



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología

Área de Biología Animal

El uso de isótopos estables en aguas dulces: un proyecto en el
Rego do Lagar (A Coruña)

O uso de isótopos estables en augas doces: un proxecto no Rego
do Lagar (A Coruña)

Using stable isotopes in freshwater: a project at the Rego do Lagar
(A Coruña)



Noemí Gómez Lado

Trabajo de Fin de Grado

Fecha de defensa: 29 de Julio de 2015

Dirigido por la Dra. María José Servia García

ÍNDICE

Resumen / Summary	1
1. Introducción	2
1.1 Isótopos estables	2
1.2 Cuantificación	2
1.3 Aplicaciones.....	3
1.4 Factores que influyen en el análisis isotópico	4
2. Objetivos	4
3. Material y métodos	5
3.1 Área de estudio.....	5
3.2 Conservación de las muestras y preparación.....	9
3.3 Análisis isotópico	9
4. Resultados	12
5. Discusión	14
6. Conclusiones / Conclusions	18
7. Agradecimientos	19
8. Bibliografía	20
9. Anexo: Macroinvertebrados identificados en el Rego do Lagar	24

Resumen

Los isótopos estables son átomos del mismo elemento que se diferencian en el número de neutrones. Los más utilizados en los estudios ecológicos son los del carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), nitrógeno ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) y azufre ($^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$). El objetivo de este trabajo es proponer un proyecto a realizar en el Rego do Lagar (A Coruña) que incluya el uso de isótopos estables. En nuestro caso proponemos estudiar la influencia del sellado de un tramo del fondo del río en las redes tróficas analizando los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$, ya que a partir de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ se pueden conocer las fuentes de materia orgánica y a partir de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ se identifican las posiciones tróficas de los distintos organismos en la red trófica del ecosistema. Así, como una primera aproximación, se ha realizado un muestreo para identificar los taxones más frecuentes de macroinvertebrados presentes en el Rego do Lagar, y se ha puesto a punto el protocolo de análisis de isótopos de este tipo de muestras en el Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI). Debido a que únicamente se ha realizado una medida preliminar de isótopos en macroinvertebrados, proponemos completar el estudio incluyendo muestras de agua superficial, microorganismos y diferentes fuentes de alimento para determinar los flujos de energía en el río.

Palabras clave: isótopo estable, red trófica, valor δ , macroinvertebrados, materia orgánica, agua dulce.

Summary

Stable isotopes are atoms of the same element which have a different number of neutrons. The three main elements used in stable isotope analysis for ecological research are carbon ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), nitrogen ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) and sulfur ($^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$). The aim of this work is to propose a project to be undertaken in the Rego do Lagar (A Coruña) that includes the use of stable isotopes. In our case we propose to study the influence of the sealing of a section of the river on the food webs by analyzing the values of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, as the $\delta^{13}\text{C}$ ratio of a consumer reflects the diet of an organism, and the $\delta^{15}\text{N}$ ratio reflects its trophic position. Thus, as an initial step, we collected macroinvertebrate samples in order to identify the most frequent taxa present in the Rego do Lagar, and we implemented the protocol for the isotope analysis of such samples in the Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI). Because we performed only some preliminary measurements of stable isotopes in macroinvertebrates, we suggest completing the study by including samples of surface water, microorganisms and different food sources to determine energy flows in the river.

Keywords: stable isotopes, food web, δ value, macroinvertebrates, organic matter, freshwaters.

1. Introducción

1.1 Isótopos estables

Los isótopos (del griego *isos* = igual y *topos* = lugar) son átomos del mismo elemento químico que presentan el mismo número de protones y electrones pero que se diferencian en el de neutrones. Casi todos los elementos se componen de una mezcla de varios isótopos. Sin embargo, mientras que en ciertos casos (como el oro y el yodo) un isótopo supone el 100% de la sustancia, en otros (como el cloro y el cinc) los diferentes isótopos se encuentran en proporciones comparables (Redondo, 2008). Según Fry (2006), los científicos sospechan la existencia de aproximadamente 120 elementos acompañados de 3100 formas isotópicas, entre las cuales sólo 283 son isótopos estables. Éstos no presentan una actividad radiactiva apreciable (emisión de radiación ionizante) ya que el isótopo en cuestión tiene un tiempo de desintegración extremadamente elevado (por ejemplo, el uranio-238, empleado en la datación de materiales geológicos, posee un período de semidesintegración de 4468 millones de años) (Redondo, 2008). Por el contrario, los isótopos radiactivos se desintegran espontáneamente, siendo peligrosos para la salud humana (Unkovich, 2001).

Ciertos elementos químicos como el hidrógeno, el carbono, el nitrógeno, el oxígeno y el azufre son muy abundantes en la corteza terrestre y participan en numerosos procesos naturales. El análisis de los isótopos estables de estos elementos (Stable Isotope Analysis, SIA) puede ser usado en investigaciones ecológicas, siendo los tres elementos principales utilizados el carbono, el nitrógeno y el azufre. El carbono existe principalmente como ^{12}C (98,89%), pero una pequeña fracción (1,11%) está presente como ^{13}C , mientras que la forma más abundante de nitrógeno es el ^{14}N (99,64%), y el resto aparece como ^{15}N (0,36%). El azufre existe en cuatro formas estables: ^{32}S (95,02%), ^{34}S (4,21%), ^{33}S (0,75%), y ^{36}S (0,02%) (Jardine *et al.*, 2003). Estos porcentajes de abundancia pueden variar ligeramente según la bibliografía que se consulte.

Los diferentes isótopos poseen las mismas propiedades químicas fundamentales, pero difieren en características que son una consecuencia directa de su masa atómica, tales como la densidad de gas o las tasas de difusión y evaporación (Jardine *et al.*, 2003). Otra diferencia importante entre las formas isotópicas es su característica termodinámica, propiedad que hace que sus reacciones en los procesos bioquímicos ocurran en diferentes tasas. Estas diferencias favorecerán, ya sea el isótopo más ligero o más pesado, el agotamiento o enriquecimiento, respectivamente, del producto con respecto al sustrato (o del consumidor con respecto a su fuente de energía).

1.2 Cuantificación

Los isótopos estables se miden a través de la espectrometría de masas. Un espectrómetro es un instrumento que se encarga de separar átomos o moléculas con carga según sus masas en presencia de un campo magnético fuerte (Unkovich, 2001). Debido a que los enlaces formados con el isótopo ligero son más débiles y más fáciles de romper que los que se forman con el isótopo pesado, las moléculas que contienen isótopos ligeros se extraen en procesos rápidos como la evaporación, mientras que las moléculas que contienen isótopos pesados lo hacen a través de procesos más lentos.

La composición isotópica de una muestra puede expresarse de varias maneras. En el caso de una muestra enriquecida, se emplea el porcentaje de abundancia relativa del isótopo con respecto al total del elemento. En el caso de muestras naturales, se emplea la unidad δ :

$$\delta = \left(\frac{R_{\text{MUESTRA}}}{R_{\text{ESTÁNDAR}}} - 1 \right) \times 1000$$

que se expresa en unidades de ‰, donde R es la proporción de isótopo pesado con respecto al ligero (por ejemplo, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) y R_{MUESTRA} y $R_{\text{ESTÁNDAR}}$ son las proporciones de los isótopos de la muestra y de un estándar, respectivamente (Unkovich, 2001).

En el trabajo de laboratorio, se comparan los gases que provienen de las muestras (dióxido de carbono, hidrógeno, nitrógeno...) con un gas de idéntica naturaleza que se denomina estándar de trabajo. Idealmente, ambos gases deben tener una composición química e isotópica parecida, y los patrones de referencia son establecidos por cada laboratorio a causa de la escasez de patrones internacionales. Por ejemplo, el patrón internacional de $\delta^{13}\text{C}$ es un pequeño fósil de belemnite de la formación Pee Dee situada en Carolina del Sur; el patrón del azufre es un meteorito caído en el Cañón del Diablo (Wyoming), y el patrón de $\delta^{15}\text{N}$ es el nitrógeno del aire (Redondo, 2008). Estos patrones internacionales definen el valor $\delta=0$ frente al cual se comparan el resto de relaciones isotópicas. De esta manera, cuando un material tiene un valor de δ positivo es porque se encuentra “enriquecido”, mientras que si el valor es negativo implica que está “empobrecido” en el isótopo pesado respecto al patrón internacional.

La técnica de espectrometría de masas es destructiva, puesto que el analito se altera dentro del instrumento de tal forma que no es posible su recuperación posterior (Redondo, 2008). Sin embargo, se trata de una técnica extremadamente sensible, por lo que se precisan cantidades de muestra muy pequeñas.

1.3 Aplicaciones

En la actualidad, el análisis de isótopos estables es una técnica utilizada en multitud de estudios. Algunas aplicaciones que presentan en los sistemas acuáticos se explican a continuación.

El análisis de isótopos estables permite detectar casos de contaminación en estuarios, ríos y lagos, ya que los vertidos residuales de origen humano suelen estar enriquecidos en ^{15}N respecto al ambiente. Como consecuencia, el aumento de dichos valores está relacionado con el aumento en la densidad de las poblaciones humanas en las cuencas hidrográficas y que, por tanto, pueden causar problemas de eutrofización (Di Lascio *et al.*, 2013; Hogsden&Harding, 2014). Por otro lado, los nutrientes de agua dulce y marinos tienen distinta proporción isotópica de carbono, nitrógeno y azufre (los sistemas marinos generalmente tienen cantidades más altas de isótopos pesados). Las especies que migran entre los diferentes sistemas tendrán diferentes firmas de isótopos estables, lo que permite la identificación de las especies migradoras e incluso de sus rutas de migración (Hobson *et al.*, 2012).

El carbono orgánico que llega a los ríos procede de dos fuentes principales: material de origen terrestre (alóctono) y el producido por los productores primarios del sistema (autóctono). El análisis de los isótopos de carbono permite evaluar la contribución de las entradas de materia orgánica terrestre a los sistemas acuáticos continentales y marinos. Además, puede cuantificarse la contribución microbiana a las redes tróficas ya que, como consecuencia de la descomposición de los microorganismos, se observa un enriquecimiento en los valores de ^{15}N en la materia vegetal, ya que la descomposición favorece el lixiviado del isótopo más ligero (Constantini *et al.*, 2014). Además, la utilización de isótopos estables permite conocer la dieta con mejor detalle que el contenido estomacal, ya que la señal isotópica integra las señales de la dieta a lo largo del tiempo, mientras que el contenido estomacal representa la última ingesta.

Por último, el análisis de isótopos estables nos permite estudiar el efecto de la invasión de especies exóticas. Así, por ejemplo, la presencia de especies exóticas provoca que disminuyan las posiciones tróficas (estimadas mediante los valores de ^{15}N) del resto de los organismos debido a la disminución del número de presas y al cambio de dieta sufrido por este hecho (Vander *et al.*, 1999).

1.4 Factores que influyen en el análisis isotópico

Existen factores que pueden obstaculizar la capacidad del investigador para utilizar el análisis de isótopos estables para describir las relaciones tróficas (Jardine *et al.*, 2003). Asumir que las proporciones de isótopos de un animal reflejan directamente la contribución de las fuentes de alimentos a su dieta es potencialmente erróneo por tres razones: 1) las diferencias en la eficiencia de asimilación de la variable de componentes de la dieta, 2) el fraccionamiento isotópico, y 3) la asignación diferencial de nutrientes a tejidos específicos.

Además, las variaciones temporales, espaciales, específicas e inter- e intra-individuales también suponen retos metodológicos y estadísticos para la investigación en isótopos estables (Lancaster&Waldron, 2001). De hecho, el estado nutricional de los animales recogidos en el campo puede tener una fuerte influencia en las proporciones de isótopos en el tejido. Así, por ejemplo, mientras que los modelos matemáticos han demostrado que la cría en cautividad o el cultivo en laboratorio, así como el hecho de que los individuos sean adultos, deberían reducir las diferencias interindividuales (Ponsard&Averbuch, 1999), las relaciones isotópicas en tejidos pueden verse afectadas por la calidad nutricional de la dieta (Fantle *et al.*, 1999).

Es importante destacar que el fraccionamiento afecta fuertemente a la composición isotópica de diferentes tejidos dentro de un organismo. Los tejidos ricos en lípidos tienden a estar más empobrecidos en ^{13}C (Tieszen *et al.*, 1983), y los valores de $\delta^{15}\text{N}$ y el porcentaje de lípidos se correlacionan positivamente (Kiriluk *et al.*, 1995). Otras investigaciones han encontrado correlaciones negativas entre los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y la relación C:N (Gu *et al.*, 1996). Por último, el efecto de la edad sobre las proporciones isotópicas en los tejidos ha recibido cierta atención (Hobson&Quirk, 2014).

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es proponer un proyecto que pueda llevarse a cabo en el Rego do Lagar (A Coruña) y que incluya el análisis de isótopos estables entre los métodos de estudio. En nuestro caso, proponemos analizar los flujos de energía en dos zonas de diferentes características del río utilizando especies comunes y abundantes en el mismo. Para ello nos hemos propuesto los siguientes objetivos concretos:

- Revisar la bibliografía y documentos disponibles sobre el Rego do Lagar para analizar el estado de conocimiento actual sobre este medio.
- Realizar un muestreo de los macroinvertebrados presentes en el Rego do Lagar para tratar de identificar los taxones más adecuados para su uso en estudios con isótopos estables.
- Poner a punto los protocolos de recogida, preparación y medición de isótopos estables ($\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$) de muestras de macroinvertebrados.

3. Material y métodos

3.1 Área de estudio

Nuestra área de estudio es el Rego do Lagar, localizado en el Campus de Elviña de A Coruña (ver Figura 1). El Rego do Lagar es de escasa sección y su caudal es reducido debido al exceso de urbanización llevada a cabo en las últimas décadas en el lugar de Penarredonda y en los altos de A Zapateira. Los únicos tramos de río que conservan cierto grado de naturalidad son los que cruzan el ámbito de estudio, puesto que el resto están prácticamente soterrados.

Tanto el Rego do Lagar como otras fuentes y manantiales que surgen en el campus vierten al sistema general de saneamiento de la ciudad, el cual conduce las aguas a la estación depuradora de aguas residuales de A Coruña y ayuntamientos limítrofes.



Figura 1. Zonas del Rego do Lagar (A Coruña) donde se llevó a cabo el muestreo: a) punto situado próximo a las huertas; b) punto en canal de regadío y c) punto próximo al SAI. Imagen tomada y modificada de Cagiao *et al.* (2010).

En la parte central situada entre los edificios de la Facultad de Ciencias Empresariales y el SAI (Servicios de Apoyo a la Investigación) existe una zona ajardinada en la que aparecen especies propias de bosques de ribera autóctonos mezcladas con otras ornamentales, las cuales también tienen preferencias por ambientes húmedos como *Liquidambar styraciflua* y *Acer saccharinum*. Toda esta información aparece recogida en los documentos del proyecto SOSTAGUA desarrollada en los Campus de Elviña y A Zapateira (Cagiao *et al.*, 2010).

En febrero de 2015 realizamos un muestreo para conocer la fauna de macroinvertebrados del Rego do Lagar. Para ello se escogieron tres zonas de diferentes características: 1) un punto situado cerca de la zona agrícola del Campus de Elviña, a la altura de las huertas disponibles para la comunidad universitaria, con características físicas de un curso natural; 2) un punto en un tramo de regadío paralelo al curso principal y de muy reducido caudal, y 3) un punto localizado entre la Facultad de Ciencias Empresariales y el SAI, tramo canalizado y con el fondo de hormigón (ver Figura 1). En dicho muestreo se utilizó una red tipo Surber, vertiendo las muestras de sedimento en botes de plástico adecuadamente etiquetados (Figura 2). Una vez que se obtuvieron las muestras de cada zona se llevaron rápidamente al laboratorio, donde se añadió una pequeña cantidad de formol al 4% para fijar la fauna. Posteriormente, se llevó a cabo la identificación a nivel de género o especie utilizando una clave general (Tachet *et al.*, 2006) y se corroboró la identificación con obras más específicas (González&Cobo, 2006; Dijkstra, 2010).



Figura 2. Material utilizado para el muestreo: red tipo Surber, botes de plástico con tapas, bandejas de plástico y pinzas.

De toda la fauna presente en el Rego do Lagar (ver Anexo), seleccionamos cinco especies y un género de macroinvertebrados para realizar el análisis isotópico debido a su gran abundancia y a los diferentes tipos de alimentación que presentan. Las características principales de cada una de ellas se describen a continuación.

Polycelis felina (Figura 3a). Es una planaria de la familia *Planariidae* que vive en todo tipo de aguas corrientes, preferentemente en fuentes y arroyos de montaña, estando su distribución limitada por la temperatura. Rehuye la luz, por lo que suele encontrarse debajo de piedras u otros objetos sumergidos, y se trata de un animal carnívoro que se alimenta de pequeños invertebrados (oligoquetos, crustáceos...) (Tachet *et al.*, 2006).

Potamopyrgus antipodarum (Figura 3b). Es una especie introducida (procede de Nueva Zelanda) común en los ríos gallegos que se alimenta de materia orgánica y algas. En los tramos de los ríos que tienen una cierta carga orgánica sus poblaciones proliferan durante el verano y el otoño, alcanzando densidades de decenas de miles de individuos por metro cuadrado (González&Cobo, 2006).

Echinogammarus lusitanicus (Figura 3c). Es el Anfípodo más frecuente y abundante en las aguas dulces de Galicia, pudiendo alcanzar densidades de varios miles de individuos por metro cuadrado (González&Cobo, 2006). Vive tanto en aguas corrientes como estancadas, asociado a todo tipo de sustratos, y es más activo por la noche que durante el día. Es detritívoro (excepcionalmente actúa como depredador) y por ello desempeña una función ecológica importante al triturar la hojarasca, además de constituir una parte importante de la dieta de otros invertebrados, peces y aves.

Cordulegaster boltonii (Figura 3d). Se trata de uno de los odonatos más frecuentes en los tramos superiores y medios de los ríos gallegos. Sus ninfas son depredadoras y prefieren las aguas remansadas, en las que se ocultan enterrándose entre la arena o restos vegetales para cazar a sus presas al acecho. El desarrollo de este odonato desde el huevo hasta alcanzar la fase adulta es muy lento, suponiendo varios años (González&Cobo, 2006).

Diplectrona felix (Figura 3e). Es una especie de Tricóptero perteneciente a la familia *Hydropsychidae* presente en zonas de corriente de los ríos. Las larvas construyen un refugio utilizando musgo, detritus y pequeñas piedras, que se unen al sustrato mediante hilos de seda. En un extremo del refugio disponen una red de sección más o menos cuadrada con la que filtran las partículas que son arrastradas por la corriente (González&Cobo, 2006), pudiendo capturar tanto materia orgánica en suspensión como pequeños invertebrados arrastrados por el agua.

Simulium spp. (Figura 3f). Son dípteros muy abundantes en los ríos, sobre todo en aquellos enriquecidos orgánicamente. Son suspensívoros, y sus premandíbulas filtran las partículas finas que son arrastradas por la corriente. También pueden alimentarse de perifiton raspando la superficie del sustrato una vez que pliegan las premandíbulas. La identificación de las especies de esta familia es muy compleja, aunque todas las especies presentes en Galicia pertenecen al género *Simulium* (González&Cobo, 2006).



Figura 3. Organismos seleccionados para realizar el análisis isotópico: a) *Polycelis felina* (imagen tomada de http://www.biopix.dk/polycelis-felina_photo-49914.aspx); b) *Potamopyrgus antipodarum* (imagen tomada de <http://www.mdzol.com/nota/569843-identifican-un-agresivo-caracol-invasor-en-chile-y-sudamerica/>); c) *Echinogammarus lusitanicus* (imagen tomada de González&Cobo, 2006); d) *Cordulegaster boltonii* (imagen tomada de <http://www.acremar.it/Articoli/HTML%20Articoli/Odonati.html>); e) *Diplectrona felix* (imagen tomada de <http://www.paperblog.fr/5715211/tribulations-d-un-maitre-de-conf-en-stage-33/>) y f) *Simulium* spp. (imagen tomada de González&Cobo, 2006).

En un segundo muestreo se capturaron ejemplares vivos que fueron procesados para permitir su análisis isotópico.

3.2 Conservación de las muestras y preparación

Debido a las pequeñas cantidades de material de muestra que se utilizan en este tipo de análisis, se deben tomar precauciones durante su manipulación (es decir, utilizar recipientes limpios y técnicas asépticas).

El mejor método para conservar la muestra es la congelación (Jardine *et al.*, 2003; Rennie *et al.*, 2012). Otras técnicas de conservación presentan problemas en mayor o menor medida. Por ejemplo, los valores isotópicos del nitrógeno no se ven afectados por la preservación con formaldehído, pero sí los valores de carbono (Rennie *et al.*, 2012). Además, la conservación en etanol debe evitarse en los macroinvertebrados, especialmente en moluscos, si son destinados a análisis isotópico, ya que favorece la hidrólisis y lixiviado de terminados tejidos (Lau *et al.*, 2012).

Antes de su medida, las muestras se secan y se trituran para asegurar su homogeneidad (Evershed *et al.*, 2007). Las muestras deben secarse suficientemente hasta que el tejido se pueda moler con un mortero o un molino hasta transformarlo en un polvo fino (por ejemplo, 60°C durante 48 horas (Hogsden&Harding, 2014) o mediante liofilización (Bayona *et al.*, 2014)). Las muestras se queman en vacío en pequeñas cápsulas de estaño. La cantidad exacta de material necesario depende de la concentración de carbono, nitrógeno y azufre en la muestra, así como de la sensibilidad del espectrómetro de masas utilizado.

3.3 Análisis isotópico

En marzo de 2015 se llevó a cabo un segundo muestreo en el Rego do Lagar (A Coruña) con el fin de recoger ejemplares y agua para mantenerlos vivos en el laboratorio. Una vez en la zona de trabajo, preparamos los tanques (constituidos por unos botes de plástico con aireadores eléctricos) y los llenamos con agua procedente del río. Seleccionamos nuestros individuos objeto de estudio del contenido de la muestra, manteniendo una especie distinta en cada tanque para evitar casos de depredación (Figura 4). Se recogió el máximo número de individuos posible, ya que se requiere al menos 1mg de peso seco de muestra (ver Tabla 1). Los individuos se mantuvieron en agua durante 24 horas para permitir el vaciado del tubo digestivo, realizando al menos un cambio de agua para evitar la coprofagia, es decir, la ingestión voluntaria de heces (Reid *et al.*, 2008). También es necesario limpiar la suciedad superficial de *Cordulegaster boltonii* con ayuda de un pincel antes de cambiar el agua (Reid *et al.*, 2008).



Figura 4. Tanques de purgado.

Tabla 1. Cantidad de ejemplares utilizados en el análisis de isótopos estables.

Muestra	Individuos utilizados en el análisis
<i>Cordulegaster boltonii</i>	3
<i>Diplectrona felix</i>	11
<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	57
<i>Echinogammarus lusitanicus</i>	38
<i>Polycelis felina</i>	64
<i>Simulium</i> spp.	40

Una vez pasadas 24 horas, secamos los individuos con papel de filtro (excepto las planarias, que podrían romperse) y los introducimos en un tubo Eppendorf (uno por especie) en el congelador (-20°C). Los ejemplares de *Potamopyrgus antipodarum* se diseccionaron *a posteriori* para eliminar la concha, el opérculo y las vísceras, manteniendo únicamente el pie para congelarlo de nuevo (Bayona *et al.*, 2014).

Las muestras se llevaron el 13 de marzo de 2015 al departamento de Análisis Isotópico del SAI (Servicios de Apoyo a la Investigación), situado en el Campus de Elviña (A Coruña), para llevar a cabo la cuantificación de los isótopos estables. Las muestras se secaron durante 48 horas a 60°C (Hogsden&Harding, 2014). Tras esto se homogenizaron en un mortero de ágata hasta obtener un polvo fino (Figura 5) y se pasaron a unos nuevos tubos Eppendorf (los ejemplares de *Cordulegaster boltonii*, debido a su gran tamaño, se procesaron de forma independiente). Este proceso finalizó con un nuevo período de secado de 2 horas a 60°C para eliminar cualquier resto de humedad.

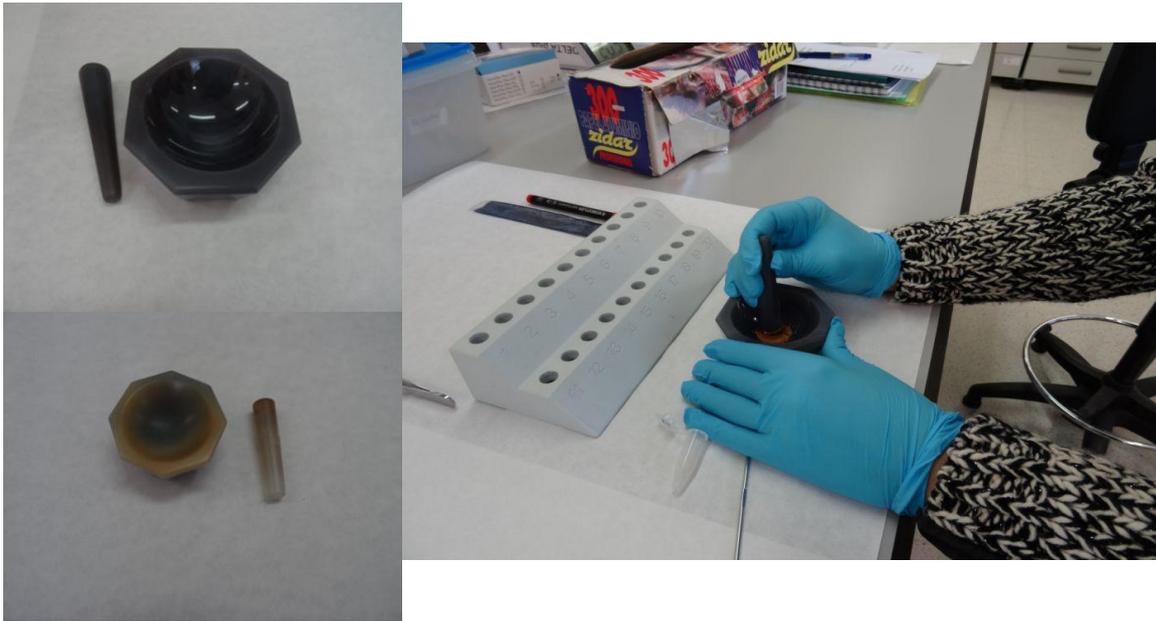


Figura 5. A la izquierda, morteros de ágata utilizados para el homogeneizado de las muestras. A la derecha, procesado de las muestras.

A continuación pesamos las muestras en cápsulas de estaño, introduciendo entre 0.5 y 0.7mg de muestra para tener una cantidad similar en todas ellas (Figura 6). Finalmente, introducimos las muestras en el espectrómetro de masas.



Figura 6. A la izquierda, pesado de las muestras. A la derecha, detalle de la cápsula de estaño en la báscula.

El contenido de carbono, nitrógeno y el análisis isotópico de las muestras se llevó a cabo mediante un analizador elemental conectado a un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas. Las cantidades de carbono y nitrógeno se determinaron mediante la comparación de las áreas de los picos con las de un patrón (acetanilida). Para el análisis isotópico, las moléculas de gas se ionizan por impacto electrónico y se separan bajo la acción de un campo magnético en función de las masas de sus isótopos constituyentes. Las relaciones isotópicas se calculan a partir de las abundancias relativas de moléculas con distintas composiciones isotópicas.

Las relaciones isotópicas para el carbono, $\delta^{13}\text{C}$, se calculan de la siguiente forma:

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{MUESTRA}}}{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{PATRÓN}}} - 1 \right) \times 1000 \text{ (‰)}$$

Las relaciones isotópicas para el carbono se expresan como $\delta^{13}\text{C}$ versus VPDB.

Las relaciones isotópicas para el nitrógeno, $\delta^{15}\text{N}$, se calculan de la siguiente forma:

$$\delta^{15}\text{N} = \left(\frac{^{15}\text{N}/^{14}\text{N}_{\text{MUESTRA}}}{^{15}\text{N}/^{14}\text{N}_{\text{PATRÓN}}} - 1 \right) \times 1000 \text{ (‰)}$$

Las relaciones isotópicas para el nitrógeno se expresan como $\delta^{15}\text{N}$ versus air- N_2 .

4. Resultados

Tras llevar a cabo la cuantificación isotópica de todas las muestras, el laboratorio de Análisis Isotópico nos proporcionó los resultados que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados del análisis isotópico.

Muestra	Peso (mg)	% N	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰)	% C	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰)
<i>C. boltonii</i> 1	0,569	11,3	9,4	46,2	-26,3
<i>C. boltonii</i> 2	0,687	10,4	8,6	49,3	-27,0
<i>C. boltonii</i> 3	0,652	11,3	9,4	49,0	-27,3
<i>D. felix</i>	0,576	10,1	8,5	49,2	-27,7
<i>Simulium</i> spp.	0,561	9,7	10,6	43,6	-26,7
<i>E. lusitanicus</i>	0,577	7,6	10,1	37,7	-27,5
<i>P. felina</i>	0,634	9,8	10,7	50,8	-28,0
<i>P. antipodarum</i>	0,683	10,5	9,3	42,0	-26,0

La representación gráfica de estos valores es la que se muestra en la Figura 7.

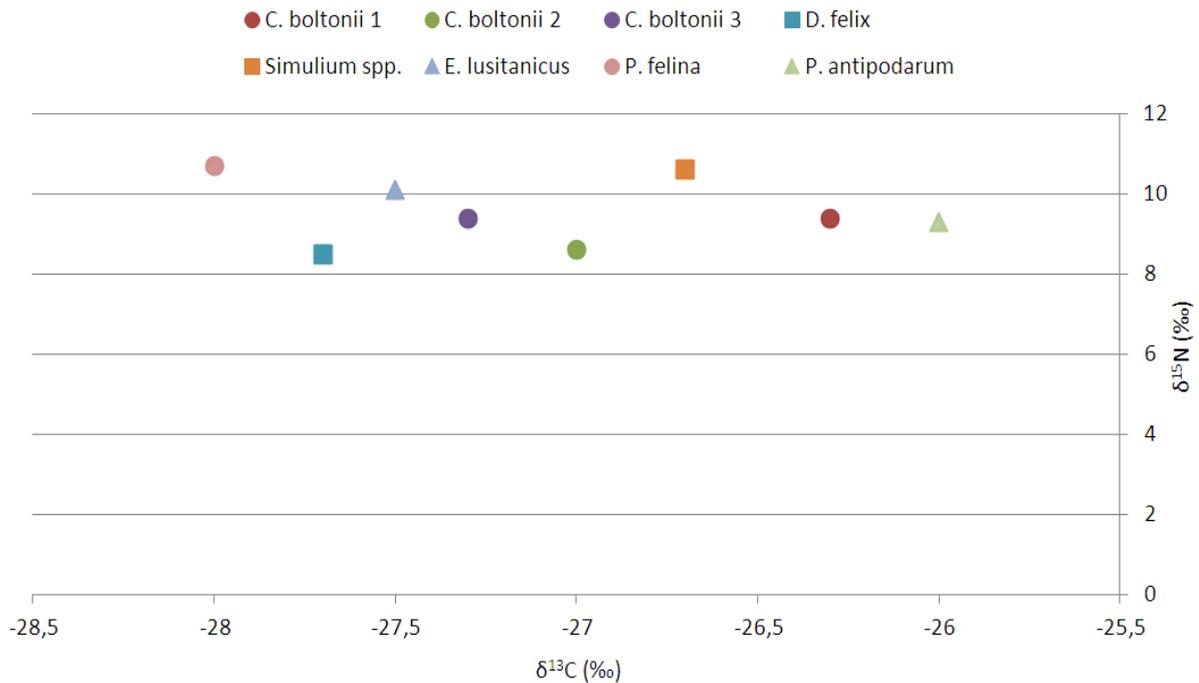


Figura 7. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de los macroinvertebrados del Rego do Lagar.

Estos datos preliminares muestran que los valores de $\delta^{15}\text{N}$, que aporta información sobre la posición de los distintos organismos en las redes tróficas de los ecosistemas, varían entre 8 y 11‰. Por otro lado, el $\delta^{13}\text{C}$ permite conocer las fuentes de materia orgánica, y en este caso podemos observar diferencias mayores, lo que podría sugerir que las fuentes de carbono de los invertebrados son distintas.

Aunque la información que podemos extraer del gráfico es muy reducida, a continuación discutiremos algunos aspectos interesantes.

5. Discusión

Los resultados que hemos obtenido son similares a los de otros investigadores (Herwig *et al.*, 2004) al compararlos en la misma estación del año (en estas condiciones estamos teniendo en cuenta el ciclo biológico de la especie). De hecho, se ha observado que durante el verano, las larvas de odonatos presentan valores bajos de $\delta^{15}\text{N}$ que no reflejan su rol como depredadores (Herwig *et al.*, 2007).

En el caso del $\delta^{15}\text{N}$, los organismos terrestres y de agua dulce presentan valores muy elevados comparados con los organismos marinos debido básicamente a las diferencias en los sistemas de excreción (Quesada, 2008). Por otro lado, el $\delta^{15}\text{N}$ depende también de la nutrición del individuo. Los macroinvertebrados depredadores presentan valores de $\delta^{15}\text{N}$ más elevados que sus presas (Herwig *et al.*, 2004). Siguiendo esta regla, los detritívoros muestran valores de enriquecimiento menores que los carnívoros y herbívoros, ya que su dieta es pobre en nitrógeno. Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ en animales aumentan según vamos ascendiendo en los niveles tróficos, y se produce un incremento teórico del 3.3‰ (Fry, 1991). Según nuestros datos, tanto *Polycelis felina* como los simúlidos deberían ser carnívoros ya que sus valores de $\delta^{15}\text{N}$ son mayores que 10‰, siendo el resto de las especies omnívoros al estar sus valores de $\delta^{15}\text{N}$ comprendidos entre 8 y 10‰ (Jardine *et al.*, 2003). Sin embargo, la bibliografía utilizada (González&Cobo, 2006) nos indica que estos resultados no son congruentes, ya que los simúlidos no son carnívoros, sino suspensívoros, y su valor de $\delta^{13}\text{C}$ debería ser más elevado y, además, debería estar empobrecido en los valores de $\delta^{15}\text{N}$ según la bibliografía (Overmyer *et al.*, 2008), ya que excreta ^{15}N en las heces y mediante otros mecanismos.

Con respecto al $\delta^{13}\text{C}$, cuanto menor sea su valor medido en un animal menor uso hace de nutrientes de origen terrestre, y viceversa. Los valores de ^{13}C aumentan alrededor de 0-1‰ por nivel trófico, siendo un indicador de las fuentes de carbono en vez del nivel trófico (Fry, 1991). En este caso, podemos comprobar que el valor de $\delta^{13}\text{C}$ más bajo corresponde a la especie invasora *Potamopyrgus antipodarum* y el más alto a la planaria *Polycelis felina*. Podemos apreciar señales muy distintas de $\delta^{13}\text{C}$, lo que indicaría que sus fuentes de carbono son distintas (valores bajos de $\delta^{13}\text{C}$, comprendidos entre -32 y -22‰, indican un consumo mayoritario de plantas C_3 mientras que valores altos, comprendidos entre -23 y -9‰, indican un consumo prioritario de plantas C_4 (Alcorlo, 2008)). Para poder asegurar cuál es la fuente de carbono en cada caso, sería necesario coger muestras de materia orgánica, plantas y algas. Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ varían entre los productores primarios con distintas fuentes isotópicas (como pueden ser las diferentes rutas fotosintéticas de las plantas C_3 y C_4), informando de las últimas fuentes de carbono en la dieta. Por último, las diferencias intraespecíficas observadas en *Cordulegaster boltonii* podrían deberse a la cantidad de CO_2 expulsado en la respiración (Perkins&Speakman, 2001) o al tamaño de las larvas, ya que se observa un empobrecimiento de ^{13}C según los individuos se van haciendo más grandes (Grey *et al.*, 2004). En nuestro caso, el ejemplar *Cordulegaster boltonii* 1 es el más pequeño y el 3 el más grande de todos (ver Tabla 2).

En resumen, parece que en nuestro caso podríamos concluir que los animales omnívoros son comunes en nuestro río, ya que presentan valores intermedios de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ (Herwig *et al.*, 2007). Sin embargo, sería necesario repetir el proceso de análisis para comprobar si nuestros resultados son congruentes, ya que en nuestro caso hemos obtenido un alto nivel de omnivorismo a pesar de que la alimentación de nuestras especies es muy distinta.

Propuesta de proyecto en el Rego do Lagar

Uno de los objetivos de este Trabajo de Fin de Grado es proponer un proyecto a realizar en el Rego do Lagar (A Coruña) en el cual podamos aplicar el análisis isotópico. En nuestro caso, proponemos estudiar los efectos que puede presentar la impermeabilización de un tramo (sellado del lecho del río con hormigón, en concreto el tramo que se encuentra en la zona ajardinada a la altura del SAI y la Facultad de Económicas) sobre variables bióticas y abióticas.

Gran cantidad de ríos sufren severos cambios debido a la acción antropogénica, que se reflejan en modificaciones en el grado de conectividad entre las aguas superficiales y las profundas (hiporreicas). Agresiones como vertidos contaminantes, la alteración de los flujos de agua, la construcción de carreteras, la erosión del suelo en la agricultura, la deforestación o la construcción de presas provocan cambios en dicha conectividad que conllevan a la pérdida irreversible de especies y cambios en la composición de la comunidad del ecosistema de agua dulce (Caschetto *et al.*, 2014; Duan *et al.*, 2014). Además, también se han observado cambios en la concentración de isótopos de nitrógeno, ya que ciertas alteraciones en los ríos provocan cambios en las tasas de desnitrificación por parte de los microorganismos (Di Lorenzo *et al.*, 2012).

La acumulación de sedimento fino en el cauce de un río puede tener efectos ecológicos perjudiciales, pudiendo ser necesaria una restauración de la zona hiporreica. La adición de sedimento fino afecta a la penetración del oxígeno, al flujo de nutrientes y a la fauna presente, pudiendo provocar cambios en las redes tróficas (Jones *et al.*, 2015). Con respecto a esta última consecuencia, se sabe que la turbidez del agua, y la reducción tanto en la permeabilidad del sedimento del fondo como en el oxígeno intersticial disuelto provocan una disminución en la densidad de invertebrados presentes (Quinn *et al.*, 1992). Debido a que los efectos de la colmatación del sedimento y su aislamiento del hiporreos sobre la estructura de las comunidades micro y macrobentónicas todavía están siendo investigadas (Jones *et al.*, 2011, Jones *et al.*, 2015), el proyecto de investigación que se propone podría suponer una aportación importante al campo de la ecología de agua dulce.

Para llevar a cabo este estudio, sería necesario coger muestras tanto en la zona natural (permeable) como en la zona afectada (impermeable) del río para luego realizar análisis u experimentos y analizar estadísticamente los resultados. Así, deberíamos recoger muestras de:

1- AGUA SUPERFICIAL

En el muestreo, deberían recogerse 50mL de agua superficial en cada una de las dos zonas del río establecidas anteriormente mediante unas botellas para la determinación de nitrato (NO_3^-), ortofosfato (PO_4^{-3}) y carbono inorgánico (DOC) (Nogaro *et al.*, 2010). Además, las muestras de agua de la superficie (100mL) serían analizadas en un espectrómetro de masas para conocer los valores de $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^2\text{H}$.

Una vez obtenidos estos datos, realizaríamos un biplot con los valores isotópicos y compararíamos ambas zonas para conocer si hay diferencias entre ellas. Con respecto al análisis químico, se compararían los valores obtenidos mediante una prueba estadística. Así, aunque teóricamente podríamos esperar un aumento de los valores de

nitrate en la zona impermeable, así como diferencias en los valores isotópicos entre las dos zonas del Rego do Lagar (Nogaro *et al.*, 2010), la zona de estudio tiene una longitud reducida, por lo que desconocemos *a priori* si sería posible detectar estas diferencias.

2- MICROORGANISMOS

Para muestrear a los microorganismos, sería necesario muestrear 5L de agua y sedimento situados en el lecho del río mediante unas botellas de plástico. Con esta muestra podemos calcular la cantidad de materia orgánica particulada (POM), pero el objetivo de este muestreo es cuantificar la actividad de nitrificación de los microorganismos, ya que en estudios previos (Nogaro *et al.*, 2010) se han observado diferencias entre ríos con alteraciones antropogénicas.

La biomasa microbiana constituye una importante fuente de alimento para los organismos detritívoros y filtradores de sistemas acuáticos. El nitrógeno orgánico procede de la asimilación de nitrógeno inorgánico por parte de dichos microorganismos. Una elevada tasa de descomposición se debe a la actividad microbiana, lo que manifiesta su importancia en el procesamiento de los nutrientes de la materia orgánica (Alcorlo, 2008). Sin embargo, un sellado de la zona hiporreica reduce los procesos aerobios (nitrificación) a favor de los anaerobios (desnitrificación) (Nogaro *et al.*, 2010), llegando a modificar la estructura trófica del río.

3- MACROINVERTEBRADOS

Para muestrear la fauna hay que tener en cuenta los distintos tipos de hábitat que presenta el río para los invertebrados: sustratos duros (rocas, piedras y gravas), detritos vegetales (hojarasca, troncos y ramas), orillas vegetadas (con raíces y plantas asociados a ellos), macrófitos sumergidos, y arena u otros sedimentos finos. En todos los casos, el muestreo se podría llevar a cabo con una red de tipo Surber, removiendo la superficie en cuestión y recogiendo los individuos que son arrastrados por la corriente en el interior de la red. Posteriormente se seguiría el protocolo explicado en el apartado de Material y métodos que, recordamos, consistiría en la selección de las especies asegurándonos de que cogemos suficiente material (debemos obtener al menos 1mg de peso seco), vaciado estomacal de los individuos durante 24 horas, muerte por congelación, homogeneizado de las muestras en un mortero y análisis isotópico en un espectrómetro de masas para medir los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$. Además de esto, podríamos hacer paralelamente un estudio de los grupos presentes en cada una de las zonas fijando los individuos una vez que llegamos al laboratorio, con la finalidad de estimar la biodiversidad presente y compararla entre ambas zonas (Caschetto *et al.*, 2014).

4- FUENTES DE ALIMENTO

Para conocer la posición trófica de los macroinvertebrados presentes en el área de estudio, sería necesario muestrear diferentes fuentes de carbono como pueden ser plantas (C_3 y C_4), materia orgánica y algas (Herwig *et al.*, 2004). Para poder cuantificar la materia orgánica, sería necesario recoger 5-10L de agua, que posteriormente sería filtrada y mantenida en hielo hasta el análisis isotópico (Herwig *et al.*, 2004). Dicha materia debe ser tratada con ácido clorhídrico para prevenir la contaminación por

carbonatos. Las muestras se liofilizan durante 72 horas y luego se homogenizan en un mortero (Molina *et al.*, 2011). Finalmente, dichas muestras se analizan en el espectrómetro de masas para obtener valores de $\delta^{13}\text{C}$. Una vez que obtengamos los resultados, podemos realizar un biplot en el que representemos los valores $\delta^{13}\text{C}$ (fuentes de carbono) y $\delta^{15}\text{N}$ (macroinvertebrados) para comparar los valores obtenidos de cada zona.

Para estimar la posición trófica de los individuos, es necesario conocer el valor $\delta^{15}\text{N}$ del consumidor y de su fuente de alimento (Molina *et al.*, 2011). El nivel trófico puede obtenerse cuando tenemos los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de plantas, herbívoros y consumidores, calculándose de la siguiente manera (Fry, 2006):

$$\text{NT} = 1 + (\delta^{15}\text{N}_{\text{CONSUMIDOR}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{PLANTA}})/3$$

utilizando las plantas como el nivel basal de la estructura trófica, o:

$$\text{NT} = 2 + (\delta^{15}\text{N}_{\text{CONSUMIDOR}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{HERBÍVORO}})/3$$

utilizando a los herbívoros como el segundo nivel basal de la estructura trófica. El valor “3” en el denominador en dichas ecuaciones representa el incremento de ^{15}N por cada nivel trófico, estimado en 2,2‰ para invertebrados y 3,4‰ para vertebrados (Fry, 2006). La información obtenida con los niveles tróficos permitiría obtener una imagen de la red trófica del área de estudio, pudiendo comparar dicha información entre las dos zonas del río para detectar diferencias debidas al sellado del mismo.

6.a Conclusiones

- 1- Hemos identificado individuos pertenecientes a 11 especies de macroinvertebrados, así como individuos pertenecientes a 4 géneros, un orden (Orden Diptera) y una clase (Clase Oligochaeta) en los que no se ha podido precisar un nivel más bajo de identificación.
- 2- Se seleccionaron 5 especies y un género de macroinvertebrados para realizar el análisis isotópico debido a su abundancia y a sus diferentes tipos de alimentación.
- 3- El protocolo llevado a cabo para el análisis isotópico ha sido adecuado para las especies de macroinvertebrados escogidas.
- 4- Los resultados preliminares son congruentes con la bibliografía, detectando un alto grado de omnivorismo común en aguas dulces.
- 5- El hecho de que el Rego do Lagar presente una zona sellada con hormigón (impermeable) y otra natural (permeable) podría permitir estudiar las diferencias en el funcionamiento de las comunidades entre ambas zonas.
- 6- Se propone brevemente un proyecto para analizar las diferencias entre la zona permeable y la impermeable del Rego do Lagar cogiendo muestras de agua superficial, microorganismos, macroinvertebrados y fuentes de carbono.

6.b Conclusions

- 1- We have identified individuals belonging to 11 species of macroinvertebrates, as well as individuals belonging to 4 genera, one order (Order Diptera) and one class (Class Oligochaeta) where identification to a lower level was not possible.
- 2- Five species and one genus of macroinvertebrates were selected to carry out the isotopic analysis because of their abundance and their different types of food.
- 3- The protocol conducted for isotopic analysis was appropriate for the species of macroinvertebrates that we chose.
- 4- Preliminary results are consistent with the literature, observing a high degree of omnivorism common in freshwaters.
- 5- The fact that the Rego do Lagar presents a sealed area with concrete (impermeable area) and other natural (permeable area) allows us to study the differences between the two areas.
- 6- Briefly we propose a project to analyze the differences between the permeable and impermeable areas of Rego do Lagar taking samples of surface water, microorganisms, macroinvertebrates and sources of carbon.

7. Agradecimientos

Este trabajo no se habría podido realizar sin la colaboración de algunas personas que me han brindado su ayuda, sus conocimientos y su apoyo. Quiero agradecerles a todos ellos cuanto han hecho por mí para que este trabajo saliera delante de la mejor manera posible.

Primero me gustaría agradecer a mi asesora del Trabajo de Fin de Grado, Dra. María José Servia García, su esfuerzo y dedicación en este proyecto. Sus conocimientos, su paciencia y su motivación fueron esenciales para poder desarrollar este trabajo. Ha sido capaz de ganar mi admiración por todo lo recibido durante el período de tiempo que ha durado esta pequeña aventura.

Segundo, me gustaría darle las gracias al Dr. Rufino Vieira-Lanero por ayudarme a identificar la especie de *Diplectrona* que aparece en este trabajo. Sin él, no podríamos obtener información de esta especie y nuestro trabajo estaría incompleto.

Tercero, y no por ello menos importante, darle las gracias a María Lema Grille por el tiempo que pasó con nosotras explicándonos detenidamente todo el proceso de análisis isotópico y por la gran ayuda que nos prestó durante el proceso. Gracias por los ánimos y los conocimientos que lograste transmitirme.

Y, por último, gracias a la Universidad de A Coruña por permitirme realizar este proyecto en la Facultad de Ciencias. Ha sido una experiencia inolvidable.

8. Bibliografía

- Alcorlo, P. (2008). Distintas aplicaciones de isótopos estables ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) en el estudio de ecosistemas acuáticos continentales. En Paloma Alcorlo, Ramón Redondo & José Toledo (Eds.), *Técnicas y aplicaciones multidisciplinares de los isótopos ambientales* (pp 347-373). Madrid: UAM ediciones.
- Bayona, Y.; Roucaute, M.; Cailleaud, K.; Lagadic, L.; Bassères, A. & Caquet, T. (2014). Isotopic niche metrics as indicators of toxic stress in two freshwater snails. *Science of the total environment* 484: 102-13. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.03.005.
- Cagiao, J.; Martínez, X. L.; Soto, M.; Giz, J. M.; Servia, M. J.; Piñeiro, F. & Sahuquillo, E. (2010). *O uso sustentable da auga e a súa relación co territorio nos campus universitarios de Elviña e A Zapateira da Universidade da Coruña*.
- Caschetto, M.; Barbieri, M.; Galassi, D. M. P.; Mastrotillo, L.; Rusi, S.; Stoch, F.; Di Cioccio, A. & Petitta, M. (2014). Human alteration of groundwater-surface water interactions (Sagittario River, Central Italy): implication for flow regime, contaminant fate and invertebrate response. *Environmental Earth Sciences* 71 (4): 1791-1807. DOI: 10.1007/s12665-013-2584-8.
- Constantini, M. L.; Calizza, E. & Rossi, L. (2014). Stable isotope variation during fungal colonisation of leaf detritus in aquatic environments. *ScienceDirect* 154-163. DOI: 10.1016/j.funeco.2014.05.008.
- Dijkstra, K. B. (2010). *Field guide to the dragonflies of Britain and Europe: including western Turkey and north-western Africa*. Dorset: British Wildlife.
- Di Lascio, A.; Rossi, L.; Carlino, P.; Calizza, E.; Rossi, D. & Constantini, M. L. (2013). Stable isotope variation in macroinvertebrates indicates anthropogenic disturbance along an urban stretch of the river Tiber (Rome, Italy). *Ecological indicators* 28: 107-114. DOI: 10.1016/j.ecolind.2012.04.006.
- Di Lorenzo, T.; Brilli, M.; Del Tosto, D.; Galassi, D. M. P. & Petitta, M. (2012). Nitrate source and fate at the catchment scale of the Vibrata River and aquifer (central Italy): an analysis by integrating component approaches and nitrogen isotopes. *Environmental Earth Sciences* 67 (8): 2383-2398. DOI: 10.1007/s12665-012-1685-0.
- Duan, S. W.; Amon, R. M. W. & Brinkmeyer, R. L. (2014). Tracing sources of organic matter in adjacent urban streams having different degrees of channel modification. *Science of the Total Environment* 485: 252-262. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.03.066.
- Evershed, R. P.; Bull, I. D.; Corr, L. T.; Crossman, Z. M.; Van Dongen, B. E.; Evans, C. J.; Jim, S.; Mottram, H. R.; Mukherjee, A. J. & Pancost, R. D. (2007). Compound-specific stable isotope analysis in ecology and paleoecology. En Michener, R. & Lajtha, K. (Eds.), *Stable isotopes in ecology and environmental science*. Malden: Blackwell Publishing.
- Fantle, M. S.; Dittel, A. I.; Schwalm, S. M.; Epifanio, C. E. & Fogel, M. L. (1999). A food web analysis of the juvenile blue crab, *Callinectes sapidus*, using stable

- isotopes in whole animals and individual amino acids. *Oecologia* 120 (3): 416-426. DOI: 10.1007/s004420050874.
- Fry, B. (1991). Stable isotope diagrams of freshwater food webs. *Ecology* 72: 2293-2297.
 - Fry, B. (2006). *Stable isotope ecology*. New York: Springer.
 - González, M. A. & Cobo, F. (2006). *Macroinvertebrados de las aguas dulces de Galicia*. A Coruña: Hércules Ediciones.
 - Grey, J.; Kelly, A. & Jones, R. I. (2004). High intraspecific variability in carbon and nitrogen ratios of lake chironomid larvae. *Limnology and Oceanography* 49 (1): 239-244. DOI: 10.4319/lo.2004.49.1.0239.
 - Gu, B.; Schell, D. M.; Huang, X. & Yie, F. (1996). Stable isotope evidence for dietary overlap between two planktivorous fishes in aquaculture ponds. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53 (12): 2814-2818. DOI: 10.1139/f96-242.
 - Herwig, B. R.; Soluk, D. A.; Dettmers, J. M. & Wahl, D. H. (2004). Trophic structure and energy flow in backwater lakes of two large floodplain rivers assessed using stable isotopes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 61: 12-22. DOI: 10.1139/F03-139.
 - Herwig, B. R.; Wahl, D. H.; Dettmers, J. M. & Soluk, D. A. (2007). Spatial and temporal patterns in the food web structure of a large floodplain river assessed using stable isotopes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 64: 495-508. DOI: 10.1139/F07-023.
 - Hobson, K. A. & Quirk, T. W. (2014). Effect of age and ration on diet-tissue isotopic ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) discrimination in striped skunks (*Mephitis mephitis*). *Isotopes in environmental and health studies*. DOI: 10.1080/10256016.2014.867852.
 - Hobson, K. A.; Soto, D. X.; Paulson, D. R.; Wassenaar, L. I. & Matthews, J. H. (2012). A dragonfly ($\delta^2\text{H}$) isoscape for North America: a new tool for determining natal origins of migratory aquatic emergent insects. *Methods in Ecology and Evolution* 3 (4): 766-772. DOI: 10.1111/j.2041-210X.2012.00202.x.
 - Hogsden, K. L. & Harding, J. S. (2014). Isotopic metrics as a tool for assessing the effects of mine pollution on stream food webs. *Ecological indicators* 36: 339-347. DOI: 10.1016/j.ecolind.2013.08.003.
 - Jardine, T. D.; McGeachy, S. A.; Paton, C. M.; Savoie, M. & Cunjak, R. A. (2003). Stable isotopes in aquatic systems: sample preparation, analysis and interpretation. *Canadian Manuscript Report of Fisheries and Aquatic Sciences*, No. 2656, 1-39.
 - Jones, J. I.; Murphy, J. F.; Collins, A. L.; Sear, D. A.; Naden, P. S. & Armitage, P. D. (2011). The impact of fine sediment on macro-invertebrates. *River research and applications* 28: 1055-1071. DOI: 10.1002/rra.1516.

- Jones, I.; Gowns, I.; Arnold, A.; McCall, S. & Bowes, M. (2015). The effects of increased flow and fine sediment on hyporheic invertebrates and nutrients in stream mesocosms. *Freshwater Biology* 60: 813-826. DOI: 10.1111/fwb.12536.
- Kiriluk, R. M.; Servos, M. R.; Whittle, D. M.; Cabana, G. & Rasmussen, J. B. (1995). Using ratios of stable nitrogen and carbon isotopes to characterize the biomagnification of DDE, mirex, and PCB in a Lake Ontario pelagic food web. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52 (12): 2660-2674. DOI: 10.1139/f95-855.
- Lancaster, J. & Waldron, S. (2001). Stable isotope values of lotic invertebrates: sources of variation, experimental design, and statistical interpretation. *Limnology and Oceanography* 46 (3): 723-730.
- Lau, D. C. P.; Leung, K. M. Y. & Dudgeon, D. (2012). Preservation effects on C/N ratios and stable isotope signatures of freshwater fishes and benthic macroinvertebrates. *Limnology and Oceanography: Methods* 10: 75-89. DOI: 10.4319/lom.2012.10.75.
- Molina, C. I.; Gibon, F. M.; Oberdorff, T.; Dominguez, E.; Pinto, J.; Marín, R. & Roulet, M. (2011). Macroinvertebrate food web structure in a floodplain lake of the Bolivian Amazon. *Hydrobiologia* 663: 135-153. DOI: 10.1007/s10750-010-0565-4.
- Nogaro, G.; Datry, T.; Mermillod-Blondin, F.; Descloux, S. & Montuelle, B. (2010). Influence of streambed sediment clogging on microbial processes in the hyporheic zone. *Freshwater Ecology* 55: 1288-1302. DOI:10.1111/j.1365-2427.2009.02352.x.
- Overmyer, J. P.; MacNeil, M. A. & Fisk, A. T. (2008). Fractionation and metabolic turnover of carbon and nitrogen stable isotopes in black fly larvae. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22 (5): 694-700. DOI: 10.1002/rcm.3413.
- Perkins, S.E. & Speakman, J.R. (2001). Measuring natural abundance of ^{13}C in respired CO_2 : variability and implications for non-invasive dietary analysis. *Functional Ecology* 15: 791-797.
- Ponsard, S. & Averbuch, P. (1999). Should growing and adult animals fed on the same diet show different $\delta^{15}\text{N}$ values? *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 13 (13): 1305-1310. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0231(19990715)13:133.0.CO;2-D.
- Quesada, A. (2008). Estudio de las redes tróficas de ecosistemas acuáticos mediante $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$. En Paloma Alcorlo, Ramón Redondo & José Toledo (Eds.), *Técnicas y aplicaciones multidisciplinares de los isótopos ambientales* (pp 293-304). Madrid: UAM ediciones.
- Quinn, J. M.; Davies Colley, R. J.; Hickey, C. W.; Vickers, M. L. & Ryan, P. A. (1992). Effects of clay discharges on streams. *Hydrobiologia* 248: 235-247. DOI: 10.1007/BF00006150.
- Redondo, R. (2008). Fundamentos teóricos y técnicos de los isótopos estables. En Paloma Alcorlo, Ramón Redondo & José Toledo (Eds.), *Técnicas y*

aplicaciones multidisciplinares de los isótopos ambientales (pp 9-24). Madrid: UAM ediciones.

- Reid, D. J.; Quinn, G. P.; Lake, P. S. & Reich, P. (2008). Terrestrial detritus supports the food webs in lowland intermittent streams of south-eastern Australia: a stable isotope study. *Freshwater Biology* 53: 2036-2050. DOI: 10.1111/j.1365-2427.2008.02025.x.
- Rennie, M. D.; Ozersky, T. & Evans, D. O. (2012). Effects of formalin preservation on invertebrate stable isotope values over decadal time scales. *Canadian Journal of Zoology* 90 (11): 1320-1327. DOI: 10.1139/z2012-101.
- Tachet, H.; Richoux, P.; Bournaud, M. & Usseglio-Polatera, P. (2006). *Invertébrés d'eau douce*. Paris: CNRS Éditions.
- Tieszen, L. L.; Boutton, T. W.; Tesdahl, K. G. & Slade, N. A. (1983). Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet. *Oecologia* 57: 32-37. DOI: 10.1007/BF00379558.
- Unkovich, M. (2001). *Stable isotope techniques in the study of biological processes and functioning of ecosystems*. Dordrecht: Kluwer Academic.
- Vander, M. J.; Casselman, J. M. & Rasmussen, J. B. (1999). Stable isotope evidence for the food web consequences of species invasions in lakes. *Nature* 401: 464-469. DOI: 10.1038/46762.

9. Anexo: Macroinvertebrados identificados en el Rego do Lagar

METAZOA

FILO PLATYHELMINTHES GEGENBAUR, 1859

Clase Turbellaria

Familia Planariidae Stimpson, 1857

Polycelis felina Dalyell, 1814

FILO ANNELIDA LAMARCK, 1802

Clase Oligochaeta

FILO MOLLUSCA LINNAEUS, 1758

Clase Gastropoda

Familia Hydrobiidae Stimpson, 1865

Potamopyrgus antipodarum Gray, 1853

FILO ARTHROPODA LATREILLE, 1829

Orden Amphipoda Latreille, 1816

Familia Gammaridae Leach, 1814

Echinogammarus lusitanicus Schellenberg, 1943

Orden Ephemeroptera Shipley, 1904

Familia Baetidae Leach, 1815

Baetis Leach, 1815

Orden Plecoptera Burmeister, 1839

Familia Nemouridae Newman, 1853

Protonemura Kempny, 1898

Orden Odonata Fabricius, 1792

Familia Cordulegasteridae Fraser, 1940

Cordulegaster boltonii Donovan, 1807

Orden Coleoptera Linnaeus, 1758

Familia Scirtidae Fleming, 1821

Elodes spp.

Familia Hydrophilidae Latreille, 1802

Orden Trichoptera Kirby, 1813

Familia Beraeidae H. D. J. Wallengren, 1891

Beraea malatebrera Schmid, 1952

Familia Helicopsychidae Ulmer, 1906

Helicopsyche lusitanica Allen, 1857

Familia Hydropsychidae Curtis, 1835

Diplectrona felix McLachlan, 1878

Familia Lepidostomatidae Ulmer, 1903

Lepidostoma hirtum Fabricius, 1775

Familia Leptoceridae Leach, 1815

Adicella spp.

Familia Limnephilidae Kolenati, 1848

Limnephilus lunatus John Curtis, 1834

Orden Diptera Linnaeus, 1758

Familia Ceratopogonidae Skuse, 1890

Familia Chironomidae Macquart, 1838

Subfamilia Orthoclaadiinae Kieffer, 1911

Familia Empididae Latreille, 1804

Familia Limoniidae

Familia Simuliidae Newman, 1834

Tribu Simuliini

Familia Tipulidae Leach, 1815

Familia Pediciidae Osten Sacken, 1860

Dicranota claripennis Verrall, 1888

Orden Heteroptera

Familia Nepidae Latreille, 1802

Nepa cinerea Linneo, 1758