 minutos.
3. *Filtración.* La suspensión teñida se filtra con filtros negros de $0,2 \mu\text{m}$ de poro y a baja presión de vacío (unos 180 mmHg). Para proteger el filtro negro, que es muy delgado y se rompe con facilidad, se puede colocar debajo del mismo un filtro Whatman GF/C o de policarbonato.
4. *Preparación de la muestra.* El filtro negro con la muestra ya teñida se coloca sobre un portaobjetos al que previamente se ha añadido una gota de aceite de inmersión. Posteriormente se añade otra gota de aceite de inmersión encima del filtro y se coloca el cubreobjetos procurando que el filtro negro quede plano para su correcta observación. Las preparaciones se pueden guardar congeladas durante dos o tres meses sin pérdida significativa de fluorescencia, aunque es preferible contarlas de inmediato.

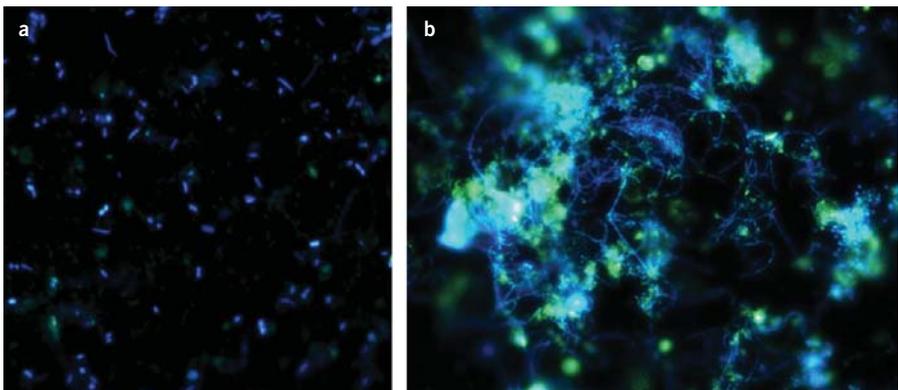
El conteo bacteriano requiere la tinción con DAPI y observación al microscopio de fluorescencia

Conteo

1. *La tinción de DAPI* permite diferenciar las bacterias en color azul claro sobre el fondo negro del filtro mediante el microscopio de fluorescencia (filtro UV-2A, Ex. 330-380 nm; véase fig. 11.1). Las muestras se cuentan a 1000 o 1250 aumentos, con objetivo de inmersión. Habitualmente se cuentan unos 20-40 campos para cada filtro, hasta un total de 400-1500 organismos. Es práctico disponer de cuadrícula en el ocular para facilitar el conteo. Si se tiene un sistema

Figura 11.1:

Bacterias teñidas con DAPI. Se pueden observar formas muy distintas: cocos, bacilos y filamentos



Nota: a) Muestra suficientemente diluida y disgregada para ser contada. b) Muestra con agregados, filamentos y material detrítico (amarillo-verdoso), que dificulta su conteo.

de análisis de imágenes se pueden fotografiar las muestras y realizar el conteo automáticamente. Para ello las muestras deberán ser muy claras, lo que resulta complicado con comunidades bentónicas.

2. *El cálculo de la densidad bacteriana se realiza aplicando los factores de dilución, volumen total de la muestra, volumen de la submuestra, superficie o volumen correspondiente de muestra recogida al campo, superficie total de filtro ocupada por la muestra (a partir del diámetro de la columna de filtración), superficie de filtro contada, y aumentos en el microscopio.*

La macro 11.1 permite calcular la densidad y biomasa bacterianas

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de bacterias}}{\text{cm}^2} = \frac{n(A/at)d(Vm/Vf)}{S} \quad (11.1)$$

donde n : número total de bacterias contadas por filtro, A : área de filtración (un poco menor que la total de filtro y calculada a partir del diámetro de la columna de filtración), at : área de filtro contada (equivalente al número de campos contados por la superficie contada de cada campo), d : factor de dilución, Vm : volumen total de muestra, Vf : volumen de la submuestra teñida y filtrada, y S : superficie de la muestra de campo.

CÁLCULO DE LA BIOMASA BACTERIANA

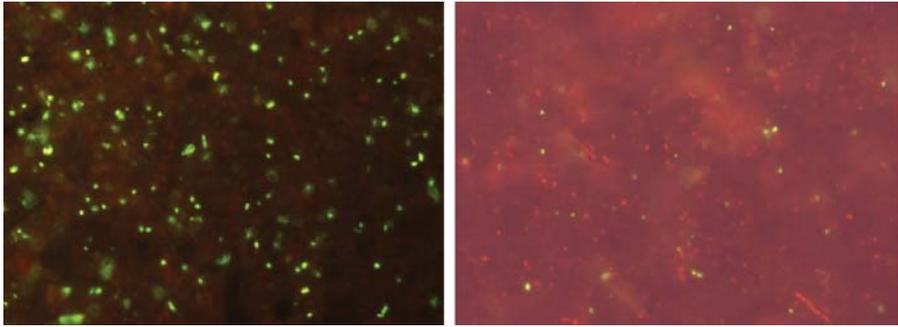
La biomasa bacteriana se calcula a partir de las densidades y del tamaño de las distintas formas observadas, que se aproximan a la correspondiente figura geométrica. En general se calculan biovolúmenes considerando los cocos como esferas, los filamentos como cilindros y los bacilos como cilindros con extremos semi-esféricos. El cálculo final de biomasa bacteriana se efectúa a partir del biovolumen y de la densidad de cada forma bacteriana observada utilizando la relación alométrica de Norland (Norland 1993) y un factor de conversión. Entre éstos, el más utilizado es el $2,2 \cdot 10^{-13} \text{ g C } \mu\text{m}^{-3}$ (Bratbak y Dundas 1984). El cálculo de la biomasa también se puede realizar de forma mucho más tosca, considerando un biovolumen medio de $0,1 \mu\text{m}^3$ por célula bacteriana. Este cálculo permite obtener un valor aproximado de $\mu\text{g C}$ bacteriano por cm^2 , interesante sobre todo cuando se está trabajando con distintos niveles tróficos.

BACTERIAS ACTIVAS/INACTIVAS

Entre un 20-70% de las bacterias pueden ser metabólicamente inactivas o estar lesionadas o muertas. Por ello, en muchas ocasiones puede ser revelador para el funcionamiento del ecosistema conocer la proporción de bacterias vivas y muertas (Freese et al. 2006). Las bacterias vivas se pueden medir mediante una doble tinción que consiste en una mezcla de 3,34 mM de SYTO® 9 (que tiñe todas las células) y 20 mM de yoduro de propidio (que penetra en las células que tienen

Figura 11.2:

Observación de bacterias epilíticas fluviales con la doble tinción de SYTO® 9 y yoduro de propidio. Izquierda, en verde claro, bacterias vivas. Derecha, con coloración roja, bacterias muertas



las membranas rotas). Cuando se excita la muestra teñida con luz azul, las células vivas, con membranas celulares intactas, aparecen verdes, y las muertas tienen coloración roja. La muestra (obtenida de la misma manera que para la tinción con DAPI) se tiñe con la mezcla 1:1 de SYTO® 9 y yoduro de propidio durante 15 minutos. Las muestras se filtran a través de filtros negros de policarbonato de 0,2 µm de poro como los utilizados para el DAPI y se preparan para la observación al microscopio de epifluorescencia.

Hay varios métodos para distinguir las bacterias vivas de las muertas

Las bacterias activas también se pueden detectar midiendo la actividad respiratoria (actividad del sistema de transporte de electrones, ETS, *electron transport system*). Ésta se determina mediante la reducción de CTC (cloruro de 5-ciano-2,3 ditolil tetrazolio) en su forma fluorescente (Rodríguez et al. 1992). Sin embargo, no todas las bacterias son capaces de reducir el CTC, que puede ser dañino para las bacterias. Las medidas a nivel celular (como la *microautorradiografía*, MAR; o la *hibridación in situ*, FISH), aunque mucho más caras, son métodos potentes y sensibles que pueden combinarse con los métodos clásicos de conteo mediante fluorescencia para una mejor detección de la biomasa bacteriana activa (Smith y Del Giorgio 2003).

Técnica 23. Biomasa de hongos

La determinación de biomasa fúngica puede hacerse midiendo el contenido en ergosterol

El *ergosterol* es una molécula que se encuentra en la membrana celular de los hongos, cuya función es estructurar e impermeabilizar los lípidos de membrana, como hace el colesterol en células animales. Existe una buena correlación entre la concentración de ergosterol y la biomasa de hongos (Stahl y Parkin 1996). La determinación de la biomasa fúngica mediante el análisis de ergosterol, descrita por Gessner y Schmitt (1996), se basa en una extracción de los lípidos y una separación del ergosterol mediante cromatografía líquida; el ergosterol se mide por absorbancia. La extracción de lípidos se puede realizar mediante extracción en

fase sólida (como se describe en este protocolo) o alternativamente mediante separación con ciclohexano (Davis y Lamar 1992).

MATERIAL

Material para el muestreo en el campo

- Sacabocados metálico (diámetro 1-2 cm).
- Papel de filtro.
- Viales de polietileno (20-100 mL).

Material y equipamiento de laboratorio

- Liofilizador.
- Tubos de ensayo de cristal resistentes a la presión (40 mL).
- Baño termostático (hasta 100 °C) con agitador para tubos.
- Baño de ultrasonidos (sonicador).
- Sistema de vacío para extracción en fase sólida.
- Bomba de vacío.
- Cartuchos para la extracción en fase sólida (por ejemplo de Waters Sep-Pack® Vac RC, 500 mg, tC18).
- Aparato de cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Éste debe constar de bomba, inyector, detector de UV programado para lectura a 282 nm y ordenador para almacenamiento de datos.
- Columna para HPLC (RP 18, 250 × 4,6 mm). La utilización de precolumna es opcional, si bien alarga la vida de la columna.
- Viales para HPLC.
- Material de cristal (matraces, vasos de precipitados).
- Pipetas.

Productos químicos

- Metanol (CH₃OH, calidad analítica o para HPLC).
- Isopropanol (C₃H₈O, calidad analítica o para HPLC).
- Hidróxido de potasio (KOH, en lentejas, calidad analítica).
- Ácido clorhídrico (HCl, calidad analítica).
- Estándar de ergosterol (C₂₈H₄₄O, pureza > 98%).

PROCEDIMIENTO

Toma de muestras

El análisis de ergosterol puede efectuarse sobre cualquier tipo de sustrato fluvial, si bien los hongos predominan en la hojarasca y éste es el sustrato habitual en la mayoría de estudios. El análisis de ergosterol en sustratos inorgánicos (arenas, piedra) es menos frecuente, aunque posible.

La hojarasca contiene la mayor parte de la biomasa de hongos

Figura 11.3:
Círculos de hoja y
sacabocados usado para
obtener los discos



1. Muestreo según cuadro 11.1. Las muestras de hoja y madera sumergidas deben ser lavadas con agua abundante para eliminar restos de material detrítico fino e invertebrados adheridos en la superficie.
2. Con el sacabocados, cortar círculos (aproximadamente 10 por muestra) y colocarlos encima del papel de filtro (fig. 11.3). Éste reduce ligeramente la cantidad de agua en la muestra.
3. Las muestras (círculos) se colocan en viales de plástico y son transportadas en frío (4 °C) hasta el laboratorio, donde se procede a su congelación (-80 °C). Las muestras deben protegerse de la luz, ya que el ergosterol puede sufrir degradación fotoquímica.

Extracción de lípidos y saponificación¹

1. Liofilizar las muestras y determinar el peso seco (PS).
2. Transferir las muestras a los tubos de ensayo y añadir 10 mL de KOH 0,14 M en metanol.
3. Tapar los tubos herméticamente e introducirlos en el baño caliente (80 °C) y en agitación durante 30 minutos.
4. Dejar enfriar las muestras a temperatura ambiente y sin luz. Transferir el extracto a un recipiente y lavar el sustrato con metanol (2 lavados de 10 mL cada uno = 30 mL extracto total) y sonicado (2 minutos en baño de ultrasonidos durante cada lavado) para una mayor recuperación.

Los lípidos se extraen
por saponificación

¹ En el caso de arenas y limos, los extractos de lípidos suelen ser más turbios y por esa razón deben ser filtrados (0,7 µm, filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F) antes de su paso por los cartuchos en fase sólida (Sep-Pack®).

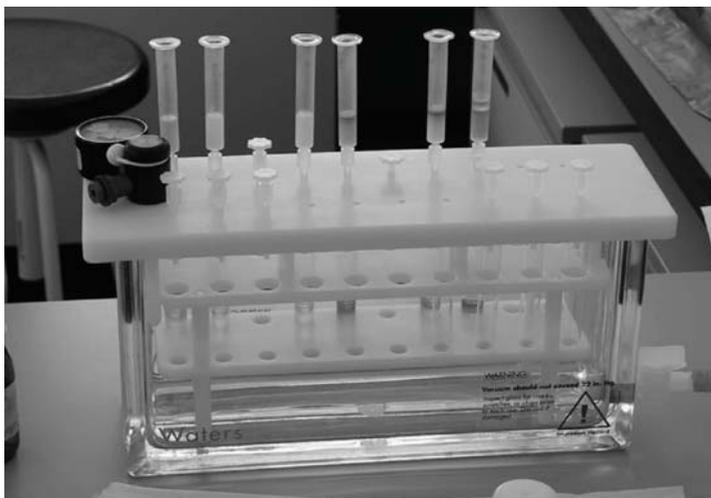


Figura 11.4:
Sistema de vacío para
extracción en fase sólida

Acondicionamiento de los cartuchos para extracción en fase sólida

1. Conectar los cartuchos y sus correspondientes válvulas al sistema de vacío; antes de iniciarlo las válvulas deben estar cerradas.
2. Añadir 7,5 mL de metanol en cada cartucho.
3. Accionar la bomba para generar vacío y abrir las válvulas. Mediante la regulación de las válvulas, se debe generar un flujo suave y constante del disolvente a través de la columna (fig. 11.4).
4. Añadir 7,5 mL de disolvente acondicionador acidificado (6 volúmenes de KOH 0,12 M en metanol + 1 volumen de HCl 0,75 M). Asegurar que el pH de la solución es < 3.
5. Cerrar las válvulas y la bomba cuando quede 1 mL de disolvente acondicionador por encima del material empaquetado dentro de la columna. Es muy importante no dejar secar la columna durante este proceso; de no ser así, se debe reiniciar el acondicionamiento desde el punto 2 de este apartado.

Elución del extracto de lípidos a través de los cartuchos de extracción en fase sólida²

1. Añadir 5 mL de HCl 0,75 M al extracto de lípidos. Sólo si el pH de la muestra es < 3, el ergosterol podrá ser retenido y concentrado en la columna. Es importante calcular el volumen final del extracto.
2. Transferir el extracto de lípidos al cartucho y accionar la bomba. Abrir las vál-

² La capacidad de retención del ergosterol a través de las columnas en fase sólida se puede evaluar añadiendo una concentración conocida de ergosterol diluido en metanol (por ejemplo, estándar de 100 µg ergosterol mL⁻¹) en una columna adicional. Este extracto deberá ser procesado igual que el resto de muestras.

vulas de los cartuchos y regular la presión en el sistema de vacío hasta obtener un flujo aproximado de 1 mL min^{-1} .

- Una vez ha pasado todo el extracto a través de la columna, añadir 2,5 mL de KOH 0,4 M en metanol:H₂O (6:4, vol:vol) para proceder a su limpieza.
- Dejar secar la columna durante 60 minutos. Este proceso se puede agilizar generando un vacío máximo, abriendo las válvulas y conectando la bomba.

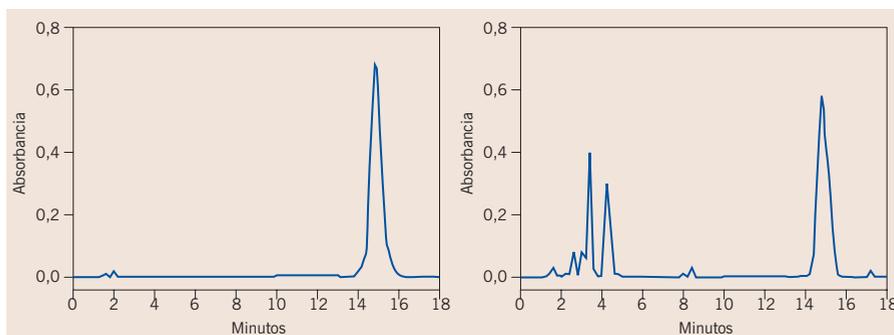
Elución del ergosterol

- Colocar viales para HPLC (prepesados) en la salida de cada una de las válvulas dentro del sistema de vacío.
- Accionar la bomba y aplicar el vacío en el sistema.
- Añadir 1,6 mL de isopropanol a los cartuchos y eluir a un flujo aproximado de 1 mL min^{-1} .
- Eliminar el vacío en el sistema de manera progresiva (no bruscamente) y retirar los viales. Pesar los viales y cerrar con su tapón correspondiente. El volumen de muestra en el vial se calcula considerando δ isopropanol = $0,79 \text{ g cm}^{-3}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Análisis con el HPLC

- Las cromatografías deben seguir la siguiente configuración:
 - Fase móvil: 100% metanol.
 - Flujo de la fase móvil: $1,4 \text{ mL min}^{-1}$
 - Temperatura de la columna: $33 \text{ }^\circ\text{C}$.
 - Longitud de onda de detección: 282 nm.
 - Volumen de inyección de muestra: $10 \text{ } \mu\text{L}$.
- El análisis de las muestras debe ir acompañado de una curva patrón (concentraciones de 0 a $200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) de ergosterol en isopropanol. Es aconsejable analizar los patrones en primer lugar y a continuación las muestras. Para una mayor exactitud en los resultados, cada muestra puede ser inyectada y analizada dos veces (configurar en cromatograma).

Figura 11.5:
Cromatogramas de un patrón de ergosterol (arriba) y de un extracto de lípidos de hojas de *Platanus acerifolia* recogidas en un río (abajo)



La instalación de una precolumna en el sistema de HPLC puede retrasar el tiempo de retención del pico de ergosterol, como se observa en estos cromatogramas (aproximadamente 14 minutos).

Sustrato	Ergosterol (μg ergosterol/g PS)	Referencia
Hojas		
<i>Fraxinus excelsior</i>	800-900	Gessner y Chauvet (1994)
<i>Alnus glutinosa</i>	575-600	Gessner y Chauvet (1994)
<i>Corylus avellana</i>	500-600	Gessner y Chauvet (1994)
<i>Quercus ilex</i>	300-400	Gessner y Chauvet (1994)
Madera		
<i>Fagus sylvatica</i>	50-60	Hendel y Marxsen (2000)
Grava	40*	Artigas et al. (2004)

Cuadro 11.2:

Contenido de ergosterol en diferentes sustratos fluviales (hojas, madera y grava)

* El valor de ergosterol en la grava se expresa en μg ergosterol/g PSLC.

- Una vez obtenidos los cromatogramas, determinar la posición del pico de ergosterol mediante la comparación entre patrones y muestras (fig. 11.5). El tiempo de retención del ergosterol se sitúa alrededor de los 8 minutos. Medir el área y la altura de los picos.

La medida de ergosterol requiere el uso de HPLC

Cálculo de la biomasa de hongos

- La concentración de ergosterol en cada muestra se calcula a partir del volumen final del extracto y el peso seco o peso seco sin cenizas de la muestra de hoja o madera (por ejemplo, μg ergosterol/g PS). El peso seco sin cenizas de la muestra puede ser determinado una vez finalizado el proceso de extracción o mediante partes alícuotas de la muestra inicial. La concentración de ergosterol también se puede expresar en función de la superficie (cm^2) de sustrato analizada. El cuadro 11.2 recoge algunos valores de ergosterol en distintos tipos de sustrato y ríos.
- La concentración de ergosterol se transforma a biomasa de hongos (en g de carbono) aplicando los siguientes factores de conversión. Se considera que 5,5 mg de ergosterol se encuentran en 1 g de biomasa fúngica (Gessner y Chauvet 1993) y que un 43% de la biomasa fúngica es en forma de carbono (Baldy y Gessner 1997).

Técnica 24. Comunidad microbiana: métodos moleculares de estudio de la diversidad

En las últimas dos décadas se han desarrollado técnicas moleculares basadas en el análisis de la diversidad genética de los microorganismos, normalmente del operón ribosomal, que han permitido la evaluación detallada de la composición de las comunidades microbianas acuáticas (incluyendo organismos procariontas y eucariontas, sean autótrofos o heterótrofos). Para ello se toman muestras

Numerosas técnicas de biología molecular permiten evaluar la diversidad de comunidades microbianas

Cuadro 11.3:
Métodos moleculares más habituales para el estudio de la diversidad microbiana acuática

Fundamento	Pasos	Observaciones	Nombre de la técnica
Con amplificación del DNA (PCR)	Amplificación Clonaje	Secuenciación Comparación de secuencias en bases de datos (p.ej. EMBL, GenBank, etc.)	Clonaje y secuenciación (<i>random sequencing in clone libraries</i>)
	<i>Fingerprinting</i> Sin digestión enzimática del DNA	Separación electroforética	DGGE (<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>)
		Separación en función de la secuencia característica que determina la temperatura de desnaturalización	TGGE (<i>Temperature Gradient Gel Electrophoresis</i>)
		Se amplifica la región espaciadora entre los genes que codifican para la subunidad pequeña y grande del rRNA. Separación determinada por la longitud de los fragmentos amplificados	RISA/ARISA (<i>Ribosomal Intergenic Spacer Analysis</i>)
		Sin desnaturalización, movilidad determinada por estructura tridimensional. Separación en función de la secuencia característica	SSCP (<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>)
	<i>Fingerprinting</i> Con digestión enzimática del DNA	Digestión con enzimas de restricción	RFLP y (t)-RFLP (<i>terminal- Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
Sin amplificación del DNA	Fijación Hibridación con sondas fluorescentes de oligonucleótidos	Recuento microscópico o por citometría	FISH (<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>)
	Extracción del DNA Desnaturalización	Cinética de reasociación del DNA Se utiliza para comparar comunidades o la diversidad intracomunitaria a partir de extractos de DNA	Reasociación del DNA

Fuente: Adaptado de Dorigo et al. 2005.

de las comunidades cuya diversidad se desea estudiar, y se realiza una extracción y purificación del DNA, para proceder a la amplificación, utilizando la técnica de *reacción en cadena de la polimerasa* (PCR), de fragmentos seleccionados del operón ribosomal mediante el uso de cebadores específicos (*primers*) de las secuencias de este operón para los microorganismos cuya diversidad se pretende determinar. La elección de cebadores específicos puede ir dirigida a la detección de microorganismos de diversos niveles taxonómicos (desde cepas de una especie hasta reinos). Los fragmentos de DNA amplificados corresponden a los diferentes microorganismos presentes en la muestra cuyo DNA coincida con la secuencia de los cebadores utilizados para la secuencia génica diana. En una segunda etapa, se trata de determinar las variaciones en las secuencias del DNA amplificado, para con ello desvelar la diversidad microbiana. Este segundo paso puede realizarse de maneras diversas, bien mediante clonaje y secuenciación, que proporciona una caracterización completa de los fragmentos, o bien mediante una separación electroforética (con o sin digestión enzimática previa). Esta última proporciona una separación visual de la mezcla de DNA (*fingerprinting*) en función del polimorfismo en la secuencia (DGGE, TGGE, SSCP; véase cuadro 11.3) o de la longitud de los fragmentos (t-RFLP, AFLP, ARISA; véase cuadro 11.3). Dicha separación puede también ir seguida de una escisión y secuenciación de las bandas. A partir de las secuencias se pueden construir árboles filogenéticos que muestran la similitud de las secuencias dominantes en la comunidad microbiana, y con ello proporcionan una visión de su diversidad. En el cuadro 11.3 se señalan las principales características distintivas de cada una de estas técnicas. La más comúnmente utilizada es la *electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante* (DGGE), que se describe a continuación. Asimismo se incluye un breve resumen del protocolo de clonación, que está entre las técnicas más utilizadas y que ofrece una resolución taxonómica mayor (Zwart et al. 2002, Kowalchuk et al. 2004, Ausubel et al. 2008). Además de las técnicas basadas en la amplificación del DNA, existen otras técnicas moleculares independientes de dicha amplificación, tales como la hibridación in situ con marcadores fluorescentes (FISH) o los métodos de reasociación del DNA, que no se incluyen aquí.

Los protocolos detallados de estas técnicas moleculares aquí descritas pueden presentar numerosas variantes que deben ser adaptadas para cada estudio concreto.

MATERIAL

El material necesario para realizar cada uno de los pasos del proceso se señala en el cuadro 11.4. La preparación de las soluciones *stock* se describe en el apéndice A.1 (pág. 413).

Cuadro 11.4:
Material necesario para
cada uno de los pasos

	A	B	C	D	E	F	G	H
Botella de vidrio pyrex estéril	✓							
Nevera portátil	✓	✓						
Acumuladores de frío	✓	✓						
Nevera (4 °C)	✓	✓	✓	✓				
Tubos Eppendorf de 2 mL	✓	✓	✓	✓				
Equipo de filtración	✓							
Bomba de vacío	✓							
Pinzas	✓							
Filtro de nytal de 30 µm de poro	✓							
Filtro de policarbonato de 10 µm de poro	✓							
Filtro de policarbonato de 3 µm de poro	✓							
Filtro de policarbonato de 0,2 µm de poro	✓							
Etanol 96% para lavado de material	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Autoclave	✓	✓						
Recipientes estériles	✓	✓						
Congelador (-80 °C)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Cepillo		✓						
Ultracentrífuga para tubos Eppendorf			✓	✓				
Pipetas automáticas de 5, 40, 200 y 1000 µL			✓	✓	✓	✓	✓	✓
Puntas estériles para pipetas			✓	✓	✓	✓	✓	✓
Tijeras estériles			✓					
Sonicador			✓					
Hielo picado			✓	✓	✓	✓	✓	✓
Bolas (<i>beads</i>) de circonio/sílice de 0,5 mm de diámetro			✓	✓				
Soluciones <i>stock</i> de extracción y purificación*			✓	✓				
Isopropanol			✓	✓				✓
Etanol 70%			✓	✓				
Vortex o <i>beadbeater</i> (rompedor de células mediante agitación con bolas de vidrio)			✓	✓				
Baño termostatzado			✓	✓				
Estufa termostatzada de aire forzado			✓	✓				
Desecador			✓	✓				
Balanza de precisión				✓				
Tubos Falcon de 15 mL				✓				
Microespátula				✓	✓			
Espectrofotómetro					✓			
Tampón TE (Tris-EDTA)*					✓	✓	✓	
Microcubeta de cuarzo					✓			
Solución estándar de DNA					✓			
Agua Milli-Q						✓	✓	✓
Tubos de PCR						✓		
Tampón 10X						✓		
Solución de MgCl ₂						✓		
Solución <i>stock</i> de oligonucleótidos (10 mM)						✓		

	A	B	C	D	E	F	G	H
Cebadores (directo y reverso)						✓		
BSA 0,1%						✓		
Solución 5X de <i>enhancer</i> (solución de intensificación)						✓		
Polimerasa termoestable (p. ej. Taq polimerasa)						✓		
Termociclador						✓		
Horno microondas							✓	
Cubeta horizontal para electroforesis							✓	
Molde de metacrilato							✓	
Peine para preparar los pocillos							✓	✓
Transiluminador y protector visual contra UV							✓	✓
Agarosa (grado para electroforesis)							✓	
Solución <i>stock</i> 50X de tampón TAE (Tris/acetato/EDTA)*							✓	✓
Tampón de carga con y sin azul de bromocresol*							✓	✓
Marcador de tamaño de fragmentos de DNA							✓	✓
Solución de bromuro de etidio							✓	✓
Fuente de electroforesis							✓	✓
Pipetas automáticas y puntas de pipeta tipo Gelsaver típs, de 1-200 µL							✓	✓
Placas de vidrio para preparación del gel								✓
Espaciadores								✓
Grasa de silicona								✓
Marco de electroforesis								✓
Pinzas para el marco								✓
Generador de gradientes								✓
Bomba								✓
Sistema de electroforesis vertical								✓
Sistema de circulación de líquidos termostatzado								✓
Cámara fotográfica								✓
Pipeta Pasteur								✓
Papel Whatman para cromatografía								✓
Film transparente								✓
Detergente suave (tipo Decon 90 o similar)							✓	✓
Solución 40% de acrilamida:bisacrialmida*								✓
Solución de APS*								✓
Formamida								✓
TEMED								✓
Urea								✓
Glicerol								✓
Butanol								✓

Cuadro 11.4:

Material necesario para cada uno de los pasos (cont.)

A: Muestreo y procesado de muestra planctónica. B: Muestreo y procesado de muestra bentónica. C: Extracción y purificación del DNA de microorganismos planctónicos o de microorganismos bentónicos recogidos por raspado. D: Extracción y purificación del DNA de microorganismos embebidos en sedimentos. E: Cuantificación del DNA. F: Amplificación del DNA (PCR). G: Electroforesis en gel de agarosa. H: DGGE.

* Véase el apéndice A.1, en página 413.

Técnica 24a. Toma, procesado y conservación de muestras

MICROORGANISMOS PLANCTÓNICOS

Las muestras planctónicas se trasladan rápidamente al laboratorio para su filtrado o se filtran in situ. La recolección de los organismos para extraer su DNA puede realizarse o bien concentrando todos los organismos en una única filtración a través de un filtro de 0,2 μm de poro, o bien mediante filtración fraccionada. En la filtración fraccionada se busca retirar los microorganismos de mayor tamaño y concentrar los de las fracciones de menor tamaño, aunque los organismos que viven adheridos a partículas (inertes o no) quedan retenidos por el filtro que retiene las partículas a las que están adheridos. Se procede del modo siguiente:

1. Recogida de la muestra. Se toma una muestra de agua (1-2 L) en una zona central del cauce ligeramente por debajo de la superficie, o en otras partes del cauce si así se precisa.
2. Poner la muestra en un recipiente estéril (por ejemplo, una botella de vidrio Pyrex previamente esterilizada).
3. Trasladar la muestra al laboratorio (a 4 °C y en la oscuridad). Filtrar lo antes posible (siempre dentro de las primeras 24 horas). Para filtrar se utiliza un equipo de filtración previamente lavado con etanol y con agua destilada, y esterilizado. En el caso de la filtración secuenciada, se filtra la muestra primero a través de un filtro de nital de 30 μm de poro, y el filtrado se pasa consecutivamente a través de filtros de policarbonato de 10 μm , 3 μm , y 0,2 μm de poro. Todos los filtros se guardan en tubos Eppendorf de 2 mL (conservación a -80 °C).

Los microorganismos planctónicos se obtienen por filtración de la muestra

En el caso de no realizar fraccionamiento, la filtración completa de la muestra se realiza directamente a través del filtro de policarbonato de 0,2 μm de poro. La filtración no fraccionada tiene la ventaja de recoger todos los componentes de la comunidad, pero en ella se produce una rápida colmatación del filtro, que puede llevar a no detectar los componentes minoritarios de la comunidad. Se recomienda realizar varias filtraciones en diferentes filtros de policarbonato de 0,2 μm de poro y realizar la extracción del DNA de todos ellos.

MICROORGANISMOS BENTÓNICOS

Los microorganismos bentónicos se obtienen por centrifugado

Los microorganismos bentónicos se recogen de acuerdo con las indicaciones del cuadro 11.1. La muestra, sea de los sedimentos o del raspado de los materiales duros, se deposita en un tubo Eppendorf de 2 mL y se centrifuga, se retira el sobrenadante y se congela el *pellet*, o material sedimentado (preferiblemente a -80 °C) hasta el momento de la extracción del DNA.

Técnica 24b. Extracción, purificación y cuantificación del DNA

Los pasos principales a realizar consisten en la homogenización de la muestra, la disrupción celular para liberar el DNA y la eliminación de los componentes del extracto que no sean ácidos nucleicos (proteínas, polisacáridos, etc.). Alternativamente a la preparación de los reactivos a partir de sus componentes se puede recurrir a kits de extracción y purificación de DNA preparados comercialmente.

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DNA DE MICROORGANISMOS PLANCTÓNICOS O BENTÓNICOS SOBRE SUSTRATOS DUROS

Los pasos 1 a 12 constituyen el proceso de extracción del DNA y a partir del 13 los de purificación.

1. En el caso de muestras procedentes de raspado, se realiza la extracción a partir del pellet guardado en el tubo Eppendorf. En el caso de muestras recogidas en un filtro, éste se fragmenta en pequeñas piezas con unas tijeras estériles y se deposita en un tubo Eppendorf de 2 mL antes de proceder al siguiente paso.
2. Añadir 567 μL de la solución TE (tampón Tris-EDTA), 30 μL de la solución de dodecilsulfato de sodio, SDS, 10% (véase apéndice A.1 en pág. 413) y dos gotas de bolas de 0,5 mm al tubo Eppendorf.³
3. Colocar el tubo Eppendorf en hielo picado y sonicar durante 5 minutos.
4. Mezclar con un vortex (o un aparato tipo *beadbeater*) durante 10-60 minutos (dependiendo de la dificultad de ruptura de las estructuras celulares).
5. Añadir 3 μL de la solución *stock* de proteinasa K (*stock* de 20 mg/mL) y 10 μL de la solución de lisozima (*stock* de 10 mg/mL).
6. Mezclar enérgicamente por volteado (sin utilizar el vortex).
7. Incubar a 37 °C durante 60 minutos.
8. En muestras con mucho RNA puede ser necesario realizar un tratamiento con RNAasa para eliminar éste (el procedimiento se suele encontrar en los kits de extracción de DNA). Se añade la RNAasa (normalmente 3 μL de la solución comercial) y se incuba a 37 °C durante 60 minutos.
9. Añadir 100 μL de la solución de NaCl 5 M.
10. Mezclar enérgicamente por volteado (sin utilizar el vortex).
11. Incubar a 65 °C durante 2 minutos.
12. Añadir 80 μL de la solución *stock* de CTAB/NaCl. Esta solución debe estar precalentada a 65 °C y, dada su elevada densidad, debe pipetarse con una punta cortada en su extremo más fino.
13. Añadir 750 μL de la solución CI (cloroformo:isoamilalcohol) y homogenizar bien por volteado provocando la emulsión de los dos medios.

³ Por ejemplo, circonio/sílice *beads* fabricadas por Biospec Products Inc. (www.biospec.com).

14. Centrifugar a 13 000 rpm durante 5 minutos.
15. Recoger el sobrenadante y depositarlo en un nuevo tubo Eppendorf.
16. Añadir 750 μL de la solución PCI (fenol:cloroformo:isoamilalcohol) y homogenizar bien por volteado provocando la emulsión de los dos medios.
17. Centrifugar a 13 000 rpm durante 5 minutos.
18. Recoger el sobrenadante y depositarlo en un nuevo tubo Eppendorf.
19. Añadir 750 μL de la solución CI (cloroformo:isoamilalcohol) y homogenizar bien por volteado provocando la emulsión de los dos medios.
20. Centrifugar a 13 000 rpm durante 5 minutos.
21. Recoger el sobrenadante y depositarlo en un nuevo tubo Eppendorf.
22. Añadir 600 μL de isopropanol para precipitar el DNA y mezclar por volteado.
23. Incubar en la oscuridad durante una noche a 4 °C o 2 horas a temperatura ambiente.
24. Centrifugar a 12 000 rpm durante 30 minutos. El *pellet* con el DNA debe ser visible.
25. Eliminar el sobrenadante.
26. Añadir 500 μL de etanol 70% para lavar los restos de cloroformo.
27. Mezclar enérgicamente por volteado (sin utilizar el vortex).
28. Centrifugar a 13 000 rpm durante 15 minutos.
29. Eliminar el sobrenadante.
30. Secar el *pellet* en un desecador al vacío de 1 a 3 horas.
31. Añadir 100 μL de la solución TE (tampón Tris-EDTA).
32. Resuspender incubando a 37 °C durante 5 minutos.
33. Cuantificar el extracto (véase procedimiento para cuantificar el DNA extraído, pág. 190).
34. Congelar el extracto a -80 °C hasta el momento de proceder a la amplificación del DNA.

La extracción de DNA
precisa un proceso largo
y cuidadoso

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DNA DE MICROORGANISMOS EMBEBIDOS EN SEDIMENTOS

1. Poner entre 50 y 300 mg de sedimentos (peso fresco) en un tubo Falcon de 15 mL (Falcon 1).
2. Añadir 2 mL del tampón de extracción TESC.
3. Congelar, y descongelar a 65 °C. Repetir este paso tres veces.
4. Añadir cuatro gotas de bolas de 0,5 mm (por ejemplo, circonio/sílice, *beads*).
5. Incubar a 70 °C durante 30 segundos, mezclar con un vórtex. Incubar de nuevo de 5 a 10 minutos (dependiendo de la dificultad de ruptura de las estructuras celulares) y agitar de nuevo el vórtex. Repetir este último paso tres veces.
6. Añadir 15 μL de la solución *stock* de proteinasa K (*stock* de 20 mg/mL), 200 μL de la solución de SDS 10%, y 50 μL de la solución de lisozima (*stock* de 10 mg/mL).

7. Incubar a 50 °C durante 40 minutos. Agitar por volteado cada 10 minutos.
8. En el caso de muestras con mucho RNA, puede ser necesario hacer un tratamiento con RNAasa para eliminar éste (habitualmente se puede encontrar el procedimiento en los kits de extracción de DNA). En ese caso se añade la RNAasa (normalmente 3 µL de la solución comercial) y se incuba a 37 °C durante 60 minutos.
9. Añadir 2 mL de la solución CI (cloroformo:isoamilalcohol) y homogenizar bien por volteado provocando la emulsión de los dos medios.
10. Centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos.
11. Recoger el sobrenadante y depositarlo en un nuevo tubo Falcon (Falcon 2).
12. Al tubo Falcon con el sedimento (Falcon 1), añadir 2 mL del tampón de extracción TESC, homogenizar bien por volteado, centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos, recoger el sobrenadante y depositarlo en el tubo Falcon 2.
13. Al tubo Falcon 2, añadirle 4 mL de la solución PCI (fenol:cloroformo:isoamilalcohol) y homogenizar bien por volteado.
14. Incubar el tubo Falcon 2 a 65 °C durante 10 minutos.
15. Centrifugar a 4000 rpm durante 12 minutos.
16. Recoger el sobrenadante y depositarlo en un nuevo tubo Falcon (Falcon 3)
17. Al tubo Falcon 3, añadirle 2 mL de la solución CI (cloroformo:isoamilalcohol) y homogenizar bien por volteado.
18. Centrifugar a 4000 rpm durante 12 minutos.
19. Recoger el sobrenadante en un nuevo tubo Falcon (Falcon 4) y agitarlo.
20. Centrifugar a 4000 rpm durante 8 minutos.
21. Comprobar que no queda CI/PCI (se verían dos fases); si queda, repetir el paso hasta elimina el CI/PCI que queda en la parte inferior.
22. Añadir 2,5 mL de isopropanol (para precipitar el DNA) y mezclar por volteado.
23. Incubar en la oscuridad durante una noche a 4 °C.
24. Centrifugar a 4000 rpm durante 1 hora. El *pellet* con el DNA debe ser visible.
25. Eliminar el sobrenadante.
26. Añadir 500 µL de etanol 70% para lavar los restos de cloroformo, agitar por volteado e incubar a -20 °C durante 10 minutos.
27. Centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos.
28. Eliminar el sobrenadante.
29. Secar el *pellet* en un desecador al vacío durante 1 a 3 horas.
30. Añadir 250 µL de la solución TE (tampón Tris-EDTA).
31. Resuspender incubando a 37 °C durante 30 minutos.
32. Pasar a un tubo Eppendorf de 2 mL.
33. Cuantificar el extracto (véase apartado siguiente).
34. Congelar el extracto a -80 °C hasta el momento de proceder a la amplificación del DNA.

PROCEDIMIENTO PARA CUANTIFICAR LA CANTIDAD Y PUREZA DEL DNA EXTRAÍDO

Una vez extraído el DNA se verifica su pureza mediante el espectrofotómetro

Una vez completada la extracción del DNA, éste debe cuantificarse para comprobar que el proceso de extracción ha tenido éxito y para evaluar su pureza. Dicha cuantificación puede realizarse de manera espectrofotométrica para determinar si la extracción ha sido suficientemente efectiva y el extracto es lo bastante puro, o bien mediante una electroforesis en gel de agarosa (normalmente preparado al 0,8-1% p/v de agarosa; véase técnica 24d). En el procedimiento espectrofotométrico se determina la absorbancia del extracto de DNA (diluido 1/25) a diversas longitudes de onda para determinar su concentración y su pureza con respecto a otras sustancias que podrían estar incluidas en el extracto (polisacáridos, proteínas, RNA, ...). La medida de la absorbancia a 260 nm permite cuantificar la concentración de ácidos nucleicos, mientras que la relación entre esta absorbancia y la determinada a otras longitudes de onda (por ejemplo, 230 para fenol y polisacáridos, 280 para proteínas) permite determinar la pureza relativa del extracto. Se resume a continuación el protocolo para la determinación espectrofotométrica.

1. En la microcubeta, añadir 500 µL de tampón TE.
2. Añadir 20 µL del extracto de DNA.
3. Medir la absorbancia de la mezcla a 230, 260 y 280 nm frente a un blanco de tampón TE.
4. Calcular la concentración de DNA, según la siguiente fórmula:

$$[\text{DNA}] \text{ (mg/mL)} = A_{260}/0,02 \quad (11.2)$$

5. Calcular la pureza mediante las siguientes razones (ratios) de absorbancia:

A_{230}/A_{260} : Debe estar comprendido entre 0,3 y 0,9; valores superiores indican la contaminación del extracto por polisacáridos o por restos del fenol resultantes de un mal lavado en el proceso de extracción.

A_{260}/A_{280} : Valores de esta relación situados entre 1,8 y 2,0 indican un alto grado de pureza de ácidos nucleicos; si se hallan entre 1,8 y 1,9 indican una alta pureza de DNA. Valores por encima de 2,0 indican contaminación por RNA, lo cual hace aconsejable la inclusión de la lisis de este RNA utilizando RNAasa en el proceso de extracción. Valores por debajo de 1,8 indican la contaminación del extracto con proteínas, lo que exigiría un mayor cuidado en la eliminación de éstas durante el proceso de extracción o una posterior purificación.

En caso de ser necesario, el extracto puede purificarse de manera adicional, por ejemplo, utilizando columnas de purificación (Sepharose G-200).

Técnica 24c. Amplificación del DNA (PCR)

AMPLIFICACIÓN DEL DNA

La técnica de la *reacción en cadena de la polimerasa* (PCR) consiste en la multiplicación in vitro de secuencias específicas de DNA utilizando la actividad enzimática de la DNA-polimerasa. Generalmente la secuencia amplificada suele ser la del gen que codifica para el 16S rRNA (en los procariotas) y para el 18S rRNA (en los eucariotas). Cuando la amplificación de las secuencias de los genes codificantes para el RNA ribosómico no da suficiente resolución suele recurrirse al uso de las *secuencias de las regiones intergénicas* (ITS). El DNA extraído de las muestras, correspondiente a toda la comunidad, se amplifica de forma selectiva mediante cebadores selectivos que se eligen en función del grupo taxonómico cuyo DNA se pretenda amplificar. Son necesarios cebadores de iniciación en ambos lados de la cadena de DNA (cebador directo —*forward primer*— y reverso —*reverse primer*—), cuyas temperaturas de hibridación deben ser similares. Las condiciones a aplicar en el termociclador (fig. 11.6a), referentes a la desnaturalización, a la hibridación de los cebadores al extremo 3' de cada hebra y a la elongación de la hebra, tales como el número de ciclos, temperaturas y los tiempos de incubación y rampas de incremento de éstas, son específicas para cada cebador y secuencia a amplificar.

El DNA se amplifica mediante cebadores selectivos

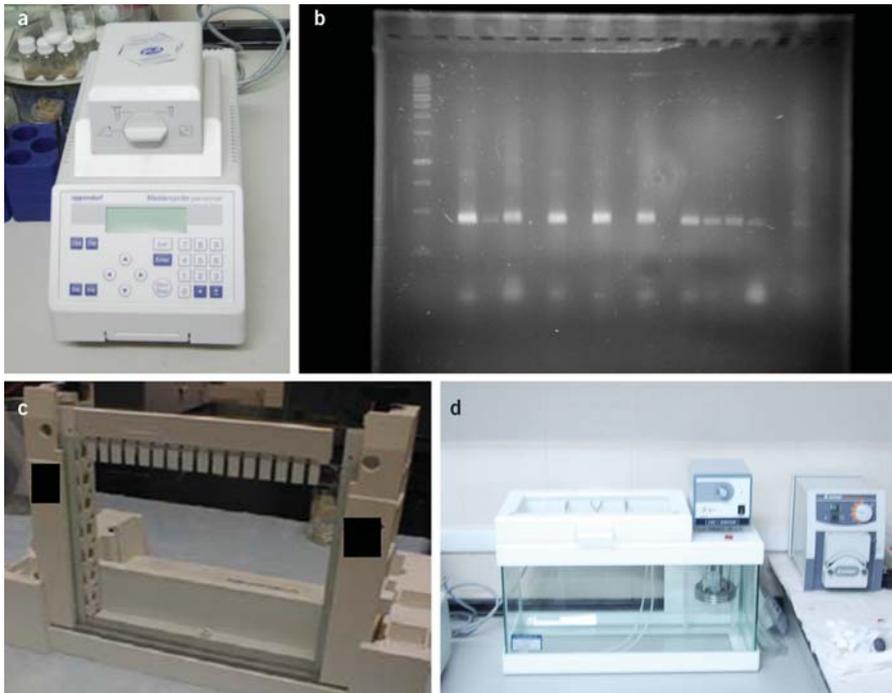


Figura 11.6:

a) Termociclador.
b) Electroforesis en gel de agarosa 2% del producto de PCR utilizando cebadores específicos para cianobacterias 460 pb (CYA359F y CYA781r), teñido con bromuro de etidio (fotografía de Antonio Picazo, Universidad de Valencia). c) Marco de electroforesis ya montado. d) Tanque contenedor y sistema de circulación y electroforesis vertical (izquierda) y generador de gradientes (derecha)

Para la amplificación, partimos del extracto de DNA previamente cuantificado que se conserva congelado. Así, se prepara la mezcla de polimerización y después se le adiciona el DNA extraído para llevarlo al termociclador.

Normalmente, los reactivos se adquieren ya preparados, en cuyo caso las cantidades a añadir serán las que especifique el fabricante. Dada la facilidad de contaminación, es recomendable que el material utilizado sea de uso exclusivo y los reactivos específicos para el uso en biología molecular, en condiciones de trabajo extremadamente pulcras. El procedimiento es el siguiente:

1. Tomar un tubo de PCR (200 μ L).
2. Añadir 5,75 μ L de agua Milli-Q.
3. Añadir 2,5 μ L de tampón 10X.
4. Añadir 0,75 μ L de $MgCl_2$. Utilizar la concentración recomendada por el fabricante de la polimerasa. Se suelen usar soluciones *stock* en torno a 50 mM, de las que se añade la cantidad indicada a la mezcla (por muestra).
5. Añadir 1 μ L de la solución de oligonucleótidos (dNTP).
6. Añadir 1 μ L del cebador directo (*stock* 10 pmo/ μ L).
7. Añadir 1 μ L del cebador reverso (*stock* 10 pmo/ μ L).
8. Añadir 1 μ L de una solución 0,1% de *seroalbúmina bovina* (BSA).
9. Añadir 5 μ L de la solución 5X de *enhancer* (solución de intensificación) (precalentado a 65 °C). Estos productos actúan de manera diversa para incrementar el rendimiento y/o la especificidad de la polimerización, por ejemplo protegiendo la actividad enzimática o disminuyendo la ligación inespecífica de los cebadores.
10. Añadir 1 μ L de Taq polimerasa.
11. Una vez preparada la mezcla de polimerización con todo lo anterior, se añaden aproximadamente 10 ng de DNA del extracto (según la abundancia del DNA que se desea amplificar en el extracto puede ser necesario añadir mayores cantidades, oscilando normalmente entre 10-100 ng). Para ello el extracto de DNA se diluye en tampón TE, de manera que haya unos 10 ng en 6 μ L. Para el buen funcionamiento de la reacción de polimerización el extracto debe estar bien limpio de compuestos tales como fenol, agentes quelantes como el EDTA, detergentes u otras sustancias usadas en el proceso de extracción, ya que éstas dificultan la acción de la polimerasa.
12. Llevar al termociclador y someter al proceso de polimerización (opciones de amplificación en función de los cebadores).
13. Comprobar que se ha obtenido amplificación y que el tamaño del DNA amplificado es correcto mediante una electroforesis en gel de agarosa (0,8-2%) con tampón TAE 1X, utilizando un marcador de tamaño, tinción del gel con bromuro de etidio u otros tintes (por ejemplo, SYBR) y observación (proteger la vista) con luz ultravioleta (fig. 11.6b).

14. Una vez obtenido el DNA amplificado y comprobado que el proceso ha funcionado correctamente, el extracto se congela a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. Si se va a utilizar para clonación no se puede congelar y debe utilizarse inmediatamente.
15. El producto de la amplificación puede ser utilizado tanto para la clonación como para la separación electroforética que proporciona el *fingerprinting* de la comunidad, o incluso para la secuenciación directa (Ausubel et al. 2008).

El DNA amplificado puede congelarse a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a no ser que vaya a utilizarse para clonación

PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR LA ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DEL PRODUCTO AMPLIFICADO

Como se ha indicado en el punto 13 del protocolo anterior, la bondad del proceso de amplificación por lo que se refiere a la cantidad y calidad del producto obtenido se evalúa mediante una electroforesis en gel de agarosa. Se usa del modo siguiente:

1. Pesar la cantidad apropiada de agarosa, entre 0,8 y 2 g según la concentración de agarosa en el gel. Se suele utilizar una concentración 0,8% para los productos de extracción de DNA y entre 1,5 y 2% para los productos de PCR. Generalmente, la concentración debe ser más baja cuanto mayores sean los fragmentos de DNA a separar.
2. Añadir la agarosa en un matraz Erlenmeyer de 0,5 L.
3. Añadir 100 mL de tampón Tris/acetato/EDTA (TAE) 1X.
4. Hervir durante 2 minutos, evitando que se vierta.
5. Dejar enfriar hasta una temperatura de $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, sin que solidifique.
6. Preparar el molde de metacrilato, incluyendo el peine con el número de pocillos necesario para las muestras y el marcador, sin que éste toque el fondo.
7. Verter cuidadosamente la agarosa evitando la formación de burbujas, o eliminado éstas si se forman (por ejemplo, pinchándolas con una aguja estéril).
8. Dejar solidificar el gel durante media hora.
9. Retirar el peine.
10. Colocar el molde con el gel en la cubeta de electroforesis, con los pocillos más próximos al polo negativo.
11. Añadir a la cubeta de electroforesis tampón TAE 1X hasta cubrir el gel de manera sobrada.
12. Preparar cada muestra en un tubo Eppendorf pequeño añadiendo 10 μL del producto amplificado y 4 μL del tampón de carga con azul de bromocresol.
13. Cargar los pocillos de los extremos con el marcador molecular de tamaño.
14. Cargar el resto de los pocillos con las muestras que corresponda.
15. Conectar la fuente eléctrica (120 V) y dejar el tiempo suficiente para que corra la muestra (entre 0,5 y 1,5 horas, según el tamaño del gel).

16. Una vez finalizada la electroforesis, teñir el gel sumergiéndolo durante unos 15 minutos en una solución de bromuro de etidio preparada añadiendo unas 10-20 gotas de éste (hasta que el agua adquiera un ligero color) a 1 L de agua Milli-Q. Toda la manipulación del bromuro de etidio y del gel a partir de este instante se debe realizar con guantes y otras medidas protectoras, utilizando material específico y recogiendo el material desechado en un recipiente adecuado. Los residuos son tóxicos, ya que el bromuro de etidio es mutágeno y potencialmente cancerígeno.
17. Lavar el gel con agua del grifo.
18. Visualizar el gel con luz ultravioleta y fotografiar si se desea.

Técnica 24d. Separación del DNA por DGGE (*fingerprinting* de la comunidad)

La DGGE proporciona un patrón de bandas de DNA característico de la comunidad microbiana

Las técnicas electroforéticas se basan en la separación de moléculas cargadas al someterlas a un campo eléctrico a través de un gel. La *electroforesis en gel con gradiente químico desnaturizante* (DGGE), generalmente usando urea y formamida para desnaturizar, al igual que su equivalente de desnaturización con gradiente de temperatura (TGGE), se utilizan de manera rutinaria para estudios cualitativos y semicuantitativos de la diversidad de comunidades microbianas. Los productos de amplificación son separados electroforéticamente en un gel de poli-acrilamida en función de las diferencias en sus secuencias, que determinan patrones diferentes de desnaturización y con ello de migración. En la DGGE la separación del DNA es función de las características de desnaturización de la doble hélice de DNA. La carrera electroforética se realiza en una cubeta vertical en la que se coloca un gel de poli-acrilamida entre un gradiente desnaturizante. En ella se obtiene un patrón de bandas característico de la comunidad. El patrón obtenido en la DGGE ofrece una visión de la diversidad de la comunidad (*finger-printing*). Además se puede obtener información taxonómica con la escisión de las bandas, su reamplificación, y la secuenciación de los productos de esa nueva amplificación, o bien mediante análisis de hibridación con oligonucleótidos marcados específicos para determinados taxones. En la DGGE se deben considerar las condiciones de la carrera electroforética y la dificultad de comparación de los patrones cuando aparecen muchas bandas, lo que puede hacer necesaria la realización de diversos geles y combinaciones de muestras. Cuando el número de bandas es grande, diferentes fragmentos de DNA podrían migrar juntos, limitando de esta manera la sensibilidad de la técnica.⁴

⁴ Para el tratamiento estadístico de los datos obtenidos en la DGGE se sugiere Fromin et al. (2002), y para dudas sobre la técnica se puede consultar <http://ddgehelp.blogspot.com/>

PREPARACIÓN DEL GEL

La acrilamida y la formamida son tóxicas, por lo que todo el procedimiento se debe realizar con guantes y, cuando se manipulen estas sustancias, en campana de gases, evitando la contaminación y recolectando todos los residuos contaminados en recipientes especiales.

1. Limpiar cuidadosamente todo el material (cristales, espaciadores, peines, etc.) con detergente (tipo Decon 90 o similar, no usar materiales abrasivos), posteriormente con isopropanol, etanol al 96% y finalmente agua Milli-Q. Es especialmente importante eliminar los restos de silicona de electroforesis anteriores.
2. Colocar los espaciadores alineados a lo largo de los bordes del cristal más largo, situar el cristal pequeño en la parte externa y sujetarlos con pinzas. Sellar los bordes y, especialmente la parte baja, con cinta y silicona (usar el mínimo necesario). Poner las placas de cristal en el marco.
3. Comprobar el buen funcionamiento del generador de gradientes con un flujo de agua Milli-Q. Una vez comprobado que el bombeo funciona correctamente, vaciar el tubo por bombeo y colocar la punta del tubo de salida (con una punta de pipeta en el extremo) en el centro de la parte superior de la cámara que contendrá el gel (el espacio entre cristales).
4. Preparar igual volumen (15-30 mL de cada, dependiendo del tamaño del gel) de las dos soluciones de acrilamida, la de mayor y la de menor concentración desnaturizante. Por ejemplo, para preparar un gradiente desnaturizante 30-70%, se prepara una solución al 30% (menor porcentaje desnaturizante) y una al 70% (mayor porcentaje desnaturizante), de acuerdo con lo reseñado en el cuadro 11.5.

También puede prepararse una solución 100% desnaturizante con concentración 40% de formamida y 7 M de urea (a partir de 84 g de urea disueltos en el mínimo posible de agua Milli-Q, 80 mL de formamida 100%, 2 mL de solu-

Reactivo	[Final]	Porcentaje											
		0	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70
Milli-Q	–	3,6	9,5	9,0	8,5	8,0	7,5	7,0	6,5	6,0	5,5	5,0	4,5
Acrilamida: bisacrilamida (37:1) 40%	Aprox. 8%	1,3	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Tampón TAE 50X	1X	0,1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Urea	Variable	0,0	1,3	1,6	1,9	2,2	2,5	2,8	3,1	3,4	3,7	4,0	4,3
Formamida	Variable	0,0	1,2	1,5	1,8	2,1	2,4	2,7	3,0	3,3	3,6	3,9	4,2
Glicerol	2%	0,0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3

Cuadro 11.5:
Cantidades de reactivos (en mL) a añadir para preparar las soluciones desnaturizantes a aplicar en el generador de gradientes

ción tampón TAE 50X, 4 mL de glicerol, 40 mL de la solución 40% de acrilamida:bisacrilamida [37:1], y agua Milli-Q hasta 200 mL) y una solución 0% (lo mismo, pero sin añadir formamida ni urea), y juntarlas en las proporciones adecuadas para hacer las dos soluciones (mayor y menor porcentaje desnaturalizante) que se vayan a utilizar. La urea se disuelve en caliente.

5. Verter 15-20 mL de solución con la mayor concentración de desnaturalizante en la cámara correspondiente del generador de gradientes. Llenar el tubo suavemente, evitando burbujas de aire. Poner en marcha el agitador de esta cámara.
6. Verter 15-20 mL de solución con la menor concentración de desnaturalizante en el otro compartimento del generador de gradientes.
7. Añadir 150 μ L de APS y 15 μ L de TEMED a cada una de las dos soluciones desnaturalizantes, mezclándolo bien con las soluciones de acrilamida. Al añadir estas sustancias comienza la polimerización de la acrilamida, desde este momento se dispone de unos 15 minutos para completar el montaje del gel.
8. Abrir las llaves de salida de las cámaras del generador de gradientes, evitando la formación de burbujas.
9. Conectar la bomba del generador de gradientes, a un flujo de 5 mL/min (si no se dispone de sistema de bombeo puede colocarse el generador de gradientes sobre las placas y dejar que el líquido pase por gravedad), completándose el vertido del gel en unos 4-6 minutos.
10. Detener el llenado cuando el líquido esté aproximadamente 0,5 cm por debajo del nivel que ocupará el peine. Limpiar el tubo y el generador de gradientes con un flujo de agua Milli-Q (que se descarta).
11. Añadir unos mL de agua Milli-Q saturada con butanol.
12. Dejar polimerizar el gel durante una hora.
13. Limpiar el espacio entre las placas tres veces con agua Milli-Q. Secar el espacio entre las placas con papel Whatman.
14. Colocar el peine en la parte superior.
15. Con una pipeta Pasteur, añadir una mezcla de solución de acrilamida 0% (sin formamida ni urea), 50 μ L de APS y 5 μ L de TEMED (*stacking gel*).
16. Dejar polimerizar el gel durante 15 minutos.
17. Quitar el peine del gel y la tapa de la parte inferior de las placas de cristal.

Las técnicas electroforéticas se basan en la separación de moléculas cargadas al someterlas a un campo eléctrico a través de un gel

Carrera electroforética y revelado del gel

1. Colocar el marco con el gel (fig. 11.6c) en el tanque contenedor de la solución tampón (fig. 11.6d).
2. Llenar el contenedor con tampón TAE 1X. Ajustar el tampón para que suba justo sobre el nivel de los pocillos. Evitar el contacto del tampón con la cámara de electroforesis superior. El tampón se renueva cada tres o cuatro carreras.
3. Conectar el sistema de circulación del baño y calentar a 60 °C.
4. Llenar los pocillos con tampón.
5. Precorrer el gel durante media hora a 60 voltios (unos 50 mA).

6. Lavar los pocillos con tampón.
7. Cargar las muestras, añadiéndoles previamente el tampón de carga de gel (10-50%) con puntas de pipeta para carga de geles. Cargar alrededor de 10 μ L de muestra.
8. Cargar los marcadores de tamaño (normalmente uno a cada extremo y uno en el centro del gel).
9. Comprobar el buen funcionamiento del sistema de circulación.
10. Cubrir la cubeta con film plástico para disminuir la evaporación.
11. Correr la electroforesis durante unas 15 horas a 50-60 voltios.
12. Finalizar la electroforesis y desconectar el aparato y el sistema de circulación.
13. Retirar el gel de la cámara apoyado sobre una de las placas de cristal.
14. Teñir el gel durante 30 minutos en una solución de TAE 1X con 50 μ L de una solución 10 mg/mL de bromuro de etidio, con agitación suave.
15. Colocar el gel en el transiluminador de luz ultravioleta.
16. Fotografiar cuidadosamente el gel con un sistema de fotografía digital.
17. Trabajar la fotografía con un programa de análisis de imagen.
18. Si se desea obtener más información taxonómica, las bandas se pueden escindir, reamplificar y secuenciar, aunque para ese tipo de estudios la clonación es un procedimiento más adecuado.

Técnica 24e. Clonación

La clonación de los fragmentos amplificados por PCR, con posterior secuenciación, es un procedimiento costoso, por lo que no suele utilizarse para estudiar diferencias espaciotemporales en toda la comunidad microbiana, sino más bien para el estudio de la diversidad de grupos taxonómicos concretos. El análisis de las secuencias clonadas hace posible identificar las secuencias dominantes en el producto inicial de la PCR.

La clonación es adecuada solamente para el estudio de la diversidad taxonómica

En la técnica de clonación, los fragmentos de DNA amplificados son unidos a un vector (un plásmido) que suele llevar un gen que codifica para unas características distintivas (normalmente una resistencia a un antibiótico y un enzima para una determinada reacción), de manera que al ser insertado en una bacteria ésta integra tanto el fragmento de DNA procedente de la amplificación como el gen que le confiere dichas características, las cuales permiten identificar las colonias de las bacterias que han incorporado el vector. Fundamentalmente, los pasos del proceso de clonación son:

Ligación del DNA amplificado al vector. La reacción se realiza en tubos Eppendorf de 0,5 mL de capacidad, en los que se introduce la mezcla de ligación consistente, fundamentalmente, en DNA-ligasa (por ejemplo, T4 DNA-ligasa), el vec-

tor de clonación (un plásmido, que en el protocolo resumido que incluimos aquí incluye un gen de resistencia a un antibiótico, generalmente a la ampicilina, junto con la capacidad de síntesis de β -galactosidasa que permite la degradación de XGal), el producto de PCR a clonar (que no se debe haber congelado previamente), un tampón, y agua Milli-Q. Se incluyen, además de las muestras, un control positivo, consistente en un fragmento de DNA diferente al amplificado, y un control negativo, en el que no se añade DNA. Todo esto se incuba a temperatura ambiente, durante aproximadamente una hora, o durante una noche a 4 °C.

Transformación (introducción del vector en las células competentes). La clonación se realiza sobre células competentes (para la transformación) de *Escherichia coli* (se pueden adquirir ya preparadas y se guardan congeladas). A estas células, una vez descongeladas en un baño con hielo, se les añade el producto de la ligación mezclándolo con la propia pipeta. Se incuba en hielo durante 20 minutos, se le somete a un choque térmico a 42 °C durante 50 segundos (sin agitar), se devuelve al hielo durante un par de minutos, se añade aproximadamente 1 mL de medio de cultivo líquido (medio Luria-Bertani —LB—, o medio SOC) y se incuba durante una hora y media a 37 °C en agitación. Se prepara también un control con el plásmido no ligado.

Cultivo de las bacterias transformadas para, a partir de cada colonia, obtener los clones. Se toma el producto de la transformación y se transfieren unos 100 μ L a una placa de medio LB/ampicilina/XGal, incubándolo durante una noche a 37 °C.

Las células transformadas, que contienen el fragmento de DNA clonado, dan lugar a colonias blancas, ya que son capaces de crecer en medio con ampicilina y degradar XGal, que es lo que caracteriza al plásmido introducido). Estas colonias se seleccionan y se vuelven a plaquear en medio sólido LB/ampicilina/XGal, obteniéndose con ello cada uno de los clones. Cada uno de ellos se deberá amplificar picando con un asa de siembra estéril en la colonia y juntando con la mezcla de polimerización para llevar al termociclador. Con el producto amplificado se corre una electroforesis en gel de agarosa para comprobar que efectivamente contienen el DNA que se pretendía clonar. El producto de PCR purificado podrá ser utilizado para su secuenciación y, con ello, para la asignación filogenética del donante de DNA comparando la secuencia con las de las bases de datos (véase técnica 24f).

Actualmente los vectores, las células competentes y la mayoría de los reactivos pueden adquirirse comercialmente en *kits* comerciales de clonación (por ejemplo, *pGEM[®]-T Easy Vector System* de Promega).

Molde	Cantidad necesaria (ng)
Producto de PCR de 100-200 pb	10
Producto de PCR de 200-500 pb	20
Producto de PCR de 500-1000 pb	30
Producto de PCR > 1000 pb	100
DNA de cadena sencilla	100
DNA de doble cadena	250

Cuadro 11.6:

Cantidades mínimas de DNA monoespecífico (de una misma secuencia) necesarias para la secuenciación

Técnica 24f. Secuenciación y asignación filogenética

Para la secuenciación se parte de un producto de PCR, que puede provenir tanto de un clon, de una banda de DGGE, o del producto amplificado en la PCR de una muestra presuntamente uniespecífica. La secuencia a realizar debe ser única. Es necesario cuantificar la cantidad de DNA que contiene el extracto para llevar a secuenciar la cantidad correcta de DNA (cuadro 11.6). Cuando sea necesario, la muestra se diluye con agua Milli-Q. Es necesario tener un producto de PCR bien purificado, sin contaminación por fenol, RNA, proteínas u otros compuestos que puedan interferir en el proceso de secuenciación. La pureza puede determinarse mediante el procedimiento anteriormente descrito en el apartado «procedimiento para cuantificar la cantidad y pureza del DNA extraído» (pág. 190) La purificación del producto de PCR previo al proceso de secuenciación se puede realizar con kits comerciales (por ejemplo, con filtración o minicolumnas), aunque éste es un proceso que habitualmente también pueden realizar los laboratorios dedicados a la secuenciación, a los que se puede remitir el DNA purificado o sin purificar, con las instrucciones oportunas al respecto.

Lo más sencillo es secuenciar el DNA en un laboratorio comercial

Una vez secuenciado, el laboratorio de secuenciación remitirá los resultados en el formato acordado, por lo que debemos asegurarnos de contar con el software adecuado para poder leerlo. Por ejemplo, los secuenciadores ABI (Applied Biosystems) utilizan el programa Chromas 1.45.⁵

Al abrir el archivo se pueden presentar tres posibilidades.

- Que la secuencia sea perfecta y cada posición tenga asignada correctamente un nucleótido.
- Que haya dos hebras secuenciadas, una del directo y otra del reverso. El software es capaz de identificarlo y solucionarlo.

⁵ Se puede encontrar más información en <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>

- c) Que en muchas posiciones aparezca la letra «N», lo que significa que en la secuenciación no se ha podido asignar un único nucleótido en esa posición. Esto indica que probablemente teníamos una mezcla de distintas secuencias y no es posible la secuenciación.

Si la secuencia es correcta, se puede alinear y comparar con otras existentes en las bases de datos. Actualmente la herramienta más utilizada para la parte inicial de este proceso es BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).⁶

Los pasos a realizar son:

Una vez secuenciado el DNA, se puede comparar la secuencia con las existentes en bases de datos

1. Ir a *Nucleotide* BLAST.
2. Introducir la secuencia o cargar directamente el archivo, darle un nombre a la búsqueda y seleccionar la base de datos donde buscar (por ejemplo, GenBank, EMBL o ARB Silva Databases).
3. Guardar el resultado y secuencias que interese alinear con la nuestra.

Una vez se tienen identificadas, se importan las secuencias con alta homología con la nuestra usando programas como Bioedit.⁷ Mediante un programa de comparación de similitud de secuencias (por ejemplo, Clustal X) se procede a construir los árboles filogenéticos que indican la proximidad de la secuencia con otros existentes en la base de datos. Muchos programas sirven tanto para manejar las secuencias como para construir las relaciones filogenéticas, como el software ARB (Ludwig et al. 2004).⁸

Técnica 25. Evaluación de la diversidad de los hongos acuáticos

La identificación de los hifomicetos acuáticos se basa en la identificación de las esporas al microscopio

Esta metodología se basa en la identificación de los hongos acuáticos a partir de la observación de esporas (conidios). En los ríos, los conidios se pueden encontrar dispersos en la columna de agua o concentrarse en las espumas, principalmente después de zonas de corriente elevada o en períodos de lluvia (Gessner et al. 2003). Los conidios constituyen la fase asexual de los hongos. La morfología de los conidios es generalmente sigmoide o tetrarradiada, lo que facilita su identificación. Además del análisis morfológico de los conidios, son cada vez más habituales las técnicas moleculares para evaluar la diversidad de los hongos acuáticos, en particular la DGGE y RFLP (técnica 24), ya que no todas las especies

⁶ BLAST fue desarrollada inicialmente por el NCBI (National Center for Biotechnology Information). Más información sobre esta herramienta en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> o <http://www.ebi.ac.uk/blast/>

⁷ Más información en <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>

⁸ Más información en <http://www.arb-home.de/>

de hongos esporulan en condiciones de laboratorio. La utilización de cebadores específicos de la región ITS del rDNA confirma que las comunidades de hifomicetos acuáticos que colonizan sustratos vegetales están mayoritariamente dominadas por Ascomycota, seguido de Basidiomycota y de Chytridiomycota (Bärlocher 2007).

MATERIAL Y EQUIPAMIENTO

- Frascos de vidrio con tapa de rosca (10-50 mL).
- Cucharas.
- Botellas de vidrio de 1 L.
- Bolsas de plástico (con mallas de 0,5 a 10 mm).
- Placas de Petri de 9 cm y de 5 cm de diámetro.
- Agitador.
- Bombas de acuario con tubos de silicona.
- Sistema de filtración conectado a un sistema de vacío o a una trompa de agua.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Microscopio óptico (160-400 aumentos).
- Microscopio invertido para los aislamientos (100-200 aumentos).
- Aguja de disección pequeña.
- Filtros con poro 5-8 μm (Millipore).
- Autoclave.
- Mechero Bunsen.
- Tubos de polipropileno para criopreservación (2 mL, Sarstedt).
- Cámara de flujo laminar.
- Bolsas de plástico tipo Zip lock para transporte de hojas.
- Nevera portátil.

REACTIVOS

- Azul de triptano en lactofenol a 60% (lactofenol: 10 mL de fenol, 10 mL de ácido láctico y 10 mL de agua desionizada) o azul de algodón (*cotton blue*) en ácido láctico a 0,1%.
- Agua desionizada.
- Agua del río filtrada y esterilizada en autoclave (120 °C, 20 min).
- Agua-agar (2% p/v agar en agua desionizada, esterilizar en autoclave, verter asépticamente en placas de Petri de 9 cm de diámetro y dejar solidificar).
- MEA (1% p/v de extracto de Malta y 1,5% p/v de agar en agua desionizada, esterilizar en autoclave, verter asépticamente en placas de Petri de 5 cm de diámetro y dejar solidificar).
- MEA con antibiótico (MEA preparado como antes, adicionar asépticamente solución de estreptomina y/o cloranfenicol (0,1% de concentración final)

- previamente esterilizada por filtración, verter asépticamente en placas de Petri de 5 cm de diámetro y dejar solidificar).
- FAA (etanol 70%, ácido acético glacial, 37% formaldehído, 1:3:1 / v/v/v).
 - Etanol 96%.
 - Formaldehído 37%.
 - Glicerol (10-30%) esterilizado en autoclave.

PROCEDIMIENTO

Toma de muestras

Las esporas de hifomicetos son especialmente abundantes en las espumas que se forman naturalmente en los ríos

Los hifomicetos acuáticos se pueden encontrar en ríos de pequeño orden bordeados por vegetación, aunque también en grandes ríos (Pascoal et al. 2005). La selección de los sitios y tiempos de muestreo deben hacerse de acuerdo con los objetivos del estudio, y así los hongos acuáticos se pueden muestrear de distinta manera:

- a) a partir de las espumas,
- b) a partir de la columna de agua,
- c) a partir del material vegetal acumulado en el lecho fluvial.

a) Muestreo de los hongos acuáticos a partir de las espumas

Las espumas concentran un elevado número y diversidad de conidios (fig. 11.7), permitiendo conocer la diversidad de estos hongos, aunque no su abundancia.

1. Recoger una muestra de espuma densa mediante una cuchara y transferirla a un frasco pequeño con tapa de rosca.
2. Eliminar el exceso de agua a fin de concentrar la muestra.
3. Transportar la espuma con sus conidios en una nevera a 4 °C y proceder lo más rápido posible a su observación, para evitar que las esporas germinen.
4. Parte de las espumas puede ser fijada con una gota de FAA, lo que permite preservar las muestras durante años. Alternativamente, las espumas pueden ser fijadas durante algunos meses con etanol al 96% o con formaldehído al 2-4%.

Para muestras cuantitativas de conidios es preferible filtrar agua

b) Muestreo de los hongos acuáticos a partir de la columna de agua

1. Recoger 1 L de agua del sitio de muestreo.
2. Transportar en una nevera a 4 °C hasta el laboratorio.

Esta técnica es cuantitativa, pero tiene la desventaja de necesitar un gran volumen de agua para encontrar una muestra representativa de la diversidad local.

c) Muestreo de los hongos acuáticos asociados a detritus vegetales

1. Preparar bolsas de plástico (malla 0,5-10 mm) que contengan hojas senescentes y dejar colonizar en el río durante dos semanas (véase técnica 26).

**Figura 11.7:**

Espuma en el río donde se concentra gran densidad de conidios de hifomicetos acuáticos

2. Alternativamente, se pueden recoger detritus vegetales del lecho de los ríos, tales como hojas en descomposición.
3. Los detritus vegetales deben ser colocados en sacos de plástico y transportados en la nevera a 4 °C hasta el laboratorio.

Procedimiento en el laboratorio

a) Espumas

1. Colocar una gota de espuma en el portaobjetos y dejar secar al aire.
2. Colocar una gota de azul de algodón o azul de triptano en el cubreobjeto, y aplicarlo directamente sobre el portaobjetos.
3. Observar al microscopio óptico (entre 160 y 400 aumentos).

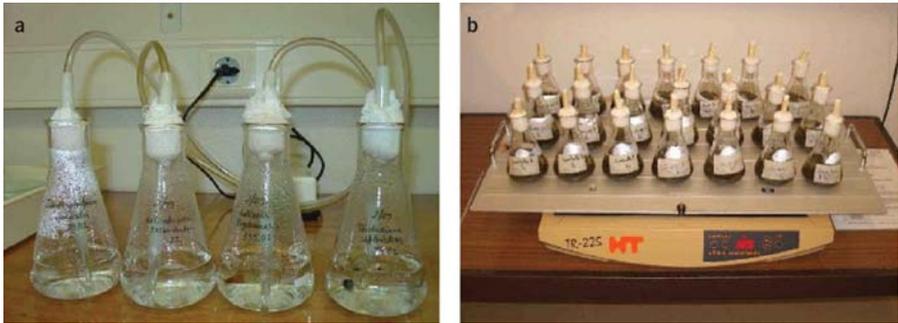
b) Agua

1. Filtrar de 250 a 1000 mL de agua, dependiendo de la densidad de conidios en suspensión, a través de filtros (47 mm de diámetro, y 5-8 µm de poro, Millipore). No se aconseja filtrar volúmenes muy grandes, ya que la acumulación de sedimentos dificulta identificar los conidios.
2. Cortar el filtro de acuerdo con el tamaño del portaobjetos.
3. Teñir el filtro con azul de algodón o azul de triptano.
4. Colocar el cubreobjeto.
5. Observar al microscopio óptico.

c) Material vegetal

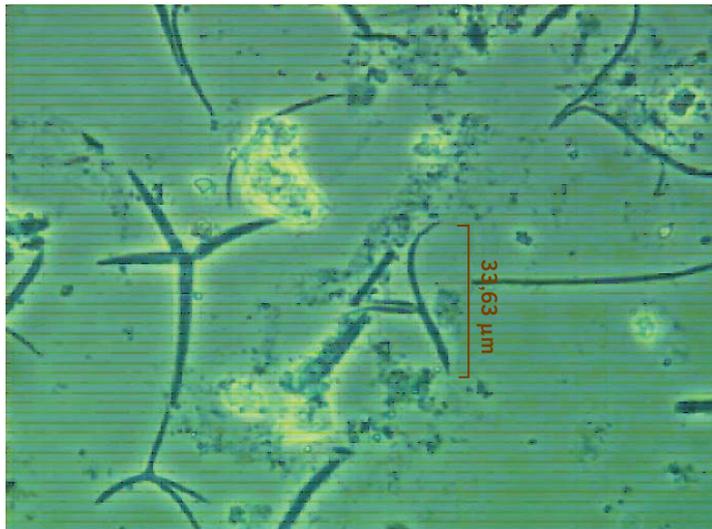
1. Lavar las hojas con agua desionizada para eliminar los sedimentos.

Figura 11.8:
Frascos con aireamiento de bombas de acuario (a) o en agitador (b)



2. Colocar las hojas en frascos Erlenmeyer con agua del río previamente filtrada y esterilizada o agua desionizada esterilizada.
3. Airear los frascos mediante bombas de acuario o un agitador para inducir la esporulación (fig. 11.8).
4. Una vez transcurridas 24-48 horas, filtrar volúmenes adecuados de agua (filtros de 5-8 μm de poro).
5. Cortar el filtro de acuerdo con el tamaño de los portaobjetos.
6. Añadir colorante (azul de algodón o azul de triptano) al filtro.
7. Cubrir con los cubreobjetos.
8. Observar al microscopio óptico.

Figura 11.9:
Conidios de hifomicetos acuáticos provenientes de espumas observadas al microscopio óptico



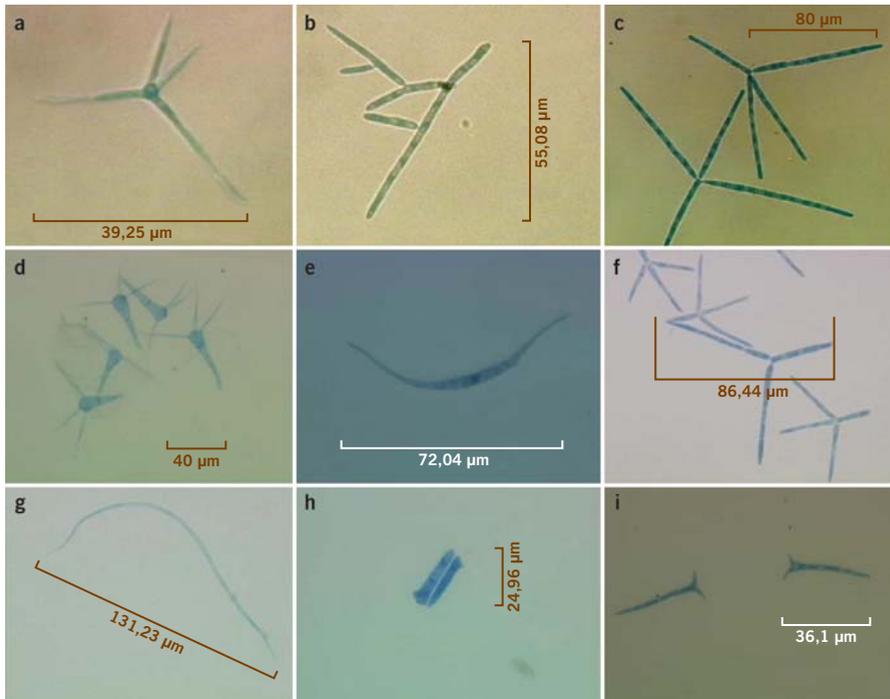


Figura 11.10:
Conidios de hifomicetos acuáticos de la colección del Departamento de Biología de la Universidad de Minho (Braga, Portugal)

Nota: a) *Alatospora acuminata*. b) *Varicosporium elodeae*. c) *Geniculospora grandis*. d) *Clavariopsis aquatica*. e) *Lunulospora curvula*. f) *Articulospora tetracladia*. g) *Anguillospora filiformis*. h) *Heliscus lugdunensis*. i) *Heliscus submersus*.

Identificación

La identificación se hace al microscopio óptico con una ampliación que, generalmente, varía entre 160 y 400 aumentos, dependiendo del tamaño de los conidios. Los conidios tienen dimensiones que pueden variar entre 12 µm y 400 µm (figs. 11.9 y 11.10). Las formas sigmoides son las más difíciles de identificar. Existen pocas claves de identificación para hifomicetos acuáticos; se aconseja consultar Ingold (1975) o Gulis et al. (2005) para climas templados, o Santos-Flores y Betancourt-López (1997) para climas tropicales. Algunos hongos son difíciles de identificar sobre la base solamente del análisis de los conidios. Para el estudio más detallado de la taxonomía, ecofisiología o toxicología de los hongos acuáticos, es preferible mantenerlos en cultivos puros.

Aislamiento de los hongos en cultivo puro

El aislamiento requiere entrenamiento y tiempo:

1. Esparcir una gota de la suspensión de conidios provenientes de las espumas o de los detritus vegetales en cajas de Petri con agua-agar.
2. Observar los conidios al microscopio invertido.

La identificación de esporas al microscopio tiene sus limitaciones. Para ir más allá hay que aislar los hongos en cultivos puros

3. Seleccionar el conidio que queramos, y cortar el agar a su alrededor con una aguja de disección.
4. Transferir el pedazo de agar con el conidio a una caja de Petri con MEA y antibiótico.
5. Incubar a 15-18 °C y monitorizar el crecimiento del hongo.
6. Cuando el hongo tenga cerca de 1 cm, y si no se observa contaminación por bacterias, transferir un pedazo del cultivo a MEA y otro pedazo a un frasco Erlenmeyer con agua para inducir la esporulación (como se indica anteriormente).
7. Controlar los conidios liberados de cada cultivo puro durante cerca de dos semanas mediante la observación microscópica de una gota de la suspensión teñida (fig. 11.10).
8. Si se sospecha de contaminación bacteriana, transferir de nuevo un pedazo del cultivo a una nueva placa de Petri con antibiótico.
9. Efectuar tantos aislamientos de conidios a partir del agua-agar como sea posible. Se pueden colocar las restantes placas de agua-agar a 8-10 °C para retrasar el crecimiento de los hongos.
10. Cuando se obtenga un cultivo puro en MEA, se pueden almacenar pedazos del cultivo en frascos de vidrio con tapón de rosca esterilizados y que contengan agua destilada estéril a 18 °C. También se pueden guardar pedazos de los cultivos en tubos de criopreservación estériles con glicerol (10-30%) y a -80 °C.

Técnica 26. Tasa de esporulación

La tasa de esporulación mide la actividad reproductora de los hongos

Las tasas de esporulación de hifomicetos acuáticos informan sobre la actividad reproductora de los hongos en hojas en descomposición. En general las hojas son colonizadas inmediatamente después de caer en el agua del río. Los hifomicetos crecen rápidamente y en poco tiempo empiezan a canalizar energía para la reproducción, de lo que resulta la producción de una gran cantidad de esporas. Esta actividad depende de la calidad del sustrato y de la cantidad de nutrientes o contaminantes en el agua. La tasa de esporulación baja muy rápidamente después de la primera o segunda semana en descomposición. Aunque se pueden usar sustratos naturales para obtener esporulación en laboratorio, es recomendable poner hojas senescentes en bolsas y depositarlas durante un tiempo determinado en el río para que sean colonizadas por los hongos y proceder a la esporulación en condiciones de laboratorio.

MATERIAL

- Bolsas de plástico (con mallas de 0,5 a 10 mm).
- Hojas de árbol senescentes.

- *Spray* para remojar las hojas.
- Bandejas de plástico o aluminio.
- Cuerdas para amarrar las bolsas en el río.
- Sacabocados o tijeras.
- Pinzas.
- Frascos Erlenmeyer de 250 mL.
- Papel de aluminio.
- Agua de río filtrada, agua destilada esterilizada o agua con nutrientes.
- Agitador orbital o aireador de acuario.
- Conexiones en «T».
- Puntas desechables de pipetas de 5 mL.
- Detergente líquido.
- Sistema de filtración.
- Filtros con poros de 5 μm (Millipore MF o equivalente).
- Estufa (50 °C).
- Balanza, ± 1 mg de precisión.
- Microscopio (recomendado ocular de 10X y objetivo de 40X; el objetivo de 16X puede ser útil para una visión general de los filtros).
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Azul de triptano en lactofenol a 60% (lactofenol: 10 mL de fenol, 10 mL de ácido láctico y 10 mL de agua desionizada) o azul de algodón (*cotton blue*) en ácido láctico a 0,1%.
- Bolsas de plástico tipo Zip lock para transporte de las hojas.
- Nevera portátil.

PROCEDIMIENTO

Preparación del material

Recoger hojas senescentes de árboles, ya sea directamente de los árboles durante la senescencia, o del suelo del bosque de ribera. Es mejor usar hojas de un único árbol para minimizar la variabilidad. En caso de usar hojas del suelo deben ser recientemente caídas, ya que rápidamente son colonizadas por hongos terrestres. Si la caída de hojas es continua, lo mejor es usar trampas, que pueden ser plásticos colocados directamente en el suelo o amarrados entre árboles (fig. 11.11), en las que se dispone alguna piedra en su centro para que las hojas se deslicen hacia él. Se deben hacer agujeros en esta parte central a fin de impedir la acumulación de agua, que podía alterar la calidad de las hojas. Después de ser recogidas, las hojas se deben secar al aire y guardar en lugar seco.

Para el estudio de los heterótrofos sobre hojas es importante utilizar hojas a punto de caer, o recién caídas

Preparación de las hojas para colocación en el río

1. Poner unos 3 g de hojas, o entre 2 y 8 hojas, en una bandeja de plástico o aluminio.

Figura 11.11:
Trampas para recolección de
hojas senescentes
de árboles



Foto: A. Encalada.

2. Humedecer las hojas con un *spray* a fin de que queden flexibles y no se fragmenten con la manipulación.
3. Poner las hojas dentro de las bolsas y guardar en frío hasta que sean puestas en el agua. No se deben dejar más de 24 horas para evitar la actividad microbiana.
4. Amarrar las bolsas en grupos de cuatro y disponerlas en zonas de acumulación natural de hojas (fig. 11.12). Amarrar a un tronco en la orilla o a piedras.

Figura 11.12:
Hojas en las bolsas antes
de ser colocadas en el río



Foto: M.F. Feio.

5. Las tasas de esporulación se pueden medir al cabo de una fecha determinada, por ejemplo, una semana. Sin embargo, para conocer la evolución de la actividad de hifomicetos acuáticos, se disponen varias bolsas en el río, que se recolectan en fechas determinadas. Por ejemplo, después de 2, 5, 10, 20, 40 y 60 días (véase técnica 20). El tiempo adecuado varía en función de las condiciones ambientales.

Procedimiento en el laboratorio

1. Sacar las bolsas del agua e introducir las en una bolsa tipo Zip lock con un poco de agua del río. Transportar las bolsas hasta el laboratorio en frío (nevera portátil).
2. En el laboratorio, lavar las hojas suavemente con agua destilada o agua del río para eliminar sedimentos o invertebrados. Debe evitarse usar agua de la red ya que tiene cloro y puede inhibir la actividad microbiana.
3. Cortar pedazos de hojas (cerca de 10 cm²) mediante tijeras o sacabocados (véase fig. 11.3) y colocarlos en frascos Erlenmeyer. Sacar de cada bolsa de 5 a 8 trozos o círculos que deberán ser recogidos de todas las hojas, para minimizar las variaciones entre hojas.
4. Poner las muestras en un frasco Erlenmeyer usando pinzas finas.
5. Limpiar el material de preparación con alcohol cuando se pase de una muestra a otra a fin de evitar contaminaciones con hifas y esporas.
6. Añadir a los frascos Erlenmeyer 15 mL de agua destilada o agua del río filtrada (0,5 µm de poro).
7. Poner los frascos Erlenmeyer en un agitador orbital a una velocidad que provoque una ola de cerca de 1 cm de alto. Si no hay agitador orbital, conectar una bomba aireadora de acuarios, usando una punta desechable de pipeta de 5 mL con el objetivo de crear una pequeña turbulencia (véase la fig. 11.8; técnica 25). Para comparar resultados es imprescindible usar siempre las mismas condiciones, ya que la tasa de esporulación depende de la turbulencia.
8. Mantener estas condiciones durante 24 a 48 horas. Es importante anotar el tiempo exacto, pues los resultados se expresan por unidad de tiempo. Es también de máxima importancia controlar la temperatura. Para ello, se puede mantener una temperatura similar a la del río donde el material fue recogido, o bien usar una temperatura constante próxima al promedio anual de las aguas en el río. Esta última opción permite comparar resultados de experimentos hechos en cualquier época del año.

Las hojas se incuban en el río, y posteriormente en el laboratorio, en un agitador orbital

Preparación para la observación

1. Al final del período de incubación, sacar los discos de hojas con unas pinzas largas, e introducirlos en el horno en cajas hechas con papel de aluminio. Secar a 50-60 °C hasta peso constante (en general, de 2 a 3 días).
2. Añadir 1 o 2 gotas de detergente a los frascos Erlenmeyer, donde se encuentra la suspensión de esporas.

3. Filtrar (5 μm de poro) un volumen apropiado de la suspensión, limpiando varias veces el Erlenmeyer (en caso que todo el volumen sea filtrado) con agua, así como las paredes del vaso de filtración.
4. Colocar el filtro en una placa de Petri pequeña, añadir unas gotas de azul de triptano hasta que todo el filtro quede húmedo, pero sin que se inunde.
5. Secar a 50-60 $^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente una hora. Los filtros así preparados se pueden guardar durante meses.

Conteos

1. Colocar el filtro en un portaobjetos. Si el filtro es mayor que el portaobjetos, cortar el filtro por la mitad.
2. Poner un cubreobjetos y observar a 400X. Contar el número de esporas por cada campo de microscopio (fig. 11.13).
3. Contar un mínimo de 100 esporas y 30 campos de microscopio.
4. Determinar el área del campo de microscopio, el área del filtro donde están retenidas las esporas (ligeramente más pequeña que el área total del filtro).
5. Las *tasas de esporulación* E (número de esporas por día y por mg de hoja) se estiman mediante la expresión:

$$E = \frac{n A/a}{t p} \quad (11.3)$$

donde n : número promedio de esporas por campo de microscopio, a : área del campo de microscopio (mm^2), A : área del filtro (mm^2), t : tiempo (días), y p : peso total (mg) de los discos de hojas (alternativamente, área total de los discos).

Figura 11.13:
Espora de Casaresia
sphagnorum

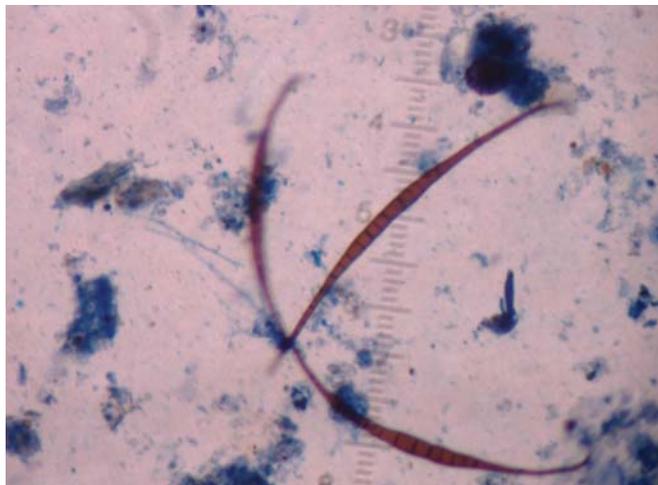


Foto: V. Ferreira.

Otras consideraciones

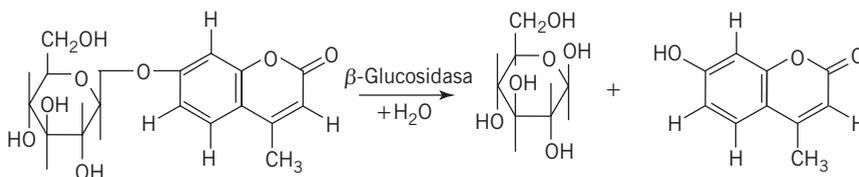
El número de esporas producido depende de las condiciones a las que las hojas estuvieron expuestas, de la calidad del sustrato y del tiempo de incubación. Valores entre 75 y 7000 esporas por g de hoja y por día han sido descritos en la literatura (Suberkropp 2001, Bärlocher 2005).

Técnica 27. Actividades enzimáticas extracelulares

Las enzimas extracelulares son sintetizadas principalmente por bacterias y hongos pero también por algunas algas y protozoos. Estas enzimas están ligadas a la superficie de la célula microbiana (o en el espacio periplasmático en las bacterias gramnegativas) y actúan fuera de la célula (Chróst 1991). En general, la expresión «actividad enzimática extracelular» se refiere a las enzimas ligadas a las células, pero también a las posibles enzimas libres (formando parte de la matriz polimérica en el biofilm o ligadas a partículas detríticas). El término *ectoenzima* se refiere específicamente a las enzimas ligadas a las células. Estas enzimas descomponen moléculas de alto peso molecular a moléculas de bajo peso molecular, que pueden incorporar directamente los microorganismos para ser metabolizadas y usar como fuente de materia orgánica (C, N y P). La tasa de descomposición de la materia orgánica depende directamente de esta actividad enzimática.

Las actividades enzimáticas extracelulares son una expresión del metabolismo microbiano heterotrófico

En la descomposición de la materia orgánica intervienen tanto enzimas hidrolíticas como oxidativas (peroxidasas, fenoloxidasas, responsables de la descomposición de lignina). En este capítulo se describe la técnica para la medida de actividades enzimáticas hidrolíticas mediante fluorescencia. Esta técnica se basa en la utilización de compuestos complejos (sustratos artificiales), que contienen el enlace sobre el cual actúa la enzima cuya actividad queremos medir. En un extremo de este enlace hay una molécula fluorescente (metilumbeliferona, MUF, o aminometilumarina, AMC), que emite fluorescencia solamente cuando está libre (gracias a la acción de la enzima; fig. 11.14). Las muestras se incuban con este sustrato artificial y se mide la fluorescencia final (es decir, los enlaces que han sido rotos por causa de la actividad de las enzimas presentes en la muestra). Los sus-



Nota: El sustrato artificial 4-metilumbeliferil- β -D-glucósido se descompone en D-glucosa y MUF gracias a la actividad de la (β -D- glucosidasa).

Figura 11.14: Diagrama de la reacción que tiene lugar durante la medición de la actividad de la enzima β -glucosidasa

Cuadro 11.7:
Enzimas extracelulares más habituales en estudios de ecología fluvial

Enzima	Sustrato artificial	Relacionada con el metabolismo de	Concentración
β -D-glucosidasa (EC 3.2.1.21)	MUF- β -D-glucopiranosido (o MUF- β -D-glucósido)	C (último paso de la descomposición de celulosa, celobiosa o pequeños oligómeros con enlaces β -D-glucosa)	0,01-0,5 mM
β -D-xilosidasa (EC 3.2.1.37)	MUF- β -D-xilopiranosido (o MUF- β -D-xilósido)	C (último paso de la descomposición de hemicelulosa, descomposición de xilobiosa o xilooligosacáridos)	0,01-0,5 mM
Celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91)	MUF-celobiósido	C (degradación de celulosa)	0,1-5 mM
Leucina-aminopeptidasa (EC 3.4.11.1)	Leu-AMC (L-leucina-4-metil-7-cumarinilamida)	N, C (descomposición de péptidos)	0,01-0,5 mM
Fosfatasa (EC 3.1.3.1-2)	MUF-fosfato	P (descomposición de ésteres de fosfato)	0,01-0,5 mM
β -N-acetilglucosaminidasa	MUF-N-acetil- β -D-glucosaminida	Degradación y síntesis de la pared fúngica. Degradación de quitina por parte de bacterias	0,01-0,5 mM
Quitinasa	MUF- β -N,N',N''-triacetilquitotriósido (MUF-[GlnNAc] ³)	Descomposición de quitina	0,01-0,5 mM

Nota: Se incluye el nombre de la enzima y el código de la EC (*Enzyme Commission*, clasificación universal de las enzimas), el sustrato artificial que se utiliza para su medición, el metabolismo en el cual está involucrada la enzima y el rango de concentración de sustrato artificial habitualmente utilizado en estudios en sistemas acuáticos.

tratos artificiales más utilizados y que existen en el mercado se resumen en el cuadro 11.7. En la mayoría de estudios se miden actividades enzimáticas extracelulares potenciales, es decir, en condiciones de saturación de la enzima, lo cual permite comparar muestras en distintas condiciones y en función del tiempo, pero dificulta acercarse a la actividad real en la naturaleza. Por ello, previamente al protocolo hay que realizar la cinética enzimática para determinar qué concentración utilizar para el estudio.

MATERIAL

- Viales de 100-125 mL de vidrio ámbar (o de polietileno) para guardar las soluciones de sustrato artificial y de los patrones madre de MUF y/o AMC.
- Viales de vidrio (de 15-30 mL) o frascos de centrífuga (tipo Falcon de 15 mL) para realizar la incubación.
- Matraces de 100 mL para preparar las soluciones patrón.
- Matraces de 1000 mL para preparar la solución tampón.

- Agitador para incubar los viales junto con los patrones y blancos, con control de temperatura.
- Centrífuga (necesaria para medidas en muestras con material en suspensión como suele ocurrir con el sedimento).
- Pipetas automáticas.
- Sustratos artificiales de la o las enzimas (cuadro 11.7).
- Patrón de MUF o AMC (según la actividad medida).
- Glicina (en polvo).
- Hidróxido sódico (lentejas).
- Agua Milli-Q.

PREPARACIÓN PREVIA DEL MATERIAL

Preparación de los sustratos artificiales fluorescentes

Los sustratos artificiales fluorescentes se diluyen en agua destilada y autoclavada y en viales ámbar (o cubiertos de la luz) para obtener una concentración de 10 mM. Esta solución concentrada se guarda en el congelador ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), se descongela y vuelve a congelar de inmediato cada vez que se utiliza. Algunos sustratos artificiales de MUF son de difícil disolución, como la MUF- β -glucósido y la MUF-celobiosido, y es necesario añadir 1-2 mL de hidroximetil éter en el sustrato en polvo para facilitar su disolución en agua y dejarlo unas 10-12 horas, en fresco ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) y a oscuras para minimizar la fotodegradación. En algún caso también será necesario sonicar la solución (fracciones de 5 minutos máximo con el fin de evitar el aumento de temperatura) para mejorar la disolución del sustrato en agua.

Preparación de patrones concentrados de MUF y AMC

Soluciones de MUF y AMC se disuelven con agua destilada y autoclavada a una concentración de $10\ 000\ \mu\text{M}$ y se guardan al congelador. Se descongelan cada vez que sea necesario preparar soluciones patrón.

Preparación de la solución tampón de glicina 0,05 M, pH = 10,4

Para obtener 1000 mL se toman 196,5 mL de glicina 0,2 M (18,76 g en 250 mL) y 803,5 mL de NaOH 0,2 M (8 g en 1000 mL). La solución tampón se prepara con agua destilada y se controla el pH final. Se puede guardar a temperatura ambiente en un recipiente de vidrio no expuesto a la luz.

Determinación previa de la concentración de sustrato artificial: cinéticas enzimáticas

Para medidas rutinarias se utilizan concentraciones de sustrato artificial en condiciones de saturación. Para analizar las actividades enzimáticas extracelulares potenciales hay que analizar previamente el comportamiento cinético de esta actividad. Para ello hay que realizar incubaciones a concentraciones crecientes del sustrato artificial (por ejemplo, 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 y 0,5 mM, en función

Es esencial determinar la cinética de la enzima cuya actividad queremos medir

de la muestra y la enzima que estemos midiendo, véase el cuadro 11.7). Los resultados se ajustan a una curva hiperbólica de Michaelis-Menten y se calcula la constante de saturación (K_m) y la velocidad máxima (V_{max}). Estos valores permiten decidir la concentración de saturación a utilizar en los ensayos de medidas potenciales. En la mayoría de trabajos con medidas de actividades enzimáticas potenciales esta concentración de saturación se encuentra alrededor de los 0,3 mM para comunidades bentónicas (un poco superior para la celobiohidrolasa, hasta 1 mM).

PROCEDIMIENTO

Recogida de muestras en el campo

El procedimiento de muestreo es básicamente el mismo que el descrito para el conteo de bacterias. Para las muestras bentónicas, debe considerarse un mínimo de cinco réplicas para cada actividad.

1. Muestreo según el cuadro 11.1. Las muestras bentónicas se guardan en agua del río filtrada (por filtros de nailon de 0,2 μm de diámetro para evitar contaminar la muestra bentónica con bacterias planctónicas) con un volumen conocido para que queden cubiertas (4-10 mL es suficiente). Es mejor utilizar agua del mismo río para no alterar las condiciones osmóticas y de nutrientes. Si el río es de cabecera y tiene una densidad bacteriana en transporte muy baja, es posible utilizar directamente agua del río sin filtrar.
2. Guardar las muestras bentónicas o de agua en viales estériles y en frío (nevera portátil) hasta el laboratorio. Empezar la incubación tan pronto como sea posible (el mismo día de muestreo o como máximo el día siguiente, guardando siempre las muestras en frío). Antes de empezar la incubación, sacar las muestras de la nevera para que adquieran la temperatura ambiente.

Extracción de la muestra

Siempre que se pueda se utiliza la comunidad microbiana intacta, y no un extracto en suspensión

Para medir las actividades enzimáticas de las comunidades adheridas o de biofilm (como cualquier otra medida metabólica) es preferible utilizar la comunidad microbiana intacta y no un extracto en suspensión. Por ello, se utilizan sustratos artificiales colonizados o muestras de hojarasca y sedimento (cuadro 11.1). En casos de muestras epífitas es muy complicado obtener un círculo de muestra representativa del total (fig. 11.3), por lo que, solamente en estos casos, se extrae la comunidad microbiana adherida.

Sumergir la muestra en un vial con un volumen conocido que la cubra, con agua del río filtrada por 0,2 μm de poro y sonicar en un baño de ultrasonidos (por ejemplo, tres veces 2 minutos, comprobar al microscopio si aún se observan algas adheridas, mantener siempre el mismo tiempo de sonicación). Tomar una sub-

muestra del líquido extraído para el análisis de la actividad. Tomar también una muestra para el control de la fluorescencia de la muestra.

Incubación

1. Preparar los materiales a incubar: muestras (bentónicas con un volumen conocido de agua y/o muestras de agua o del extracto de una muestra epifítica), blanco (agua Milli-Q, para cada actividad a medir, que permite controlar la degradación abiótica del sustrato artificial), control (muestra de agua del río para controlar la fluorescencia del agua), patrones de MUF o de AMC (en función de la actividad a medir). Es indicado que el volumen sea el mismo en todas las muestras a incubar.
2. Añadir a las muestras y al blanco un volumen del sustrato artificial (por ejemplo, de MUF-fosfato para medir fosfatasa) para tener la concentración final de saturación obtenida con la curva de saturación previa. En las muestras control no hay que añadir sustrato artificial alguno para la actividad (fluorescencia natural del agua).
3. Colocar las muestras en un agitador, a oscuras, y con control de la temperatura. La temperatura de incubación puede ser la misma que la del río o, alternativamente, se pueden realizar las incubaciones siempre a temperatura estándar de laboratorio (20 °C). El tiempo de incubación es de alrededor de 1 hora. Para muestras con actividades muy altas pueden utilizarse tiempos de incubación menores y también tiempos más largos para muestras poco activas. La linealidad de la actividad enzimática con el tiempo se mantiene durante los primeros 90 minutos, por lo que es conveniente no realizar incubaciones más largas. Es importante calcular con exactitud el tiempo de incubación para tener una buena medida de la actividad, y conviene utilizar siempre el mismo tiempo de incubación para las muestras del mismo río.
4. Añadir tampón de glicina 0,05 M de pH = 10,4, que desnaturaliza las proteínas y detiene la reacción enzimática. Este tampón básico también convierte el MUF y el AMC en sus formas aniónicas más fluorescentes. Se añade el tampón a todas las muestras, controles, blancos y patrones con una relación ½ v/v tampón/muestra.
5. En caso de tener muestras turbias (por ejemplo, muestras de sedimento), después de añadir el tampón, centrifugar levemente (por ejemplo, 4 minutos a 2000-3000 rpm). Tomar el sobrenadante para medir la fluorescencia.

La incubación se detiene con tampón de glicina

Medida de la fluorescencia

Medir la fluorescencia a 365 nm de excitación y 455 nm de emisión para el MUF y 364/445 excitación/emisión para el AMC en el fluorímetro, con cubeta de cuarzo de 10 mm. La cuantificación de la fluorescencia se realiza con soluciones patrones de MUF y AMC, y calculando la recta de calibración. La intensidad de la fluorescencia del blanco del sustrato y del blanco del agua se resta de todas las

muestras para corregir la posible hidrólisis no enzimática del sustrato y la presencia de compuestos fluorescentes en el agua.

Cálculo de las actividades enzimáticas

Las actividades enzimáticas se expresan como nmoles (o μ moles) de MUF o AMC liberados por hora y cm^2 de biofilm (epilítico) o de superficie proyectada del sustrato que se mide (epipsámico, epifítico) o por peso seco (epifítico) o por L (agua). En algunos casos (excluyendo la fosfatasa, que también es algal), la actividad enzimática específica se puede calcular por célula bacteriana, a pesar de que no se conoce la fracción de esta comunidad que, efectivamente, contribuye a la actividad metabólica analizada (Karner et al. 1992). También se puede expresar la actividad enzimática por unidad de biomasa microbiana (contenido de carbono microbiano del biofilm) o por el contenido de proteínas.

Las actividades enzimáticas pueden variar en función de múltiples factores, y especialmente de la cantidad y calidad de materia orgánica. El rango de valores es muy amplio y varía en función de la enzima que se mida (Romaní y Marxsen 2002).

11.3. Bibliografía

- ARTIGAS J., ROMANÍ A.M., y SABATER S. «Organic matter decomposition by fungi in a Mediterranean forested stream: Contribution of streambed substrata». *Annales de Limnologie* 40 (2004): 269-277.
- AUSUBEL F.M., BRENT R., KINGSTON R.E., MOORE D.D., SEIDMAN J.G., SMITH J.A., y STRUHL K, eds. *Current protocols in molecular biology*. Nueva Jersey: Wiley, 2008.
- BALDY V., y GESSNER M.O. «Towards a budget of leaf litter decomposition in a first-order woodland stream». *Comptes rendus de l'Academie des Sciences III-Vie*, 320: 747-758, 1997.
- BÄRLOCHER F. «Sporulation by aquatic hyphomycetes». En M.A.S. Graça, F. Bärlocher, y M.O. Gessner, eds. *Methods to study litter decomposition: A practical guide*. Dordrecht: Springer, 2005: 185-188.
- BÄRLOCHER F. «Molecular approaches applied to aquatic hyphomycetes». *Fungal Biology Reviews* 1 (2007): 19-24.
- BRATBAK G., y DUNDAS I. «Bacterial dry matter content and biomass estimations». *Applied and Environmental Microbiology* 48 (1984): 755-757.
- CHRÓST R.J. *Microbial enzymes in aquatic environments*. Nueva York: Springer-Verlag, 1991.
- DAVIS M.W., y LAMAR, R.T. «Evaluation of methods to extract ergosterol for quantification of soil fungal biomass». *Soil Biology and Biochemistry* 24 (1992): 189-198.
- DORIGO U., VOLATIER L., y HUMBERT J.F. «Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities». *Water Research* 39 (2005): 2207-2218.
- FREESE H.M., KARSTEN U., y SCHUMANN R. «Bacterial abundance, activity, and viability in the eutrophic river Warnow, Northeast Germany». *Microbial Ecology* 51 (2006): 117-127.
- FROMIN N., HAMELIN J., TARNAWSKI S., ROESTI D., JOURDAIN-MISEREZ K., FORESTIER N., TEISSIER-CUVELLE S., GILLET F., ARAGNO M., y ROSSI P. «Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGGE) fingerprinting patterns». *Environmental Microbiology* 4 (2002): 634-643.

- GESSNER M.O., y CHAUVET E. «Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes». *Applied and Environmental Microbiology* 59 (1993): 502-507.
- GESSNER M.O., y CHAUVET E. «Importance of stream microfungi in controlling breakdown rates of leaf litter». *Ecology* 75 (1994): 1807-1817.
- GESSNER M.O., y SCHMITT A.L. «Use of solid-phase extraction to determine ergosterol concentration in plant tissue colonized by fungi». *Applied and Environmental Microbiology* 62 (1996): 415-419.
- GESSNER M.O., BÄRLOCHER F., y CHAUVET E. «Qualitative and quantitative analyses of aquatic hyphomycetes in streams». En Tsui C.K.M., y Hyde K.D., eds. *Freshwater mycology*. Hong Kong: Fungal Diversity Press, 2003: 127-157.
- GESSNER M.O., GULIS V., KUEHN A., CHAUVET E., y SUBERKROPP K. «Fungal decomposers of plant litter in aquatic ecosystems». En C.P. Kubicek, y I.S. Druzhinin, eds. *Environmental and microbial relationships*. 2.ª ed. Berlín: Springer-Verlag, 2007: 301-324.
- GULIS V., MARVANOVA L., y DESCALS E. «An illustrated key to the common temperate species of aquatic hyphomycetes». En M.A.S. Graça, F. Bärlocher, y M.O. Gessner, eds. *Methods to study litter decomposition: A practical guide*. Dordrecht: Springer, 2005.
- HENDEL B., y MARXSEN J. «Extracellular enzyme activity associated with degradation of beech wood in a central european stream». *International Review Of Hydrobiology* 85 (2000): 95-105.
- INGOLD C.T. *An illustrated guide to aquatic and water-borne hyphomycetes (Fungi imperfecti) with notes on their biology*. Ambleside: Freshwater Biological Association Scientific Publication N.º 30, 1975.
- KARNER M., FUKS D., y HERNDL G. «Bacterial activity along a trophic gradient». *Microbial Ecology* 24 (1992): 243-257.
- KOWALCHUK G.A., DE BRUIJN F.J., HEAD I.M., AKKERMANS A.D., y VAN ES LAS J.D. *Molecular microbial ecology manual*. Nueva York: Springer, 2004.
- LUDWIG W., STRUNK O., WESTRAM R., RICHTER L., MEIER H., YADHUKUMAR, BUCHNER A., LAI T., STEPPI S., JOBB G., FÖRSTER W., BRETTSCHE I., GERBER S., GINHART A.W., GROSS O., GRUMANN S., HERMANN S., JOST R., KÖNIG A., LISS T., LÜSSMANN R., MAY M., NONHOFF B., REICHEL B., STREHLOW R., STAMATAKIS A., STUCKMANN N., VILBIG A., LENKE M., LUDWIG T., BODE A., y SCHLEIFER K.H. «Arb: A software environment for sequence data». *Nucleic Acids Research* 32 (2004): 1363-1371.
- NORLAND S. «The relationships between biomass and volume of bacteria». En P.F. Kemp, B.F. Sherr, E.B. Sherr, y J.J. Cole, eds. *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993: 303-307.
- PASCOAL C., y CÁSSIO F. «Linking fungal diversity to the functioning of freshwater ecosystems». En K.R. Sridhar, F. Bärlocher, y K.D. Hyde, eds. *Novel techniques and ideas in mycology*. Hong Kong: Fungal Diversity Press, 2008.
- PASCOAL C., MARVANOVA L., y CÁSSIO F. «Aquatic hyphomycete diversity in streams of North-West Portugal». *Fungal Diversity* 19 (2005): 109-128.
- PORTER K.G., y FEIG Y.S. «The use of dapi for identifying and counting aquatic microflora». *Limnology & Oceanography* 25 (1980): 943-948.
- PUSCH M., FIEBIG D., BRETTAR I., EISENMANN H., ELLIS B.K., KAPLAN L.A., LOCK M.A., NAEGLI M.W., y TRAUNSPURGER W. «The role of micro-organisms in the ecological connectivity of running waters». *Freshwater Biology* 40 (1998): 453-495.
- RODRIGUEZ G.G., PHIPPS D., ISHIGURO K., y RIDGWAY H.F. «Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria». *Applied and Environmental Microbiology* 58 (1992): 1801-1808.
- ROMANÍ A.M., FISCHER H., MILLE-LINDBLOM C., y TRANVIK L. «Interactions of bacteria and fungi on decomposing litter: Differential extracellular enzyme activities». *Ecology* 87 (2006): 2559-2569.

- ROMANÍ A.M., y MARXSEN J. «Extracellular enzyme activities in epilithic biofilms of the breitenbach». *Archiv für Hydrobiologie* 155 (2002): 541-555.
- SANTOS-FLORES C.J., y BETANCOURT-LÓPEZ C. «Aquatic and water-borne hyphomycetes (*Deuteromycotina*) in streams of Puerto Rico (including records from other neotropical locations)». *Caribbean Journal of Science, Special Publication 2* (1997): 1-116.
- SMITH E.M., y DEL GIORGIO P.A. «Low fractions of active bacteria in natural aquatic communities?» *Aquatic Microbial Ecology* 31 (2003): 203-208.
- STAHL P.D., y PARKIN, T.B. «Relationship of soil ergosterol concentration and fungal biomass». *Soil Biology and Biochemistry* 28 (1996): 847-855.
- SUBERKROPP K. «Fungal growth, production, and sporulation during leaf decomposition in two streams». *Applied and Environmental Microbiology* 67 (2001): 5063-5068.
- ZWART G., CRUMP B.C., KAMST-VAN AGTERVELD M., HAGEN F., y HAN S.K. «Typical freshwater bacteria: An analysis of available 16s rrna gene sequences from plankton of 500 lakes and rivers». *Aquatic Microbial Ecology* 28 (2002): 141-155.

La biota de los ríos: los microorganismos autótrofos

NORA GÓMEZ, JHON CHARLES DONATO, ADONIS GIORGI,
HELENA GUASCH, PILAR MATEO Y SERGI SABATER

12.1. Introducción

Las algas son organismos eucariotas o procariotas, uni o pluricelulares, sin estructuras de conducción, que presentan un amplio rango de tamaños. Estos productores primarios habitan una gran variedad de ambientes acuáticos. Algunos conforman el *plancton*, que es el conjunto de organismos que viven suspendidos en la masa de agua, y otros el *bentos*, o conjunto de organismos asociados al fondo o a plantas u objetos sumergidos (Wetzel 2001). La mayoría de las algas bentónicas están representadas por cianobacterias (llamadas cianófitas en la terminología botánica), algas verdes (clorófitas), diatomeas (bacillariófitas) y algas rojas (rodófitas). Por la cantidad de especies y la diversidad de sus formas de vida, las diatomeas son el principal grupo de algas en los ríos (Sabater 2008). En relación con el tipo de sustrato al que se asocian, distinguimos las *algas epífitas* (sobre la vegetación sumergida), las *algas epipélicas* (en sedimentos blandos limoarcillosos), las *algas epilíticas* (sobre sustratos duros) y las *algas epipsámicas* (asociadas a sustrato arenoso). En términos generales, las algas bentónicas tienen altas tasas de renovación y poseen estrategias vitales oportunistas que les permiten explotar con éxito diversos hábitats (Biggs 1996). Cuando los ríos tienen un flujo muy lento, mayor profundidad o altas concentraciones de nutrientes, el plancton puede alcanzar una importancia destacada.

Las algas bentónicas o planctónicas son, a menudo, los más importantes productores primarios en ríos

Todos los grupos de algas fluviales presentan clorofila *a* como pigmento fotosintético mayoritario. Las cianobacterias presentan, además, ficocianinas y ficoeritri-

na como pigmentos accesorios. Suelen frecuentar ambientes que sufren desecación y aguas con altas concentraciones de nutrientes, principalmente fósforo, aunque algunas especies dominan en aguas oligotróficas. Los euglenófitos presentan clorofila *a* y *b*, y suelen habitar ambientes con alto contenido de materia orgánica disuelta. Las clorófitas comparten con los euglenófitos la presencia de clorofila *a* y *b*. Algunos géneros como *Oedogonium*, *Stigeoclonium* y *Cladophora* pueden observarse a simple vista, ya que alcanzan varios centímetros. Las diatomeas presentan clorofila *a* y *c*, y fucoxantina como pigmento accesorio, que les otorga una coloración verde amarronada. Las rodófitas (como *Batrachospermum* e *Hildenbrandia*) presentan clorofila *a*, ficocianina y ficoeritrina, siendo el predominio de esta última la que les otorga su característica coloración rojiza.

Técnica 28. Muestreo y observación de algas no diatomeas

En esta técnica se describe cómo recolectar y acondicionar las algas bentónicas para su observación. Las técnicas específicas para diatomeas se detallan en la técnica 29, y las específicas de cianobacterias en la técnica 31.

MATERIAL

- Viales de cristal o plástico.
- Espátula, cuchillo o cepillo dental.
- Formaldehído al 40%.
- Corer de metacrilato (o jeringa sin su ápice).
- Tijeras.
- Cámara Palmer-Maloney (capacidad 0,1 mL).
- Cámara Sedgewick-Rafter (capacidad 1 mL).
- Cubreobjetos y portaobjetos.
- Pipetas Pasteur o cuentagotas.
- Microscopio de investigación.

PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

Muestreo sobre sustratos naturales

Dada la elevada variabilidad espacial de las comunidades algales, a menudo es necesario tomar réplicas en tres puntos distintos del tramo (de tres a cinco muestras por cada punto), ubicados en zonas con similar velocidad de la corriente, y separados entre sí por unos 50-150 m. Se recolectan muestras de sustratos naturales (rocas, cantos rodados o sedimentos finos) en tres puntos a lo largo de un transecto longitudinal. Los puntos de muestreo deben ubicarse en la parte central del cauce o, si no es posible, cerca de los márgenes, pero

asegurando siempre que el sustrato esté permanentemente sumergido. Es conveniente realizar una caracterización visual del área muestreada, reconociendo la presencia de macroalgas (como *Spirogyra*, *Batrachospermum*, etc.) y de biofilms de microalgas con distinta coloración para asegurar un muestreo representativo.

Para el muestreo de algas sobre *sustratos duros* de grandes dimensiones se obtienen las muestras de la superficie disponible más cercana. Cuando el material disponible es de cantos rodados o rocas de mediana dimensión, en cada punto de muestreo se recogen al azar rocas o cantos rodados de tamaño semejante. De cada roca se recolecta el material en una superficie definida, utilizando para ello una plantilla de superficie interna de 1 cm², y anotándose la superficie total muestreada. Para la remoción del material se emplean cepillos de dientes o bien navajas para el caso de material incrustante. Para lavar estos utensilios se emplea agua destilada, asegurándose que queden limpios antes de ser reutilizados en el próximo sitio a muestrear. El material colectado en cada muestra se introduce en un vial con unos 50 mL de agua del río, preferentemente filtrada para evitar la presencia de organismos planctónicos. Posteriormente se etiqueta la muestra; para su conservación se puede utilizar formol a concentración final del 4%.

Para el muestreo de *sustratos blandos* con predominio de limos y arcillas es aconsejable utilizar una pipeta de 10 mL a la cual se le secciona la parte inferior, colocando en el extremo contrario un aspirador manual (fig. 12.1). En la parte inferior se le acopla un adaptador de goma o plástico que permita apoyar en la superficie de los sedimentos, y así asegurar que se aspire la capa superficial (primeros 5-10 mm), que es la fotosintéticamente activa. En cada sitio de muestreo se recogen al menos 5 unidades muestrales de 1 cm² de superficie de los sedimentos.

Las algas sobre sustrato duro se muestrean por raspado



Figura 12.1:
Detalle del aspirador
de sedimentos finos

Figura 12.2:
Acondicionamiento de tallos
de macrófitos emergentes



Las algas sobre sustrato
blando se recogen de la
capa superficial

En el caso de sedimentos con predominio de arena se puede emplear un corer de metacrilato que permita la extracción de los primeros milímetros, o bien una jeringa a la cual se le seccione la parte inferior y se mantiene el émbolo del lado contrario para facilitar la extracción del material.

Si dominan *macrófitos* o *macroalgas* sumergidas en el tramo, es posible muestrear la planta entera (si es pequeña), o bien cortar una parte utilizando un cuchillo o tijera. Se debe guardar la planta o una parte de ella en una bolsa de plástico con cierre hermético (fig. 12.2). Recolectar cinco réplicas, evitando las partes sumergidas de las hojas flotantes (por ejemplo, nenúfares) que no reciban luz directa. Si dominan los macrófitos emergidos, las muestras se obtienen de porciones permanentemente sumergidas, seccionándolos a partir de 2 cm de la superficie del sedimento, para así evitar que se contaminen con éstos.

Para medidas cuantitativas debe secarse el macrófito o calcularse su superficie para referir el número de organismos encontrados en una unidad de biomasa o de superficie. Para uniformizar el muestreo se recomienda muestrear siempre las mismas especies de macrófitos o, en su defecto, especies de fisonomía similar.

Muestreo sobre sustratos artificiales

Los sustratos artificiales
son una buena
alternativa al muestreo
de sustratos naturales

Si la obtención de materiales de sustratos naturales resulta inviable, se pueden disponer sustratos artificiales que imiten los naturales más abundantes. Entre ellos se cuentan cristales esmerilados, cerámicos, arenas artificiales o plantas acuáticas artificiales. Se debe, en todo caso, probar la eficacia de estos materiales antes de usarlos rutinariamente, para verificar que realmente sean colonizados

por algas, y que su composición se parezca a la hallada sobre sustrato natural. Cuando se utilizan pegamentos o adhesivos se debe tener especial precaución en que no posean sustancias tóxicas. Dado que los sustratos artificiales suelen ser más homogéneos que los naturales, se puede reducir el número de réplicas, siendo tres el número más adecuado.

Observación y conteo

Para observar, identificar y contar las algas de la muestra se procede de diferente forma según se trate de diatomeas (técnica 29) o de no diatomeas. En este último caso se coloca una alícuota de muestra entre un portaobjetos y un cubreobjetos, observándolos con una magnificación adecuada y empleando distintos tipos de iluminación para observar mejor las estructuras (contraste interferencial, de fases, campo oscuro, etc.). También se pueden emplear tinciones distintas, según el grupo algal, para así facilitar la identificación (presencia de vainas, mucílago, almidón, etc.). Asimismo, es posible elaborar preparados semipermanentes sellando el portaobjeto y cubreobjeto con esmalte para uñas, lo que permitirá observar las muestras más tarde.

Para el conteo de las algas se pueden emplear cámaras (Palmer-Maloney o Sedgewick-Rafter). El uso de estos utensilios depende de las características del material; si predominan las formas filamentosas se recomienda la Sedgewick-Rafter. Se coloca una parte alícuota de la muestra previamente homogeneizada en la cámara de recuento. Una densidad de entre 10 y 20 células por campo resulta apropiada para el conteo, en caso contrario hay que diluir la muestra para facilitar la observación. Se deben identificar y contar 300-400 células. En el caso de formas filamentosas, se puede asumir una porción determinada, por ejemplo una longitud de 10 μm , como el equivalente a una célula; en ese caso, debe indicarse en el recuento final. Cuando se trata de algas muy pequeñas, se recomienda colocar un volumen reducido de muestra sobre un cubreobjetos y realizar el conteo a una magnificación de 1000X.

Hay que identificar y contar un mínimo de 300 células al microscopio

Para calcular la densidad de algas halladas en la cámara de recuento se debe tener en cuenta la cantidad de campos observados al microscopio y el volumen de muestra contenida en cada uno de ellos. Para el cálculo de este último se requiere conocer la profundidad de la cámara de recuento utilizada y la superficie del campo, que se calcula a partir del radio. Para el cálculo de la densidad se emplea la siguiente fórmula:

$$D_{spx} = \frac{N_{spx} \cdot V_t}{V_c \cdot A} \quad (12.1)$$

donde D_{spx} : densidad de la especie x (células por unidad de superficie o volumen), N_{spx} : número de células de la especie x , V_t : volumen total de la muestra (mL), V_c : volumen de los campos contados (mL), y A : área de sustrato muestreado (cm^2).

Una alternativa al método anterior consiste en utilizar una micropipeta de 50 μL para obtener una parte alícuota de muestra, que puede montarse directamente entre porta y cubreobjetos. Este último método subestima las algas de mayor tamaño, por lo que hay que observar numerosas partes alícuotas de la muestra para que el conteo realizado sea representativo.

Técnica 29. Tratamiento y análisis de diatomeas

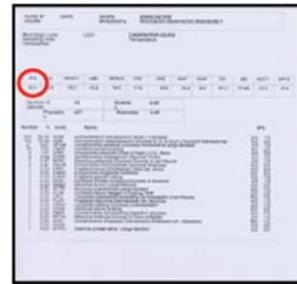
Las diatomeas se clasifican en función de su frústulo silíceo, lo que sólo puede hacerse tras eliminar la materia orgánica incluida en sus células

Se describe el tratamiento de muestras de diatomeas para eliminar la materia orgánica, y su posterior montaje en resina para su observación al microscopio. En la bibliografía del final del capítulo pueden encontrarse más detalles de los procedimientos y protocolos, así como las principales floras recomendadas.

MATERIAL

- Viales de cristal o plástico.
- Espátula, cuchillo o cepillo dental.
- Formaldehído al 40%.
- Reactivos de limpieza de diatomeas: HCl diluido; H_2O_2 al 30% (100 volúmenes).

Figura 12.3:
Secuencia de análisis en el estudio de diatomeas, desde el campo hasta la elaboración del inventario



- Otros reactivos de limpieza de diatomeas: H_2SO_4 concentrado; $KMnO_4$ en cristales.
- Campana de extracción de gases adecuada para ácidos.
- Cubreobjetos y portaobjetos.
- Resina artificial de alto índice de refracción (Naphrax, Hyrax o similar).
- Microscopio de investigación con objetivo de inmersión de alta apertura numérica.

LIMPIEZA DE LAS DIATOMEAS

Para una identificación adecuada de las diatomeas es necesario eliminar todo el contenido de materia orgánica celular o extracelular. Esto puede realizarse exponiendo la muestra a agentes oxidantes fuertes. En aguas ricas en carbonato cálcico se recomienda eliminar previamente los carbonatos con HCl diluido. Para limpiar los frústulos de las diatomeas se debe tratar la muestra con reactivos que permitan la digestión de la materia orgánica. Aunque hay diversas posibilidades, se recomienda digerir la materia orgánica mediante solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% (100 volúmenes). En caso de materia orgánica difícilmente digerible, como filamentosas, se puede optar por una digestión más enérgica mediante ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y permanganato potásico ($KMnO_4$) en cristales, añadiendo peróxido de hidrógeno como catalizador.

En los dos casos hay que limpiar los restos de reactivo mediante lavados sucesivos con agua destilada o desionizada. Los lavados pueden realizarse mediante filtros (0,4 μm de poro) o mediante centrifugación suave.

MONTAJE DE PREPARACIONES PERMANENTES DE DIATOMEAS

Una vez digerido el material, se coloca en un vial limpio con un volumen conocido de agua destilada. Se agita el vial y, con una pipeta Pasteur, se deposita el material en un cubreobjetos. Una vez evaporado el líquido, se procede al montaje con resina. Se requiere de un medio de montaje con un índice de refracción superior a 1,6 (recomendado el Naphrax).

Es conveniente realizar montajes permanentes de diatomeas

CONTEO E IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS

Hay que contar de 300 a 500 individuos, incluyendo todas las especies previamente identificadas. El conteo se realiza al microscopio de luz directa o con uno que esté provisto de contraste interferencial o de fases. En el análisis de rutina es aconsejable referirse a los individuos como valvas, y no como frústulos completos, ya que, a menudo, es difícil encontrar los organismos intactos con las dos valvas.

Las observaciones se hacen siempre con una magnificación de 1000X, usando aceite de inmersión y objetivos de gran apertura numérica.

Para el conteo de las valvas se recomienda efectuar transectos a lo largo del cubreobjeto con un desplazamiento horizontal o vertical, contando cada diatomea que quede incluida en el campo. La identificación de especies requiere el uso de monografías especializadas (cuadro 12.1).

Técnica 30. Fitoplancton

En ríos de bajo gradiente el fitoplancton puede alcanzar un buen desarrollo, resultando importante su estudio. A continuación se describe cómo deben ser colectadas y acondicionadas las muestras de fitoplancton para su observación.

MATERIAL

- Botellas de plástico de 100 mL de volumen.
- Ioduro de potasio con ácido acético o acetato de sodio al 70% (Lugol).
- Red de pesca de fitoplancton (Nytal o similar), de 25-30 μm de diámetro de poro.
- Columnas y cámaras de sedimentación de Utermöhl.

PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

Para los estudios cuantitativos se extraen muestras por triplicado en el centro del cauce, sumergiendo una botella en los primeros centímetros de la columna de agua. Se recomienda que las muestras tengan un volumen de unos 100 mL de agua. La recolección debe evitar resuspender material del fondo. En caso de tratarse de ríos anchos y profundos se pueden extraer muestras del centro y de las márgenes y a distintas profundidades. Las muestras son fijadas con dos o tres gotas de Lugol y almacenadas en la oscuridad.

Para extraer muestras cualitativas se emplean redes de plancton con apertura de poro inferior a 35 μm .

Observación y conteo

Para la identificación taxonómica detallada se recurre a muestras cualitativas, ya que las especies raras sólo aparecen de forma esporádica en las muestras cuantitativas. Para las diatomeas se puede emplear la técnica 29 y para las no diatomeas la técnica 28.

Se puede muestrear el fitoplancton de forma cuantitativa mediante botellas, o de forma cualitativa con el uso de redes

Anagnostidis y Komárek 1985
Anagnostidis y Komárek 1988
Anagnostidis y Komárek 1990
Bicudo y Picudo 1970
Coesel 1987
Comas 1989a
Comas 1989b
Comas 1990
Comas 1992
Comas 1996
Croasdale et al. 1983
Geitler 1932
Hegewald et al. 1980
Iltis 1984
Komárek y Anagnostidis 1986
Komárek y Anagnostidis 1989
Komárek y Anagnostidis 1999
Komárek y Anagnostidis 2005
Krammer 2002
Krammer y Lange-Bertalot 1986, 1991
Krieger y Bourrelly 1956
Lange-Bertalot 1993, 2001
Parra et al. 1982a
Parra et al. 1982b
Parra et al. 1982c
Parra et al. 1982d
Rivera et al. 1982
Steinitz-Kankan et al. 1982
Tell y Conforti 1986
Therezien 1985
Whitton, 2002
Yacubson 1980

Cuadro 12.1:

Segundas referencias bibliográficas de utilidad para identificar las algas de ambientes fluviales

Las muestras de fitoplancton se disponen en cámaras tubulares de sedimentación que son observadas en un microscopio invertido. La elección del volumen de la cámara de sedimentación depende de la concentración de fitoplancton en la muestra. Si hay más de 10 000 cel/mL las cámaras poco profundas (< 5 mL) pueden ser adecuadas. En caso contrario, se recomienda utilizar cámaras de sedimentación mayores. El tiempo de sedimentación requerido se calcula considerando que es necesario decantar 2 horas por cada cm de altura que tenga la cámara. La cantidad de campos que se debe contar depende de la frecuencia de las especies presentes en la muestra; es recomendable que se contabilicen al menos 100 individuos de la especie más frecuente. Los datos se expresan en cel/mL, de acuerdo con la ecuación 12.2. En el caso de especies filamentosas en las cuales las células sean de difícil observación, se puede asumir que la unidad corresponda a una porción determinada del filamento equivalente a una célula,

Las muestras de botella se concentran por sedimentación

por ejemplo, 10 μm . La magnificación de observación recomendable es de 400X o superior. La densidad algal de calcula mediante la siguiente ecuación:

$$N^{\circ} \text{ cel} / \text{mL} = CA_t / A_c T_c V \quad (12.2)$$

donde C : número de organismos contados, A_t : área total de la cámara de sedimentación (mm^2), A_c : área de un campo (mm^2), T_c : número total de campos contados, y V : volumen de muestra sedimentado (mL).

Para la determinación de fitoplancton se usa una gran variedad de manuales y monografías (cuadro 12.1).

Técnica 31. Recolección y análisis de cianobacterias

En determinados ríos las cianobacterias forman colonias macroscópicas (fig. 12.4a) o tapetes, pero normalmente aparecen como parte de los biofilms sobre piedras o sedimentos (fig. 12.4b).

MATERIAL

- Viales de cristal o plástico.
- Espátula, cuchillo o cepillo dental.
- Formaldehído al 40%.
- Medios de cultivo (descritos en el texto).
- Campana de gases que permita condiciones de esterilidad.
- Autoclave.
- Placas de Petri.
- Parafilm.
- Cámara Neubauer.
- Microscopio de investigación con contraste de fases o epifluorescencia.

Figura 12.4:
Colonias de cianobacterias
(a) o cianobacterias
formando parte de un
biofilm mixto (b)



PROCEDIMIENTO

Para muestrear cianobacterias del biofilm, se recogen al menos tres piedras del lecho del río por punto de muestreo. Éstas deben estar sumergidas, tener un cierto tapiz homogéneo en la cara superior, y ser de tamaño suficiente como para poder realizar el raspado del biofilm (de entre 4 y 5 cm de diámetro mínimo). Además, es necesario que el sustrato componente admita la extracción del tapiz sin romperse, y que sea representativo de la zona. Seleccionar una parte uniforme de

Las cianobacterias se muestrean por raspado del sustrato

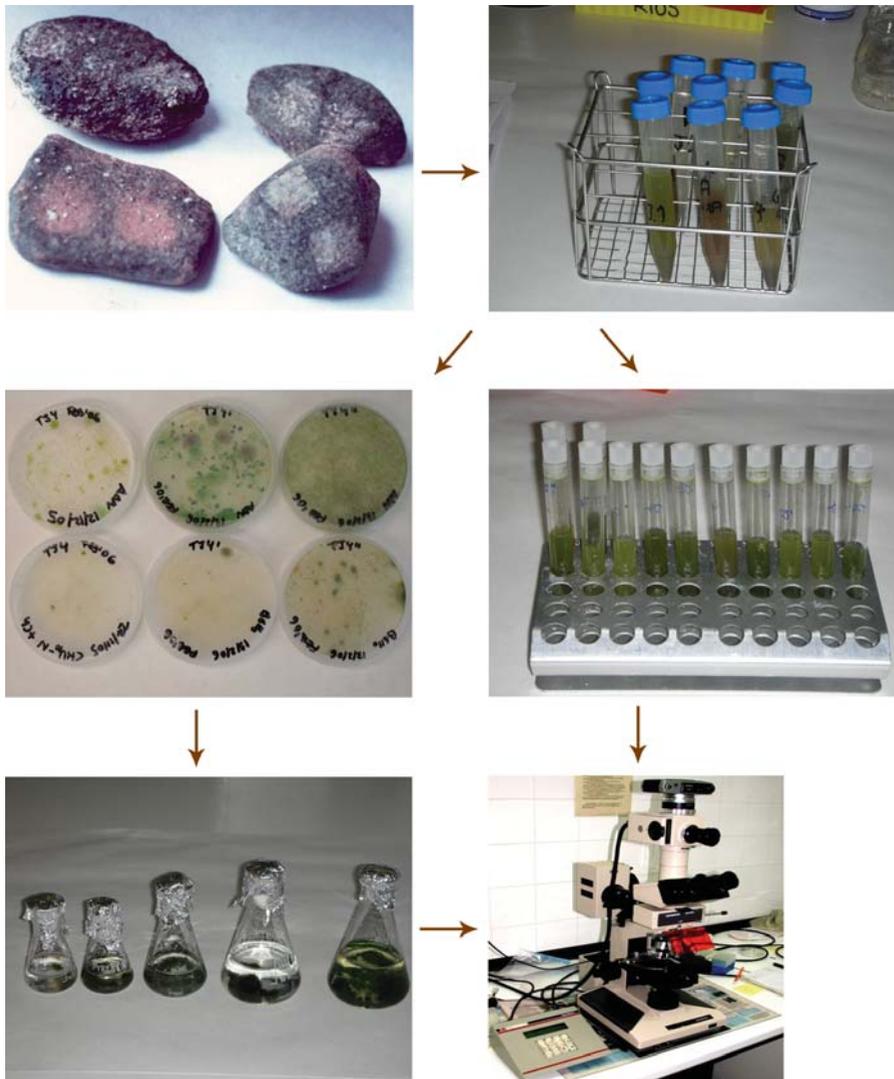


Figura 12.5: Secuencia recomendable en el análisis de cianobacterias desde su recolección hasta su identificación

la superficie rocosa, que permita un raspado fácil (4-16 cm²). Con un cepillo de cerdas no muy duras se raspa la superficie elegida. Todo el material utilizado debe ser previamente lavado con etanol para eliminar contaminaciones, y aclarado después con abundante agua destilada. El material extraído se resuspende en 5-10 mL de agua del río o de medio de cultivo para cianobacterias, si se quieren aislar las mismas según se especifica más adelante.

Para la posterior observación al microscopio, se separa una alícuota y se fija con formol a una concentración final del 4% (fig. 12.5).

CULTIVOS DE CIANOBACTERIAS

Algunos grupos de cianobacterias se deben cultivar para poder ser identificados

Los cultivos de cianobacterias son necesarios para ciertos grupos de taxonomía problemática, cuya identificación depende de conocer el ciclo vital, o para la observación de características morfológicas específicas, que se pueden propiciar en medios artificiales.

Composición de los medios de cultivo

Se pueden encontrar muchas recetas de medios de cultivos para el crecimiento y mantenimiento de cianobacterias en laboratorio. La elección de un medio de cultivo determinado depende de los objetivos planteados. En el caso que se trate de identificar las cianobacterias de un hábitat determinado, se cultivan en un medio de características semejantes a las encontradas en el río estudiado. Así, para cianobacterias

Cuadro 12.2:
Composición del medio de cultivo Chu No.10 D modificado

Componentes	Concentración
KH ₂ PO ₄	0,032 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,101 mM
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O*	0,250 mM
NaHCO ₃	0,188 mM
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,009 mM
Na ₂ -EDTA	0,010 mM
Microelementos	
H ₃ BO ₃	11,560 μM
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,229 μM
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,193 μM
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,028 μM
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,079 μM
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0,037 μM

* Para medio sin nitrógeno, se reemplaza este componente por CaCl₂·2H₂O a una concentración de 0,25 mM.

Componentes	Concentración
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0,180 mM
Na_2 -EDTA	0,003 mM
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,300 mM
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,250 mM
$NaNO_3^*$	17,650 mM
Ácido cítrico	0,029 mM
Citrato férrico amónico	0,020 mM
Na_2CO_3	0,190 mM
Microelementos	
H_3BO_3	46,00 μ M
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	9,10 μ M
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,77 μ M
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	1,60 μ M
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,32 μ M
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	0,17 μ M

* Para el medio BG11₀ (sin nitrógeno), se desestima este componente.

Cuadro 12.3:
Composición del medio
de cultivo BG11

nobacterias de ecosistemas fluviales hay que tener en cuenta, sobre todo, la concentración de nutrientes.

El *medio Chu No. 10 D modificado* (Chu 1942) es bajo en nutrientes, muy útil para dilucidar los rasgos morfológicos, citológicos y fisiológicos característicos de ciertas poblaciones que viven en medios oligotróficos (por ejemplo, *Rivulariaceae*). Además, si no se le añade fuente alguna de nitrógeno, se consigue el crecimiento de cianobacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico. Su composición en sales se muestra en el cuadro 12.2. El medio se tampona con HEPES [ácido 4-(2 hidroxietil)-1-piperacilil-etanosulfónico] a una concentración 2,5 mM y se ajusta el pH a 7,8.

El *medio BG11* (Rippka et al. 1979) utiliza concentraciones de nitrato muy altas y concentraciones de fósforo relativamente altas, salvo en el caso del BG11₀ (medio sin nitrógeno), donde no se añade fuente alguna de nitrógeno, potenciando así el crecimiento de las cianobacterias fijadoras. La composición y concentración de sales se muestran en el cuadro 12.3. El medio se tampona con HEPES a una concentración 2,5 mM y se ajusta el pH a 7,8.

El *medio de Allen y Arnon* (Allen y Arnon 1955) contiene altas concentraciones de nitratos y muy altas de fósforo. Este medio se ha diseñado para conseguir altos crecimientos celulares. La composición y concentración de sales se muestran en el cuadro 12.4.

En función de los
objetivos se pueden usar
distintos medios de
cultivo de cianobacterias

Cuadro 12.4:
Composición del medio de cultivo de Allen y Arnon

Componentes	Concentración
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	2,00 mM
NaCl	4,00 mM
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,00 mM
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,50 mM
Na ₂ -EDTA	76,75 μM
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	69,16 μM
NaNO ₃ *	6,25 mM
KNO ₃ *	6,25 mM
Microelementos	
H ₃ BO ₃	46,000 μM
MoO ₃	1,250 μM
MnCl ₂ ·4H ₂ O	9,100 μM
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,770 μM
NH ₄ VO ₃	0,196 μM
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,320 μM
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,170 μM

* En el caso del medio sin nitrógeno, se desestiman estos componentes.

Los medios se preparan en condiciones de esterilidad, a partir de reactivos de alta pureza, agua destilada y material previamente esterilizado. Para cada uno de los medios, se puede añadir además el antibiótico cicloheximida con una concentración final en el medio de 0,1 g/L. Se trata de un antibiótico que afecta a células eucariotas, impidiendo así el crecimiento de hongos, levaduras y algas verdes, lo que facilita el crecimiento de las cianobacterias, haciéndolas más competitivas. La preparación de la cicloheximida requiere usar guantes y mascarilla, puesto que es nocivo para el ser humano. Se esteriliza utilizando filtros estériles de 0,2 μm de diámetro de poro. La cicloheximida se deteriora fácilmente a altas temperaturas, por lo que se añade al medio una vez que está frío tras autoclararlo.

Preparación de medios de cultivo con agar en placas de Petri

Para poder aislar las cianobacterias y estudiar sus características con fines taxonómicos, es necesario sembrar el material extraído del biofilm en placas de Petri con medio de cultivo agarizado, que sirve a las cianobacterias de sustrato sobre el que crecer. Para ello, se utiliza medio de cultivo líquido y se combina con agar purificado (1,5% concentración final), con el fin de que adquiera un estado sólido.

Para la preparación de medios sólidos se ha de evitar esterilizar el medio de cultivo *BG11* con el agar, ya que se producen compuestos tóxicos. Para otros medios

quizá no sea el caso, pero sería aconsejable esterilizar el medio de cultivo y el agar en soluciones separadas al doble de su concentración, y mezclarlas sólo después de enfriar alrededor de 45 °C.

Siembra en placas de Petri

Debe sembrarse en un medio de cultivo y en condiciones lo más parecidas al medio natural, o favorecer el crecimiento con unas condiciones más idóneas, para así obtener una mayor efectividad en el aislamiento. Cuantas más variaciones se realicen más probable será obtener un mayor número de especies. Así, se recomienda sembrar en distintos medios de cultivo. El procedimiento se describe a continuación:

1. Agitar bien la muestra del material recolectado y tomar 0,3 mL que se añaden en la placa de Petri con el medio de cultivo agarizado.
2. Extender con un asa de siembra de vidrio de manera uniforme por toda la superficie de la placa.
3. Una vez completada la siembra, tapar cada placa, sellándola con parafilm y dejarlas boca arriba un día hasta que no haya líquido sobre las placas. Posteriormente, darles la vuelta y dejar crecer las cianobacterias sembradas. Los regímenes de temperatura y luz deben acercarse a las condiciones de su hábitat natural. Si no se dispone de un incubador se dejan a temperatura ambiente, en el laboratorio.
4. Dejar crecer durante 30-40 días. Realizar un seguimiento para que las colonias no lleguen a solaparse.

La siembra y la preparación de los medios de cultivos han de realizarse en campanas estériles de flujo continuo de aire. Si no se dispone de este material, deben realizarse cerca de la llama de un mechero para evitar contaminaciones por bacterias o por eucariotas.

Aislamiento de cianobacterias

Una vez transcurrido el período de incubación, observar en las placas, mediante la lupa binocular, las diferentes colonias que han crecido. Seleccionar y tomar muestras de las mismas con un capilar muy fino, fabricado estirando el extremo de una pipeta Pasteur bajo la llama de un mechero Bunsen. La muestra se coloca en un portaobjetos, se añade una gota de agua y el cubreobjetos, y se observa al microscopio. Una vez observada la colonia y la estirpe de cianobacteria, se repite la operación, sembrando el pequeño inóculo obtenido en otra placa de Petri con el mismo medio de cultivo. Se coloca en el incubador y se deja crecer. Una vez la estirpe crece bien en medio agarizado, se siembran esas colonias en medio de cultivo líquido, del que se podrán tomar después muestras para estudiar sus características taxonómicas.

Las cianobacterias se identifican al microscopio de contraste de fases o de epifluorescencia

Observación y recuento de las muestras fijadas

El análisis cuantitativo se realiza observando al microscopio las muestras fijadas con formol. Se toma una alícuota de la muestra previamente homogeneizada y se monta en una cámara Neubauer. Se cuentan de 300 a 500 células de las especies previamente identificadas, utilizando una magnificación 1000X y, si es necesario, contraste de fases. Es posible también emplear un microscopio con lámpara de epifluorescencia para facilitar el recuento. La autofluorescencia diferencial de las ficobiliproteínas (al excitarse con luz verde) permite visualizar y contar fácilmente las cianobacterias presentes. El recuento de cada muestra se realiza por duplicado.

Técnica 32. Pigmentos fotosintéticos

La estima de pigmentos fotosintéticos puede llevarse a cabo mediante espectrofotometría (técnica que se detalla a continuación) y por cromatografía. La técnica más común en este segundo caso es la *cromatografía líquida de alta presión* (HPLC). Ésta requiere un equipo adecuado (véase técnica 23) y patrones que permitan la identificación de cada uno de los pigmentos que aparecen en los cromatogramas. Su exactitud y precisión (permite la correcta identificación de los productos de degradación de las clorofilas y los distintos carotenoides) hacen aconsejable las medidas con HPLC cuando se requiera distinguir los pigmentos. Se recomienda al potencial interesado que consulte las obras de Zapata et al. (1987, Millie et al. (1993), y de Schmid y Stich (1995).

Técnica 32a. Pigmentos fotosintéticos por espectrofotometría

La clorofila *a* se utiliza como indicador de la biomasa algal

El análisis de clorofila permite estimar la cantidad de pigmentos fotosintéticos (que se estima como parte mayoritaria de la clorofila *a*). A la vez, este cálculo es representativo de la biomasa de los productores primarios (algas). Dadas las características diferenciales de los compartimentos planctónico y bentónico, la metodología debe ser distinta, aunque el material y los procedimientos son comunes en muchos de los pasos.

MATERIAL

La macro 12.1 permite calcular el contenido en clorofila de muestras tanto planctónicas como bentónicas

- Cubo de plástico (2-5 L) para recoger agua del río para clorofilas planctónicas.
- Jeringuilla de 60 mL y portafiltras Millipore (Swinnex-47).
- Papel de aluminio.
- Botes de plástico para recoger las muestras bentónicas.
- Cuadrado de superficie interna de 1 cm² que permita definir un área de muestreo sobre sustratos sólidos.

- Pinzas de plástico.
- Filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/F).
- Baño de ultrasonidos.
- Pipetas automáticas.
- Acetona al 90%.
- Medidor de luz en el campo y en el laboratorio.
- Espectrofotómetro de doble haz.
- Cubetas de cuarzo de 1 y 5 cm.
- Nevera portátil.

ANÁLISIS DE CLOROFILAS BENTÓNICAS

Recolección de las muestras

Recolectar muestras de los sustratos naturales (piedras, rocas) en tres puntos distintos del río no afectados por las condiciones litorales, y separados entre ellos unos 50-150 m. Si no hay piedras o es imposible recogerlas, obtener las muestras de la superficie disponible más cercana. En cada punto se recogen al azar cinco sustratos sólidos de tamaño semejante. De cada uno se recolecta el material en una superficie definida, utilizando para ello un cuadrado de superficie interna de 1 cm². Hay que recoger el material suficiente que permita obtener una medida correcta de clorofila. Debemos anotar el número de veces que se ha recogido material mediante el cuadrado. Anotar también la presencia de herbívoros en las muestras recogidas.

Etiquetar las muestras y guardarlas en viales de plástico en frío (nevera) y en la oscuridad (recubierto con hoja de aluminio) hasta su análisis en el laboratorio. Una vez en el laboratorio, congelar la muestra hasta el análisis, a ser posible a -20 °C.

Para muestrear sustratos blandos y epifiton seguir la técnica 28. Los sedimentos son sonicados durante 2 minutos para facilitar el desprendimiento de los especímenes adheridos a los mismos, repitiendo este procedimiento por lo menos tres veces. El sobrenadante es filtrado por un filtro Whatman GF/F.

En el caso del epifiton colocar la macrófita en agua destilada y sonicarla tres veces durante 2 minutos. Filtrar el líquido con material epifítico mediante un filtro Whatman GF/F.

Extracción de la clorofila

Describimos a continuación un procedimiento de extracción y lectura de pigmentos clorofílicos sin corrección por feopigmentos. Existen otros métodos (acidificación del extracto; Lorenzen 1967) que incluyen esta corrección, aunque su baja fiabilidad en muestras naturales desaconseja su uso. Debe aclararse que la estima con acidificación es aproximativa y, de buscarse una estima más exacta de la

Las muestras para pigmentos fotosintéticos se extraen igual que las de comunidades

La técnica espectrofotométrica que incluye corrección para feopigmentos es poco fiable

representación de los pigmentos derivados de la clorofila, es preciso usar cromatografía líquida de alta presión (HPLC). El procedimiento a seguir comprende los pasos siguientes:

1. Añadir de 5 a 10 mL de acetona al 90% en cada vial hasta cubrir totalmente la muestra.
2. Guardar la muestra y el extracto en la nevera de 8 a 12 horas. El disolvente orgánico extraerá la clorofila de las muestras.
3. Someter las muestras a un baño de ultrasonidos durante 2 minutos.
4. Efectuar una segunda adición de 5 mL de acetona al 90% y homogenizar la muestra mecánicamente hasta la total extracción de la clorofila.
5. Filtrar los extractos (Whatman GF/C) para disminuir la turbidez.
6. Leer las absorbancias a 665 y 750 nm, mediante un espectrofotómetro. La clorofila *a* absorbe principalmente a los 665 nm. El valor en 750 nm se utiliza para descontar la turbidez de la muestra, que no debería ser mayor a 0,015. El valor de la absorbancia a 430 indica concentración de carotenoides y otros pigmentos accesorios.
7. Estimar las concentraciones de clorofila mediante la expresión empírica siguiente:

$$Chl\ a = 11,4(A_{665} - A_{750})V / (LS) \quad (12.3)$$

donde *Chl a*: clorofila *a* (mg/m³), *A_x*: absorbancia a *x* nm, *V*: volumen del extracto (mL), *L*: longitud de la cubeta del espectrofotómetro (cm), y *S*: superficie de sustrato muestreado (cm²).

ANÁLISIS DE CLOROFILA PLANCTÓNICA

El compartimento planctónico corresponde al asociado a la columna del agua. Por tanto, previo a su análisis, debe ser filtrado o sedimentado.

Recolección de muestras

Recoger 2-5 litros de agua, en dos puntos distintos del río, distantes entre ellos 50-150 m, siempre en la zona de agua libre y, si es el caso, en coincidencia con las muestras de fitoplancton que se recojan. Filtrar el agua recogida en el campo, con una jeringuilla de 60 mL, un portafiltros Millipore (Swinnex-47) y filtros Whatman GF/F. Guardar los filtros en viales, en frío (4 °C) y en la oscuridad hasta su análisis.

Extracción y análisis de las muestras en el laboratorio

1. Poner 10 mL de acetona al 90% en los viales hasta cubrir bien el filtro.
2. Guardar las muestras en la nevera de 8 a 12 horas. El disolvente orgánico extraerá la clorofila de las muestras.

3. Someter las muestras a ultrasonidos durante 2 minutos.
4. Añadir 10 mL de acetona al 90%, y disponer el filtro en un homogenizador hasta su total desintegración.
5. Filtrar las muestras (Whatman GF/F) para disminuir la turbidez de la misma.
6. Leer las absorbancias a 630, 645, 665 y 750 nm, mediante un espectrofotómetro. La cubeta del espectrofotómetro suele ser de 1 o 5 cm de anchura; este dato es relevante y debe incorporarse a la ecuación.
7. Estimar las concentraciones de clorofila mediante la siguiente ecuación:

$$Chl a (\mu\text{g/L}) = \left[11,6(A_{665} - A_{750}) - 1,31(A_{645} - A_{750}) - 0,14(A_{630} - A_{750}) \right] V_e / (V_f L) \quad (12.4)$$

donde *Chl a*: clorofila *a* ($\mu\text{g/L}$), A_x : absorbancia a x nm, V_e : volumen del extracto (L), V_f : volumen filtrado (L), y L : longitud de la cubeta (cm).

La clorofila se mide con el espectrofotómetro

ANÁLISIS DE FICOBILIPROTEÍNAS BENTÓNICAS

Extracción y cuantificación

Se pueden llevar a cabo dos métodos distintos. Uno de ellos, basado en la extracción con tolueno, mide la ficocianina como pigmento mayoritario de las ficobiliproteínas. Este método es más rápido y sencillo, pero el tolueno es un disolvente orgánico tóxico, por lo que debe manipularse siempre con guantes y en campana extractora. Por este motivo, explicamos un segundo protocolo de extracción y cuantificación de ficobiliproteínas basado en el glicerol.

El método del tolueno es sencillo aunque debe operarse con cuidado

A. Extracción con tolueno

1. Tomar una parte alícuota de 2 mL del material en tubos Eppendorf y añadir 100 μL de tolueno, agitando enérgicamente durante 90 segundos.
2. Mantener en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante 4 horas.
3. Centrifugar los tubos Eppendorf a 14000 rpm durante 10 minutos para sedimentar los restos celulares.
4. Leer la absorbancia del sobrenadante a 620 nm, en una cubeta de 1 cm de anchura.
5. Estimar la concentración de ficocianina mediante la ecuación 12.5 (Blumwald y Tel-Or 1982):

$$PC = 135A_{620} \quad (12.5)$$

donde *PC*: concentración de ficocianina *c* ($\mu\text{g/mL}$), y A_{620} : absorbancia a 620 nm.

B. Extracción con glicerol

1. Tomar una alícuota de 1 mL de la muestra y centrifugar a 6-7 °C, 10000 rpm durante 10 minutos.

2. Descartar el sobrenadante, observando que el precipitado quede seco, y añadir 100 μL de glicerol.
3. Con ayuda de un homogenizador para tubos Eppendorf, homogeneizar la mezcla, sometiéndola posteriormente a un baño de ultrasonidos durante 3 minutos.
4. Transcurrido este tiempo, dejar reposar a 4 $^{\circ}\text{C}$ y en oscuridad durante un mínimo de 1 hora.
5. Someter las muestras a choque osmótico añadiendo 900 μL de agua destilada.
6. Volver a sonicar las muestras durante 1 minuto.
7. Centrifugar nuevamente a 6-7 $^{\circ}\text{C}$, 10000 rpm durante 10 minutos.
8. Analizar en el espectrofotómetro el sobrenadante, midiendo a 750, 652, 615 y 562 nm, mediante cubetas de 1 cm de anchura.

Para asegurar la extracción del total de ficobiliproteínas, al precipitado se le realizan extracciones sucesivas hasta que no tenga coloración verde azulada.

Calcular la concentración de ficobiliproteínas mediante la fórmula tricromática de Bennett y Bogorad (1973) (ecuaciones 12.6 a 12.8).

$$PC = (A_{615} - 0,474 A_{652}) / 5,34 \quad (12.6)$$

$$APC = (A_{652} - 0,208 A_{615}) / 5,09 \quad (12.7)$$

$$PE = [A_{562} - (2,41 PC) - (0,849 APC)] / 9,62 \quad (12.8)$$

donde PC : concentración de ficocianina c ($\mu\text{g}/\text{mL}$), APC : concentración de aloficocianina a ($\mu\text{g}/\text{mL}$), PE : concentración de ficoeritrina r ($\mu\text{g}/\text{mL}$), A_{615} : absorbancia a 615 nm, A_{652} : absorbancia a 652 nm, y A_{562} : absorbancia a 562 nm.

Técnica 32b. Estima de la eficiencia fotosintética y de la biomasa algal mediante fluorimetría

En los últimos años se han desarrollado diversas técnicas basadas en la fluorimetría. Este es un método alternativo para estudiar la producción primaria y determinar la biomasa algal. Existen *fluorímetros de pulsos de amplitud modulada* (como Phyto-PAM de Walz) que, excitando la clorofila simultáneamente con luz de distintas longitudes de onda (470, 525, 640 y 665 nm), permiten evaluar la biomasa de los distintos grupos algales presentes en una muestra. La precisión de los resultados depende de la complejidad de la muestra estudiada, y de la ca-

libración previa del aparato con patrones específicos, aspectos que no se desarrollarán aquí.

El fluorímetro de pulsos de amplitud moderada (PAM) utiliza tres tipos de luz distintos (*modulada, actínica y de saturación*) que permiten analizar la cinética de inducción de fluorescencia en organismos fotosintetizadores. Combina así la posibilidad de provocar el efecto Kautsky, mediante la realización de pulsos de luz saturante, con la medida de la emisión de fluorescencia (Schreiber 2004, Schreiber et al. 2002). Dicha combinación es posible gracias a un sistema selectivo de amplificación de los pulsos, con los que se registra sólo la fluorescencia generada por los pulsos de luz de medida.

El fluorímetro de pulsos de amplitud modulada permite determinar el contenido de pigmentos de forma no intrusiva

El uso del PAM permite estudiar varios parámetros relacionados con la fotosíntesis. Entre ellos, el *rendimiento fotónico efectivo*, Φ'_{PSII} , también llamado *eficiencia fotoquímica del PSII por fotón absorbido*, que ha sido utilizado para calcular la producción primaria. Este parámetro proporciona una estima de la eficiencia en el transporte de electrones en el aparato fotosintético. La *tasa total de transporte de electrones* (ETR) se obtiene multiplicando el rendimiento fotónico efectivo por el número de fotones absorbidos, y debería guardar una relación de proporcionalidad con la tasa de fijación de carbono. Dicha proporcionalidad se mantiene en condiciones de luz próximas a la saturación, pero pierde linealidad a irradiancias elevadas. En estas circunstancias se obtienen valores crecientes de tasa de transporte de electrones que no siempre corresponden a un incremento similar en la fijación de carbono, hecho que desaconseja la utilización del PAM como sustitutivo de otras estimas de producción primaria.

MATERIAL

- Fluorímetro de pulsos de amplitud modulada.
- Soporte específico de sujeción de la muestra con distancia fija al lector de fluorescencia.

ESTIMA DE LA BIOMASA ALGAL MEDIANTE LA FLUORESCENCIA BASAL (F_0)

Previo calibración del fluorímetro, se estima la biomasa algal sobre la base de los valores de fluorescencia basal (F_0), que es la que emite la clorofila sin excitación por la luz. Esta medida puede ser equivalente a la estima de clorofila, aunque no completamente en biofilms gruesos o en tejidos multicapas.

La fluorescencia basal sirve para estimar la cantidad de clorofila

Procedimiento

1. Fijar los parámetros de medida del aparato.
2. Colocar un soporte que permita mantener constante la distancia entre la muestra y el sensor.

3. Adaptar la muestra a la oscuridad durante un mínimo de 3 minutos.
4. Medir la emisión de fluorescencia a 470 nm para las algas verdes, a 520 nm para las diatomeas y a 645 nm para las cianobacterias.

ESTIMA DE LA EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA SOBRE LA BASE DEL RENDIMIENTO FOTÓNICO EFECTIVO: Φ'_{PSII}

El rendimiento fotónico efectivo permite estimar la eficiencia fotosintética de la comunidad

Para estimar el rendimiento fotónico es esencial controlar la temperatura y medir la luz incidente de forma precisa, dado que ambos parámetros afectan de manera sustancial a la medida realizada. Así pues, las medidas se realizan a 25 °C, en condiciones de saturación de luz, es decir, entre 80 y 350 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ (según la historia lumínica de las comunidades que se consideren).

Procedimiento

1. Fijar los parámetros de medida del aparato.
2. Colocar un soporte que permita mantener constante la distancia entre la muestra y el sensor.
3. Aplicar un pulso de saturación sobre una muestra iluminada y obtener el rendimiento fotónico efectivo. Se recomienda realizar un mínimo de tres medidas por muestra y utilizar un mínimo de tres muestras por punto de muestreo.
4. El rendimiento fotónico efectivo se calcula mediante la ecuación 12.9:

$$\Phi'_{PSII} = (Fm' - F) / Fm' \quad (12.9)$$

donde Φ'_{PSII} : rendimiento fotónico efectivo, F : emisión de fluorescencia basal, y Fm' : emisión máxima de fluorescencia provocada por un pulso de luz saturante sobre una muestra iluminada.

12.2. Bibliografía

- ALLEN M.B., y ARNON D.I. «Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm». *Plant Physiology* 30 (1955): 366-372.
- ANAGNOSTIDIS K., y KOMÁREK J. «Modern approach to the classification system of cyanophytes. 1.Introduction». *Archiv fur Hydrobiologie. Algological Studies* 38-39 (Suppl. 71) (1985): 291-302.
- ANAGNOSTIDIS K., y KOMÁREK J. «Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3. Oscillatoriales». *Archiv fur Hydrobiologie. Algological Studies* 50-53 (Suppl. 80) (1988): 327-472.
- ANAGNOSTIDIS K., y KOMÁREK J. «Modern approach to the classification-system of cyanophytes. 5. Stigonematales». *Archiv fur Hydrobiologie. Algological Studies* 59 (Suppl. 86) (1990): 1-73.
- BENNETT A., y BOGORAD L. «Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga». *Journal of Cell Biology* 58 (1973): 419-435.

- BICUDO C., y PICUDO R.H. *Algas do aguas continentais brasileiras*. Sao Paulo: Fundação Brasileira para o desenvolvimento do ensino do Ciências, 1970.
- BIGGS B.J.F. «Patterns in benthic algae of streams». En R.J. Stevenson, M.L. Bothwell, y R.L. Lowe, eds. *Algal ecology*. San Diego: Academic Press Inc, 1996: 31-56.
- BLUMWALD E., y TEL-OR E. «Osmoregulation and cell composition in salt-adaptation of *Nostoc muscorum*». *Archives of Microbiology* 132 (1982): 168-172.
- CHU S.P. «The influence of the mineral composition of the media on the growth of planktonic algae. Part 1. Methods and culture media». *Journal of Ecology* 30 (1942): 284-325.
- COESEL P.F.M. «Taxonomic notes on Colombian desmids». *Cryptogamie Algologie* 8 (1987): 127-142.
- COMAS A. «Taxonomische übersicht der Zonobialen Chlolorokkalkalgen von Kuba. I. Fam. Hydrodictyaceae». *Algological studies* 55 (1989a): 129-151.
- COMAS A. «Taxonomische übersicht der Zonobialen Chlolorokkalkalgen von Kuba. II. Fam. Coelastraceae». *Algological studies* 56 (1989b): 347-364.
- COMAS A. «Taxonomische übersicht der Zonobialen Chlolorokkalkalgen von Kuba. III. Fam. Scenedesmaceae». *Algological studies* 61 (1990): 55-94.
- COMAS A. «Taxonomische beiträge zur grunalgenflora (Chrorellales) Kuba». *Algological studies* 65 (1992): 11-21.
- COMAS A. «Las Chlorococcales dulceacuícolas de Cuba». *Bibl Phycol* 99 (1996).
- CROASDALE H.C., BICUDO C.E., y PRESCOTT G.M. *Desmidiaceae: Placodermae, section 5*. Lincoln y Londres: Nebraska Press, 1983.
- DESIKACHARY T.V. *Cyanophyta*. New Delhi: ICAR-Indian Council of Agriculture Research, 1959.
- FIGUEROA F.L., CONDE-ÁLVAREZ R., y GÓMEZ I. «Relations between electron transport rates determined by pulse amplitude modulated chlorophyll fluorescence and oxygen evolution in macroalgae under different light conditions». *Photosynthesis Research* 75 (2003): 259-275.
- GEITLER L. Cyanophyceae. En L. Rabenhorst, ed. *Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*. Koenigstein: Koeltz Scientific Books, 1932: 1-1196.
- HEGEWALD D.E., SCHNEPT E., y ALDAVE A. «Investigations on the lakes of Perú and their phytoplankton: 5. The algae of laguna Huaypo, Cuacu, with special reference to *Francia*, *Oocystis* and *Scenedesmus*». *Archiv fur Hydrobiologie* 56 (1980): 387-420.
- ILTIS A. «Algues du lac Titicaca et des lacs de la vallée d'Hichu Kkota (Bolivie)». *Cryptogamie Algologie* 5 (1984): 85-108.
- KOMÁREK J., y ANAGNOSTIDIS K. *Cyanoprokaryota. Chroococcales*. Jena: Gustav Fischer Verlag, 1999.
- KOMÁREK J., y ANAGNOSTIDIS K. «Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 2- Chroococcales». *Archiv fur Hydrobiologie* 46 (Suppl. 73) (1986): 157-226.
- KOMÁREK J., y ANAGNOSTIDIS K. «Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4-Nostocales». *Archiv fur Hydrobiologie. Algological Studies* 36 (Suppl. 82) (1989): 247-345.
- KOMÁREK J., y ANAGNOSTIDIS K. *Cyanoprokaryota: Oscillatoriales*. München: Elsevier, 2005.
- KRAMMER K. *Diatoms of Europe, volume 3: Diatoms of European inland waters and comparable habitats*. Ruggell, Liechtenstein: A.R.G. Gantner Verlag K.G., 2002.
- KRAMMER K., y LANGE-BERTALOT K. *Bacillariophyceae. Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Jena: Gustav Fischer Verlag, 1986-1991.
- KRIEGER W., y BOURRELLY P. «Desmidiacees des Andes du Venezuela». *Ergebn Deutsch Limnol Venezuela - expedition 1952* 1 (1956): 141-195.
- LANGE-BERTALOT H. *Bibliotheca diatomologica, 85 new taxa und über 100 weitere neu definierte taxa ergänzend zur süßwasserflora von Mitteleuropa*. Stuttgart: J. Cramer, 1993.

- LANGE-BERTALOT H. *Navicula sensu stricto 10. Genera separated from Navicula sensu lato. Frustulia*. Ruggell, Liechtenstein: A.R.G. Gantner Verlag K.G., 2001.
- MILLIE D.F., PAERL H.W., y HURLEY J.P. «Microalgal pigments assessments using high-performance liquid chromatography: A synopsis of organismal and ecological applications». *Can J Fish Aquat Sci* 50 (1993): 2513-2527.
- PARRA O., GONZÁLEZ M., DELLAROSSA V., RIVERA P., y ORELLANA M. *Manual taxonómico del fitoplancton de aguas continentales con especial referencia al fitoplancton de Chile. I. Cyanophyceae*. Santiago: Universidad de Concepción (Chile), 1982a.
- PARRA O., GONZÁLEZ M., DELLAROSSA V., RIVERA P., y ORELLANA M. *Manual taxonómico del fitoplancton de aguas continentales con especial referencia al fitoplancton de Chile. II. Chrysophyceae*. Santiago: Universidad de Concepción (Chile), 1982b.
- PARRA O., GONZÁLEZ M., DELLAROSSA V., RIVERA P., y ORELLANA M. *Manual taxonómico del fitoplancton de aguas continentales con especial referencia al fitoplancton de Chile. III. Cryptophyceae*. Santiago: Universidad de Concepción (Chile), 1982c.
- PARRA O., GONZÁLEZ M., DELLAROSSA V., RIVERA P., y ORELLANA M. *Manual taxonómico del fitoplancton de aguas continentales con especial referencia al fitoplancton de Chile. V. Chlorophyceae. Parte I. Volvocales*. Santiago: Universidad de Concepción (Chile), 1982d.
- RIPPKA R., DERUELLES J., WATERBURY J.B., HERDMAN M., y STANIER R.Y. «Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria». *Journal of General Microbiology* 111 (1979): 1-61.
- RIVERA P., PARRA O., GONZÁLEZ M., DELLAROSSA V., y ORELLANA M. *Manual taxonómico del fitoplancton de aguas continentales con especial referencia al fitoplancton de Chile. IV. Bacillariophyceae*. Santiago: Universidad de Concepción (Chile), 1982d.
- SABATER S. «Diatoms». En G. Likens, y J. Padisak, eds. *Water encyclopedia*, 2008 (en prensa).
- SCHMID H., Y STICH H.B. «HPLC-analysis of algal pigments: Comparison of columns, column properties and eluents». *Journal of Applied Phycology* 7 (1995): 487-494.
- SCHREIBER U. «Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: An overview». *Advances in Photosynthesis and Respiration* 19 (2004): 279-319.
- SCHREIBER U., GADEMANN R., BIRD P., RALPH P.J., LARKUM A.W.D., y KUHL M. «Apparent light requirement for activation of photosynthesis upon rehydration of desiccated beachrock microbial mats». *Journal of Phycology* 38 (2002): 125-134.
- STEINIZ-KANKAN M., NIENABER M., RIEDINGER M., OETTY-HARELL M., y MILLER M. «Estudios limnológicos en la laguna de San Marcos con descripciones de las especies principales de diatomeas». *Publ Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales* 3 (1982): 39-65.
- TELL G., y CONFORTI V. *Euglenophyta pigmentadas de la Argentina. Bibliotheca Phycologica-band 75*. Stuttgart: J. Cramer, 1986.
- THEREZIEN V. «Contribution a l'étude del algues d'eau douce de Bolivia, desmidiales». *Nova Hedwigia* 41 (1985).
- WETZEL R.G. *Limnology: Lake and river ecosystems*. San Diego: Academic Press, 2001.
- WHITTON B.A. «Phylum Cyanophyta». En D.M. John, B.A. Whitton, y A.J. Brook, ed. *The freshwater algal flora of the British Isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae*. Cambridge: Cambridge University Press, 2002: 25-122.
- YACUBSON S. «The phytoplankton of some freshwater bodies from Zulia state (Venezuela)». *Nova Hedwigia* 33 (1980): 279-339.
- ZAPATA M., AYALA A.M., FRANCO J.M., y GARRIDO J.L. «Separation of chlorophylls and their degradation products in marine phytoplankton by reversed-phase high-performance liquid chromatography». *Chromatographia* 23 (1987): 26-30.

La biota de los ríos: los macrófitos

CLAUDIA FEIJOÓ Y MARGARITA MENÉNDEZ

13.1. Introducción

Las plantas acuáticas ejercen una profunda influencia sobre el ambiente de los ríos, y juegan un papel preponderante en la estructura y funcionamiento de estos ecosistemas, especialmente en aquellos que reciben mucha luz debido a la ausencia de bosque ripario. A través de los procesos de fotosíntesis y respiración, y de su arquitectura y tasa de crecimiento, los macrófitos influyen mucho sobre diversos factores físicos y químicos, y sobre la microflora y fauna asociadas, a las que dan soporte, protección y alimento. En ríos donde forman comunidades densas, los macrófitos pueden constituir la principal comunidad productora (Vilches 2005), además de incrementar la heterogeneidad del hábitat. La arquitectura compleja de ciertas especies afecta a la velocidad de la corriente, a la disponibilidad de luz, y a diversas variables físicas y químicas, generando nuevos microhábitats que pueden ser ocupados por algas, invertebrados y peces. La densidad y diversidad de invertebrados y peces son más elevadas en las zonas cubiertas por macrófitos, donde pueden hallar alimento y refugio contra la depredación (Rozas y Odum 1988, Uvíra et al. 2005). Las plantas con mayor complejidad estructural suelen tener asociada una comunidad algal más desarrollada y mayor densidad y riqueza de invertebrados (Cattaneo y Kalff 1980, Taniguchi et al. 2003). En ríos como los pampeanos, donde los lechos están formados por sedimentos finos y no hay piedras o guijarros, la heterogeneidad de hábitat depende fundamentalmente de la vegetación acuática que, además, es un sustrato cuya estructura varía con el tiempo (Giorgi et al. 2005).

Los macrófitos tienen gran importancia en el hábitat y en el funcionamiento de ríos poco turbulentos y sin bosque ripario

Las interacciones entre macrófitos y algas epífitas son materia de controversia. Aunque es posible que los macrófitos actúen como un sustrato neutro en ambientes eutróficos, en sistemas oligotróficos serían un sustrato activo, brindándole nutrientes a los epífitos (Blindow 1987). Algunos autores han planteado que existe una relación simbiótica entre los macrófitos y los epífitos: los macrófitos proporcionan sustrato y nutrientes, mientras que los epífitos son consumidos por herbívoros que, de otra manera, atacarían a la planta; además, liberan dióxido de carbono y micronutrientes orgánicos (Brönmark 1989, Gopal y Goel 1993). Sin embargo, un crecimiento excesivo de las algas disminuye la fotosíntesis macrofítica, al interceptar la luz e influir sobre el intercambio de gases y nutrientes. La interacción entre macrófitas y perifiton, en definitiva, dependería de la concentración de nutrientes en agua, de las especies involucradas y de otras variables ambientales (Brönmark 1989). En cuanto a los invertebrados, los macrófitos les brindan alimento, refugio, sustrato para poner huevos o alcanzar la interfase aire-agua, y un entorno químico favorable, al aumentar la concentración de oxígeno disuelto durante el día y absorber sustancias tóxicas como amonio (Gopal y Goel 1993). Los macrófitos como fuente directa de alimento son menos importantes que las algas epífitas, e influyen menos en el ciclo del carbono de las redes tróficas bentónicas (France 1995), posiblemente debido a la liberación de sustancias alelopáticas que los defienden de los herbívoros, o a su baja calidad alimentaria.

13.2. Papel de los macrófitos en la dinámica de nutrientes

Los macrófitos pueden captar nutrientes del agua y del sustrato

Los macrófitos enraizados pueden absorber nutrientes de los sedimentos, aun en ambientes fértiles donde los efectos de las plantas sobre el potencial redox del sustrato son mínimos, debido a la acumulación de materia orgánica en descomposición (Barko et al. 1991). En ambientes oligotróficos, este mecanismo introduce nutrientes al sistema que, de otra manera, no estarían disponibles para los autótrofos (Barko y Smart 1980). Los macrófitos también pueden captar nutrientes del agua, pero su papel en la disminución de la carga de nutrientes en arroyos no es tan importante debido a los cambios estacionales que sufre su biomasa (Feijoó 2000). La estequiometría de los macrófitos es bastante estricta, por lo que su concentración tisular se relaciona poco con la disponibilidad de nutrientes. Esto limita el valor de los macrófitos como bioindicadores de eutrofización, aunque se observan cambios en la respuesta específica en función de la carga de nutrientes (Demars y Edwards 2007).

Durante la senescencia, los macrófitos pueden liberar importantes cantidades de fósforo, nitrógeno y materia orgánica al agua, materia que suele descomponerse más rápidamente en ecosistemas acuáticos que en terrestres. En la necromasa, el fósforo se suele liberar más rápido que el carbono, mientras que el nitrógeno lo

hace más lentamente, generalmente en forma de amonio (Feijoó 2000). La senescencia, al final del período vegetativo, contribuye a la disminución de la concentración de oxígeno disuelto y, en condiciones anaeróbicas, promueve la sedimentación de gran cantidad de materia orgánica refractaria (Barko et al. 1991). En plantas no senescentes también se ha observado liberación activa de fósforo y nitrógeno, aunque en pequeñas cantidades; en el caso del primer nutriente, no supera el 10% del fósforo movilizado desde el sedimento (Barko y Smart 1980).

Técnica 33. Estructura y biomasa de comunidades macrofíticas

Para el seguimiento de las comunidades de macrófitos en los ríos, es importante registrar las especies presentes, su biomasa, así como la superficie y distribución de las manchas de macrófitos en el tramo estudiado. En algunos estudios también puede resultar de interés analizar la composición de los pigmentos fotosintéticos en los tejidos vegetales, dado que estas medidas pueden dar información sobre el estado fisiológico de la planta y las posibles adaptaciones a la radiación luminosa recibida.

Además de estudiar la composición y biomasa, es interesante analizar la distribución espacial de los macrófitos

MAPEO DEL TRAMO

Material

- Regla de 1,5 metros para medir la profundidad del cauce.
- Cinta métrica de 25 m.
- Cuerdas.
- Estacas para identificar las áreas de estudio.
- Martillo.

Procedimiento

Para realizar este mapeo, se establecen transectos distanciados entre 0,5 y 2 m a lo largo del tramo a estudiar (fig. 13.1), dependiendo del tamaño de los manchones de macrófitos y de la longitud del tramo. En dichos transectos se estima

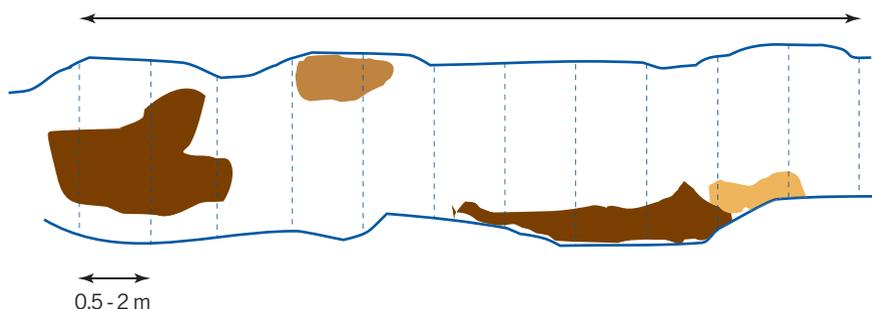
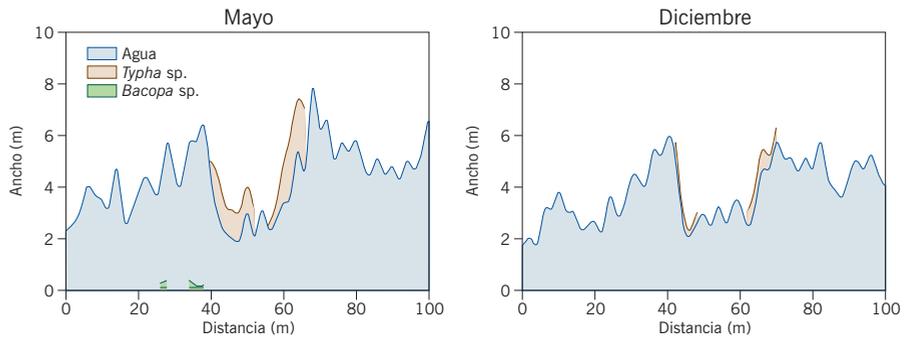


Figura 13.1:
Esquema de los transectos para determinar la superficie cubierta por cada especie de macrófito

Figura 13.2:
Distribución de los manchones de macrófitos en dos épocas del año en un río pampeano



la cobertura total del manchón y la cobertura de cada especie de macrófito, midiendo la longitud del transecto cubierta por agua y por cada especie.

Los mapeos se realizan a partir de transectos espaciados regularmente

Es conveniente realizar este mapeo antes de extraer muestras para estimar la biomasa macrofítica. A partir de esta información se pueden elaborar mapas que permitan la comparación visual de los distintos muestreos (fig. 13.2).

A partir de estas gráficas se pueden estimar las áreas cubiertas por cada manchón de macrófitos usando algún programa de tratamiento de imágenes. Si dentro del mismo plan de muestreo se realizan estimaciones de biomasa, esta información puede combinarse con las áreas de los manchones para referir la biomasa a escala de tramo, lo que permite realizar comparaciones entre diferentes tramos y ríos.

ESTIMACIÓN DE LA BIOMASA

Material

- Marco de madera de 20 × 20 cm de luz (o de 15 × 15 cm si los manchones de macrófitos fueran pequeños).
- Cover de PVC o metal.
- Marco metálico de 20 × 20 cm de luz.
- Cedazo de 1 mm de poro.
- Tijeras de campo.
- Bolsas de plástico transparentes.
- Nevera portátil.
- Estufa.
- Balanza con precisión de 0,01 g.

Procedimiento de campo

Se toman muestras en los manchones de macrófitos utilizando el marco de madera. En el caso que se quiera determinar la biomasa subterránea se puede utili-

zar un *corer* (Menéndez y Comín 1989) o si el sustrato es blando, un marco metálico que se pueda clavar en el sedimento. La muestra se pasa por un cedazo para separar el sedimento del material vegetal. Hay que cuidar el mantenimiento de la comunidad macrofítica, dado que el riesgo de sobremuestreo suele ser alto en ríos pequeños. Como referencia, en un tramo de 100 m de longitud con una presencia de macrófitos medianamente abundante, suelen bastar entre 6 y 10 muestras. Se debe evitar tomar muestras en machones pequeños, donde la extracción puede llevar a su desaparición. Las muestras se ubican al azar dentro de cada manchón. Con una tijera, se corta toda la biomasa que se observe dentro del marco, desde la superficie hasta el fondo. Las muestras extraídas se guardan en bolsas y en frío hasta su traslado al laboratorio.

Procedimiento de laboratorio

Es conveniente realizar el tratamiento de las muestras de macrófitos en laboratorio el mismo día de la recolección. Si esto no fuera posible, pueden guardarse un día en nevera y oscuridad. Las muestras se lavan para extraer las algas filamentosas e invertebrados asociados a las plantas. El lavado se realiza con agua de grifo y sobre un tamiz, recogiendo el material vegetal pequeño que pudiera quedar sobre el tamiz con una pinza. El material lavado se separa por especies y se coloca en bandejas de aluminio de peso conocido, registrando su tipo funcional. Habitualmente se consideran los siguientes tipos funcionales:

Emergentes: especies arraigadas al sustrato y cuyas hojas emergen por encima de la superficie del agua. Ejemplos: *Typha*, *Schoenoplectus*, *Ludwigia*, *Iris*, etc. (fig. 13.3).

Sumergidos: especies arraigadas o libres, que presentan sus hojas totalmente sumergidas. Ejemplos: *Egeria*, *Elodea*, *Ceratophyllum*, *Myriophyllum*, etc. (fig. 13.4).

Flotantes: especies que no están arraigadas al sustrato y que flotan sobre la superficie del agua. Ejemplos: *Lemna*, *Azolla*, *Pistia*, *Eichhornia*, *Ricciocarpus*, etc. (fig. 13.5).



Figura 13.3:

Ejemplos de especies emergentes: a la izquierda Iris pseudacorus, y a la derecha Rorippa nasturtium-aquaticum e Hydrocleys nymphoides

Figura 13.4:

Ejemplos de especies sumergidas: a la izquierda *Myriophyllum* sp y a la derecha *Potamogeton* sp



La biomasa se determina a partir del peso seco o de peso seco libre de cenizas

Secar las muestras en estufa a 60 °C hasta peso constante (en general, entre 3 y 5 días). Retirarlas de la estufa y dejar enfriar en desecador antes de pesarlas en balanza con precisión de 0,01 g. La biomasa se expresa en g/m². Una vez determinada la biomasa, las muestras secas pueden utilizarse para medir el contenido de carbono, nitrógeno y fósforo.

ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE PIGMENTOS

Material

- Homogeneizador de cristal.
- Acetona 90%.
- Filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C.
- Espectrofotómetro.

Procedimiento de campo

Para determinar el contenido de pigmentos hay que tomar muestras del tejido a examinar que, a modo orientativo, pueden ser de 0,5 cm². Las muestras deben ser

Figura 13.5:

Las macrófitas flotantes
Pistia stratiotes
y *Azolla filiculoides*



representativas del material a estudiar, y se deben recolectar varias réplicas (entre tres y seis) de material vegetal en distinto estadio de desarrollo (hojas jóvenes y viejas). Las muestras deben protegerse de la luz durante el transporte al laboratorio, ya que la luz es uno de los factores que más afecta a la degradación de la clorofila. Es preferible analizar las muestras lo más pronto posible, aunque se pueden conservar protegiéndolas de la luz en frío (a menos de 5 °C) durante 24 horas. Si se desea conservarlas más tiempo se deben congelar.

Procedimiento en laboratorio

Existen varios disolventes para extraer pigmentos vegetales, pero el más utilizado por su baja toxicidad es la acetona al 90%. Es necesario triturar el material con un homogeneizador como el Potter-Elrehjem (fig. 13.6) o un mortero de mano al que se le añade arena de cuarzo, a temperatura ambiente. Se recomienda utilizar un volumen de acetona entre 5 y 6 mL para facilitar el triturado y posteriormente añadir pequeñas cantidades de acetona (unos 2 mL) para limpiar el triturador.

La muestra se tritura hasta que no se puedan distinguir pedazos de tejido y la pasta sea homogénea. Seguidamente el extracto se filtra a través de un filtro de fibra de vidrio de 0,45 μm (Whatman GF/C). Se mide el volumen final del extracto y su absorbancia en un espectrofotómetro. El extracto debe ser transparente; para confirmar esta transparencia se mide la absorbancia en el espectrofotómetro a 750 nm, longitud de onda a la cual las clorofilas no presentan absorción. Esta absorbancia nos da idea de la turbidez de la muestra y se debe restar a los valores

La clorofila se mide por espectrofotometría



Figura 13.6:
*Homogeneizador de vidrio
Potter-Elrehjem*

de absorbancia a 664 y 647 nm, que son los correspondientes a los máximos de absorción de la clorofila *a* y *b*. Este procedimiento debe llevarse a cabo de manera que la luz incida lo menos posible sobre la muestra y el extracto. Las ecuaciones más utilizadas son las de Jeffrey y Humphrey (1975):

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg/L)} = 11,93 (A_{664} - A_{750}) - 1,93 (A_{647} - A_{750}) \quad (13.1)$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (mg/L)} = 20,36 (A_{647} - A_{750}) - 5,50 (A_{664} - A_{750}) \quad (13.2)$$

donde A_x : absorbancia a la longitud de onda x nm.

Las concentraciones de clorofila se deben corregir para el volumen del extracto y para el peso fresco, seco o superficie, de la submuestra empleada para obtener el extracto:

Clorofila (mg/g tejido) = Clorofila (mg/L) × Volumen extracto (L)/Peso fresco submuestra (g).

13.3. Agradecimientos

A Nicolás Ferreyro por la preparación de las figuras que ilustran este capítulo.

13.4. Bibliografía

- BARKO J.W., GUNNISON D., y CARPENTER S.R. «Sediment interactions with submersed macrophyte growth and community dynamics». *Aquatic Botany* 41 (1991): 41-65.
- BARKO J.W. y SMART R.M. «Mobilization of sediment phosphorus by submersed freshwater macrophytes». *Freshwater Biology* 10 (1980): 229-238.
- BLINDOW I. «The composition of epiphyton on several species of submerged macrophytes - the neutral substrate hypothesis tested». *Aquatic Botany* 29 (1987): 157-168.
- BRÖNMARK C. «Interactions between epiphytes, macrophytes and freshwater snails: A review». *Journal of Molluscan Studies* 55 (1989): 299-311.
- CATTANEO A., y KALF J. «The relative contribution of aquatic macrophytes and their epiphytes to the production of macrophytes beds». *Limnology and Oceanography* 25 (1980): 280-289.
- DEMARS B.O.L., y EDWARDS A.C. «Tissue nutrient concentrations in freshwater aquatic macrophytes: High inter-taxon differences and low phenotypic response to nutrient supply». *Freshwater Biology* 52 (2007): 2073-2086.
- FEIJO C. *Ciclo de vida y dinámica poblacional de Egeria densa planch. (Hydrocharitaceae) en un arroyo de llanura*. Tesis doctoral. Argentina: Universidad Nacional de La Plata, 2000: 168.
- FRANCE R.L. «Stable isotopic survey of the role of macrophytes in the carbon flow of aquatic foodwebs». *Vegetatio* 124 (1995): 67-72.

- GIORGI A., FEIJOÓ C., y TEL G. «Primary producers in a Pampean stream: Temporal variation and structuring role». *Biodiversity and Conservation* 14 (2005): 1699-1718.
- GOPAL B., y GOEL U. «Competition and allelopathy in aquatic plant communities». *Botanical Review* 59 (1993): 155-210.
- JEFFREY S.W., y HUMPHREY G.F. «New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c1* and *c2* in higher plants, algae and natural phytoplankton». *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 167 (1975): 191-194.
- MENÉNDEZ M., y COMÍN F.A. «Seasonal patterns of biomass variation of *Ruppia cirrhosa* (Peltagna) Grande and *Potamogeton pectinatus* L. in a coastal lagoon». *Scientia Marina* 53 (1989): 633-638.
- ROZAS L.P., y ODUM W.E. «Occupation of submerged aquatic vegetation by fishes- testing the roles of food and refuge». *Oecologia* 77 (1988): 101-106.
- UVÍRA V., UVÍROVÁ I., y KOMÁREK O. «Comparison of macrozoobenthic community structure within vegetative and mineral substrata in a stream rich in submerged macrophytes». *Verhandlungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 29 (2005): 1054-1058.
- VILCHES C.S. *Comparación del metabolismo en productores del Arroyo Las Flores*. Tesis de licenciatura. Luján: Universidad Nacional de Luján, 2005: 83.

La biota de los ríos: los invertebrados

ALBERTO RODRIGUES-CAPÍTULO, ISABEL MUÑOZ,
NÚRIA BONADA, AINHOA GAUDES Y SYLVIE TOMANOVA

14.1. Introducción

Los invertebrados se encuentran entre los organismos que mejor se han adaptado a los ecosistemas fluviales, ya que viven en la mayoría de los arroyos y ríos de todo el mundo, con excepción de aquellos más efímeros o muy contaminados. Además, la densidad y diversidad de invertebrados suele ser muy elevada, habiéndose encontrado hasta un millar de especies en arroyos particularmente bien estudiados. Entre los taxones más comunes de los sistemas fluviales se incluyen insectos, crustáceos, anélidos, moluscos, nematodos, planarias, briozoos y cnidarios. Habitan en los sedimentos, tanto blandos como rocosos, así como en plantas sumergidas. Los ecólogos suelen distinguir entre macroinvertebrados y meiofauna. Los macroinvertebrados son los animales retenidos por una malla de 500 μm (Hauer y Resh 2006), aunque en etapas tempranas de su desarrollo pueden pasar a través de dicha malla. Por su parte, la meiofauna está constituida por organismos menores, que habitualmente son capturados con mallas más finas (32 μm según Higinis y Thiel 1988). Los invertebrados juegan un papel fundamental en la transferencia de energía desde los recursos basales (macrófitos, algas, detritus y microbios asociados) hacia los consumidores superiores de las redes tróficas (vertebrados acuáticos, aves), y constituyen el principal recurso alimentario para muchas especies de peces.

Los invertebrados constituyen un grupo de elevada diversidad y gran importancia ecológica

La elevada diversidad de las comunidades de macroinvertebrados implica que en cualquier tramo de río habita un elevado número de especies poco frecuentes o

raras, que sólo aparecen si se realiza el esfuerzo de muestreo suficiente. Además, estas comunidades son muy variables en el espacio y en el tiempo, lo que complica aún más el muestreo. Por si eso fuera poco, muchos invertebrados fluviales son muy exigentes con su hábitat, por lo que el estudio de la composición, abundancia y diversidad de las comunidades debe basarse en programas de muestreo que recojan la variabilidad en los hábitats más representativos (Barbour et al. 1999, ISO 1985). La sensibilidad ante la degradación ambiental y la facilidad de estudio ha hecho que se desarrollen innumerables métodos para la biomonitorización basados en los invertebrados. No mostraremos aquí ninguno de esos métodos, aunque los protocolos explicados pueden utilizarse también con este fin.

La clasificación general de invertebrados en grupos tróficos funcionales debe adaptarse a cada zona de estudio mediante el análisis de contenidos estomacales

Aparte de la información que proporcionan sobre la calidad del agua y otras características del medio fluvial, los invertebrados tienen gran importancia en los ecosistemas fluviales. Un punto que ha levantado gran interés es el de su papel funcional. A diferencia de los invertebrados terrestres, muchos de los cuales se alimentan de unas pocas especies de presa, los invertebrados fluviales han evolucionado en un medio impredecible, lo que les ha llevado a desarrollar dietas generalistas y estrategias oportunistas. Sin embargo, sobre la base de su estrategia de alimentación se pueden agrupar en grupos tróficos funcionales (Merritt y Cummins 1996), y numerosos trabajos han mostrado cómo cambia la estructura trófica de la comunidad de unos ríos a otros. De todas formas, la clasificación de Merritt y Cummins debe ser complementada localmente para ajustarla a la fauna regional. Para ello es necesario analizar los contenidos estomacales (técnica 48), lo que permite cuantificar la dieta alimentaria estimando la densidad y biomasa de las especies consumidas, en función de la disponibilidad de los recursos del hábitat (Tavares-Cromar y Williams 1996).

Además de la estructura trófica, las comunidades de invertebrados muestran gran plasticidad en lo que se refiere a sus rasgos vitales, que optimizan en función de las características ambientales. Así, la dureza, variabilidad e impredecibilidad del medio ambiente determinan en buena medida las estrategias reproductoras y otros rasgos vitales de las comunidades que habitan en cualquier tramo, hasta el punto que algunos autores utilizan la concordancia entre características ambientales y rasgos biológicos para predecir cambios en gradientes ambientales en lugar de hacerlo sólo por su composición taxonómica (Townsend y Hildrew 1994, Bonada et al. 2006). De esta manera se puede obtener información de tipo funcional en distintas escalas espaciales independientes de la región biogeográfica de que se trate.

Técnica 34. Estudio de la comunidad de macroinvertebrados

Como se ha mencionado, las comunidades de macroinvertebrados muestran gran variabilidad espacial y temporal, y muchos taxones tienen gran afinidad por deter-

minado tipo de hábitat. Todo ello ha de tenerse en cuenta al establecer el programa de muestreo idóneo. Hay técnicas cualitativas, como el muestreo con red (*kick-ing*) y otras cuantitativas (Surber, Hess, *freezing corers*, sustratos artificiales, etc.). Las técnicas cualitativas, si bien no aportan datos cuantitativos precisos, proporcionan una información a menudo más completa de la riqueza de taxones del tramo, e incluso dan una idea de la relación de abundancia entre los diferentes taxones.

El método de muestreo que se describe posibilita obtener representación de todos los taxones relativamente abundantes, estimar su densidad y biomasa para cada tramo y períodos de muestreo, y calcular los índices de diversidad para cada tramo y período. Se basa en un método multihábitat, lo que significa que se muestrean todos los hábitats presentes en el tramo elegido en función de su representatividad. Es una adaptación del método AQEM (2002) para la evaluación ecológica de los ríos, basado en Barbour et al. (1999) y en las normas oficiales para el muestreo de macroinvertebrados (ISO 1985).

Para conocer la comunidad de macroinvertebrados es esencial muestrear en todos los tipos de hábitat presentes en cada tramo

MATERIAL DE MUESTREO

- Red Surber o red de mano (tamaño en función del sustrato predominante en el río) de 250-500 μm de malla. Normalmente se utilizan redes Surber de 25 \times 25 cm o de 30 \times 30 cm.
- Draga Eckman o corers (cilindro de metacrilato entre 10-15 cm de diámetro, con tapas extraíbles a cada extremo) para los ríos con sedimento fino abundante.
- Cuadrícula de 25 cm de lado para ríos con macrófitas.
- Formaldehído (40%) y alcohol (70%).
- Batería de cedazos de malla decreciente (5 cm, 1 cm, 2 mm, 1 mm, 500 μm , 250 μm).
- Microscopio binocular estereoscópico (lupa) con micrómetro.
- Estufa y mufla.
- Balanza de precisión (de 0,0001 g).

PROTOCOLO DE MUESTREO

Elegir tramos de 50 m razonablemente homogéneos y que sean representativos del río que queremos estudiar.

Porcentaje de los diferentes hábitats

Para este método se definen los hábitats en función de los tipos y tamaños de sustrato que aparecen en el lecho fluvial (cuadro 14.1). Desde la ribera del río y sin perturbar el lecho, calcular visualmente el porcentaje de cobertura de cada uno de los sustratos presentes en el río. Si, como es habitual, el equipo de muestreo

Cuadro 14.1:
Clasificación de los tipos de sustrato que se pueden encontrar en el río

Tipos	Características
Sustrato mineral	
Rocas y bloques	Diámetro mayor > 25 cm
Cantos	Diámetro 6-25 cm
Guijarros	Diámetro 2-6 cm
Grava	Diámetro 0,2-2 cm
Arena	Partículas de 6 µm a 2 mm. Presentan un tacto áspero
Limo/arcilla	Partículas < 6 µm. Presentan un tacto suave
Sustrato orgánico	
Masas flotantes	Macrófitos flotantes. Masas de bacterias, hongos, musgos o algas. Normalmente acompañados de detritus
Algas	Algas filamentosas, diatomeas
Macrófitos sumergidos	Macrófitos, incluidas briófitos y caráceas
Macrófitos emergentes	Por ejemplo: <i>Typha</i> , <i>Carex</i> , <i>Phragmites</i>
Partes vivas de vegetación terrestre	Raíces o ramas de vegetación riparia
Madera muerta	Troncos, ramas, madera muerta
MOPG	Detritus grueso (> 1 mm): hojas, etc.
MOPF	Depósitos de detritus finos. No se distinguen sus constituyentes

está constituido por varias personas, es aconsejable recorrer todo el tramo, anotando cada persona mentalmente la abundancia de cada tipo de hábitat, para después ponderar entre todos su cobertura. Todos los sustratos que cubran al menos un 5% de la superficie del lecho deben muestrearse para obtener la máxima representación de la comunidad. Cada sustrato se puede separar también en función de la velocidad de la corriente (zonas rápidas y lentas).

Trabajo de campo

1. La toma de muestras debe adecuarse al tipo de sustrato. Los sustratos duros (rocas, cantos, madera...) y los acúmulos de materia orgánica se muestrean con la red Surber. En los sustratos blandos (arena, limos...) es preferible utilizar la draga o los corers. Los macrófitos se muestrean recortando una porción de la planta con la ayuda de la cuadrícula de 25 cm. La red Surber se coloca contracorriente y con el pie o la mano se limpia y remueve todo el sustrato comprendido en el área determinada por la Surber, hasta una profundidad de 10-15 cm, asegurando que los animales y el sedimento fino liberados acaban dentro de la red. Si es difícil fijar la Surber en el sustrato (por ejemplo, en el caso que los sustratos sean demasiado grandes) se puede utilizar cada sustrato

Cada tipo de sustrato puede muestrearse mediante métodos específicos, pero siempre teniendo cuidado de conocer la superficie de cada muestra

- (por ejemplo, una piedra) como unidad de muestreo. En este caso hay que determinar la superficie de la piedra, para lo que se puede recubrir con papel de aluminio (sin solapamiento), que posteriormente se pesará en el laboratorio. Es importante apuntar siempre el área de muestreo para cada muestra.
2. Muestrear desde aguas abajo hacia arriba. Recoger 20 réplicas repartidas en función de la cobertura de cada sustrato. Por ejemplo, si en el tramo hay un 50% de cobertura de guijarros, un 25% de gravas y un 25% de MOPG, se deben recoger 10 muestras en las zonas de guijarros, cinco muestras en las gravas y cinco muestras más en los depósitos de MOPG.
 3. Una vez extraída la muestra, colocarla sobre el cedazo, y lavarla con abundante agua de río, eliminando en la medida de lo posible las piedras y otras partículas grandes, los macrófitos, así como todo el sedimento fino que atraviese el cedazo. Tener mucho cuidado de no perder invertebrados.
 4. Introducir la muestra en un bote de plástico de boca ancha, y fijarla con formaldehído al 4%. *¡No incluir más de una réplica por bote!*

Trabajo en el laboratorio

1. Tamizar las muestras con los cedazos para obtener las diferentes fracciones: 2000 μm , 1000 μm , 500 μm y 250 μm . Si no se dispone de estos cedazos, la muestra se puede separar directamente.
2. Separar los animales, primero a simple vista y después mediante lupa binocular utilizando los aumentos necesarios. Las muestras deben separarse en unidades sistemáticas lo más próximo posible a la especie. Si en alguna de las fracciones la densidad fuera muy alta, pueden hacerse submuestras a partir de 500 especímenes encontrados.
3. Enumerar los individuos encontrados para cada especie y preservarlos en formaldehído (4%), que mantiene las propiedades del contenido estomacal. Si no se va a analizar el contenido estomacal, también se pueden preservar los individuos en alcohol al 70%. Es aconsejable separar los individuos de cada familia o especie, en función de su abundancia, en botes separados, para facilitar su posterior análisis.

Conviene preservar los organismos separados en botes por familia o por especie

La macro 14.1 permite calcular la densidad de invertebrados en un tramo en base al muestreo multihábitat

Biomasa

Para las especies de mayor tamaño y/o abundancia se puede calcular la biomasa a partir del peso seco:

1. Separar un número conocido de individuos de tamaño similar y de la misma especie.
2. Secarlos a 70 °C durante 24-48 horas hasta peso constante.
3. Pesarlos en balanza de precisión. Para invertebrados de cierto tamaño, como los grandes dípteros, plecópteros, odonatos, etc., los individuos se pueden pesar separadamente. Para los de menor tamaño, pesar un número de individuos conocido y calcular el peso medio por individuo.

4. Calcinar los materiales en una mufla a 450 °C durante 4 horas.
5. Pesar las cenizas.
6. Determinar el peso seco libre de cenizas calculando la diferencia entre el peso seco y el peso de las cenizas. El peso seco libre de cenizas corresponde a la biomasa de los macroinvertebrados.

Medida o peso seco

La macro 14.2 permite calcular la biomasa de los invertebrados en función de medidas corporales

Una alternativa a la metodología anterior puede ser medir los individuos que se separan e identifican, y calcular la biomasa siguiendo las ecuaciones propuestas por Meyer (1989) para ríos de montaña europeos, u otras similares. Se obtiene así una biomasa más fiable para los individuos pequeños o de especies poco abundantes. Para medir los individuos se necesita una lupa binocular con micrómetro en el ocular. Para cada familia se toman medidas diferentes que suelen ser la longitud del animal, la anchura de la cabeza, etc.

Con la determinación taxonómica y los datos de abundancia se pueden calcular índices de diversidad. Los resultados de abundancia y biomasa se expresan por unidad de superficie de muestreo o de tramo.

Técnica 35. Estudio de la meiofauna

La meiofauna está constituida por metazoos pequeños de distintos grupos taxonómicos, incluyendo fases larvarias tempranas de macroinvertebrados

La *meiofauna* está constituida por aquellos metazoos bentónicos que pasan a través de una malla de 500 μm pero quedan retenidos por una de 32 μm (Fenchel 1978, Higgins y Thiel 1988). Las comunidades dulceacuícolas que forman parte de este grupo suelen estar dominadas por nematodos, rotíferos, microcrustáceos (copépodos harpacticoides y ciclopoideos, ostrácodos y cladóceros), quironómidos y oligoquetos (enquitræidos y naídidos), aunque también suelen estar presentes microturbelarios, gastrotricos, tardígrados, ácaros y fases larvarias tempranas de varios insectos (efemerópteros, plecópteros, coleópteros, etc.). De hecho, comúnmente se suele dividir la meiofauna en permanente (aquellos que pasan todo su ciclo vital siendo meiofauna) y temporal (aquellos que empiezan sus primeros estadios larvarios como meiofauna y luego pasan a formar parte de los macroinvertebrados).

La meiofauna está estrechamente ligada al sedimento, y por tanto es muy sensible a cambios en la velocidad del agua y en la granulometría del sedimento. Estos organismos, junto con los protozoos, constituyen el eslabón trófico entre los detritus, su comunidad microbiana asociada, y los macroinvertebrados (por ejemplo, Meyer 1994, Borchardt y Bott 1995). Además, constituyen una parte importante del número total de invertebrados en los sedimentos (por ejemplo, Stead et al. 2004), aunque su biomasa es relativamente modesta.

La observación y estudio de la meiofauna se puede realizar bien mediante muestras frescas o bien mediante muestras fijadas. El material fresco ofrece la posibilidad de poder identificar y enumerar la mayoría de individuos, ya que los organismos de tegumento blando son vulnerables ante las técnicas de fijación. El inconveniente es que la muestra fresca debe ser procesada lo más rápidamente posible para evitar que el estrés sufrido por los organismos pueda modificar los resultados. Por el contrario, las muestras fijadas con formol se pueden conservar durante mucho tiempo, aunque no fijen la totalidad de los organismos.

MATERIAL PARA RECOGIDA DE MUESTRAS EN EL CAMPO

- Cilindro (corer) de plástico rígido (por ejemplo, Perspex) con regla dibujada.
- 2 tapones de goma.
- 5 botes de plástico (aproximadamente 250 mL).
- 2 cedazos apilables de 32 y 500 μm de tamaño de poro.
- Botella o frasco lavador.
- Nevera con acumuladores de frío.

PROCEDIMIENTO

Escoger la zona de estudio teniendo en cuenta que los organismos de la meiofauna son muy sensibles a los cambios de velocidad del agua y a la granulometría del sedimento (por ejemplo, zonas leníticas con granulometrías intermedias).

Hay que tomar al menos cinco muestras por tramo



Figura 14.1:
Cilindro o corer de muestreo

Clavar el cilindro sobre el sustrato a muestrear, a unos 8-10 cm de profundidad, para evitar posibles zonas de anoxia, y sacarlo con ayuda de los tapones de goma. Una vez fuera, decantar sobre los dos cedazos apilados (500 μm arriba, 32 μm abajo; fig. 14.1). Con ayuda del frasco lavador lleno de agua del río, lavar bien la fracción mayor de 500 μm para evitar que haya organismos aún sujetos al sedimento. Con ayuda del mismo frasco, recoger la fracción retenida en el cedazo de 32 μm y colocarla dentro del bote de plástico. Cerrar el bote y guardarlo en la nevera. Hay que recoger un mínimo de cinco réplicas por punto de muestreo, debido a la tendencia de estos organismos a tener distribuciones agregadas.

En caso de muestrear sustratos diferentes a las arenas o limos, como por ejemplo hojarasca o piedras, extraerlos con precaución fuera del agua (por ejemplo poniendo una red de 32 μm aguas abajo) y limpiarlo con ayuda de un pincel o con las manos sobre una bandeja de plástico con agua del río. Tratar el líquido con el material desprendido de la forma anteriormente descrita para las arenas/limos.

MATERIAL PARA PROCESADO DE MUESTRAS FRESCAS

- Lupa esteoroscópica de 50X.
- Placas de Petri.
- Pinzas.
- Aguja enmangada.
- Succionador de punta estrecha para recoger y manipular los individuos.
- Frasco lavador con agua procedente del río.

PROCEDIMIENTO

Lavar las muestras siempre con agua del río

Este método tiene la ventaja de que se mantienen todos los taxones, incluso los microturbelarios, rotíferos, gastrotricos y algunos oligoquetos, que son muy sensibles. Filtrar de nuevo las muestras en el laboratorio para eliminar el exceso de agua y separar los organismos mediante la lupa. El agua utilizada para la limpieza de la muestra o para la observación ha de ser la misma que la del río. Muchos de estos organismos son muy sensibles a cambios de la mineralización del agua y pueden explotar o contraerse cuando el medio cambia. Las muestras se pueden mantener un máximo de 4 días a 4 °C.

MATERIAL PARA PROCESADO DE MUESTRAS PRESERVADAS

- Solución al 6% de MgCl_2 (73,2 g/L) o algún otro anestésico (por ejemplo, agua carbonatada).
- Tinción con rosa de Bengala (1 g de polvo de rosa de Bengala por litro de formol al 4%).

- Bandeja de plástico.
- Cedazo de 32 μm .
- Lupa esteoroscópica de 50X.
- Placas de Petri.
- Pinzas.
- Aguja enmangada.
- Succionador de punta estrecha para recoger y manipular los individuos.

PROCEDIMIENTO

Este es un método aconsejable si se quieren estudiar los microcrustáceos y nematodos, que toleran mejor las técnicas conservativas. Para fijar las muestras se puede añadir un relajante previo para que los organismos no queden contraídos (por ejemplo, calor o MgCl_2) y una tinción para realzar su contraste (rosa de Bengala). La cantidad de colorante o anestésico puede variar en función de las características del agua así como de su contenido en materia orgánica (debido a su acción quelante). En el momento del procesado de las muestras hay que eliminar el formol utilizando el cedazo de 32 μm con cuidado de no perder una fracción significativa de muestra en el proceso. Algunos autores (Pfannkuche y Thiel 1988) proponen métodos de agitación y decantación o de gradiente de densidades por centrifugación (por ejemplo, usando LUDOX-TM®). En cualquier caso, se recomienda una buena calibración previa al estudio para cada tipo de sedimento, inspeccionando con detenimiento los sedimentos remanentes.

Los crustáceos y nematodos se estudian mejor sobre muestras preservadas

IDENTIFICACIÓN Y BIOMASA

El nivel de resolución taxonómica es un compromiso que debe asumir cada investigador, pues algunos grupos son difíciles de identificar debido a la inmadurez de los individuos. Las claves más adecuadas para determinar estos organismos se

La macro 14.2 permite calcular la biomasa de meiofauna

Grupo	Referencia
General	Lopretto y Tell (1995)
Copepoda	Reid (1985)
Cladocera	Dodson y Frey (1991)
Gastrotricha	Rundle et al. (2002)
Ostracoda	Moguilevsky y Whatley (1995)
Microturbellaria	Kolasa (1991), Cannon (1986)
Nematoda	Eyualem-Abebe et al. (2006)
Rotifera	Pennak (1978), Wallace y Snell (2001), Nogrady et al. (1993)
Tardigrada	Rundle y Robertson et al. (2002)

Cuadro 14.2:
Algunas claves taxonómicas para la identificación de meiofauna, especialmente indicadas para América Latina

Cuadro 14.3:

Algunas claves taxonómicas para la identificación de meiofauna, especialmente indicadas para Europa

Grupo	Referencia
General	Rundle et al. (2002)
Cladocera	Alonso (1986), Amorós (1984)
Copepoda	Dussart y Defaye (1995)
Gastrotricha	Rundle et al. (2002)
Ostracoda	Meisch (2000)
Microturbellaria	Young (1970), Cannon (1986)
Nematoda	Eyualem-Abebe et al. (2006)
Rotifera	Nogrady et al. (1993)
Tardigrada	Rundle et al. (2002)

detallan en los cuadros 14.2 y 14.3. En el caso de organismos de difícil determinación es recomendable tomar una fotografía digital que permita consultar con especialistas.

La biomasa y el biovolumen se determinan midiendo los organismos

Para calcular la biomasa, un método aconsejable es medir los organismos directamente mediante la escala métrica del ocular de la lupa o microscopio, y aplicar regresiones ya publicadas (por ejemplo, Meyer 1989, Bottrell et al. 1976, Burgherr y Meyer 1997, Benke et al. 1999) para calcular el peso seco. También se pueden aplicar fórmulas de estima del biovolumen descritas en la literatura. Por ejemplo, para nematodos, Andrassy (1956), para oligoquetos, Smit y Vanhed (1993), y para ostrácodos, ácaros, tardígrados y microturbelarios, Ramsay y Rundle (1997).

La producción secundaria suele obtenerse mediante el método de frecuencia de tamaños (técnica 47). Puede hallarse más información en Palmer y Strayer (2007) y en Rundle y Robertson (2002).

Técnica 36. Rasgos biológicos de especies

Muchos rasgos biológicos están relacionados con funciones ecológicas

La *teoría del «river habitat templet»* establece una estrecha relación entre las condiciones ambientales del hábitat y los rasgos biológicos de las especies (adaptaciones) que viven en dicho hábitat (Townsend y Hildrew 1994). En este sentido, los rasgos biológicos de las especies pueden ser utilizados para predecir cambios en las comunidades de invertebrados en gradientes ambientales (naturales o antrópicos) (por ejemplo, Statzner et al. 2005). A pesar de que la clasificación de la comunidad en estrategias tróficas (técnica 51) puede considerarse un rasgo biológico, en este apartado nos referiremos a un conjunto más amplio de rasgos.

Caracterizar la comunidad de invertebrados por sus rasgos biológicos permite (Bonada et al. 2006):

1. Obtener información de tipo funcional, ya que muchos de los rasgos utilizados están relacionados directa o indirectamente con funciones ecológicas (como, por ejemplo, el tipo de alimentación o el tamaño y la relación producción:biomasa).
2. Utilizarlos en estudios a distintas escalas espaciales (entre distintas ecorregiones), ya que la mayoría de rasgos son independientes de aspectos taxonómicos y, por lo tanto, también de la región biogeográfica que se considere.
3. Establecer hipótesis simples que permitan predecir cambios en las comunidades debidos a cambios en el ambiente.

A pesar de estas ventajas, el uso de los rasgos biológicos requiere información biológica detallada para todas las especies de una región, que todavía sigue incompleta (Statzner et al. 2007).

MATERIAL

- Base de datos de invertebrados (presencia/ausencia o abundancias).
- Base de datos con características ambientales de los sitios de estudio.
- Base de datos de rasgos biológicos. Varias bases de datos están ya disponibles o se están desarrollando en diferentes partes del mundo: Europa (Tachet et al. 2002), Estados Unidos (Bêche et al. 2006, Vieira et al. 2006), América del Sur (Tomanova y Usseglio-Polatera 2007) y Nueva Zelanda (Dolédec et al. 2006).

PROCEDIMIENTO

Características de las bases de datos de rasgos biológicos

1. Los rasgos biológicos describen varias características de las especies relacionadas con la morfología, los ciclos vitales, la reproducción, la dispersión, la fisiología y el comportamiento. Cada rasgo biológico está subdividido en categorías (cuadros 14.4 a 14.7). El número y tipo de rasgos y categorías varía según la base de datos utilizada.
2. Todos los datos sobre los rasgos se obtienen de información bibliográfica y/o de observaciones directas de las especies, e incluyen toda la información biológica existente para cada taxón.
3. En la mayoría de los casos, la resolución taxonómica utilizada es el género. Estas bases de datos contienen información para cada taxón y cada categoría (presencia/ausencia o afinidad) utilizando la técnica del código difuso (método más común).

Cuadro 14.4:

Algunos ejemplos de rasgos biológicos y sus correspondientes categorías relacionadas con características morfológicas

Rasgo biológico	Categorías
Tamaño máximo (mm)	≤ 2,5 2,6-5 5,1-10 10,1-20 20,1-40 40,1-80 > 80,1
Flexibilidad del cuerpo	< 10° 10-45° > 45°
Forma del cuerpo	Hidrodinámica Aplanada Cilíndrica Esférica
Adaptaciones morfológicas a la corriente	Ventosas Glándula de seda Material mineral (estuches) Gancho anal Gancho en el tarso Sin adaptación

4. La técnica del código difuso permite cuantificar la afinidad de cada taxón a cada categoría (Chevenet et al. 1994). Generalmente se usa el código desde 0 hasta 3, así un 0 indica no afinidad y un 3 indica una fuerte afinidad de ese taxón para esa categoría. Por ejemplo, si tenemos un rasgo «voltinismo» que tiene como categorías «semivoltino/univoltino/multivoltino» (cuadro 14.5) una

Cuadro 14.5:

Algunos ejemplos de rasgos biológicos y sus correspondientes categorías relacionadas con características del ciclo vital

Rasgo biológico	Categorías
Duración ciclo de vida (años)	1 > 1
Voltinismo	Semivoltino Univoltino Multivoltino
Duración de los adultos (días)	1-10 10-30 30-365 > 365
Estadios acuáticos	Larva Ninfa Imago Huevos
Formas de resistencia	Estatoblastos Gémulas Capullos Refugios (por ejemplo, grietas) Diapausa Ninguna

Rasgo biológico	Categorías
Reproducción	Ovoviviparidad Huevos aislados libres Huevos aislados fijados en sustrato Huevos agrupados libres Huevos agrupados fijados en sustrato Huevos en la vegetación Huevos terrestres
Dispersión	Asexual Acuática pasiva Acuática activa Aérea pasiva Aérea activa

Cuadro 14.6:

Algunos ejemplos de rasgos biológicos y sus correspondientes categorías relacionadas con características reproductivas y de dispersión

codificación de «0/3/1», indicaría que se trata de un taxón normalmente univoltino pero que algunas veces (para algunas especies dentro del taxón o para todas las especies en determinadas condiciones ambientales) es multivoltino.

- Una manera de caracterizar los taxones mediante la codificación difusa es analizando los perfiles ecológicos del taxón para cada rasgo. Así, por ejemplo, la

Rasgo biológico	Categorías
Respiración	Tegumento Branquia Plastrón Espiráculo o vesícula hidrostática
Locomoción	Volador Nadador en superficie Nadador Andadores Excavadores (epibentónicos) Intersticiales (endobentónicos) Temporalmente fijados al sustrato Permanentemente fijados al sustrato
Alimentación	Sedimento fino y microorganismos Detritus < 1 mm Detritus vegetal > 1 mm Micrófitos vivos Macrófitos vivos Animales muertos > 1 mm Microinvertebrados vivos Macroinvertebrados vivos Vertebrados
Modo de alimentación	Absorción a través del tegumento Ingestión de sedimentos finos/Colector Triturador/Desmenuzador Ramoneador/Raspador Filtrador Perforador (vegetación o animales) Depredador Parásito

Cuadro 14.7:

Algunos ejemplos de rasgos biológicos y sus correspondientes categorías relacionadas con características fisiológicas y de comportamiento

Figura 14.2:

Ejemplo de codificación del rasgo «alimentación» utilizando información sobre los contenidos estomacales de varias especies del género *Leptonema* (Trichoptera, Hydropsychidae)

género *Leptonema* (Hydropsychidae) - América del Sur



SF + M	Sedimento fino y microorganismos
Det < 1	Detritus < 1 mm
Det > 1	Detritus vegetal > 1 mm
MiF	Micrófitos vivos
MaF	Macrófitos vivos
AM	Animales muertos > 1 mm
MIIn	Microinvertebrados vivos
MAIn	Macroinvertebrados vivos
Ve	Vertebrados

Rasgo biológico	Alimentación								
Categorías	SF + M*	Det < 1	Det > 1	MiF	MaF	AM	MIIn	MAIn	Ve
Código difuso	0	3	2	2	1	0	0	2	0

(* SF + M sólo se codifica cuando domina en el alimento ya que podría ser ingerido accidentalmente)

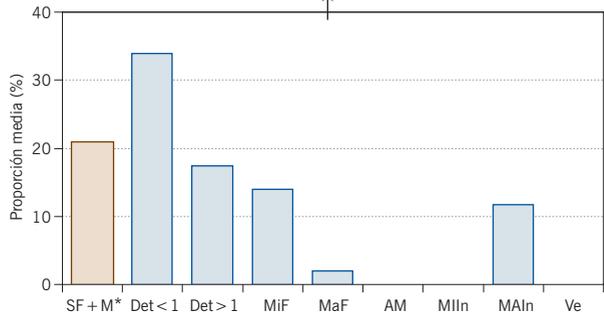


figura 14.2 muestra la codificación del rasgo «alimentación» utilizando los contenidos estomacales de varias especies de género *Leptonema* (Trichoptera, Hydropsychidae).

Cómo usar una base de datos de rasgos biológicos

Se calcula la proporción de individuos de cada categoría de rasgo en cada estación

1. Calcular la proporción relativa de distintos rasgos biológicos en la comunidad de la siguiente manera: a) transformar la base de datos de presencia/ausencia o abundancias de invertebrados en datos relativos (matriz A: estaciones × taxones), b) para cada taxón y rasgo biológico reescalar los valores difusos de manera que sumen 1 (matriz B: taxones × categorías) y c) multiplicar la matriz A por la matriz B para obtener una nueva matriz que incluya información sobre la proporción de cada categoría en cada estación (matriz C: estaciones × categorías) (fig. 14.3).
2. En función de los objetivos planteados existen varias maneras para analizar este tipo de datos. La matriz C, 1) se puede utilizar para, por ejemplo, obtener métricas (por ejemplo, índices de diversidad) que podrán ser relacionadas con la base de datos de características ambientales (matriz D: estaciones × ambiente) o 2) se puede analizar conjuntamente con la matriz D mediante técnicas multivariantes de ordenación (por ejemplo, análisis de coinercia).
3. Los métodos estadísticos más utilizados para estos análisis son aquellos desarrollados inicialmente por Dolédec et al. (1996) y cuyas aplicaciones estadísticas están disponibles gratuitamente en el programa ADE-4,¹ también implementado en el programa R.² Otros métodos, como por ejemplo el *4th Corner*

¹ El programa ADE-4 está disponible en <http://pbil.univ-lyon1.fr/ADE-4/home.php?lang=eng>

² Disponible en <http://cran.r-project.org/>

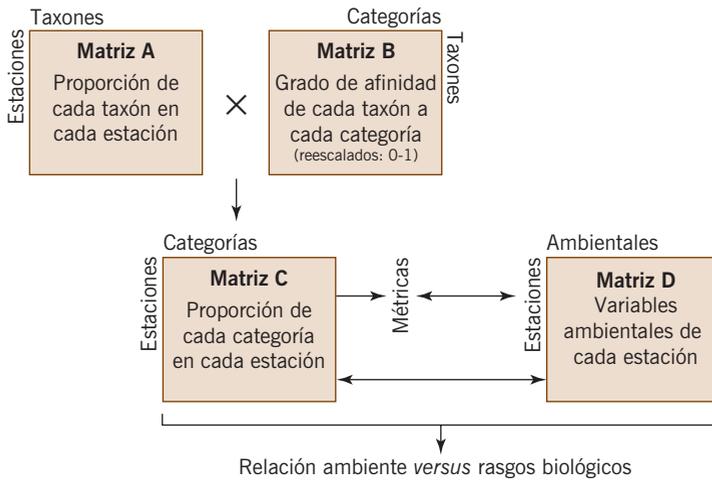


Figura 14.3:
Estructura de las bases de datos

Program (Legendre et al. 1997), también permiten tratar estadísticamente este tipo de datos.

Otras consideraciones

1. A pesar de que algunas bases de datos de rasgos biológicos incluyen información sobre especies, subgéneros, tribus, familias o grupos biológicos (Usseglio-Polatera et al. 2000a, Vieira et al. 2006), el género se considera la resolución taxonómica óptima, ya que permite caracterizar adecuadamente la relación rasgos–ambiente disminuyendo los costes de identificación que requiere el nivel específico (Dolédec et al. 2000). Según algunos trabajos (por ejemplo, Dolédec et al. 2000), también se puede trabajar a escala de familia, aunque se pierde información ecológica.
2. Los individuos que no puedan ser identificados a escala de género (tamaños pequeños, falta de piezas) se asignan a los géneros de la misma familia identificados en esa misma estación, repartiendo su abundancia según la distribución de abundancias de los géneros identificados. En el caso de que no haya géneros identificados en una estación, se utilizan los de estaciones cercanas de la misma cuenca o de cuencas cercanas.
3. En el caso de que en la zona de estudio se encuentren géneros no contemplados en la base de rasgos biológicos existentes, primero debe verificarse que no se trata de un cambio de nomenclatura. En caso de que sea necesario codificarlos, se aplica la metodología expuesta en anteriores apartados, teniendo en cuenta la información de las distintas especies del género así como la variabilidad dentro de cada especie. Para América del Sur, este trabajo es bastante complejo por el gran desconocimiento que se tiene de las especies y de su biología. En estos casos se recomienda utilizar toda la información disponi-

El nivel de resolución taxonómica suficiente es el de género

- ble en lugar de utilizar datos de otras regiones. En el caso de que la información biológica sea inaccesible para alguna/s categorías, éstas se codifican como 0 o se utiliza la media de todos los géneros de la misma familia.
4. Varios estudios (por ejemplo, Usseglio-Polatera et al. 2000b, Statzner et al. 2005, Dolédec et al. 2006) han demostrado el potencial de los rasgos biológicos para la bioindicación, y por lo tanto su utilidad para los sistemas de calidad del agua.
 5. Aparte de los rasgos biológicos se pueden usar también los rasgos ecológicos, ligados a la distribución y tolerancia ecológica de las especies (Tachet et al. 2002). La técnica de los códigos y el procedimiento de este tipo de datos son los mismos que los utilizados para los rasgos biológicos.

14.2. Bibliografía

- ALONSO M. «Crustacea, Branchiopoda». Vol. 7. En M.A. Ramos et al., eds. *Fauna ibérica*. Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC, 1996: 486.
- AMORÓS C. «Introduction pratique à la systématique des organismes des eaux continentales françaises -5- Crustacés Cladocères». *Bulletin Mensuel de la Société Linnéenne de Lyon* 53 (1984): 71-145.
- ANDRASSY I. «Die rauminhalts- und gewichtsbestimmung der fadenwürmer (Nematoden)». *Acta Zoologica Academica Scientiarum Hungaricae* 2 (1956): 1-15.
- AQEM. «Manual for the application of the AQEM system. A comprehensive method to assess European streams using benthic macroinvertebrates, developed for the purpose of the Water Framework Directive. Version 1.0». 2002.
- BARBOUR M.T., GERRITSEN J., SNYDER B.D., y STRIBLING J.B. *Rapid bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers: Periphyton, benthic macroinvertebrates and fish*. Washington, D.C.: Environmental Protection Agency, Office of Water, 1999.
- BÊCHE L.A., MCELRAVY E.P., y RESH V.H. «Long-term seasonal variation in the biological traits of benthic-macroinvertebrates in two Mediterranean-climate streams in California, USA». *Freshwater Biology* 51 (2006): 56-75.
- BENKE A.C., HURYN A.D., SMOCK L.A., y WALLACE J.B. «Length-mass relationships for freshwater macroinvertebrates in North America with particular reference to the South-eastern United States». *Journal of the North American Benthological Society* 18 (1999): 308-343.
- BONADA N., PRAT N., RESH V.H., y STATZNER B. «Developments in aquatic insect biomonitoring: A comparative analysis of recent approaches». *Annual Review of Entomology* 51 (2006): 495-523.
- BORCHARDT M.A., y BOTT T.L. «Meiofaunal grazing of bacteria and algae in a piedmont stream». *Journal of the North American Benthological Society* 14 (1995): 278-298.
- BOTTRELL H.H., DUNCAN A., GLIWICZ Z.M., GRYGIEREK E., HERZIG A., HILLBRICHT-ILKOWSKA A., KURASAWA H., LARSSON P., y WEGLENSKA T. «A review of some problems in zooplankton production studies». *Norwegian Journal of Zoology* 24 (1976): 419-456.
- BURGHERR P., y MEYER E.I. «Regression analysis of linear body dimensions vs. dry mass in stream macroinvertebrates». *Archiv für Hydrobiologie* 139 (1997): 101-112.
- CANNON L.R.G. *Turbellaria of the world. A guide to families and genera*. Brisbane: Queensland Museum, 1986: 1-136.

- CHEVENET F., DOLÉDEC S., y CHESSEL D. «A fuzzy coding approach for the analysis of long-term ecological data». *Freshwater Biology* 31 (1994): 295-309.
- DODSON S.I., y FREY D.G. «Cladocera and other Branchiopoda», en: J.H. Thorp, y A.P. Covich, eds. *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*. San Diego: Academic Press, 1991: 723-786.
- DOLÉDEC S., CHESSEL D., TER BRAAK C.F.J., y CHAMPELY S. «Matching species traits to environmental variables: A new three-table ordination method». *Environmental and Ecological Statistics* 3 (1996): 143-166.
- DOLÉDEC S., OLIVIER J.M., y STATZNER B. «Accurate description of the abundance of taxa and their biological traits in stream invertebrate communities: Effects of taxonomic and spatial resolution». *Achiv für Hydrobiologie* 148 (2000): 25-43.
- DOLÉDEC S., PHILLIPS N., SCARSBROOK M., RILEY R.H., y TOWNSEND C.R. «Comparison of structural and functional approaches to determining landuse effects on grassland stream invertebrate communities». *Journal of the North American Benthological Society* 25 (2006): 44-60.
- DUSSART B.H., y DEFAYE D. «Copepoda. Introduction to the Copepoda», en: H.J. Dumont (ed.). *Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world*. Vol. 7. La Haya: SPB Academic Publishing bv, 1995.
- EYUALEM-ABEBE E., TRAUNSPURGER W., y ANDRÁSSY I. *Freshwater nematodes: ecology and taxonomy*. Wallingford: CABI Publishing, 2006.
- FENCHEL T.M. «Ecology of microbenthos and meiobenthos». *Annual Review of Ecology and Systematics* 9 (1978): 99-121.
- HAUER F.R., y RESH V.H. «Macroinvertebrates». En R. Hauer, y G. Lamberti G., eds. *Methods in stream ecology*. Nueva York: Academic Press, 2006: 435-464.
- HIGGINS R.P., y THIEL H. *Introduction to the study of meiofauna*. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 1988.
- ISO 7828. *Water quality – methods of biological sampling – guidance on handnet sampling of aquatic benthic macro-invertebrates*. Secondary Titl. 1985.
- KOLASA J. «Flatworms: Turbellaria and Nemertea», en: J.H. Thorp, y A.P. Covich, eds. *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*. San Diego: Academic Press, 1991: 145-171.
- LEGENDRE P., GALZIN R., y HARMELIN-VIVIEN M.L. «Relating behavior to habitat: Solutions to the fourth-corner problem». *Ecology* 78 (1997): 547-562.
- LOPRETTO E., y TELL G. *Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio. I-II-III*. Buenos Aires: Ediciones Sur, 1995.
- MERRIT R.W., y CUMMINS K.W., eds. *An introduction of the aquatic insects of North America*. Dubuque: Kendall/Hunt, 1996.
- MEYER E.I. «The relationship between body length parameters and dry mass in running water invertebrates». *Archiv für Hydrobiologie* 117 (1989): 191-203.
- MEYER J.L. «The microbial loop in flowing waters». *Microbial Ecology* 28 (1994): 195-199.
- MOGUILVSKY A., y WHATLEY R. «Crustacea Ostracoda», en: E.C. Lopretto, y G. Tell, eds. *Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio*. Buenos Aires: Ediciones Sur, 1995: 973-999.
- NOGRADY T., WALLACE R.L., y SNELL T.W. *Rotifera. Volume 1: Biology, ecology and systematics. Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World (4T. Nogrady)*. The Hague: SPB Academic Publishing: 1993.
- PALMER M.A., y STRAYER D.L. «Meiofauna». En F.R. Hauer, y G. Lamberti, eds. *Methods in stream ecology*. San Diego: Academic Press Elsevier, 2007.
- PENNAK R.W. *Freshwater Invertebrates of the United States*. Nueva York: Wiley, 1978.

- PFANNKUCHE O., y THIEL H. «Sample processing», en R.G. Higgins, y H. Thiel. *Introduction to the study of meiofauna*. Washington DC: Smithsonian Institute Press, 1988.
- RAMSAY P.M., y RUNDLE S.D. «A rapid method for estimating biomass size spectra of benthic metazoan communities». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54 (1997): 1716-1724.
- REID J.W. «Chave de identificacao e lista de referencias bibliograficas para as especies continentais sulamericanas de vida livre da ordem Cyclopoida (Crustacea. Copepoda)». *Boletim de Zoologia* (Sao Paulo) 9, 17 (1985): 143.
- RUNDLE S., y ROBERTSON A., eds. *Freshwater meiofauna: Biology and ecology*. Leiden: Backhuys Publishers, 2002.
- SMIT H., y VANHEEL E.D. «Biovolume as a tool in biomass determination of *Oligochaeta* and *Chironomidae*». *Freshwater Biology* 29 (1993): 37-46.
- STATZNER B., BADY P., DOLÉDEC S., y SCHÖLL F. «Invertebrate traits for the biomonitoring of large European rivers: An initial assessment of trait patterns in least impacted river reaches». *Freshwater Biology* 50 (2005): 2136-2161.
- STATZNER B., BONADA N., y DOLÉDEC S. «Conservation of taxonomic and biological trait diversity of European stream macroinvertebrate communities: A case for a collective public database». *Biodiversity and Conservation* 16 (2007): 3609-3632.
- STEAD T.K., SCHMID-ARAYA J.M., y HILDREW A.G. «The contribution of subsurface invertebrates to benthic density and biomass in a gravel stream». *Archiv für Hydrobiologie* 160 (2004): 171-191.
- TACHET H., RICHOUX P., BOURNAUD M., y USSEGLIO-POLATERA P. *Invertébrés d'eau douce (2nd corrected impression)*. París: CNRS éditions, 2002.
- TAVARES-CROMAR A.F., y WILLIAMS D.D. «The importance of temporal resolution in food web analysis: Evidence from a detritus based stream». *Ecological Monographs* 66 (1996): 91-113.
- TOMANOVA S., y USSEGLIO-POLATERA P. «Patterns of benthic community traits in neotropical streams: Relationship to mesoscale spatial variability». *Fundamental and Applied Limnology* 170 (2007): 243-255.
- TOMANOVA S. y Usseglio Polatera P. «Patterns of benthic community traits in neotropical streams: Relationship to mesoscale spatial variability». *Fundamental and Applied Limnology* 170 (2007): 243-255.
- TOWNSEND C.R., y HILDREW A.G. «Species traits in relation to a habitat templet for river systems». *Freshwater Biology* 31 (1994): 265-275.
- USSEGLIO-POLATERA P., BOURNAUD M., RICHOUX P., y TACHET H. «Biological and ecological traits of benthic freshwater macroinvertebrates: Relationships and definition of groups with similar traits». *Freshwater Biology* 43 (2000a): 175-205.
- USSEGLIO-POLATERA P., BOURNAUD M., RICHOUX P., y TACHET H. «Biomonitoring through biological traits of benthic macroinvertebrates: How to use species trait databases». *Hydrobiologia* 422/423 (2000b): 153-162.
- VIEIRA N.K.M., POFF N.L., CARLISLE D.M., MOULTON Ii S.R., KOSKI M.L., y KONDRATIEFF B.C. «A database of lotic invertebrate traits for North America». *US Geological Survey Data Series* 187 (2006). Disponible en: <http://pubs.water.usgs.gov/ds187>.
- WALLACE R.L., y SNELL T.W. «Rotifera», en: J.H. Thorp, y A.P. Covich, eds. *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*. San Diego: Academic Press, 1991: 187-248.

La biota de los ríos: los peces

LLUÍS ZAMORA, ANNA VILA Y JOAN NASPLEDA

15.1. Introducción

De las aproximadamente 24 600 especies de peces descritas científicamente, el 41% habita exclusivamente en aguas epicontinentales y un 1% se mueve entre el mar y las aguas dulces a lo largo de su ciclo vital (Nelson 1994). De hecho, se ha propuesto una clasificación de las especies ícticas epicontinentales en tres categorías: *primarias* o *sedentarias*, cuando completan todo su ciclo vital en agua dulce; *secundarias* si, aun viviendo en aguas dulces, tienen cierta tolerancia a las marinas; y especies *periféricas* si, aun derivando de formas marinas ancestrales, residen más o menos tiempo en aguas dulces o habitan una parte de su ciclo vital en este ambiente y otra parte en el mar (Granado-Lorencio 1996). Éste sería el caso de las especies migradoras, las cuales reciben distintas denominaciones en función del tipo de migración. Así, la especie *potamodromas* realizan migraciones entre sistemas epicontinentales, las *oceanodromas* dentro del mar y las *diadromas* entre ambos medios. Dentro de este grupo se distinguen las especies *catadromas*, que realizan migraciones reproductivas hacia el mar (por ejemplo, la anguila europea *Anguilla anguilla*) y de las *anadromas*, que realizan la migración en sentido contrario reproduciéndose en aguas dulces (por ejemplo, el salmón *Salmo salar*) (McDowall 1992).

La diversidad de especies de peces incrementa de acuerdo con el área de la cuenca. También influyen factores como el caudal, la calidad del agua, la turbulencia y la productividad

Los peces ocupan prácticamente todos los hábitats acuáticos que presentan agua líquida durante buena parte del año, incluyendo fuentes termales y alcalinas, lagos hipersalinos, cuevas, lagunas temporales, ríos torrenciales o lagos situados a elevadas altitudes (hasta 3800 m) (Helfman et al. 1997). Geográficamente, la mayor diversidad de peces la encontramos en los trópicos, siendo en el sudeste asiático, América del Sur y África donde existe el mayor número de especies epicontinentales. Como en muchos otros grupos taxonómicos, la estructura y composición de las comunidades de peces varía en función de la escala espacial. Cuanto mayor es la escala, mayor detalle podemos conocer sobre la organización de la comunidad o la población y en el caso de los peces ésta varía desde el nivel de cuenca hidrográfica hasta el de unidad de hábitat (microhábitat) (Reeves et al. 2001). En general, la diversidad de la comunidad de peces de un río se incrementa desde las zonas de cabecera hasta la desembocadura o, dicho de otra forma, aumenta de acuerdo con el orden del río (Wootton 1990). Una explicación a esta característica la encontramos en la relación *especie-área* propuesta por Williams (1964) en el contexto de la teoría ecológica de comunidades. Según este concepto, el número de especies se incrementa de acuerdo con el aumento del área considerada. Aunque diversos factores como el caudal, la calidad del agua o la turbulencia pueden romper esta tendencia (Ricklefs 1987), es posible predecir este incremento de la diversidad, dado que el río experimenta importantes cambios a lo largo de su eje longitudinal aumentado en anchura, profundidad y complejidad de hábitats, por lo que es posible encontrar un mayor número de especies (Pitcher y Hart 1982).

Otra posible explicación del patrón observado de incremento de la diversidad y distribución de especies ícticas en la cuenca hidrográfica está relacionada con la productividad (Currie 1991). La diversidad es, en general, mayor en los niveles intermedios de productividad, aunque este principio no siempre se cumple en los ambientes acuáticos, dado que actúan otros procesos como, por ejemplo, los cambios en las características físicas (anchura, profundidad, velocidad, temperatura, etc.) (Persson 2002).

No sólo los gradientes físicos espaciales explican la estructuración de las comunidades ícticas. Los peces interactúan con otros muchos taxones, compitiendo por el alimento, por el hábitat, actuando como depredadores o como presas. Los peces herbívoros, más comunes en los trópicos, pueden llegar a influir sobre la biomasa vegetal de la zona, la productividad, el crecimiento y la composición de especies (Helfman et al. 1997). Como miembros de los niveles superiores de las cadenas tróficas, pueden también afectar considerablemente al resto de niveles. Por ejemplo, los peces zooplanctívoros pueden provocar la disminución del zooplankton herbívoro, lo que puede llegar a suponer un incremento del fitoplankton (Løvgren y Persson 2001).

Para poder interpretar los gradientes de ocupación del espacio y el papel que juegan los peces en el ecosistema fluvial, es necesario realizar una aproximación a su composición específica, su abundancia y distribución. Esta información tan sólo es posible obtenerla mediante un muestreo y no es una cuestión fácil de resolver, puesto que la movilidad de los peces y el medio en que habitan pueden llegar a dificultar en extremo esta tarea. Por ello, existe una gran variedad de métodos de muestreo de peces, desde los *activos* como la pesca eléctrica, el arrastre o el uso de sacadoras; pasando por los *pasivos* como las trampas, redes o pesca con caña, hasta los métodos indirectos de detección u observación como la ecosondación, la filmación o la práctica del submarinismo (Lucas y Baras 2000). No existe un método universal para todas las especies y todos los tipos de ambientes, por lo que será necesario seleccionar la técnica en función de la especie y del ambiente (río, lago, estuario, etc.) a estudiar y de los objetivos del estudio. En el caso de las poblaciones de peces de río, el rango de métodos se reduce, siendo el más utilizado la pesca eléctrica. Otros muy comunes son las trampas o las redes de bloqueo.

La elevada movilidad de los peces dificulta su muestreo. Existen métodos pasivos y métodos activos de captura

El objetivo de este capítulo es ofrecer una visión general de las principales técnicas de captura de peces en ríos, así como los métodos más utilizados para la descripción del estado de las poblaciones de peces en ambientes lóticos sobre la base de su densidad y estado de condición.

Técnica 37. Muestreo de peces: pesca eléctrica

La pesca eléctrica se fundamenta en el hecho de que los peces responden involuntariamente a la acción de los campos eléctricos de suficiente intensidad, nadiendo en dirección al polo positivo o ánodo (Reynolds 1996). Así, al sumergir dos electrodos en el agua se origina un campo eléctrico y los peces reaccionan en función de la diferencia de potencial que se establece alrededor de su cuerpo. En las proximidades del ánodo, el individuo sufre electrotaxia (o galvanotaxia) que le impulsa a aproximarse al operador; cuando el pez se encuentra a una determinada distancia (variable en función de la especie, el potencial aplicado y las características del ambiente) se produce la electronarcosis (o galvanonarcosis) restando el individuo inmóvil por la contracción de su musculatura, momento en el que puede ser capturado. El efecto de la electricidad es reversible, y los peces se recuperan segundos después sin efectos secundarios. Esta es la gran ventaja de la pesca eléctrica, si es realizada correctamente (Snyder 1995, Schill y Beland 1995).

La pesca eléctrica realizada correctamente es un método inocuo y eficaz para capturar los peces vivos

Hay distintos equipos de pesca eléctrica. La base la constituye una fuente de potencial (grupo electrógeno o batería), un rectificador que permite controlar la intensidad, el voltaje y el tipo de corriente, un ánodo o polo positivo que es trans-

Figura 15.1:
*Equipo de investigadores
 pescando en un arroyo
 mediante un aparato
 portátil de pesca eléctrica*



portado por el operador, y un cátodo o polo negativo, que puede ser fijado al fondo del río o arrastrado por el operador (fig. 15.1).

La efectividad de la pesca eléctrica en la captura de peces está condicionada por nueve factores: el voltaje, la forma y materiales de los electrodos, la conductividad del agua, la temperatura del agua, el tipo de sustrato del río, la distancia respecto al individuo a capturar, el tamaño del pez, la especie y el tiempo de pesca (Steinmetz 1990, Sharber y Carothers 1990, Randall 1990, Klein Breteler et al. 1990). De estos factores, el más determinante es la conductividad del agua respecto a la conductividad del pez. La pesca eléctrica puede resultar un técnica muy eficiente en ríos vadeables con una conductividad de entre 50 y 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Smith-Root 1995). En zonas profundas o poco accesibles su rendimiento disminuye, al igual que en aguas poco conductoras (por ejemplo, zonas de alta montaña) o excesivamente saladas (estuarios). El tamaño del pez también influye, de forma que a mayor tamaño, mayor sensibilidad a la corriente eléctrica. Los juveniles o especies que no superan los 5 cm son difícilmente capturables (o con baja eficiencia) aunque es posible modificar el equipo, como usar un ánodo (aro) de menor diámetro, con el fin de concentrar la diferencia de potencial a su alrededor y facilitar su captura. Les pesca eléctrica también es más eficiente con temperaturas del agua más elevadas, especialmente a partir de 15 °C (Randall 1990).

MATERIAL

- Equipo de pesca eléctrica.
- Grupo electrógeno.

- Rectificador y conexiones.
- Rejilla (cátodo).
- Pértiga y aro (ánodo).
- Sacadoras (mango aislante, de madera o fibra de vidrio).
- Cubos.
- Dos redes de bloqueo.
- Tanques y aireadores para guardar las capturas en la orilla.
- Equipo de seguridad.
- Guantes de protección eléctrica.
- Vadeadores.
- Gafas polarizadas.
- Botiquín de primeros auxilios.
- Equipo medida peces.
- Anestésico.
- Ictiómetro (superficie con escala métrica incorporada para medir longitud de los peces; recomendable entre 60 y 100 cm).
- Balanza (recomendable precisión 0,1 g hasta 2 kg).
- Pinzas, sobres o viales para conservar muestras de escamas (opcional).
- Nevera (para preservar ejemplares sacrificados).

PROCEDIMIENTO

Éste puede variar en función de las características del río, del equipo utilizado y del número de operadores pero, en general, puede establecerse lo siguiente:

1. Seleccionar los tramos de muestreo, localizarlos en función de sus coordenadas geográficas, caracterizarlos y medir su superficie total. Es importante hacer todo esto sin molestar a los peces y, a ser posible, sin pisar el cauce.
2. El tramo debe presentar la mayor variedad posible de condiciones de profundidad, velocidad del agua, zonas de refugio y tipos de vegetación y sustrato.
3. El área de muestreo debe tener una longitud 10 veces la anchura media del río; con un mínimo de 100 m².
4. Si el objetivo es evaluar la densidad de la población a partir de métodos de capturas sucesivas (técnica 39a), hay que instalar sendas redes de bloqueo al inicio y final del tramo, con una luz de malla lo suficientemente pequeña como para evitar la entrada o salida de los ejemplares de menor tamaño (recomendable inferior a 2 cm).
5. El muestreo debe efectuarse de día, y preferiblemente al final de la estación de crecimiento. Evitar la pesca si la temperatura del agua es inferior a 5 °C, dado que la actividad de los peces es muy reducida.
6. Instalar todo el equipo en una orilla del río, revisando las conexiones y realizando una prueba de pesca antes de iniciar el muestreo.

El aparato de pesca eléctrica debe regularse a las características de cada río y a las comunidades de peces presentes

7. Graduar el tipo de corriente y la intensidad en función de la conductividad del agua, para evitar la electrocución de los peces. Es recomendable trabajar con intensidades inferiores a 2 A y voltajes de entre 200 y 400 V, aunque puede variar en función de cada tramo de río, por lo que debe realizarse una prueba de pesca (comprobar la reacción de los peces, la distancia o radio de acción del ánodo, etc.) antes de iniciar el muestreo.
8. El número de operarios óptimo son cuatro personas: un responsable del ánodo (conductor de la pesca), dos encargados de recoger los peces con sacaderas, y un cuarto técnico provisto de un cubo con agua para recoger los peces capturados y transportarlos a tanques con mayor volumen de agua situados en la orilla.
9. Realizar la pesca siempre aguas arriba, evitando en lo posible enturbiar el agua y barriendo con el ánodo todos los hábitats del tramo.
10. Dado que el uso de la electricidad conlleva un cierto nivel de riesgo, todo el personal debe estar equipado con el material adecuado (vadeadoras, guantes aislantes, etc.), conocer el funcionamiento del equipo, y tener nociones de primeros auxilios, especialmente sobre reanimación cardiopulmonar. En muchos países sólo puede utilizar equipo de pesca eléctrica quien obtenga el título correspondiente tras un curso de formación específico.
11. Una vez finalizada la pesca, desconectar el equipo, retirar las redes de bloqueo y proceder a la toma de medidas biométricas
12. Para la manipulación de los peces es recomendable su sedación mediante anestésicos. Para ello, es preciso utilizar los más adecuados, siendo el más indicado el eugenol o MS222 (100 mg/L).
13. Cada ejemplar debe ser identificado, sexado si es posible, y contabilizado (especificando a qué captura corresponde, en caso de realizar más de una). Se mide su longitud eligiendo una de las tres aproximaciones posibles: longitud estándar (distancia entre el rostro y el hueso hipural o zona donde nacen los radios de la aleta caudal), longitud furcal (distancia desde el rostro hasta la escotadura de los lóbulos de la aleta caudal) o la longitud total (distancia entre el rostro y la proyección de ambos lóbulos de la aleta caudal plegados) (Granado-Lorencio 1996). El pez debe ser pesado (precisión mínima 1 g) y debe anotarse su estado (presencia de heridas, parásitos, etc.).
14. Finalmente, devolver los peces en un tramo del río con presencia de refugio y baja velocidad del agua, para permitir su rápida recuperación.

Técnica 38. Muestreo de peces: métodos pasivos

Si las características del río no permiten desarrollar la pesca eléctrica o no se dispone del equipo necesario, existen otras técnicas de captura que pueden ser aplicadas en ambientes lóticos. Las trampas han sido desde siempre uno de los mé-



Figura 15.2:
Detalle de nasas instaladas
en un arroyo

todos más utilizados para la captura de peces (Hubert 1996). Aunque han recibido críticas por su baja eficiencia (Jackson y Harvey 1997), también es cierto que en muchos casos es el único método para desarrollar un muestreo de peces comparativo (Clavero et al. 2006). Uno de los modelos de trampa más utilizados en ríos son los de tipo nasa o trampas de «botella invertida» (*minnow traps*) para los peces de menor tamaño (fig. 15.2). La mayoría tienen forma rígida con una o varias aberturas en forma de embudo (o muerte). Los peces pueden entrar fácilmente pero no encuentran la salida, por lo que quedan retenidos. En el otro extremo de la trampa puede adaptarse una segunda entrada, o bien una bolsa por donde extraer las capturas. Dado que todos los métodos de captura tienen sus limitaciones, es necesario elegir el modelo y diseño óptimo en función de las especies a capturar y el tipo de río, con el fin de optimizar el esfuerzo. En ríos poco profundos, las trampas tipo nasas han demostrado ser más eficientes y capturar un mayor rango de tallas y especies (Clavero et al. 2006), por lo que es muy recomendable su uso.

Cuando no es posible la pesca eléctrica se pueden usar otras técnicas de captura, como nasas y redes

En ríos mayores es posible también usar redes, del tipo agalladeras o trasmallos, aunque su uso no es muy frecuente y el impacto sobre los peces es mayor (elevada mortalidad) (Kurkilahti y Rask 1996).

PROCEDIMIENTO

En el caso de realizar capturas mediante nasas, el procedimiento a seguir es:

1. Seleccionar los tramos de muestreo, localizarlos en función de sus coordenadas geográficas, caracterizarlos y medir su superficie total. Es importante hacer todo esto sin espantar a los peces y, a ser posible, sin pisar el cauce.
2. Instalar las trampas en una zona poco profunda, de forma que el último embudo sobresalga del agua. Con ello se evita que mueran otras especies que pueden penetrar en la trampa, como anfibios, reptiles o mamíferos. En zonas pro-

La efectividad de las nasas no es la misma en capturas diurnas que en capturas nocturnas

- fundas es posible utilizar trampas tipo *minnow* o incluso nasas de estructura rígida, de fácil instalación.
3. La probabilidad de captura varía entre las horas diurnas y nocturnas, por lo que la elección del tiempo de muestreo varía según los objetivos del estudio y de la disponibilidad de técnicos. Es recomendable inspeccionar las trampas cada 24 horas.
 4. En algunos casos puede ser recomendable usar cebos o atractores, pero debe valorarse su posible efecto sobre la capturabilidad.
 5. Procesar los ejemplares capturados como se indica en la técnica 37.

Técnica 39. Estima de la densidad poblacional

Rara vez se puede contar toda la población de peces. En su lugar, se emplean diferentes técnicas para estimar el tamaño poblacional

El tamaño de la población, es decir, el número de individuos que la componen, es una de las informaciones básicas en el estudio de la ictiofauna y es, junto con la estructura de edades (o tallas) y la condición, una de las variables más utilizadas para describir el estado de las poblaciones de peces (Hubert y Fabrizio 2004). Ya sea por su elevada abundancia, comportamiento o por su inaccesibilidad, raramente se puede realizar un recuento total de los peces que ocupan el área de estudio. Por ello es preciso recurrir a una estimación del tamaño poblacional, basándose en dos tipos de métodos: absolutos o relativos. En los métodos absolutos el resultado final es un valor exacto (junto a su correspondiente medida del error de la estimación), obtenido después de capturar una muestra representativa de la población. Los métodos relativos, por el contrario, nos permiten comparar la abundancia de peces entre tramos o entre ríos, pero no calcular un número o densidad real. Entre los métodos absolutos más habituales para el estudio de las poblaciones de peces de ríos están los basados en *capturas sucesivas con extracción* y los métodos de *captura-marcaje-recaptura* (también conocidos como métodos de marcaje y recaptura).

En la mayoría de los ambientes acuáticos los métodos de estimación absolutos requieren un elevado esfuerzo (en tiempo, personal, material, económico, etc.) para obtener un determinado resultado, de acuerdo con el grado de precisión deseada. Una alternativa pueden ser los métodos relativos como, por ejemplo, los índices de abundancia, siendo el más utilizado las *capturas por unidad de esfuerzo*. A continuación se describen los principales métodos (absolutos y relativos) aplicados en la evaluación de la densidad de peces en ríos.

Técnica 39a. Métodos absolutos: capturas sucesivas con extracción

El principio de este grupo de métodos consiste en realizar una serie de capturas sucesivas dentro de un tramo de río cerrado físicamente, tanto mediante pesca

eléctrica o trampas, como con cualquier otro método. En las capturas se aplica una cantidad de esfuerzo conocida y constante. Los individuos capturados en cada ocasión no son devueltos hasta el final del experimento, y se estima el tamaño de población a partir de la disminución de las capturas realizadas en las distintas ocasiones (Schwarz y Seber 1999). En el caso del estudio de peces de río, el esfuerzo suele medirse a partir del tiempo total de pesca o la longitud del tramo (o su superficie) si se capturan mediante pesca eléctrica, o de las dimensiones de las redes si se usan trampas o cerco.

El principio consiste en realizar una serie de capturas sucesivas dentro de un tramo de río físicamente cerrado. Es importante mantener constante el esfuerzo de captura

Las soluciones matemáticas de estos modelos son varias, y han sido recogidas y descritas en Seber (1982). Se pueden dividir en dos categorías: modelos de máxima verosimilitud y modelos basados en regresión lineal. Los primeros ofrecen una mejor estimación y un mayor rigor estadístico (Cowx 1983), mientras que los segundos son una buena alternativa cuando resulta difícil cumplir los supuestos del método. Además, una clara ventaja de los métodos basados en la máxima verosimilitud respecto a los basados en regresión lineal (y que hace que sean más usados) es su mayor flexibilidad, ya que ofrecen la posibilidad de testar el cumplimiento de algunos de los supuestos, e incluso variantes del método.

Supuestos del método

Para poder aplicar estos métodos, en general se deben satisfacer las siguientes condiciones (Moran 1951):

1. La población debe ser cerrada. No debe producirse una significativa natalidad, mortalidad o migración durante el experimento. Se puede cumplir con esta condición reduciendo el tiempo del muestreo.
2. Cada ocasión de captura debe reducir la población en una proporción significativa.
3. Todos los individuos deben tener la misma probabilidad de captura.
4. La probabilidad de captura debe ser constante en las distintas ocasiones en que se realice.

Suele ser difícil cumplir en sentido estricto todas estas condiciones. El tramo de río a muestrear puede cerrarse con redes de bloqueo de luz de malla lo suficientemente pequeña como para evitar la entrada o salida de los individuos de menor tamaño. El tiempo entre cada ocasión de captura puede ser lo suficientemente breve como para considerar que la población es cerrada. En cuanto al segundo supuesto, resulta difícil valorar si la disminución conseguida es significativa, dado que estamos precisamente estimando el tamaño de la población. Algunos autores apuntan a que debe capturarse más del 2% de la población para obtener una buena estimación (Krebs 1998). En cuanto a los dos últimos supuestos, dependen en

Para asegurar la efectividad de la captura se deben cumplir los supuestos del método

gran medida de la eficiencia de la técnica utilizada, de las características ambientales y del tamaño de los individuos que forman la población. La pesca eléctrica, por ejemplo, es muy eficiente en ríos poco caudalosos y con una conductividad media o baja. Dentro incluso del tramo, las zonas más profundas (menos vadeables) no pueden ser muestreadas con la misma facilidad que los tramos rápidos y someros, por lo que la eficiencia de la técnica puede variar y influir en el resultado final. También cabe recordar que los peces reaccionan a la pesca eléctrica en función de la especie, pero también de su tamaño, de manera que los individuos de mayor biomasa suelen ser capturados con mayor eficiencia. Una forma de corregir este efecto, así como su posible error sobre la estimación, consiste en separar los individuos por clases de tallas y realizar una estimación para cada clase. El tamaño poblacional será el resultado de sumar el número estimado de individuos para el total de clases.

Procedimiento

En la técnica 37 se ha comentado cómo se desarrolla la pesca eléctrica. A continuación se detalla el procedimiento a seguir para obtener una estimación del tamaño poblacional a partir de pescas sucesivas con pesca eléctrica, aunque el esquema puede ser fácilmente traducible al uso de trampas o redes.

1. Seleccionar un tramo de río vadeable y que presente la mayor diversidad posible de ambientes (pozas, rápidos, refugios, etc.). En función de la densidad de peces, el tramo puede tener una longitud de entre 50 y 100 metros. Evitar transitar por dentro del tramo para no provocar la huida de los peces.
2. Cerrar el tramo con el uso de redes de bloqueo, cuya luz de malla evite la entrada o salida de los individuos de menor tamaño. En ocasiones puede resultar útil aprovechar una barrera natural (por ejemplo, un salto de agua) como bloqueo, siempre que realmente evite la salida de individuos.
3. Situar en el punto inicial del tramo (aguas abajo) e iniciar la pesca. Para medir el esfuerzo puede resultar útil cronometrar el tiempo de pesca. Algunos equipos incorporan un contador de tiempo efectivo de pesca. Mantener un ritmo constante de pesca y no variar las condiciones de amperaje y voltaje durante todo el experimento.
4. Depositar los peces capturados en tanques de agua, separados por ocasión de captura. Controlar la temperatura del agua de los tanques así como la concentración de oxígeno disuelto, con el fin de evitar la mortalidad por confinamiento. Es recomendable el uso de aireadores (bombas de aire), que pueden incluso funcionar con baterías. Otra solución consiste en mantener los individuos capturados en cestas instaladas directamente dentro del cauce del río, lo que permite la renovación constante del agua. En este último caso, tener en cuenta que han de situarse fuera del radio de acción de la pesca eléctrica.

5. Una vez finalizada la primera ocasión de pesca, regresar al punto inicial para continuar con la segunda captura sucesiva. Si ha aumentado la turbidez por el tránsito de los pescadores, esperar un tiempo a que las condiciones sean similares a las iniciales.
6. Repetir tantas veces como sea necesario, en función de la densidad y la disminución de las capturas. El número mínimo recomendable es de tres capturas, siendo cuatro el ideal. En el caso de que las capturas no disminuyan con pasadas sucesivas, puede ser necesario realizar hasta ocho capturas.
7. Una vez finalizado el experimento, retirar las redes de bloqueo y contar el número de ejemplares de cada especie capturados para cada ocasión. Siempre que sea posible, medir y pesar los individuos, separando el resultado para cada ocasión de pesca. Devolver los peces en el mismo tramo, liberándolos en una zona de aguas tranquilas y en presencia de refugio, con el fin de facilitar su rápida recuperación.
8. Es necesario conocer la superficie del tramo muestreado para calcular la densidad de peces.

En la práctica hay que realizar pasadas sucesivas de pesca eléctrica hasta que el número de individuos capturados por pasada caiga de forma notoria

Trabajo de gabinete: estimación del tamaño poblacional

La elección del método para estimar la abundancia de peces está determinada por el cumplimiento de los supuestos. Como ya se ha comentado, los métodos basados en la máxima verisimilitud son los más utilizados. Se basan en estimar la distribución de probabilidades de las capturas para cada esfuerzo de pesca como:

$$f(\{n_i\}) = \prod_{i=1}^s \binom{P - x_i}{n_i} p_i^{n_i} q_i^{N - x_i + 1} \tag{15.1}$$

$$\frac{P!}{\left(\prod_{i=1}^s n_i!\right) (P - x_{s+1})!} p_1^{n_1} (q_1 p_2)^{n_2} \dots (q_1 q_2 \dots q_{s-1} p_s)^{n_s} (q_1 q_2 \dots q_s)^{N - x_s + 1} \tag{15.2}$$

donde P : población inicial, n_i : tamaño de las capturas para cada muestra i (total de capturas para cada muestra u ocasión de captura), k_i : capturas acumuladas, o $k_i = \sum_{j=1}^{i-1} n_j$, f_i : unidad de esfuerzo, F_i : esfuerzo acumulado, o $F_i = \sum_{j=1}^{i-1} f_j$, y $F_1 = 0$, p_i : probabilidad de un individuo de ser capturado en la ocasión i , y q_i : probabilidad de un individuo de no ser capturado en la ocasión i , $q_i = e^{(-hf_i)}$.

Zippin (1956, 1958) y Seber (1982) hicieron una propuesta de simplificación del método, considerando un esfuerzo de pesca constante entre las distintas ocasiones, y Junge y Libosvárský (1965) formularon una solución explícita para un total de tres ocasiones de captura:

$$X = 2C_1 + C_2 \quad (15.3)$$

$$Y = C_1 + C_2 + C_3 \quad (15.4)$$

$$\hat{P} = \frac{6X^2 - 3XY - Y^2 + Y(Y^2 + 6XY - 3X^2)^{\frac{1}{2}}}{18(X - Y)} \quad (15.5)$$

$$\hat{p} = \frac{3X - Y - (Y^2 + 6XY - 3X^2)^{\frac{1}{2}}}{2X} \quad (15.6)$$

$$V(\hat{P}) = \frac{\hat{P}(1 - q^3)q^3}{(1 - q^3)^2 - 9p^2q^2} \quad (15.7)$$

$$V(\hat{p}) = \frac{(qp)^2(1 - q^3)}{\hat{P}(q(1 - q^3)^2 - 9p^2q^3)} \quad (15.8)$$

donde \hat{P} : estima del tamaño de la población, \hat{p} : estima de la capturabilidad, q : $(1 - \hat{p})$, $V(\hat{P})$: varianza de \hat{P} , $V(\hat{p})$: varianza de \hat{p} , y C_x : número de individuos capturados en la muestra x .

A ser posible, conviene utilizar el método de máxima verosimilitud

Si la probabilidad de captura no se mantiene constante es posible aplicar la variación de Otis et al. (1978), siempre que se hayan realizado un mínimo de cuatro capturas sucesivas. En el caso de violación de los supuestos, el método desarrollado por Carle y Strub (1978) es especialmente aconsejable por su mayor robustez. Los métodos basados en regresión lineal prácticamente ya no se utilizan, ya que los intervalos de confianza del parámetro estimado acostumbra a ser no válidos, pero pueden llegar a ser la única alternativa cuando no es posible cumplir los supuestos de los métodos basados en la máxima verosimilitud. En general, la formulación matemática de todos estos modelos es compleja y no es intención de esta revisión tratarlos de forma exhaustiva. Existen diversos programas informáticos que permiten obtener la solución de manera sencilla. Entre estas aplicaciones destacan los programas MARK¹ y MicroFish.²

¹ Desarrollado por White y Burnham (1999), está disponible en <http://www.phidot.org/software/mark/>

² Desarrollado por Van Deventer y Platts (1989), está disponible en <http://www.microfish.org/>

Técnica 39b. Métodos absolutos: captura-marcaje y recaptura

Otra forma de estimar el tamaño de la población consiste en capturar y marcar individuos, devolverlos al medio y, posteriormente, volver a repetir el muestreo para observar qué fracción de individuos tienen una marca.

Los métodos de marcaje-recaptura presentan una serie de inconvenientes, como requerir un elevado esfuerzo de muestreo (es necesario marcar y recapturar un porcentaje muy elevado de la población), una inversión económica en marcas, y ofrecer estimaciones de baja precisión. A pesar de ello, son muy utilizados porque, además de ofrecer una estimación de la densidad, permiten calcular la tasa de supervivencia y obtener información individual de aspectos como la tasa de crecimiento, desplazamientos o selección del hábitat.

Los métodos de marcaje y recaptura son costosos, pero proporcionan datos interesantes sobre la biología de los peces

Supuestos del método

Los supuestos a los que se hacía referencia anteriormente se pueden resumir en:

1. El individuo marcado no queda afectado por la captura, manipulación y marcaje, manteniendo constante su probabilidad de captura.
2. Las marcas son permanentes y fácilmente reconocibles.
3. Todos los individuos tienen la misma probabilidad de ser capturados.
4. El proceso de marcaje no afecta a la tasa de supervivencia.
5. La población debe ser cerrada.

Así, la técnica escogida de marcaje no debe afectar al comportamiento de los individuos, y la marca debe permanecer mientras dure el experimento. En la práctica, resulta fácil violar alguno de estos supuestos, lo que ha llevado a plantear distintos diseños de marcaje-recaptura con el fin de minimizar el error en la estimación.

Procedimiento

Un primer paso es valorar el tipo de marcas a utilizar, pues deben tener un impacto mínimo sobre la población, ser fácilmente reconocibles y tener un tiempo de permanencia superior a la duración del experimento. También es necesario diseñar el muestreo en cuanto al número de ocasiones de recaptura, en función del tamaño poblacional y de la proporción de individuos marcados. Cuanto menor sea esta proporción, será preciso realizar mayor número de muestreos. En general, es necesario:

1. Capturar los peces con el método más eficiente (en función del ambiente y de las especies objeto de estudio).
2. Marcar los individuos capturados con un código de grupo o con marcas individuales, en función del método de estimación y de los objetivos del estudio.

- Es conveniente medir todos los individuos con el fin de obtener una estimación directa del crecimiento corporal entre el momento del marcaje y su posterior recaptura. Tras la manipulación, todos los ejemplares son devueltos al medio.
3. Transcurrido un tiempo prudencial para garantizar que los individuos capturados y marcados se han mezclado de nuevo con el resto de la población, se procede a la primera recaptura, repitiendo exactamente el mismo esfuerzo de pesca.
 4. Se anota el número de ejemplares capturados y de éstos, el número que presenta marca.
 5. Se repite la recaptura tantas ocasiones como sea posible o aconseje el método de estimación utilizado. En el caso de trabajar con poblaciones abiertas, se acostumbra realizar un mínimo de ocho recapturas.

Los peces se pueden
marcar con códigos
individuales o de grupo

Trabajo de gabinete: estimación del tamaño poblacional

Muchos son los métodos que permiten estimar la abundancia poblacional a partir de la información del marcaje y recaptura. En general se dividen entre métodos para poblaciones cerradas y métodos para poblaciones abiertas. Dentro de los métodos para poblaciones cerradas el más simple es el *método de Petersen*, que consiste en una única ocasión de marcaje y una recaptura. Los datos que se obtienen son el número de individuos capturados y marcados en el primer muestreo (m), el número de individuos capturados en el segundo muestreo (c) y el número de individuos capturados en el segundo muestreo que presentan una marca (individuos recapturados, r). Si se cumplen unos supuestos muy rigurosos, es posible predecir que la proporción de individuos recapturados respecto al total de capturados en el segundo muestreo será igual a la fracción de individuos marcados en la primera ocasión respecto al total de individuos de la población:

$$\frac{r}{c} = \frac{m}{\hat{P}} \quad (15.9)$$

de manera que:

$$\hat{P} = \frac{mc}{r} \quad (15.10)$$

siendo la desviación típica del parámetro estimado:

$$S(\hat{P}) = \sqrt{\frac{m^2 c (c - r)}{r^3}} \quad (15.11)$$

Su diseño tan sencillo hace que sea muy difícil el cumplimiento de los supuestos descritos anteriormente. El *método de Schnabel* (1938, Seber 1982) representa una buena alternativa al ser más robusto y mejorar la estimación del error asociado.

Se basa en múltiples procesos de marcaje y recaptura de la misma población, de forma que en cada nueva captura se registra el número de individuos marcados y se marcan los ejemplares capturados por primera vez, incrementándose paulatinamente la proporción de peces marcados presentes en la población. El tamaño poblacional se estima como:

$$\hat{P} = \frac{\sum_t (C_t M_t)}{\sum_t R_t + 1} \quad (15.12)$$

donde C_t : total de individuos capturados en cada momento t , R_t : individuos con marca en la muestra t , U_t : individuos marcados por primera vez y liberados en la muestra t , $C_t = R_t + U_t$ y M_t : corresponde al número de marcados antes del momento t : $M_t = \sum_{i=1}^{t-1} U_i$

siendo la varianza del parámetro estimado:

$$\text{var}\left(\frac{1}{\hat{P}}\right) = \frac{\sum R_t}{(\sum C_t M_t)^2} \quad (15.13)$$

En el caso de poblaciones abiertas, el diseño más frecuente es el propuesto por Jolly (1965, 1982) y Seber (1982), que consiste en realizar distintas ocasiones de marcaje-recaptura, identificando con una marca o código distinto los ejemplares capturados para cada ocasión. La formulación es compleja, por lo que resulta muy recomendable usar algún programa informático como MARK (ya mencionado en página 292), que ofrece una amplia recopilación de métodos para el análisis de los datos obtenidos a partir del marcaje y posterior recaptura.

Técnica 39c. Métodos relativos: capturas por unidad de esfuerzo

En la mayoría de los casos, los métodos absolutos requieren una gran inversión de tiempo o esfuerzo económico (en material o personal). Por otra parte, no siempre la cuestión que se está investigando requiere una estima exacta del tamaño poblacional, o simplemente no es posible obtenerla. En estas circunstancias puede resultar conveniente obtener una estima relativa de la abundancia de peces, siendo el método más habitual la obtención de un índice de abundancia.

El *índice de abundancia* se puede definir como un parámetro relacionado con la densidad, que varía proporcionalmente con la misma. El índice de abundancia

Si es posible, conviene realizar marcajes y recapturas sucesivos

Si interesan más las tendencias de la población que el número concreto de individuos, cabe utilizar índices de abundancia

más usado en ecología de peces es el derivado de las *capturas por unidad de esfuerzo* (CPUE), que se define matemáticamente como:

$$\frac{C}{f} = qN \quad (15.14)$$

donde C : número o biomasa de peces capturados, f : unidad de esfuerzo invertido, q : coeficiente de capturabilidad (o probabilidad de capturar un individuo cuando se aplica una unidad de esfuerzo), y N : tamaño absoluto de la población de peces.

Así, el número de peces capturados cuando se aplica una unidad de esfuerzo depende del total de individuos que forman la población estudiada y de la probabilidad de capturarlos.

Supuestos del método

Para que se cumpla la igualdad entre la proporción de capturas por una unidad de esfuerzo y el tamaño absoluto de la población, deben cumplirse una serie de supuestos subyacentes como son:

1. Que exista una relación lineal entre las CPUE y la densidad absoluta, de forma que las capturas sean siempre proporcionales al esfuerzo invertido.
2. Que la población se encuentre en equilibrio (es decir, tasas de mortalidad y emigración compensadas por las tasas de natalidad e inmigración).
3. Que las unidades de esfuerzo operen independientemente, es decir, que una unidad de esfuerzo (todo lo que implique el desarrollo de la pesca) no afecte a la probabilidad de captura en las siguientes ocasiones de pesca.
4. Que el coeficiente de capturabilidad sea constante durante el período de estudio.
5. Que cada individuo de la población tenga la misma probabilidad de ser capturado.

En la práctica, estos supuestos raramente se cumplen. Las poblaciones difícilmente presentan una dinámica estacionaria, no todos los individuos se capturan con la misma facilidad (la capturabilidad suele variar entre tamaños o sexos) o bien no todos los métodos son igualmente efectivos en todos los ambientes o épocas del año, por ejemplo. La capturabilidad varía debido a factores tanto extrínsecos como intrínsecos, disminuyendo la exactitud de las estimaciones obtenidas a partir de las CPUE.

Procedimiento

Existen muchas alternativas para obtener un índice de abundancia, y la elección depende de aspectos como el ambiente, la técnica de captura, las especies que se pretenden capturar, etc., por lo que resulta imposible concretar un único procedimiento. Las dos únicas variables que deben ser controladas son el número de

capturas y el esfuerzo invertido. Este último puede ser medido de muchas maneras, en función de las técnicas y métodos utilizados. Por ejemplo, las capturas se pueden relacionar con el tiempo invertido durante una sesión de pesca eléctrica, con la distancia de río muestreada, con el número de trampas dispuestas, con la superficie de redes instaladas, etc.

Si bien un índice de abundancia como las CPUE ofrece sólo una estimación relativa de la densidad, sus principales virtudes son la facilidad de obtención y el permitir la comparación entre localidades o estaciones (por ejemplo) si las condiciones metodológicas se mantienen constantes. En el diseño del muestreo la clave es contrarrestar los efectos de la variación de la capturabilidad, aunque esto es difícilmente evitable. Si identificamos los factores que determinan las CPUE y estandarizamos el muestreo (el esfuerzo), es posible llegar a minimizar la variabilidad de q . Esto se consigue, por ejemplo, pescando siempre con el mismo equipo, con la misma intensidad, en los mismos tramos o en los mismos períodos del año.

Pese a sus limitaciones, las capturas por unidad de esfuerzo son muy utilizadas

Técnica 40. Estado de condición

En peces se llama *condición* al estado fisiológico de los individuos según caracteres externos. Se trata de un indicador a corto plazo del estado de salud de los individuos de una población. Típicamente se estima comparando el peso de un individuo con el peso estándar para una longitud determinada, asumiendo que mayores índices de condición corresponden a un mejor estado fisiológico. La utilización de los índices de condición, aunque muy extendida debido a su simplicidad y fácil cálculo, presentan algunos inconvenientes estadísticos, por lo que recientemente se han propuesto otros métodos basados en la relación longitud-peso de los individuos. Concretamente, Bolger y Connolly (1989) y García-Berthou y Moreno-Amich (1993) sugieren que las variaciones en la condición están relacionadas con la variación del parámetro a (ordenada en el origen) de la relación longitud-peso transformada logarítmicamente ($\log \text{longitud} = \log a + b \log \text{peso total}$) después de comprobar la homogeneidad del parámetro b (pendiente de la relación longitud-peso transformada logarítmicamente) de las muestras o poblaciones que se comparan.

La condición es el estado fisiológico aparente de los peces

El estado de condición se considera altamente relacionado con las características ambientales, tales como la temperatura, la disponibilidad de alimento, el régimen hídrico, la competencia, la disponibilidad de oxígeno, la vegetación de ribera, etc. (Pope y Kruse 2007), de manera que se utiliza como indicador de la variación de las condiciones ambientales y de los procesos ecológicos (Vila-Gispert et al. 2000). También, el análisis del estado de condición se utiliza a menudo en estudios de manipulación para determinar si un tratamiento afecta al estado de los individuos de una población.

El estado de condición se determina midiendo y pesando cada pez

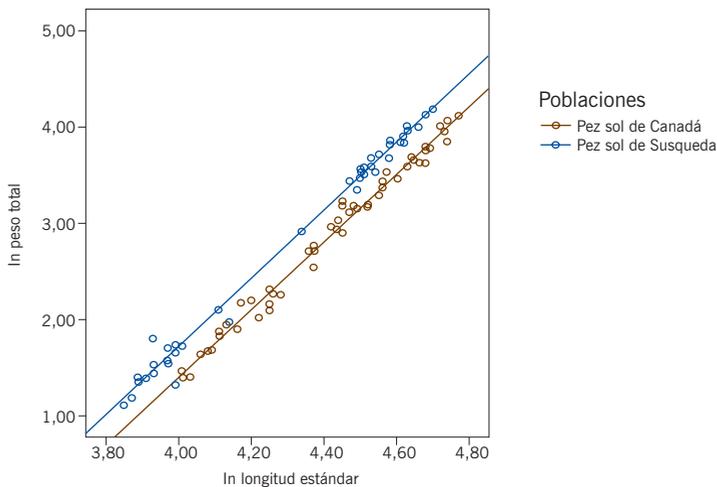
Procedimiento

Al determinar el estado de condición en peces es aconsejable que todas las tallas de la población estén representadas en todas las muestras, para así evitar posibles sesgos. Una vez obtenidas las muestras, se anestesian los peces con benzocaína y se mide in situ la longitud total o estándar (± 1 mm) y el peso total (± 1 g) de cada individuo. A continuación se liberan los individuos en el tramo del río donde han sido capturados.

Debido a las variaciones estacionales de la condición como consecuencia del crecimiento gonadal, se recomienda tomar muestras de una misma época (preferiblemente al cabo de uno o dos meses de realizada la puesta), para asegurar que todos los individuos de la población de una especie determinada se encuentren en la misma fase del ciclo fisiológico, y que las variaciones en la condición sean debidas principalmente a diferencias en la ingesta de alimento, y no a diferencias de peso gonadal. El muestreo para el análisis de la condición debe planificarse en función de la época de puesta de cada especie. En cuanto a las posibles diferencias de morfología entre machos y hembras, es aconsejable realizar el análisis estadístico separadamente para cada sexo. También es preferible aplicar los análisis estadísticos separando los individuos jóvenes de los adultos.

El análisis estadístico utilizado para comparar la condición de distintas poblaciones de peces o de una misma población en función del tiempo, parte del método propuesto por García-Berthou y Moreno-Amich (1993), que se basa en el análisis de la covarianza (ANCOVA), utilizando el peso total como variable dependiente y la longitud como covariable. La relación entre estas dos variables no es lineal, pero la transformación logarítmica de los datos la linealiza. La homogeneidad de los coeficientes de regresión (pendientes) de las rectas de regresión del peso y la longitud se comprueba a partir de un diseño especial del ANCOVA, analizando la interacción entre el factor y la covariable. Si la interacción (homogeneidad de pendientes) es no significativa ($p > 0,05$), el diseño estándar del ANCOVA comprueba si existen diferencias significativas en el parámetro a (intersección de y) entre las poblaciones o grupos. El problema de la utilización del ANCOVA reside en el hecho de que si no hay homogeneidad de pendientes, ésta no puede aplicarse para el análisis de la condición.

A fin de determinar los posibles factores o variables ecológicas que pueden explicar la variación de la condición en distintas poblaciones o de una misma población en función del tiempo, se puede aplicar una regresión múltiple por pasos (*stepwise multiple regression*), que da información sobre cuál de los factores ecológicos explica la mayor parte de la variación de la condición (fig. 15.3).

**Figura 15.3:**

Se puede observar homogeneidad de pendientes entre dos poblaciones de pez sol (*Lepomis gibbosus*) comparadas, pero diferencias en cuanto al parámetro a (intersección de y)

Nota: Como el valor de la intersección de y de la población del embalse de Susqueda (Cataluña, al noreste de España) parece mayor que el de la población de Canadá se puede concluir que el estado de condición es mejor para la población de Susqueda que para la de Canadá.

15.2. Bibliografía

- BOLGER T., y CONNOLLY P.L. «The selection of suitable indices for the measurement and analysis of fish condition». *Journal of Fish Biology* 34 (1989): 171-182.
- CARLE F.L., y STRUB M.R. «A new method for estimating population size from removal data». *Biometrics* 34 (1978): 621-830.
- CLAVERO M., BLANCO-GARRIDO F., y PRENDA J. «Monitoring small fish populations in streams: A comparison of four passive methods». *Fisheries Research* 78 (2006): 243-251.
- COWX I.G. «Review of methods for estimating fish population size from survey removal data». *Fisheries Management* 14 (1983): 67-82.
- CURRIE D.J. «Energy and large-scale patterns of animal and plant-species richness». *American Naturalist* 137 (1991): 27-49.
- GARCÍA-BERTHOU E., y MORENO-AMICH R. «Multivariate analysis of covariance in morphometric studies of the reproductive cycle». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50 (1993): 1394-1399.
- GRANADO-LORENCIO C. *Ecología de peces*. Sevilla: Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla, 1996.
- HELPMAN G.S., COLLETE B.B., y FACEY D.E. *The diversity of fishes*. Malden: Blackwell Science, 1997.
- HUBERT W.A. «Passive capture techniques». En B.R. Murphy, y D.W. Willis, eds. *Fisheries techniques*. Bethesda: American Fisheries Society, 1996: 157-182.
- HUBERT W.A., y FABRIZIO M.C. «Relative abundance and catch/effort relationships». En M.L. Brown, y C.S. Guy, eds. *Analysis and interpretation of freshwater fisheries data*. Bethesda: American Fisheries Society, 2004: 1-95.
- JACKSON D.A., y HARVEY H.H. «Qualitative and quantitative sampling of lake fish communities». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54 (1997): 2807-2813.
- JOLLY, G.M. «Explicit estimates from capture-recapture data with both death and immigration-stochastic model». *Biometrika* 52 (1965): 225-247.

- JOLLY, G.M. «Mark-recapture models with parameters constant in time». *Biometrics* 38 (1982): 301-321.
- JUNGE C.O., y LIBOSVÁRSKÝ J. «Effects of size selectivity on populations estimates based on successive removals with electrical fishing gear». *Zoologické Listy* 14 (1965): 171-178.
- KLEIN BRETELER J.G.P., RAAT A.J.P., y GRIMM M.P. «Efficiency and selectivity in fishing with electricity». En I.G. Cowx, ed. *Developments in electric fishing*. Oxford: Fishing News Books, 1990: 219-228.
- KREBS C.J. *Ecological methodology*. Menlo Park: Addison Wesley Longman Inc., 1998.
- KURKILAHTI M., y RASK M. «A comparative study of the usefulness and catchability of multi-mesh gill nets and gill net series in sampling of perch (*Perca fluviatilis* L.) and roach (*Rutilus rutilus* L.)». *Fisheries Research* 27 (1996): 243-260.
- LØVGREN J., y PERSSON L. «Fish-mediated indirect effects in a littoral food web». *Oikos* 96 (2001): 150-156.
- LUCAS M.C. y BARAS E. «Methods for studying spatial behaviour of freshwater fishes in the natural environment». *Fish and Fisheries* 1 (2000): 283-316.
- MCDOWALL R.M. «Diadromy: Origins and definition of terminology». *Copeia* 19 (1992): 248-251.
- MORAN P.A.P. «A mathematical theory of animal trapping». *Biometrika* 38 (1951): 307-311.
- NELSON J.S. *Fishes of the world*. Nueva York: John Wiley & Sons, 1994.
- OTIS D.L., BURNHAM K.P., WHITE G.C., y ANDERSON D.R. «Statistical inference from capture data on closed animal populations». *Wildlife Monographs* 62 (1978): 1-135.
- PERSSON L. «Community ecology of freshwater fishes». En P.J.B. Hart, y J.D. Reynolds, eds. *Handbook of fish biology and fisheries*. Malden: Blackwell Publishing, 2002: 321-340.
- PITCHER T.J., y HART P.J.B. *Fisheries ecology*. Londres: Croom Helm, 1982.
- POPE K.L., y KRUSE C.G. «Condition». En C.S. Guy, y M.L. Brown, eds. *Analysis and interpretation of freshwater fisheries data*. Bethesda: American Fisheries Society, 2007: 423-471.
- RANDALL R.G. «Effect of water temperature, depth, conductivity and survey area on the catchability of juvenile Atlantic salmon by electric fishing in New Brunswick streams». En I.G. Cowx, ed. *Developments in electric fishing*. Oxford: Fishing News Books, 1990: 19-90.
- REEVES G.H., BISSON P.A., y DAMBACHER J.M. «Fish communities». En R.J. Naiman, ed. *River ecology and management. Lessons from the Pacific Coastal ecoregion*. Nueva York: Springer, 2001: 200-234.
- REYNOLDS J.B. «Electrofishing». En B.R. Murphy, y D.W. Willis, eds. *Fisheries techniques*. Bethesda: American Fisheries Society, 1996: 221-254.
- RICKLEFS R.E. «Community diversity: Relative roles of local and regional processes». *Science* 235 (1987): 167-171.
- SCHILL D.J., y BELAND K.F. «Electrofishing injury studies: A call for population perspective». *Fisheries Research* 20 (1995): 28-29.
- SCHNABEL Z.E. «The estimation of the total fish population of a lake». *American Mathematician Monthly* 45 (1938): 348-352.
- SCHWARZ C.J., y SEBER G.A.F. «A review of estimating animal abundance III». *Statistical Science* 14 (1999): 427-456.
- SEBER G.A.F. *The estimation of animal abundance*. Londres: Charles Griffin and Company, 1982.
- SEBER G.A.F. «A review of estimating animal abundance». *Biometrics* 42 (1986): 267.
- SHARBER N.G., y CAROTHERS S.W. «Influence of electric fishing pulses shape on spinal injuries in adult rainbow trout». En I.G. Cowx, ed. *Developments in electric fishing*. Oxford: Fishing News Books, 1990: 19-26.
- SMITH-ROOT Inc. *Electrofishing manual*. Vancouver: Smith-Root Inc., 1995.
- SNYDER D.E. «Impacts of electrofishings on fish». *Fisheries Research* 20 (1995): 26-27.

- STEINMETZ B. «Electric fishing: Some remarks on its use». En I.G. Cowx, ed. *Developments in electric fishing*. Oxford: Fishing News Books, 1990: 1-4.
- VAN DEVENTER J.S., y PLATTS W.S. *Microcomputer software system for generating population statistics from electrofishing data – User's guide for MicroFish® 3.0. Secondary Titl*. Ogden: US Department of Agriculture, Forest Service Intermountain Research Station, General Technical Report INT-254, 1989.
- VILA-GISPERT A., ZAMORA L., y MORENO-AMICH R. «Use of the condition of Mediterranean barbel (*Barbus meridionalis*) to assess habitat quality in stream ecosystems». *Archiv für Hydrobiologie* 148 (2000): 135-145.
- WHITE G.C., y BURNHAM K.P. «Program mark: Survival estimation from populations of marked animals». *Bird Study* 46 (Suppl) (1999): 120-138.
- WILLIAMS C.B. *Patterns in the balance of nature*. Londres: Academic Press, 1964.
- WOOTTON R.J. *Ecology of teleost fishes*. Londres: Chapman & Hall, 1990.
- ZIPPIN C. «An evaluation of the removal method of estimating animal populations». *Biometrics* 12 (1956): 163-189.
- ZIPPIN C. «The removal method of population estimation». *Journal of Wildlife Management* 22 (1958): 82-90.

La biota de los ríos: otros vertebrados

JORGE GONZÁLEZ ESTEBAN

16.1. Introducción

En ecología fluvial la variedad e intensidad de trabajos sobre invertebrados y peces eclipsan los estudios sobre otros vertebrados, aunque irónicamente son estos últimos los que concentran los mayores esfuerzos en cuanto a conservación (Jefries y Mills 1990). Hay numerosos vertebrados, aparte de los peces, que están ligados a las aguas continentales, algunos estrictamente acuáticos, otros semiacuáticos. Además, innumerables especies terrestres frecuentan a menudo los ríos, bien sea para beber, bañarse, buscar comida o refugio, pudiendo afectar a los ecosistemas fluviales con sus excrementos, o como en el caso del ganado mayor, al pisotear las orillas modificando la vegetación de ribera (Trimble y Mendel 1995). En cuanto a las especies más ligadas a los ríos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos forman parte de las redes tróficas lóxicas, a menudo ocupando nichos en la cúspide de las mismas, por lo que pueden tener gran influencia tanto sobre las comunidades como sobre el funcionamiento del ecosistema. Desafortunadamente, el conocimiento del papel de estos grupos es escaso y se basa mayoritariamente en trabajos descriptivos (Allan y Castillo 2007).

Además de las estrictamente fluviales, muchas especies de vertebrados terrestres frecuentan los ríos

Los anfibios encarnan uno de los mejores ejemplos de la explotación de un ecosistema poco maduro por formas juveniles que, en su estado adulto, se incorporan a un ecosistema más maduro (Margalef 1983). Desde el punto de vista de la limnología, los urodelos (tritones y salamandras) y los anuros (ranas y sapos) son

completamente diferentes. Las larvas de los primeros son zoófagos muy semejantes a los adultos, mientras que los renacuajos de los anuros divergen más del adulto, con profundas alteraciones anatómicas como adaptación a la vida acuática. Los renacuajos son micrófagos, comen sedimento, y pueden raspar el sustrato mediante filas de dientecitos dispuestas delante y detrás de la boca. A su vez, los renacuajos son alimento de muchos depredadores. Algunas especies de salamandras pueden alcanzar gran tamaño y sus poblaciones alcanzan gran biomasa. Otras especies son los principales depredadores en el curso alto de ríos y arroyos.

Los vertebrados superiores (reptiles, aves y mamíferos) son animales de respiración atmosférica, y su retorno a la vida acuática es una adaptación secundaria debida, principalmente, a la búsqueda de alimento (Margalef 1983). La historia y la evolución hacen que los vertebrados superiores que han vuelto al agua sean principalmente macrófagos, aunque hay algunos vegetarianos (manatí) y micrófagos (flamencos).

Entre los reptiles hay numerosas tortugas de agua dulce omnívoras, que consumen invertebrados y peces (Allan y Castillo 2007). Las serpientes también cuentan con representantes en los ríos, y la mayor parte de los cocodrilos actuales son de agua dulce. Serpientes y cocodrilos son depredadores de peces e invertebrados; incluso los cocodrilos se alimentan fundamentalmente de invertebrados en las primeras etapas de su vida.

Además de tener un marcado efecto en las redes tróficas, las aves son importantes vectores de dispersión para numerosos organismos fluviales

Las aves constituyen un importante vehículo de cambio entre los ecosistemas terrestres y los acuáticos (Margalef 1983). Numerosos órdenes dependen en mayor o menor grado del alimento producido en las aguas, o de refugios apropiados para la cría. Utilizan el excedente de la producción de los ecosistemas acuáticos, de manera que se orientan preferentemente hacia sistemas fluctuantes (marismas, etc.) y hacia los lagos eutróficos. Es difícil evaluar la materia orgánica exportada a través de las aves, pero esta dirección de flujo no es única. Se reconocen numerosas adaptaciones en estructura de pico, patas, protección (hidrófuga) del plumaje y comportamiento. Unas se alimentan en superficie y otras en profundidad, bien a base de invertebrados, bien cazando peces y anfibios. Muchas aves acuáticas son migradoras y sus rutas incluyen la explotación de sistemas acuáticos apropiados en el momento oportuno, cuando aumenta rápidamente la productividad y hay pocos competidores. Algunas de estas aves, como los cisnes, son importantes en la dispersión de invertebrados, algas y macrófitos (Figuerola y Green 2002), que de esta forma tienen un flujo genético preferencial en las principales rutas migratorias (King et al. 2002, Klaasen y Nolet 2007).

En cuanto a los mamíferos, una gran variedad de especies forman parte de las redes tróficas de los ríos (Allan y Castillo 2007). Desde pequeños insectívoros hasta

osos consumen ocasional o frecuentemente invertebrados y peces. Otros, como nutrias y visones, son completamente acuáticos y se alimentan casi exclusivamente de recursos acuáticos; los castores, para alimentarse de vegetación de ribera, talan árboles y construyen presas, alterando profundamente la morfología y el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos (Jones et al. 1994, Wright et al. 2002). Entre los grandes mamíferos fluviales se puede considerar a los manatíes, herbívoros estrictos, y a algunas especies de delfines que se alimentan de invertebrados y peces.

Una gran variedad de especies de mamíferos forman parte de las redes tróficas fluviales

Las diferencias en tamaño, hábitat y comportamiento entre distintos grupos de vertebrados, y el hecho de que muchos de los trabajos realizados se centren exclusivamente en unas pocas especies, por ejemplo, porque son objetivo de planes de conservación, ha producido la proliferación de métodos de trabajo altamente específicos, que contrastan con las técnicas más estandarizadas que se usan para otros grupos, como los invertebrados. Ante la imposibilidad de resumir todas las técnicas habituales para el estudio de vertebrados fluviales, recogemos aquí siete, que a nuestro entender reflejan el espectro de métodos que se utilizan en este campo. Por un lado, es habitual realizar inventarios de las especies presentes en determinados lugares. En algunos grupos, como por ejemplo las anátidas, puede tener gran interés realizar censos y extenderlos en el tiempo, ya que eso permite analizar las tendencias poblacionales de un grupo de especies, e inferir pautas interesantes para su gestión. Además, a menudo una o unas pocas especies tienen gran prioridad, como cuando son objeto de programas específicos de conservación. A título de ejemplo, describimos dos técnicas habituales de detección de especies fluviales, la búsqueda de rastros y el trampeo, ilustrándolas con los ejemplos de dos especies prioritarias en Europa.

Todas estas técnicas deben tomarse como una pequeña muestra del abanico disponible, y el lector debe tener en cuenta que son muy específicas del grupo animal y del tipo de río, por lo que deberá adaptarlas a sus necesidades particulares, o simplemente utilizar otras técnicas diferentes. Y por supuesto, hay infinidad de otras técnicas, desde análisis genéticos hasta estudios del comportamiento, que se pueden aplicar en función de los objetivos del estudio.

Técnica 41. Captura e inventario de anfibios y reptiles

La complejidad del cauce y de las márgenes dificulta los estudios detallados de los anfibios y reptiles que habitan el ecosistema fluvial. La mayor parte de las especies son difíciles de detectar, al menos durante gran parte del año, por lo que en el mejor de los casos hay que combinar varias técnicas de detección para realizar un inventario y éste ha de estar orientado hacia un grupo concreto formado por especies con ciclo vital y requerimientos semejantes.

La captura de anfibios a mano es un buen método de inventario

Técnica 41a. Captura de anfibios a mano

Pese a ser un método poco sofisticado, la prospección intensiva de un tramo de río capturando las especies a mano o con la ayuda de una sacadera es un buen procedimiento para determinar la presencia y abundancia relativa de algunas especies de anuros y urodelos (Resources Inventory Committee, 2000).

PROCEDIMIENTO

Para elaborar el listado de especies de un tramo (presencia/ausencia) se pueden realizar prospecciones durante un tiempo fijado de antemano (por ejemplo, 120 minutos-persona o dos personas buscando durante 60 minutos). Este tipo de búsquedas permite cubrir tramos grandes y maximizar el número total de capturas al orientar el esfuerzo hacia los hábitats más idóneos o más accesibles. No es recomendable establecer una longitud de tramo a cubrir, ya que algunas especies se distribuyen en agregados y pueden pasar más fácilmente desapercibidas. Para conocer la abundancia relativa se realizan prospecciones sobre un área fijada de antemano. Comenzando en la parte inferior del tramo elegido se prospectan intensivamente bandas transversales de un metro de ancho hasta completar una longitud previamente establecida en función de las densidades esperadas para las especies objetivo. La abundancia relativa se calcula como el número de individuos observado por área prospectada. Esta aproximación no es adecuada para especies de baja densidad. Si por razones de tiempo o dinero no es factible realizar una búsqueda intensiva de este tipo, la prospección sobre un tiempo fijado puede proporcionar una estima grosera de la abundancia relativa, expresada como el número de individuos por unidad de esfuerzo de búsqueda.

DISEÑO DEL MUESTREO

Para alcanzar un buen rendimiento es necesario establecer cuáles son las especies objetivo y qué información se busca obtener de cada una de ellas. Hay que seleccionar y delimitar sobre cartografía a escala adecuada las áreas a prospectar, incluyendo únicamente las que satisfacen los requerimientos de las especies objetivo. En otros casos la prospección está condicionada por la necesidad de conocer la fauna de un determinado tramo de río, no habiendo lugar para selección alguna. En cualquier caso es conveniente contar con dos niveles de estratificación en los que agrupar las unidades de esfuerzo: hábitat potencial y otros hábitats.

A continuación es necesario determinar qué técnica es la más adecuada para nuestro estudio. La de tiempo fijo es idónea en prospecciones generales de grandes áreas, permitiendo distinguir al menos tres situaciones: buena, media y baja. La de área fija permite identificar, además, relaciones entre hábitat y abundancia.

En prospecciones de presencia/ausencia, es conveniente realizar un muestreo aleatorio en el cual todas las unidades de muestreo tengan la misma probabilidad de ser prospectadas. Las estimas de abundancia relativa deben realizarse sobre el área de distribución potencial, realizando un muestreo sistemático. Es decir, obteniendo al azar una primera unidad a partir de la cual se seleccionan las siguientes mediante algún criterio fijo repetido periódicamente (por ejemplo, prospectando una unidad de muestreo cada X metros en un recorrido previamente delimitado, Tellería 1986). Si se establece algún nivel de estratificación hay que prospectar el mismo número de unidades para cada estrato.

Conviene estratificar el área de muestreo, prestando especial atención al hábitat potencial de cada especie

En los estudios de abundancia relativa es conveniente inspeccionar previamente el área de estudio para adecuar la selección de las unidades de esfuerzo a las condiciones de accesibilidad de los distintos tramos del río.

MATERIAL

- Mapas (1:25 000, 1:10 000).
- Guías de identificación.
- Cinta métrica de 50 m.
- Sacadera, salabardo o similar.
- Marco con fondo transparente para inspeccionar el sustrato en aguas turbulentas.
- Recipientes para depositar los ejemplares capturados.
- Calibre y/o regla.
- Dinamómetro.
- Cinta de plástico para señalar los límites del área de trabajo.

TRABAJO DE CAMPO

1. En primer lugar es conveniente realizar un esquema del tramo a prospectar.
2. Señalar los límites del área de trabajo.
3. Comenzar la búsqueda en el agua desde el punto más bajo del tramo.
4. Comenzar inspeccionando visualmente el río y la orilla (el primer metro).
5. Levantar o voltear sólo los objetos (rocas, piezas de madera) que no están incrustados en el sustrato, para no ocasionar modificaciones importantes en las orillas; devolverlos después a su posición original.
6. Explorar cuidadosamente cada objeto que proporcione cobertura, recorriéndolo con las manos en el caso de que por su anclaje al sustrato su desplazamiento pudiese ocasionar daños a los microhábitats del río.
7. En estudios de abundancia es conveniente explorar y extraer los objetos que puedan proporcionar cobertura y depositarlos en la orilla; colocarlos en su posición original al finalizar el censo.

Es esencial registrar la posición, determinar el sexo y estado del animal capturado, y devolverlos a su lugar de captura al terminar la prospección

8. Cuando se localice un ejemplar, registrar su posición (por ejemplo, superficie, bajo roca, profundidad, microhábitat).
9. Para prevenir recapturas depositar los individuos capturados en recipientes protegidos, procurando minimizar el estrés y el sobrecalentamiento.
10. Dependiendo de las necesidades del estudio anotar determinadas características de los ejemplares capturados (sexo, longitud, peso, estado de desarrollo...). Este tiempo dedicado a la toma de datos no debe ser contabilizado en las prospecciones durante un tiempo fijo.
11. Una vez completada la prospección, devolver los animales adultos a su lugar de captura y liberar las larvas en el punto más alto del tramo prospectado de forma que deriven dentro del tramo.

TRATAMIENTO DE LOS DATOS

El primer resultado obtenido es el listado de especies observadas. Además, el procedimiento seguido permite:

1. Calcular una medida de la abundancia en términos de número de animales observado por unidad de esfuerzo. Esto puede ser estimado para cada tramo, río, estrato o área estudiada.
2. Contrastar las características del hábitat entre las muestras en las que se ha observado la presencia de una determinada especie o grupo y las muestras donde no se han hallado.
3. Examinar las relaciones entre el estado de desarrollo de los anfibios y las características del hábitat.
4. Contrastar la estructura y la abundancia de las poblaciones entre tramos de un mismo río o entre ríos.

Técnica 41b. Censo de anuros mediante escuchas

Se pueden censar anuros contando el número de machos que cantan

En muchos anuros se pueden identificar los cantos de los machos y realizar escuchas estandarizadas para inventariar las especies que habitan un área dada y determinar su abundancia (Heyer et al. 1994). No obstante, en hábitats lineales como los ríos es difícil asignar el número de contactos obtenidos (machos cantores) a una unidad de superficie, ya sea a través de un transecto lineal desde el que se estima la distancia hasta cada contacto o de una anchura fija a la que se asignan o excluyen los animales.

La abundancia puede expresarse como número de machos cantores por kilómetro de orilla recorrida. Para ello hay que seleccionar tramos con características homogéneas, en los que se mantengan las características del hábitat y las condi-

ciones de detectabilidad, y recorrerlos manteniendo una velocidad constante (por ejemplo, 2-3 km/h). Los recorridos serán de una o dos horas, de modo que no cambien significativamente las condiciones ambientales, ni se incluyan momentos del día en los que los animales muestran distinto comportamiento.

Técnica 41c. Censo de galápagos basado en observación directa

Entre los muchos tipos de reptiles asociados a los ríos, los galápagos acuáticos son un grupo de amplia distribución que cuenta con muchas especies sujetas a inventariación y planes de seguimiento. Por ello, expondremos la técnica de observación directa más usual con este grupo.

La técnica más común es el conteo de ejemplares asignándolos a una superficie prospectada o a una distancia recorrida por el observador (Heyer et al. 1994). En el caso de los galápagos, la necesidad que tienen de recibir el sol facilita la realización de este tipo de censos. Sin embargo la disponibilidad de superficies adecuadas para que los animales tomen el sol, que sean a su vez accesibles al observador, condiciona este tipo de censos y dificulta la comparación de resultados entre ríos. Para realizar un censo de este tipo es necesario asumir que: 1) todos los individuos tienen la misma oportunidad de ser observados; 2) cada especie tiene la misma probabilidad de ser observada durante cada sesión de muestreo; 3) cada individuo es registrado una única vez durante el censo; 4) los resultados de dos observadores censando la misma área simultáneamente son idénticos.

Los galápagos son relativamente fáciles de observar mientras toman el sol

El procedimiento es sencillo. Consiste básicamente en prospectar una superficie conocida. En este caso, al tratarse el río de un hábitat lineal, hay que recorrer un tramo fijado de antemano, registrando y localizando cada una de las observaciones. En el caso de los galápagos es posible establecer dos o tres clases de tamaño reconocibles a simple vista. Una vez recorrido el tramo se puede expresar la abundancia como el número de individuos observado por superficie de la lámina de agua. Es conveniente repetir al menos una vez cada muestreo, en iguales condiciones ambientales, para poder disponer de estimas más precisas.

Técnica 42. Censos de aves acuáticas

Hay numerosas técnicas de conteo de aves acuáticas, que aquí resumimos en dos, una para anátidas (patos) y aves afines (somormujos, fochas, gallinetas), que a menudo forman grupos reproductores o invernantes (Resources Inventory Committee 1999), y otra para martines pescadores y mirlos acuáticos (Resources Inventory Committee 1998), como ejemplo de técnica para aves solitarias.

Técnica 42a. Censos de anátidas y aves afines desde estaciones de observación

Una buena red de estaciones de observación fijas permite obtener censos de gran precisión

En principio, lo único que se requiere es detectar e identificar las aves desde una posición fija. Los tramos son seleccionados, sistemática o aleatoriamente, en el conjunto del área a estudiar o en distintos estratos. Entre las ventajas de estas estaciones fijas cabe señalar que: 1) una muestra de estaciones bien espaciada proporciona datos más representativos que una serie de transectos sobre un hábitat bien definido, 2) un observador fijo tiene más tiempo para detectar e identificar especies menos conspicuas, y 3) se pueden tomar datos de hábitat al mismo tiempo y asociarlos más fácilmente con la presencia de aves individuales. Entre los inconvenientes: 1) si incluimos las aves que se desplazan su densidad estará sobrestimada, 2) las aves huidizas no podrán ser contabilizadas, 3) es necesario emplear más tiempo que en el caso de los transectos, y 4) la estructura de la vegetación condiciona la detectabilidad de las aves.

DISEÑO DEL MUESTREO

En cada área a prospectar situar estaciones de observación en uno o más puntos, de modo que quede cubierta toda la superficie considerada. A la hora de trabajar con estaciones de observación es necesario conocer el radio efectivo de detección desde la estación, de forma que los resultados obtenidos se puedan referir a una determinada superficie. La distancia de detección varía entre especies, por lo que dicho radio puede definirse como la distancia máxima a la cual es posible reconocer la especie a la que pertenecen todos los individuos que quedan dentro de la parcela delimitada por dicha distancia. La determinación del radio efectivo de detección para el material óptico utilizado es un trabajo previo a los censos, que ha de realizarse contrastando la capacidad de identificación a diferentes distancias conocidas. Además, las estaciones deben estar situadas a suficiente distancia unas de otras como para considerar los resultados de cada estación como independientes.

Una vez determinados el radio de detección y la distancia de separación entre estaciones, identificar sobre el terreno los límites del área de observación correspondiente a cada estación (mediante visita previa o con la ayuda de cartografía).

ESFUERZO DE MUESTREO

El esfuerzo de muestreo depende de la precisión requerida, por lo que es importante ir analizando los resultados a medida que se obtengan, para saber

si hay que volver a censar o no. Para contar jóvenes, hay que repetir el censo cada tres días hasta alcanzar la precisión requerida. El trabajo de varios observadores alternándose en las estaciones puede ayudar a evitar o mitigar algunos sesgos.

MATERIAL

- Prismáticos (preferentemente, 10 × 40).
- Telescopio terrestre (preferentemente, 20-60 × 80).
- Mapas (1:25 000, 1:10 000).
- Guías de identificación.

TRABAJO DE CAMPO

1. No se debe censar con lluvia, viento fuerte, niebla u otras condiciones que reduzcan la visibilidad.
2. En cada estación, observar las aves mediante binoculares y telescopio.
3. Contar los efectivos de cada especie que se encuentran dentro del radio de detección previamente determinado. Los que quedan fuera se registrarán únicamente a efectos de conocer su presencia en el área.
4. Para las parejas reproductoras anotar el número de parejas, machos solitarios y machos agrupados.
5. En el conteo de los jóvenes anotar el número de jóvenes y su clase de edad en las especies en las que esto sea posible.
6. Para las no reproductoras anotar el número total de aves de cada sexo y clase de edad.
7. Los conteos han de realizarse lentamente para poder observar las aves que bucean y salen a la superficie.
8. En cada visita se ha de contar al menos tres veces y quedarse con los valores más altos.
9. Por último, es conveniente anotar las características del área prospectada, incluyendo nivel del agua, extensión de la vegetación emergente y estado de los hábitats de alrededor.

Es importante muestrear sólo en días con buenas condiciones de visibilidad

TRATAMIENTO DE LOS DATOS

Los resultados permiten, en primer lugar, confeccionar el listado de especies presentes en el área prospectada. Además, se puede conocer la tendencia de la población en función del tiempo, calculando, por ejemplo, el número de parejas reproductoras de cada especie en un momento dado. Para ello puede tomarse cada conteo diario como una réplica y obtener valores medios para cada censo. Además, se puede comparar la densidad entre áreas.

Técnica 42b. Censo de martines pescadores y mirlos acuáticos

Las poblaciones de estas aves, de comportamiento territorial y estrechamente ligados al hábitat fluvial, pueden ser censadas mediante itinerarios que discurren siguiendo el cauce del río (Resources Inventory Committee 1998).

Martines pescadores y mirlos acuáticos tienen una estrecha ligazón con el medio acuático que facilita su localización

Estas especies son relativamente fáciles de detectar y en época de cría están en continuo movimiento, subiendo y bajando el río, por lo que los observadores necesitan anotar la dirección y el número de aves que pasan junto a ellos. A menudo pueden ser oídos antes que vistos, circunstancia que aumenta su detectabilidad.

Hay que tener en cuenta a la hora de hacer estimas de abundancia de mirlo acuático que, si bien la norma es la monogamia, la poligamia no es infrecuente.

Los martines pueden anidar alejados del cauce, por lo que si no están descansando o alimentándose en el río pueden pasar desapercibidos. La mejor época para detectarlos es el período en el que los adultos alimentan a los pollos y deben realizar para ello gran número de desplazamientos.

Esta técnica permite realizar censos precisos, siendo el mejor método para detectar a estas aves y estimar su abundancia relativa en pequeñas áreas.

DISEÑO DEL MUESTREO

En primer lugar es necesario seleccionar las áreas de estudio sobre cartografía de escala apropiada, utilizando la experiencia personal y/o datos existentes. La ruta de censo debe ser planificada de modo que se maximice la eficiencia de los desplazamientos y la cobertura de todo el hábitat. Las líneas de censo son transectos que siguen el curso del río y es conveniente que sean dibujados sobre los mapas que se utilizarán para orientarse.

ESFUERZO DE MUESTREO

Los censos se realizan una vez por estación reproductora. Sin embargo, si es posible repetirlos, pueden obtenerse mejores estimas del éxito reproductor. Se recomienda el trabajo conjunto de dos observadores, por razones de eficiencia y seguridad.

MATERIAL

- Prismáticos.
- Botas vadeadoras.
- Material de escritura resistente al agua.

TRABAJO DE CAMPO

1. Caminar siguiendo el río de modo que el cauce y ambas orillas sean visibles.
2. Anotar el número de aves observadas, así como el sentido de su desplazamiento (aguas arriba o abajo), de modo que no sean contabilizadas dos veces.
3. Marcar sobre el mapa la localización de las aves observadas y de los nidos encontrados.

TRATAMIENTO DE LOS DATOS

La abundancia puede ser estimada como el número de aves/parejas/jóvenes dividido por la longitud del tramo prospectado.

Se obtienen datos de número de aves por kilómetro

OTRAS CONSIDERACIONES

Existe una variante de esta técnica que puede ser utilizada en ríos que cuenten con una densidad media o alta de mirlos acuáticos. Básicamente, consiste en recorrer el cauce del río ahuyentando al ave hasta el momento en que se da la vuelta y cambia de sentido. A continuación se le sigue hasta que vuelva a girar y recupere el sentido de desplazamiento inicial. Se asume que los dos lugares en donde giró son los límites de su territorio.

Anotar esas dos posiciones y calcular la distancia entre esos dos puntos permite estimar la abundancia en el tramo prospectado, expresada como aves territoriales o parejas por kilómetro.

Técnica 43. Muestreo de mamíferos ligados al agua

Las técnicas disponibles para estudiar la riqueza y la abundancia de mamíferos se pueden agrupar en: 1) técnicas basadas en la observación directa, 2) técnicas basadas en rastros y señales características, y 3) técnicas basadas en la captura de los animales (Wilson et al. 1996).

La mayor parte de los mamíferos son difíciles de detectar, por lo que sus estudios se basan en la búsqueda de rastros o en el trapeo

Los rasgos generales del comportamiento de la mayor parte de las especies de mamíferos (nocturnas y elusivas) y la dificultad que conlleva trabajar en el medio fluvial hacen que podamos encontrar pocos ejemplos de censos mediante observación directa. Además, en las pocas ocasiones en que esto es posible, su ejecución es similar a la ya detallada en el caso de los galápagos (técnica 41c), por lo que no nos detendremos en esta técnica y sí en las más utilizadas: búsqueda de rastros y trapeo.

Figura 16.1:
Excremento de nutria



Técnica 43a. Búsqueda de rastros de nutria

Las nutrias marcan su territorio con excrementos muy visibles

La nutria paleártica es un carnívoro semiacuático, nocturno y elusivo, ligado estrechamente al hábitat fluvial. Es escasa y muy difícil de observar en la naturaleza. Sin embargo, sus deyecciones son muy características y, por tanto, fáciles de identificar (fig. 16.1). Además, el animal las utiliza como señales olfativas, depositándolas con preferencia en lugares sobresalientes (piedras aisladas en el agua, playas, troncos caídos, bases de puentes, etcétera). A efectos prácticos, se consideran como señales positivas de la presencia de la especie los excrementos y las huellas muy claras. Esta técnica se basa en la búsqueda de señales de nutria en tramos determinados de ribera (Ruiz-Olmo y Delibes 1998).

DISEÑO DEL MUESTREO

En primer lugar es necesario delimitar el área a cubrir (por ejemplo, una cuenca), en la que planificar el muestreo con la ayuda de cartografía a escala adecuada. A modo de ejemplo, en los sondeos realizados en España la referencia utilizada es el mapa 1:50 000 y la distribución del esfuerzo se realiza dividiendo el mapa en cuatro cuadrantes y muestreando dos puntos en cada uno ellos.

Hay que prospectar todo tipo de masas de agua

Todo tipo de masa de agua (ríos, embalses, lagos, costa) debe ser investigado, aun cuando parezca improbable la presencia de la nutria. Los puntos de muestreo deben estar separados por una distancia de, al menos, 5 km para poder considerarlos independientes.

La prospección de todos los puntos debe completarse en un tiempo razonable para poder considerar que la distribución obtenida representa la situación de la especie en un momento dado. Como referencia, los sondeos europeos a escala nacional tienen una duración de dos años. Un sondeo regional no debería exceder el año.

MATERIAL

- Botas vadeadoras.
- Material de escritura resistente al agua.

TRABAJO DE CAMPO

Una vez seleccionada la estación de muestreo, recorrer minuciosamente 200 m de margen (tan sólo una de las dos riberas en el caso de grandes ríos o embalses; ambas cuando se trata de ríos o arroyos fácilmente vadeables) anotando el número y la distribución de las señales de nutria vistas. Si se encuentra alguna, el muestreo se da por terminado al finalizar esos primeros 200 m. En caso contrario, la búsqueda se prolonga hasta los 600 m, interrumpiéndola al encontrar la primera señal o considerando el muestreo negativo si, en dicho tramo, no se encuentra animal alguno.

En cada uno de los puntos de muestreo visitados, anotar la localización del tramo, características del hábitat y número de señales.

El resultado es la distribución de la nutria en el área de estudio, aunque, si bien el hallazgo de los excrementos es prueba irrefutable de su presencia, el no encontrarlos no puede considerarse demostración de su no existencia. De hecho, la distribución y densidad de las señales se ven afectadas por el transcurso de las estaciones, sexo, estado reproductivo, nivel de población y características del hábitat. Estos factores deben tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados del sondeo, de los que no cabe extraer consecuencias muy rotundas en lo que se refiere a densidad de población y utilización del hábitat. No obstante, esta técnica es de indudable utilidad a la hora de realizar prospecciones a gran escala y permite, manteniendo los puntos de muestreo en sondeos sucesivos, evaluar las tendencias poblacionales.

Técnica 43b. Trampeo del desmán del Pirineo

En el caso de otras especies, a la baja abundancia y a los hábitos nocturnos y elusivos se une el hecho de que no dejan rastros identificables, lo cual hace que para conocer su distribución sea necesario el uso de técnicas que conllevan la captura de los animales. Un buen ejemplo es el desmán del Pirineo, un pequeño insectí-

Figura 16.2:

Desmán del Pirineo
(*Galemys pyrenaicus*)



voro semiacuático de apenas 70 gramos de peso, que habita en los ríos de la mitad norte de la península Ibérica (fig. 16.2).

PROCEDIMIENTO

El desmán es nocturno, se alimenta de macroinvertebrados bentónicos y busca activamente a sus presas recorriendo el lecho de los arroyos que habita. Esta técnica aprovecha este comportamiento para capturar a los animales.

DISEÑO DEL MUESTREO

El desmán es sumamente sensible a la alteración del hábitat, por lo que no merece la pena prospectar lugares que no cuenten con las características de su hábitat óptimo: cursos altos permanentes de ríos y arroyos, con aguas no embalsadas, caudal de estiaje superior a los 50 L/s, pendiente superior al 0,2% y una buena calidad del agua (toleran únicamente situaciones de contaminación orgánica baja de origen urbano, agrícola o ganadero).

Para capturar el desmán, se colocan dos trampas cada 500 m lineales de río, nunca en las épocas de cría

Los desmanes se distribuyen a lo largo del río ocupando tramos consecutivos de entre 500 y 1000 m, mostrando territorialidad entre individuos del mismo sexo y solapamiento intersexual. Por ello, una estación de muestreo debería contar con dos trampas cada 500 m en un tramo de entre 3 y 5 km de longitud (entre 12 y 20 trampas por estación). Esta es la unidad de esfuerzo a distribuir por el área a



Figura 16.3:
*Nasa para la captura
de desmanes*

prospectar. Como paso previo a los muestreos es preciso estudiar el terreno sobre cartografía a escala adecuada (1:25 000, 1:5000) y visitarlo seleccionando los lugares más adecuados para colocar las trampas (hay que tener en cuenta que la revisión de las trampas se realiza de noche y la accesibilidad es un factor importante a tener en cuenta).

Para el trampeo se utilizan nasas rígidas de malla metálica, sin cebar, que se disponen semisumergidas en el cauce (fig. 16.3) (González-Esteban et al. 2003). Mantener las trampas activas durante dos días consecutivos, únicamente durante la noche y visitarlas cada dos o tres horas. Trampear preferentemente con tiempo estable, evitando lluvias abundantes que puedan provocar oscilaciones bruscas del caudal. Del mismo modo, evitar trampear en las jornadas previas y posteriores a plenilunio, en las que los desmanes restringen notablemente sus desplazamientos.

El desmán es una especie amenazada cuya captura precisa autorización administrativa y técnicas que no causen daño a los animales. Los trampeos son efectivos durante todo el año, pero no deben realizarse en el período comprendido entre abril y junio, época en la que las hembras están criando (preñadas o lactantes).

MATERIAL

- Nasas.
- Material para la manipulación de los animales (guantes, cubo, bolsas de plástico).
- Botas vadeadoras.

- Material de escritura resistente al agua.
- Dinamómetro.
- Linterna frontal.

TRABAJO DE CAMPO

1. Reconocer el tramo elegido para valorar la accesibilidad y seleccionar los puntos donde colocar las trampas.
2. Colocar las trampas.
3. Revisar las trampas. La primera revisión se realiza tres horas después de anochecer, y las siguientes cada dos o tres horas hasta que amanezca. Es imprescindible mantener este ritmo de revisiones para garantizar que los animales no mueran de estrés.
4. Extraer los animales capturados de la nasa, depositarlos en un cubo y observar y anotar su sexo, peso y edad.
5. Liberar los animales en el mismo lugar de captura. Es conveniente que el proceso de manipulación no exceda de 5 minutos y la toma de datos se realice alternando períodos de observación y reposo del animal en el cubo para evitar su muerte por estrés.

El desmán se estresa muy fácilmente, por lo que hay que tener mucho cuidado en su manipulación

TRATAMIENTO DE LOS DATOS

El primer resultado obtenido es la distribución del desmán en el área estudiada. La capturabilidad de esta técnica es alta, por lo que la ausencia de capturas puede ser interpretada como ausencia de desmanes o, al menos, puede considerarse que el estado de conservación de la población en ese tramo es malo. Un muestreo negativo que cuente con varias estaciones y se repita en dos épocas distintas del año es garantía de que el desmán ha desaparecido del área prospectada.

La alta capturabilidad y la distribución espacial de los desmanes permite estimar la abundancia relativa de cada tramo muestreado, expresándola como número de individuos por km. A partir de los datos de cada estación y en función de la planificación del estudio se pueden realizar comparaciones entre distintas áreas o evaluar la tendencia de las poblaciones.

16.2. Bibliografía

- ALLAN J.D., y CASTILLO M.A. *Stream ecology: Structure and function of running waters*. Dordrecht: Springer, 2007.
- FIGUEROLA J., y GREEN A.J. «Dispersal of aquatic organisms by waterbirds: A review of past research and priorities for future studies». *Freshwater Biology* 47 (2002): 483-494.

- GONZÁLEZ-ESTEBAN J., VILLATE I., y CASTIÉN E. «A comparison of methodologies used in the detection of the Pyrenean desman *Galemys pyrenaicus* (e. Geoffroy, 1811)». *Mammal Biology* 68 (2003): 387-390.
- HEYER W.R., DONNELLY M.A., MCDIARMID R.W., HAYEK L.C., y FOSTER M.S., eds. *Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for amphibians*. Washington/Londres: Smithsonian Institution Press, 1994.
- JEFFRIES M., y MILLS D. *Freshwater ecology. Principles and applications*. Londres: Belhaven Press, 1990.
- JONES C.G., LAWTON J.H., y SHACHAK M. «Organisms as ecosystem engineers». *Oikos* 69 (1994): 373-386.
- KING R.A., GORNALL R.J., PRESTON C.D., y CROFT J.M. «Population differentiation of *Potamogeton pectinatus* in the Baltic sea with reference to waterfowl dispersal». *Molecular Ecology* 11 (2002): 1947-1956.
- KLAASSEN M., y NOLET B.A. «The role of herbivorous water birds in aquatic systems through interactions with aquatic macrophytes, with special reference to the Bewick's swan. Fenel pondweed system». *Hydrobiologia* 584 (2007): 205-213.
- MARGALEF R. *Limnología*. Barcelona: Omega, 1983.
- RESOURCES INVENTORY COMMITTEE. *Inventory methods for riverine birds. Standards for components of British Columbia's biodiversity no. 12*. Vancouver: Ministry of Environment, Lands and Parks, 1998: 58.
- RESOURCES INVENTORY COMMITTEE. *Inventory methods for waterfowl and allied species. Standards for components of British Columbia's biodiversity no. 18*. Vancouver: Ministry of Environment, Lands and Parks, 1999: 90.
- RESOURCES INVENTORY COMMITTEE. *Inventory methods for tailed frog and pacific giant salamander. Standards for components of British Columbia's biodiversity no. 39*. Vancouver: Ministry of Environment, Lands and Parks, 2000: 37.
- RUIZ-OLMO J., y DELIBES M. *La nutria en España ante el horizonte del año 2000*. Málaga: SECEM, 1998.
- TELLERÍA J.L. *Manual para el censo de los vertebrados terrestres*. Madrid: Ed. Raíces, 1986.
- TRIMBLE S., y MENDEL A. «The cow as a geomorphic agent: A critical review». *Geomorphology* 13 (1995): 233-253.
- WILSON D.E., COLE F.R., NICHOLS J.D., RUDRAN R., y FOSTER M.S., eds. *Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for mammals*. Washington: Smithsonian Institution Press, 1996.
- WRIGHT J.P., JONES C.G., y FLECKER A.S. «An ecosystem engineer, the beaver, increases species richness at the landscape scale». *Oecologia* 132 (2002): 96-101.

La vegetación terrestre asociada al río: el bosque de ribera

ARTURO ELOSEGI Y JOSERRA DÍEZ

17.1. Introducción

Con la excepción de las zonas alpinas o subpolares, situadas por encima de la línea del bosque, la mayor parte de los ríos del mundo relativamente bien conservados tienen sus márgenes cubiertas por bosque u otra vegetación de ribera. Incluso en zonas generalmente desprovistas de árboles, como sabanas o desiertos, los pocos árboles que existen crecen en las riberas de los ríos, donde encuentran condiciones adecuadas, asociadas a un más alto nivel freático que en los terrenos adyacentes (fig. 17.1). En otras áreas, la vegetación es herbácea, pero en todo caso con características fenológicas y composición distintas de la correspondiente vegetación puramente terrestre.

En sentido estricto, se llama vegetación de ribera a las zonas cubiertas por ésta en las márgenes de los ríos, donde las características del suelo, sobre todo el nivel freático, están influidas por la dinámica fluvial. Se trata, por tanto, de una vegetación *azonal* que corresponde al ecotono entre el ecosistema terrestre y acuático. A menudo hay un contraste marcado entre las especies de ribera y las que crecen en suelos zonales no relacionados hidrológicamente con los ríos: los árboles de ribera típicamente están adaptados a suelos fértiles y son capaces de resistir la inundación, mientras que otras muchas especies no pueden sobrevivir en estas condiciones. Por ejemplo, la vegetación dominante en zonas de clima mediterráneo suelen ser árboles de poco porte, hoja perenne y crecimiento lento, aunque

Los bosques de ribera tienen características diferentes de los bosques circundantes

Figura 17.1:

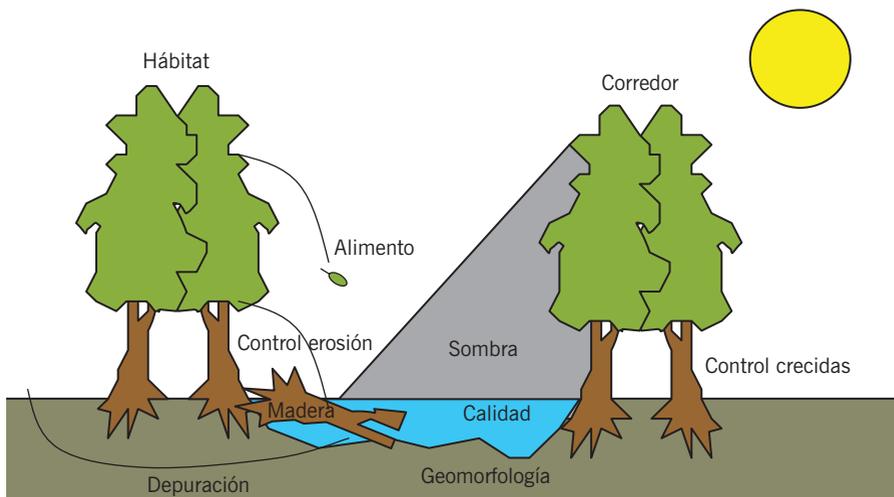
Un río flanqueado por vegetación de ribera en un paisaje semidesértico (Nuevo México, Estados Unidos). Aunque el río se seca, la vegetación sobrevive gracias al agua freática



los ríos de esas mismas zonas pueden estar flanqueados por grandes árboles de hoja caduca, a menudo de las mismas especies que crecen en climas más benignos.

El bosque de ribera tiene gran importancia en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas fluviales

En un sentido más laxo, sin embargo, se puede llamar bosque de ribera a cualquier formación boscosa que crezca en las márgenes de los ríos o sus llanuras de inundación, aunque en zonas de fuerte pendiente, el efecto del río sobre el bosque desaparece al alejarnos unos pocos metros del cauce. Como estos bosques tienen, en cualquier caso, un efecto directo sobre la ecología fluvial, en este capítulo los consideraremos también bosques de ribera. Los bosques de ribera, además de ser un componente integral de los ríos, tienen gran importancia ecológica (fig. 17.2) y prestan numerosos servicios ecosistémicos. Por un lado, el bosque proporciona sombra, ayudando a regular la temperatura del agua y a mantenerla bien oxigenada. Además, gran parte de las entradas de materia orgánica particulada al cauce (hojas, frutos, flores, ramas; véase capítulo 10), que se cuentan entre los recursos alimentarios más importantes para los organismos lóticos (véase capítulo 14), provienen directamente del bosque de ribera. Los bosques de ribera también tienen gran incidencia sobre la forma del cauce, ya que limitan la erosión de sus márgenes, y la caída de troncos aumenta la complejidad estructural del cauce y favorece tanto la retención de partículas como la creación de nuevos hábitats (Harmon et al. 1986, Gregory et al. 2003; véase capítulo 10). Como ejemplo de este efecto, al desaparecer el bosque de ribera, los ríos se encajan y se convierten en más estrechos, con lo que disminuye la superficie utilizable por los organismos fluviales, la conexión del cauce con la llanura de inundación, así como los servicios que prestan los ríos (Sweeney et al. 2004). Además, el bosque de ribera cumple un importante efecto de filtro verde, reteniendo partículas y nutrientes que llegan por escorrentía o por vía subsuperficial, por lo que tiene un efecto directo sobre la calidad

**Figura 17.2:**

Algunas de las funciones ecológicas más relevantes del bosque de ribera

de las aguas. En las llanuras de inundación, además, puede aumentar la cantidad de agua retenida durante las crecidas y disminuir su velocidad, suavizando, aguas abajo, los efectos de las inundaciones sobre infraestructuras o construcciones en el territorio fluvial.

Algunos de los bosques de ribera (como la *varzea* amazónica) se encuentran entre los ecosistemas más diversos del mundo (Naiman y Décamps 1990). Otros ofrecen hábitats para numerosas especies que no están estrictamente ligadas a los ríos. Además, los bosques de ribera conectan zonas espacialmente muy alejadas, por lo que podrían constituir importantes corredores ecológicos para numerosos organismos forestales (Saunders y Hobbs 1991).

Todas estas cuestiones justifican la relevancia en definir aquellas características del bosque de ribera que más directamente pueden influir sobre la estructura y el funcionamiento fluvial. Salir del cauce para adentrarse en el medio terrestre circundante exige cambiar de escala y de métodos de trabajo; por ello, definiremos una serie de criterios generales que puedan ser de utilidad en la evaluación del estado de conservación y funcionalidad de las zonas de ribera.

Técnica 44. Criterios para evaluar la calidad ecológica del bosque de ribera

Las funciones y servicios antes descritos no están garantizadas por el mero hecho de que las riberas estén cubiertas de bosque, sino que dependen de determinadas características que son sensibles a las actividades humanas. Por ello, conviene

definir los atributos clave del bosque de ribera, y cómo pueden afectar distintas actividades humanas a dichos atributos. Las características del bosque de ribera (composición, estructura, funcionamiento) cambian en función del tipo de río y de la ecorregión que se considere. Por ejemplo, el bosque de ribera en ríos con fuertes migraciones laterales se mantiene en fases poco maduras, y ello limita la variedad de sus hábitats; en zonas desérticas, los árboles de ribera tienen portes modestos, por lo que no producen tanta sombra como los de otras zonas; los bosques de ribera boreales son mucho menos diversos que los tropicales, y existen grandes diferencias geográficas en su diversidad específica. A pesar de esta diversidad de circunstancias, es posible definir cuáles son los atributos más significativos, y cuál es la relación precisa entre dichos atributos y la ecología de los ríos. El lector interesado puede encontrar información adicional o aplicación de índices concretos en la literatura (García de Jalón et al. 2006, Munné et al. 1998, Wards y Atwill 1983).

MATERIAL

La lista propuesta debiera ser adaptada para los objetivos concretos y el tipo de bosque a estudiar. Se indican, a título orientativo, los elementos de uso más común:

- Sistema de Información Geográfica.
- Receptor GPS.
- Ortofotografías y fotografías aéreas, actuales y antiguas.
- Mapas cartográficos.
- Regla telescópica.
- Cinta métrica.
- Calibre forestal.
- Tabla de composición de sedimento.
- Cámara con objetivo de gran angular u ojo de pez.
- Brújula.
- Clinómetro.
- Pintura en *spray*.

ATRIBUTOS MÁS SIGNIFICATIVOS Y RELACIÓN CON LA ECOLOGÍA FLUVIAL

Para cada atributo que se valora, hay que establecer un nivel óptimo

Es importante establecer el óptimo de cada uno de los atributos del bosque de ribera (cuadro 17.1), en relación con sus funciones, o bien respecto al estado natural del río. La acción modificadora humana explica que en algunas áreas apenas queden zonas naturales que puedan servir como referencia. Sin embargo, se puede tener una idea aproximada de cómo serían estos ecosistemas si se tiene en cuenta los factores que actúan sobre ellos. Por ejemplo, los bosques de ribera se

	Extensión (anchura continuidad longitudinal)	Estructura del suelo. Conectividad cauce-orillas	Estructura y composición. Madurez	Conexiones laterales
Estabilización de los márgenes	■	■	■	
Retención de sedimentos	■	■	■	
Protección y regulación frente a avenidas	■	■	■	■
Filtro de nutrientes, pesticidas...	■	■	■	
Sombra	■		■	
Fuente de materia orgánica	■		■	
Hábitat y corredor ecológico	■		■	■

Cuadro 17.1:

Relación entre las funciones de la vegetación de ribera y los principales atributos que influyen en esas funciones ecológicas

ven sometidos a frecuentes inundaciones, por lo que es esperable encontrar claros creados por las crecidas, y otras zonas donde se acumula gran cantidad de árboles muertos. En estas circunstancias, un bosque espacialmente continuo sería menos natural que otro espacialmente más heterogéneo. Como estos atributos tienen sentido a escalas muy diferentes, aquí se propone un estudio a tres escalas; extensión y continuidad del bosque a escala de paisaje, conectividad lateral a escala de tramo, y estructura del bosque a escala de parcela.

EXTENSIÓN, ANCHURA Y CONTINUIDAD LONGITUDINAL DE LA VEGETACIÓN DE RIBERA

La extensión, anchura y continuidad longitudinal de la vegetación de ribera son algunos de los atributos más importantes de los bosques riparios. Estas características se deben determinar a escala de paisaje (varios kilómetros), y su funcionalidad está directamente relacionada con la entidad de la ripisilva. La vegetación arbórea, junto con un sotobosque denso conformado por herbáceas, matorrales y arbustos, contribuye con su sistema radicular a estabilizar los márgenes, dado que cohesionan las partículas del suelo a mayor profundidad y disminuyen la erosión producida por la corriente del agua, las partículas en suspensión y la carga de fondo. De igual modo, una vegetación densa, ancha y bien estructurada es más eficiente amortiguando el flujo y atrapando nutrientes y tóxicos (Peterjohn y Correll 1984, Brunet et al. 1994).

La extensión y continuidad del bosque de ribera debe determinarse a escala de kilómetros

La continuidad longitudinal hace posible que la vegetación de ribera funcione como hábitat y como corredor que conecta diversos ecosistemas. Su estructura y anchura definen, por tanto, su calidad y capacidad de acogida (Saunders y Hobbs 1991). Así, franjas de vegetación riparia muy estrechas y alargadas pueden incrementar el efecto de borde del ecotono y limitar el hábitat y la dispersión de las es-

pecies (Naiman y Décamps 1990). La capacidad de aportar sombra se relaciona directamente con la continuidad y con el porte de la vegetación de ribera. La sombra es de vital importancia, especialmente en los cauces de cabecera, dada la escasa profundidad de la lámina de agua. Por tanto, unos pocos metros de vegetación con porte elevado pueden afectar de manera significativa a la temperatura del agua (Johnson y Jones 2000). A su vez, la evapotranspiración de la vegetación de ribera (árboles, arbustos y plantas) contribuye a disminuir la temperatura y, junto a la lámina de agua, crear un ambiente con un microclima diferenciado (Nagler et al. 2005).

Conviene comparar fotos aéreas actuales con otras más antiguas

Para determinar la extensión, anchura y continuidad de la vegetación de ribera lo más adecuado es trabajar con un Sistema de Información Geográfica (SIG) sobre ortofotografías y fotografías aéreas, aunque en caso de no disponer de éstas, se puede cartografiar fácilmente mediante trabajo de campo y con ayuda de un GPS. De esta manera es posible determinar el territorio fluvial y la extensión actual longitudinal y transversal del bosque ripario. En caso de disponer de fotos aéreas antiguas, o de cartografía antigua de detalle, la diferencia entre ésta y la actual informa de cómo se han transformado las márgenes, lo que permite extraer indicaciones útiles para la ecología fluvial y para la gestión de los ríos, como, por ejemplo, un manejo acertado del riesgo de inundabilidad. Por su parte, la sombra (o en su lugar, la irradiación que alcanza el cauce o las márgenes) puede ser estimada mediante la obtención de fotografías del dosel arbóreo (técnica 14).

La escala ideal de trabajo puede variar en función de las características de la zona de estudio pero, en general, no debería ser inferior a 1:5000. La longitud de tramo a estudiar es asimismo variable, pero si el estudio se centra en la conectividad para grandes animales, al menos habría que estudiar la conectividad en tramos fluviales de varios kilómetros. El procedimiento a seguir podría ser el siguiente:

1. Sobre las ortofotografías, o mediante trabajo de campo, delimitar las manchas de bosque de ribera (fig. 17.3). Si es posible, distinguir el bosque natural de las plantaciones forestales.
2. Calcular el porcentaje de las orillas cubierto de bosque.
3. Calcular la anchura media de la vegetación de ribera.
4. Medir la longitud (máxima, media y mínima) de las manchas de bosque de ribera.
5. Determinar la distancia (máxima, media y mínima) entre manchas de bosque de ribera.

Todas estas medidas pueden hacerse bien mediante un SIG, o como se describe en la técnica 1. Para ríos medianos a grandes conviene realizar estas mediciones para cada orilla por separado.

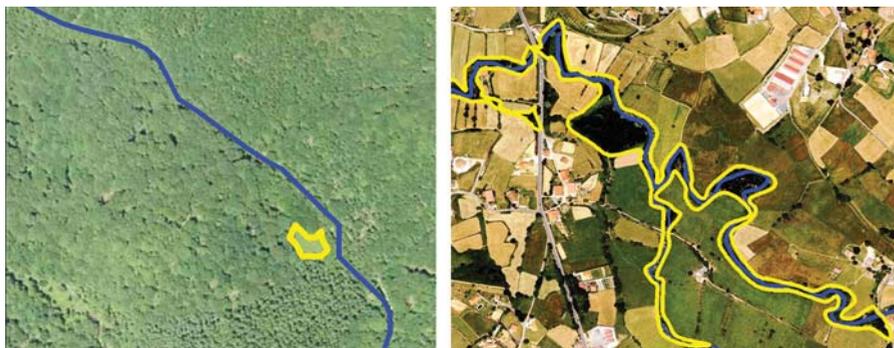


Figura 17.3:
Ortofotografías de dos arroyos con bosques de ribera de características contrastadas

Nota: En el arroyo de la *izquierda* (Elama, Navarra, España), las riberas están cubiertas de bosque continuo, que también tiene continuidad con los bosques de los alrededores. Sólo se ha marcado un pequeño claro. En el de la *derecha* (Butroe, Bizkaia, España), una gran parte de los márgenes disponen de una estrecha hilera de bosque de ribera, raramente conectado con los bosques adyacentes, dado que éstos han sido sustituidos por cultivos, infraestructuras y edificaciones. En este caso, los polígonos amarillos marcan las áreas del bosque de ribera en conexión con bosques o plantaciones arbóreas adyacentes al río.

CONECTIVIDAD ENTRE EL CAUCE Y LAS ORILLAS

La conectividad entre las zonas de ribera y el cauce influye en muchas de las funciones antes definidas (cuadro 17.1). La conectividad es superficial pero también subsuperficial. Los flujos subsuperficiales tienen gran importancia en la dinámica de nutrientes y en su papel como filtro de materiales sólidos y disueltos (véase capítulo 6). La textura del suelo condiciona la capacidad de la vegetación riparia para ralentizar el flujo del agua durante las avenidas y secuestrar sedimentos, nutrientes y/o pesticidas. Sin embargo, la conectividad está limitada por numerosas actividades humanas (motas o diques laterales, carreteras, urbanización de la zona de ribera, etc.) que causan el incremento de la velocidad del agua, y el posterior arrastre de sedimentos y encajamiento del cauce. En casos extremos, la llanura de inundación deja de ser inundable excepto en crecidas extraordinarias, descendiendo el nivel freático, y cambiando en consecuencia el tipo de bosque.

La determinación precisa de la conectividad entre el cauce y las orillas es bastante complicada, especialmente en el caso de los flujos subsuperficiales, pero se puede obtener una idea aproximada sobre la base de inspecciones oculares. La escala óptima de trabajo es la de tramo, de alrededor de 1 km. El procedimiento sería el siguiente:

1. Recorrer los márgenes del río con un mapa u ortofoto detallado y, a ser posible, con un GPS, anotando y tomando referencias espaciales de los siguientes puntos (fig. 17.4):
 - a) Tramos en los que el río está excesivamente encajado, sin contacto con la llanura de inundación. Éstos se identifican porque la antigua llanura de inun-

Numerosas actividades humanas disminuyen la conectividad lateral

Figura 17.4:
Ejemplos de algunas
afecciones a la conectividad
lateral



Nota: a: Arroyo agrícola, que por la degradación del cauce se halla desconectado de la llanura de inundación. Obsérvese cómo colapsan las márgenes. b: Arroyo rectificado y con pequeños diques laterales a ambos lados. c: Orilla protegida por escolleras, que impiden la migración del cauce. d: Ambas orillas protegidas por escolleras, y caminos de cemento sobre la llanura de inundación. e: Cauce constreñido por un gran dique, y obras de refuerzo de las márgenes. f: Caso extremo de arroyo con las orillas y el lecho de cemento.

dación forma una terraza abandonada, quedando la línea de desechos dejados por la última riada por debajo de la misma. También se puede apreciar porque la vegetación no tiene características propias de zonas de ribera.

- b) Tramos en los que las márgenes están protegidas por diques laterales, que reducen la inundabilidad y, por lo general, encorsetan al río.
 - c) Tramos con defensas en las márgenes: escolleras, revestimientos de cemento, etc. Anotar el tipo de defensa, su longitud y su altura.
 - d) Tramos con caminos o carreteras en la llanura de inundación. Medir la anchura del camino y la distancia a la orilla.
 - e) Tramos en los que se aprecia compactación del suelo (por ejemplo, por vertido de áridos). Medir la anchura de las afecciones.
2. Determinar el porcentaje de cauces fluviales afectado por cada tipo de alteración.

Esta inspección ocular es más efectiva después de unas riadas ordinarias, pues es entonces cuando mejor se ve el alcance real del río en aguas altas.

COMPOSICIÓN, ESTRUCTURA Y MADUREZ DE LA VEGETACIÓN RIPARIA

La composición específica y la presencia de especies exóticas indica el grado de *naturalidad* del bosque. Así, un bosque en el que las especies dominantes sean exóticas, tiene un menor nivel de naturalidad que otro autóctono. Este carácter tiene gran incidencia en el funcionamiento ecológico fluvial, ya que implica cambios en la cantidad y calidad de la hojarasca que entra en el río, el efec-

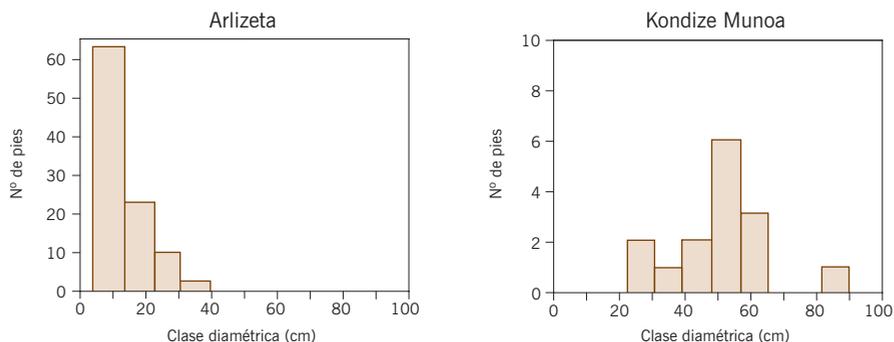


Figura 17.5:
Distribución de clases diamétricas de dos bosques en Azpeitia (España)

Nota: En el de la *izquierda* se aprecia una mayor dominancia de árboles jóvenes. En el de la *derecha* hay un mayor rango de diámetros y algunos árboles muy maduros.

to sobre la dinámica subsuperficial de nutrientes, etc. El grado de naturalidad es, pues, un criterio general de la estructura del bosque ripario, en el que la composición ideal sería la esperable en ese río en ausencia de actividades humanas.

Asimismo, la *madurez* del bosque y su dinámica son aspectos que contribuyen a determinar la relevancia ecológica del bosque. Es especialmente importante determinar si todos los árboles son coetáneos, o si, en cambio, la estructura de edades es más compleja. Para determinar la edad de los árboles se atiende a la estructura de tamaños, especialmente de clases diamétricas (fig. 17.5). A medida que el bosque de ribera madura, aumenta el aporte de materia orgánica (hojarasca, restos de madera, etc.) y paralelamente incrementa su influencia sobre el cauce y la biota. Los grandes troncos que caen al río son más importantes que los más pequeños, ya que por su gran estabilidad, aquellos estructuran físicamente el cauce y aumentan su retentividad. Por ello, la madurez es un aspecto clave del bosque como modelador del hábitat fluvial (Gregory et al. 2003).

La naturalidad y madurez del bosque de ribera determinan su relevancia ecológica

Tanto la composición como la madurez de la vegetación riparia se deben estudiar a una escala de decenas de metros. Para ello se seleccionan parcelas de muestreo. En estudios generales de bosques, estas parcelas suelen ser cuadrados de 1 hectárea (100×100 m), pero para bosques de ribera a menudo es más adecuado optar por parcelas más estrechas y alargadas, ya que estos bosques suelen estar muy fragmentados. Cualquiera que sea la forma y tamaño de la parcela, conviene seguir estos pasos:

1. Marcar con cuerdas los límites de la parcela.
2. Determinar el número de estratos de vegetación que se observan (fig. 17.6).

Figura 17.6:

Dos bosques de ribera con una estructura muy diferente. A la izquierda, selva amazónica en el río Beni (Bolivia). A la derecha, plantación de chopos en el río Ebro (España)



Nota: Obsérvese que en la foto de la *izquierda* el bosque está compuesto por árboles de tamaño muy diverso, que al menos forman cuatro estratos (dosel, árboles medianos, arbustos y vegetación herbácea), mientras que en el de la *derecha* todos son árboles coetáneos.

3. Medir la altura de los árboles dominantes. Para ello, hay que situarse a unos cuantos metros de distancia de un árbol, medir la distancia, y con el clinómetro medir el ángulo que forma la copa respecto de la horizontal. Mediante trigonometría se calcula la altura del árbol.
4. Con el calibre forestal, medir el diámetro a la altura del pecho (establecido a 1,3 m del suelo) de todos los árboles de diámetro mayor de 10 cm. Marcar cada árbol con la pintura en *spray* (o cualquier otra marca) conforme se mide, para evitar repeticiones. Es importante poner las marcas siempre de forma sistemática (a la misma altura, orientándola siempre hacia el lado opuesto al río, etc.). En zonas donde los árboles son muy grandes se mide su circunferencia, no su diámetro. Si hay árboles con contrafuertes (típicos en selvas tropicales), se puede estimar visualmente el diámetro a mayor altura. Identificar la especie de árbol.
5. Calcular el área basimétrica como indicador de la densidad de arbolado. Para ello, se calcula la superficie del círculo que forma cada tronco a 1,3 m del suelo, se suma la superficie de todos los troncos, y se divide por la superficie total de la parcela (unidades, m²/ha).
6. Medir la abundancia de plántulas de árboles. Para ello, seleccionar al azar tres parcelas de 100 m², y en cada una de ellas identificar la especie de todas las plántulas y medir su diámetro en la base y a 50 cm de altura.
7. Medir la cantidad de madera muerta, distinguiendo los árboles muertos en pie de aquellos que forman parte de la madera caída. Para los árboles muertos en pie, se mide su diámetro a la altura del pecho, y se estima su altura. Para los árboles caídos se miden los diámetros de los dos extremos y la longitud de todos los troncos mayores de 10 cm de diámetro y de 1 m de longitud. Calcular el volumen suponiendo que los troncos tienen forma de troncocono.
8. Visualmente, estimar la frecuencia de árboles con oquedades.
9. En algunos tipos de bosque, puede ser interesante medir la abundancia de formas especiales de plantas: epífitos, lianas, etc.

OTRAS CONSIDERACIONES

La vegetación de ribera suele tener una fenología muy marcada, por lo que conviene estudiarla en la época más favorable. En zonas de vegetación caducifolia lo más adecuado es el final de la primavera, aunque si interesa la vegetación herbácea puede haber épocas más interesantes.

17.2. Bibliografía

- BRUNET R.C., PINAY G., GAZELLE F, y ROQUES L. «Role of the floodplain and riparian zone in suspended matter and nitrogen retention in the Adour river, South-West France». *Regulated Rivers: Research and Management* 9 (1994): 55-63.
- GARCÍA DE JALÓN D., GONZÁLEZ DEL TÁNAGO M., LARA F., y GARILLETI R. «Índice RQI para la valoración de las riberas fluviales en el contexto de la Directiva Marco del Agua». *Ingeniería Civil* 143 (2006): 97-108.
- GREGORY S., BOYER K., y GURNELL A., eds. *The ecology and management of wood in world rivers*. Bethesda: American Fisheries Society, 2003.
- HARMON M.E., FRANKLIN J.F., SWANSON F.J., SOLLINS P., GREGORY S.V., LATTIN J.D., CUMMINS K.W., ANDERSON N.H., CLINE S.P., AUMEN N.G., SEDELL J.R., LIENKAEMPER G.W., y CROMACK K. JR. «Ecology of coarse woody debris in temperate ecosystems». *Advances in Ecological Research* 15 (1986): 133-302.
- JOHNSON S.L., y JONES J.A. «Stream temperature responses to forest harvest and debris flows in Western Cascades, Oregon». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57 (2000): 30-39.
- MUNNÉ A., SOLÀ C., y PRAT N. «Un índice rápido para la evaluación de la calidad de los ecosistemas de ribera». *Tecnología del Agua* 175 (1998): 20-37.
- NAGLER P.L., CLEVERLY J., GLENN E., LAMPKIN D., HUETE A., y ZHENGMIN G W. «Predicting riparian evapotranspiration from MODIS vegetation indices and meteorological data». *Remote sensing and Environment* 94 (2005): 17-30.
- NAIMAN R.J., y DÉCAMP S. H. (eds.). *The ecology and management of aquatic-terrestrial ecotones*. Man and Biosphere Series, 4, Parthenon, UNESCO, 1990.
- PETERJOHN W.T., y CORRELL D.L. «Nutrient dynamics in an agricultural watershed: Observations on the role of a riparian forest». *Ecology* 65 (1984): 1466-1475.
- SAUNDERS D., y HOBBS R. «Nature conservation 2: The role of corridors». Chipping Norton, Australia: Surrey Beatty, 1991.
- SWEENEY B., BOTT T., JACKSON J., KAPLAN L., NEWBOLD J., STANDLEY L., HESSION W., y HORWITZ R. «Riparian deforestation, stream narrowing, and loss of ecosystem services». *Proceedings of the North American Academy of Sciences* 101 (2004): 14132-14137.
- WARDS T.A., y ATWILL E.R. *Visual assessment of riparian health*: University of California. Division de Agriculture and Natural Resources: 23, 2003.

Flujo de energía en el ecosistema fluvial. Producción primaria y producción secundaria

ISABEL MUÑOZ, ALBERTO RODRIGUES-CAPÍTULO, ANTONIO CAMACHO,
JOSÉ MANUEL GONZÁLEZ, ANNA M. ROMANÍ Y SERGI SABATER

18.1. Introducción

Una aproximación energética de los procesos en un ecosistema consiste en estudiar el flujo de energía desde los compartimentos fotosintetizadores autótrofos hasta su disipación última a través de la respiración heterótrofica. Los productores primarios generan materia orgánica a partir de compuestos inorgánicos gracias a la energía del Sol. En los ríos abundan los biofilms, o comunidades de microorganismos adheridos a los sustratos sólidos (piedras, macrófitos, restos de hojas o madera), y que están constituidas tanto por autótrofos (algas y cianobacterias) como heterótrofos, embebidos en una matriz de polisacáridos producida por los propios organismos (Lock 1983). En estos biofilms, la parte autótrofica, comúnmente fotosintética, fija el carbono, que es aprovechado tanto por los heterótrofos del biofilm como por los animales de mayor tamaño que se alimentan de éste. Para estudiar la dinámica del carbono en los sistemas fluviales es esencial determinar las tasas de incorporación autótrofica de carbono por parte de estos biofilms.

La incorporación de isótopos radiactivos (especialmente ^{14}C) se ha utilizado ampliamente para medir la producción del fitoplancton en sistemas marinos y lenfíticos. Sin embargo, su uso ha sido menos frecuente en comunidades bentónicas fluviales. Esta técnica se debe utilizar en sistemas cerrados y con las debidas precauciones.

Las técnicas con isótopos radiactivos o estables permiten analizar con detalle el flujo de energía en el ecosistema

El uso, en ecología, de los isótopos estables (no radiactivos) del carbono (^{13}C) y nitrógeno (^{15}N) se ha incrementado considerablemente en los últimos años (Fry 2006), y pueden ser especialmente útiles para seguir las transferencias desde los compuestos inorgánicos hacia las plantas y el material detrítico, y más tarde hasta los herbívoros y consumidores secundarios (véase también capítulo 19). El enriquecimiento de las muestras con estos isótopos estables permite determinar las tasas de incorporación por parte de los organismos que se incuban con ellos. Es una técnica que también se desarrolla en sistemas cerrados para controlar el balance entre el enriquecimiento y la fijación.

Completar el balance del carbono con la producción secundaria de los invertebrados permite conocer los niveles y limitaciones de la producción en el sistema fluvial y es un valor añadido en la ecología fluvial. El cálculo de la producción secundaria incluye densidad, biomasa, crecimiento, reproducción, supervivencia, y tiempo de desarrollo. Estos valores se pueden relacionar con aspectos bioenergéticos, con factores físicos o biológicos que controlan la producción (Huryn y Wallace 2000) o con aspectos más aplicados como los cambios en el uso del suelo o manipulaciones en el ecosistema (Sallenave y Day 1991, Peterson et al. 1993).

Este capítulo muestra alguna de las técnicas más recomendables para el estudio del flujo de la materia y la energía en los ecosistemas fluviales. Las tres primeras técnicas analizan la incorporación de compuestos inorgánicos (C y N) por los productores primarios a partir de la adición de isótopos radiactivos (técnica 45a) o isótopos estables (técnicas 45b y 46). También se detallan dos métodos para el cálculo de la producción secundaria en invertebrados: el del crecimiento instantáneo, que calcula un crecimiento diario (técnica 47a) y el de la frecuencia de tamaños (técnica 47b), que asume que la distribución de las frecuencias medias de tamaño se aproxima a una curva de mortalidad para una cohorte promedio.

Técnica 45. Determinación de las tasas de fijación autotrófica de carbono en biofilms

Técnica 45a. Técnica de incorporación de carbono con ^{14}C

Este es un método especialmente adecuado para sistemas oligotróficos, en los que la producción primaria es baja. En este aspecto, la técnica de incorporación de carbonato ácido (bicarbonato) marcado es más sensible que la técnica del oxígeno (véase capítulo 20). Sin embargo, tiene aspectos que deben considerarse. Uno de ellos, nada menor, es que se basa en la utilización de isótopos radiactivos y, por tanto, genera residuos que requieren tratamiento especial. Al tratarse de una técnica muy contaminante deben tenerse las instalaciones adecuadas y el personal debe es-

tar debidamente formado (ambos aspectos sujetos a reglamentaciones específicas). Además, los residuos deben ser tratados de manera adecuada a su persistencia. El segundo aspecto es que esta medida proporciona una estima intermedia entre la producción neta y la producción bruta, y ello depende en gran medida del tiempo de incubación que se use. En tiempos de incubación largos pueden ser relevantes las pérdidas de ^{14}C incorporado por respiración, por excreción o por exudación de materia orgánica. La técnica que mostramos a continuación está adaptada para estimar la producción primaria tanto en sustratos naturales como artificiales.

La estima de la incorporación del $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ en biofilms se puede realizar sobre sustratos naturales (piedras, sedimentos, arenas) o artificiales (cristales, cerámicos u otros similares). Si los sustratos son pequeños se incuban en viales de centelleo, si son mayores, en cristalizadores. Es importante mantener los sustratos en corriente y la temperatura controlada. En las incubaciones de viales esto se consigue mediante un tanque de incubación con agitación; en las incubaciones en cristalizador recirculando el agua con bombas de acuario. Como mínimo deben utilizarse siete réplicas: cuatro para determinar la incorporación de ^{14}C a la luz, dos para la incorporación en oscuridad, y uno para medir el *quenching*, o incorporación no biótica de radiactividad.

MATERIAL

Todo el material que se use para la manipulación y estima de la incorporación de carbonato ácido radiactivo debe ser adecuadamente marcado, y no debe intercambiarse para otros usos distintos a éste. Se desaconseja manipular los materiales radiactivos en el campo. El ^{14}C es un isótopo de baja intensidad pero de alta persistencia, por lo que su presencia contaminante puede invalidar posibles medidas futuras en el ecosistema. Las incubaciones se pueden llevar a cabo en viales de centelleo en el caso de sustratos pequeños, o en cristalizadores si se usan sustratos mayores.

Material común:

- Nevera portátil.
- Botes de plástico para recoger agua del río para análisis químico (alcalinidad, nutrientes).
- Luz halógena o fluorescente (véase texto).
- Papel de aluminio.
- Solución de formaldehído al 40%.
- Pinzas de metal para extraer los sustratos de su incubador.
- Solución *stock* de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (unos $10\ \mu\text{Ci}$ por incubación).
- Baño de ultrasonidos.
- Pipetas automáticas (únicas para estas medidas).

La técnica del ^{14}C da buenos resultados incluso en ríos con muy baja productividad, pero sólo puede ser utilizada por personal cualificado y tiene riesgos ambientales importantes

Todo el material que entre en contacto con el ^{14}C debe estar marcado y usarse solamente para estas medidas

- Material de seguridad: guantes de látex o polivinilo desechables, bata de laboratorio (específica), gafas de laboratorio.
- Medidor de luz fotosintéticamente activa en el campo y en el laboratorio.
- Agua destilada.
- Campana de gases (específica para técnicas que usen radiactividad).
- HCl 1 N.
- Líquido de centelleo (cóctel Biogreen) con dispensador.
- Medidor de centelleo.
- Recipiente de vidrio para almacenar residuos líquidos radiactivos. Este recipiente debe estar claramente marcado y dispuesto en lugar específico, separado del resto de los materiales en el laboratorio.

Material si se van a realizar las incubaciones en cristalizador:

- Contenedores de plástico opacos con tapa, de 1 L de capacidad para transportar los sustratos al laboratorio.
- Cristalizadores (1-2 L capacidad), uno para cada sustrato.
- Bombas de acuario sumergibles, que permitan la recirculación en el cristalizador, una para cada sustrato.
- Contenedores de plástico (uno por sustrato) de 250 mL capacidad.

Material si se van a realizar las incubaciones en viales:

- Tanque de incubación con agitación (para asegurar la temperatura del agua y la homogeneización constante durante la incubación).
- Viales de centelleo de 20 mL (de cristal y con topes de aluminio).

PROCEDIMIENTO

Como se ha descrito, se deben utilizar siete réplicas en la estima. Cuatro se destinan a determinar la incorporación de ^{14}C a la luz (C_{luz}), dos para la incorporación en oscuridad (C_{osc}), y uno para medir el *quenching*, o incorporación no biótica de radioactividad (C_{cont}). Cada una de las réplicas consiste en un sustrato colocado en un vial (muestra de pequeño tamaño) o bien cristalizador (muestra de gran tamaño), que está lleno con agua del río filtrada por 0,2 μm de poro. Las muestras se guardan en la nevera.

Se añade ^{14}C a cada una de las muestras y se incuba de una a dos horas a la luz, en oscuridad, y en condiciones de control

La incorporación de carbono en la oscuridad (C_{osc}) se efectúa con muestras cubiertas con papel de aluminio. Para la determinación del *quenching* (C_{cont}), hay que añadir unas gotas de formaldehído al 40% a la muestra y esperar unos 30 minutos a fin de asegurar la mortandad de todos los organismos presentes en la muestra.

Para la medida de C_{luz} , unos 15 minutos antes de empezar la incubación, sacar los viales de la nevera y ponerlos bajo la luz a la que se desarrollará la incubación (con-

diciones de saturación: 100-150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ si son comunidades adaptadas a la sombra, 400 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en comunidades adaptadas a la luz) para que se adapten a la luz y activen el sistema fotosintético antes de la adición de materiales radiactivos. En todos los casos, bajo la campana de gases se inyecta 1 μCi de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ a cada vial o cristalizador que contenga el sustrato. Además se repite esta operación en un vial o cristalizador adicional (sin sustrato biótico ni abiótico) para controlar las *desintegraciones por minuto* (DPM) iniciales que es necesario obtener posteriormente. Es recomendable comprobar que las *DPM iniciales* (DPM_{ini}) se corresponden a la concentración de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ supuestamente añadida. Estas DPM iniciales pueden ser calculadas aplicando la transformación 2,22 10^6 DPM por μCi . A la solución inicial se le añaden 0,1 mL de fenilalanina a fin de fijar el carbono inorgánico.

Incubar los viales o cristalizadores durante una a dos horas a temperatura controlada. Seguidamente, sacar los sustratos de los viales o cristalizadores (bajo la campana) y limpiarlos con agua destilada. Introducir los sustratos en un nuevo vial; en el caso de sustratos más grandes que un vial, introducir sólo una porción, extraída por raspado (como en la técnica 28). Añadir 5 mL de agua destilada a cada vial y sonicar durante 4 minutos para asegurarse que el material quede en suspensión. Añadir 15 mL de líquido de centelleo, colocar los viales en el contador de centelleo, y medir la radiactividad de cada muestra de 3 a 5 minutos. Es importante mantener los viales limpios de huellas digitales, que podrían interferir en la lectura del contador.

Si es necesario efectuar incubaciones largas porque la actividad del biofilm es baja, una parte del material marcado radiactivamente puede ser excretado, lo que afecta a las estimas. En este caso conviene determinar la cantidad de carbono orgánico radiactivo excretado. Para ello, se añaden 100 μL de HCl 0,6 N al final de la incubación y se dejan evaporar (bajo campana de gases trabajando en continuo) durante dos días para eliminar todo el ^{14}C no incorporado. Esta estima deberá sustraerse de la lectura final.

A veces conviene medir también el carbono orgánico excretado

CÁLCULO

A fin de poder expresar las desintegraciones por minuto como producción primaria es necesario conocer la concentración de carbono inorgánico en el agua del río (técnica 9), ya que el cálculo de la incorporación de carbonato ácido marcado está basado en la relación siguiente:

$$\frac{Ci}{Cd} = \frac{{}^{14}Ci}{{}^{14}Cd} \quad (18.1)$$

donde Ci : carbono incorporado, y Cd : carbono disponible.

Para calcular la incorporación de carbono se utiliza la siguiente expresión:

$$C_{\text{luz}} = \frac{1,06(DPM_m \cdot DPM_c)(V_i \cdot CID)}{DPM_i \cdot S \cdot T} \quad (18.2)$$

donde C_i : carbono incorporado ($\mu\text{g C cm}^{-2} \text{h}^{-1}$), 1,06: factor de corrección en razón de la preferencia de las algas por el carbono inorgánico no marcado frente al radiactivo, DPM_m : desintegraciones por minuto de la muestra, DPM_c : desintegraciones por minuto en el control (*quenching*), DPM_i : desintegraciones por minuto iniciales, V_i : volumen de agua en la incubación (L), viales o cristalizadores, CID : concentración de carbono inorgánico disuelto en el río ($\mu\text{g L}^{-1}$), S : superficie de biofilm en la muestra (cm^2), y T : tiempo de incubación (h).

A estas estimas se deben restar las correspondientes a la oscuridad para obtener la producción primaria por incorporación de carbono marcado. Así:

$$\text{Producción primaria} = C_{\text{luz}} - C_{\text{osc}} \quad (18.3)$$

La actividad final se expresa como $\mu\text{g C cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ o como $\mu\text{g C mg Chl } a^{-1} \text{h}^{-1}$, para lo que hay que medir también la clorofila de forma independiente. Existe un método que mide simultáneamente la incorporación de carbono marcado y la clorofila (Palumbo et al. 1986), aunque requiere precaución adicional.

Técnica 45b. Técnica de enriquecimiento con ^{13}C

Las técnicas de incorporación de ^{13}C y ^{15}N son muy parecidas y no contaminantes. Ambas son alternativas interesantes al uso de isótopos radiactivos

Los isótopos estables del carbono y el nitrógeno pueden ser utilizados como trazadores de las redes tróficas sin necesidad de enriquecer las muestras. Además, incubando las muestras con isótopos pesados de C y N se pueden determinar las tasas de incorporación por parte de los organismos, como alternativa a las técnicas que utilizan isótopos radiactivos (Camacho et al. 2005). Puesto que en los biofilms suele acumularse una gran cantidad de biomasa activa, es posible utilizar técnicas como la presentada aquí para medir la asimilación autotrófica de carbono o nitrógeno por parte de dichas comunidades.

Estas técnicas, aunque tienen unos límites de detección algo superiores a los de los métodos que utilizan isótopos radiactivos, no generan contaminantes peligrosos ni suponen riesgos en su realización, mientras que su rango de detección se ajusta perfectamente a las tasas que se registran en dichos biofilms.

Así, si se emplea $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ para la incubación, se pueden determinar las tasas de incorporación autotrófica de carbono inorgánico, mientras que la utilización

de compuestos inorgánicos con ^{15}N permite determinar las tasas de incorporación de nitrógeno. Buena parte del protocolo y material son comunes a ambas técnicas. En este apartado se explica de forma detallada cómo determinar las tasas de incorporación autotrófica de carbono, y en el siguiente (técnica 46) las variaciones que hay que introducir para determinar las tasas de incorporación de compuestos de nitrógeno inorgánicos.

MATERIAL

- Nevera portátil.
- Nevera de laboratorio.
- Congelador.
- Acumuladores de frío.
- Espátula.
- Cepillo dental.
- Frasco lavador.
- Embudo.
- Bote colector.
- Botellas para recoger agua del río para análisis químico (alcalinidad, compuestos inorgánicos de nitrógeno...).
- pH-metro.
- Termómetro.
- Regla corta o cinta métrica para medir superficies.
- Bolsas Whirlpak (fig. 18.1e).
- Regla larga para incubar las bolsas Whirlpak (fig. 18.1f).
- Gomas elásticas para enganchar las bolsas a la regla.
- Cinta aislante.
- Balanza de precisión (0,01 g) a pilas.
- Papel de aluminio.
- Solución *stock* de $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$; se prepara de forma que se añadan unos 0,2 mL por bolsa, así el carbono inorgánico añadido represente aproximadamente el 10% del total presente en la muestra.
- Medidor de irradiancia, a ser posible con *datalogger*.
- Gradilla para depositar las bolsas Whirlpak.
- Placas de Petri.
- Agua destilada.
- Formol comercial (37-40%).
- HCl 1 N.
- NaOH 1 N.
- Papel absorbente.
- Tubos Eppendorf de 2 mL.
- Micromortero.

Figura 18.1:
Ilustración de algunos pasos
de la preparación de
incubaciones y procesado
de muestras



Nota: a: Piedras con biofilms, b: Biofilms compactos. c: Recogida del raspado del biofilm epilítico. d: Preparación de la suspensión de microalgas del biofilm para dispensar en las bolsas Whirlpak. e: Adición a las bolsas de la suspensión de microalgas del biofilm. f: Incubación de muestras de biofilms compactos, uniendo las bolsas con una goma elástica a una regla transparente. g: Lavado de biofilm compacto h: Filtrado de la suspensión de microalgas tras la incubación.

- Malla de nailon de 0,5 mm de poro.
- Equipo de filtración para filtros de 25 mm de diámetro.
- Bomba de vacío.
- Pinzas.
- Filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F, de 25 mm de diámetro.
- Estufa de aire forzado.
- Espectrómetro de masas acoplado en flujo continuo a un analizador elemental CHNS.

PROCEDIMIENTO

1. Si se trata de un biofilm epilítico o epifítico no compacto (figs. 18.1a y 18.2b), raspar una superficie determinada (por ejemplo, 25 cm²) con un cepillo de dientes (fig. 18.1c) o una espátula. Anotar la superficie raspada para referir la actividad de incorporación de carbono a superficie de biofilm. Diluir el

material raspado en 10 mL de agua del río (fig. 18.1d) previamente filtrada a través de un filtro de fibra de vidrio Whatman GF/F. Colocar 10 mL de la suspensión en una bolsa Whirlpak de 60 mL de capacidad (muestra para incubar) (fig. 18.1e). Preparar las bolsas por triplicado: una bolsa se deja descubierta a la luz, otra se tapa con papel aluminio para determinar la fijación oscura (si la hubiera) y a la tercera se le añade formol (2% concentración final, añadiendo 0,5 mL de formol comercial de concentración 37-40%) antes de la incubación para medir la precipitación pasiva, y se tapa igualmente con papel de aluminio.

2. Si se trata de algas filamentosas (fig. 18.2c) o de un biofilm incrustante compacto (figs. 18.1b, 18.2a y 18.2d), recoger tres fragmentos de aproximadamente 0,3 g, pesarlos en la balanza portátil, anotar el peso exacto y a ser posible su superficie, colocarlos en una bolsa Whirlpak de 60 mL de capacidad y añadir un volumen de 10 mL de agua del río filtrada (Whatman GF/F).
3. En ambos casos, tomar tres réplicas adicionales, colocarlas sin incubar sobre papel absorbente dentro de una bolsa Whirlpak, y congelar lo antes posible a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Estas réplicas servirán para determinar la abundancia natural de ^{13}C en la muestra previa a la incubación. De esa manera, mediante la diferencia entre las muestras incubadas con isótopo pesado y las no incubadas, se estiman las tasas de fijación autotrófica de carbono. Con estas muestras de abundancia natural se debe proceder según lo señalado a partir del punto 12 de este protocolo.
4. Tomar una muestra adicional para determinar la concentración de clorofila (técnica 32) por unidad de superficie (biofilms epilíticos o epifíticos, muestreando una superficie conocida) o por unidad de peso (algas filamentosas o biofilm incrustante compacto, extrayendo los pigmentos de un peso conocido). De forma alternativa, puede determinarse microscópicamente el biovolumen (y la biomasa con las transformaciones adecuadas) de organismos fotosintéticos. Con cualquiera de estas dos medidas se pueden referir las tasas de fijación por unidad de biomasa fotosintética (estimada por clorofila, biovolumen o biomasa) calculando la relación entre superficie o peso, y clorofila (o biovolumen, o biomasa determinados microscópicamente) en la muestra.
5. Tomar una muestra de agua del río filtrada para determinar su alcalinidad, midiendo también el pH y la temperatura in situ. Estos datos permiten calcular el carbono inorgánico disponible (^{12}C).
6. Añadir a cada bolsa con muestra a incubar (tanto a la que se incuba en luz como las que se incuban en oscuridad, formolizadas o no) una cantidad de $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ que represente aproximadamente el 10% del carbono inorgánico presente en el agua (que se puede determinar mediante la alcalinidad, conociendo el pH y la temperatura, véase, por ejemplo, en Rodier, 1984). Se debe preparar una solución *stock* del isótopo de tal manera que la adición a cada bolsa sea de unos 0,2 mL.

Figura 18.2:
Diversos tipos de comunidades de biofilms fluviales. En la parte inferior de cada fotografía se muestra la imagen macroscópica de la comunidad



Nota: a: Comunidad incrustante de cianobacterias de los géneros *Phormidium* y *Pseudanabaena*. b: Biofilm epilítico formado por diatomeas y cianobacterias, dominado por los géneros *Denticula*, *Synedra*, *Amphora*, *Cocconeis* y *Gomphonema*, con una capa inferior formada por cianobacterias del género *Pseudanabaena*. c: Comunidad compacta formada fundamentalmente por algas filamentosas del género *Enteromorpha*. d: Comunidad incrustante de cianobacterias y diatomeas.

Fuente: Modificado a partir de Sánchez-Ferrer (2003).

7. Cerrar la bolsa evitando que queden burbujas de aire en su interior.
8. Enganchar las bolsas en una regla mediante gomas elásticas (fig. 18.1f) y depositar dicho soporte dentro del río, en la zona de procedencia de las muestras o en la de la orilla si la corriente de la zona de procedencia es alta. Atar la regla o clavarla mediante una piqueta para evitar que se vuelque o sea arrastrada por la corriente, colocando las bolsas en la parte superior de la regla.
9. Incubar (fig. 18.1f) durante aproximadamente tres horas, anotando el tiempo exacto de incubación. Si es posible, medir la radiación luminosa incidente durante el período de incubación. En el caso de biofilms compactos, exponer siempre la parte superior de éstos hacia la luz.
10. Finalizado el tiempo de incubación, abrir la bolsa, añadir 0,5 mL de HCl 1 N, y dejar la bolsa abierta en una gradilla durante una noche. Con la adición de HCl, además de detenerse la actividad biológica, todo el carbono inorgánico no fijado pasa a CO₂ y se libera hacia la atmósfera.
11. Añadir 0,5 mL de NaOH 1 N para neutralizar el ácido, y dejar incubar durante media hora.

12. En el caso de que se trate de algas filamentosas o de un biofilm incrustante compacto, sacar cada uno de los tres fragmentos de la bolsa con unas pinzas, lavarlos sumergiéndolos en una placa de Petri con agua destilada (fig. 18.1g), pesarlos y colocarlos, separados, en un papel absorbente dentro de una bolsa Whirlpak, y congelarla lo antes posible a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
13. En el caso de un biofilm epilítico o epifítico no compacto, filtrar el volumen dividido en tres partes a través de filtros de fibra de vidrio GF/F (fig. 18.1h) y guardarlos congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
14. Para procesar las muestras, tanto las incubadas con isótopos estables como las de abundancia natural, hay que descongelarlas, secarlas a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante dos horas, y pesarlas (esto último para los biofilms compactos o algas filamentosas).
15. En muestras de biofilms compactos, moler el biofilm y tamizarlo a través de una malla de nailon de 0,5 mm. En muestras de biofilms rascados y recogidos tras la incubación en un filtro, recortar un trozo de filtro, y utilizarlo para la determinación.
16. Guardar el fragmento de filtro o la muestra molida en un tubo Eppendorf y determinar la abundancia de ^{13}C y ^{12}C (se determina en las tres réplicas por separado y, posteriormente, se calcula la media de las réplicas). La determinación de la abundancia relativa de isótopos estables (riqueza relativa de ^{13}C y ^{12}C , dada por el parámetro $\delta^{13}\text{C}$ en comparación con un material estándar) se realiza con un espectrómetro de masas acoplado en flujo continuo a un analizador elemental CHNS que permite analizar tanto las relaciones isotópicas como la cantidad de carbono o nitrógeno contenido en la muestra.
17. Los cálculos tienen en cuenta tanto la cantidad total de carbono inorgánico disuelto en el agua (CID, que se obtiene mediante la alcalinidad, pH y temperatura, véase, por ejemplo, en Rodier, 1984), como la riqueza de ^{13}C y ^{12}C en las muestras incubadas y no incubadas con ^{13}C . Los cálculos se realizan de la siguiente manera:

La cantidad de ^{13}C se determina por espectrometría de masas

Conversión de $\delta^{13}\text{C}$ a $\%^{13}\text{C}$

$$\%^{13}\text{C} = 1,10559 + 0,0010985 \delta^{13}\text{C} \tag{18.4}$$

Tasa de incorporación específica de C inorgánico:

$$V_c = \frac{\%^{13}\text{C}_m - \%^{13}\text{C}_b}{\left[\left(100 \frac{^{13}\text{C}_a}{^{13}\text{C}_a + \text{CID}} \right) - \%^{13}\text{C}_b \right] T} \tag{18.5}$$

donde V_c : tasa de incorporación específica de C inorgánico (h^{-1}), $\%^{13}\text{C}_m$: concentración de ^{13}C en la muestra (%), $\%^{13}\text{C}_b$: concentración de ^{13}C en el blanco (abundancia natural), $^{13}\text{C}_a$: cantidad de ^{13}C añadida (mg/L), CID: con-

centración de carbono inorgánico disuelto en el agua (mg/L), y T : tiempo de incubación (h).

Tasa de fijación de C inorgánico:

$$\rho_C = COP \cdot V_C \quad (18.6)$$

donde ρ_C : tasa de fijación de C inorgánico (mg C h⁻¹), y COP : carbono orgánico particulado de la muestra (mg). Se calcula como %C total en la muestra por el peso seco, y dividido por 100.

Para referir las tasas a unidades de hábitat o de biomasa, se puede considerar bien la superficie muestreada o bien la biomasa de las muestras incubadas.

Se puede distinguir la fijación fotosintética y la fijación quimiosintética

18. Realizar los cálculos por separado para las muestras incubadas en luz y las incubadas en oscuridad. Para obtener la tasa de incorporación de carbono mediante cada mecanismo, se resta el valor de los tratamientos de la siguiente forma:

Fijación fotosintética = incorporación en luz – incorporación en oscuridad.
Fijación quimiolitótrofa = incorporación en oscuridad – incorporación en las muestras formolizadas (retención pasiva).

Las unidades son mg C fijado por hora, y por peso seco, o por unidad de superficie, dependiendo de la referencia: unidad de biomasa (determinada microscópicamente) o por concentración de clorofila.

Técnica 46. Determinación de las tasas de incorporación de nitrógeno inorgánico en biofilms mediante enriquecimiento con ¹⁵N

Esta técnica comparte la mayor parte del protocolo y el material con la técnica 45b, por lo que sólo se especifican las modificaciones correspondientes. Mediante su aplicación pueden determinarse las tasas de incorporación de nitrato y amonio por parte de los biofilms fluviales.

MATERIAL

El material a utilizar es el mismo de la técnica 45b, excepto, en los siguientes puntos:

- Se utiliza un compuesto distinto para el enriquecimiento isotópico. En lugar de utilizar NaH¹³CO₃, si se desea medir las tasas de incorporación de amonio

se añade $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, mientras que si se quieren medir las tasas de incorporación de nitrato se utiliza K^{15}NO_3 . También se prepara una solución *stock* añadiendo unos 0,2 mL del *stock* por bolsa, de manera que el nitrógeno inorgánico añadido represente aproximadamente el 10% del total presente en la muestra.

— No son necesarios el pH-metro, el termómetro, el HCl, el NaOH, ni el medidor de irradiancia.

La técnica de enriquecimiento con ^{15}N es muy similar a la de incorporación de ^{13}C

PROCEDIMIENTO

El protocolo a seguir es el mismo, excepto en los siguientes puntos:

- Punto 3. En este caso, las muestras no incubadas se utilizan para determinar la abundancia natural de ^{15}N en la muestra.
- Punto 5. En lugar de tomar muestras para determinar la alcalinidad, hay que tomar muestras para determinar compuestos inorgánicos de nitrógeno (nitrato + nitrito + amonio) en el agua del río que se utiliza para la incubación.
- Punto 6. En lugar de utilizar $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$, se añade $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para medir la incorporación de amonio, o K^{15}NO_3 para medir la incorporación de nitrato. Si se van a medir ambas, las incubaciones deben realizarse en bolsas separadas para cada compuesto, ya que ambos están marcados con ^{15}N y la incorporación sería indistinguible si se añadieran ambos conjuntamente.
- Puntos 10 al 13. En el caso de las muestras de biofilms rascados que se incuban en una suspensión, la incubación se detiene añadiendo formol a una concentración final del 2%, por lo que no se añade ni HCl ni NaOH, lavándose el filtro, una vez filtrada la muestra, con agua destilada. En cambio, en las muestras de biofilms compactos, la incubación se detiene lavando el biofilm al final de la incubación (inmediatamente) con agua destilada (tres veces), y congelándolo inmediatamente.
- Punto 16. Aquí es aplicable lo mismo, pero correspondiente al ^{15}N .
- Punto 17. *Cálculos*. Es necesario conocer las concentraciones de *nitrógeno inorgánico disuelto* (NID; técnica 11). De la medida en el espectrómetro de masas se obtiene la relación de abundancia entre ^{15}N y ^{14}N en la muestra, expresada mediante el parámetro $\delta^{15}\text{N}$, que compara la proporción de ambos isótopos en la muestra con la proporción en un material estándar.

Los cálculos se realizan de la siguiente manera:

Conversión de $\delta^{15}\text{N}$ a $\%^{15}\text{N}$:

$$\%^{15}\text{N} = 0,366295 + 0,000363009 \delta^{15}\text{N} \quad (18.7)$$

Tasa de incorporación específica de N:

$$V_N = \frac{\%^{15}N_m - \%^{15}N_b}{\left[\left(100 \frac{^{15}N_a}{^{15}N_a + NID} \right) - \%^{15}N_b \right] T} \quad (18.8)$$

donde V_N : tasa de incorporación específica de N inorgánico (h^{-1}), $\%^{15}N_m$: concentración de ^{15}N en la muestra (%), $\%^{15}N_b$: concentración de ^{15}N en el blanco (abundancia natural), $^{15}N_a$: cantidad de ^{15}N añadida (mg/L), NID : concentración de nitrógeno inorgánico disuelto en el agua (amonio o nitrato, según corresponda a las incubaciones para medir la incorporación de uno u otro compuesto, mg/L), y T : tiempo de incubación (h).

Tasa de incorporación de N:

$$\rho_N = NOP \cdot V_N \quad (18.9)$$

donde ρ_N : tasa de fijación de N inorgánico (mg N h^{-1}), y NOP : nitrógeno orgánico particulado de la muestra (mg). Se calcula como % N total en la muestra por el peso seco dividido por 100) Para referir las tasas a unidades de hábitat o de biomasa, se puede considerar la superficie muestreada o la biomasa de las muestras incubadas.

El resto del protocolo es similar al especificado para la técnica 45b.

Técnica 47. Determinación de la producción secundaria

Técnica 47a. Cálculo por el método del crecimiento instantáneo

Se necesita conocer el ciclo de vida de la especie, y los cambios temporales de la biomasa de la población y de la masa individual

Este método calcula la producción de una población a partir de su biomasa y de la tasa de crecimiento de los individuos que la componen (Ricker 1946, Allen 1949). Para utilizarlo, se necesita determinar el ciclo de vida de la población estudiada y los cambios con el tiempo de su biomasa y masa individual media. Obtener esta información requiere realizar un muestreo cuantitativo que abarque todo el período de desarrollo de los organismos, utilizando los procedimientos explicados en la técnica 34. Aumentar la frecuencia de muestreos y el número de réplicas de bentos tomadas aumenta la fiabilidad de las estimas de producción (Morin et al. 1987).

MATERIAL

- Lupa binocular con micrómetro o con sistema de análisis de imagen.
- Muestras cuantitativas tomadas durante todo el período de desarrollo de la población cuya producción pretendemos calcular.

- Balanza de precisión.
- Pinzas.
- Placas de Petri.

PROCEDIMIENTO

Esta metodología tiene dos variantes. Si se pueden diferenciar las cohortes entre sí (esto es, los grupos de organismos que nacen y se desarrollan a la vez), las tasas de crecimiento individual se calculan directamente a partir de los datos de campo. Si las cohortes que componen la población no son diferenciables, se pueden utilizar tasas de crecimiento obtenidas a partir de experimentos de campo o de laboratorio. En estos casos, para que tales tasas de crecimiento sean fiables, se debe tener en cuenta el efecto de varios factores, entre ellos la masa individual del organismo y la temperatura del agua (González y Graça 2003).

En caso de que las cohortes no sean diferenciables hay que utilizar tasas de crecimiento obtenidas de forma experimental

DETERMINACIÓN DEL CICLO DE VIDA

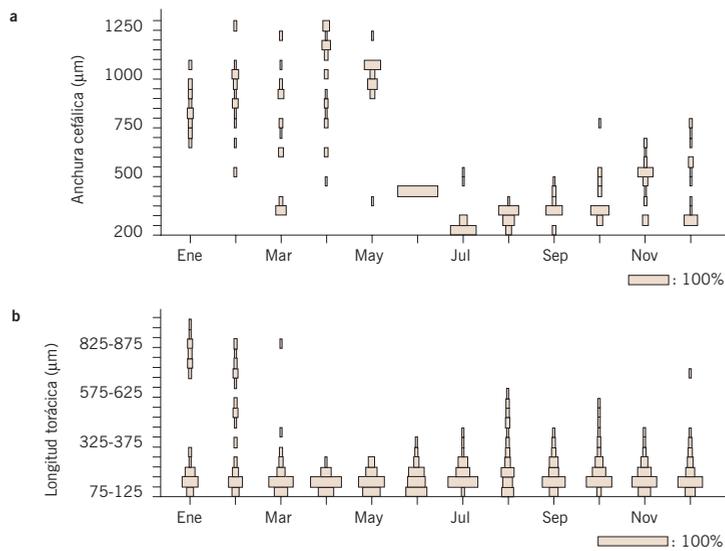
Se trata de un paso previo que permite conocer si las cohortes de la población pueden ser identificadas o no, y determinar cuáles son los períodos de reclutamiento y de transformación a pupas o adultos. Esta última información puede evitar subestimaciones en los cálculos de producción.

1. Para determinar el ciclo de vida se precisa conocer el tamaño de todos los individuos tomados en las muestras. El tamaño puede obtenerse a partir de varias medidas corporales, pero debe elegirse la que tenga el mayor rango de variación posible y no cambie por efecto de la fijación de las muestras. Las más utilizadas son la longitud corporal y la anchura de la cápsula cefálica (para una revisión véase Johnston y Cunjak 1999). Las medidas corporales pueden obtenerse usando un micrómetro adaptado a una lupa binocular o sistemas de captura y análisis de imagen. Conviene utilizar la máxima precisión de medida posible.
2. Representar las frecuencias de los tamaños de los organismos de cada muestreo. Si la precisión de la medida permite diferenciar los estadios de desarrollo, se pueden mostrar las abundancias relativas de los organismos en cada estadio. Si no se pueden diferenciar los estadios, las clases de tamaño tendrán rango fijo y arbitrario, elegido de modo que proporcione la máxima información y claridad.¹ La figura 18.3a representa el ciclo de vida de una población con una sola cohorte. En la figura 18.3b se muestra el ciclo de vida de una población cuyas cohortes no se pueden diferenciar.

Es importante que la medida corporal estudiada no se vea afectada por el método de conservación

¹ En la página http://ephemeroptera.de/inhaltsverzeichnis_engl/pinboard/pinboard.html puede descargarse una macro Excel para construir este tipo de gráficos.

Figura 18.3:
Ciclo de vida del plecóptero
Siphonoperla torrentium
(Pictet) (a) y del anfípodo
Echinogammarus
tarragonensis (Pinkster) (b),
en la cabecera de un río
del norte de España



Nota: La anchura de las barras representa la frecuencia relativa de animales de cada clase de tamaños, y en cada fecha.

3. Si hay varias cohortes diferenciadas (por ejemplo, una población bivoltina), los cálculos se realizan de manera independiente para cada una de ellas. La producción anual es la suma de la producción de todas las cohortes observadas.

En las siguientes explicaciones se muestra el caso más simple: una población que durante el año sólo presenta una cohorte (esto es, univoltina).

MEDIDA DE LA MASA INDIVIDUAL MEDIA Y DE LA BIOMASA DE LA POBLACIÓN

El procedimiento precisa conocer en cada fecha de muestreo la biomasa de la población y el promedio de las masas individuales de los organismos que la integran.

Mejor que pesar los organismos de forma individual es medirlos y calcular el peso en función del tamaño

1. La masa individual media de los organismos de la población se puede medir directamente con una balanza. Sin embargo, es una opción laboriosa que requiere secar y pesar todos los individuos capturados en cada muestreo. Lo más habitual es utilizar modelos de regresión que relacionan el tamaño del organismo con su masa (fig. 18.4). Los modelos más fiables se construyen utilizando organismos de la población estudiada y evitando usar fijadores, porque causan pérdidas de masa (Johnston y Cunjak 1999).
2. La biomasa de la población en cada muestreo se puede calcular como el producto de la densidad media de organismos y su masa individual media.

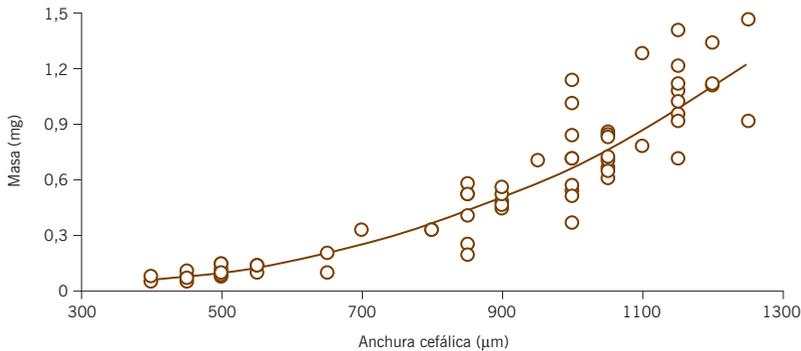


Figura 18.4: Relación tamaño-masa de la población de *S. torrentium* de la figura 18.3a. El coeficiente de determinación de la regresión (r^2) es de 0,9

CÁLCULO DE LA PRODUCCIÓN

1. Las tasas instantáneas de crecimiento (G) se obtienen mediante la fórmula:

$$G = \ln(m_t - m_{t-\Delta t}) \tag{18.10}$$

donde G : tasa instantánea de crecimiento, m_t : masa individual media de los organismos en el muestreo t (g), y $m_{t-\Delta t}$: masa individual media en el muestreo anterior (g). La fórmula asume que la masa de los organismos aumenta de manera exponencial.

2. La producción entre dos muestreos consecutivos (p , en g/m^2) es el producto de G y el promedio de las biomásas observadas en ambos muestreos.
3. La producción anual (P , en g/m^2 año) se calcula como la suma de las producciones observadas entre todos los muestreos realizados durante el año:

$$P = \sum p \tag{18.11}$$

CORRECCIONES FINALES

Habitualmente, la eclosión de los invertebrados acuáticos no es totalmente sincrónica, lo que puede provocar que durante el período de reclutamiento se observen valores negativos de la tasa instantánea de crecimiento y de la producción entre muestreos. Se trata de artefactos debidos a la incorporación de individuos de baja masa a la población. Estos valores negativos pueden ser eliminados de los cálculos con escaso efecto sobre la estima de la producción anual.

A veces se obtienen tasas de crecimiento instantáneo negativas, datos que es mejor eliminar

Durante los períodos de emergencia o, en su caso, de pupación, también pueden aparecer valores negativos de crecimiento y producción. La razón es que los individuos de mayor tamaño tienden a ser los primeros en emerger o pupar (Forrest 1987), lo que provoca un descenso en la masa individual media

Cuadro 18.1:
Cálculo de la producción secundaria de *S. torrentium* utilizando el método del crecimiento instantáneo

Fecha (t)	Biomasa (mg/m ²)	Masa individual media (m _p , en mg)	Tasa instantánea de crecimiento	Biomasa media (mg/m ²)	Producción entre muestreos (p, en mg/m ²)
13/01/1993	22,286	0,334	0,375	41,903	15,716
17/02/1993	61,520	0,486	0,289	46,758	13,529
16/03/1993	31,996	0,313	0,841	34,549	29,067
20/04/1993	37,101	0,726	0,841	30,825	25,935
25/05/1993	24,549	0,650			
24/06/1993	0,219	0,049	-0,896	1,003	0
20/07/1993	1,787	0,020	0,049	2,609	0,127
18/08/1993	3,430	0,021	0,389	4,706	1,833
22/09/1993	5,982	0,031	0,660	7,034	4,645
29/10/1993	8,085	0,060	0,427	12,595	5,383
24/11/1993	17,104	0,092	0,353	20,903	7,387
20/12/1993	24,701	0,131	0,936	23,494	21,989
Producción anual (P, mg/m ² año)					125,611

Nota: La población estudiada corresponde a un tramo de cabecera de la cuenca del Agüera (norte de España). Se destacan en color los valores corregidos de tasa de crecimiento instantáneo y de producción entre muestreos.

observada en los muestreos posteriores. Introducir tales valores negativos en la ecuación 18.11 para calcular la producción anual puede subestimar de forma importante su valor real, porque la biomasa de la población puede alcanzar sus valores máximos durante estas fases finales del ciclo de vida (cuadro 18.1). En estos casos, puede sustituirse el valor observado de G por el resultado de la fórmula:

$$G_{est} = G_{pos} \frac{\Delta t}{\Delta t_{pos}} \quad (18.12)$$

donde G_{est} : valor estimado de la tasa instantánea de crecimiento que sustituye al valor negativo observado, G_{pos} : última tasa instantánea de crecimiento positiva observada, Δt : tiempo transcurrido entre los dos muestreos consecutivos para los que se hace haciendo la estima, y Δt_{pos} : tiempo transcurrido entre los dos muestreos que dieron lugar a la última tasa de crecimiento positiva observada.

La macro 18.1 permite calcular la producción secundaria mediante el método del crecimiento instantáneo

De todos modos, hay poblaciones que, aunque presentan cohortes diferenciadas, tienen el desarrollo tan poco sincrónico que el método del crecimiento instantáneo subestima su producción real. En estos casos, debe recurrirse a estimas independientes de tasas de crecimiento o calcular la producción por el método de la frecuencia de los tamaños (Benke 1993).

En el cuadro 18.1 se presenta un ejemplo del uso del método del crecimiento instantáneo para calcular la producción de una población univoltina.

Técnica 47b. Cálculo por el método de la frecuencia de tamaños

Este método calcula la producción de una población a partir de la distribución de frecuencias de los tamaños de los animales capturados durante un año. La distribución de frecuencias se utiliza para construir la curva de supervivencia de una cohorte promedio, que, con las correcciones adecuadas, permite calcular la producción anual de la población. Para utilizarlo se necesita disponer de un muestreo cuantitativo de la población durante un año completo (técnica 34). La toma de muestras debe tener una frecuencia constante durante el año. Aumentar el número de muestreos y el número de réplicas incrementa la fiabilidad de los resultados (Morin et al. 1987).

Si no se distinguen las cohortes, se puede calcular la producción secundaria mediante el método de la frecuencia de tamaños

MATERIAL

- Lupa binocular con micrómetro o sistema de análisis de imagen.
- Muestras cuantitativas tomadas durante todo el período de desarrollo de la población cuya producción pretendemos calcular.
- Balanza de precisión.
- Pinzas.
- Placas de Petri.

PROCEDIMIENTO

El procedimiento fue desarrollado inicialmente para estimar la producción de comunidades completas sin necesidad de identificar a sus componentes (Hynes y Coleman 1968). Sin embargo, investigaciones posteriores han mostrado que para obtener estimas correctas los grupos de especies deben cumplir tres condiciones (Hamilton 1969): 1) todas ellas deben necesitar el mismo tiempo para completar su desarrollo, 2) su tamaño máximo debe ser similar y 3) también debe ser similar su tamaño mínimo. Se trata de premisas difíciles de cumplir y comprobar, lo que dificulta el uso correcto de este método para calcular la producción de aglomerados de especies.

A diferencia del método del crecimiento instantáneo, el método de la frecuencia de los tamaños no necesita que las cohortes que forman la población sean diferenciables. Además, se trata de un método robusto frente a la asincronía en el crecimiento de los individuos. Sin embargo, mientras que el primer método permite estudiar los cambios en la producción durante el período de desarrollo de los organismos, el de la frecuencia de los tamaños estima únicamente la producción total anual.

El método de la frecuencia de tamaños no permite calcular la producción en períodos cortos

DETERMINACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS DE LOS TAMAÑOS

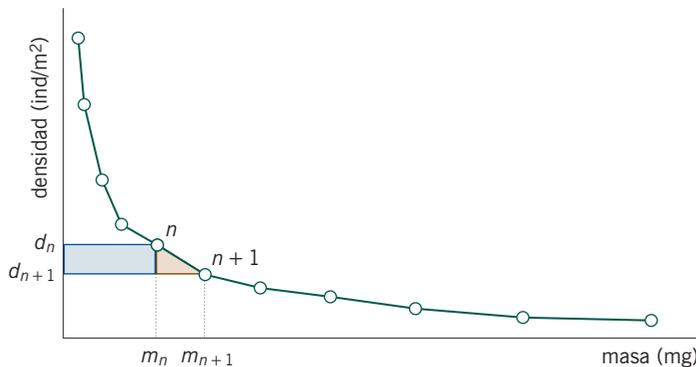
1. Medir todos los individuos de la población capturados durante el año utilizando una lupa con un micrómetro o un sistema de captura y análisis de imágenes. Conviene que la medida corporal elegida tenga el mayor rango de variación posible y no sufra cambios por el uso de fijadores. Las medidas más utilizadas son la anchura de la cápsula cefálica y la longitud corporal (para una revisión, se puede consultar Johnston y Cunjak 1999).
2. Establecer el número y el rango de las clases de tamaño que se van a utilizar en los cálculos. Si el tipo de organismo y la precisión de las medidas tomadas lo permiten, las clases de tamaño pueden consistir, simplemente, en los diferentes estadios de desarrollo. En otro caso, lo habitual es establecer categorías de tamaño de longitud arbitraria y regular. Al aumentar el número de clases de tamaño, aumenta la fiabilidad de la estima de producción (Morin et al. 1987). Sin embargo, si el número establecido de clases es demasiado alto, aumenta la probabilidad de que se den casos en los que la frecuencia relativa de animales en la clase n sea menor que la frecuencia relativa de animales en la clase $n + 1$, lo que hace que la curva de supervivencia de la cohorte promedio sea poco realista.
3. Calcular la densidad media anual (d , en ind/m²) y la masa individual media (m , en g) de los organismos de cada clase de tamaños. Las masas individuales medias pueden medirse directamente con una balanza, pero lo más habitual es usar ecuaciones de regresión tamaño-masa. Conviene utilizar modelos construidos utilizando organismos de la población cuya producción vamos a calcular y evitar pérdidas de masa por la utilización de fijadores (González et al. 2002).

Hay que establecer un número suficiente de clases de tamaño

CÁLCULO DE LA PRODUCCIÓN DE LA COHORTE PROMEDIO

La figura 18.5 representa la densidad media anual de cada clase de tamaños frente a su masa individual media. La curva obtenida se considera equivalente a la cur-

Figura 18.5:
Densidad media anual de cada clase de tamaños de una cohorte promedio frente a la masa individual media de los animales que integran cada clase



Nota: En el texto, el área azul se denomina A y la marrón, B.

va de supervivencia de una cohorte promedio hipotética, esto es, construida a partir de las muestras tomadas durante todo el año. La producción de la cohorte se calcula como la superficie situada debajo de la curva.

1. Se observan pérdidas de organismos entre clases de tamaño consecutivas, que implican pérdidas de biomasa para la población: calcularlas como el producto de la densidad perdida (Δd , en ind/m²) y el promedio de las masas individuales medias de las dos clases consecutivas (\bar{m} , en g).

La razón de hacerlo así es que la biomasa perdida entre las clases n y $n + 1$ se calcula como la superficie de los polígonos A y B de la figura 18.5:

$$A + B = (d_n - d_{n+1})m_n + \frac{(d_n - d_{n+1})(m_{n+1} - m_n)}{2} \tag{18.13}$$

El desarrollo de la ecuación lleva a:

$$(d_n - d_{n+1})\left(\frac{m_{n+1} + m_n}{2}\right) = \Delta d \cdot \bar{m} \tag{18.14}$$

donde d_n : densidad observada en el muestreo n (ind/m²), d_{n+1} : densidad observada en el muestreo $n+1$ (ind/m²), m_{n+1} : masa media individual observada en el muestreo $n+1$ (g), y m_n : masa media individual observada en el muestreo n (g).

Explicado de manera más formal, se asume que los animales desaparecidos en el paso de una clase a la siguiente murieron cuando tenían una masa individual que era intermedia entre la de ambas clases de tamaños.

2. Calcular la producción de la cohorte promedio hipotética como la suma de todas las pérdidas de biomasa entre clases de tamaño consecutivas:

$$P_c = \sum_{n=1}^j (d_n - d_{n+1})\left(\frac{m_{n+1} + m_n}{2}\right) \tag{18.15}$$

donde P_c : producción de la cohorte promedio hipotética (g/m²), y j : número total de clases de tamaño establecidas.

Es frecuente encontrar casos en los que d_1 es menor que d_2 , lo que da lugar a valores negativos de producción entre ambas clases de tamaño. Estas situaciones pueden ser debidas a la pérdida de los individuos más pequeños de la cohorte durante la toma y procesamiento de muestras. Por tanto, si se dan valores negativos de producción entre las primeras clases de tamaño, pueden ser excluidos del sumatorio que calcula P_c sin provocar cambios importantes en los resultados. Sin embargo, los posibles valores negativos de producción entre clases de tamaño mayo-

En ocasiones se obtienen valores negativos de producción entre clases de tamaño

res deben ser incluidos en el sumatorio (Hamilton 1969, Waters 1977). La razón es que pueden ser resultado de: 1) la variabilidad muestral de los valores observados de d_n o de d_{n+1} , y 2) cambios durante el desarrollo de los organismos en la cantidad de tiempo que pasan en cada clase de tamaño. En estos casos, excluir tales valores negativos conduciría a sobrestimar la producción real de la población.

CÁLCULO DE LA PRODUCCIÓN ANUAL DE LA POBLACIÓN

1. Para calcular la producción anual de la población (P) a partir de la producción de la cohorte promedio hipotética hay que introducir dos factores de corrección:
 - a) El número de clases de tamaño establecidas (Hamilton 1969). Al establecer j clases de tamaño diferentes se asume que cada organismo pasa en cada una de ellas una fracción del año $1/j$, por lo que los valores d_n (calculados a partir de las muestras tomadas durante *todo* el año) subestiman en un factor j el número real de organismos que han alcanzado cada clase de tamaños durante todo el año.
 - b) La cantidad de tiempo que necesitan los organismos para completar su desarrollo desde la fase de larva recién eclosionada hasta convertirse en adulto o en pupa (tiempo de producción de la cohorte, TPC, Benke 1979). Los cálculos anteriores asumen que los animales precisan un año para desarrollarse; si no es así, hay que corregir la estima de producción anual utilizando un factor $12/TPC$, en el que el TPC se mide en meses.

Cuadro 18.2:
Cálculo de la producción secundaria de *Siphonoperla torrentium* (*Pictet*) en la cabecera de un río del norte de España por el método de la frecuencia de los tamaños

Clase de tamaños (j)	Rango de tamaños (μm)	Densidad media anual (d , en ind/m ²)	Masa individual media (m , en mg)	Pérdida de densidad (Δd , en ind/m ²)	Promedio de valores consecutivos de m (\bar{m} , en mg)	Pérdida de biomasa (mg/m^2)
1	200-300	26,111	0,010	-1,296	0,0170	0
2	300-400	27,407	0,024	16,852	0,0420	0,707
3	400-500	10,556	0,060	-3,519	0,0805	-0,283
4	500-600	14,074	0,101	7,037	0,1370	0,964
5	600-700	7,037	0,173	0,741	0,2235	0,166
6	700-800	6,296	0,274	1,667	0,3310	0,551
7	800-900	4,630	0,388	-1,667	0,4595	-0,766
8	900-1000	6,296	0,531	0,370	0,6190	0,229
9	1000-1100	5,926	0,707	4,259	0,8190	3,488
10	1100-1200	1,667	0,931	-0,926	1,0635	-0,985
11	1200-1300	2,593	1,196	2,593	1,1960	3,101
Producción de la cohorte promedio hipotética (P_c, en mg/m²):						7,174
Producción anual (P, en mg/m² año):						105,215

2. La producción anual (P , en $\text{g}/\text{m}^2 \text{ año}$) se calcula a partir de la producción de la cohorte promedio hipotética mediante la fórmula:

$$P = j \frac{12}{TPC} P_c \quad (18.16)$$

En el cuadro 18.2 se muestra cómo aplicar el método de la frecuencia de los tamaños para calcular la producción de la población usada como ejemplo de la técnica 47a. El TPC se estimó en nueve meses, que fue el tiempo transcurrido entre el inicio del reclutamiento y la aparición de las primeras ninfas con fundas alares completamente desarrolladas.

La macro 18.2 permite calcular la producción secundaria mediante el método de la frecuencia de tamaños

18.2. Bibliografía

- ALLEN K.R. «Some aspects of the production and cropping of fresh waters». *Transactions and Proceedings of the Royal Society of New Zealand* 77 (1949): 222-228.
- BENKE A.C. «A modification of the hynes method for estimating secondary production with particular significance for multivoltine populations». *Limnology and Oceanography* 24 (1979): 168-171.
- BENKE A.C. «Concepts and patterns of invertebrate production in running waters». *Verhandlungen Internationale Vereinigung fur theoretische und angewandte Limnologie* 25 (1993): 15-38.
- CAMACHO A., ROCHERA C., SILVESTRE J.J., VICENTE E., y HAHN M. «Spatial dominance and inorganic carbon assimilation by conspicuous autotrophic biofilms in a chemical gradient of a cold sulfurous spring: The role of differential ecological strategies». *Microbial Ecology* 50 (2005): 172-184.
- FORREST T.G. «Insect size tactic and development strategies». *Oecologia* 73 (1987): 178-184.
- FRY B. *Stable isotope ecology*. Nueva York: Springer, 2006.
- GONZÁLEZ J.M., BASAGUREN A., y POZO J. «Size-mass relationships of stream invertebrates in a North Spain stream». *Hydrobiologia* 489 (2002): 131-137.
- GONZÁLEZ J.M., y GRAÇA M.A.S. «Conversion of leaf litter to secondary production by a shredding caddis-fly». *Freshwater Biology* 48 (2003): 1578-1592.
- HAMILTON A.L. «On estimating annual production». *Limnology and Oceanography* 14 (1969): 771-782.
- HURYN A.D., y WALLACE J.B. «Life history and production of stream insects». *Annual Review of Entomology* 45 (2000): 83-110.
- HYNES H.B.N., y COLEMAN M.J. «A simple method of assessing the annual production of stream benthos». *Limnology and Oceanography* 14 (1968): 569-573.
- JOHNSTON T., y CUNJAK R.A. «Dry mass-length relationships for benthic insects: A review with new data from Catamaran Brook, New Brunswick, Canada». *Freshwater Biology* 41 (1999): 653-674.
- LOCK M.A. «River epilithon, a light and organic energy transducer». En M.A. Lock y D.D. Williams, eds. *Perspectives in running water ecology*. Nueva York: Plenum Press, 1983: 3-40.
- MORIN A., MOUSSEAU T.A., y ROFF D.A. «Accuracy and precision of secondary production estimates». *Limnology and Oceanography* 32 (1987): 1342-1352.

- PALUMBO A.V., MULHOLLAND P.J., y ELWOOD J.W. «Extraction with DMSO to simultaneously measure periphyton photosynthesis, chlorophyll, and ATP». *Limnology and Oceanography* 32 (1986): 464-471.
- PETERSON B.J., DEEGAN L., HELFRICH J., HOBBIE J.E., HULLAR M., MOLLER B., FORD T.E., HERSHEY A., HILTNER A., KIPPHUT G., LOCK M.A., FIEBIG D.M., MCKINLEY V., MILLER M.C., VESTAL J.R., VENTULLO R., y VOLK G. «Biological responses of a tundra river to fertilization». *Ecology* 74 (1993): 653-672.
- RICKER W.E. «Production and utilization of fish populations». *Ecological Monographs* 16 (1946): 373-391.
- RODIER J. *L'analyse de l'eau*. París: Dunod, 1984.
- SALLENAVE R.M., y DAY K.E. «Secondary production of benthic stream invertebrates in agricultural watersheds with different land management practices». *Chemosphere* 23 (1991): 57-76.
- SÁNCHEZ FERRER N. *Patrones estacionales y diarios de producción primaria de las comunidades epilíticas de un arroyo salino*. Valencia: Universidad de Valencia, 2003.
- WATERS T.F. «Secondary production in inland waters». *Advances in Ecological Research* 10 (1977): 91-164.

Relaciones tróficas en el ecosistema fluvial

ISABEL MUÑOZ, ANNA M. ROMANÍ, ALBERTO RODRIGUES-CAPÍTULO,
JORGE GONZÁLEZ ESTEBAN Y EMILI GARCÍA-BERTHOU

19.1. Introducción

El estudio de las redes tróficas de los ecosistemas se revitalizó en los años 1970 (Cohen 1978, Pimm 1982) y ha recibido un nuevo impulso en los últimos años. La creciente cantidad de datos obtenidos en redes tróficas naturales ha permitido la modelización de la estructura de las cadenas y redes tróficas y, especialmente, el análisis de su estabilidad (Montoya et al. 2006). Si se conoce la red trófica de un ecosistema fluvial es posible integrar la dinámica de la materia orgánica y el procesado de los nutrientes con las interacciones dentro de la comunidad. En los ecosistemas acuáticos prácticamente todos los organismos son omnívoros, ya que tanto el material vegetal como el biofilm están colonizados por bacterias, hongos y pequeños invertebrados, que son ingeridos en conjunto. Por ello, en el caso de los invertebrados, una forma de conocer la estructura trófica es clasificando los organismos en función de estrategias tróficas más generales (ramoneadores, recolectores, filtradores, trituradores y depredadores). Generalmente esta clasificación se basa en la bibliografía (por ejemplo, Cummins 1973, Merritt y Cummins 1996), aunque se puede corregir y completar con la experiencia propia en cada zona de estudio. La determinación de la dieta de los peces permite obtener, además de datos propios acerca de esta comunidad, información sobre los niveles tróficos superiores, que generalmente ocupa este grupo. La proporción en abundancia o biomasa de cada una de estas estrategias ayuda a conocer la estructura de la comunidad en función de los recursos disponibles.

El estudio de las redes tróficas fluviales es complejo, ya que el omnivorismo es muy frecuente

De todos modos, para un estudio más detallado de la transferencia de energía en ecosistemas fluviales es necesario empezar con una buena identificación de todos los niveles tróficos y de sus interacciones. En este análisis no pueden faltar muestras de todos los recursos disponibles en el río (materia orgánica, perifiton, macrofitos, etc.) y de sus consumidores. La técnica del análisis de dietas (técnica 48) describe cómo determinar el consumo de recursos que realizan los animales. Es una técnica que requiere la observación de muchos individuos, de todas las especies presentes en el río y en sus diferentes fases de crecimiento. También hay que tener en cuenta, que las dietas pueden variar en el tiempo y en el espacio, siendo en muchos casos difíciles de identificar o cuantificar.

Las relaciones isotópicas usando isótopos estables ofrecen nuevas posibilidades para analizar las relaciones tróficas en el ecosistema

En los últimos años, se ha extendido el uso de los isótopos estables en ecología (Lajtha y Michener 1994, Fry 2006). Los isótopos estables del carbono (^{13}C) y nitrógeno (^{15}N) son especialmente útiles para seguir las transferencias desde las plantas y el material detrítico hasta los herbívoros y consumidores secundarios. En muchos ecosistemas, las distintas fuentes de materia orgánica tienen diferentes relaciones isotópicas $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ y $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$, por lo que las dietas de los animales se pueden inferir a partir de la señal isotópica de sus tejidos. En el paso entre niveles tróficos sucesivos ocurre un cambio en las proporciones isotópicas, debido al propio metabolismo de los compuestos de carbono y nitrógeno. Los tejidos animales se enriquecen levemente (entre 0,3 y 0,5 ‰ de media) en ^{13}C respecto a su comida, pero el enriquecimiento es mayor en ^{15}N (entre 1 y 5 ‰). Por ello, este enriquecimiento predecible en nitrógeno se utiliza como indicador del nivel trófico. La combinación de ambos isótopos se usa para determinar las vías de transferencia de la materia orgánica y la estructura trófica de los ecosistemas.

Estudiar estos patrones de transferencia de energía es generalmente insuficiente para inferir muchos procesos de interés ecológico. Sin embargo, la biogeoquímica de los elementos esenciales proporciona una perspectiva funcional de la red trófica que complementa la aproximación energética y dinámica explicada anteriormente. Así, la ecología estequiométrica se ocupa del balance de energía y de elementos químicos en las interacciones ecológicas y, especialmente, en las relaciones tróficas. La estequiometría principalmente estudia los organismos en función de su composición elemental (y en particular C, N y P, Elser et al. 1996, Sterner y Elser 2002). Por ejemplo, la abundancia relativa de C respecto a N y P se halla estrechamente asociada con la tasa de crecimiento tanto en autótrofos como heterótrofos. Como principio general, los elementos limitantes se transfieren en la red trófica con una alta eficiencia. Cuando un consumidor tiene una dieta con cocientes C:N o C:P elevados, el N y el P son utilizados con una alta eficiencia por el animal, mientras que una buena parte del C no se asimila y es rechazado, excretado o respirado (Cross et al. 2003, Elser y Hessen 2005). La calidad de la dieta se mide en función de los requerimientos de los consumidores.

Por ello, es importante conocer los posibles desequilibrios entre las relaciones C:N:P del consumidor y de su alimento.

Este capítulo muestra alguna de las técnicas más recomendables para el estudio de las conexiones tróficas en los sistemas fluviales. Con el análisis de los contenidos estomacales (técnica 48) se obtiene una aproximación de la estructura trófica en términos de interacciones y del flujo de energía a partir de la cuantificación (técnica 51). Esta técnica puede complementarse con el análisis de los isótopos estables (técnica 50), que muestra la estructura trófica del material asimilado y, por tanto, integra la dieta en función del tiempo. La combinación de las distintas técnicas permite determinar la consistencia de las observaciones respecto a la clasificación de los grupos tróficos. La técnica del análisis estequiométrico de diferentes compartimentos biológicos (técnica 49) también permite determinar cómo se transfiere la materia orgánica desde los niveles basales a los consumidores, pero con una información más funcional.

Técnica 48. Análisis de dietas

Técnica 48a. Contenidos estomacales en invertebrados

El análisis de contenidos estomacales permite conocer la dieta de los invertebrados y estudiar el papel de cada especie en la estructura trófica de la comunidad. El rol de una especie en la red trófica está determinado por su densidad y biomasa, que hay que cuantificar en los tramos estudiados (técnica 34), y por la fuerza de sus interacciones tróficas con las especies depredadas, que es equivalente al consumo per capita. Esto es lo que se busca mediante la aplicación de esta técnica, aunque hay que tener en cuenta que el contenido estomacal refleja la dieta ingerida por el individuo, y no la asimilada. Por ello es conveniente completar esta información con otras técnicas, como la de análisis de los isótopos estables (técnica 50).

El análisis de contenidos estomacales muestra el alimento ingerido por el individuo y no necesariamente el asimilado

Para obtener una buena caracterización de la red trófica mediante esta técnica es necesario un examen exhaustivo del contenido estomacal de muchos individuos. Muchas veces es difícil identificar bien algunos de los componentes de las dietas; otras veces el consumidor sólo se alimenta de fluidos o partes blandas inidentificables. En ríos con hidrología o temperatura variable, las conexiones tróficas y, especialmente, su intensidad (cantidad consumida), pueden cambiar en el tiempo. De todos modos, esta técnica permite obtener esquemas y diagramas de la red trófica para, por ejemplo, conocer los efectos de la desaparición de un recurso o de una especie clave. Si se complementa la identificación con una cuantificación de cada ítem consumido, se pueden, además, construir flujos de energía entre algunas especies, por ejemplo las más abundantes o características del río estudiado.

MATERIAL

- Bisturí.
- Pinzas.
- Placas de Petri.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Solución de rosa de Bengala (1 g de polvo de rosa de Bengala por litro de agua destilada).
- Lupa estereoscópica.
- Microscopio óptico (100-400 X, preferiblemente, con sistema fotográfico).

PROCEDIMIENTO

Hay que extraer el tracto digestivo a un mínimo de 10 animales por especie

1. A partir de las muestras recogidas en el campo y fijadas en formaldehído, separar al menos 10 individuos de cada especie a estudiar (las más abundantes o más representativas), y de cada estadio de crecimiento. Muchos taxones cambian de dieta con la edad. Diseccionar los animales bajo la lupa estereoscópica, extrayendo su tracto digestivo. En algunos taxones basta con estirar de la cabeza, en otros hay que abrir longitudinalmente el animal. En los gasterópodos hay que localizar la boca y separar el tubo digestivo a partir de una disección. Los esquemas de anatomía interna que se encuentran en cualquier tratado general de zoología son muy útiles. El contenido de los organismos o estadios más pequeños se puede observar directamente por transparencia.
2. Introducir los tubos diseccionados en botes pequeños con rosa de Bengala durante 12-24 horas. Este colorante tiñe la materia orgánica y ayuda a diferenciar los organismos del resto de material ingerido. Es aconsejable recoger el contenido del digestivo más próximo a la boca, ya que este material está menos digerido. Para los individuos de menor tamaño y cuya cutícula sea muy fina (por ejemplo, Naididae o Chironomidae) se puede teñir el animal entero.
3. Tras pasar 24 horas en rosa de Bengala, vaciar los tubos y montar su contenido en preparaciones. Utilizar el método del *squash* (presionar y rotar) entre el portaobjetos y el cubreobjetos, para garantizar la dispersión del contenido estomacal. Observar bajo el microscopio (100-400 X) y, si es posible, fotografiar lo representativo e identificable. Clasificar el contenido del tracto digestivo de las especies no carnívoras en: detritus (material no identificable), material vegetal (pequeñas porciones de hojas), algas filamentosas, diatomeas, hongos (conidios, hifas) y material mineral (fig. 19.1). En el caso de las especies carnívoras intentar llegar a la máxima resolución taxonómica de las presas consumidas.
4. Para estudios cuantitativos, calcular la proporción de cada tipo de alimento respecto al total. Para ello se debe cuantificar todo el contenido del tubo digestivo, o si éste es muy largo o está muy lleno, seleccionar una parte de longitud co-

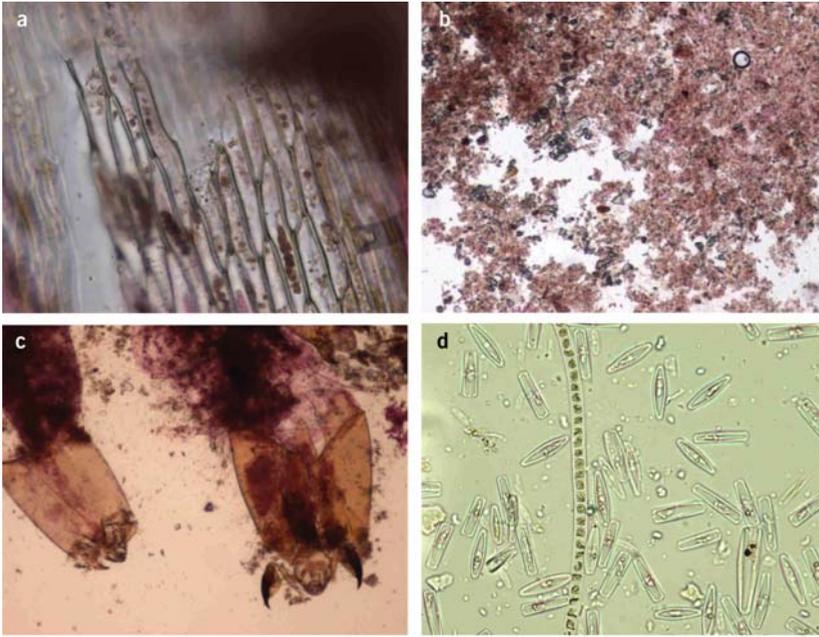


Figura 19.1:
Fotografías del contenido estomacal de diversas especies: a) material vegetal, b) detritus y material mineral, c) restos de presas (quirónómidos) y d) diatomeas y algas filamentosas

Nota: Observaciones en macroinvertebrados de Fuirosos (Cataluña, NE de España; Guerra 2003).

nocida respecto a la longitud total. Las imágenes se pueden analizar con cualquier programa de tratamiento de las mismas, o a partir de una parrilla que se superpone a la imagen. Si la proporción se calcula directamente de la preparación, se observa un número representativo de campos al microscopio, y en cada campo se calcula la proporción de cada una de las presas encontradas.

Cuantificar la proporción de cada alimento en función del área que ocupa

Técnica 48b. Contenidos digestivos y análisis de la dieta de peces

A continuación se revisa la metodología para estudiar los contenidos digestivos de peces y analizar la dieta, partiendo básicamente de las revisiones de Hynes (1950), Pillay (1952), Hyslop (1980) y Bowen (1983), y de nuestra propia experiencia en la materia (por ejemplo, García-Berthou 1999, García-Berthou 2002).

CAPTURA Y PRESERVACIÓN DE CONTENIDOS

Para analizar la dieta de animales es esencial conservar los contenidos digestivos desde el momento de su captura. Las distintas técnicas de captura de peces tienen influencia en la determinación de la dieta. La mayoría de técnicas provocan una cierta probabilidad de regurgitación, especialmente en los piscívoros, y por

El método de pesca influye en los contenidos digestivos de los peces. A ser posible, conviene analizar la dieta de peces pescados por métodos activos

tanto un sesgo en la descripción de la dieta. La digestión de los contenidos es más importante si se usan técnicas de captura pasivas, como redes agalleras, trasmallos, trampas o nasas, ya que el pez una vez capturado está un cierto tiempo sin alimentarse y digiriendo; las trampas y nasas también pueden conducir a los peces capturados a consumir otras presas capturadas que, normalmente, no consumirían. Para analizar la dieta es preferible usar métodos activos (pesca eléctrica, redes de arrastre litoral (*seines*) o salabres (sacaderas), o reducir el tiempo de colocación de los pasivos, especialmente en climas cálidos, donde la digestión es más rápida. Los peces capturados pueden conservarse en neveras con hielo hasta su congelación en el laboratorio, o bien ser fijados con formol, después de sacrificarlos con una sobredosis de anestésico; los peces muy grandes pueden diseccionarse en el campo y fijar sólo el tubo digestivo. Después de la disección en el laboratorio conviene pasar los tubos digestivos a alcohol (70%), para posteriormente analizar los contenidos.

Otra posibilidad, si no se quiere sacrificar los peces (por ejemplo, para especies amenazadas o poblaciones con interés de conservación), es extraer los contenidos estomacales por medios mecánicos (succión con peras peristálticas o similares), o con sustancias eméticas (Hyslop 1980). Estos métodos pueden presentar sesgos para peces que coman presas muy grandes.

MEDIDAS DESCRIPTORAS DE LA DIETA

De los contenidos digestivos, se puede medir la presencia/ausencia de diferentes categorías alimentarias, lo que permite calcular la frecuencia o porcentaje de ocurrencia, es decir, el porcentaje de depredadores que consumían un cierto tipo de presa. Alternativamente, se puede contar el número de presas de las distintas categorías tróficas presentes en el contenido digestivo, lo que proporciona una medida más cuantitativa. También se puede medir el peso o el volumen de las diferentes presas, ya sea directamente (con balanzas, probetas, etc.) o preferiblemente midiendo el tamaño y convirtiéndolo posteriormente en peso mediante regresiones peso-longitud previamente establecidas. Esto debe hacerse preferiblemente para las especies en el área de estudio; para peces muy pequeños (por ejemplo, larvas o poecílicos) también puede medirse el volumen con una cámara de las que se usan para contar glóbulos sanguíneos. Finalmente, se puede estimar visualmente el volumen de las diferentes categorías alimentarias. Estas medidas subjetivas suponen menos esfuerzo, pero pueden introducir errores que deberían evaluarse y dificultan la comparación entre autores.

Las distintas medidas proporcionan visiones diferentes de las dietas, y tienen distintas ventajas. El número da más importancia a presas pequeñas pero abundantes, y aunque refleja el esfuerzo en la selección de alimento, no es aplicable a ca-

tegorías no contables (por ejemplo, detritus, macroalgas, plantas, restos de vegetales, etc.). El peso, volumen o similar da más importancia a las presas mayores (a menudo poco abundantes), refleja mejor el aporte energético de las distintas presas y permite medir las categorías no contables. Recomendamos medir siempre el número, y una medida de peso o volumen (directa o preferiblemente por conversión de una medida de tamaño); las medidas de ocurrencia vienen implícitas con las medidas de número y peso.

Conviene determinar el número y, además, el peso o volumen de cada tipo de presa ingerida

MATERIAL

- Tijeras.
- Bisturí.
- Agujas enmangadas.
- Pinzas.
- Placas de Petri.
- Lupa binocular con micrómetro.
- Papel de filtro para secar las presas antes de pesar.
- Balanza de precisión.

PROCEDIMIENTO

Para los peces con estómago diferenciado (por ejemplo, centrárquidos o salmónidos) se debe analizar sólo el contenido estomacal. Para peces sin estómago diferenciado (como ciprínidos), algunos autores sólo examinan el contenido de la parte anterior del tubo digestivo, por ejemplo, el primer tercio o la primera mitad, pero no está claro que este método sea el mejor. Aunque la parte anterior del tubo digestivo contiene el contenido menos digerido y la parte posterior debería tener mayor proporción de categorías de difícil digestión, Schoener (1989) no detectó estos efectos en una revisión para reptiles, sugiriendo en cambio que considerar todo el tubo digestivo aumenta el tamaño muestral y, por tanto, la precisión para las presas mayores (menos frecuentes).

Para especies con estómago diferenciado, cabe analizar sólo el contenido estomacal

Los tubos digestivos conservados en alcohol se abren y se separa su contenido, que se examina en una placa de Petri mediante una lupa binocular. En el caso de peces con estómago diferenciado, que suelen consumir presas grandes, se puede analizar todo el contenido estomacal; en el caso de peces detritívoros, planctívoros u omnívoros grandes, a menudo se puede analizar en detalle sólo una submuestra (aproximadamente 10-25%) del contenido, después de examinarlo todo para detectar todas las especies presa posibles, así como contar y medir las presas grandes, que son poco frecuentes. Inicialmente se examina todo el contenido para intentar identificar todos los grupos taxonómicos presentes con la mayor precisión posible.

DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DE LA DIETA

Para describir la dieta se suele usar:

- a) El porcentaje de ocurrencia, o porcentaje de tubos digestivos que presentaban una cierta categoría alimentaria.
- b) El porcentaje en número, o porcentaje de individuos de una cierta especie presa respecto al total de individuos en el conjunto de tubos digestivos. Este descriptor sólo considera las categorías contables (es decir, no se calcula para detritus, trozos de plantas, etc.).
- c) El porcentaje en biomasa o biovolumen es la medida equivalente a la anterior, pero para la biomasa o biovolumen.

El porcentaje medio de biomasa de una categoría alimentaria, a diferencia de los dos anteriores, separa los datos por individuo depredador o tubo digestivo, y es el porcentaje de cada especie presa en cada tubo digestivo, promediado para todos los individuos depredadores. Más que para una descripción general de la dieta, este descriptor se usa para comparar distintos grupos (por ejemplo, de tamaño o de lugar de captura de los depredadores), en los que es necesario juntar las especies presa en categorías alimentarias más generales (por ejemplo, zooplankton, peces, etc.). A diferencia de los dos anteriores, el porcentaje medio de biomasa reduce la importancia de tubos con un contenido distinto de la mayoría, pero da igual importancia a tubos digestivos llenos y más vacíos, por lo que sobrevalora las presas más presentes en tubos con menos contenido.

A veces, los tres primeros descriptores se combinan en los llamados *índices de importancia relativa* (IRI), como el de Pinkas et al. (1971) o el de George y Hadley (1979). Estos índices han sido criticados por su redundancia y arbitrariedad. Mucho más interesante es estudiar la relación entre descriptores, como con el método de Costello (1990).

A parte de los descriptores básicos de dieta, de los datos se puede extraer información útil para la ecología de comunidades, tales como:

1. Estima de índices de diversidad, que en el contexto de alimentación se llaman índices de amplitud de nicho o dieta.
2. Las útiles técnicas de ordenación, como el análisis de correspondencias.
3. Índices de solapamiento de nicho, que de hecho son índices de similitud, entre los cuales el más utilizado es el de Schoener.
4. Índices de electividad, que comparan el alimento consumido con el disponible (requieren datos de disponibilidad de bentos o plancton).

A partir de los contenidos digestivos se conoce la dieta del individuo, y se puede derivar información ecológica muy útil

Técnica 48c. Análisis de la dieta de mamíferos

Existen distintas técnicas para estudiar la dieta de los mamíferos: 1) a través de la observación directa de animales mientras se alimentan, 2) mediante el estudio de alimentos parcialmente comidos, 3) del contenido del aparato digestivo, o 4) de las heces (Jordan 2005). Detallaremos el procedimiento para el análisis de contenidos estomacales, ya que este método es el que proporciona la información más precisa.

En algunas especies de mamíferos se puede analizar la dieta por observación directa

MATERIAL

- Bisturí.
- Pinzas.
- Placas de Petri.
- Etanol.
- Tamiz de 250 μm de poro.
- Lupa estereoscópica.

PROCEDIMIENTO

A pesar de haber técnicas para inducir la regurgitación del alimento en animales vivos, en pocas especies de mamíferos es posible obtener de esta forma contenidos gástricos que permitan estudiar su dieta. La técnica más utilizada es el análisis del contenido del aparato digestivo recogido *post mortem*, siendo el contenido del estómago el más utilizado. Es obvio que estos estudios sólo pueden realizarse en especies cuyas poblaciones puedan soportar la extracción de ejemplares sin poner en peligro su supervivencia. Detallamos aquí el procedimiento seguido en el estudio de la dieta de los musgaños (género *Neomys*) (Castián 1995), un pequeño mamífero insectívoro semiacuático. Una vez que se han extraído los estómagos, se almacenan en etanol al 60% hasta realizar el análisis. El contenido estomacal se extrae y se lava con agua en un tamiz de 250 μm de poro. Posteriormente, se deposita en una placa de Petri y se procede a su examen.

La identificación se realiza con la ayuda de una lupa estereoscópica comparando los fragmentos de las presas con material de colección. Los musgaños se alimentan de invertebrados (insectos, arácnidos, miriápodos, crustáceos, gasterópodos, oligoquetos). El número de individuos de cada taxón-presa por estómago se estima como el mínimo coherente con el número de cuerpos completos y/o partes encontradas.

El número de presas ingeridas se estima como el mínimo coherente con los fragmentos encontrados

TRATAMIENTO DE LOS DATOS

A partir de la información obtenida se puede construir la matriz trófica que expresa la importancia de cada presa en la dieta (cuadro 19.1). Otra posibilidad es

Cuadro 19.1:
Ejemplo de matriz trófica
para el musgano patiblanco,
Neomys fodiens

Taxón-presa		N	%N	%P	D
Oligochaeta		12	4,03	22,45	0,77
Gastropoda		11	3,69	20,41	0,34
Crustacea	Isopoda	1	0,33	2,04	0,008
	Amphipoda	9	3,02	18,37	0,46
Myriapoda	Chilopoda	14	4,70	28,57	0,63
	Diplopoda	28	9,39	46,94	2,86
Arachnida	Araneae	10	3,35	20,41	0,33
	Opilioneida	27	9,06	48,98	2,28
	Pseudoscorpionida	2	0,67	4,08	0,15
	Acarina	6	2,01	8,16	0,30
Insecta	Coleoptera adulto	26	8,72	32,65	1,23
	Coleoptera larva	6	2,01	12,24	0,41
	Diptera adulto	10	3,35	16,33	0,31
	Diptera larva	45	15,10	34,69	1,54
	Hemiptera	17	5,70	24,49	0,92
	Orthoptera	1	0,33	2,04	0,01
	Hymenoptera	2	0,67	4,08	0,03
	Ephemeroptera larva	13	4,36	22,45	0,34
	Plecoptera larva	29	9,73	30,61	1,30
	Trichoptera larva	27	9,06	30,61	2,16
Materia vegetal		2	0,67	4,08	0,15

N: frecuencia absoluta; %N: frecuencia relativa; %P: porcentaje de estómagos con un determinado tipo de alimento; D: índice de Simpson.

Fuente: Tomado de Castián (1995).

realizar un estudio de la variación estacional de la dieta, para lo cual es necesario contar con un número suficiente de ejemplares capturados en distintas épocas del año.

Técnica 49. Ecología estequiométrica. Análisis elemental

Las relaciones C:N y C:P
proveen información
sobre las conexiones
tróficas en el ecosistema

La cantidad de N y P en los alimentos, expresada normalmente como relación molar de átomos C:N y C:P, puede determinar la capacidad de la comunidad bentónica fluvial para absorber uno u otro nutriente del medio. La determinación de la estequiometría de la comunidad (contenido de C, N y P) permite relacionar posibles desequilibrios entre estos elementos en los diferentes compartimentos (cuadro 19.2) y los procesos que tienen lugar en el ecosistema, como por ejemplo, la utilización y el reciclaje de la materia orgánica (Frost et al. 2002). Las proporciones de C, N y P pueden indicar la ruta metabólica que la comunidad necesita utilizar para obtener estos elementos. Al mismo tiempo, si la composición de los recursos difiere mucho de la relación estequiométrica característica de la comunidad, la tasa de descomposición del material puede cambiar, y la calidad del alimento puede limitar el crecimiento de los consumidores. La composición elemental de la comunidad bentónica microbiana depende, también, de la pro-

	Fuirosos			Cross et al. (2003)					
	Biofilm	MOPF	Invertebrados	Trituradores	Ramoneadores	Depredadores	MOPG	MOPF	Biofilm
%C	7,95	36,63	22,48						
%N	1,06	3,41	3,63						
%P	0,11	0,62	0,25						
C:N	8,84	13,83	8,03	6,7	6,2	5,1	73	34	6,1
C:P	222,00	151,84	289,57	498	369	223	4858	1015	324
N:P	21,33	12,1	32,25	73	59	43	67	28	52

Nota: Valores medios en febrero de 2004. Se muestran también las relaciones molares para diferentes estrategias tróficas y recursos en un río con abundancia de detritus (Cross et al. 2003).

Cuadro 19.2:

Porcentaje de C, N y P y sus correspondientes relaciones molares en el arroyo de Fuirosos (Cataluña, NE de España)

porción de los distintos grupos (bacterias, hongos, algas), por lo que informa sobre la composición de la misma (Makino et al. 2003).

MATERIAL

- Estufa
- Mortero de porcelana, o triturador que no contamine la muestra (por ejemplo, de ágata).
- Cápsulas de aluminio para análisis de C/N.
- Filtros Whatman GF/F de 25 mm de diámetro.
- Equipo de filtración.
- Balanza de precisión (microgramos).
- Analizador elemental de carbono y nitrógeno.
- Autoclave.
- Reactivos para la digestión de P (reactivo de oxidación):
 - a. Solución de NaOH 0,375 M: 15 g de NaOH en 1 L de agua desionizada (se puede almacenar durante meses en la nevera en una botella de polietileno).
 - b. Reactivo de oxidación: disolver 5 g de peroxidisulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) y después 3 g de ácido bórico (H_3BO_3) en 100 mL de la solución de NaOH anterior. No invertir el orden de los reactivos en esta preparación.

PROCEDIMIENTO

1. *Recogida de muestras.* Hay que tomar muestras de los principales compartimentos de la red trófica: peces, macroinvertebrados, biofilm, hojarasca, macrófitos, y material particulado fino bentónico y en suspensión en el agua. En el caso que un determinado compartimento sea muy poco abundante en un río, no debe tenerse en cuenta. Recoger como mínimo tres réplicas por cada compartimento y tramo de estudio. Transportar las muestras en nevera hasta el

Recoger muestras de los principales compartimentos de la red trófica

laboratorio para su extracción. Si no es posible realizar el protocolo directamente, se pueden congelar las muestras, pero es preferible realizar la extracción con las muestras frescas, o, en todo caso, guardar los extractos congelados.

2. *Extracción de la muestra.* Para cada compartimento el protocolo es distinto.
 - a) *Peces.* Si los individuos son pequeños, retirar el tubo digestivo y guardar los animales enteros. Si son de suficiente tamaño, cortar y obtener una submuestra de tejido muscular. Si hay distintas especies, considerarlas por separado.
 - b) *Macroinvertebrados.* Recoger tantos individuos como biomasa se necesite para analizar las especies o grupos tróficos por separado. Los individuos se recogen directamente en el campo, o si se trata de muestras de sedimento, se separan en el laboratorio mediante la lupa. Los organismos deben estar limpios y vivos. Dejarlos entre 8 y 12 horas, en función del tamaño, en agua del río y manteniendo su temperatura, para vaciar el contenido estomacal. En especies de tasa de excreción alta como los gasterópodos, ir limpiando los excrementos con una pipeta Pasteur para evitar que sean de nuevo ingeridos.
 - c) *Biofilm.* Distinguir entre material sobre arenas o gravas, sobre piedras, o sobre macrófitas. Para obtener el biofilm de la arena, añadir un volumen conocido de agua Milli-Q (unos 2-10 mL), sonicar la muestra en un baño de ultrasonidos (5 minutos), recuperar el líquido y repetir la operación (añadir un volumen conocido sobre la arena y sonicar). Juntar los extractos obtenidos en cada sonicación para obtener un solo extracto por muestra. Para biofilms epilíticos, además de sonicar se recomienda raspar la superficie de la piedra con un cepillo de dientes. Para el biofilm epifítico (sobre macrófitas), tomar una submuestra del extracto después de sonicar la muestra.
 - d) *Hojarasca, macrófitas.* Separar una fracción de las hojas acumuladas en el lecho del río y de macrófitas frescas y acumuladas en el lecho. Considerar separadamente cada especie. En las zonas de acumulación de materia orgánica, se puede separar el material fino y grueso y analizarlo separadamente.
 - e) *Material particulado del agua.* Filtrar un volumen conocido de agua en filtros Whatman GF/F previamente calcinados (4 horas a 450 °C) y pesados.
3. *Preparación y análisis del C/N.* Dejar secar los extractos a 60 °C en la estufa hasta peso constante (2-3 días) y triturarlos, si es necesario, con un mortero o molinete para obtener una muestra homogénea (partículas de diámetro no superior a 0,1 mm). Pesar el material seco en polvo en una microbalanza de alta precisión y, antes de empaquetar en cápsulas de estaño, añadir una pequeña cantidad (la punta de una espátula pequeña) de pentóxido de vanadio como catalizador. Para los extractos líquidos como los provenientes de las muestras del biofilm, verter 1 mL del extracto concentrado directamente en las cápsulas de estaño previamente pesadas, secar y volver a pesar. Para los filtros del particulado, pesar el filtro seco y envolverlo en la cápsula de estaño. Añadir también el catalizador. Las cápsulas se guardan en seco en una gradilla hasta su análisis en un analizador de carbono y nitrógeno mediante combustión. La

Las muestras de animales para el análisis elemental no deben incluir el contenido de su tracto digestivo

cantidad de material necesario para el análisis está en función del compartimento analizado, ya que la cantidad de C y N es diferente en material vegetal que en animal. En general, es suficiente con 1 mg para material vegetal. Las cápsulas de estaño suelen tener una capacidad máxima de 1,5 mg. Para el análisis de material particulado del agua acumulado en los filtros se suelen usar unas cápsulas diferentes. No hay que olvidar las características y especificaciones del analizador a utilizar.

4. *Preparación y análisis de P.* Obtener un peso conocido de muestra (de 2 a 20 mg de peso seco, en función del contenido de fósforo) y colocarlo en un tubo de teflón. Añadir 20 mL de agua Milli-Q y 2 mL de reactivo de oxidación. Digerir en autoclave (90 minutos a 110 °C). Analizar el contenido de P con el método descrito para el fósforo reactivo soluble en el agua (técnica 12a).

Técnica 50. Análisis de la red trófica mediante isótopos estables de C y N

La composición isotópica del C de una muestra se expresa como las partes por mil (‰) de la relación isotópica en unidades delta (δ), respecto a un material estándar (roca carbonatada PeeDee belemnita, PDB):

$$\delta^{13}\text{C} = \left[\left(\frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{muestra}}}{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{estándar}}} \right) - 1 \right] 1000 \quad (19.1)$$

Las muestras más ricas en ^{13}C son más *pesadas* y tienen $\delta^{13}\text{C}$ mayores o menos negativos. Por el contrario, las muestras más empobrecidas en ^{13}C son más *ligeras* y tienen $\delta^{13}\text{C}$ más bajos o más negativos. La relación isotópica del C cambia poco a través de la red trófica (entre 0,3-0,5‰), lo que la convierte en un buen indicador de la fuente de alimento.

La relación isotópica del N ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ relativo al N atmosférico o $\delta^{15}\text{N}$) se ha utilizado para estimar la posición trófica, ya que la $\delta^{15}\text{N}$ de un consumidor es más alta que la de su dieta, y la magnitud de la diferencia es similar entre organismos. La diferencia se expresa como enriquecimiento (Δ) y se calcula:

$$\Delta = \delta^{15}\text{N}_{\text{consumidor}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{dieta}} \quad (19.2)$$

Este enriquecimiento oscila entre el 1 y 5‰ (media de 3,4‰) para cada salto de nivel trófico.

En los ríos, los consumidores tienen una dieta mixta, lo que dificulta la separación de la señal isotópica y la interpretación de la transferencia de materia orgánica.

Los depredadores tienen un contenido en ^{15}N mayor que sus presas

nica a través de la red. Estas limitaciones pueden solventarse con la información de los contenidos estomacales.

Para evaluar la contribución relativa de cada recurso en la dieta del consumidor existen modelos de cálculo (Phillips y Gregg 2003), aunque no siempre es fácil su interpretación.

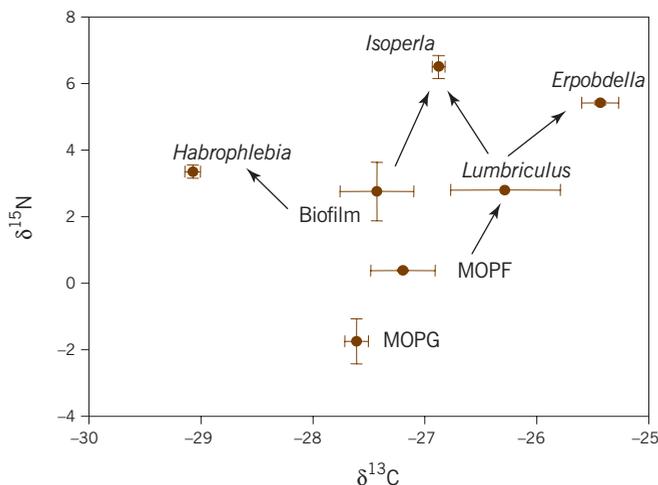
MATERIAL

- Estufa o liofilizador.
- Mortero de porcelana.
- Cápsulas de aluminio.
- Filtros Whatman GF/F de 25 mm de diámetro.
- Equipo de filtración.
- Balanza de microprecisión (microgramos).
- Espectrómetro de masas acoplado al analizador elemental de carbono y nitrógeno.

PROCEDIMIENTO

1. *Recogida de muestras en el campo.* Para considerar los distintos compartimentos de la red trófica, tomar muestras de peces, macroinvertebrados, biofilm, hojarasca, macrófitos, material particulado fino bentónico y en suspensión del agua.
2. *Extracción de la muestra.* Para cada compartimento el protocolo de extracción es distinto.
 - a) *Peces.* Si los individuos son pequeños, extraer el tubo digestivo y guardar los animales enteros. Si son de suficiente tamaño, cortar y obtener una submuestra de tejido muscular. Si hay distintas especies, considerarlas por separado.
 - b) *Macroinvertebrados.* Mantenerlos vivos en agua del río y a una temperatura similar a la del río entre 8 y 12 horas para vaciar el contenido estomacal. En especies de tasa de excreción alta (como los gasterópodos), se debe ir limpiando los excrementos con una pipeta Pasteur, para evitar que los ingieran. Una vez los tubos digestivos estén limpios, los crustáceos, gasterópodos o bivalvos se deben medir sin la concha, ya que el carbonato tiene un valor de $\delta^{13}\text{C}$ enriquecido respecto al tejido blando. Tener especial cuidado en separar, siempre que sea posible, los macroinvertebrados a nivel de especie, ya que especies similares pueden tener diferentes dietas. Separar también los individuos de diferente tamaño para estimar el cambio de la dieta con la edad. La posibilidad de conocer la variabilidad entre individuos, de analizar varias réplicas para cada especie o separar tamaños, está en función del material disponible y el coste del aná-

Los invertebrados deben mantenerse vivos y en ayunas hasta que vacíen el contenido de su tubo digestivo

**Figura 19.2:**

Representación de los datos de la señal isotópica $\delta^{13}\text{C}$ frente a la $\delta^{15}\text{N}$ en el arroyo Fuirosos

Nota: Las flechas indican hipotéticas transferencias tróficas basadas en el fraccionamiento para cada nivel trófico del C y N.

Fuente: I. Muñoz, datos no publicados.

lisis. Tener en cuenta también que el análisis de un grupo de individuos da una mejor estima del valor medio de la señal isotópica de una población que un análisis limitado a un individuo.

- c) *Biofilm*. Extraer el biofilm según la técnica del análisis estequiométrico.
 - d) *Hojarasca, macrófitos*. Tomar muestras de hojarasca acumulada en el lecho del río y de macrófitas frescas y acumuladas en el lecho.
 - e) *Material particulado del agua*. Filtrar un volumen conocido de agua en filtros Whatman GF/F previamente calcinados (4 horas a 450 °C) y pesados.
3. *Preparación de las muestras*. Secar las muestras a 60 °C en la estufa o en liofilizador y triturar con un mortero o molinete cuando sea necesario, a fin de obtener una muestra homogénea (partículas de diámetro 0,1 mm).

Las muestras secas pueden mantenerse indefinidamente en un desecador antes de su análisis. También se pueden congelar antes de secar. No preservar las muestras con formol o alcohol, ya que altera la señal isotópica tanto del C como del N. Pesar el material seco en polvo en una microbalanza de alta precisión y empaquetar en cápsulas de estaño. Para los filtros, pesar el filtro seco para conocer el peso de muestra y envolverlo en la cápsula de estaño. Los filtros deben ser de pequeño tamaño (25 mm), en muchos casos incluso es necesario cortarlos. Guardar las cápsulas en seco en una gradilla hasta su análisis. La cantidad mínima analizable está en función del contenido de nitrógeno de la muestra y de los patrones que se utilicen, el peso mínimo suele ser de 300 µg. Es conveniente hacer pruebas de análisis previas para determinar el peso mínimo necesario. Los isótopos ^{13}C y ^{15}N se analizan con un espectrómetro de masas que complementa el analizador

Las muestras se miden mediante espectrometría de masas

elemental de carbono y nitrógeno mediante combustión, de forma que ambos resultados se obtienen a la vez. Se utilizan diferentes estándares para calibrar la señal isotópica: sacarosa, polietileno y grafito para el C; sulfato de amonio y nitrato de potasio para el N. Los estándares se analizan varias veces para garantizar la linealidad. Los resultados se referencian a la composición isotópica del N atmosférico para el N y de la roca carbonatada PeeDee belemnita (PDB) para el C.

Los resultados se representan en una figura con las señales isotópicas para el ¹³C y ¹⁵N (fig. 19.2).

Técnica 51. Caracterización de la estructura trófica

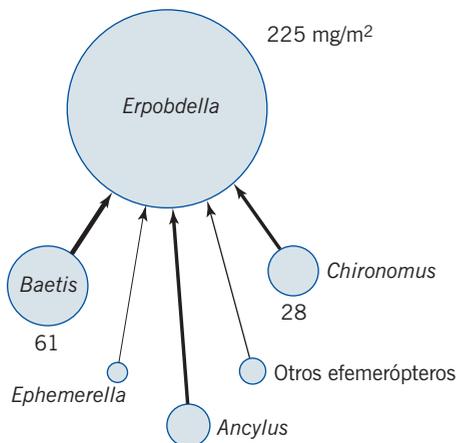
A partir de los datos de contenidos estomacales se puede determinar la estructura trófica del ecosistema y las interacciones entre consumidores y presas

La estructura de la red trófica se puede caracterizar simplemente por las conexiones tróficas entre las especies. Expresándola como flujo de energía en gramos de peso seco o de C, o como consumo de individuos, se puede caracterizar la fuerza de las interacciones entre los consumidores y sus presas (fig. 19.3). La técnica del análisis de los contenidos estomacales puede utilizarse para ambos propósitos (Tavares-Cromar y Williams 1996, Hall et al. 2000).

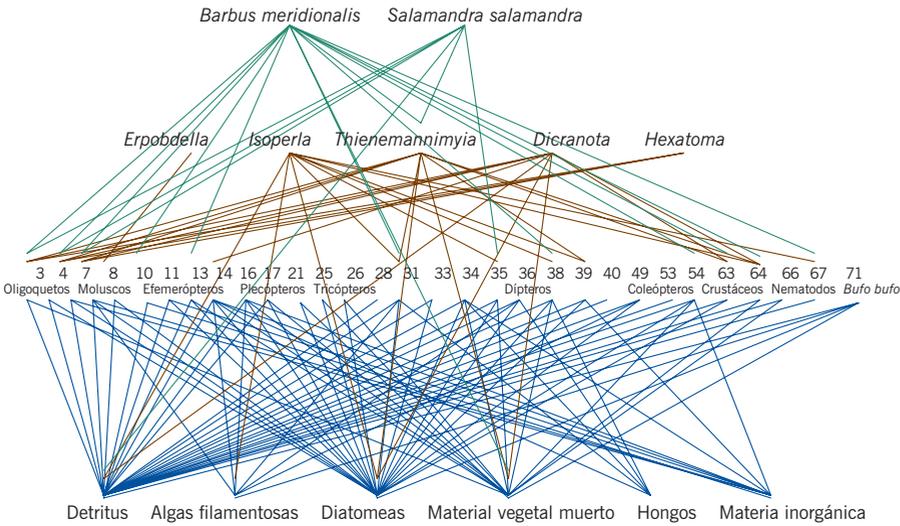
PROCEDIMIENTO

Para construir una red trófica completa hay que estudiar los contenidos estomacales de todas las especies presentes en el tramo de estudio. Para ello es neces-

Figura 19.3:
Flujo de materia orgánica en las relaciones tróficas entre el depredador *Erpobdella* y sus presas en el verano de 2002, en el arroyo de Fuirosos



Nota: Las unidades son mg peso seco/m². El tamaño de los círculos indica la biomasa presente en el tramo de estudio, el grosor de las flechas la proporción de cada presa presente en el contenido estomacal.
Fuente: I. Muñoz, datos no publicados.



Fuente: Guerra (2003).

Figura 19.4:
Estructura de la red trófica en el arroyo Fuerosos durante la primavera de 2002

rio efectuar muestreos adicionales para incluir las especies poco abundantes. Las dietas cambian con la edad y en el tiempo (Thompson y Townsend 1999, Woodward et al. 2005, Basaguren et al. 2003, Omella 2003), por lo que es aconsejable analizar individuos de diferentes estadios y hacer muestreos, al menos dos veces al año, en función de la variabilidad temporal de la comunidad de macroinvertebrados en el tramo estudiado. Para construir un flujo de energía entre niveles tróficos es también importante conocer la disponibilidad de recursos, principalmente, la cantidad de algas, de materia orgánica bentónica gruesa y fina y de materia orgánica en suspensión.

Para construir una red trófica completa hay que estudiar el contenido estomacal de todos los estadios de todas las especies

1. A partir del análisis de los contenidos estomacales construir la red trófica enlazando cada consumidor con sus presas (fig. 19.4).
2. También se puede representar en forma de matriz de doble entrada, donde cada interacción se señala con un 1 (o con signo +) (cuadro 19.3).
3. A partir de los resultados se pueden calcular diversos parámetros (Morin, 1999) que caracterizan la estructura de la red trófica y su estabilidad (cuadro 19.4). Dichos parámetros son:
 - *Conexiones reales (L)*: número de líneas de interacción entre consumidores y consumidos.
 - *Tamaño de la red (S)*: número de especies en la red trófica.
 - *Conectancia (C)*: proporción de conexiones realizadas en nuestra red respecto las conexiones totales que podrían darse $\{C = 2L/[S(S - 1)]\}$.
 - *Densidad de conexiones (L/S)*: número de conexiones por elementos de la red.
 - *Complejidad de conexiones (C.S)*: tamaño de la red trófica por conectancia.

Cuadro 19.3:
Matriz de interacciones
tróficas

	Sp ₁	Sp ₂	Sp ₃	Sp ₄	Sp ₅	Sp ₆	Sp ₇	...	Sp _n
Sp ₁		+	+	-	-	+	+		-
Sp ₂			-	+	+	+	-		-
Sp ₃				-	-	-	+		-
Sp ₄					-	-	-		+
Sp ₅						+	+		+
Sp ₆							-		-
Sp ₇									-
...									
Sp _n									

- *Número de especies superiores*: especies que no son depredadas por otras.
- *Número de especies intermedias*: especies que representan tanto depredadores como presas.
- *Número de especies basales*: especies que son depredadas por otras, pero no depredan sobre ninguna.
- *Longitud de la cadena máxima*: número de conexiones que hay en la cadena trófica más larga, desde las especies superiores (máximos depredadores) hasta los elementos basales (Pimm 1982).
- *Longitud media de las cadenas de la red trófica*: longitud media de todas las cadenas descritas en la red.
- *Número de omnívoros*: el de organismos que se alimentan de más de un nivel trófico.
- *Relación depredador-presa (D/P)*: número de especies depredadoras entre el número de especies presas. Según Jeffries y Lawton (1985), *depredador* es un taxón que consume otro. *Presas* son aquellos individuos detritívoros, herbívoros o fungívoros. Las presas no pueden ser a su vez depredadores.

Cuadro 19.4:
Cálculo de los parámetros
de la red trófica del arroyo
Fuirosos, en la primavera
(véase figura 19.4)

Parámetro	
<i>L</i>	137,000
<i>S</i>	44,000
<i>C</i>	0,145
<i>L / S</i>	3,110
<i>C · S</i>	6,380
Longitud media de las cadenas	1,920
Número de especies superiores	22,000
Número de especies intermedias	16,000
Número de especies basales	6,000
Número de omnívoros	5,000
<i>D/P</i>	0,230

4. Para cuantificar los flujos de energía hay que conocer la biomasa de cada presa y consumidor en el tramo de estudio. Además es necesario cuantificar la cantidad o proporción de cada presa en la dieta, o una tasa de ingestión. También pueden utilizarse valores de la producción secundaria de una especie. Como todos estos cálculos son largos y complejos, se aconseja que estos estudios se realicen solamente en cadenas tróficas concretas que abarquen unos pocos depredadores y sus presas.

Una vez conocidas las conexiones se pueden cuantificar los flujos de energía

19.2. Bibliografía

- BASAGUREN A., RIAÑO P., y POZO J. «Life history patterns and dietary changes of several caddisfly (*Trichoptera*) species in a Northern Spain stream». *Archiv für Hydrobiologie* 155 (2002): 23-41.
- BOWEN S.H. «Quantitative description of the diet». En L.A. Nielsen y D.L. Johnson, eds. *Fisheries techniques*. Bethesda: American Fisheries Society, 1983: 513-532.
- CASTIÉN E. «The diet of *Neomys fodiens* in the Spanish western Pyrenees». *Folia Zoologica* 44 (1995): 297-303.
- COHEN J.E. *Food webs and niche space*. Nueva Jersey: Princeton University Press, 1978.
- COSTELLO M.J. «Predator feeding strategy and prey importance: A new graphical analysis». *Journal of Fish Biology* 36 (1990): 261-263.
- CROSS W.F., BENSTEAD J.P., ROSEMOND A.D., y WALLACE J.B. «Consumer-resource stoichiometry in detritus based streams». *Ecology Letters* 6 (2003): 721-732.
- CUMMINS K.W. «Trophic relations of aquatic insects». *Annual Review of Entomology* 18 (1973): 183-206.
- ELSER J.J., DOBBERFUHL D.R., MACKEY N.A., y SCHAMPEL J.H. «Organism size, life history, and N:P stoichiometry». *BioScience* 46 (1996): 674-684.
- ELSER J.J., y HESSEN D.O. «Biosimplicity via stoichiometry: The evolution of food-web structure and processes». En A. Belgrano, U.M. Scharler, J. Dunne, y R.E. Ulanowicz, eds. *Aquatic food webs: An ecosystem approach*. Nueva York: Oxford University Press, 2005: 7-18.
- FROST P.C., STELZER R.S., LAMBERTI G.A., y ELSER J.J. «Ecological stoichiometry of trophic interactions in the benthos: Understanding the role of C:N: P ratios in lentic and lotic habitats». *Journal of the North American Benthological Society* 21 (2002): 515-528.
- FRY B. *Stable isotope ecology*. Nueva York: Springer, 2006.
- GARCIA-BERTHOU E. «Food of introduced mosquitofish: Ontogenetic diet shift and prey selection». *Journal of Fish Biology* 55 (1999): 135-147.
- GARCIA-BERTHOU E. «Ontogenetic diet shifts and interrupted piscivory in introduced largemouth bass (*Micropterus salmoides*)». *International Review of Hydrobiology* 87 (2002): 353-363.
- GEORGE E.L., y HADLEY W.F. «Food and habitat partitioning between rock bass (*Ambloplites rupestris*) and smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*) young of the year». *Transactions of the American Fisheries Society* 108 (1979): 253-261.
- GUERRA E. *Estructura de la comunidad de macroinvertebrados en un río mediterráneo (Fuïrosos): Redes tróficas y efecto de la fertilización*. Barcelona: Universidad de Barcelona, 2003.
- HALL R.O., WALLACE J.B., y EGGERT S.L. «Organic matter flow in stream food webs with reduced detrital resource base». *Ecology Letters* 81 (2000): 3445-3463.

- HYNES H.B.N. «The food of fresh-water sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* and *Pygosteus pungitius*), with a review of methods used in studies of the food of fishes». *Journal of Animal Ecology* 19 (1950): 36-58.
- HYSLOP E.J. «Stomach contents analysis—a review of methods and their application». *Journal of Fish Biology* 17 (1980): 411-429.
- JEFFRIES M.J., y LAWTON J.H. «Predator-prey ratios in communities of freshwater invertebrates: The role of enemy free space». *Freshwater Biology* 15 (1985): 105-112.
- JORDAN M.J.R. «Dietary analysis for mammals and birds: A review of field techniques and animal-management applications». *International Zoo Yearbook* 39 (2005): 108-116.
- LAJTHA K., y MICHENER R.H., eds. *Stable isotopes in ecology and environmental science. Methods in ecology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994.
- MAKINO W., COTNER J.B., STERNER R.W., y ELSEY J.J. «Are bacteria more like plants or animals? Growth rate and resource dependence of bacterial C:N:P stoichiometry». *Functional Ecology* 17 (2003): 121-130.
- MERRITT R.W., y CUMMINS K.W. eds. *An introduction of the aquatic insects of North America*. Dubuque: Kendall/Hunt, 1996.
- MONTOYA J.M., PIMM S.L., y SOLÉ R.V. «Ecological networks and their fragility». *Nature* 442 (2006): 259-264.
- MORIN P.J. *Community ecology*. Malden: Blackwell Science, 1999.
- OMELLA M. *Efecte de l'estiatge en l'estructura tròfica de la comunitat de macroinvertebrats en un riu mediterrani (Furió)*. Barcelona: Universidad de Barcelona, 2003.
- PHILLIPS D.L., y GREGG J.E. «Source partitioning using stable isotopes: Coping with too many sources». *Ecosystems* 136 (2003): 261-269.
- PILLAY T.V.R. «A critique of the methods of study of food of fishes». *Journal of the Zoological Society of India* 4 (1995): 185-200.
- PIMM S.L. *Food webs*. Londres: Chapman and Hall, 1982.
- PINKAS L., OLIPHANT M.S., e IVERSON I.L.K. *Food habits of albacore bluefin tuna and bonito in California waters*. Department of Fisheries and Game. Fish Bulletin, 1971.
- SCHOENER T.W. «Should hindgut contents be included in lizard dietary compilations?». *Journal of Herpetology* 23 (1989): 455-458.
- STERNER R.W., y ELSEY J.J. *Ecological stoichiometry*. Nueva Jersey: Princeton University Press, 2002.
- TAVARES-CROMAR A.F., y WILLIAMS D.D. «The importance of temporal resolution in food web analysis: Evidence from a detritus based stream». *Ecological Monographs* 66 (1996): 91-113.
- THOMPSON R.M., y TOWNSEND C.R. «The effect of seasonal variation on the community structure and food-webs attributes of two streams: Implications for food-web science». *Oikos* 87 (1999): 75-88.
- WOODWARD G., THOMPSON R., TOWNSEND C.R., e HILDREW A.G. «Pattern and process in food webs: Evidence from running waters». En A. Belgrano, U.M. Scharler, J. Dunne, y R.E. Ulanowicz R.E., eds. *Aquatic food webs: An ecosystem approach*. Nueva York: Oxford University Press, 2005.

Flujo de energía en el ecosistema. Metabolismo fluvial

VICENÇ ACUÑA, HELENA GUASCH, ADONIS GIORGI Y OIHANA IZAGIRRE

20.1. Introducción

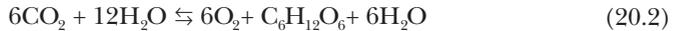
El metabolismo informa sobre los flujos de materia y energía a través de los ecosistemas, por lo que proporciona una de las visiones más integradoras de su funcionamiento (Enquist et al. 2003). El metabolismo de ecosistemas fluviales incluye la producción primaria y la respiración, y es altamente sensible a muchos factores ambientales y de estrés, tales como los cambios en la cobertura del bosque de ribera (Hill et al. 2001), la cantidad de nutrientes (Guasch et al. 1995), la contaminación orgánica (Rutherford et al. 1991), la impermeabilización del lecho fluvial (Hill et al. 1998), la presencia de metales (Niyogi et al. 2002) o los cambios en el régimen hidrológico (Young y Huryn 1997), entre otros. El metabolismo tiene significado y puede medirse de un modo preciso en cualquier tipo de ríos.

El metabolismo fluvial proporciona una visión integradora del funcionamiento del ecosistema

La *producción primaria* se define como la tasa de formación de materia orgánica a partir de carbono inorgánico vía fotosíntesis o quimiosíntesis. En ecosistemas fluviales, la producción primaria es realizada básicamente por organismos fotosintetizadores, representando así la conversión de energía solar en energía en forma de enlaces químicos. Parte de la energía fijada en la materia orgánica se pierde a través de la *respiración (R)*, otra parte queda almacenada en forma de materia orgánica y constituye la *producción primaria neta (PPN)*, mientras que el total (respirada más almacenada) es la *producción primaria bruta (PPB)*:

$$PPB = PPN + R \quad (20.1)$$

En sistemas fluviales, ambos procesos metabólicos involucran cambios en el O_2 disuelto, en la biomasa (C ganado o perdido) y en el CO_2 . La fotosíntesis oxigénica sigue de forma mayoritaria la siguiente estequiometría:



Los cambios de O_2 disuelto en el agua pueden usarse para medir fotosíntesis y, en menor medida, respiración

El estrecho vínculo entre CO_2 y O_2 , y la mayor facilidad para medir O_2 en el agua, explican que la mayor parte de estudios caractericen el metabolismo del C de forma indirecta a través de los cambios en el O_2 disuelto. Las tasas de producción de O_2 pueden usarse directamente para cuantificar la producción primaria. En contraste con esta aproximación, y debido al posible consumo de O_2 por nitrificación y por respiraciones aeróbicas y anaeróbicas, el consumo de oxígeno sólo puede considerarse una cuantificación aproximada de la respiración. Así pues, las estimaciones de respiración a partir del consumo de O_2 son sólo válidas en caso de ausencia de fuentes importantes de amonio y de zonas anóxicas en el ecosistema acuático.

El análisis de ambos procesos metabólicos es fundamental para comprender el funcionamiento de los ecosistemas. El *balance neto del ecosistema* se define como la *producción neta diaria del ecosistema (PNE)*, que se calcula como la producción primaria bruta menos la *respiración del ecosistema (RE)*, es decir, la energía disipada durante 24 horas en el ecosistema, ya sea por organismos autótrofos o heterótrofos. El cociente P/R (o PPB/RE) expresa el balance de los procesos metabólicos en términos relativos, y proporciona información sobre la importancia relativa de las dos fuentes de energía que alimentan ecosistemas fluviales, producción primaria autóctona o importaciones de materia orgánica alóctona. Así, nos referimos a tramos fluviales autótrofos cuando la P/R es superior a 1 y heterótrofos cuando la P/R es inferior a 1.

20.2. Relevancia y objeto de las distintas aproximaciones en la medida del metabolismo

20.2.1. PRINCIPIOS GENERALES

El metabolismo puede caracterizarse a distintos niveles jerárquicos, desde el individuo hasta el conjunto del planeta. En ecología fluvial, la mayor parte de estudios caracterizan el metabolismo respecto de la comunidad o del ecosistema.

Las medidas a escala de comunidad se pueden realizar con cámaras en las que se encierra una muestra de la comunidad de estudio (una piedra, una porción de arena del lecho, de hojarasca, un volumen determinado de agua con plancton) y

se miden los cambios de oxígeno disuelto que resultan de la actividad biológica durante el tiempo de incubación (habitualmente en torno a 1-2 horas). La utilización de cámaras permite caracterizar el metabolismo para los distintos sustratos presentes en la comunidad bentónica. Sin embargo, requiere medidas repetidas con el fin de incorporar la variabilidad temporal en cada sustrato y para incorporar la variabilidad entre sustratos; así que obtiene una estima del metabolismo respecto del ecosistema. La técnica de medida de metabolismo con cámaras es relativamente sencilla de usar en ríos pequeños y medianos, pero es menos adecuada en ríos de mayores dimensiones por la dificultad de cuantificar el metabolismo en la columna de agua, macrófitos, etc. Por otro lado, la respiración hiporreica suele ser elevada, lo que exige usar cámaras especiales y estimar el volumen del hiporreos.

Las medidas en cámaras de incubación permiten cuantificar el metabolismo de distintos componentes del ecosistema

Por el contrario, los métodos en cauce abierto permiten medir el metabolismo respecto del ecosistema, aunque no cuantificar la contribución de cada tipo de sustrato, ni la contribución de la comunidad hiporreica. El uso combinado de ambas técnicas (cámaras y metabolismo abierto) permite obtener valores respecto del ecosistema, así como cuantificar la contribución relativa de cada comunidad.

Las medidas abiertas son integradoras pero no permiten conocer la contribución relativa de los componentes del ecosistema

Sea a través de cámaras o en abierto, las medidas de metabolismo mediante O_2 disuelto pueden transformarse a valores de C o a energía. Para la producción primaria, se asume un *coeficiente fotosintético* (CF) de 1,2, es decir, 1,2 moles de oxígeno liberados por mol de carbono incorporado:

$$gC = gO_2 \frac{1}{CF} \frac{12}{32} \quad (20.3)$$

donde 12: peso atómico del C, y 32: peso molecular del O_2 .

La conversión a *calorías* (cal) se consigue usando el factor 11,4 cal/mg C (Platt y Irwin 1973). Para la respiración se asume un *coeficiente respiratorio* (CR) de 0,85 moles de oxígeno consumidos por mol de carbono liberado:

$$gC = gO_2 CR \frac{12}{32} \quad (20.4)$$

20.2.2. SELECCIÓN DE LA TÉCNICA ADECUADA

La selección de la técnica debe basarse en los objetivos del estudio y en las especificidades de cada técnica (cuadro 20.1). Una primera pregunta a plantearse es si interesa conocer el metabolismo respecto de la comunidad o del ecosistema. En

Cuadro 20.1:
Técnicas de medida de metabolismo en ríos, requerimientos y aplicaciones potenciales

Técnica	Requerimientos	Aplicación
Cámaras		
Recirculatorias	Utilizar réplicas para incorporar la variabilidad en cada sustrato y entre sustratos	Medidas de metabolismo en cuanto al bentos o hiporreos. Ideales para experimentos en laboratorio
Sin circulación	Utilizar réplicas para incorporar la variabilidad en cada sustrato y entre sustratos	Medidas de metabolismo respecto de hiporreos o en ríos con baja velocidad
En cauce abierto		
Una estación	Tramo homogéneo en la longitud integrada por la medida de metabolismo	Medidas de metabolismo en cuanto al ecosistema. Ideal para tramos homogéneos donde se pretende medir el metabolismo durante períodos largos
Dos estaciones	Tramo homogéneo de al menos un tercio de la longitud integrada por la medida de metabolismo	Medidas de metabolismo en cuanto al ecosistema. Ideal para realizar medidas respecto del ecosistema en ríos con tramos heterogéneos

caso de estudiar el metabolismo en cuanto a la comunidad, debemos decidir si nos interesa el bentos o la zona hiporreica. Para el bentos de río se utilizan cámaras recirculantes, mientras que para el hiporreos o el bentos de ríos muy lentos se pueden usar cámaras sin recirculación.

La selección de la técnica de medida debe basarse en los objetivos de estudio y considerar las especificidades de cada técnica

En el caso de estudiar el metabolismo respecto del ecosistema, hay que identificar tramos homogéneos en cuanto a cobertura del bosque de ribera y geomorfología, e identificar si existen afluentes o aportes significativos de aguas subterráneas. Si se pretenden obtener medidas durante varios días o meses, es aconsejable usar la técnica de una sola estación, mientras que la técnica de dos estaciones va mejor en ríos heterogéneos.

Técnica 52. Metabolismo fluvial: cámaras

MATERIAL

- 3 cámaras de incubación transparentes.
- 3 cámaras de incubación opacas.
- Sonda de oxígeno con termistor (mejor disponer de varios aparatos).

DISEÑO GENERAL

McIntire et al. (1964) introdujeron el uso de las cámaras de respiración equipadas con sistemas de recirculación del agua para medir el metabolismo de la co-

unidad bentónica en ríos sin necesidad de determinar la reaeración con la atmósfera. La sencillez de la técnica ha permitido el amplio uso de las cámaras en las últimas décadas.

El uso de cámaras exige prestar atención en determinados detalles. Así, las incubaciones largas pueden verse afectadas por limitación de nutrientes (que disminuyen durante la incubación), y por la alteración de las condiciones hidrológicas. Otra posible fuente de error son los cambios de temperatura ocasionados por las bombas de agua, aunque esto se minimiza si la incubación se efectúa directamente en el campo o se controla la temperatura mediante baños. También hay que tener en cuenta que las cámaras, generalmente, no incluyen la comunidad hiporreica, responsable en muchos casos de buena parte de la respiración del ecosistema (Naegeli y Uehlinger 1997). Las principales ventajas del método son que: a) permite la compartimentación del ecosistema, caracterizando la contribución relativa de cada sustrato al metabolismo; b) permite relacionar las tasas metabólicas específicas de cada sustrato con los organismos que en ellos habitan; y c) permiten la experimentación en condiciones de laboratorio (Acuña et al. 2008) (fig. 20.1).

El tipo de cámara a utilizar, su tamaño y forma, dependen del tipo de sustrato y del tipo de ambiente. Un aspecto primordial es cartografiar previamente el tramo para determinar cuáles son los sustratos más frecuentes y si éstos varían estacionalmente. También es conveniente caracterizar la heterogeneidad de velocidades en el tramo, ya que la producción cambia de los rápidos a los remansos. Por último, esta cartografía es necesaria para estimar la contribución de cada tipo de sustrato a la escala del tramo. La utilización de cámaras permite obtener varias medidas para cada tipo de sustrato, así como representar todos los sustratos y ambientes, si esto fuera deseable. Es conveniente asociar los valores de producción a las medidas de irradiancia en cada incubación.

Las medidas del metabolismo en cámaras deben evitar la limitación de nutrientes, por lo que deben ser cortas

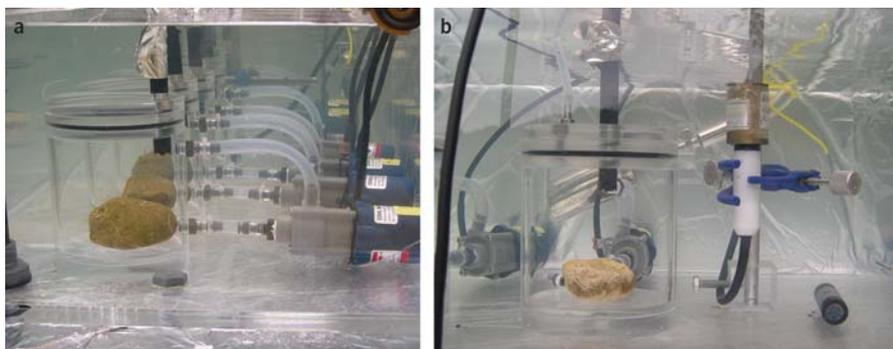


Figura 20.1:
a) Medida de metabolismo en cámaras en condiciones experimentales de manipulación de temperatura, y b) detalle de una cámara de metabolismo con sistema de recirculación de agua y control de luz ambiental

Técnica 52a. Determinación del metabolismo con cámaras recirculantes

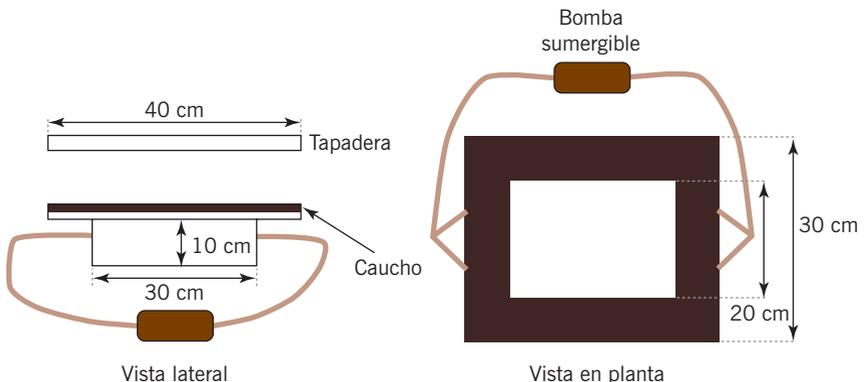
Las cámaras deben cerrarse herméticamente y sin dejar burbujas

Para obtener medidas fiables se precisa un mínimo de tres cámaras de incubación transparentes (para la producción neta), tres cámaras opacas (para la respiración) y al menos una sonda de oxígeno con sensor de temperatura. Las cámaras pueden construirse con metacrilato. Deben cerrarse herméticamente y estar provistas de un sistema de recirculación, a través de un tubo conectado a una bomba sumergible como las que se usan en los acuarios (figs. 20.2 y 20.3). De manera opcional se puede incluir una abertura para el electrodo de oxígeno, lo que permite medir la concentración de oxígeno en continuo. Si no se dispone de dicho dispositivo, se toman medidas de oxígeno al inicio y al final de la incubación, asumiendo que la concentración varía de forma lineal. Normalmente éste es el caso en incubaciones no superiores a la hora. Las cámaras opacas deben ser iguales que las transparentes, pero hechas de metacrilato opaco, o si no, deben estar cubiertas de forma que se impida la penetración de la luz. Esto debe comprobarse con el sensor de luz.

Algunas recomendaciones a tener en cuenta son:

- Realizar una prueba previa de estanqueidad: llenar y tapar la cámara sobre un papel y observar que no existan pérdidas de agua.
- Realizar una prueba de estabilidad: medir el oxígeno de una cámara llena de agua corriente, y repetir la medida al cabo de dos horas para comprobar que no entra oxígeno del exterior.
- Seleccionar sustratos cuyo volumen no exceda al 40% de la cámara, a no ser que la producción de la comunidad sea muy baja.
- Calcular el volumen de cada cámara. Después del experimento, estimar en el laboratorio el volumen de agua desplazado por el sustrato introducido en

Figura 20.2: Esquema de las cámaras de metacrilato. Las dimensiones son meramente orientativas y corresponden a las que se utilizan habitualmente para medir el metabolismo en cantos rodados



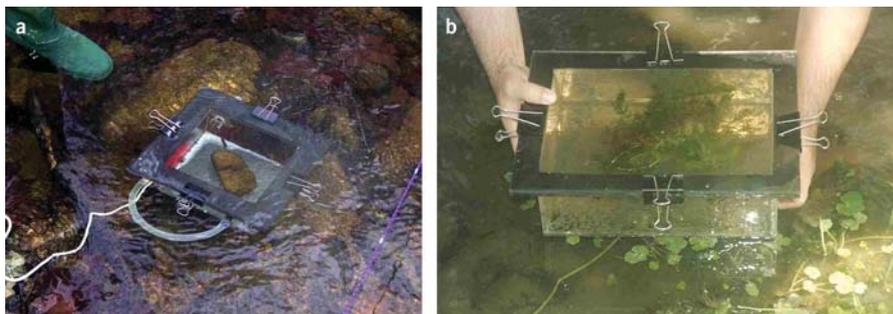


Figura 20.3:
 Cámaras con circulación
 (a) y sin circulación
 (b) de agua

cada caso y descontarlo del volumen total. Es importante numerar cada una de las cámaras con el fin de evitar confusiones.

- Realizar las incubaciones en tiempos adecuados para registrar variaciones mayores al error del instrumento de medición.
- Ajustar la velocidad a un valor cercano a la velocidad media en el tramo.

Las cámaras de incubación se sitúan en el lecho del río para mantener la misma temperatura del río. Se recomienda utilizar tres cámaras transparentes y tres cámaras opacas para poder incubar réplicas de uno de los sustratos para estimas de producción primero, y de respiración acto seguido. Los distintos sustratos pueden, entonces, incubarse secuencialmente.

Colocar en cada una de las cámaras el sustrato colonizado, teniendo cuidado de perturbarlo lo mínimo posible durante la extracción. Llenar la cámara con agua del río (evitar usar agua sobresaturada en oxígeno ya que de lo contrario se pueden producir burbujas de oxígeno) y medir la concentración inicial de oxígeno. Colocar la tapa con precaución, para evitar la formación de burbujas, y cerrar la cámara dentro del agua. Durante la incubación, deben tomarse medidas de las condiciones ambientales: temperatura del agua y luz incidente (PAR mediante un sensor de luz). Al finalizar la incubación, retirar el sustrato incubado y medir el volumen de agua. Para realizar una nueva incubación renovar el agua de la cámara.

Para sustratos rocosos, determinar la superficie incubada (cubriendo la superficie colonizada con un papel de aluminio que, posteriormente, se pesará en el laboratorio) y tomar una muestra del sustrato colonizado para su posterior análisis de clorofila. La misma metodología puede utilizarse si el sustrato es de hojarasca. Los sustratos de arena, limo o arcilla se colocan en una bandeja o caja que evite su remoción, pero debe tener perforaciones que permitan la circulación de agua. La superficie se calcula multiplicando la superficie de la bandeja por un factor que represente la superficie de las partículas en función de su granulometría (Romaní y Sabater 2001).

Para medir el metabolismo de macrófitos, elegir las especies más abundantes e incubar un fragmento. Determinar la clorofila de un fragmento y medir el peso seco de toda la planta. Es necesario obtener una relación entre el peso seco y la superficie del macrófito.

La producción neta de la comunidad se obtiene de la variación de O_2 en las cámaras transparentes, la respiración de la comunidad de la que se mide en las cámaras oscuras

La *producción neta de la comunidad (PNC)* se obtiene a partir de las variaciones de oxígeno en las cámaras transparentes (ecuaciones 20.5 y 20.6). La *respiración de la comunidad (RC)* se obtiene a partir de la variación de oxígeno en las cámaras oscuras siguiendo la misma fórmula utilizada para la *PNC*. La producción primaria bruta (*PPB*) se obtiene de sumar al valor medio de producción de oxígeno en las cámaras transparentes, el valor medio (en valores absolutos) de consumo de oxígeno en las opacas. Dado que la *RC* se ve afectada por los cambios de temperatura, se recomienda utilizar las medidas simultáneas de *PNC* y *RC* (hechas, por lo tanto, a la misma temperatura) para calcular la *PPB*. Así, el valor de producción primaria por unidad de área (en $g O_2 m^{-2} h^{-1}$) o de clorofila (en $g O_2 mg Chl^{-1} h^{-1}$) se obtiene a partir de las expresiones siguientes:

$$PNC_{\text{área}} = \frac{\Delta O_2}{\Delta t} \frac{V}{S} \quad (20.5)$$

$$PNC_{\text{clorofila}} = \frac{\Delta O_2}{\Delta t} \frac{V}{Chl} \quad (20.6)$$

La macro 20.1 permite calcular el metabolismo con cámaras

donde ΔO_2 : variación de oxígeno disuelto durante la incubación ($g O_2 m^{-3}$), Δt : duración de la incubación (h), V : volumen de agua dentro de la cámara (m^3), S : superficie de sustrato (m^2), y Chl : contenido de clorofila del sustrato incubado. Este valor puede transformarse a unidades de carbono utilizando los factores de corrección descritos antes.

Técnica 52b. Determinación del metabolismo con cámaras sin circulación

Las cámaras sin circulación se pueden utilizar en hábitats muy lentos

Las cámaras sin circulación se han utilizado en ambientes con mucha vegetación y con amplias zonas de aguas muertas que hacen imperceptible el flujo de agua (Velasco et al. 2003, Vilches y Giorgi 2008). Además de ser ambientes con escasa velocidad de agua, deben tener elevadas concentraciones de nutrientes para que no se produzca agotamiento de los mismos durante la incubación. En este caso, suele ser conveniente utilizar períodos de incubación menores debido a que la elevada producción puede acarrear sobresaturación de oxígeno. También pueden usarse en ríos lentos pero oligotróficos, donde es necesario utilizar tiempos de incubación más largos (en torno a dos horas). El procedimiento es igual que el de cámaras con circulación.

Técnica 53. Metabolismo fluvial: métodos en cauce abierto

MATERIAL

Una o dos sondas de oxígeno con termistor y con capacidad de almacenaje de datos. Para las medidas de reaireación con gases trazadores se requiere material adicional (véase Genereux y Hemond 1992).

DISEÑO GENERAL

La técnica de medida de metabolismo en cauce abierto, introducida por Odum (1956), permite estimar la producción y la respiración respecto del ecosistema, y ha estimulado multitud de estudios sobre metabolismo fluvial. El método se basa en el análisis del balance de masas del oxígeno disuelto en un tramo, y requiere información de los cambios en el tiempo o en el espacio, así como del intercambio de oxígeno entre la columna de agua y la atmósfera (reaireación). Sus principales limitaciones son: a) su poca precisión en sistemas oligotróficos, donde los cambios en la concentración de O_2 disuelto son muy pequeños, y b) que no funciona en tramos muy turbulentos, con altas tasas de reaireación (McCutchan et al. 1998).

El método en cauce abierto no es adecuado en tramos muy turbulentos

El balance de O_2 disuelto en un río depende de la producción, de la respiración y de la *reaireación* (E). El flujo de reaireación depende a su vez del déficit de saturación de O_2 y del coeficiente de reaireación.

$$C = PPB - R \pm E \quad (20.7)$$

$$E = (C_s - C) \times k_{O_2} \quad (20.8)$$

donde C : concentración de O_2 disuelto, C_s : concentración saturante (varía en función de la presión atmosférica y la temperatura), y k_{O_2} : coeficiente de reaireación.

Así pues, E es positiva en casos de valores de oxígeno superior a la saturación y negativos en el caso contrario. Es decir, en condiciones de déficit de saturación de oxígeno el río tiende a absorber este gas de la atmósfera, mientras que cuando la saturación está por encima de 100% tiende a perderlo.

Los parámetros metabólicos pueden estimarse más fácilmente en períodos de buen tiempo que favorezcan cambios significativos de las concentraciones de O_2 en condiciones hidráulicas estacionarias. Debido a que las variaciones diarias de O_2 conllevan una mínima variación de las concentraciones de O_2 en el espacio, la dispersión tiene un papel insignificante en las concentraciones de O_2 . Así pues, la hidráulica fluvial estacionaria, la ausencia de afluentes y el efecto negligible de

la dispersión en las concentraciones de O_2 permiten describir la ecuación de transporte-reacción del O_2 como:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + v(x) \frac{\partial C}{\partial x} = P(x,t) - R(x,t) + k_{O_2}(x)[C_s(x,t) - C] \quad (20.9)$$

donde t : tiempo, x : localización a lo largo del río, C : concentración de O_2 disuelto, v : velocidad media del agua en el río, P : producción de O_2 por producción primaria, R : consumo de O_2 atribuido a la respiración del ecosistema, C_s : concentración saturante de oxígeno, y k_{O_2} : coeficiente de reaireación.

La ecuación 20.9 describe, pues, la variación temporal de la concentración de O_2 en función de la advección, producción, respiración y reaireación.

SELECCIÓN DEL TRAMO DE MUESTREO

El tramo debe ser homogéneo en cuanto a cobertura del bosque de ribera y geomorfología, y no debe recibir afluentes o aportes significativos de aguas subterráneas. Asimismo, deben evitarse tramos con aportes puntuales de nutrientes o efluentes industriales o urbanos. La selección del tramo adecuado es de vital importancia para obtener resultados coherentes; de no ser así, pueden obtenerse resultados erróneos.

El tramo a medir debe ser homogéneo. Su longitud se determina en función de la velocidad del agua y del coeficiente de reaireación

La longitud del tramo no debe ser menor que la *longitud integrada* (LI) por las medidas de metabolismo en caso de usar la técnica con una estación (Chapra y Di-Toro 1991) (ecuación 20.10), y no menor un tercio de LI , en caso de usar la técnica con dos estaciones (McCutchan et al. 1998).

$$LI = \frac{3v}{k_{O_2}} \quad (20.10)$$

donde v : velocidad promedio del agua ($m\ s^{-1}$), y k_{O_2} : coeficiente de reaireación (s^{-1}).

En el momento de selección del tramo de muestreo deben considerarse siempre combinaciones de v y k_{O_2} que resulten LI máximas para el tramo examinado. Una vez realizados estos cálculos, si se cuenta con tramos homogéneos de longitud mayor a LI , se podrá elegir entre las técnicas de una o dos estaciones. Por el contrario, si el tramo homogéneo es inferior a LI , deberemos usar la técnica con dos estaciones. En el caso ilustrado en la figura 20.4, la longitud del tramo necesario para estimar el metabolismo con la técnica de una estación es de 1,8 km, mientras que en la longitud mínima la técnica de dos estaciones es de 600 m. En estas condiciones, el metabolismo fluvial de tramos cubiertos podría ser evaluado mediante la técnica de una estación en las estaciones 1 o 2, ya que el tramo homogéneo aguas arriba de estas estaciones es más largo que LI . En cambio, no podría ser evaluado en la estación 5, ya que el tramo cubierto aguas arriba es menor que

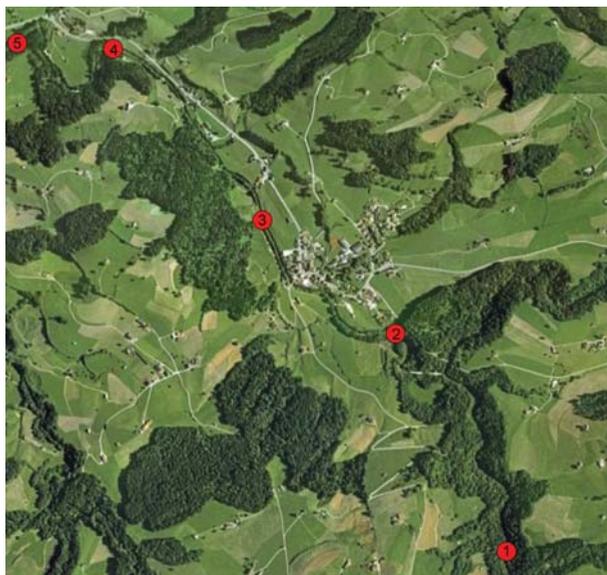


Figura 20.4:
Tramo fluvial del río Necker,
Suiza

Nota: El tramo de 2 km empieza con una sección cubierta entre 1 y 2. Aguas abajo de 2, la cobertura del bosque se ve reducida y la luz que llega al río es entre uno y dos órdenes de magnitud superiores. El tramo sin cobertura tiene una longitud de 2 km (entre las estaciones 2 y 4). Aguas abajo de la estación 4, la cobertura del bosque de ribera es otra vez elevada. El tramo entre las estaciones 4 y 5 tiene una longitud de 700 m.

LI. La técnica de dos estaciones podría ser usada entre las estaciones 1 y 2, pero no entre 4 y 5, ya que la longitud del tramo entre 4 y 5 no es suficiente para detectar cambios significativos en O_2 disuelto. Para medir el metabolismo en tramos sin cobertura, sólo podría usarse la técnica de dos estaciones entre las estaciones 2 y 4.

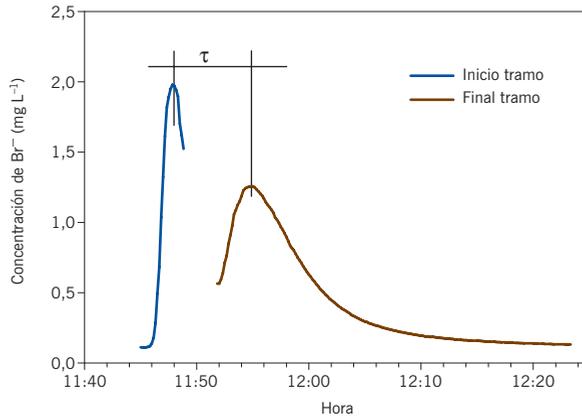
En ambas técnicas, es preferible que los electrodos para la medida de oxígeno se coloquen en puntos donde exista una buena mezcla de agua, pues de lo contrario los valores de oxígeno pueden variar considerablemente a lo ancho del río. Si se pretenden realizar varias medidas de metabolismo en distintos momentos del año, se marcan claramente y de forma no percedera los extremos del tramo, por ejemplo, mediante cintas de colores colgadas en ramas del bosque de ribera.

CARACTERIZACIÓN HIDROLÓGICA DEL TRAMO DE ESTUDIO

Tanto si se usa la técnica con una o dos estaciones, hay que caracterizar la hidrología del tramo de estudio y estimar el tiempo medio de viaje del agua. En caso de realizarse la técnica con dos estaciones, hay que caracterizar el tramo situado entre ambas estaciones. Si se usa la técnica con una estación, hay que caracterizar un tramo no inferior a un tercio de *LI*. Se recomienda usar solutos conservativos tales como el cloruro (Cl^-) o el bromuro (Br^-) (capítulo 4). Estas adiciones pue-

La caracterización
hidrológica del tramo se
hace mediante adición
de solutos conservativos

Figura 20.5:
Concentraciones de Br^- al inicio y final del tramo de estudio obtenidas con el uso de un solo electrodo específico para Br^- (río Lutteren, Suiza). τ es el tiempo medio de viaje



den realizarse de forma continua o bien instantánea. El uso de Cl^- tiene las ventajas de su fácil adquisición en forma de sal común (NaCl) y fácil cuantificación indirecta en forma de conductividad eléctrica. En cambio, el Br^- es más difícil de conseguir y requiere utilizar electrodos específicos, aunque presenta la ventaja de poder detectarse a muy bajas concentraciones, por lo que su uso es recomendado en ríos de más de $0,5 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$. Así, se disuelve Cl^- o Br^- en un recipiente lleno de agua del río. Una vez mezclado, se echa al río en un punto en que la solución pueda mezclarse fácilmente por toda la sección del río. El punto de adición debe situarse siempre aguas arriba del inicio del tramo de interés, para permitir la mezcla completa. La longitud de este tramo de mezcla debe determinarse en función de las dimensiones y la hidrología del tramo de estudio.

La concentración de Cl^- (o conductividad eléctrica) o Br^- deben ser medidas y registradas de forma continua desde el inicio de la adición al inicio y al final del tramo. Si no se cuenta con dos electrodos, puede medirse la concentración del soluto conservador en el inicio del tramo hasta alcanzar el pico de concentración, y acto seguido, situarse el mismo electrodo al final del río. Esta alternativa permite caracterizar el tramo con un solo electrodo, aunque se pierde parte de la información (fig. 20.5).

El *tiempo medio de viaje* (τ) se calcula como el tiempo transcurrido entre los picos de las concentraciones de Br^- entre el inicio y final del tramo. La velocidad media se obtiene dividiendo la longitud del tramo de estudio por τ .

DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE REAIREACIÓN

La determinación del coeficiente de reaireación presenta dificultades, aunque existe una variedad de métodos para estimarlo (Hornberger y Kelly 1975, Thyssen et al. 1987, Genereux y Hemond 1992).

El procedimiento más preciso es la medida directa en la que se usan gases trazadores como propano (C_3H_8) o hexafluoruro de azufre (SF_6) cada vez que se mide el metabolismo. Dado el esfuerzo necesario para ello, muchos investigadores prefieren utilizar estimaciones del coeficiente de reaeración que luego calibran con unas pocas medidas directas con gases trazadores (no menos de cuatro). En el caso de no poder realizar medidas directas del coeficiente de reaeración, pueden usarse de forma exclusiva estimaciones, aunque la fiabilidad de las medidas de metabolismo puede verse gravemente afectada.

El paso más crítico en las medidas abiertas del metabolismo es la determinación del coeficiente de reaeración

Técnica 53a. Determinación de la reaeración a partir de la evasión de gases trazadores

Las adiciones de gases trazadores deben realizarse de forma simultánea con las adiciones de solutos conservativos, ya sea Cl^- o Br^- . El C_3H_8 es barato y fácil de adquirir, mientras que el SF_6 es más fácil de detectar por cromatografía de gases.

La evasión de gases trazadores es el método más fiable para determinar el coeficiente de reaeración

El gas trazador se inyecta a tasa constante en el mismo punto y de manera simultánea con la adición de Cl^- o Br^- . El flujo de gas puede regularse mediante un regulador de presión (fig. 20.6a) y debe ser inyectado a través de un difusor que favorezca la mezcla (fig. 20.6b). Las muestras de agua para el análisis de los gases trazadores se toman cuando el trazador se encuentra mezclado en todo el tramo en un estado estacionario, es decir, cuando al final del tramo se alcanza el pico de concentración del soluto conservativo. En ese momento, se toman como mínimo muestras al inicio y final de tramo, aunque también pueden tomarse muestras en puntos adicionales a lo largo del mismo. Estas muestras de agua deben transportarse al laboratorio en recipientes estancos, y pueden tomarse con jeringuillas de triple válvula (fig. 20.6c y d) o bien en contenedores tipo *vacutainer*. En cualquier caso, la toma de muestras debe realizarse siempre debajo del agua para evitar la fuga de gases durante el muestreo.

Las muestras de agua son transportadas al laboratorio, donde se analizan con un cromatógrafo de gases. Una descripción más detallada del método puede encontrarse en Cirpka et al. (1993). Una vez estimada la concentración del gas trazador, el coeficiente de reaeración se calcula como:

$$k_g(T) = \ln \left(\frac{C_i}{C_f} \right) \frac{1}{\tau} \quad (20.11)$$

donde τ : tiempo medio de viaje (minutos) entre el inicio y final del tramo, C_i : concentración del gas trazador en el inicio de tramo, y C_f : concentración del gas trazador al final de tramo.

Figura 20.6:

a) Depósito de gas trazador y regulador de presión, b) difusores de gas, c) toma de muestras de agua para análisis de gases, y d) jeringuillas de triple válvula



La macro 20.2 permite calcular el coeficiente de reaeración mediante gases trazadores

k_{O_2} se calcula a partir de la k_g obtenida con el gas trazador. Así, debe multiplicarse la k_g por 1,4 en el caso de usarse SF_6 o C_3H_8 (Wanninkhof et al. 1990). Estos factores de conversión se basan en la aplicación de modelos de renovación de superficie en los que se usan los coeficientes de reaeración de gases trazadores y de oxígeno. El coeficiente de reaeración depende de la temperatura, según describe la ecuación 20.12 (Thyssen et al. 1987):

$$k_g(T) = k_{g(20)} 1,024^{(T-20)} \quad (20.12)$$

donde k_g : coeficiente de reaeración medido, $k_{g(20)}$: coeficiente de reaeración a una temperatura estándar de 20 °C, y T : temperatura (°C).

El coeficiente de reaeración depende de la temperatura, por lo que hay que recalcularlo cuando ésta varíe

La relación entre coeficiente de reaeración y temperatura permite estimar k_{O_2} para distintas temperaturas.

Técnica 53b. Estimaciones de reaeración según las características hidráulicas y geomorfológicas del tramo de estudio

En la bibliografía (cuadro 20.2) hay numerosas fórmulas empíricas para calcular el coeficiente de reaeración. Dichas fórmulas se basan en variables hidráulicas

Cuadro 20.2:

Ecuaciones empíricas para calcular el coeficiente de reaeración (k_{O_2})

Ecuación	Autores y año de publicación
$k_{O_2} = 32,69 v^{0,413} s^{0,273} / d^{1,408}$	Bennett y Rathbun 1972
$k_{O_2} = 5,58 v^{0,607} / d^{1,689}$	Bennett y Rathbun 1972
$k_{O_2} = 186,07 (vs)^{0,5} / d$	Cadwallader y McDonnell 1969
$k_{O_2} = 0,0217 v^{2,695} / d^{3,085} s^{0,825}$	Churchill et al. 1962
$k_{O_2} = [(59,17 (1 + N^2) (vs)^{0,375}) / d (0,9 + N)^{0,5}] \cdot [(\coth 4,1 (vs)^{0,125}) / (0,9 + N)^{0,5}]$	Dobbins 1965
$k_{O_2} = 173,01 (vs)^{0,404} / d^{0,66}$	Krenkel y Orlob 1963
$k_{O_2} = 5,14 v / d^{1,33}$	Langbein y Durum 1967
$k_{O_2} = 6,91 v^{0,73} / d^{1,75}$	Owens et al. 1964
$k_{O_2} = 5,35 v^{0,67} / d^{1,85}$	Owens et al. 1964
$k_{O_2} = K'(\Delta H/\Delta X) v$ (método de la disipación de energía)	Tsivoglou y Neal 1976

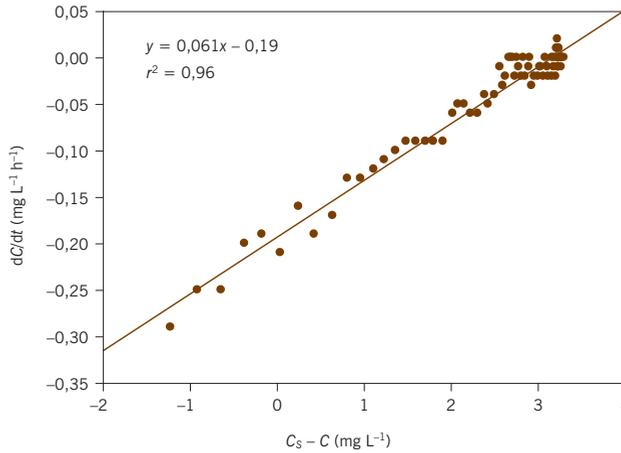
K' : $0,0162 \text{ m}^{-1}$ (cuando $Q = 0,75\text{-}90 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) y $0,033 \text{ m}^{-1}$ (cuando $Q = 0,03\text{-}0,3 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$); $\Delta H/\Delta X$ (m m^{-1}): pendiente de la superficie del agua; v (m s^{-1}): velocidad del agua; d (m): profundidad del agua; s (m m^{-1}): pendiente del tramo; N : número de Froude.

como velocidad del agua, profundidad, pendiente del tramo, velocidad de fricción o número de Froude. Aunque su fiabilidad es irregular (Generaux y Hemond 1992), el cálculo de los parámetros necesarios en las ecuaciones empíricas requiere caracterizar la morfología del tramo de estudio (técnica 5). Para obtener datos en continuo de parámetros como velocidad, pendiente de la superficie, y profundidad del agua, es necesario tener datos en continuo del caudal y la descripción morfológica del cauce para después calcular los parámetros requeridos mediante modelización hidráulica.

Técnica 53c. Estimaciones de la reaeración según la variación nocturna del oxígeno

El método de la variación nocturna del oxígeno (Hornberger y Kelly 1975) se basa en el descenso de la concentración de oxígeno que ocurre durante la noche. Para aplicar este método se necesita medir en continuo la concentración de oxígeno y la temperatura durante toda la noche. Es recomendable disponer de medidas cada 10-15 minutos, ya que cuanto más frecuentes sean las medidas mayor será la probabilidad de que obtengamos un valor significativo para la constante de reaeración. Esta medida se basa en la premisa de que la fotosíntesis, y con ello la producción de oxígeno, se paraliza al anochecer hasta el amanecer siguiente. Por lo tanto, durante la noche la respiración causa la disminución de la concentración de oxígeno y, al principio, se detecta una fuerte bajada, hasta que llega a un equilibrio. Paralelamente, la reaeración actúa acercando las concentraciones de oxígeno a la saturación. En una regresión lineal que represente datos noctur-

Figura 20.7:
 Regresión lineal entre dC/dt
 y $C_s - C$ para determinar la
 constante de reaeración
 ($k_{O_2} = 0,061 \text{ h}^{-1}$).



La macro 20.3 permite calcular el coeficiente de reaeración mediante la caída nocturna de oxígeno

nos de la concentración de oxígeno en continuo en intervalos de tiempo (dC/dt) respecto del déficit de saturación de oxígeno en el agua ($C_s - C$) (fig. 20.7), la pendiente de la línea será la *constante de reaeración*. Este método funciona mejor cuando los cambios nocturnos del déficit de saturación son marcados. Su efectividad es menor cuando la producción es baja o cuando la reaeración es tan alta que las concentraciones de oxígeno se mantienen cerca de la saturación.

Técnica 53d. Medida del metabolismo con una estación

Para medir el metabolismo en abierto hacen falta datos de O_2 y temperatura en continuo durante, al menos, 24 horas

Para medir el metabolismo en cauce abierto es necesario obtener datos en continuo y sincronizados de O_2 disuelto y temperatura a intervalos de 10-20 minutos. El período de mediciones, como mínimo, debe ser de un día, aunque se recomienda tomar medidas durante, al menos, tres días para descartar posibles errores. La técnica para medir la *PPB* y *RE* con una estación se basa en la técnica descrita por Odum (1956). La ecuación 20.13 describe el cálculo de la tasa metabólica neta basándose en la variación temporal del O_2 disuelto:

$$PNEi = \left[\frac{\Delta C}{\Delta t} + k_{O_2}(C_s - C) \right] z \tag{20.13}$$

donde *PNEi*: tasa instantánea de producción neta del ecosistema ($g \text{ O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), *C*: concentración de oxígeno disuelto ($g \text{ O}_2 \text{ m}^{-3}$), *C_s*: concentración saturante de O_2 ($g \text{ O}_2 \text{ m}^{-3}$), *k_{O₂}*: coeficiente de reaeración (d^{-1}), y *z*: profundidad media del tramo (m).

En este caso, la derivada de *C* se calcula como el cambio de la concentración de O_2 disuelto entre medidas consecutivas de O_2 . El coeficiente de reaeración se es-

tima mediante los distintos métodos detallados en la sección anterior, y debe adaptarse a la temperatura del momento usando la ecuación 20.12. C_s se calcula a partir de los datos de temperatura (T) usando la ecuación 20.14 (APHA 1992).

$$\ln(C_s) = -139,344 + \frac{1,5757 \cdot 10^5}{T} - \frac{6,6423 \cdot 10^7}{T^2} + \frac{1,2438 \cdot 10^{10}}{T^3} - \frac{8,6219 \cdot 10^{11}}{T^4} \quad (20.14)$$

Por otro lado, hay que definir el inicio de la noche y el día, bien a partir del momento en que la radiación fotosintéticamente activa sobrepasa los $2 \mu E m^{-2} s^{-1}$, o alternativamente, utilizando las horas oficiales de puesta y salida del Sol.

La PNE se calcula sumando las $PNEi$ de todo el día. La tasa diaria de respiración, o RE , se calcula sumando las $PNEi$ obtenidas durante la noche y la tasa de respiración diurna estimada a partir de la extrapolación entre los valores de $PNEi$ una hora antes de la salida del sol y una hora después de su puesta (fig. 20.8). Finalmente, la producción diaria, o PPB , se calcula como la suma de PNE y RE .

Se han diseñado varias aplicaciones para el cálculo del metabolismo a partir de medidas en continuo en cauce abierto (Izagirre et al. 2007). Tal como se refleja en la figura 20.8, esta técnica asume que la RE durante el día es similar a la de la noche, cosa que es probablemente errónea. La RE con luz diurna es, con toda probabilidad, superior a la que se da en condiciones de oscuridad debido a la fotorespiración, a un incremento del componente autotrófico de la RE , y a la mayor actividad heterotrófica ligada a la disponibilidad de exudados celulares de la comunidad algal. La respiración del perifiton está especialmente vinculada a la luz, y sus valores en ausencia de la misma pueden ser incluso la mitad que con luz, permitiendo unas estimaciones correctas de PPN y de RE durante la noche, pero subestimando la PPB . La luz del Sol puede también incrementar la degradabilidad

La macro 20.4 permite calcular el metabolismo mediante el método de la estación única

La técnica de la estación única asume que la respiración es constante durante todo el día, lo que a menudo no es así

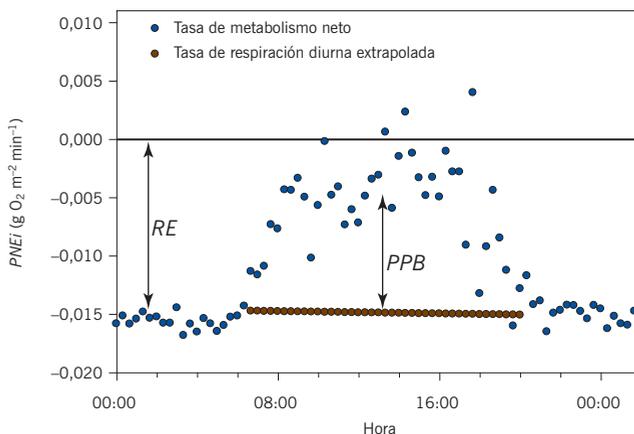


Figura 20.8: Extrapolación de los valores de respiración diurna a partir de los valores de PNEi previos a la salida del Sol y posteriores a la puesta del Sol (río Necker, Suiza)

de la materia orgánica disuelta, incrementando así la respiración heterotrófica. Actualmente, estas limitaciones metodológicas pueden superarse con el uso de los isótopos de oxígeno (Venkiteswaran et al. 2007, Tobias et al. 2007), aunque la complejidad de esta técnica va más allá del objetivo de este capítulo.

Técnica 53e. Medida del metabolismo con dos estaciones

La medida de *PPB* y *RE* con dos estaciones se basa en la técnica descrita por Marzolf et al. (1994), con las posteriores modificaciones sugeridas por Young y Huryn (1998) para el cálculo de la reaireación. La ecuación 20.15 describe el cálculo de la tasa metabólica neta basándose en la variación espacio-temporal del O_2 disuelto:

$$PNEi = \left[\frac{C_t - C_0}{\tau} + k_{O_2} (C_{sa} - C_a) \right] z \quad (20.15)$$

donde *PNEi*: tasa instantánea de producción neta del ecosistema ($g O_2 m^{-2} d^{-1}$), C_t : concentración de oxígeno disuelto al tiempo t ($g O_2 m^{-3}$), C_0 : concentración de oxígeno disuelto al tiempo 0 ($g O_2 m^{-3}$), τ : tiempo medio de viaje de retraso entre las dos estaciones (min), k_{O_2} : coeficiente de reaireación (d^{-1}), C_{sa} : valor promedio de la concentración saturante de oxígeno ($g O_2 m^{-3}$) entre inicio y final del tramo de estudio, C_a : valor promedio de la concentración de oxígeno entre inicio y final del tramo de estudio, y z : profundidad media del tramo de estudio (m).

C_t y C_0 corresponden, respectivamente, a las concentraciones en la estación de río arriba y de río abajo con un tiempo medio de viaje de retraso (τ) (min). Las *PNE*, *PPB* y *RE* se calculan del mismo modo que con una sola estación.

Una asunción de las dos técnicas de cauce abierto es que las contribuciones de agua subterránea al tramo de estudio sean mínimas, puesto que altas contribuciones de agua subterránea con concentraciones bajas de oxígeno darían valores de *RE* mayores a los reales, así como valores de *PPB* menores a los reales. Hall y Tank (2005) propusieron un método para corregir las estimaciones del metabolismo en cauce abierto en caso de conocer la contribución de agua subterránea y su concentración de oxígeno:

$$PNEi = \left[\frac{C_t - C_0}{\tau} + k_{O_2} (C_{sa} - C_a) \right] z - \frac{Q_{subt}}{A} (C_{subt} - C_t) \quad (20.16)$$

donde C_{subt} : concentración de oxígeno disuelto en el agua subterránea ($g O_2 m^{-3}$), Q_{subt} : aportación de caudal de agua subterránea al tramo ($m^3 min^{-1}$), y A : área del tramo de estudio (m^2).

Si hay aportes importantes de agua subterránea al tramo, hay que tener en cuenta su influencia sobre el balance de oxígeno

Q_{subt} puede estimarse a partir del incremento neto de caudal entre el inicio y el final del tramo. C_{subt} puede medirse en muestras de agua de pozos, aunque también puede asumirse anoxia en el peor de los casos. En el muestreo del agua subterránea, es importante no confundir agua subterránea con agua hiporreica, esta última en continuo intercambio con el agua superficial.

La macro 20.5 permite calcular el metabolismo con dos estaciones

20.3. Bibliografía

- ACUÑA V., WOLF A., UEHLINGER U., y TOCKNER K. «Temperature dependence of stream benthic respiration in an alpine river network with relevance to global warming». *Freshwater Biology* 53 (2008): 2076-2088.
- APHA. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington DC: American Public Health Association, 1992.
- BENNETT J.P., y RATHBUN R.E. «Reaeration in open channel flow». *U. S. Geological Survey Professional Paper* 737 (1972).
- CADWALLADER T.E., y MCDONNELL A.J. «A multivariate analysis of reaeration data». *Water Research* 3 (1969): 731-742.
- CHAPRA S.C., y DITORO D.M. «Delta method for estimating primary production, respiration, and reaeration in streams». *Journal of Environmental Engineering, ASCE* 117 (991): 640-655.
- CHURCHILL M.A., ELMORE H.L., y BUCKINGHAM E.A. «The prediction of stream reaeration rates». *Journal of Sanitary Engineering, ASCE* 88 (1962): 1-46.
- CIRPKA O., REICHERT P., WANNER O., MULLER S.R., y SCHWARZENBACH R.P. «Gas-exchange at river cascades - field experiments and model-calculations». *Environmental Science and Technology* 27 (1993): 2086-2097.
- DOBBINS W.E. «Closure to BOD and oxygen relationship in streams». *Journal of Sanitary Engineering, ASCE* 91 (1965): 49-55.
- ENQUIST B.J., ECONOMO E.P., HUXMAN T.E., ALLEN A.P., IGNACE D.D., y GILLOOLY J.F. «Scaling metabolism from organisms to ecosystems». *Nature* 423 (2003): 639-642.
- GENEREUX D.P., y HEMOND H.F. «Determination of gas-exchange rate constants for a small stream on Walker Branch watershed, Tennessee». *Water Resources Research* 28 (1992): 2365-2374.
- GUASCH H., MARTÍ E., y SABATER S. «Nutrient enrichment effects on biofilm metabolism in a Mediterranean stream». *Freshwater Biology* 33 (1995): 373-383.
- HALL R.O., y TANK J.L. «Correcting whole-stream estimates of metabolism for groundwater input». *Limnology and Oceanography-Methods* 3 (2005): 222-229.
- HILL B.H., HERLIHY T., KAUFMANN P.R., y SINSABAUGH R.L. «Sediment microbial respiration in a synoptic survey of mid-atlantic region streams». *Freshwater Biology* 39 (1998): 493-501.
- HILL W.R., MULHOLLAND P.J., y MARZOLF E.R. «Stream ecosystem responses to forest leaf emergence in spring». *Ecology* 82 (2001): 2306-2319.
- HORNBERGER G.M., y KELLY M.G. «Atmospheric reaeration in a river using productivity analysis». *Journal of the Environmental Engineering Division, ASCE* 101 (1975): 729-739.
- IZAGIRRE O., BERMEJO M., POZO J., y ELOSEGI A. «Rivermet[®]: An Excel-based tool to calculate river metabolism from diel oxygen-concentration curves». *Environmental Modelling and Software* 22 (2007): 24-32.
- KRENKEL P.A., y ORLOB G.T. «Turbulent diffusion and the reaeration coefficient». *Transactions American Society of Civil Engineering* 128 (1963): 293-334.

- LANGBEIN W.B., y DURUM W.H. «The reaeration capacity of streams». *U. S. Geological Survey Circular* 542 (1967).
- MARZOLF E.R., MULHOLLAND P.J., y STEINMAN A.D. «Improvements to the diurnal upstream-downstream dissolved-oxygen change technique for determining whole-stream metabolism in small streams». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 51 (1994): 1591-1599.
- MCCUTCHAN J.H., LEWIS W.M., y SAUNDERS J.F. «Uncertainty in the estimation of stream metabolism from open-channel oxygen concentrations». *Journal of the North American Benthological Society* 17 (1998): 155-164.
- MCINTIRE C.D., GARRISON R.L., PHINNEY H.K., y WARREN C.E. «Primary production in laboratory streams». *Limnology and Oceanography* 9 (1964): 92-102.
- NAEGELI M.W., y UEHLINGER U. «Contribution of the hyporheic zone to ecosystem metabolism in a prealpine gravel-bed river». *Journal of the North American Benthological Society* 16 (1997): 794-804.
- NIYOGI D.K., LEWIS W.M., y MCKNIGHT D.M. «Effects of stress from mine drainage on diversity, biomass, and function of primary producers in mountain streams». *Ecosystems* 5 (2002): 554-567.
- ODUM E.P. «Primary production in flowing waters». *Limnology and Oceanography* 2 (1956).
- OWENS M., EDWARDS R.W., y GIBBS J.W. «Some reaeration studies in streams». *International Journal of Air and Water Pollution* 8 (1964): 469-486.
- PLATT T., y IRWIN B. «Caloric content of phytoplankton». *Limnology and Oceanography* 18 (1973): 306-310.
- ROMANI A.M., y SABATER S. «Structure and activity of rock and sand biofilms in a Mediterranean stream». *Ecology* 82 (2001): 3232-3245.
- RUTHERFORD J.C., WILCOCK R.J., y HICKEY C.W. «Deoxygenation in a mobile-bed river. 1. Field studies». *Water Research* 25 (1991): 1487-1497.
- THYSSEN N., ERLANDSEN M., JEPPESEN E., y URSIN C. «Reaeration of oxygen in shallow, macrophyte rich streams. 1. Determination of the reaeration rate coefficient». *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie* 72 (1987): 405-429.
- TOBIAS C.R., BOHLKE J.K., y HARVEY J.W. «The oxygen-18 isotope approach for measuring aquatic metabolism in high-productivity waters». *Limnology and Oceanography* 52 (2007): 1439-1453.
- TSIVOGLOU E.C., y NEAL L.A. «Tracer measurements of reaeration: III. Predicting the reaeration capacity of inland streams». *Journal WPCF* 48 (1976): 2669-2689.
- VELASCO J., MILLAN A., VIDAL-ÁBARCA M.R., SUAREZ M.L., GUERRERO C., y ORTEGA M. «Macrophytic, epipelic and epilithic primary production in a semiarid Mediterranean stream». *Freshwater Biology* 48 (2003): 1408-1420.
- VENKITESWARAN J.J., WASSENAAR L.I., y SCHIFF S.L. «Dynamics of dissolved oxygen isotopic ratios: A transient model to quantify primary production, community respiration, and air-water exchange in aquatic ecosystems». *Oecologia* 153 (2007): 385-398.
- VILCHES C., y GIORGI A. «Metabolismo de productores de un arroyo pampeano». *Biología Acuática* 24 (2008): 87-93.
- WANNINKHOF R., MULHOLLAND P.J., y ELWOOD J.W. «Gas-exchange rates for a 1st-order stream determined with deliberate and natural tracers». *Water Resources Research* 26 (1990): 1621-1630.
- YOUNG R.G., y HURYN A.D. «Longitudinal patterns of organic matter transport and turnover along a New Zealand grassland river». *Freshwater Biology* 38 (1997): 93-107.
- YOUNG R.G., y HURYN A.D. «Comment: Improvements to the diurnal upstream-downstream dissolved oxygen change technique for determining whole-stream metabolism in small streams». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55 (1998): 1784-1785.

Uso de ríos artificiales en ecología fluvial

HELENA GUASCH Y ALEXANDRA SERRA

21.1. Introducción

Los *ríos artificiales* se llevan utilizando, desde hace décadas, para el estudio de algas, invertebrados y peces. Se trata de canales de dimensiones reducidas que simplifican las condiciones naturales de los ecosistemas fluviales, aunque mantienen sus características de aguas corrientes, incluyendo una parte de la comunidad biológica. Estos mesocosmos que simulan ecosistemas fluviales, permiten controlar las condiciones ambientales y proporcionan la oportunidad de examinar cuestiones científicas que no pueden ser abordadas directamente en estudios de campo. En algunos casos es indispensable la experimentación a una escala intermedia entre la escala de campo, donde el investigador tiene muy poco control sobre las variables ambientales, y los experimentos en el laboratorio, donde las variables están estrictamente controladas. En estas circunstancias, el uso de canales artificiales es una opción a considerar (Guasch et al. 2005, Lamberti y Steinman 1993).

Esta aproximación, sin embargo, tiene limitaciones. El control de las condiciones ambientales exige simplificar el sistema, hecho que dificulta en muchos casos la reproducción de las características tanto estructurales como funcionales de un ecosistema fluvial, limitando así la extrapolación de los resultados (cuadro 21.1). Estas limitaciones pueden superarse con estudios combinados entre el laboratorio y el campo, que incluyan experimentación en condiciones controladas (utilizando canales) y la validación de los resultados obtenidos mediante muestreos de campo.

El uso de ríos artificiales permite dilucidar cuestiones que no pueden abordarse directamente en el campo

Cuadro 21.1:
*Resumen de las ventajas
 y limitaciones asociadas
 al uso de canales
 en ecología fluvial*

Ventajas	Limitaciones
<ul style="list-style-type: none"> - Control de variables ambientales - Replicación y significación estadística - Permiten modificar las condiciones ambientales (nutrientes, luz, velocidad del agua...) y las interacciones biológicas (depredación, herbivoría...) - Permiten trabajar con comunidades y analizar efectos directos e indirectos de los tratamientos - Mayor grado de realismo que los estudios de laboratorio 	<ul style="list-style-type: none"> - Simplificación del ecosistema fluvial - Dificultad para mantener poblaciones o comunidades parecidas a las naturales - Dificultad en reproducir los procesos que ocurren a escala mayor - Difícil extrapolación de los resultados obtenidos a nivel de ecosistema natural - Coste de las instalaciones y de su mantenimiento - Elevado consumo de agua (en sistemas abiertos de dimensión mediana o grande)

En general, el uso de canales en ecología fluvial permite: a) tratar cuestiones que no pueden ser estudiadas mediante ensayos de laboratorio u observaciones de campo, b) mejorar el conocimiento del funcionamiento del ecosistema fluvial estudiando sus mecanismos, y c) contribuir directamente al desarrollo y al ensayo de modelos para predecir respuestas a escala de ecosistema. El diseño debe adecuarse a las características del estudio (tipo de organismo o comunidad estudiados) y a las variables utilizadas para evaluar su respuesta (cambios estructurales y/o funcionales). El grado de realismo depende de la semejanza entre la dimensión y complejidad del sistema de canales y las del ecosistema que se pretende examinar (Harris et al. 2007). Las limitaciones asociadas a la escala de estudio pueden ser compensadas mediante estudios de campo destinados a validar los resultados obtenidos.

21.2. Tipología

Se han construido canales de formas y dimensiones muy variadas, y han sido utilizados para un amplio rango de aplicaciones. Se han planteado preguntas muy diversas, que van desde la ecología del perifiton y su respuesta a los nutrientes, a los estudios de crecimiento y supervivencia de invertebrados, la respuesta a las perturbaciones, la dinámica de la colonización, o las interacciones biológicas (herbivoría y depredación). Los sistemas de canales que se utilizan en ecología fluvial pueden estar localizados in situ, normalmente en las orillas de un río del que se deriva el agua; alternativamente, pueden construirse lejos del río, bien al aire libre o bien en el interior de un laboratorio. En este último caso se puede ejercer un mayor control sobre las condiciones ambientales de caudal, luz y temperatura (fig. 21.1). Los canales usan agua derivada de una fuente próxima, ya sea un río, o agua de la red previamente tratada. Este suministro de agua puede ser unidireccional (es decir, en continuo) o recirculado (en que el caudal vuelve a entrar en el canal, usualmente a partir de un depósito). El flujo unidireccional es

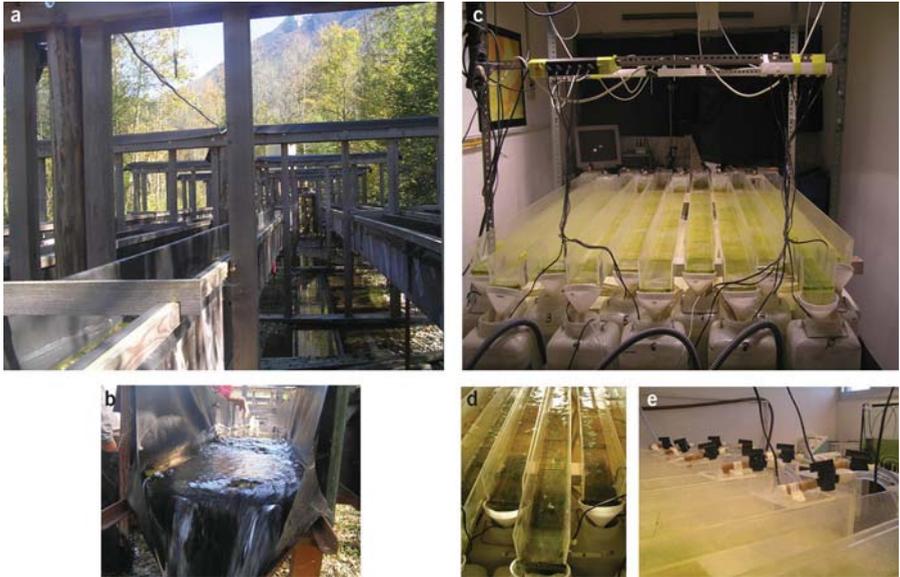
preferible dado que maximiza la proporción agua/biota, con lo que son mínimos los efectos de la actividad biológica (principalmente procesos de fotosíntesis y respiración) sobre el medio. En este caso, si el diseño experimental requiere manipular las características químicas del medio (por ejemplo, incremento en la disponibilidad de nutrientes), es necesario disponer de un sistema capaz de mantener un flujo constante de adición (por ejemplo, mediante bombas peristálticas) durante la duración del experimento. Si la cantidad disponible de agua es un problema, se puede optar por un sistema de recirculación. En este caso, es fundamental mantener la cantidad de agua lo más elevada posible, lo que se consigue usando un depósito grande conectado a cada uno de los canales, y renovar el medio con frecuencia (por ejemplo, dos veces por semana). En todo caso, la frecuencia de renovación del agua se debe optimizar mediante el seguimiento de las variaciones físicas y químicas ocurridas en los canales. Estas diferencias deberían mantenerse siempre por debajo del 20%. Esta solución permite un importante ahorro de agua, pero tiene como inconveniente el trabajo asociado a los recambios de agua y a los análisis químicos, y el menor control de las condiciones experimentales que en el diseño de flujo unidireccional.

El objetivo científico debe determinar la dimensión y características del sistema de canales utilizado. Los canales permiten la replicabilidad de los análisis, tan compleja en sistemas naturales, pero ello exige asegurar que todos los canales de un experimento sean idénticos (Harris et al. 2007, Lamberti y Steinman 1993). Los canales de pequeñas dimensiones (próximos a 1 m) permiten estudiar la ecología de las comunidades microbianas y explorar la influencia de factores clave como la velocidad del agua, la temperatura, el pH, la irradiancia o la concentración de nutrientes. La inclusión de herbívoros exige una mayor superficie de canal (1-5 m de longitud), que proporcione el alimento suficiente para estos orga-

Ecosistema	Río artificial			
	in situ	exterior	interior	
10^2-10^3	10^1-10^2	10^1-10^2	10^0-10^1	Escala (metros)
				Aplicaciones Perifiton Invertebrados Peces
				Control Flujo Química agua Luz y T °C
				Replicabilidad
				Realismo

Figura 21.1: Esquema comparativo de la dimensión, aplicaciones, control de las condiciones ambientales, replicabilidad y realismo en estudios de ecología fluvial basados en la manipulación del ecosistema, en canales situados in situ, canales ubicados en el exterior pero alejados del río, y canales ubicados en el interior

Figura 21.2:
Ejemplos de distintos
modelos de canales



Nota: a) Canales de la estación limnológica de Lunz am Zee, Austria, situados en el exterior y alimentados con el agua de un río cercano. b) El fondo del canal está cubierto por sustratos naturales. c) Canales con circulación situados en el interior de un laboratorio en la Universidad de Girona. El fondo está recubierto con sustratos artificiales (cristales esmerilados) colonizados con perifiton. (Autorización de T. Batin para la realización de fotografía.) d) Cada uno de los canales vierte en un depósito situado en el interior de un baño refrigerado. e) Una bomba sumergible devuelve el agua al inicio del canal.

nismos (Ledger et al. 2006, Wong et al. 2004). Si se incluyen varias especies de invertebrados o peces, sus requisitos de hábitat específicos obligan a realizar diseños más complejos y mayores (mayor longitud, anchura y profundidad), que incorporen distintos tipos de sustrato (rocas, gravas, limos, etc.) y condiciones hidrológicas (alternando rápidos y pozas). En este caso de complicación extrema, difícilmente podrán ser ubicados los canales en recintos cerrados. El diseño final debe ser fruto del compromiso entre la replicabilidad y el realismo. La reducción de la escala permite aproximarse al grado de replicación óptimo en términos estadísticos. Sin embargo, el cambio de escala suele ir asociado a una simplificación del sistema y a una disminución del realismo. En términos generales, es más sencillo estudiar de manera experimental la ecología de ríos pequeños. Cuanto más se acerca la dimensión del sistema de canales a la del sistema sobre el que se quiere experimentar, más realismo se obtiene.

21.3. El diseño: consideraciones generales

El tamaño de los canales debe ser suficiente para: a) permitir el desarrollo y supervivencia de los organismos a estudiar, b) permitir la expresión de los factores

que se pretenden controlar, y c) evitar al máximo el impacto sobre la biota durante los muestreos.

21.3.1. RÉPLICAS

El número total de canales necesarios varía en función del número de factores estudiados y de la magnitud del gradiente que se pretende evaluar (Navarro et al. 2000). Para estudiar la respuesta de una variable a un único factor, como por ejemplo la presencia de una concentración determinada de tóxico, hay que comparar la variabilidad experimental con la debida al factor analizado. Por tanto, se necesita utilizar un mínimo de tres canales control y tres canales sometidos al factor que estudiamos. El *canal* es la unidad experimental, por lo que las muestras tomadas del mismo canal son consideradas réplicas analíticas. Los resultados obtenidos se pueden comparar mediante un *test t de Student*, o en el caso de que haya más de un tratamiento (por ejemplo, dos concentraciones de tóxico), mediante un *análisis de la varianza* (ANOVA) de un factor. Este diseño permite estudiar aspectos tales como la limitación de luz o nutrientes, comparando la actividad del perifiton en canales control con otros que reciben más luz o nutrientes; la herbivoría, comparando canales con y sin herbívoros, o la depredación comparando canales con y sin depredadores. Para estudiar la interacción entre dos factores, hay que añadir al menos tres canales sometidos al segundo de los factores, y tres con ambos factores a la vez (12 canales en total), y analizar los datos mediante un ANOVA de dos factores.

En otras ocasiones, el objetivo es analizar el efecto de un determinado factor en función de su intensidad. En este caso, lo ideal es seguir un diseño de tipo exponencial: se suelen utilizar tres canales control y un mínimo de seis canales sometidos a niveles crecientes del factor que se pretende estudiar. Idealmente, el gradiente debe incluir un nivel en el que los efectos sean presumiblemente sutiles, varios niveles con efectos aparentes, y otros con efectos muy marcados. El ajuste de los resultados obtenidos (tres controles y seis niveles crecientes) a un modelo de regresión permite establecer el tipo y magnitud de la respuesta en función del factor estudiado. Como hemos descrito, en el diseño exponencial sólo hay réplicas de los controles, estando cada uno de los demás canales sujeto a una concentración diferente.

21.3.2. DURACIÓN

Los experimentos pueden tener una duración de hasta varios meses, dependiendo del tiempo de respuesta de los organismos estudiados (horas en bacterias, días en algas, semanas en invertebrados y meses en el caso de los peces), y de la escala de complejidad biológica escogida (población, comunidad o ecosistema).

21.3.3. TIPO DE SUSTRATO

El *sustrato* en la base de los canales puede ser básicamente de dos tipos: natural (rocas, gravas, sedimento, materia orgánica...) o artificial (cristal, cerámica, metacrilato, plástico...). Es importante escoger bien el sustrato, ya que éste determina la estructura de las comunidades que se desarrollan. El sustrato artificial proporciona una mayor homogeneidad y simplicidad que el natural, y es recomendable en estudios realizados a escala microbiana. En este caso se utilizan sustratos artificiales de pequeña dimensión (centímetros), que permitan tomar gran número de muestras comparables. Los sustratos naturales permiten incrementar el grado de complejidad del fondo del canal, la variabilidad del flujo y la variedad de procesos que se desarrollan, y así acercarse más a las características de los ríos reales. Se utilizan para estudios a escala de comunidad de invertebrados o peces y para el estudio de procesos a escala de ecosistema (por ejemplo, dinámica de nutrientes).

Los ríos artificiales deben ser colonizados por organismos, lo que se puede realizar de dos formas: a) incubar los sustratos del canal en un río durante un período suficiente para que sean colonizados de forma natural, y transferirlos luego a los canales, o b) añadir un inóculo directamente a los canales. El inóculo se extrae de un río de referencia con características químicas parecidas a las del sistema de canales utilizados.

21.3.4. CONTROL DE LA VARIABILIDAD EXPERIMENTAL

El diseño debe permitir un ajuste preciso de las condiciones de luz, caudal, velocidad y química del agua, que garantice la homogeneidad entre canales y la estabilidad en el tiempo. La variabilidad entre canales, aunque inevitable, determina el límite de detección de los efectos causados por el factor o factores estudiados. Éstos sólo pueden ser detectados si superan a la variación entre réplicas (canales con un mismo tratamiento).

Técnica 54. Diseño de ríos artificiales en laboratorio

Básicamente se pueden diseñar experimentos basados en la interacción de factores (tipo ANOVA), o en respuesta a un gradiente ambiental (exponencial)

Esta técnica permite realizar un diseño experimental complejo, pudiéndose estudiar tanto la respuesta a un gradiente de una variable ambiental (diseño exponencial) como la interacción de varios factores (diseño tipo ANOVA). Este diseño permite evaluar temas como el papel de distintos recursos (por ejemplo, luz y nutrientes) en la producción primaria, o la respuesta de los consumidores a la disponibilidad de alimento en función de la velocidad del agua. Las mayores dificultades residen en disponer de la suficiente cantidad de agua de calidad adecuada, y en obtener poblaciones o comunidades adecuadas.

MATERIAL

Se indica el material adecuado para un conjunto de 12 canales. En el caso en que no sea necesario dicho número, obviamente se debe modificar proporcionalmente.

- 12 estructuras de metacrilato en forma de U ($2 \times 0,1 \times 0,1$ m).
- Tubo de riego (goteros) para el suministro de agua a los canales.
- Tabla resistente y soporte (2×2 m).
- Estructura de mecano.
- 6 focos halógenos de 500 W.
- Sistema de refrigeración.
- Sustratos artificiales (cristal rugoso).
- Bombas hidráulicas para el suministro de agua, en el caso de que ésta no se suministre por gravedad.

DISEÑO DE RÍOS ARTIFICIALES PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO DE DOS FACTORES SOBRE EL PERIFITON

Para estudiar dos factores simultáneamente, hacen falta doce canales, que pueden ser de 2 m de longitud, 0,1 m de profundidad y 0,1 m de anchura. Para mayor comodidad, éstos pueden situarse a 1 m de altura sobre una tabla resistente (fig. 21.3). La velocidad del agua se controla modificando la inclinación de la tabla, para lo que se diseña cualquier mecanismo específico. Por encima de los canales se construye una estructura tipo «mecano», que servirá de soporte para los focos de iluminación.

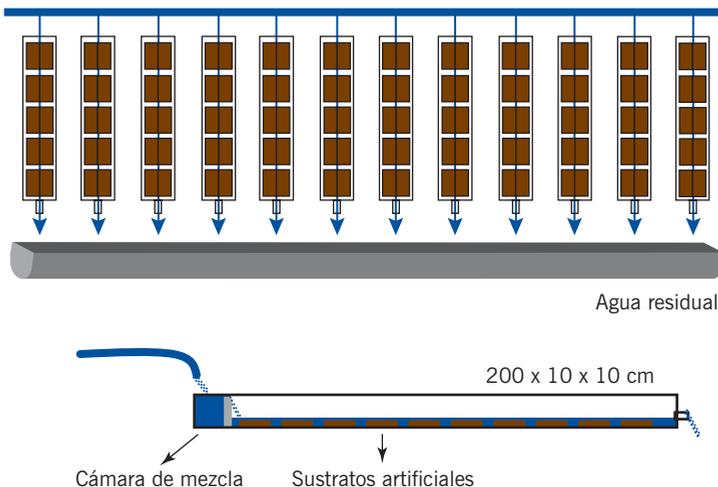


Figura 21.3:
Esquema de un sistema de doce canales (arriba) y detalle de un canal (abajo)

Agua

Se necesita una fuente de agua abundante y de calidad. Se puede utilizar agua proveniente de un río o acuífero, o agua de la red tratada (por ejemplo, mediante eliminación del cloro, descalcificación, etc.). En cualquier caso, es fundamental analizar el agua utilizada, incluyendo el contenido de sales, nutrientes y posibles contaminantes.

Velocidad y caudal

La distribución del agua a los canales se realiza mediante un sistema de riego (goteros) para repartir de forma homogénea y controlada el mismo caudal en todos los canales. Para canales de las dimensiones aquí propuestas se sugiere utilizar un caudal de 1,5 L/min. Dicha configuración permite ajustar la velocidad del agua desde 1 a 50 cm/s, controlando la inclinación del canal (para más información, véase Sabater et al. 2002).

Luz y temperatura

La luz se puede proporcionar con lámparas de luz fría, fluorescentes o lámparas halógenas. Se debe aportar luz suficiente para mantener el crecimiento de los productores primarios, si éste es el caso. Las lámparas halógenas son la solución más económica, sin embargo, aportan gran cantidad de infrarrojos, lo que genera mucho más calor que otros tipos de iluminación. Seis focos halógenos de 500 W dispuestos sobre los canales proporcionan 150-300 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \text{ s}$. Es importante comprobar que el espectro de luz sea adecuado para los productores primarios.

La temperatura del agua se debe controlar, lo que puede efectuarse refrigerando la sala en la que se ubiquen los canales.

Sustratos de colonización

El fondo de los canales se recubre con sustratos artificiales que permitan el desarrollo y posterior muestreo de los organismos bentónicos que son objeto del estudio.

Biota

El mantenimiento de poblaciones o comunidades naturales es uno de los elementos clave del diseño. En el caso del perifiton, el inóculo puede provenir del río que proporciona el agua. Si el agua utilizada proviene de otra fuente, se puede obtener el inóculo a partir de muestras de campo. En el caso de los invertebrados o peces, los individuos utilizados se obtienen a partir de poblaciones naturales o de su reproducción en el laboratorio. En cualquier caso, es esencial verificar la similitud entre la comunidad o población establecida en el sistema de canales y la natural.

21.4. Bibliografía

- GUASCH H., MARTÍ E., y SABATER S. «Nutrient enrichment effects on biofilm metabolism in a Mediterranean stream». *Freshwater Biology* 33 (1995): 373-383.
- HARRIS R.M.L., ARMITAGE P.D., MILNER A.M., y LEDGER M.E. «Replicability of physicochemistry and macroinvertebrate assemblages in stream mesocosms: Implications for experimental research». *Freshwater Biology* 52 (2007): 2434-2443.
- LAMBERTI G.A., y STEINMAN A.D. «Research in artificial streams: Applications, uses and abuses». *Journal of the North American Benthological Society* 12 (1993): 313-384.
- LEDGER M.E., HARRIS R.M.L., MILNER A.M., y ARMITAGE P.D. «Disturbance, biological legacies and community development in stream mesocosms». *Oecologia* 148 (2006): 682-691.
- NAVARRO E., GUASCH H., MUÑOZ I., REAL M., y SABATER S. «Uso de ríos artificiales en ecotoxicología». *Limnetica* 18 (2000): 1-14.
- SABATER S., NAVARRO E., y GUASCH H. «Effects of copper on algal communities at different current velocities». *Journal of Applied Phycology* 14 (2002): 391-398.
- WONG Dcl., MALTBY L., WHITTLE D., WARREN P., y DORN PB. «Spatial and temporal variability in the structure of invertebrate assemblages in control stream mesocosms». *Water Research* 38 (2004): 128-138.

Diseño experimental y análisis de datos

EMILI GARCÍA-BERTHOU, CARLOS ALCARAZ, LLUÍS BENEJAM Y JOSEP BENITO

«All models are wrong, but some are useful»
(BOX 1979)

«Normality is a myth; there never was, and never will be, a normal distribution»
(GEARY 1947)

22.1. Introducción

El diseño del estudio y el análisis de datos son partes cruciales en cualquier investigación ecológica. A menudo, el uso apropiado de diseños y análisis estadísticos es desafiante y frustrante para el investigador. Un primer error, todavía frecuente debido en parte a la aversión estadística de muchos biólogos, es pensar en la estadística sólo después de obtener los datos (Green 1979). Ello, a menudo, conduce a diseños inapropiados o subóptimos, dificultades de análisis y resultados dudosos.

Los estudios pueden dividirse en experimentos o *estudios experimentales* y *estudios observacionales*. En los experimentos, el investigador somete el material de estudio (unidad experimental) a diferentes tratamientos; por ejemplo, podemos fertilizar un tramo de río y compararlo con un control no fertilizado. En los estudios observacionales sólo observamos unidades muestrales en diferentes condiciones preestablecidas y no podemos decidir qué nivel o «tratamiento» recibirá una cierta unidad muestral; por ejemplo, podemos comparar las comunidades de diatomeas o macroinvertebrados a lo largo de un río o en lugares con distintos grados de contaminación. Las ventajas respectivas de los dos tipos de estudios pueden encontrarse, por ejemplo, en Hurlbert (1984) o Diamond (1986), pero pueden resumirse en un mayor control y claridad de resultados en los experimentos, y en mayores escalas espaciales y temporales, y mayor realismo de los estudios observacionales.

El pensamiento estadístico debe guiar el diseño experimental desde el principio

Tres principios importantes del diseño experimental: control, replicación y aleatorización

Al diseño de experimentos se ha prestado mucha atención desde los trabajos del gran estadístico y biólogo Ronald A. Fisher (Box 1978). El diseño de estudios observacionales se llama *diseño muestral* (*sampling design* en inglés), y desafortunadamente su aplicación ha sido mucho menos desarrollada en ecología que el diseño experimental. Tres principios clásicos del diseño experimental básicamente desarrollados por Fisher (véase, por ejemplo, Hurlbert 1984) son el control, la replicación (uso de varias unidades experimentales que reciben el mismo tratamiento) y la aleatorización (asignación al azar de los tratamientos a las distintas unidades experimentales).

El *control* es un grupo de unidades experimentales normalmente «no tratadas», con las que se compararán los tratamientos experimentales. El control proporciona un nivel de referencia que definirá los efectos de los tratamientos. Es importante ser cuidadosos con la definición del control, de modo que la única diferencia entre grupo control y tratamiento sea el factor que nosotros queremos estudiar: por ejemplo, los médicos usan los *placebos* (pastillas o preparados sin principios activos) y dan las pastillas *doblemente a ciegas* (es decir, ni el administrador ni el paciente saben si se está administrando un placebo o la sustancia que se está ensayando), porque el objetivo es sólo estudiar los efectos farmacológicos y no la autosugestión. Un equivalente ecológico sería que si queremos usar, por ejemplo, una *estructura de exclusión* para estudiar cuál es el efecto de los peces en la estructura trófica de un río, debemos evitar que la misma altere mucho las características del hábitat o fisicoquímicas (por ejemplo, aumentando la colmatación con sedimentos finos o reduciendo la luz), ya que de otro modo confundiremos fuentes de variación (depredación frente a estructura del hábitat).

Hay que tener cuidado en incurrir en la seudoreplicación

La *replicación* es el principio de que necesitamos dos o más unidades experimentales (réplicas) con el mismo tratamiento para medir el error experimental. La mayoría de métodos estadísticos (como el análisis de varianza o ANOVA) estudian la existencia de efectos de los tratamientos comparando la variación entre tratamientos con la variación dentro de los tratamientos. Aumentar el número de réplicas (y reducir el error experimental) aumentará la precisión de las estimaciones y la potencia de las pruebas estadísticas, es decir, la capacidad de detectar efectos. Un error frecuente en experimentos ecológicos es la *seudoreplicación*, término acuñado por Hurlbert (1984), que consiste en el análisis incorrecto que usa la variación dentro de la unidad experimental como error experimental. Por ejemplo, si sólo usamos un acuario tratado (por ejemplo, con un tóxico) y otro sin tratar, no podemos usar medidas de distintos individuos (por ejemplo, tamaño o fecundidad de invertebrados) dentro de cada acuario para analizar el efecto del tratamiento. Nótese que la seudoreplicación es un error más de análisis que de diseño, y que algunos experimentos sin replicación pueden analizarse correctamente, por ejemplo, mediante técnicas de regresión (Hurlbert 2004).

La *aleatorización* consiste en asignar al azar los tratamientos (y otros procedimientos) a las distintas unidades experimentales, para evitar sesgos del experimentador y favorecer la independencia de los errores. Aunque la aleatorización es, en principio, recomendable, de hecho seguramente es más importante la *interspersión* es decir, que los distintos tratamientos estén repartidos entre las distintas réplicas, evitando la agregación espacial de los distintos tratamientos (Hurlbert 2004).

Estos tres principios del diseño experimental son de fácil aplicación en el laboratorio pero, a menudo, presentan muchas dificultades para la experimentación en el campo a escalas medias o grandes, o para estudios como los de impactos ambientales (Carpenter et al. 1989, Carpenter 1990, Osenberg et al. 2006). La unidireccionalidad y heterogeneidad espacial de los ríos seguramente dificulta más el diseño experimental que en ecosistemas terrestres o lacustres (Downes et al. 2002). Imaginemos, por ejemplo, que queremos ver cuál es el efecto de fertilizar un tramo de río en los procesos biogeoquímicos o en las comunidades de diatomeas. Podemos añadir nutrientes en el tramo experimental y usar un control justo aguas arriba del tramo. Podríamos repetir simultáneamente la fertilización en otro tramo, aunque ello duplica el esfuerzo de campo. ¿Podemos usar la *variación* entre diferentes controles, por encima de un único tramo fertilizado? Pues, según Stewart-Oaten y Bence (2001), ello no sería correcto. Usar la variación entre un tramo fertilizado y dos controles por encima es inapropiado porque:

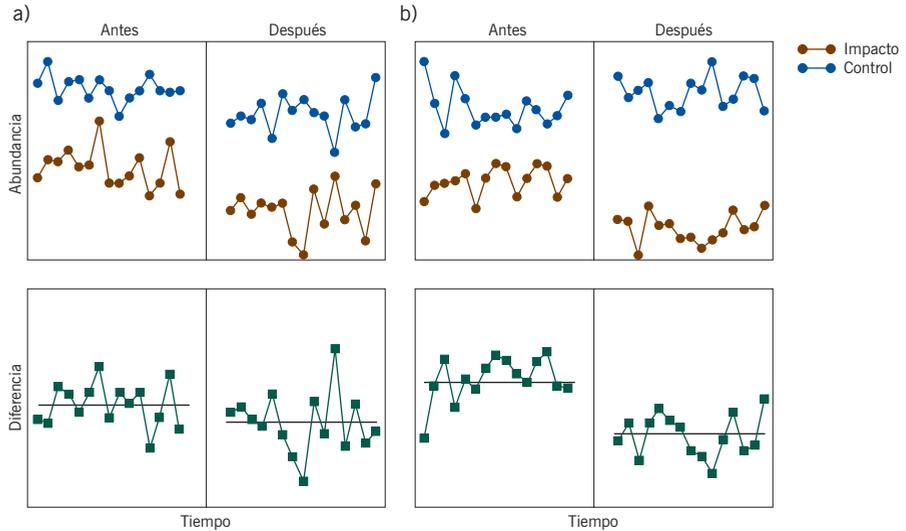
- estaremos confundiendo la variación entre tratamiento y control con la variación espacial entre controles;
- las unidades experimentales no son independientes y la variación entre ellas estará muy correlacionada y será función de la distancia entre ellas; y
- si usamos varios controles, debemos calcular la media entre ellos y comparar la trayectoria de esta media con la del tramo fertilizado.

En este caso, si no se pueden fertilizar varios tramos, el diseño más apropiado según Stewart-Oaten y Bence (2001) es un diseño BACI (*Before-After-Control-Impact*) también llamado BACIPS (*BACI-Paired Series*). El *diseño BACI* compara las series temporales (o las diferencias) de la zona tratada (o impactada) y el control, antes y después de la intervención o tratamiento experimental (fig. 22.1). Se pueden analizar con pruebas *t* de Student de las diferencias de medias o, preferiblemente, con técnicas de regresión o series temporales (si existen datos suficientes) (Stewart-Oaten y Bence 2001).

El diseño BACI consiste en comparar las condiciones en dos tramos, uno control y otro impactado, antes y después del impacto

A continuación proponemos algunos pasos generales para el diseño de estudios y análisis de datos ecológicos. Nuestro objetivo es compensar la desproporción entre matemáticas y aplicación de muchos libros y cursos estadísticos, a pesar de que en estadística tampoco son recomendables los *libros de recetas*, porque lo fun-

Figura 22.1:
Ilustración de un diseño BACI



Nota: Se estudia la abundancia de un organismo en una zona control y otra zona «impacto» antes y después de un determinado suceso, intervención, o tratamiento experimental. En la izquierda (a) existe una diferencia entre las dos zonas (control e impacto) y una tendencia temporal, pero que es similar en el control y la zona impactada o tratada. En cambio, en la derecha (b), las diferencias entre control e impacto cambian con la intervención (antes-después), por lo que concluiremos que existe un efecto de la intervención.

Fuente: Adaptada de Stewart-Oaten et al. (1992).

damental es entender bien los métodos para poder aplicarlos correctamente, y ningún libro incluye todos los casos posibles (Box 1976, Hurlbert 1984).

Técnica 55. Diseño del estudio

ALGUNOS PRINCIPIOS GENERALES (O LOS DIEZ MANDAMIENTOS DE GREEN)

Los diez mandamientos de Green son un compendio de buenas conductas en estadística aplicada

A modo de principios generales, enumeramos, a continuación, una adaptación de lo que nosotros llamamos los *diez mandamientos* de Green (1979), advirtiendo que «quien esté libre de pecado, que tire la primera piedra»:

1. *Objetivo.* Serás capaz de explicar a cualquier persona, de forma clara y concisa, qué cuestión quieres resolver. Los resultados del estudio serán tan coherentes y comprensibles como tu concepción inicial del problema.
2. *Replicación.* Tomarás réplicas por cada combinación de tiempo, lugar y cualquier otro factor controlado. Las diferencias *entre* grupos sólo pueden detectarse comparándolas con las diferencias *dentro* de estos grupos.
3. *Aleatorización.* Tomarás aleatoriamente *un número igual* de réplicas para cada combinación de variables controladas. Decidir qué réplicas son «representativas» o «típicas» no es un muestreo aleatorio.

4. *Control*. Con el fin de comprobar si una condición produce un efecto, es necesario muestrear en presencia y en ausencia de la condición, sin que el resto de condiciones varíen. Un efecto sólo se puede demostrar por comparación con un control.
5. *Estudio piloto*. Tomarás muestras preliminares con el fin de obtener información básica que permita evaluar qué diseño muestral y qué análisis estadístico son los más adecuados. Quien se salta este paso por falta de tiempo, normalmente acaba perdiendo más tiempo.
6. *Eficiencia del muestreo*. Verificarás que el método o aparato de muestreo está realmente muestreando la población que piensas, con eficiencia constante y adecuada en todo el rango de condiciones de muestreo. Las diferencias en la eficiencia de muestreo sesgan las comparaciones.
7. *Muestreo estratificado, cuando hay heterogeneidad poblacional*. Si la población muestra heterogeneidad es necesario realizar un muestreo aleatorio estratificado: dividirás la población en estratos homogéneos y tomarás muestras proporcionalmente según el tamaño del estrato. Por ejemplo, si las comunidades que estudias parecen diferir entre rápidos y pozas, muestrearás cada uno de estos hábitats por separado.
8. *Unidad experimental o muestral, y número de réplicas (tamaño muestral)*. Definirás apropiadamente la unidad experimental o muestral. Estimarás el número mínimo de réplicas necesario para obtener la precisión deseada.
9. *Verificarás los supuestos de los análisis estadísticos*. Comprobarás si las varianzas son homogéneas y si los errores tienen una distribución normal. Si, como es habitual en biología, esto no se cumple: a) transformarás apropiadamente los datos, b) utilizarás un procedimiento no paramétrico, c) utilizarás un diseño muestral secuencial apropiado, o d) usarás métodos de aleatorización o permutación.
10. *Escogerás el método estadístico al diseñar el estudio*. Una vez escogido el método estadístico para comprobar la hipótesis, aceptarás el resultado. Un resultado no esperado o no deseado no es una razón válida por rechazar el método y buscar uno «mejor».

Estos principios son más esenciales en experimentos de menor tamaño. En estudios observacionales o experimentos a gran escala, el diseño es más complicado y se permiten más «pecados». Por ejemplo, la replicación es lógicamente muy recomendable, pero las técnicas de regresión son aplicables correctamente sin replicación.

ESTRUCTURA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL O MUESTRAL

Un primer paso para diseñar bien un estudio y, por ende, escoger el método estadístico adecuado, es aplicar bien la terminología del diseño, que es un poco distinta para experimentos y estudios observacionales, a la estructura de nuestro estudio (cuadro 22.1).

Cuadro 22.1:
Terminología del diseño experimental (experimentos) y muestral (estudios observacionales)

Definición	Estudio observacional	Experimento
Aquellas <i>variables</i> que nosotros manipulamos (experimento) o que medimos a niveles distintos ya preestablecidos (estudio observacional)	Factor o variable independiente	Factor, variable experimental o variable independiente
Variable que medimos y queremos saber cómo responde a nuestra manipulación o a los distintos niveles del factor	Variable, variable de respuesta o variable dependiente	Variable, variable de respuesta o variable dependiente
Distintos niveles de un factor	Nivel	Tratamiento o nivel
Todo el conjunto de material al cuál aplicamos un cierto tratamiento, independientemente del resto de material. Las distintas unidades experimentales que reciben el mismo tratamiento reciben el nombre de réplicas	–	Unidad experimental
Conjunto de material de un cierto nivel del factor, del cual medimos una o más variables. A menudo los ecólogos las llamamos muestras	Unidad muestral	–
Conjunto de unidades muestrales con los mismos niveles del factor o factores (concepto tradicional de muestra en estadística)	Grupo o muestra	Grupo, muestra o combinación de tratamientos

Fuente: Modificado de Sachs (1978).

Los estudios observacionales y los experimentos siguen aproximaciones estadísticas diferentes, lo que se refleja en la terminología utilizada

Si aplicamos esta terminología a nuestros estudios, podremos decidir qué métodos estadísticos utilizar. Por ejemplo, el de la figura 22.1 será un estudio observacional si se trata de un impacto ambiental que ya se ha producido, y será un experimento si es una fertilización o adición de nutrientes controlada por el investigador. En cualquier caso, existen dos factores: la *zona* (con los niveles control e impacto) y el *tiempo* (que tiene múltiples niveles pero del que, básicamente, queremos decidir si existe una diferencia antes y después de la intervención). La *variable de respuesta* es la abundancia de un cierto organismo o cualquier variable que nosotros queramos estudiar cómo se ve afectada por el impacto. La *unidad muestral* o *experimental* es el material en cada una de las zonas en un momento determinado de medición. Podemos considerar que tenemos cuatro muestras resultantes de dos factores con dos niveles cada uno, pero sin replicación. En selección de métodos de la técnica 56 veremos cómo analizar este tipo de datos.

Técnica 56. Análisis de datos

SELECCIÓN DE PROGRAMA INFORMÁTICO

Existen actualmente varios paquetes estadísticos muy completos (por ejemplo, SAS, SPSS, S-plus). La elección entre ellos, a menudo, depende de la disponibili-

dad y tradición de uso en nuestro entorno más inmediato. Sí que es poco recomendable ceñirse sólo a Excel, ya que sus extensiones son limitadas y constriñen la elección de métodos.

Es esencial manejar programas estadísticos completos

Una auténtica revolución estadística es actualmente el entorno R que, a pesar de ser más difícil de aprender, es gratuito y tiene las siguientes ventajas:¹

- Tiene revisiones y actualizaciones muy frecuentes, y constante aparición de paquetes con nuevos métodos; los investigadores estadísticos que desarrollan actualmente nuevos métodos los implementan a menudo en R, por lo que se facilita mucho la transición entre desarrollo de nuevos métodos y su aplicación generalizada.
- Están apareciendo versiones Gui (entorno gráfico similar a Windows o a Macintosh) de algunas aplicaciones, por lo que se facilita el uso.
- Existen numerosos métodos específicamente desarrollados o recomendados para datos ecológicos.² Desarrollado por ecólogos de la Universidad Claude-Bernard Lyon I originalmente para Macintosh, incluye muchas más variantes de técnicas de ordenación (Dolédec et al. 2000, Pelissier et al. 2003, Dray et al. 2003) que las que pueden hacerse con un *software* de más fácil uso pero comercial como CANOCO (Ter Braak y Smilauer 2002, Lepš y Smilauer 2003) que, seguramente, aún es el más utilizado en ecología.
- Flexibilidad para implementar métodos o cálculos propios (por ejemplo, simulaciones).
- Facilidad de repetición de los mismos análisis (ya que se genera un *script*) por el mismo u otros usuarios.

El entorno R ofrece gran variedad de aplicaciones estadísticas gratuitas, aunque no es el programa de más fácil manejo

ANÁLISIS EXPLORATORIO DE DATOS

En cualquier paso de la investigación científica se cometen errores. Una vez introducidos los datos en el programa estadístico elegido, es muy recomendable realizar lo que se llama *análisis exploratorio de datos*, el cual, además de servir para depurar los datos, también sirve para entender las características de los mismos (por ejemplo, la forma de la distribución de las variables de respuesta). Este análisis exploratorio de datos puede consistir en estadística descriptiva, histogramas, gráficas de caja, etc. Resultan muy útiles las gráficas de dispersión entre variables cuantitativas, ya que a menudo nos permiten identificar valores atípicos o *outliers*. Debemos revisar estos valores atípicos y eliminarlos tan sólo en aquellos casos

Un análisis exploratorio de los datos es fundamental para depurar los mismos y comprender el tipo de distribución de las variables

¹ Puede encontrarse información sobre este entorno en <http://www.r-project.org/>

² Véase una relación de ellos en la *Task View: Analysis of Ecological and Environmental Data*, disponible en <http://cran.r-project.org/web/views/Environmetrics.html>. Por ejemplo, el programa ade4, consultable en <http://pbil.univ-lyon1.fr/ADE-4/>

en que estemos convencidos de que se trata de un dato altamente improbable, fruto de error de lectura o anotación; lo mejor es no eliminarlos dada la variabilidad del fenómeno.

SELECCIÓN DE MÉTODOS

Para seleccionar los métodos estadísticos, previa aplicación de la terminología del diseño (véase técnica anterior), debemos establecer las características siguientes para nuestros datos (entre paréntesis la técnica a utilizar):

A fin de seleccionar la técnica estadística adecuada cabe responder estas siete cuestiones

1. *Tipo de estudio.* Experimento con variables cuantitativas (contraste de hipótesis o estadística inferencial), estudio observacional de ecología de comunidades (técnicas de ordenación y clasificación de análisis multivariante).
2. *Tipo de variable/nivel de medida.* Cuantitativa o medida (estadística paramétrica como el análisis de la varianza, la regresión múltiple o los modelos lineales generalizados), ordinal (estadística no paramétrica), categórica binaria o politémica (análisis de frecuencias o de datos categóricos: regresión logística o modelos lineales generalizados con errores binomiales, etc.).
3. *Número de variables.* Una (estadística univariante) o dos variables de respuesta, o bien muchas variables en general (análisis multivariante).
4. *Número de factores.* Uno o más; número de muestras: uno, dos o más.
5. *Objetivo/hipótesis.* Estudiar la tendencia central, la variabilidad, toda la forma de la distribución (pruebas de bondad de ajuste), la relación entre variables (correlación, regresión, análisis multivariante).
6. *¿Tenemos muchos datos ($n > 50$) durante el tiempo (series temporales), o el espacio (estadística espacial)?*
7. *¿Tenemos datos de supervivencia? (análisis de supervivencia)*

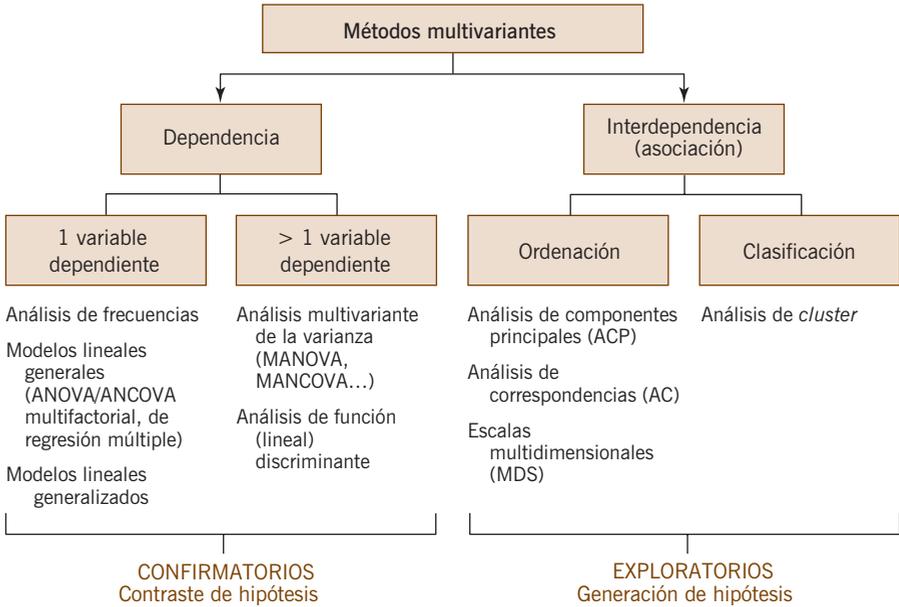
Si respondemos a estas cuestiones podremos escoger entre las principales técnicas univariantes mediante el cuadro 22.1 y entre las multivariantes mediante la figura 22.2. Volvamos a nuestro ejemplo de la figura 22.1 para intentar aplicar estos siete puntos. Imaginemos que medimos para el diseño de la figura 22.1, unas pocas variables de respuesta cuantitativas (por ejemplo, abundancia de unas pocas especies o algunas variables fisicoquímicas). La respuesta a estos siete puntos sería:

1. Si medimos unas pocas variables de respuesta cuantitativas, el objetivo será comparar el control con la zona impactada, y necesitamos estadística inferencial (es decir, contraste de hipótesis).
2. Entre la estadística inferencial, como las variables son cuantitativas usaremos estadística paramétrica. Si tenemos variables fisicoquímicas o abundancias elevadas con pocos cerros, podemos usar modelos lineales (ANOVA, regresión). Si tenemos variables con unos pocos valores discretos (abundancias bajas con

Tipos de variable ESTADÍSTICA ↓	1 muestra 1 var. y 1 factor independientes;	2 muestras 1 var. y 1 factor cuantitativo o 1 var. con medidas repetidas	2 o más muestras dependientes; 1 var. y más que 1 factor cuantitativo o 1 var. con medidas repetidas	OBJETIVO ↓
Nominales o categóricas ANÁLISIS DE FRECUENCIAS	Prueba de ajuste a proporción teórica Prueba de independencia Regresión logística Modelos lineales generalizados			
Ordinales ESTADÍSTICA NO PARAMÉTRICA	Spearman (r_s) Kendall (τ)	Mann-Whitney Wilcoxon	Friedman Kruskal-Wallis	Relación Tendencia central Forma
Cuantitativas ESTADÍSTICA PARAMÉTRICA	Prueba χ^2	Prueba F	Correlación o regresión simple	Correlación o regresión múltiple
	Prueba t	Prueba t muestras independientes	Prueba t datos apareados	Varianzas ANOVA 1 factor comp. múltiples
	Prueba t	Prueba t muestras independientes	Prueba t datos apareados	ANOVA bloques ANCOVA Medias

Cuadro 22.2:
Selección de métodos univariantes en función de las características del diseño del estudio

Figura 22.2:
Selección de métodos multivariantes en función del tipo de datos y el objetivo del estudio



ceros), será preferible usar modelos lineales generalizados (con errores de Poisson para las abundancias).

3. Si tenemos una o muy pocas variables, usaremos estadística univariable. Si tenemos muchas variables, a menudo es útil un análisis multivariante, por ejemplo, el análisis de varianza multivariante MANOVA (véase, por ejemplo, García-Berthou y Moreno-Amich, 1993) o el análisis discriminante; método que está muy relacionado con el anterior.
4. Ya hemos comentado que puede considerarse que tenemos cuatro muestras resultantes de dos factores (antes-después y control-impacto) con dos niveles cada uno.
5. El objetivo en ecología es, en general, estudiar las medias, pero a menudo también sería interesante estudiar las varianzas, aunque metodológicamente es más complicado. En los diseños BACI, en general, se usan el test *t* o ANOVA (cuyas hipótesis hacen referencia a la tendencia central), aunque las técnicas de regresión seguramente son más flexibles.
6. Si tenemos series largas de tiempo ($n > 50$) usar técnicas de series temporales es muy recomendable en un diseño BACI, aunque en ecología no es frecuente tener datos suficientes.
7. Existen métodos desarrollados para tipos de datos específicos, por ejemplo, el análisis de supervivencia cuando nuestra variable de respuesta es la supervivencia de individuos (se trata de un tipo de datos denominado *censurado* porque algunos individuos que han sobrevivido durante todo el experimento pueden morir muy poco después).

En cambio, si para el mismo diseño hemos estudiado la composición de algas o macroinvertebrados (con decenas de especies) y queremos estudiar cómo varía la composición de especies, la respuesta básicamente diferirá en los tres primeros puntos:

1. Se trata de un estudio de ecología de comunidades, donde típicamente tenemos decenas de variables (abundancia de muchas especies) y la estadística inferencial es menos apropiada (aunque las técnicas de ordenación también admiten algún diseño BACI (Lepš y Smilauer 2003)). Por ello, usaremos métodos como las técnicas de ordenación o clasificación (como, por ejemplo, el análisis de correspondencias), que en lugar de métodos de estadística inferencial y confirmación de hipótesis, típicamente son métodos exploratorios y generadores de hipótesis (fig. 22.2).
2. Si tenemos unas pocas variables de presencia o abundancia de especies, éstas son las variables de respuesta (cuantitativas), que se podrían analizar con modelos lineales generalizados, o para datos de presencia-ausencia, con regresión logística. Pero si tenemos decenas de especies y el objetivo es comparar la composición de especies, entonces la variable de respuesta mejor es la «especie», que es categórica *politémica*, y de las que hemos medido las frecuencias u otra estima de abundancia; por ello, habitualmente se usa el *análisis de correspondencias* (que se basa en la descomposición de la tabla de contingencia y la distancia chi-cuadrado).
3. Las técnicas de ordenación y clasificación, tan frecuentemente usadas en ecología de comunidades, se consideran técnicas de análisis multivariante, ya que analizan no unas pocas variables o factores, sino grandes tablas (de especies \times muestras y variables ambientales \times muestras) de muchas *variables*.

Entre los métodos de ordenación (fig. 22.2), podemos escoger entre las técnicas siguientes según el objetivo y tipo de datos (Ter Braak 1988):

1. Análisis indirecto de gradiente.
 - 1.1. Métodos basados en distancias
 - Análisis de coordenadas principales (*metric multidimensional scaling*).
 - Escalas multidimensionales no métricas o *nonmetric multidimensional scaling* (NMDS).
 - 1.2. Álgebra matricial (*eigenanalysis*).
 - 1.2.1. Respuesta lineal.
 - Análisis de componentes principales (ACP).
 - 1.2.2. Respuesta unimodal
 - Análisis de correspondencias (AC) o *reciprocal averaging*.
 - Análisis de correspondencias sin tendencia o *detrended correspondence analysis* (DCA).

2. Análisis directo de gradiente.
 - 2.1. Respuesta lineal
 - Análisis de redundancia (RDA).
 - 2.2. Respuesta unimodal
 - Análisis canónico de correspondencias (CCA).

Las técnicas de análisis indirecto analizan una sola matriz de datos, las de análisis directo se basan en dos matrices

El *NMDS* es un método basado en distancias ampliamente usado en psicología y también en biología marina.³ En cambio, en ecología terrestre y limnología, los métodos más utilizados son las distintas variedades de ACP y análisis de correspondencias.

Las técnicas de *análisis indirecto de gradiente* analizan una sola matriz, por ejemplo, un AC para la abundancia de diatomeas en distintas muestras o un ACP para la fisicoquímica. En cambio, las técnicas de *análisis directo de gradiente* o *análisis restringido (constrained)* como el CCA, analizan al mismo tiempo dos matrices, construyendo que la ordenación de las muestras, según la composición de especies, sea una función lineal (modelo de regresión múltiple) de las variables ambientales (físicoquímicas). Ambos tipos de técnicas (indirectas y directas o *constrained*) tienen objetivos distintos y son alternativas o complementarias: aunque el CCA resume en un solo análisis toda la información, es posible que la principal variación en la composición de especies corresponda a una variable ambiental no medida, por lo que un AC mostraría una ordenación muy distinta (y muy informativa) (Økland 1996). A menudo el CCA es menos robusto y precisa muchas más muestras que variables ambientales (McCune 1997). Buenos manuales para el uso de estas técnicas son Jongman et al. (1995) y Lepš y Smilauer (2003).

VERIFICACIÓN DE SUPUESTOS DEL MODELO

Es importante verificar los supuestos del método estadístico utilizado, pero sin caer en extremismos

La verificación de los supuestos o condiciones en los que se basan los métodos estadísticos es una de las cuestiones que más preocupan a los biólogos, y en las que más malentendidos persisten (Box 1953, Stewart-Oaten 1995, Smith 1995, Johnson 1995). A continuación intentamos aclarar algunos:

1. Las variables biológicas, en general, no siguen *exactamente* la distribución normal, sino más bien la lognormal. La *distribución lognormal* es similar a la normal (ambas son unimodales, es decir, con un solo máximo), pero no puede tomar valores negativos y tiene asimetría positiva. Por eso, las variables biológicas, en general, tienen una distribución *aproximadamente* normal pero la transformación logarítmica (de cualquier tamaño, concentración de sustancias...), suele

³ Véase *software Primer* en <http://www.zen87707.zen.co.uk/primer-e/>

mejorar el ajuste a la normalidad. Por ejemplo, si una variable siguiera la distribución normal tendría que existir entre menos y más infinito. Pero eso raramente se cumple en biología: los tamaños, pesos, concentraciones, etc., no pueden tomar valores negativos.

2. Las variables biológicas suelen mostrar *heteroscedasticidad*, es decir, cuando las medias son diferentes las varianzas también. A menudo, las desviaciones típicas aumentan linealmente con la media y, por eso, la transformación logarítmica tiende a arreglar también el supuesto de homoscedasticidad u homogeneidad de varianzas.
3. La estadística paramétrica es muy *robusta* (poco sensible) a la no normalidad; es decir, sus resultados tienden a ser correctos aunque no se cumpla el supuesto de normalidad. El supuesto de normalidad es poco relevante para la estadística paramétrica.
4. La estadística paramétrica es robusta a la heteroscedasticidad, sobre todo si la replicación es constante (Box 1953). Por lo tanto, el supuesto de homoscedasticidad es más importante que el de normalidad.
5. La robustez del análisis de la varianza (ANOVA) se manifiesta en que, en general, su conclusión es la misma tanto si se considera la variable original como la transformación logarítmica. Sin embargo, en un pequeño porcentaje de casos, la conclusión con la transformación es diferente y más fiable, por lo que es importante transformar los datos apropiadamente o bien usar modelos lineales generalizados (con la distribución de errores adecuada).
6. Las pruebas de homoscedasticidad (sobre todo la de Bartlett) son poco robustas a la no normalidad. Es decir, paradójicamente verificamos supuestos poco importantes para el ANOVA con métodos en que el supuesto de normalidad sí es importante.
7. En el análisis de regresión (y correlación) lineal, el supuesto de linealidad es más importante que los de homoscedasticidad y normalidad, ya que si la relación es claramente no lineal los estadísticos (r , recta de regresión) describirán muy mal los datos. El sesgo de los estadísticos generalmente será mucho mayor si hay no linealidad que si hay heteroscedasticidad o no normalidad.
8. A medida que aumenta el número de datos (réplicas), los resultados de todos los tests son más fiables (propiedad fundamental denominada *consistencia estadística*). Los tests de normalidad tienden a ser poco potentes (muy conservadores), es decir, a no detectar pequeñas desviaciones de la normalidad (resultados no significativos incorrectos, o lo que es lo mismo, errores de tipo II). Cuando aumenta la replicación es más fácil detectar estas pequeñas desviaciones y, por lo tanto, tendemos a encontrar mayor no normalidad; pero cuando aumenta la replicación, el supuesto de normalidad afecta menos al ANOVA. Otra paradoja: detectamos más el no cumplimiento de la normalidad cuando es menos importante.
9. Los métodos gráficos para estudiar la homoscedasticidad y la normalidad son más subjetivos y menos claros que los tests. Pero de hecho, por las paradojas

Al aumentar el número de réplicas, aumenta la fiabilidad de los tests estadísticos

de los puntos 6 y 8, los métodos gráficos son más fiables y útiles (en contra de lo que parece inicialmente), porque nos indican si es adecuado utilizar una transformación y cuál de ellas.

10. A pesar de lo que se piensa muy a menudo, la estadística no paramétrica también hace supuestos. Por ejemplo, el test de Mann-Whitney y el de Kruskal-Wallis suponen que la única diferencia, si la hay, entre los grupos que se comparan es en la tendencia central; y que la dispersión y distribución de los grupos es igual excepto con respecto a la tendencia central (Johnson 1995, Kasuya 2001). Es decir, hacen supuestos similares a la homoscedasticidad y no son ninguna panacea como se suele asumir. En cambio, para las pruebas *t* de Student hay fórmulas que no suponen la homoscedasticidad, por lo que realizan menos supuestos y sus resultados a menudo serán más correctos que los de un método no paramétrico (Johnson 1995). Lo mismo ocurre con los tests de aleatorización o permutación: hacen los mismos supuestos que los paramétricos, excepto el de normalidad (que es irrelevante para estos últimos) (Stewart-Oaten et al. 1992, Hayes 2000).
11. Sólo existen los equivalentes no paramétricos de los diseños experimentales más sencillos. Por ejemplo, la mayoría de paquetes estadísticos no tienen el equivalente no paramétrico de un diseño de bloques aleatorizados o de un ANOVA de medidas repetidas. Por ello, a menudo, se aplican métodos no paramétricos de diseños más simples sin respetar el diseño experimental establecido, lo que puede conducir fácilmente a conclusiones erróneas.

Es más recomendable transformar adecuadamente los datos y aplicar métodos paramétricos que usar métodos no paramétricos

En resumen, los métodos no paramétricos son «sirenas estadísticas» (Johnson 1995) poco recomendables (con la excepción del *coeficiente de correlación de Spearman*, que es una manera rápida de estudiar correlaciones sin buscar la transformación adecuada). En lugar de aplicar métodos no paramétricos, recomendamos estudiar gráficamente (en vez de con contrastes de hipótesis) la distribución de nuestras variables y usar una de las dos opciones siguientes:

1. Aplicar una transformación a los datos y usar métodos paramétricos como los modelos lineales (ANOVA o regresión lineal) o las pruebas *t* de Student. Las transformaciones principales a usar (que son simplemente un cambio de escala que puede tener mucho sentido) son: la logarítmica (para variables medidas como concentraciones, pesos, tamaños, ...), la raíz cuadrada (para variables también con asimetría positiva como frecuencias) y el arcoseno ($\arcsin \sqrt{x}$, para las proporciones) (Sokal y Rohlf 1995).
2. Aplicar *modelos lineales generalizados* (GLM), que extienden los modelos lineales a muchas otras distribuciones y permiten ajustar los supuestos de tipo de distribución, homoscedasticidad y linealidad, de forma independiente. Los GLM (McCullagh y Nelder 1989) incluyen los modelos lineales como caso particular (cuando se usan errores normales y función *link* identidad) y podemos

utilizar errores de Poisson para variables de frecuencia (por ejemplo, número de individuos) y errores binomiales para las proporciones o variables de presencia-ausencia (o incluso la regresión logística, que es matemáticamente equivalente a un GLM con errores binomiales y función *link* logit).

22.2. Bibliografía

- BOX G.E.P. «Non-normality and tests on variances». *Biometrika* 40 (1953): 318-335.
- BOX G.E.P. «Science and statistics». *Journal of the American Statistical Association* 71 (1976): 791-799.
- BOX G.E.P. «Robustness in the strategy of scientific model building». (Citado en Cook y Weisberg 1997.) En R.L. Launer, y G.N. Wilkinson, eds. *Robustness in statistics*. Nueva York: Academic Press, 1979: 201-236.
- BOX J.F. *R.A. Fisher. The life of a scientist*. Nueva York: Wiley, 1978.
- CARPENTER S.R. «Large-scale perturbations: Opportunities for innovation». *Ecology* 71 (1990): 2038-2043.
- CARPENTER S.R, FROST T.M, HEISEY D., y KRATZ T.K. «Randomized intervention analysis and the interpretation of whole-ecosystem experiments». *Ecology* 70 (1989): 1142-1152.
- COOK R.D., y WEISBERG S. «Graphics for assessing the adequacy of regression models». *Journal of the American Statistical Association* 92 (1997): 490-499.
- DIAMOND J. «Overview: Laboratory experiments, field experiments, and natural experiments». En J. Diamond, y T.J. Case, eds. *Community Ecology*. Nueva York: Harper and Row, 1986: 3-22.
- DOLÉDEC S., CHESEL D., y GIMARET-CARPENTIER C. «Niche separation in community analysis: A new method». *Ecology* 81 (2000): 2914-2927.
- DOWNES B.J., BARMUTA L.A., FAIRWEATHER P.G., FAITH D.P., KEOUGH M.J., LAKE P.S., MAPSTONE B.D., y QUINN G.P. *Monitoring ecological impacts: Concepts and practice in flowing waters*. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.
- DRAY S., CHESEL D., y THIOULOUSE J. «Co-inertia analysis and the linking of ecological data tables». *Ecology* 84 (2003): 3078-3089.
- GARCIA-BERTHOU E., y MORENO-AMICH R. «Multivariate analysis of covariance in morphometric studies of the reproductive cycle». *Canadian Journal of the Fisheries and Aquatic Sciences* 50 (1993): 1394-1399.
- GEARY R.C. «Testing for normality». *Biometrika* 34 (1947): 209-242.
- GREEN R.H. *Sampling design and statistical methods for environmental biologists*. Nueva York: John Wiley and Sons, Inc., 1979.
- HAYES A.F. «Randomization tests and the equality of variance assumption when comparing group means». *Animal Behaviour* 59 (2000): 653-656.
- HURLBERT S.H. «Pseudoreplication and the design of ecological field experiments». *Ecological monographs* 54 (1984): 187-211.
- HURLBERT S.H. «On misinterpretations of pseudoreplication and related matters: A reply to Oksanen». *Oikos* 104 (2004): 591-597.
- JOHNSON D.H. «Statistical sirens: The allure of nonparametrics». *Ecology* 76 (1995): 1998-2000.
- JONGMAN R.H.G., TER BRAAK C.J.F., y VAN TONGEREN O.F.R., eds. *Data analysis in community and landscape ecology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

- KASUYA E. «Mann-Whitney U test when variances are unequal». *Animal Behaviour* 61 (2001): 1247-1249.
- LEPŠ J., y ŠMILAUER P. *Multivariate analysis of ecological data using CANOCO*. Cambridge: Cambridge University Press, 2003.
- MCCULLAGH P., y NELDER J.A. *Generalized linear models*. Nueva York: Chapman and Hall, 1989.
- MCCUNE B. «Influence of noisy environmental data on canonical correspondence analysis». *Ecology* 78 (1997): 2617-2623.
- ØKLAND R.H. «Are ordination and constrained ordination alternative or complementary strategies in general ecological studies?». *Journal of Vegetation Science* 7 (1996): 292.
- OSENBERG C.W., M. B.B., WHITE J.S., ST. MARY C., y SHIMA J.S. «Statistical issues and assessment of ecological restorations: Lessons from marine reserves». En D. Falk, N. Palmer, and J. Zedler, eds. *Foundations of restoration ecology*. Washington, D.C.: Island Press, 2006: 280-302.
- PELISSIER R., COUTERON P., DRAY S., y SABATIER D. «Consistency between ordination techniques and diversity measurements: Two strategies for species occurrence data». *Ecology* 84 (2003): 242-251.
- SACHS L. *Estadística aplicada*. Barcelona: Ed Labor, 1978.
- SMITH S.M. «Distribution-free and robust statistical methods: Viable alternatives to parametric statistics?». *Ecology* 76 (1995): 1997-1998.
- SOKAL R.R., y ROHLF F.J. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. Nueva York: Freeman, 1995.
- STEWART-OATEN A. «Rules and judgments in statistics: Three examples». *Ecology* 76 (1995): 2001-2009.
- STEWART-OATEN A., y BENCE J.R. «Temporal and spatial variation in environmental impact assessment». *Ecological monographs* 71 (2001): 305-339.
- STEWART-OATEN A., BENCE J.R., y OSENBURG C.W. «Assessing effects of unreplicated perturbations: No simple solutions». *Ecology* 73 (1992): 1396-1404.
- TER BRAAK C.J.F. «A theory of gradient analysis». *Advances in Ecological Research* 18 (1988): 271-317.
- TER BRAAK C.J.F., y ŠMILAUER P. *CANOCO reference manual and CANODRAW for Windows user's guide: Software for canonical community ordination (version 4.5)*. Ithaca, Nueva York: Micro-computer Power, 2002.

Preparación de soluciones *stock* y reactivos (Técnica 24)

A.1. Preparación de las soluciones *stock* utilizadas en el procedimiento de extracción y purificación del DNA

Tris 1 M (1 L)

- Disolver 121,1 g de Tris base en 800 mL de agua Milli-Q.
- Ajustar el pH a 8 añadiendo aproximadamente 42 mL de HCl.
- Llevar el volumen a 1 L con agua Milli-Q.
- Autoclavar durante 30 minutos.
- Almacenar a 4 °C. Si la solución es amarillenta descartarla y preparar una nueva con Tris Base de mejor calidad.

Tampón Tris 10 mM (500 mL)

- Añadir 5 mL de la solución *stock* Tris base 1 M a 490 mL de agua Milli-Q.
- Ajustar el pH a 7,4 con unas gotas de HCl.
- Llevar el volumen a 500 mL con agua Milli-Q.
- Autoclavar durante 30 minutos.
- Almacenar a 4 °C.

EDTA 0,5 M (1 L)

- Disolver 186,1 g de EDTA disódico - 2H₂O en 800 mL de agua Milli-Q.
- Ajustar el pH a 8 mediante la adición de unos 20 g de lentejas de NaOH. El EDTA no se disuelve hasta que el pH está ajustado a 8.

- Llevar el volumen a 1 L con agua Milli-Q.
- Autoclavar durante 30 minutos.
- Almacenar a 4 °C.

Tampón TE (Tris-EDTA) (500 mL)

- Tomar 495 mL de la solución *stock* de tampón Tris 10 mM.
- Añadir 1 mL de la solución *stock* 0,5 M de EDTA.
- Ajustar el pH a 7,4 con unas gotas de HCl.
- Llevar el volumen a 500 mL con agua Milli-Q.
- Autoclavar durante 30 minutos.
- Almacenar a 4 °C.

Solución CTAB/NaCl (10% CTAB en 0,7 M de NaCl)

- Disolver 4,1 g de NaCl en 80 mL de agua Milli-Q.
- Calentar a 65 °C en un agitador magnético con bloque calefactor.
- Agitando, añadir lentamente 10 g de CTAB (bromuro de hexadecil trimetil amonio).
- Ajustar el volumen final a 100 mL con agua Milli-Q.
- Almacenar a temperatura ambiente (no refrigerar, porque el CTAB precipita).

Tampón TESC (1 L)

- Disolver 87,66 g de NaCl en 500 mL de agua Milli-Q (solución 1,5 M de NaCl).
- Añadir 100 mL de la solución *stock* Tris base 1 M.
- Añadir 200 mL de la solución *stock* 0,5 M de EDTA.
- Calentar a 65 °C en un agitador magnético con bloque calefactor.
- Agitando, añadir lentamente 10 g de CTAB (bromuro de hexadecil trimetil amonio).
- Llevar el volumen a 1 L con agua Milli-Q.
- Comprobar el pH (debe ser aproximadamente 8), ajustar si es necesario.
- Autoclavar durante 30 minutos.
- Almacenar a temperatura ambiente (no refrigerar, porque el CTAB precipita).

Solución 10% de SDS

- Para pesar el SDS (dodecilsulfato sódico) debe utilizarse mascarilla, ya que el SDS se dispersa fácilmente, y debe limpiarse cuidadosamente la balanza y el área de pesado. La solución se prepara en una botella estéril de vidrio Pyrex.
- Disolver 25 mL de SDS en 175 mL de agua Milli-Q estéril, calentando para favorecer la disolución.
- Llevar el volumen a 250 mL con agua Milli-Q.
- Ajustar el pH a 7,2 con soluciones estériles de HCl (1% v/v) o NaOH (1% p/v).

- Aflojar el tapón y poner en el microondas durante 2 o 3 minutos, para inactivar posibles enzimas.
- Almacenar a temperatura ambiente (no refrigerar, porque el SDS precipita).

Solución de proteinasa K

- Disolver 20 mg de proteinasa K en 1 mL de agua Milli-Q.
- Filtrar a través de un filtro estéril de 0,2 μm de poro y colocar en un tubo Eppendorf estéril de 1,5 mL.
- Congelar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Solución 10 mg/mL de lisozima

- Inmediatamente antes de su uso, disolver lisozima en polvo a una concentración de 10 mg/mL en la solución 10 mM de Tris (pH = 8, comprobar antes de añadir la lisozima).

Solución PCI (fenol:cloroformo:alcohol isoamílico) (25:24:1) (250 mL)

- Preparar la mezcla en una campana de gases, con guantes. La solución PCI es inflamable y el fenol y el cloroformo son potencialmente cancerígenos. La solución se prepara en una botella estéril de vidrio Pyrex.
- Añadir 5 mL de alcohol isoamílico.
- Añadir 120 mL de cloroformo.
- Añadir 125 mL de fenol.
- Mezclar bien.
- Cubrir la botella con papel de aluminio para evitar la incidencia de la luz.
- Almacenar a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Solución CI (cloroformo:alcohol isoamílico) (24:1) (250 mL)

- Preparar la mezcla en una campana de gases, con guantes. La solución CI es inflamable y el cloroformo es potencialmente cancerígeno. La solución se prepara en una botella estéril de vidrio Pyrex.
- Añadir 10 mL de alcohol isoamílico.
- Añadir 240 mL de cloroformo.
- Mezclar bien.
- Cubrir la botella con papel de aluminio para evitar la incidencia de la luz.
- Almacenar a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A.2. Procedimiento para realizar la electroforesis en gel de agarosa del producto amplificado. Preparación de reactivos

Los reactivos utilizados se prepararan de la siguiente manera:

Solución *stock* 50X de tampón TAE (Tris/acetato/EDTA)

- Pesar 242 g de Tris base.
- Añadir 57,1 mL de ácido acético glacial.
- Añadir 37,2 g de EDTA disódico dihidratado.
- Llevar a 1 litro con agua Milli-Q.

Tampón de carga con azul de bromocresol (para 50 mL)

- En un frasco Erlenmeyer de 50 mL, añadir 6 mL de tampón TAE 50X.
- Añadir 7,5 g de ficol.
- Añadir 0,125 g de azul de bromocresol.
- Calentar en un baño a 60 °C hasta que se disuelva.
- Completar el volumen hasta 50 mL.

El tampón transparente se prepara de la misma manera pero sin añadir azul de bromocresol.

A.3. Reactivos específicos DGGE

- Solución 40% de acrilamida:bisacrilamida (37:1). Usar preferiblemente la mezcla comercial preparada para su uso directo.
- Solución de APS (persulfato amónico). Preparar una solución al 10% (p/v) en agua Milli-Q. Preparar alícuotas y congelar a -20 °C hasta su utilización.

Glosario de términos

- *absorbancia*: densidad óptica de una solución a una longitud de onda determinada.
- *acuífero*: masa de rocas o sedimentos con capacidad para almacenar y liberar agua. Se aplica al área bajo la superficie terrestre donde se halla almacenada el agua de la superficie.
- *agradación*: acumulación de sedimentos en sistemas fluviales acontecida cuando los aportes superan la cantidad que puede ser arrastrada; ello provoca, consecuentemente, la colmatación del cauce.
- *alelopático*: dicese de los metabolitos involucrados en la defensa (química) de las plantas.
- *alóctono*: dicese del material de origen externo al sistema fluvial.
- *anádromo*: dicese de los peces que, principalmente, viven en agua marina y se reproducen en las aguas continentales.
- *anfídromo*: dicese de los peces que se mueven entre el sistema fluvial y el marino durante su ciclo vital, pero no en su reproducción.
- *arreica*: se denomina así, la cuenca cuyas aguas no desembocan ni en lagos ni en mares.
- *autótrofo*: dicese del organismo que basa su funcionamiento en la síntesis del carbono orgánico a partir de carbono inorgánico y energía externa, generalmente lumínica.

- *BACI*: acrónimo de *before-after-control-impact*, corresponde a un diseño estadístico que considera los citados factores del acrónimo, para evidenciar el efecto de una perturbación en un ecosistema sobre una o varias variables.
- *biofilm*: película orgánica formada por microorganismos de distintos tipos, que se desarrolla sobre superficies sólidas en contacto con el agua.
- *biogeoquímico*: corresponde al conjunto de procesos que afectan a los elementos químicos que forman parte de los seres vivos, y que discurren o se acumulan en la biosfera. Se refiere a los ciclos de elementos tales como el nitrógeno, fósforo y carbono.
- *bioindicador*: organismo usado como indicador de los cambios ecológicos en los ecosistemas. Se aplica a las diatomeas, cianobacterias, macrófitos, macroinvertebrados o peces, entre otros.
- *bivoltino*: término que se aplica a los ciclos de vida y de poblaciones; denota la existencia de dos generaciones de individuos por año.
- *capa límite*: la de agua que, por estar en contacto con el sustrato, experimenta una disminución de velocidad exponencial.
- *carga de fondo*: cantidad de partículas arrastradas por el río, pero que por su gran tamaño no están suspendidas en el agua, sino arrastradas o dando tumbo sobre el lecho.
- *carga disuelta*: cantidad de solutos transportados por un volumen de agua.
- *carga en suspensión*: cantidad transportada de partículas finas, que permanecen en suspensión.
- *carga particulada*: cantidad transportada de partículas finas y gruesas.
- *cascada trófica*: relación de interdependencia entre los distintos grupos tróficos en un ecosistema, por la cual los efectos sobre un nivel pueden incidir en otros situados por encima (*bottom-up*) o por debajo (*top-down*).
- *catádro*: se refiere a los peces que viven en aguas continentales y se reproducen en el medio marino.
- *cauce*: parte del sistema fluvial por donde discurren las aguas.
- *cauce húmedo*: zona del cauce cubierta por agua.
- *caudal basal*: el transportado cuando hace tiempo que no ha llovido, y que, en su mayor parte, proviene de la descarga de los acuíferos.
- *caudal de tormenta*: el transportado durante los episodios de precipitación intensa, y que puede provocar avenidas.
- *cebador*: secuencia corta de ácido nucleico que actúa como punto de inicio para la edición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde.
- *ciclo de vida*: secuencia de procesos de crecimiento, desarrollo, mortalidad y reproducción que enlaza una generación con la siguiente.

- *ciclo hidrológico*: normalmente, el referido al global del agua en el planeta.
- *coeficiente de reaíreación*: tasa que mide el grado en que el agua intercambia gases con la atmósfera y que depende, principalmente, de la turbulencia.
- *cohorte*: grupo de organismos de la misma población que nacen y se desarrollan a la vez.
- *conductímetro*: aparato que permite medir la conductividad eléctrica del agua.
- *conidio*: espora asexual de hongos, formada directamente a partir de una hifa o célula conidiógena o esporógena.
- *corer*: cilindro usado para recoger materiales del sedimento.
- *correntímetro*: aparato que permite medir la velocidad de la corriente del agua.
- *cuantómetro*: aparato que permite medir la intensidad o irradiancia de la luz solar.
- *curva de gastos*: relación entre el nivel del agua y el caudal en una estación de aforo.
- *curva de supervivencia*: representación de la relación entre la cantidad de organismos vivos en una población y su edad.
- *detritívoro*: organismo que se alimenta de detritus o materia orgánica muerta.
- *detritus*: en general, materia orgánica muerta; a veces se utiliza para referirse a la materia orgánica parcialmente descompuesta y cuyo origen es difícil de precisar.
- *diádromos*: dicese de los peces que viajan entre aguas salada y dulce.
- *día-pausa*: período de latencia en el que entran algunos organismos o sus huevos. Está desencadenado por factores ambientales (fotoperíodo, temperatura, etc.), pero causada por factores internos (adquiridos evolutivamente por la especie).
- *distancia de asimilación*: la que recorre, en promedio, un nutriente en su forma disuelta a lo largo del río hasta que es asimilado por la biota.
- *distancia de retorno*: la que recorre un átomo, en promedio, en el compartimento biótico hasta que es liberado de nuevo como nutriente inorgánico.
- *ecotono*: zona de transición entre dos ecosistemas distintos, y que puede albergar especies diferentes de las áreas que separa.
- *ectoenzima*: enzima adherida a la pared externa de las células (generalmente bacterianas).
- *emergencia*: paso del medio acuático al aéreo, que se produce especialmente en insectos acuáticos coincidiendo con la metamorfosis a adulto.
- *endorreica*: se refiere a la cuenca en que la evaporación es mayor que la entrada por precipitación.

- *energía exosomática*: la externa (luz, viento, etc.) que favorece el aumento de la producción primaria en un ecosistema, pero sin llegar a incorporarse a la biomasa.
- *enzima extracelular*: la que actúa fuera de la célula, bien por estar ligada a la célula (ectoenzima) o por estar libre en el medio.
- *epifítico*: dicese del que se encuentra y desarrolla sobre organismos vegetales vivos.
- *epilítico*: dicese del que se encuentra y desarrolla sobre las piedras. Comúnmente referido al biofilm.
- *epipsámico*: dicese del que se encuentra sobre arenas.
- *ergosterol*: componente lipídico de la membrana de los hongos.
- *escorrentía*: lámina de agua que circula por la cuenca, resultado de la diferencia entre la precipitación y la infiltración y evapotranspiración.
- *espiráculo*: orificio que comunica el aparato respiratorio traqueal de los insectos con el exterior. En algunos insectos acuáticos permite la entrada de aire atmosférico al contactar con la superficie del agua.
- *espiral de nutrientes*: expresión que resume la dinámica de nutrientes en ríos como resultado de su retención y transporte.
- *estadios de desarrollo*: cada una de las fases por las que atraviesan los organismos durante su ciclo vital. Se refiere especialmente a aquellos organismos que sufren cambios acentuados, como metamorfosis.
- *estequiometría*: expresión de las relaciones cuantitativas entre reactivos y productos que participan de una reacción química. Se aplica a las relaciones entre elementos de la materia viva.
- *estrategia alimentaria*: tipologías de alimentación de los consumidores. Los distintos grupos tróficos funcionales se definen en base a estas estrategias.
- *fenología*: estudio de la periodicidad en la que suceden los procesos naturales (por ejemplo, la floración, la aparición de las hojas, etc.).
- *fijación*: conservación de muestras biológicas añadiéndoles determinados compuestos.
- *fingerprinting*: en el análisis genético, separación visual de la mezcla de DNA en función del polimorfismo en la secuencia o de la longitud de los fragmentos.
- *fluorímetro*: aparato que permite medir la fluorescencia de una disolución al ser excitada por la luz.
- *freático*: dicese del nivel superior del agua que se acumula en el suelo por infiltración. Por debajo del nivel freático, el sedimento está saturado de agua.
- *Froude (número de)*: el que relaciona las fuerzas inerciales de un fluido con las de la gravedad.

- *gémulas/estatablastos*: formas de resistencia características de los poríferos y briozoos de agua dulce, respectivamente, que se producen en condiciones adversas. Consisten en cápsulas que contienen células no diferenciadas capaces de regenerar nuevos individuos.
- *glándula de la seda*: órgano que presentan algunos insectos acuáticos destinado a producir filamentos pegajosos de seda que les permiten mantenerse sujetos al sustrato, construir habitáculos o redes alimentarias.
- *grado-día*: cantidad de calor acumulado en un cierto período y calculado como la suma de las temperaturas medias diarias durante un determinado tiempo.
- *hidrograma*: gráfico que expresa la variación de caudal durante un período concreto.
- *hiporreos*: compartimento inferior al superficial en el cauce fluvial e íntimamente conectado a éste, con dinámica hidrológica, biogeoquímica y biota características.
- *irradiancia*: intensidad de luz visible.
- *histéresis*: comportamiento no lineal de las relaciones concentración/caudal que difieren entre la rama ascendente y la descendente del hidrograma.
- *isótopo estable*: forma isotópica de un elemento químico no sujeta a desintegración radiactiva, manteniéndose estable su peso molecular.
- *lago en herradura*: el de origen fluvial, de forma de herradura y, normalmente, formado por estrangulación de antiguos meandros.
- *lenítico*: dicese de sistema lacustre o de aguas estancadas.
- *lixiviación*: proceso de disolución de materiales solubles orgánicos.
- *llanura de inundación*: zona terrestre vecina al cauce fluvial, y que puede inundarse periódicamente.
- *lótico*: referido a río.
- *macrófito*: por oposición a micrófito, organismo vegetal acuático visible macroscópicamente.
- *meiofauna*: pequeños invertebrados bentónicos que pueden pasar a través de un poro de 1 mm de diámetro y que quedan retenidos por un poro de 45 μ m.
- *metabolismo*: en un ecosistema fluvial, se refiere a los procesos de producción y respiración que ocurren en él.
- *mota*: elevación de tierra, construida normalmente sobre las márgenes, para evitar que se desborden los ríos y proteger poblaciones y propiedades humanas.
- *necromasa*: materia orgánica muerta.
- *orden de río*: sistema de clasificación de las entidades de un tramo fluvial en función de la red de drenaje situada aguas arriba.

- *perifiton*: micrófitos, algas microscópicas bentónicas.
- *período de reclutamiento*: intervalo en el que se incorporan organismos a una población por nacimiento de nuevos individuos.
- *perturbación*: episodio de energía superior a la habitual, que causa una alteración en la estructura y en el funcionamiento del ecosistema. Las perturbaciones de mayor energía pueden tener efectos catastróficos.
- *piezómetro*: pozo de pequeño diámetro que se clava en el sedimento o en el suelo para medir la altura de las aguas freáticas o hiporreicas.
- *plancton*: organismos que viven en suspensión en la columna del agua en sistemas leníticos o en ríos muy lentos.
- *plastrón*: mecanismo de respiración de algunos insectos acuáticos caracterizado por una zona con pilosidad abundante sobre los espiráculos respiratorios, que crea una fina película de aire y permite el intercambio de gases con el agua.
- *población cerrada*: la de individuos sin inmigración ni emigración. Cuando no es así, se habla de población abierta.
- *poza*: área del cauce amplia y profunda, en la que el río disminuye su velocidad y en la que se favorece la sedimentación de materiales.
- primer [Véase *cebador*].
- *prístino*: dicese del ecosistema libre de cualquier perturbación originada por actividad humana.
- *producción primaria*: proceso mediante el cual los organismos sintetizan materia orgánica a partir de carbono inorgánico. Aunque la fuente de energía más común es la radiación solar, es posible que se efectúe mediante el uso de energía química.
- *producción secundaria*: tasa de generación de biomasa por una población de heterótrofos.
- *propágulo*: elementos de reproducción asexual en algas y plantas que viajan por el agua o mediante organismos dispersores.
- *pupación*: transformación de la última fase larvaria de los insectos al estadio de pupa; un estado inactivo inmediatamente anterior a la de adulto.
- *quelante*: proceso de enlace a un ion metálico. Los compuestos que forman complejos se llaman agentes quelantes.
- *quenching*: incorporación no biótica de radiactividad, por ejemplo, la asociada a la adsorción al sustrato.
- *quimismo*: química del agua.
- *radiación fotosintéticamente activa*: radiación solar emitida en el rango visible, entre 400 y 700 nm, útil para la fotosíntesis.

- *rambla*: cauce con caudal temporal, frecuentemente de tipo torrencial.
- *rasgo biológico*: característica de los organismos vivos referente a su morfología, ciclo vital, reproducción, dispersión, fisiología o comportamiento.
- *redox*: dicese de las reacciones de reducción y oxidación.
- *régimen hidrológico*: patrón hidrológico de un sistema fluvial.
- *rendimiento fotónico efectivo*: eficiencia fotoquímica en el transporte de electrones en el aparato fotosintético.
- *Reynolds (número de)*: el adimensional que relaciona las fuerzas inerciales de un fluido con las de viscosidad o resistencia de éste al desplazamiento.
- *ribera (de)* [Véase *ripario*].
- *ripariano* [Véase *ripario*].
- *ripario*: dicese de la franja de vegetación herbácea, arbustiva o arbórea que se desarrolla en la zona hidrológicamente conectada al sistema fluvial.
- *seudorreplicación*: en estadística, análisis incorrecto que usa la variación dentro de la unidad experimental como error experimental.
- *servicio (del ecosistema)*: funciones del ecosistema que derivan de su funcionamiento y que proveen con bienes o beneficios a la sociedad humana.
- *sonicación*: proceso de aplicación de energía de ultrasonidos suficiente para agitar las partículas adheridas a una superficie y desprenderlas de ésta.
- *subcapa difusiva*: la de agua de unos pocos micrómetros de profundidad, en contacto con el sustrato.
- *subcapa viscosa*: aquella en la que la fricción interna del agua rivaliza con la mezcla turbulenta de las capas superiores.
- *Surber*: red de recolección de macroinvertebrados que permite muestreos cuantitativos.
- *termistor*: aparato eléctrico para medir la temperatura del agua.
- *thalweg*: dicese de la línea longitudinal que constituye la parte más profunda del cauce fluvial.
- *tiempo de recurrencia*: el que, por término medio, tarda en acontecer un episodio de un caudal determinado.
- *titración* [Véase *titulación*].
- *titulación*: método cuantitativo de análisis químico usado para determinar la concentración de un sustrato.
- *trazador*: elemento conservativo (cloruro o bromuro) que permite analizar la dinámica hidrológica de un sistema: también se aplica a elementos fluorescentes que efectúan la misma función.

- *univoltino*: dícese del ciclo de vida con una sola generación de organismos por año.
- *vadosa (zona)*: la parcialmente saturada del suelo entre la superficie de éste y el nivel freático del agua subterránea.
- *valoración* [Véase *titulación*].
- *velocidad de asimilación*: aquella a la que se mueve una molécula de nutriente desde la columna de agua al sedimento o biofilm.
- *voltinismo*: número de generaciones por año de un organismo vivo: así, el término semivoltino equivale a una generación de más de un año, univoltino a una generación por año y multivoltino a varias generaciones por año.
- *zona de retención transitoria*: estructuras que retienen el flujo de las aguas río abajo; el agua retenida de forma transitoria en estas estructuras (hiporreos, barras de arena, etc.) se entretiene durante un tiempo superior al tiempo medio de residencia de la masa de agua que se mueve libremente en el cauce (ZRT).
- *zona vadosa* [Véase *vadosa (zona)*].

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Índice de cuadros

Cuadro 1.1:	Volumen de agua en los distintos compartimentos por los que discurre el ciclo hidrológico global terrestre	15
Cuadro 1.2:	Funciones de los ecosistemas fluviales que pueden traducirse en servicios	21
Cuadro 3.1:	Factores de cuenca que tienen especial relevancia sobre los ecosistemas fluviales	41
Cuadro 3.2:	Características de los ríos especialmente ligadas a los factores de cuenca	42
Cuadro 3.3:	Actividades humanas y principales efectos en la cuenca	43
Cuadro 4.1:	Lista de material necesario para la ejecución de una adición a flujo constante y a pulso	63
Cuadro 5.1:	Tipos de sustrato, según la escala de Wentworth (1922)	81
Cuadro 5.2:	Viscosidad cinemática del agua, según Gordon et al. (1992)	82
Cuadro 7.1:	Lista de los solutos y métodos analíticos descritos en el capítulo 7	101
Cuadro 7.2:	Peligrosidad específica de los reactivos utilizados en el capítulo 7	102
Cuadro 7.3:	Material de laboratorio necesario para el desarrollo de las técnicas analíticas descritas	104
Cuadro 10.1:	Materia orgánica particulada gruesa bentónica (MOPGB) (exceptuando restos grandes de madera) en varios ríos	151
Cuadro 10.2:	Tasas de renovación (entradas terrestres/acumulación en el lecho) de la materia orgánica (exceptuando restos grandes de madera) en varios ríos	163
Cuadro 10.3:	Balance anual de MOPG	165
Cuadro 11.1:	Procedimiento de muestreo para la comunidad microbiana en distintos hábitats fluviales	171
Cuadro 11.2:	Contenido de ergosterol en diferentes sustratos fluviales (hojas, madera y grava)	181
Cuadro 11.3:	Métodos moleculares más habituales para el estudio de la diversidad microbiana acuática	182
Cuadro 11.4:	Material necesario para cada uno de los pasos	184
Cuadro 11.5:	Cantidades de reactivos en (mL) a añadir para preparar las soluciones desnaturizantes a aplicar en el generador de gradientes	195

Cuadro 11.6: Cantidades mínimas de DNA monoespecífico (de una misma secuencia) necesarias para la secuenciación	199
Cuadro 11.7: Enzimas extracelulares más habituales en estudios de ecología fluvial	212
Cuadro 12.1: Segundas referencias bibliográficas de utilidad para identificar las algas de ambientes fluviales	227
Cuadro 12.2: Composición del medio de cultivo Chu No.10 D modificado	230
Cuadro 12.3: Composición del medio de cultivo BG11	231
Cuadro 12.4: Composición del medio de cultivo de Allen y Arnon	232
Cuadro 14.1: Clasificación de los tipos de sustrato que se pueden encontrar en el río	256
Cuadro 14.2: Algunas claves taxonómicas para la identificación de meiofauna, especialmente indicadas para América Latina	261
Cuadro 14.3: Algunas claves taxonómicas para la identificación de meiofauna, especialmente indicadas para Europa	262
Cuadro 14.4: Algunos ejemplos de rasgos biológicos y sus correspondientes categorías relacionadas con características morfológicas	264
Cuadro 14.5: Algunos ejemplos de rasgos biológicos y sus correspondientes categorías relacionadas con características del ciclo vital	264
Cuadro 14.6: Algunos ejemplos de rasgos biológicos y sus correspondientes categorías relacionadas con características reproductivas y de dispersión	265
Cuadro 14.7: Algunos ejemplos de rasgos biológicos y sus correspondientes categorías relacionadas con características fisiológicas y de comportamiento	265
Cuadro 17.1: Relación entre las funciones de la vegetación de ribera y los principales atributos que influyen en esas funciones ecológicas	315
Cuadro 18.1: Cálculo de la producción secundaria de <i>S. torrentium</i> utilizando el método del crecimiento instantáneo	340
Cuadro 18.2: Cálculo de la producción secundaria de <i>Siphonoperla torrentium</i> (Pictet) en la cabecera de un río del norte de España por el método de la frecuencia de los tamaños	344
Cuadro 19.1: Ejemplo de matriz trófica para el musgaño patiblanco, <i>Neomys fodiens</i> ...	356
Cuadro 19.2: Porcentaje de C, N y P y sus correspondientes relaciones molares en el arroyo de Fuirosos (Cataluña, NE de España)	357
Cuadro 19.3: Matriz de interacciones tróficas	364
Cuadro 19.4: Cálculo de los parámetros de la red trófica del arroyo Fuirosos, en primavera	364
Cuadro 20.1: Técnicas de medida de metabolismo en ríos, requerimientos y aplicaciones potenciales	370
Cuadro 20.2: Ecuaciones empíricas para calcular el coeficiente de reaeración (k_{O_2}) ..	381
Cuadro 21.1: Resumen de las ventajas y limitaciones asociadas al uso de canales en ecología fluvial	388

Cuadro 22.1: Terminología del diseño experimental (experimentos) y muestral (estudios observacionales) 402

Cuadro 22.2: Selección de métodos univariantes en función de las características del diseño del estudio 405

Índice de figuras

Figura 2.1: Esquema del funcionamiento ecológico de un bosque (*izquierda*), de un lago (*centro*) y de un río (*derecha*) 24

Figura 2.2: Ejemplo de red trófica en un río pampeano, donde se muestra de un modo simplificado la complejidad de las interacciones tróficas 25

Figura 2.3: Factores de la cuenca que determinan la morfología y dinámica del sistema fluvial 27

Figura 2.4: Esquema de los compartimentos existentes en un río de cabecera e indicación de algunas de las principales interacciones entre ellos 28

Figura 2.5: Esquema de la biota típica en un río ibérico. Organismos de aguas rápidas (*izquierda*) y de aguas lentas (*derecha*) 29

Figura 2.6: Variaciones diarias y mensuales en el biovolumen de la comunidad de diatomeas bentónicas de un río tropical andino y su respuesta al caudal 31

Figura 3.1: El ciclo hidrológico 40

Figura 3.2: Cuenca hidrográfica 40

Figura 3.3: Trazado del contorno (*en negro*) de una cuenca de drenaje sobre un mapa topográfico 46

Figura 3.4: Trazado del contorno (*en magenta*) de una cuenca de drenaje sobre una ortofotografía 47

Figura 4.1: Esquema hipotético de un río árido con la cabecera en clima húmedo, que alterna tramos perennes con otros intermitentes y temporales, y tramos ganadores y perdedores de agua 52

Figura 4.2: Hidrograma de tormenta idealizado. Una tormenta produce un evento de lluvia en una cuenca, y el agua llega con un retraso determinado a la estación de aforo, donde produce un aumento rápido del caudal y una disminución más pausada hasta volver al caudal basal 53

Figura 4.3: Caudales diarios durante 2005 de dos ríos muy diferentes: Agüera, pequeño río en la península Ibérica, y Amazonas en Óbidos, Brasil, la mayor estación de aforo del mundo 55

Figura 4.4: Ejemplo de una curva de advección-dispersión y de retención transitoria (ADRT) obtenida durante una adición a flujo constante y utilizada para estimar los valores de los parámetros de retentividad (k_1 , k_2 y A_{ZRT}) 60

Figura 4.5: Ejemplo de sección fluvial en la que se han tomado 16 medidas de velocidad (círculos con asa), y asignación de la superficie a cada medida (m/s) 65

Figura 4.6:	Histograma de frecuencias de los máximos caudales medios diarios que han pasado durante un año natural por la estación de aforo de Roda de Ter, en el río Ter (España), durante el período 1950-2007	66
Figura 4.7:	Función de distribución de probabilidad de excedencia de un determinado caudal máximo anual para la serie de valores medios diarios en un año natural, para el período 1950-2007 en el río Ter, a la entrada del embalse de Sau	67
Figura 4.8:	Análisis de frecuencias para los valores máximos de caudales medios diarios medidos durante un año natural en Roda de Ter, durante el período 1950-2007	68
Figura 5.1:	Diversos tipos de río: a) gran río de llanura, b) río trezado de piedemonte, c) río temporal de desierto, d) arroyo de montaña, e) arroyo de lecho arenoso y f) arroyo travertínico	72
Figura 5.2:	Tres escalas a las que es significativo el papel biológico de la morfología fluvial	72
Figura 5.3:	Un arroyo de montaña de cauce constreñido. El sustrato geológico consiste en estratos horizontales, lo que unido a la elevada pendiente favorece la creación de estructuras con escalones y pozas	73
Figura 5.4:	Río trezado en el piedemonte del Pirineo (España)	74
Figura 5.5:	Río meandriforme en las Montañas Rocosas (Estados Unidos)	75
Figura 5.6:	Algunos tipos especiales de río	76
Figura 5.7:	Tipología fluvial, según Rosgen (1996)	76
Figura 5.8:	Ejemplo de marca	78
Figura 5.9:	Ejemplo de red de transectos y rumbos a tomar en un tramo	79
Figura 5.10:	Ejemplo de transecto	80
Figura 5.11:	Midiendo el desnivel entre las cuerdas de dos transectos	80
Figura 5.12:	Ejemplo de cartografía obtenida en un transecto, según Gordon et al. (1992)	83
Figura 6.1:	Gráficos de dispersión de la concentración de nitrato en tres pequeños ríos de cabecera en cuencas forestadas	86
Figura 6.2:	Ejemplo de respuestas <i>C-Q</i> durante crecidas para el nitrato y el COD (carbono orgánico disuelto) en dos ríos mediterráneos	87
Figura 6.3:	<i>Arriba</i> , caudal en el río Urumea (País Vasco) durante el año 1999. <i>Abajo</i> , dinámica de la turbidez en tres episodios de avenida	88
Figura 6.4:	Características de un piezómetro que permite estimar las propiedades hidráulicas del medio hiporreico	92
Figura 6.5:	Ejemplo de cálculo de la <i>VGH</i> entre dos piezómetros	93
Figura 6.6:	Gráfico semilogarítmico que ilustra la recuperación de un piezómetro después de haberlo vaciado	95
Figura 8.1:	Ilustración esquemática de la espiral de nutrientes (línea de puntos) y los dos componentes de la distancia de la espiral: la distancia de asimilación (S_w) y la distancia de retorno (S_b)	118
Figura 8.2:	Esquema de la puesta a punto del tramo experimental para la realización de una adición de nutrientes en continuo	120

Figura 8.3:	Variación longitudinal de la conductividad y la concentración de fosfato en el tramo experimental a partir de la realización de una adición a flujo constante de nutrientes y trazador hidrológico	125
Figura 8.4:	Curvas de conductividad y concentración de fosfato obtenidas al final del tramo, después de una adición instantánea de nutrientes junto con un trazador hidrológico	129
Figura 9.1:	Foto cenital tomada sobre un arroyo forestado	137
Figura 9.2:	Foto cenital tratada para medir la cobertura	138
Figura 9.3:	Distribución transversal de velocidades en ríos	138
Figura 9.4:	Distribución de la velocidad en las distintas capas de agua que van del agua libre a la que interactúa con un sustrato sólido	139
Figura 10.1:	Modelo simplificado de interacción detritus–detritívoros–descomponedores en el procesado y mineralización de la materia orgánica en ríos bien oxigenados	141
Figura 10.2:	Acumulación de hojarasca en un lecho fluvial, el recurso más aprovechado por detritívoros y descomponedores	142
Figura 10.3:	Restos de madera en el cauce de un río, un recurso alternativo a la hojarasca del que no todos los organismos pueden hacer uso. Se aprecia el efecto sobre la retención de otros materiales y la heterogeneidad que genera en el cauce	143
Figura 10.4:	En los ríos desprovistos de vegetación arbórea riparia, la producción primaria puede suplir por sí sola las necesidades energéticas de la comunidad. Son sistemas autotróficos	144
Figura 10.5:	Barrera de malla fija para retener la MOPG transportada. Una gran cantidad de sedimento también queda retenida, lo que dificulta la recogida del material	145
Figura 10.6:	Red de deriva para el muestreo discreto de MOPG transportada	145
Figura 10.7:	Trampa para recogida de aportes verticales de MOPG	146
Figura 10.8:	Trampa que permite la recogida de MOPG depositada en el suelo, removilizada por el viento u otras causas y que, finalmente, entra en el cauce	146
Figura 10.9:	Hojas de ginkgo listas para su uso	150
Figura 10.10:	Red de tipo Surber modificada, con la que se recoge la MOPG del lecho fluvial	152
Figura 10.11:	Tramo fluvial donde se señalan una serie de transectos de 0,5 m de anchura elegidos al azar donde se recogerá la MOPG bentónica	153
Figura 10.12:	Medición del diámetro de un tronco	156
Figura 10.13:	Pérdida de masa en función del tiempo (<i>izquierda</i>) y de los grados-días (<i>derecha</i>) de la hojarasca de aliso en un arroyo del norte de España	157
Figura 10.14:	Bolsas de malla de 5 mm de poro preparadas para depositar (<i>izquierda</i>) o ya sumergidas en el río (<i>derecha</i>). Para asegurarlas se pueden atar a piedras o a barras de hierro clavadas en el lecho	158

Figura 10.15:	Componentes de un balance de materia orgánica particulada gruesa (MOPG) en un tramo fluvial	162
Figura 11.1:	Bacterias teñidas con DAPI. Se pueden observar formas muy distintas: cocos, bacilos y filamentos	174
Figura 11.2:	Observación de bacterias epilíticas fluviales con la doble tinción de Syto® 9 y yoduro de propidio. <i>Izquierda</i> , en verde claro bacterias vivas. <i>Derecha</i> , con coloración roja, bacterias muertas	176
Figura 11.3:	Círculos de hoja y sacabocados usado para obtener los discos	178
Figura 11.4:	Sistema de vacío para extracción en fase sólida	179
Figura 11.5:	Cromatogramas de un patrón de ergosterol (<i>arriba</i>) y de un extracto de lípidos de hojas de <i>Platanus acerifolia</i> recogidas en un río (<i>abajo</i>)	180
Figura 11.6:	a) Termociclador. b) Electroforesis en gel de agarosa 2% del producto de PCR utilizando cebadores específicos para cianobacterias 460 pb (CYA359F y CYA781r), teñido con bromuro de etidio (fotografía de Antonio Picazo, Universitat de València). c) Marco de electroforesis ya montado. d) Tanque contenedor y sistema de circulación y electroforesis vertical (<i>izquierda</i>), y generador de gradientes (<i>derecha</i>)	191
Figura 11.7:	Espuma en el río donde se concentra gran densidad de conidios de hifomicetos acuáticos	203
Figura 11.8:	Frascos con aireamiento de bombas de acuario (<i>a</i>) o en agitador (<i>b</i>)	204
Figura 11.9:	Conidios de hifomicetos acuáticos provenientes de espumas observadas al microscopio óptico	204
Figura 11.10:	Conidios de hifomicetos acuáticos de la colección del Departamento de Biología de la Universidad de Minho (Braga, Portugal)	205
Figura 11.11:	Trampas para recolección de hojas senescentes de árboles	208
Figura 11.12:	Hojas en las bolsas antes de ser colocadas en el río	208
Figura 11.13:	Espora de <i>Casaresia sphagnorum</i>	210
Figura 11.14:	Diagrama de la reacción que tiene lugar durante la medición de la actividad de la enzima β -glucosidasa	211
Figura 12.1:	Detalle del aspirador de sedimentos finos	221
Figura 12.2:	Acondicionamiento de tallos de macrófitos emergentes	222
Figura 12.3:	Secuencia de análisis en el estudio de diatomeas, desde el campo hasta la elaboración del inventario	224
Figura 12.4:	Colonias de cianobacterias (<i>a</i>) o cianobacterias formando parte de un biofilm mixto (<i>b</i>)	228
Figura 12.5:	Secuencia recomendable en el análisis de cianobacterias desde su recolección hasta su identificación	229
Figura 13.1:	Esquema de los transectos para determinar la superficie cubierta por cada especie de macrófito	245
Figura 13.2:	Distribución de los manchones de macrófitos en dos épocas del año en un río pampeano	246

Figura 13.3: Ejemplos de especies emergentes: a la izquierda <i>Iris pseudacorus</i> , y a la derecha <i>Rorippa nasturtium-aquaticum</i> e <i>Hydrocleys nymphoides</i>	247
Figura 13.4: Ejemplos de especies sumergidas: a la izquierda <i>Myriophyllum</i> sp y a la derecha <i>Potamogeton</i> sp	248
Figura 13.5: Las macrófitas flotantes <i>Pistia stratiotes</i> y <i>Azolla filiculoides</i>	248
Figura 13.6: Homogeneizador de vidrio Potter-Elrehjem	249
Figura 14.1: Cilindro o corer de muestreo	259
Figura 14.2: Ejemplo de codificación del rasgo «alimentación» utilizando información sobre los contenidos estomacales de varias especies del género <i>Lep-tonema</i> (<i>Trichoptera</i> , <i>Hydropsychoidea</i>)	266
Figura 14.3: Estructura de las bases de datos	267
Figura 15.1: Equipo de investigadores pescando en un arroyo mediante un aparato portátil de pesca eléctrica	274
Figura 15.2: Detalle de nasas instaladas en un arroyo	277
Figura 15.3: Se puede observar homogeneidad de pendientes entre dos poblaciones de pez sol (<i>Lepomis gibbosus</i>) comparadas, pero diferencias en cuanto al parámetro <i>a</i> (intersección de <i>y</i>)	289
Figura 16.1: Excremento de nutria	304
Figura 16.2: Desmán del Pirineo (<i>Galemys pyrenaicus</i>)	306
Figura 16.3: Nasa para la captura de desmanes	307
Figura 17.1: Un río flanqueado por vegetación de ribera en un paisaje semidesértico (Nuevo México, Estados Unidos). Aunque el río se seca, la vegetación sobrevive gracias al agua freática	312
Figura 17.2: Algunas de las funciones ecológicas más relevantes del bosque de ribera	313
Figura 17.3: Ortofotografías de dos arroyos con bosques de ribera de características contrastadas	317
Figura 17.4: Ejemplos de algunas afecciones a la conectividad lateral	318
Figura 17.5: Distribución de clases diamétricas de dos bosques en Azpeitia (España)	319
Figura 17.6: Dos bosques de ribera con una estructura muy diferente. A la izquierda, selva amazónica en el río Beni (Bolivia). A la derecha, plantación de chopos en el río Ebro (España)	320
Figura 18.1: Ilustración de algunos pasos de la preparación de incubaciones y procesamiento de muestras	330
Figura 18.2: Diversos tipos de comunidades de biofilms fluviales. En la parte inferior de cada fotografía se muestra la imagen macroscópica de la comunidad	332
Figura 18.3: Ciclo de vida del plecóptero <i>Siphonoperla torrentium</i> (Pictet) (a) y del anfípodo <i>Echinogammarus tarragonensis</i> (Pinkster) (b), en la cabecera de un río del norte de España	338
Figura 18.4: Relación tamaño–masa de la población de <i>S. torrentium</i> de la figura 18.3a. El coeficiente de determinación de la regresión (r^2) es de 0,9	339

Figura 18.5: Densidad media anual de cada clase de tamaños de una cohorte promedio frente a la masa individual media de los animales que integran cada clase	342
Figura 19.1: Fotografías del contenido estomacal de diversas especies: a) material vegetal, b) detritus y material mineral, c) restos de presas (quironómidos) y d) diatomeas y algas filamentosas	351
Figura 19.2: Representación de los datos de la señal isotópica $\delta^{13}\text{C}$ frente a la $\delta^{15}\text{N}$ en el arroyo Fuirosos	361
Figura 19.3: Flujo de materia orgánica en las relaciones tróficas entre el depredador <i>Erpobdella</i> y sus presas en el verano de 2002, en el arroyo de Fuirosos	362
Figura 19.4: Estructura de la red trófica en el arroyo Fuirosos durante la primavera de 2002	363
Figura 20.1: a) Medida de metabolismo en cámaras en condiciones experimentales de manipulación de temperatura, y b) detalle de una cámara de metabolismo con sistema de recirculación de agua y control de luz ambiental	371
Figura 20.2: Esquema de las cámaras de metacrilato. Las dimensiones son meramente orientativas y corresponden a las que se utilizan habitualmente para medir el metabolismo en cantos rodados	372
Figura 20.3: Cámaras con circulación (a) y sin circulación (b) de agua	373
Figura 20.4: Tramo fluvial del río Necker, Suiza	377
Figura 20.5: Concentraciones de Br^- al inicio y final del tramo de estudio obtenidas con el uso de un solo electrodo específico para Br^- (río Lutteren, Suiza) τ es el tiempo medio de viaje	378
Figura 20.6: a) Depósito de gas trazador y regulador de presión, b) difusores de gas, c) toma de muestras de agua para análisis de gases, y d) jeringuillas de triple válvula	380
Figura 20.7: Regresión lineal entre dC/dt y $C_s - C$ para determinar la constante de reaireación ($k_{o_2} = 0,061 \text{ h}^{-1}$)	382
Figura 20.8: Extrapolación de los valores de respiración diurna a partir de los valores de <i>PNEi</i> previos a la salida del Sol y posteriores a la puesta del Sol (río Necker, Suiza)	383
Figura 21.1: Esquema comparativo de la dimensión, aplicaciones, control de las condiciones ambientales, replicabilidad y realismo en estudios de ecología fluvial basados en la manipulación del ecosistema, en canales situados in situ, canales ubicados en el exterior pero alejados del río, y canales ubicados en el interior	389
Figura 21.2: Ejemplos de distintos modelos de canales	390
Figura 21.3: Esquema de un sistema de doce canales (<i>arriba</i>) y detalle de un canal (<i>abajo</i>)	393
Figura 22.1: Ilustración de un diseño <i>BACI</i>	400
Figura 22.2: Selección de métodos multivariantes en función del tipo de datos y el objetivo del estudio.....	406

ÍNDICE ALFABÉTICO

- actividad enzimática, 191, 211, 215, 216
acuífero, 39, 41*c*, 42*c*, 52, 53, 76, 97, 100
adición a flujo constante, 56, 60*f*, 61, 63*c*, 125
 en pulso, 56, 61
agradación, 12, 82
aleatorización, 398-401, 410
alelopático, 244
alga, 12, 18, 25*f*, 26, 30, 31, 36, 37, 72*f*, 99,
 134, 139, 169, 211, 214, 219-224, 227*c*, 228,
 232, 234, 238-240, 243, 244, 247, 256*c*, 294,
 323, 328, 330*f*-333, 351, 363*f*, 383, 387, 391
alóctono, 142, 143, 151, 170
amonio, 98, 101, 110-115, 244, 245, 334, 335, 368
anádromo, 271
análisis de datos, 397, 399, 402
ánodo, 273-276
arceica, 39
autótrofo, 35, 144, 181, 219, 244, 323, 324,
 328, 329, 331, 348, 368, 383
- BACI, 399, 400*f*, 406, 407
bacteria, 30, 42, 103, 108, 141*f*, 156, 169-176,
 191, 197, 198, 206, 211, 214, 256, 347
balance de materia orgánica, 162*f*, 164
bentónico, 31, 118, 121, 151-153*f*, 159, 161,
 164, 171-175, 185*c*-187, 214, 215, 219, 234-
 237, 244, 258, 306, 323, 356, 357, 360, 363,
 369, 371, 394
bentos, 25, 169, 219, 336, 354, 370
biodiversidad, 11, 17, 36, 43*c*, 77
biofilm, 30, 32, 34, 73, 121, 135, 169, 173, 211,
 214, 216, 221, 228, 229, 232, 323-328, 330*f*-
 335, 347, 357*c*, 358, 361
biogeoquímico, 29, 91, 97, 100, 102, 107, 348,
 399
bioindicador, 244
biovolumen, 31, 175, 262, 331, 354
bivoltino, 338
- cadena trófica, 141, 364
capa límite, 135, 139
- capacidad de infiltración, 51, 52
capilaridad, 51
captura (método de), 253, 273-288, 295-298,
 305-308, 337, 342, 351, 352
carbono, 35, 87*f*, 88, 97, 99, 101-103, 105, 107,
 108, 141*f*, 143, 181, 216, 239, 244, 248, 323,
 324, 326-334, 348, 360, 367, 369, 374
carga
 disuelta, 12, 27, 88, 89, 100
 de fondo, 88, 89, 315
 particulada, 12, 28, 88, 89
 en suspensión, 88, 89
cascada trófica, 33
catádro, 271
cauce, 12, 15-19, 23-29, 41-43, 47, 48, 52, 56-
 62, 64, 71-77, 81-83, 86, 91-94, 100, 101,
 118*f*, 130, 131, 136-138, 143, 147-156, 164,
 186, 295, 302, 303, 312, 315*c*, 317-319, 369,
 370*c*, 375, 381
abierto, 369, 370*c*, 375, 382-384
húmedo, 81, 83, 149-151, 153
seco, 153
caudal, 11, 16, 24, 26-28, 31*c*, 33-35, 41, 42*c*, 51-
 55, 58, 60*f*-62, 64-68, 75, 82, 86-91, 94, 119,
 121-123, 125, 126, 147, 280, 306, 384-385, 394
basal, 41*c*, 42*c*, 53, 64
dominante, 75
ordinario, 68
de tormenta, 53*f*, 54
cebador, 183, 185*c*, 191, 192, 201
cianobacteria, 30, 169, 191, 219, 220, 228*f*-
 234, 240, 332
ciclo
 hidrológico, 16, 39, 40*f*, 54, 98
 de vida, 33, 264, 336-338*f*, 340
cinética enzimática, 212
clonación, 183, 193, 197, 198
clorofila, 133, 219, 220, 234-239, 249, 250,
 328, 331, 373, 374
cobertura, 51, 86, 136-138*f*, 143, 246, 255-257,
 297, 302, 367, 370, 376, 377*f*
coeficiente
 de capturabilidad, 286

- de correlación de Spearman, 410
- de extinción, 136
- fotosintético, 369
- de reaireación, 375, 376, 378-382, 384
- de regresión, 288
- respiratorio, 369
- cohorte, 324, 337, 338, 340-345
- conductividad, 42*c*, 60-63, 86, 91, 92, 94, 95, 98, 120*f*, 121, 123, 131, 274, 276, 280, 378
- conidio, 170, 200, 202-204*f*, 205, 206
- conservación de muestras, 103, 186
- consumidor, 12, 25, 32, 34, 143, 253, 324, 348, 349, 356, 359, 360, 362, 363, 365
- contenido estomacal, 257, 349, 350, 351*f*, 353, 355, 358, 360, 362*f*, 363*f*
- corer*, 171*c*, 220, 222, 246, 247, 255, 256, 259*f*
- correntómetro, 64, 80, 90, 138, 139, 147
- corriente, 64, 81, 119, 133-135, 138, 139, 149, 220, 243, 256, 264*c*, 332
- crecida, 12, 28, 53-55, 65-68, 74-76, 82, 83, 87*f*-89, 100, 149, 154, 313, 315, 317
- cromatografía
 - de gases, 379
 - líquida, 176, 177, 234, 236
- cromatograma, 180, 181, 234
- cuantómetro, 135, 136
- cuenca, 16-18, 23, 26-28, 35, 39-48, 53-55, 68, 85, 86*f*, 88, 100, 117, 272, 340*c*
- curva
 - de ADRT, 57, 59, 60
 - de gastos, 65
 - de supervivencia, 341, 342

- DAPI, 172, 173, 174*f*, 176
- Darcy (ley de), 94
- degradación, 12, 82, 108, 142, 157, 178, 198, 212*c*, 215, 234, 249, 254, 318
- delta, 74
- descomponedor, 25, 34, 107, 141-143, 156, 157, 170
- descomposición, 12, 24, 30, 42, 101, 141, 156-165*c*, 170, 206, 212*c*, 407
- detritívoro, 33, 141*f*/143, 156, 157, 353, 364
- detritus, 32, 141, 157, 202, 203, 205, 256*c*, 265*c*, 350, 351*f*, 357*c*, 363*f*
- DGGE, 182, 183, 185, 194, 199, 200, 416
- día-pausa, 264
- diatomea, 31*f*, 219, 220, 223-226, 240, 256*c*, 332*c*, 351*f*, 363*f*, 397, 408
- dieta, 25, 254, 347-352, 354-356, 359, 360, 363

- diseño
 - experimental, 389, 392, 397-398, 401, 402*c*, 410
 - muestral, 398, 401
- distancia
 - de asimilación, 117-120, 124, 125*f*, 128
 - de retorno, 117-119
- DNA, 172, 182*c*, 183, 184*c*, 185*c*, 186-194, 197-201, 413

- ecosistema, 11, 17, 19-30, 33-36, 41*c*, 43-54, 71, 75, 77, 85, 88, 97, 100, 117-120, 134, 141, 144, 161, 169, 170, 175, 231, 243, 293-295, 311-315, 323-325, 347, 348, 356, 362, 367-371, 376, 382, 384, 387-389
- ecotono, 311, 315
- ectoenzima, 211
- electroforesis, 182*c*, 183, 185*c*, 190-198, 415
- embalse, 35, 36, 43*c*, 55, 67, 289
- emergencia, 339
- endorreica, 39
- energía exosomática, 26
- enzima extracelular, 156, 170, 171, 211, 212, 213
- epifítico, 216, 235, 330, 331, 333, 358
- epilítico, 216, 330*f*/333, 358
- epipsámico, 171, 219
- ergosterol, 176, 177-181
- escorrentía, 40, 51, 53, 54, 68, 86, 87, 100, 101
- espectrofotómetro, 102, 104, 110, 111, 114, 184*c*, 190, 235-238, 249
 - de masas, 330, 333, 335, 360, 361
- espiráculo, 265
- espiral de nutrientes, 117, 118*f*
- espora, 30, 170, 200, 202, 205*f*, 209-211
- esporulación, 171, 204, 206, 209, 210
- estadios de desarrollo, 337, 342
- estatoblasto, 264*c*
- estequiometría, 244, 348, 356, 368
- estrategia alimentaria, 32, 254
- estructura del ecosistema, 27
- estudio
 - experimental, 57, 120, 387-392, 397-404
 - observacional, 402, 404

- fenología, 118, 151, 162, 321
- ficobiliproteína, 234, 237, 238
- ficocianina, 219, 220, 237, 238
- fijación, 182, 239, 259, 324, 331, 334, 336, 337
- fingerprinting*, 182*c*, 183, 193, 194
- fitoplancton, 226-228, 272, 323
- fluorimetría, 238

ÍNDICE ALFABÉTICO

- fósforo, 42*c*, 88, 97-101, 104*c*, 105, 114, 115, 220, 231, 244, 245, 359
- freático, 52, 55, 86, 101, 311, 312*c*, 317
- Froude (número de), 81, 381
- funcionamiento del ecosistema, 17, 19, 21, 29, 33, 54, 71, 75, 77, 97, 100, 175, 293, 367, 388
- gémulas, 264*c*
- glándula de la seda, 264*c*
- gradiente
 - hidráulico horizontal, 92
 - hidrológico vertical, 93
- grado-día, 157, 161
- grupo trófico funcional, 420, 254, 358
- hábitat, 17, 18, 26, 28, 29, 31, 32, 36, 41-43, 54, 55, 72*f*, 154, 171, 219, 243, 254-257, 262, 272, 296-300, 305, 312-315, 319, 334, 336, 390
- heterótrofo, 25*f*, 133, 142, 169, 171, 207, 323, 368
- hidrograma, 53*f*, 54, 87
- hifa, 30, 170, 209, 350
- hifomiceto, 30, 170, 200-206, 209
- hiporreos, 29, 35, 64, 74, 92-94, 369, 370*c*
- histéresis, 87, 88*f*
- hongo, 30, 141*f*, 158, 169-171, 176, 177, 181, 200-202, 205-207, 350, 363*f*
- HPLC, 177, 180*f*, 181, 234, 236
- índice
 - de abundancia, 278, 285-287
 - de condición, 287
 - de diversidad, 255, 258, 266, 354
 - de electividad, 354
 - de fluorescencia, 101, 107, 109
 - de importancia relativa, 354
 - de Simpson, 356
- ingeniería, 77
- invertebrado, 32, 37, 154, 159, 160, 243, 244, 253, 254, 257, 262, 263, 266, 295, 324, 339, 349, 357*c*, 360, 394
- isótopo
 - estable, 12, 34, 119, 324, 328, 333, 348, 349, 359
 - radiactivo, 323, 324, 308
- lago en herradura, 74
- lixiviación, 157
- lótico, 91, 134, 273, 276, 312
- luz, 133-136, 142, 169, 172, 233, 238-240, 243, 249, 250, 326, 328, 371-373, 383, 394
- llanura
 - aluvial, 18, 35, 36, 54
 - de inundación, 27-29, 35, 74, 75-77, 312, 313, 317, 318
- macroalgas, *v.* macrófito
- macrófito, 31, 222, 243-247, 256, 265, 266*f*, 358, 361, 374
- macroinvertebrado, 32-34, 42*c*, 134, 254, 255, 258, 266, 351*f*, 358, 360
- madera, 154-156, 163, 178, 181, 256, 313*f*, 320
- Mariotte (botella), 120, 122, 123
- materia
 - orgánica, 12, 24*f*, 25*f*, 32, 34, 41*c*, 42*c*, 86, 100, 103, 107, 109, 141-144, 153, 156, 157, 161, 163*c*, 211, 224, 261, 315*c*, 323, 348, 349, 362, 367
 - bentónica, 121, 151, 363
 - disuelta, 100, 103, 107, 142
 - particulada, 142-144, 151, 161, 162*f*, 312
- medio de cultivo, 198, 230-233
- meiofauna, 32, 253, 258, 259, 261*c*, 262*c*
- metabolismo, 34, 141, 211, 212, 348, 367-377, 382, 383, 384
- fluvial, 34, 367, 370, 375
- morfología fluvial (clasificación de la), 71, 72, 75, 77, 78
- morfometría, 44, 45
- necromasa, 244
- nitrateo, 29, 86, 87, 98, 101, 110, 112, 113, 231, 334, 335, 362
- nitrito, 101, 111, 112, 335
- nitrógeno, 99, 101, 110, 113, 230-232, 244, 324, 328, 329, 334-336, 348, 361
- orden de río, 16, 34, 35, 37, 40, 41, 48, 67, 151, 163*c*, 169, 272
- OTIS, 59, 131
- patógeno, 20, 42*c*, 170
- PCR, 182, 184, 185, 191, 197-199
- período de reclutamiento, 337, 339, 345
- perturbación, 75, 77, 255, 373, 388
- pescía eléctrica, 273, 274, 276-281, 287
- pez, 25, 32, 33, 35-37, 42*c*, 54, 55, 271-276, 288, 352
- pH, 42, 98, 101-104*c*, 105-109, 179, 331, 333, 335

- piezómetro, 92-96
 piranómetro, 135
 plancton, 30-32, 169, 171-173, 185*c*-187, 214, 219, 226, 236, 272
 plásmido, 197, 198
 plastrón, 265*c*
 población
 abierta, 284, 285
 cerrada, 279, 283, 284
 presión hidráulica, 92
 prístino, 43, 86
 producción
 primaria, 24, 25, 30-33, 71, 133, 135, 143, 144*f*, 170, 238, 239, 323-325, 327, 328, 367-369, 374, 376, 392
 secundaria, 262, 323, 324, 336, 340*c*, 341, 344*c*, 365
 protozoo, 30, 169, 170, 258
 pupación, 339
- quelante, 192, 261
quenching, 325, 326, 328
 química, 367, 389, 392
 quimismo, 86, 100
- radiación fotosintéticamente activa, 134, 135, 383
 rambla, 19
 rasgo
 biológico, 254, 262-268
 vital, 12, 26, 54, 254
 rastro, 295, 303-305
 reaireación, 371, 375-384
 (constante de), 381, 382
 red trófica, 25, 34, 99, 118, 119, 244, 253, 293-295, 328, 347-349, 357, 359-364
 redox, 29, 98, 139, 244
 régimen hidrológico, 53-55, 143, 367
 rendimiento fotónico efectivo, 239, 240
 replicabilidad, 389, 390
 respiración, 243, 265, 294, 323, 325, 367-376, 381, 383, 384, 389
 retentividad, 56, 57, 59, 60*f*, 62, 118
 Reynolds (número de), 81
 río
 anastomosado, 74
 artificial, 387, 389, 392, 393
 intermitente, 47, 52
 meandriforme, 74, 75
 perenne, 52, 53
 temporal, 18, 47, 52-54, 72*f*, 77, 82
 trenzado, 71, 72*f*, 74, 76
- ripario, 142, 144, 146, 151, 163, 164, 243, 315, 316, 319
 RNA, 182*c*, 187, 189-191, 199
- senescencia, 207, 244, 245
 servicio del ecosistema, 20, 21, 312
 seudorreplicación, 398
 sistema de información geográfica, 45, 69, 314, 316
 sistema de transporte de electrones, 176, 239
 sonicar, 173, 177, 178, 184*c*, 213, 214, 235, 258
 subcapa
 difusiva, 139
 viscosa, 139
 Surber, 152, 153, 255, 256
 sustrato (tipos de), 74, 75, 80, 81-83, 98, 154, 169-171, 173, 177, 181*c*, 219-221, 256*c*, 274, 371, 392
- tasa
 de asimilación, 119, 120, 122, 124, 126, 129
 de crecimiento, 337, 339, 340, 348
 de descomposición, 157, 161, 163, 164, 211, 356
 de esporulación, 171, 206, 209, 210
 de fijación, 239, 324, 331, 334, 336
 de incorporación, 333-336
 de renovación, 162-164, 219, 323, 324, 328, 329
 de retención, 119, 120, 125, 128-131, 150
 temperatura, 42, 82*c*, 90, 100, 133, 134, 159, 161, 182*c*, 194, 209, 215, 371
 tiempo, 402
 de incubación, 191, 211, 215, 325, 328, 332, 334, 336, 369, 374
 medio de viaje, 378, 379, 384
 de recurrencia, 65
 de residencia, 85, 118
 de retorno, 68
 titulación, 105-107
 trampeo, 295, 303, 305, 307
 transecto, 77-83, 151-154, 226, 245, 246, 298, 300
 trazador, 56-61, 120-131, 328, 375, 379, 380
 univoltino, 264, 265
 vadosa (zona), 51
 velocidad de asimilación, 119, 120, 124, 126
 voltinismo, 264
- zona, 402
 de retención transitoria, 130, 131

NOTA SOBRE LOS AUTORES

VICENÇ ACUÑA, doctor en Biología, trabaja actualmente como investigador en el Instituto Catalán de Investigaciones del Agua (ICRA). Su investigación científica se centra en los flujos de carbono en ecosistemas fluviales, en especial en tramo, cuenca y global. Específicamente, los efectos del cambio climático global en los regímenes térmico e hídrico sobre los ecosistemas fluviales centran buena parte de su investigación, aunque también trabaja en estudios para la mejora de las técnicas de medida de metabolismo del ecosistema fluvial y en el efecto de perturbaciones tales como riadas y sequías en el ecosistema.

CARLOS ALCARAZ, doctor en Biología, trabaja como investigador en la Unidad de Sistemas Acuáticos del Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (IRTA), en San Carlos de La Rápita. Su investigación se centra en el impacto de las especies introducidas sobre las autóctonas, así como en los mecanismos que modulan estas interacciones, especialmente sobre el impacto ecológico de la gambusia (*Gambusia holbrooki*) y los mecanismos que limitan su potencial invasor. En la actualidad, trabaja en los aspectos de la biología e impactos del mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*) en el río Ebro.

JOAN ARMENGOL, doctor en Biología y catedrático de Ecología en la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona. Trabaja en ecología de las aguas continentales con énfasis en el estudio de los embalses. Su actividad se ha centrado de forma especial en las interacciones entre procesos físicos y biológicos como el efecto meteorológico o la hidrodinámica de los embalses en los procesos químicos y biológicos. Los resultados de esta investigación están siendo aplicados a la gestión ecosistémica de los embalses con el objeto de mejorar la calidad del agua que acumulan y que suministran.

JOAN ARTIGAS, doctor en Biología, trabaja como contratado postdoctoral en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Girona. Su investigación se centra en determinar el papel de hongos y bacterias en la descomposición de material orgánico en ríos. Utilizando el biofilm fluvial como herramienta de estudio, pretende determinar la interacción y relevancia de estos grupos en el bucle microbiano.

LLUÍS BENEJAM, doctor en Biología, trabaja como investigador postdoctoral en el Instituto de Ecología Acuática de la Universidad de Girona. Su investigación se centra en el papel de los peces continentales de la cuenca mediterránea como bioindicadores de la calidad del ecosistema. Ha estudiado las comunidades de peces de embalses, lagos y ríos. También ha analizado el impacto de algunas especies invasoras como la gambusia o el siluro.

JOSEP BENITO, licenciado en Biología y miembro del Instituto de Ecología Acuática de la Universidad de Girona, estudia la ecología de los peces continentales de agua dulce en ríos y embalses, así como el impacto de algunas especies invasoras (siluro y gambusia, entre otros) en estos ambientes. Su investigación doctoral se centra en la ecología de peces en embalses, analizando su alimentación, edad y crecimiento, así como la actividad y desplazamientos de ciertas especies de peces mediante técnicas de telemetría ultrasónica.

NÚRIA BONADA, doctora en Biología, trabaja como profesora lectora en la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, y es miembro del grupo de investigación FEM (*Freshwater Ecology and Management*). Su investigación se centra en las comunidades de macroinvertebrados de ríos de clima mediterráneo a gran escala. En concreto, ha trabajado en taxonomía y ecología de tricópteros y, últimamente, está interesada en los aspectos biogeográficos y macroecológicos.

ANDREA BUTTURINI, doctor en Biología, es investigador Ramón y Cajal en el Departamento de Ecología de la Universidad de Barcelona; está especializado en biogeoquímica e hidrología en ríos intermitentes. Sus investigaciones se centran en analizar las respuestas biogeoquímicas durante condiciones hidrológicas dinámicas y extremas, y en explorar los cambios cuantitativos y cualitativos de la materia orgánica disuelta a lo largo de continuo fluvial y en la interfase río-cuenca.

ANTONIO CAMACHO, doctor en Biología, es miembro del Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva de la Universidad de Valencia, en cuya Facultad de Biología trabaja como profesor titular de Ecología. Su investigación se centra en aspectos funcionales de los ecosistemas acuáticos epicontinentales y en el estudio de la biodiversidad microbiana acuática y de los procesos en los que están implicados los microorganismos, tanto procariotas como protistas. Su investigación aplicada está principalmente relacionada con la evaluación del estado ecológico, la conservación y la restauración de los ecosistemas acuáticos.

JOSERRA DíEZ, doctor en Biología, trabaja como profesor contratado en la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del País Vasco, en Bilbao. Su investigación se centra en aspectos funcionales de los ríos, tales como la interacción entre el ecosistema terrestre y el fluvial, y en los efectos de la compleji-

dad del cauce sobre el funcionamiento del ecosistema con énfasis en la madera muerta. Actúa como consultor científico en proyectos de restauración.

JHON CHARLES DONATO, doctor en Biología, trabaja como profesor asociado en el Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional de Colombia, en Bogotá. Su investigación se centra en aspectos funcionales de ríos y lagos de los Andes colombianos, como ecología del fitoplancton, producción primaria, diversidad de diatomeas, metabolismo y productores primarios en ríos.

ARTURO ELOSEGI, doctor en Biología, trabaja como profesor titular en la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del País Vasco en Bilbao. Su investigación se centra en aspectos funcionales de los ríos, como el metabolismo o la retentividad de los ecosistemas fluviales, y en los efectos de las actividades humanas y de la complejidad del cauce sobre el funcionamiento del ecosistema. Los resultados de esa investigación están siendo aplicados al diseño de proyectos de restauración fluvial.

CLAUDIA FEJJOÓ, doctora en Biología, es profesora adjunta en el Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad Nacional de Luján, Argentina. Ha enfocado su trabajo de investigación sobre el estudio de la estructura y funcionamiento de arroyos pampeanos, con énfasis en la dinámica de nutrientes y en la función estructurante de las comunidades de macrófitos. Los resultados de estos trabajos han sido presentados a los organismos de gestión para el diseño de estrategias que mitiguen el impacto de la actividad agrícola sobre los ambientes fluviales.

EMILI GARCÍA-BERTHOU, doctor en Biología, es profesor titular de Ecología de la Universidad de Girona e investigador del Instituto de Ecología Acuática de dicha universidad. Investiga en ecología de peces continentales, especialmente especies invasoras. También está interesado en ecología estadística y ha realizado algunas contribuciones sobre el análisis estadístico de datos ecológicos.

AINHOA GAUDES, licenciada en Biología, actualmente realiza su tesis bajo la dirección de Isabel Muñoz en el Departamento de Ecología de la Universidad de Barcelona. Su investigación se centra en el estudio de comunidades meiobénticas de ríos mediterráneos con énfasis en el efecto que las perturbaciones, naturales o antrópicas, tienen sobre dichos organismos.

ADONIS GIORGI, doctor en Ciencias Naturales, es profesor adjunto en la Universidad Nacional de Luján e investigador adjunto en el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina. Su temática de estudio es la ecología de algas epifitas y del bentos de arroyos y ríos de la zona pampeana, así como aspectos del metabolismo de esos sistemas.

NORA GÓMEZ, doctora en Ciencias Naturales, trabaja como investigadora independiente en el CONICET y como profesora adjunta de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Argentina. Su investigación se centra en explorar descriptores estructurales y funcionales del plancton y biofilms de sistemas lóticos pampeanos, y en su relación con los usos del suelo. Los resultados de las investigaciones están destinados a interpretar el funcionamiento de los sistemas lóticos de llanura y generar herramientas para la evaluación y monitorización.

JOSÉ MANUEL GONZÁLEZ, doctor en Biología, trabaja como profesor contratado doctor en la Escuela Superior de Ciencias Experimentales y Tecnología de la Universidad Rey Juan Carlos, en Madrid. Su investigación se centra en la estructura y el funcionamiento de las comunidades de macroinvertebrados en tramos altos de los ríos, especialmente en sus relaciones con las características de las cuencas y de las riberas.

JORGE GONZÁLEZ ESTEBAN, doctor en Biología, trabaja como consultor ambiental para distintas Administraciones Públicas, como el Gobierno Vasco, el Gobierno de Navarra y la Diputación Foral de Gipuzkoa. Su actividad se centra en la gestión de especies de fauna amenazada y fauna invasora, destacando el estudio y seguimiento de poblaciones de mamíferos estrechamente ligados al ecosistema fluvial (desmán del Pirineo, visón europeo, coipú).

MANUEL A. S. GRACA, doctor en Zoología y catedrático de Ecología en la Universidad de Coimbra, Portugal. Está interesado en conocer procesos que regulan la descomposición de detritus vegetales en ríos y la interacción entre los detritus, los descomponedores y los detritívoros. Paralelamente asiste a la industria y autoridades ambientales en la biomonitorización para determinar la calidad ecológica de los ríos.

HELENA GUASCH, doctora en Biología, es profesora titular de Ecología en la Universidad de Girona. Su aportación científica se enmarca en el campo de la ecología fluvial, en el que ha desarrollado intereses centrados en el estudio de las comunidades perifíticas, la producción primaria, la dinámica de nutrientes, la ecofisiología y la ecotoxicología.

OIHANA IZAGIRRE, doctora en Biología. Sus investigaciones se han centrado en aspectos funcionales de los ríos, como el metabolismo fluvial, la retentividad de nutrientes o las dinámicas del perifiton. Ha desarrollado herramientas para el seguimiento en continuo del metabolismo por parte de los gestores. Actualmente trabaja en la empresa privada dedicada a consultoría de industrias alimentarias.

EUGÈNIA MARTÍ, doctora en Biología, trabaja como científica titular en el Centro de Estudios Avanzados de Blanes (CEAB), del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Su investigación se centra en el estudio de los ecosistemas fluviales desde una perspectiva biogeoquímica. En concreto, sus trabajos examinan los procesos asociados a los flujos de materia y energía de estos ecosistemas, así como los factores que los influyen y los efectos derivados del cambio global sobre éstos. Su investigación reciente en esta área está basada en el uso de isótopos estables y el desarrollo de trazadores hidrometabólicos.

PILAR MATEO, doctora en Biología, trabaja como profesora titular en la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid. Su investigación se centra en la caracterización morfológica, genética y fisiológica de cianobacterias de ríos, así como en la utilización de cianobacterias como bioindicadores en dichos sistemas fluviales. Los resultados de esa investigación están siendo aplicados en la monitorización de la calidad del agua en ríos.

MARGARITA MENÉNDEZ, doctora en Biología, trabaja como profesora agregada en el Departamento de Ecología de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona. Su investigación se enmarca en aspectos funcionales, como el estudio de la descomposición y la producción, de ecosistemas acuáticos, tanto en marismas como en lagunas costeras y ríos. También ha trabajado en estudios de ecofisiología de macrófitos acuáticos, cuyos resultados se han aplicado en programas de gestión y restauración en ecosistemas costeros.

JON MOLINERO, doctor en Biología, trabaja como investigador en la Unidad de Sistemas Acuáticos del Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (IRTA), en San Carlos de La Rápita. Su investigación se ha centrado en aspectos variados de los sistemas fluviales, incluyendo la circulación de materia orgánica y nutrientes en ríos, la geoquímica de cuencas fluviales y la aplicación de modelos hidráulicos e hidrológicos en la gestión de los recursos acuáticos. En la actualidad trabaja en el desarrollo de un modelo de transporte de sedimento del río Ebro.

ISABEL MUÑOZ, doctora en Biología, trabaja como profesora titular en el Departamento de Ecología de la Universidad de Barcelona. Su investigación se centra en la ecología de invertebrados acuáticos, especialmente en ríos mediterráneos. Actualmente trabaja en la respuesta de la estructura trófica de la comunidad fluvial a los cambios hidrológicos, a la calidad de la materia orgánica y a los impactos de las actividades humanas. Dentro del campo de la ecotoxicología, está estudiando los efectos que los contaminantes emergentes ejercen sobre los invertebrados bentónicos.

JOAN NASPLEDA, licenciado en Biología, realiza su doctorado en el Instituto de Ecología Acústica de la Universidad de Girona. Su investigación se centra en evaluar el impacto de las especies de peces introducidas, concretamente del pez sol (*Lepomis gibbosus*), sobre las poblaciones ícticas autóctonas, en la península Ibérica. Analiza la capacidad de invasión de esta especie gracias a su adaptación a distintos ambientes mediante cambios morfológicos y en sus atributos ecológicos. También está interesado en los patrones de movimiento, uso del hábitat y rango de dispersión del pez sol como elementos que puedan ayudar a predecir su distribución potencial y riesgo de expansión.

CLÁUDIA PASCOAL, doctorada en Biología, trabaja como profesora auxiliar en el Departamento de Biología de la Universidad de Minho, en Braga, Portugal. Su investigación se centra en las relaciones entre la diversidad y el funcionamiento de los ríos impactados por las actividades humanas, con enfoque en el proceso de descomposición de la materia orgánica por hongos, bacterias e invertebrados, a escala de comunidades, poblaciones y células, con particular interés en las respuestas de los hongos acuáticos. En los últimos años se ha interesado por el desarrollo de marcadores moleculares para evaluar la diversidad y actividad microbiana.

JESÚS POZO, doctor en Biología, es catedrático de Ecología en la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del País Vasco en Bilbao. Su investigación se centra en aspectos funcionales de los ríos, como la descomposición de la hojarasca o los balances orgánicos en estos ecosistemas, en su variabilidad y en los efectos de las actividades humanas sobre esos procesos. La sensibilidad de los mismos al cambio ambiental abre una vía de aplicación potencial de los resultados.

ALBERTO RODRIGUES-CAPÍTULO, doctor en Ciencias Naturales con Orientación Ecología. Es investigador del CONICET, y profesor titular de la Cátedra de Ecología de Poblaciones en la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de la Plata, Argentina, y también es director del Instituto de Limnología «Dr. Raúl A. Ringuelet» (ILPLA CONICET La Plata-UNLP). Su investigación se centra actualmente en la ecología del zoobentos de sistemas lóticos pampeanos y del Río de la Plata; estudia las respuestas funcionales de las poblaciones de macroinvertebrados y su uso en la biomonitorización de calidad del hábitat y del agua en ríos y arroyos de llanura. Realiza transferencia de los resultados a entidades públicas y del sector productivo vinculados a la gestión ambiental.

ANNA M. ROMANÍ, doctora en Biología, trabaja como profesora agregada en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Girona. Su investigación se centra en la ecología microbiana en los ríos, especialmente en el funcionamiento y la estructura de las comunidades del biofilm y su papel en la descomposición y utilización

de materia orgánica. Trabaja en ecosistemas mediterráneos sometidos a una marcada estacionalidad y cambios drásticos de caudal, y en sistemas sometidos a perturbaciones humanas (nutrientes, tóxicos).

FRANCESC SABATER, doctor en Biología, es profesor titular de Ecología y de Limnología en la Universidad de Barcelona. Sus líneas de investigación se centran en aspectos biogeoquímicos relativos a la dinámica de nutrientes y al procesado de la materia orgánica disuelta en los ecosistemas fluviales. Dichos trabajos se relacionan con la hidromorfología del cauce fluvial, y tienen un interés aplicado en la restauración fluvial. También estudia las respuestas geoquímicas y el papel de los ecosistemas riparios en función de las crecidas y de los usos del territorio en la cuenca. Los resultados de esa investigación son de interés en la gestión de cuencas fluviales.

SERGI SABATER, doctor en Biología por la Universidad de Barcelona, es catedrático de Ecología en la Universidad de Girona e investigador del Instituto Catalán de Investigaciones del Agua (ICRA). Sus intereses en investigación se hallan en la ecología fluvial e incluyen la ecología y taxonomía algal, la estructura y el funcionamiento del biofilm fluvial y la interacción de éste con los nutrientes y tóxicos. Está especialmente interesado en el funcionamiento global del ecosistema fluvial, y su respuesta en relación con las alteraciones hidrológicas y las perturbaciones humanas.

ALEXANDRA SERRA, licenciada en Biología, en la actualidad cursa el doctorado en el Instituto de Ecología de la Universidad de Girona. Su investigación se enmarca en el ámbito de la ecología fluvial y la ecotoxicología, más concretamente en el estudio de la dinámica de nutrientes y metales pesados en el ecosistema fluvial, así como en los efectos, tanto estructurales como funcionales, de los metales pesados sobre comunidades perifíticas fluviales, incluyendo aspectos de toxicidad y bioacumulación.

SYLVIE TOMANOVA, doctora en Hidrobiología, actualmente trabaja como ingeniera en la Oficina Nacional del Agua y de los Medios Acuáticos (ONEMA), Francia. Su tema de investigación cubre principalmente los invertebrados de la zona tropical de América del Sur y Asia. Se dedica al mismo tiempo a la ecología de los peces en zonas templadas.

ANNA VILA, doctora en Biología, es profesora en la Universidad de Girona y miembro del Instituto de Ecología Acuática de la misma universidad. Su trabajo se centra en las estrategias vitales de peces continentales, en atributos de los ciclos vitales y características ecológicas de especies nativas e introducidas, y en la condición de peces continentales en relación con las características ambientales.

LLUÍS ZAMORA, doctor en Biología, trabaja como profesor ayudante doctor en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Girona, y es miembro del Instituto de Ecología Acuática de la misma universidad. Su investigación se centra en la ecología de peces continentales de lagos, embalses y ríos, siendo su especialización el estudio del uso del hábitat y patrones de desplazamiento. Participa en diversos proyectos que tratan sobre la conservación de la fauna íctica, así como del efecto de las introducciones de peces exóticos sobre las especies autóctonas.

