

Conceptos y técnicas en ecología fluvial

Edición a cargo de:

ARTURO ELOSEGI

Profesor titular de Ecología en la Universidad del País Vasco

SERGI SABATER

Catedrático de Ecología en la Universidad de Girona

Separata del capítulo 18

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

SERGI SABATER

Primera edición: abril 2009

ISBN: 978-84-96515-87-1

© los autores, 2009

© de la edición en español, Fundación BBVA, 2009

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:

$$\frac{Ci}{Cd} = \frac{{}^{14}\text{Ci}}{{}^{14}\text{Cd}} \quad (18.1)$$

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

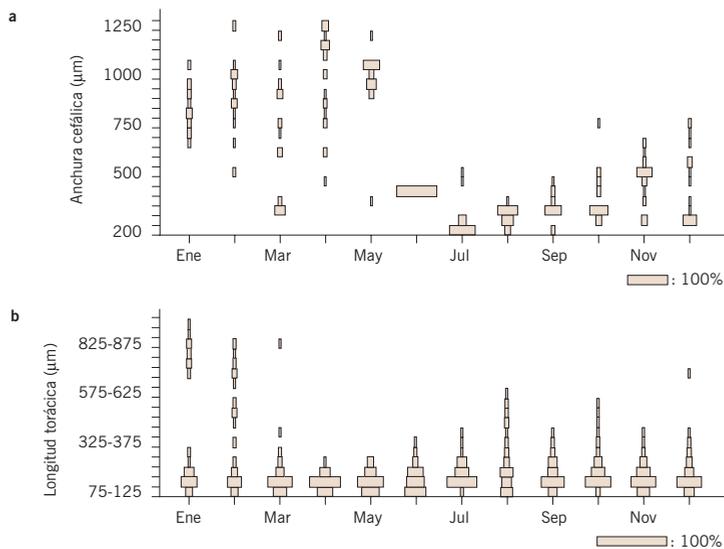
Se trata de un paso previo que permite conocer si las cohortes de la población pueden ser identificadas o no, y determinar cuáles son los períodos de reclutamiento y de transformación a pupas o adultos. Esta última información puede evitar subestimaciones en los cálculos de producción.

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.

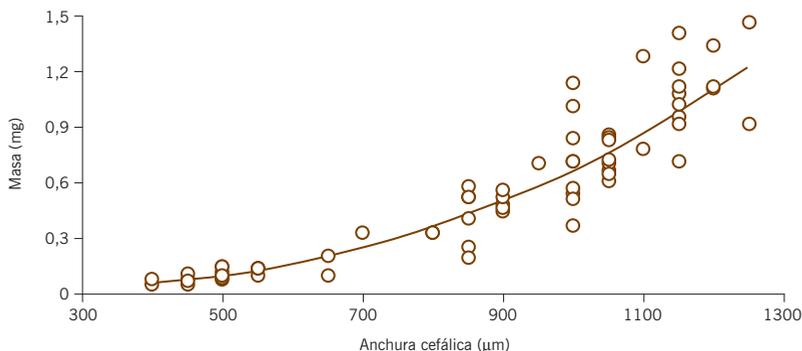


Figura 18.4: Relación tamaño-masa de la población de *S. torrentium* de la figura 18.3a. El coeficiente de determinación de la regresión (r^2) es de 0,9

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 instantáneas 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

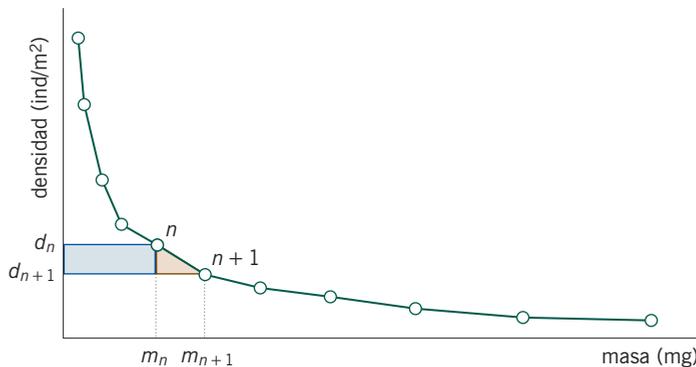
1. Medir todos los individuos de la población capturados durante el año utilizando una lupa con un micrómetro o un sistema de captura y análisis de imágenes. Conviene que la medida corporal elegida tenga el mayor rango de variación posible y no sufra cambios por el uso de fijadores. Las medidas más utilizadas 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 procesado 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/m^2):						7,174
Producción anual (P, en mg/m^2 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.