

# **Salinització dels sistemes aquàtics fluvials: efectes de la interacció amb les aigües residuals en les comunitats del biofilm i macroinvertebrats**

**Martí Piñero Fernandez**

**Dr. Miguel Cañedo Argüelles**

**F.E.H.M. Lab, Universitat de Barcelona**

**IDAEA-CSIC**

**Treball Final de Màster**

**Màster en Ecologia, Gestió i Restauració del Medi Natural**

**Universitat de Barcelona**

**15 de setembre de 2022**



# **Salinització dels sistemes aquàtics fluvials: efectes de la interacció amb les aigües residuals en les comunitats del biofilm i macroinvertebrats**

**Martí Piñero Fernandez**

**Dr. Miguel Cañedo Argüelles**

**F.E.H.M. Lab, Universitat de Barcelona**

**IDAEA-CSIC**

**Treball Final de Màster**

**Màster en Ecologia, Gestió i Restauració del Medi Natural**

**Universitat de Barcelona**

**15 de setembre de 2022**



## RESUM

Les activitats humanes estan provocant un augment de la salinització dels ecosistemes d'aigua dolça. La salinització sol coincidir amb la contaminació per nutrients en les aigües residuals i l'escolament agrícola, però el seu efecte interactiu en els ecosistemes d'aigua dolça continua estant poc estudiat. L'objectiu d'aquest treball és estudiar els efectes interactius de la contaminació per sals i nutrients en les comunitats biològiques dels ecosistemes fluvials. Fent ús de canals artificials, s'ha testat els efectes de diferents tractaments sobre les comunitats del biofilm i dels macroinvertebrats. Es van recrear sis condicions experimentals amb tres rèpliques per a cada tractament: Control (C), Sal (S), Alta Concentració de Nutrients (NH), Baixa Concentració de Nutrients (NL) i les interaccions entre les condicions de salt i nutrient (SNH i SNL). Durant l'exposició es renovava l'aigua cada tres dies i s'analitzaven paràmetres físico-químics de l'aigua (pH, conductivitat elèctrica, temperatura, oxigen dissolt, saturació d'oxigen), paràmetres funcionals del biofilm (absorció de fòsfor i eficiència fotosintètica) i paràmetres estructurals de la comunitat fotosintètica (clorofil·la a, massa seca lliure de cendra i composició del biofilm). Finalitzat el temps d'exposició es van recol·lectar tots els invertebrats de cada canal pel posterior anàlisi a la lupa binocular. Els resultats van mostrar pèrdues funcionals del biofilm, impulsades per la salinitat i compensada pels nutrients, i el canvi de composició de la comunitat fotosintètica cap a la dominància de les diatomees, així com la pèrdua de biodiversitat d'invertebrats, identificant els quironòmids com a tàxon indicador d'aigües salinitzades. Contràriament a la nostra hipòtesi, la interacció sal-nutrients no va resultar ser l'escenari més perjudicial, sent la salinització l'estressor més sever. Futurs estudis s'han de centrar al voltant d'aquesta temàtica amb l'objectiu de dilucidar les respostes d'aquests ecosistemes enfront la interacció d'aquests estressors, així com la interacció amb altres factors d'estrès dels sistemes aquàtics.

Paraules clau: Salinització, Aigües Residuals, Biofilm, Macroinvertebrats, Aigües Dolces

## **ABSTRACT**

Human activities are leading to increased salinisation of freshwater ecosystems. Salinisation often co-occurs with nutrient pollution in wastewaters and agricultural runoff, but their interactive effect on freshwater ecosystems remains poorly explored. The aim of this work is to study the interactive effects of salt and nutrient pollution on biological communities in river ecosystems. Using artificial channels, the effects of different treatments on biofilm and macroinvertebrate communities were tested. Six experimental conditions were recreated with three replicates for each treatment: Control (C), Salt (S), High Nutrient Concentration (NH), Low Nutrient Concentration (NL) and the interactions between the nutrient and salt conditions (SNH and SNL). During the exposure, the water was renewed every three days and physico-chemical parameters of the water (pH, electrical conductivity, temperature, dissolved oxygen and oxygen saturation), functional parameters of the biofilm (phosphorus uptake and photosynthetic efficiency) and structural parameters of the photosynthetic community (chlorophyll a, total dry ash-free and biofilm composition) were collected. At the end of the exposure time, all invertebrates from each channel were collected for subsequent binocular analysis. The results showed functional losses of the biofilm, driven by salinity and compensated by nutrients, and the change of photosynthetic community composition towards the dominance of diatoms, as well as the loss of invertebrate biodiversity, identifying chironomids as an indicator taxon of salinised waters. Contrary to our hypothesis, the salt-nutrient interaction did not prove to be the most detrimental scenario, being salinisation the most severe stressor. Future studies should focus on this issue in order to elucidate the responses of these ecosystems to the interaction of these stressors, as well as the interaction with other stressors in aquatic systems.

Keywords: Salinization, Wastewaters, Biofilm, Macroinvertebrates, Freshwater

## INDEX

<b>1. INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>1</b>
1.1.- Salinització: que és? .....	1
1.2.- Causes i efectes de la salinització .....	1
1.3.- Interacció amb les aigües residuals .....	4
1.4.- Objectius i hipòtesis .....	6
<b>2. METODOLOGIA .....</b>	<b>7</b>
2.1.- Disseny experimental.....	7
2.2.- Estudi de l'efecte en la cadena tròfica.....	10
2.3.- Anàlisi estadístic .....	10
<b>3. RESULTATS.....</b>	<b>12</b>
3.1.- Paràmetres fisico-químics de l'aigua.....	12
3.2.- Respostes funcionals del biofilm .....	13
3.2.1.- Eficiència fotosintètica .....	13
3.2.2.- Capacitat d'absorció de fòsfor .....	14
3.3.- Respostes estructurals de la comunitat fotosintètica del biofilm .....	15
3.3.1.- Massa Seca Lliure de Cendres (AFDM).....	15
3.3.2.- Clorofil·la a (Chl-a) .....	16
3.3.3.- Composició de la comunitat del biofilm.....	17
3.4.- Respostes de la comunitat de macroinvertebrats.....	18
3.4.1.- Índexs de biodiversitat i abundàncies .....	18
3.4.2.- Valor Indicador .....	20
<b>4. DISCUSSIÓ .....</b>	<b>21</b>
<b>5. CONCLUSIONS.....</b>	<b>23</b>
<b>AGRAÏMENTS .....</b>	<b>24</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>25</b>

# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1.- Salinització: que és?

La salinització de l'aigua dolça ha sorgit com un tema de creixent preocupació ecològica (Cañedo-Argüelles et al., 2016; Kaushal et al., 2005). La salinització dels rius s'està produint en tots els continents habitats a conseqüència de diverses activitats humanes, i es preveu que empitjori a causa del canvi climàtic i a l'augment de la demanda d'aigua (Kefford et al., 2016).

La salinitat, considerada com la concentració total d'ions inorgànics dissolts, és un component inherent a totes les aigües continentals (Williams & Sherwood, 1994; Vendrell-Puigmitja et al., 2021). Encara que en principi la salinitat pot referir-se a qualsevol ió inorgànic, en la pràctica sol ser el resultat dels següents ions principals:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  i  $\text{HCO}_3^-$  (Cañedo-Argüelles, 2013). En les aigües continentals, la salinitat pot variar des de desenes de mg/L fins a centenars de g/L, essent un factor important que limita la distribució de la biota. De fet, la biota aquàtica s'ha agrupat comunament segons les seves preferències de salinitat; és a dir, fauna d'aigua dolça, fauna d'aigua salobrosa i fauna marina (Remane & Schlieper, 1971).

La salinització es podria definir com el procés (o conjunt de processos) que provoca l'augment de la concentració d'ions dissolts en un medi (Williams, 1999), sigui en el cas de les aigües o d'altres sistemes com el sòl.

## 1.2.- Causes i efectes de la salinització

La caracterització de la salinització es fa basant-se en l'origen de les sals.

Es considera salinització primària quan els processos naturals condueixen a l'augment del contingut iònic de les aigües superficials continentals (Cañedo-Argüelles et al., 2019). Per contra, l'augment del contingut iònic de les aigües continentals causat per activitats humanes (construcció, extracció de recursos o canvis en la cobertura del sòl que augmenten el transport d'ions a la superfície), es considera salinització secundària (Kaushal et al., 2018; Steffen et al., 2011; Cañedo-Argüelles et al., 2019; Vendrell-Puigmitja et al., 2021).

En absència d'influències antropogèniques, la salinitat i les proporcions dels ions provenen fonamentalment de tres fonts: (1) La meteorització de la conca; (2) L'aerosol marí, en les localitats costaneres; (3) Petites quantitats de sals dissoltes en l'aigua de pluja a conseqüència de l'evaporació de l'aigua de mar. Així doncs, la salinitat natural dels rius és una funció complexa i dinàmica del clima (recent i passat), la geologia de la seva conca, la distància a la mar, la topografia i la vegetació.

Per altra banda, la salinització secundària és una amenaça global, i creixent, que planteja el risc de causar greus pèrdues de biodiversitat i de comprometre els béns i serveis dels ecosistemes que proporcionen els rius, aiguamolls i llacs del món (Cañedo-Argüelles, 2020). Per això, la salinització ha estat qualificada com un dels factors d'estrès més importants per als ecosistemes d'aigua dolça (De Castro-Català et al., 2015) i els seus organismes (Cañedo-Argüelles et al., 2013; Velasco et al., 2018; Hintz & Relyea, 2019).

Les activitats antropogèniques com la mineria, l'agricultura i l'aplicació de sals de desglaç en les carreteres estan augmentant la concentració de sal de les aigües dolces (Thorslund et al., 2021; Cunillera-Montcusí et al., 2022), i s'espera que aquesta contaminació augmenti en el futur a causa del canvi global (Le et al., 2019; Olson, 2018).

Les activitats mineres es consideren un dels motors més importants de la salinització secundària (Cañedo-Argüelles et al., 2012), i és una de les causes de salinització del riu Llobregat, ja que el seu pas es troba molt a prop de les mines de potassa de Sallent. Els residus produïts per aquesta activitat solen ser emmagatzemats en zones pròximes a les mines, des d'on poden arribar a les aigües superficials i subterrànies per escolament i infiltracions, causant greus efectes en les comunitats d'aigua dolça al produir-se pics de conductivitat. A més, en l'estació seca, la reduïda capacitat de dilució dels rierols condueix a un augment de les conductivitats, és a dir, de la salinitat, fet important en les regions mediterrànies (Kefford et al., 2016; Vendrell-Puigmitja et al., 2022). La manca de normativa eficaç per tractar les mines abandonades suposa un afegit que en moltes regions contribueix a perpetuar aquesta contaminació salina (Vendrell-Puigmitja et al., 2021).

Sumat a la mineria, els canvis de l'ús del sol, i el pertinent canvi de vegetació que redueix la captació d'aigua del sòl, juntament amb l'abocament d'aigües residuals agrícoles salines, a causa de l'ús de fertilitzants, provoca l'augment de la salinitat de moltes masses d'aigua dolça, incloent-hi les subterrànies, que acaben influenciant en la salinització de rius i llacs (Williams, 2001). S'ha demostrat que l'agricultura augmenta la concentració de sals en els sòls a través de diverses vies: (1) la substitució de la vegetació d'arrels profundes pels cultius provocant l'augment de les capes freàtiques que poden diluir les sals del sòl, (2) la introducció de sals mitjançant el reg i acumulant-se al sòl, degut a una lixiviació insuficient, i (3) per les sals contingudes en els fertilitzants aplicats als cultius (Estévez et al., 2018). En totes aquestes situacions, les sals poden acabar en els ecosistemes d'aigua dolça circumdants als cultius a través de l'escolament superficial.

La salinització de l'aigua dolça té un impacte en les seves comunitats (Cañedo-Argüelles et al., 2017), modificant l'estructura, el funcionament i processos de l'ecosistema (Kefford et al., 2016). En els ecosistemes d'aigua dolça, les respostes a curt termini a l'augment de la salinització són clares: la biodiversitat disminueix al llarg d'un gradient de salinitat (Kefford et al., 2016), i moltes espècies no sobreviuen quan se supera un determinat llindar de salinitat (Cañedo-Argüelles et al., 2020). De fet, els organismes tenen diferents sensibilitats cap a l'estrès salí i, per tant, s'espera que la salinització alteri la composició de les comunitats d'aigua dolça (Berger et al., 2018; Vendrell-Puigmitja et al., 2021).

Per exemple, s'ha demostrat que la sal altera l'estructura de les comunitats microbianes. Els efectes indesitjables de l'augment de la salinitat en determinats tàxons poden influir en processos ecosistèmics més amplis dels sistemes aquàtics relacionats amb la productivitat primària, el cicle dels nutrients i la complexitat de les xarxes tròfiques (Kahusal et al., 2005). La Directiva Marc de l'Aigua (DMA) identifica els biofilms com un compartiment biològic que ha de ser objecte d'avaluació de l'estat ecològic de les masses d'aigua (Vendrell-Puigmitja et al., 2021). Els biofilms són comunitats microbianes complexes formades per bacteris, algues, fongs i microfauna, adherides a superfícies en entorns aquàtics que poden mostrar respostes ràpides a canvis del medi (Besemer, 2015). A més, els biofilms mantenen el funcionament ecosistèmic i contribueixen als mecanismes d'absorció i processament de nutrients i contaminants, autodepurant els ecosistemes aquàtics en funcionament (Sabater et al., 2007) i esdevenint un component clau d'aquests.

S'ha observat que la salinitat afecta la funcionalitat i l'estructura del biofilm aquàtic modificant paràmetres funcionals (Proia et al., 2017) i canviant la composició de la comunitat del biofilm. Funcionalment, l'eficiència fotosintètica disminueix en concentracions d'alta salinitat, de la mateixa manera que la capacitat d'absorció de nutrients (SRP i  $\text{NH}_4^+$ ) (Vendrell-Puigmitja et al., 2022). Les respostes dels biofilms a la salinització poden conduir a una reducció de la densitat d'algues i del creixement, així com a un canvi en la dominància dels tàxons quan s'exposen a concentracions altes de NaCl i  $\text{NaHCO}_3$  en l'aigua (Vendrell-Puigmitja et al., 2021).

Un altre grup d'organismes sensibles als nivells elevats de sals són els invertebrats d'aigua dolça, i especialment els insectes (Pinder et al., 2005; Kefford, 1998; Wolf et al., 2009). Les seves comunitats poden veure's alterades significativament per la salinització de les aigües (Hart et al., 1991; Böhme, 2011; Kefford et al., 2011).

Les respostes en l'àmbit de la comunitat de macroinvertebrats aquàtics a la salinització s'han començat a conèixer al llarg de les últimes dècades. Per exemple, els treballs a llarg termini en el riu Werra (Alemanya) (Bäthe & Coring, 2011) van identificar un augment



significatiu de la riquesa d'espècies després de la reducció de l'activitat d'extracció de sal. Diversos estudis han informat de la disminució de la riquesa d'espècies al llarg dels gradients de conductivitat (Böhme, 2011; Kefford et al., 2011; Pinder et al., 2005;), però la influència d'altres factors dificulta la quantificació de les respostes de les comunitats d'invertebrats als nivells elevats de salinitat (Cañedo-Argüelles et al., 2012).

En assajos en mesocosmos al riu Llobregat (Cañedo-Argüelles et al., 2012), les condicions de major salinitat modificaven la comunitat de macroinvertebrats, disminuint la densitat, la riquesa i diversitat, així com perdent els tàxons més sensibles i obtenint més individus a la deriva. La salinització, doncs, apunta a ser una causa de reducció dels índexs de la comunitat, especialment en la diversitat.

Fins ara, la majoria d'investigacions s'han focalitzat en un dels dos compartiments, biofilm o macroinvertebrats. És per això que en aquest experiment plantejem un mesocosmos on s'integren els dos tipus d'organismes per entendre com s'influeixen les diferents comunitats sota estrès salí, i com múltiples estressos poden modificar les respostes.

La importància d'estudiar els dos compartiments en conjunt rau en la interdependència que tenen invertebrats i biofilm. La xarxa tròfica dels sistemes fluvials connecta aquests grups d'organismes, al ser els organismes del biofilm una font d'alimentació pels invertebrats, fet que pot modificar la composició de la comunitat (Lawrence et al., 2002). No només invertebrats alimentant-se d'algues, sinó que aquestes ofereixen hàbitat i refugi a la fauna, sobretot pel que fa als estats més primerencs del cicle vital (Cacabelos et al., 2020).

És important tenir en compte que els ecosistemes d'aigua dolça es veuen afectats per diferents fonts de contaminació, així com per alteracions hidrològiques i físiques, per la qual cosa se sotmeten a múltiples factors d'estrès. Atès que la salinització és causada per una varietat d'activitats humanes, els seus potencials factors d'estrès són molts i poden interactuar de diferents maneres (Cañedo-Argüelles, 2020).

### **1.3.- Interacció amb les aigües residuals**

A conseqüència del creixement poblacional i de la migració cap a les àrees urbanes, s'ha produït un augment de l'activitat industrial i agrícola destinada al subministrament de recursos. Associat a aquests canvis, les activitats humanes han enriquit els ecosistemes d'aigua dolça amb nutrients alterant el seu estat tròfic (Lind et al., 2018). Aquest fet s'observa freqüentment en les aportacions d'aigües, crues o tractades en estacions depuradores d'aigües residuals (EDAR), que han augmentat i són una font de contaminació puntual rellevant en els ecosistemes fluvials (Pereda et al., 2019).

Els abocaments d'aigües residuals són un component important de la contaminació de l'aigua, contribuint a la demanda d'oxigen i a la de nutrients, fomentant la proliferació d'algues i conduint a un ecosistema aquàtic desestabilitzat. El problema s'agreuja en les zones en les quals els sistemes de tractament d'aigües residuals són senzills i poc eficients (Morrison et al., 2001; Igbinosa & Okoh, 2009). Derivat d'aquests efluentes de EDARs poc eficient trobem que es modifiquen paràmetres fisico-químics de l'aigua receptora.

S'ha observat que aquests efluentes provocaven variacions del pH, variable molt correlacionada amb altres factors com la conductivitat elèctrica (EC) i l'oxigen dissolt (DO). En aquests estudis, per culpa de l'efluent de l'EDAR, es va observar un augment de la salinitat de l'aigua, i el corresponent augment de la EC (Igbinosa & Okoh, 2009).

Funcionalment, lligat a l'augment dels nitrats, nitrits i fosfats, les aigües receptores pateixen una reducció de la capacitat d'autodepuració, causada per la disminució de la capacitat de captació de nutrients dels organismes (Martí et al., 2004), esdevenint els nutrients part de l'augment de la conductivitat.

Per tant, trobem en els sistemes de tractament d'aigua, i les aigües residuals, un nou factor de salinització secundària dels medis aquàtics fluvials, sobretot aquells més pròxims als nuclis urbans i industrials.

En comunitats fotosintètiques, a causa de l'enriquiment amb nutrients, la resposta a la salinitat varia tendint cap a una comunitat dominada per cianobacteris i algues verdes filamentoses (Greco et al., 2021), i això repercuteix en l'estructura de la resta de comunitats del medi aquàtic com la creació o manteniment d'hàbitat i refugi per a macroinvertebrats (Cacabelos et al., 2020).

En un estudi de la interacció entre la salinització i un medi enriquit en nutrients, s'han vist alguns resultats sobre el biofilm, on la concentració de Chl-a sembla indicar que la biomassa total no varia i els paràmetres fisico-químics de l'aigua resten força estables. Pel que fa a la composició, la dominància taxonòmica del biofilm la desenvolupen cloròfits i diatomees (Cochemo et al., 2017), contràriament al cas anterior en situació de només enriquiment de nutrients. Aquest fet evidència la necessitat de més estudis en aquest camp.

Tot i que la salinització i la contaminació per enriquiment de nutrients sol donar-se a la vegada (Walsh et al., 2005), l'efecte combinat d'aquests dos estressors sobre les comunitats aquàtiques i el funcionament dels ecosistemes aquàtics no ha estat gaire estudiat i mereix atenció.

#### **1.4.- Objectius i hipòtesis**

Aquest treball té com a objectiu principal l'estudi dels efectes produïts en les comunitats biològiques de sistemes fluvials influenciats per la interacció de la salinització secundària i l'enriquiment amb nutrients de les aigües.

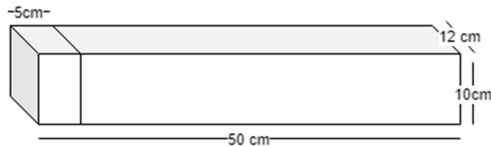
El primer objectiu específic és analitzar l'efecte interactiu de la salinització i les aigües residuals sobre la comunitat, funcionalitat i estructura del biofilm. Com a primera hipòtesi del treball (H1) esperem que en les condicions experimentals de major salinitat, i sobretot aquelles enriquides amb nutrients, s'observi una disminució funcional del biofilm, reduint-se l'activitat fotosintètica, així com l'absorció de fòsfor. Com a segona hipòtesi (H2), esperem veure un canvi de proporcions en la composició del biofilm per cada condició experimental sense canvis significatius en la biomassa total.

Pel que fa a la fauna, el segon objectiu específic s'enfoca en l'anàlisi de la comunitat de macroinvertebrats i com pot variar aquesta sota l'efecte dels tractaments. Per la tercera hipòtesi del treball (H3), s'espera que les mètriques de diversitat (riquesa taxonòmica, índex de Shannon i índex de Simpson) de la comunitat canviïn indicant una reducció de la biodiversitat. En quant a la quarta (H4), i última hipòtesi, s'espera observar un canvi en la dominància d'algun tipus de tàxon més resistent a la salinitat i les condicions d'alt contingut de nutrients de l'aigua, perdent els més sensibles i podent identificar algunes espècies indicadores de cada condició.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1.- Disseny experimental

L'experiment es va dur a terme en 18 mesocosmos, en forma de canals artificials (50 cm llarg), sota condicions controlades de temperatura ( $\approx 15^{\circ}\text{C}$ ) i un fotoperíode determinat de 12:12.



**Imatge 1.- Mides dels canals que s'utilitzen com a mesocosmos per a l'estudi**



**Imatge 2.- Disposició dels canals a les instal·lacions del BETA Tech Center UVic. Font: Imatge pròpia**

Una vegada instal·lats els canals es van mantenir les condicions basals de l'aigua del punt de mostreig on s'extrauria les mostres per a l'inòcul. L'aigua utilitzada en els canals s'agafava del circuit d'aigua de les instal·lacions fent-la passar prèviament per un filtre. Per equiparar els paràmetres fisico-químics de l'aigua del riu es va analitzar prèviament una mostra d'aigua del punt de mostreig. Una vegada analitzat, es van modificar alguns paràmetres a través de l'addició de sals, com nivells de nutrients i salinitat.

El punt de mostreig (Imatge 3), tant per al biofilm com per les mostres de macroinvertebrats, així com l'extracció de mostra d'aigua per al seu anàlisi, es va fer al riu Llobregat a l'altura de Balsareny. Poc després d'aquest punt del riu es troben les mines de potassa de Sallent, les quals actuarien com una font de salinització d'aquestes aigües.



**Imatge 3.- Ubicació del punt de mostreig al riu Llobregat a l'alçada de Balsareny (marcat en vermell). Font: Imatge extreta de Google Maps**

Prèviament a l'aplicació dels tractaments es van obtenir mostres del biofilm. Es produïa una suspensió filtrada, que serviria d'inòcul, procedent del raspament de pedres del punt de mostreig del riu Llobregat. S'inoculà cada canal amb 250ml de la mostra filtrada i homogeneïtzada del biofilm. Al cap d'una setmana es va afegir una segona dosi igual de l'inòcul per a facilitar el creixement del biofilm. El desenvolupament requereix unes tres setmanes per arribar a la fase "plateau", que va ser el temps que es va deixar fins a l'aplicació dels tractaments i la introducció dels macroinvertebrats. En aquest punt es van preparar els tractaments per aplicar a cada canal.

La recollida de macroinvertebrats d'aigua dolça es va fer al mateix punt del riu Llobregat on es va adquirir la mostra per a l'inòcul de biofilm. A través de l'ús de xarxes amb malla de 250 micres, es van recollir mostres de la màxima representabilitat d'hàbitats possible emprant la tècnica "kicking". L'obtenció d'individus es va complementar amb el raspament de la superfície de pedres. La fauna recollida va ser transportada a continuació fins a les instal·lacions del BETA-Tech Center de la UVic, i es van abocar 500 ml d'aigua amb individus a cada canal.

A partir d'aquest moment comença l'aplicació dels tractaments establerts per a l'estudi (Taula 1). Cadascun dels canals reben un dels 6 tractaments (x 3 rèpliques): Control (C), Sal (S), Alta Concentració de Nutrients (NH), Baixa Concentració de Nutrients (NL) i les interaccions entre les condicions de sal i nutrient (SNH i SNL). Els tractaments es van disposar aleatòriament en els canals. La condició NL, tot i ser concentració baixa, els nivells de nutrients ja són més elevats que la situació C o S. Es considera una situació intermitja entre aquests i la condició NH. Amb cada renovació d'aigua (cada tres dies) es tornava a afegir el tractament.

Tractaments	N-NH4 (mg/L)	P-PO4 (mg/L)	Cl (mg/L)
C	0,05	0,0375	33,5
NL	0,4	0,271	33,5
NH	0,843	0,807	33,5
S	0,05	0,0375	3000
SNL	0,4	0,271	3000
SNH	0,843	0,807	3000

**Taula 1.- Concentracions de cada component de cada tractament: Control (C), Sal (S), Alta Concentració de Nutrients (NH), Baixa Concentració de Nutrients (NL) i les interaccions entre les condicions de sal i nutrients (SNH i SNL).**

Els paràmetres analitzats van ser els següents:

- Paràmetres físico-químics de l'aigua: pH, conductivitat elèctrica (EC), temperatura, oxigen dissolt (DO) i saturació d'oxigen. Aquestes dades es van mesurar directament en cada mesocosmos amb una sonda multiparamètrica en cada renovació d'aigua (cada 3 dies).
- Per l'anàlisi dels nutrients es van recollir mostres d'aigua per a cada tractament (una mostra per canal) i es van filtrar a través d'un filtre de microfibra de vidre de 0,22 µm de diàmetre de porus. Les mostres d'aigua es van congelar immediatament i es van conservar a - 20 °C fins a la seva anàlisi seguint els protocols de APHA (American Public Health Association, 1992).
- Per l'obtenció de dades de l'absorció de fòsfor s'aïllava una de les 3 rajoles de vidre de 11 cm x 20 cm, de cada canal, en un aquari amb 2L d'aigua i, aplicant un pols inicial 4 vegades major al de cada tractament, es feien extraccions d'aigua a l'inici del procediment i cada 120 minuts al llarg de quatre hores. Les mostres d'aigua per a l'anàlisi del contingut de SRP es processaven i analitzaven seguint els protocols de APHA (American Public Health Association, 1992).
- Mostreig de biofilms en rajoles de vidre de 9 cm<sup>2</sup> un cop per setmana durant el temps d'exposició: biomassa total (per aproximació amb la clorofil·la a), massa seca lliure de cendres (AFDM), composició de la comunitat fotosintètica, eficiència fotosintètica i la capacitat d'absorció de fòsfor. En cada dia de mostreig es va recollir una rajola a l'atzar de cada mesocosmos. Immediatament després de la recollida, es va mesurar directament l'activitat fotosintètica i la composició de la comunitat amb un fluorímetre d'amplitud modulada (fluorímetre Mini-PAM, Walz, Efeltrich, Alemanya) i una sonda fluorimètrica portàtil BenthosTorch (bbe Moldaenke, Schwentineta, DK) (Vendrell-Puigmitja et al, 2020). A continuació, es van raspar els biofilms utilitzant un raspall de dents i es van suspendre en aigua del mesocosmos corresponent. Seguidament, es van prendre alíquotes de 10 ml de suspensió de biofilm per a analitzar la concentració de Chl-a (clorofil·la a i la massa seca lliure de cendres (AFDM), seguint els protocols de APHA (American Public Health Association, 1992).

- La comunitat de macroinvertebrats es va analitzar després de l'exposició durant dues setmanes als tractaments, contant i identificant els organismes a la lupa binocular seguint la guia "Invertébrés d'eau douce" (Tachet et al., 2010). La recollecció va consistir en el buidatge de l'aigua de cada mesocosmos fent-la passar per una xarxa de malla amb porus de 250 micres. Tot el que quedava a la malla era abocat a un recipient on es fixarien els organismes amb una solució d'alcohol al 70%, conservant-la a -18°C fins a l'anàlisi ocular.

## 2.2.- Estudi de l'efecte en la cadena tròfica

Paral·lelament a l'estudi de les comunitats, a l'inici del desenvolupament d'aquest treball, es va plantejar i iniciar un estudi sobre l'efecte d'aquests tractaments en la cascada tròfica, mesurant la taxa de depredació de les larves del gènere *Rhyacophila* sobre larves del gènere *Chironomidae* i observant el seu efecte sobre la biomassa del biofilm.

Per a cada canal, es va construir una gàbia amb malla amb porus de 250 micres (imatge 4), aïllant al seu interior una *Rhyacophila*, 10 quironòmids i una placa de vidre de 9cm<sup>2</sup> colonitzada amb biofilm. Es va triar aquesta mida de malla per tal de no saturar la superfície de la gàbia, però va resultar ser un espai suficient per permetre que els quironòmids poguessin marxar.



Imatge 4.- Fotografia del model de gàbia utilitzat per a l'aïllament de la cadena tròfica. Font: Imatge pròpia

No obstant, per les dificultats metodològiques esmentades, no es va poder tirar endavant. Això ens va portar a deixar de banda aquest aspecte i centrar-nos en l'estudi que presentem. Cal remarcar, però, que aquest tema d'estudi és molt interessant de cara al futur, ja que les comunitats fluvials responen a aquest tipus d'interacció.

## 2.3.- Anàlisis estadístics

Prèviament a l'aplicació dels tests estadístics es van comprovar les condicions de normalitat i homocedasticitat de les dades. Per els anàlisis individuals de totes les variables analitzades del biofilm i els paràmetres fisico-químics de l'aigua s'han utilitzat test ANOVA1-W (Anova One Way) per a l'anàlisi d'un sol moment mitjançant el paquet "stats" versió 4.2.1 (R Core Team, 2022), i rm-Anova 2W (repeated measures Two way Anova) per a l'anàlisi de mesures al llarg del temps fent servir el paquet "rstatix" versió 0.7.0 (Kassambara, 2021). Per tots dos tipus d'anàlisi estadístic, posteriorment es realitzava una comparació dos a dos

per tractament, i també per cada temps, amb un test de Tukey-HSD per l'anova simple i un test de Bonferroni per la rm-Anova 2W.

Per l'anàlisi de les dades de macroinvertebrats es van calcular tres índexs de biodiversitat (riquesa taxonòmica, índex de Shannon i índex de Simpson), utilitzant els paquets "vegan" versió 2.6.2 (Oksanen et al., 2022) i "BiodiversityR" versió 2.14.2.1 (Kindt and Coe, 2005). També es van comparar amb test Anova-1W (Anova One Way) i comparant-ho dos a dos entre tractaments amb un test de Tukey-HSD. A més, a través de la l'anàlisi Indval (Dufrière and Legendre, 1997), s'elabora l'estudi d'espècies indicadores que caracteritzin cada tractament amb el paquet "labdsv" versió 2.0.1 (Roberts, 2019). Aquest anàlisi assigna cada tàxon a un grup de tractament més probable i proporciona un valor indicador (IndVal) i un p-valor segons les abundàncies i freqüències relatives de cada tàxon dins de cada tractament, on considerem que són indicadors robustos només aquells valors indicadors que donin p-valors menors de 0.05. Els anàlisis estadístics s'han dut a terme amb R versió (R Core Team, 2022).



### 3. RESULTATS

#### 3.1.-Paràmetres físico-químics de l'aigua

La Taula 2 presenta els paràmetres físico-químics de l'aigua durant el període d'estudi. Les dades de la setmana 0 corresponen a les característiques de la qualitat de l'aigua just abans d'aplicar els tractaments. L'etiquetatge en aquests moments es correspon al tractament que tindran aquests canals a partir de l'exposició. Les dades de setmana 1 i setmana 2 corresponen a les obtingudes un cop finalitzada cadascuna de les setmanes d'exposició als tractaments corresponents.

Ni en el moment d'inici de l'estudi (setmana 0), ni en les setmanes posteriors d'exposició (setmanes 1 i 2), el pH no va presentar diferències significatives entre cap dels tractaments. Pel que fa al llarg del temps, només es van observar diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre l'inici ( $8.31 \pm 0.102$ ) i l'última setmana d'exposició ( $8.613 \pm 0.072$ ) en el tractament NH.

La EC, com era d'esperar al ser un dels paràmetres manipulats, no pateix diferències significatives al llarg de les dues setmanes d'exposició, però sí entre els tractaments que vam determinar diferents.

Tant el DO com la saturació d'oxigen van presentar diferències significatives ( $p < 0.05$ ) al llarg del temps, però no per l'efecte dels tractaments. Pel que fa a la variació en el temps, només es van observar diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre l'inici (setmana 0, amb valor  $9,11 \pm 0.29$  mg/L O<sub>2</sub>) i l'última setmana (setmana 2, amb valor  $9.77 \pm 0.50$  mg/L O<sub>2</sub>) d'exposició en el tractament NH, observant-se un lleuger augment de la concentració d'oxigen.

En últim lloc, respecte a la temperatura sí que es van trobar diferències significatives ( $p < 0.05$ ) tant per l'efecte dels tractaments com del temps (Inici  $T^\circ = 15.50 \pm 0.26$ ; Setmana 1  $T^\circ = 15.16 \pm 0.20$ ; Setmana 2  $T^\circ = 15.57 \pm 0.30$ ). En el cas dels tractaments, tot i trobar-se diferències globals, no es van identificar diferències significatives en les comparacions dos a dos. Les diferències trobades s'atribueixen a la posició de cada canal respecte al sistema de refrigeració de la sala on es trobaven els canals, i en ser tan petites no tenen gaire rellevància per les comunitats.

	Tractament	Pàrametres físico-químics				
		pH	Conductivitat electrica (EC)	Oxigen Dissolt (DO)	Saturació d'oxigen (%)	Temperatura
Setmana 0 (condicions d'inici abans de l'exposició)	C	8.263(±0.025)	270.333(±2.517)	8.993(±0.26)	90.367(±2.757)	15.667(±0.058)
	NH	8.31(±0.102)	265.667(±4.933)	8.95(±0.174)	89.9(±1.587)	15.633(±0.208)
	NL	8.373(±0.214)	259.667(±13.577)	9.097(±0.065)	90.833(±0.666)	15.333(±0.153)
	S	8.577(±0.351)	252.333(±25.794)	9.44(±0.449)	94.967(±4.676)	15.5(±0.173)
	SNH	8.273(±0.11)	278(±15.62)	9.207(±0.371)	91.7(±2.884)	15.2(±0.4)
	SNL	8.237(±0.012)	271.333(±2.082)	8.973(±0.203)	90.3(±1.908)	15.667(±0.116)
Setmana 1 d'exposició als tractaments	C	7.957(±0.168)	291.667(±8.327)	8.22(±0.936)	81.9(±9.36)	15.167(±0.058)
	NH	8.343(±0.045)	307(±3.606)	9.23(±0.257)	92.067(±2.65)	15.233(±0.116)
	NL	8.213(±0.138)	298.333(±10.693)	9.107(±0.064)	90(±0.346)	14.967(±0.058)
	S	8.183(±0.133)	3574.333(±71.71)	8.953(±0.31)	89.333(±3.436)	15.267(±0.153)
	SNH	8.193(±0.083)	3575(±101.868)	9.02(±0.321)	89.067(±2.589)	14.967(±0.306)
	SNL	8.237(±0.1)	3630.667(±24.007)	9.037(±0.305)	90.267(±3.253)	15.333(±0.153)
Setmana 2 d'exposició als tractaments	C	8.53(±0.139)	302.667(±68.806)	9.553(±0.331)	95.2(±2.17)	15.733(±0.116)
	NH	8.613(±0.072)	312(±26)	9.627(±0.211)	97.167(±1.069)	15.567(±0.252)
	NL	8.613(±0.28)	289(±38.223)	10.107(±0.585)	100.933(±5.572)	15.267(±0.153)
	S	8.34(±0.07)	3720(±18.33)	9.59(±0.277)	98.267(±2.223)	15.833(±0.208)
	SNH	8.36(±0.299)	3747(±44.136)	10.273(±0.82)	102.267(±7.58)	15.233(±0.322)
	SNL	8.303(±0.049)	3732.333(±74.333)	9.463(±0.311)	95.5(±3.318)	15.8(±0.1)

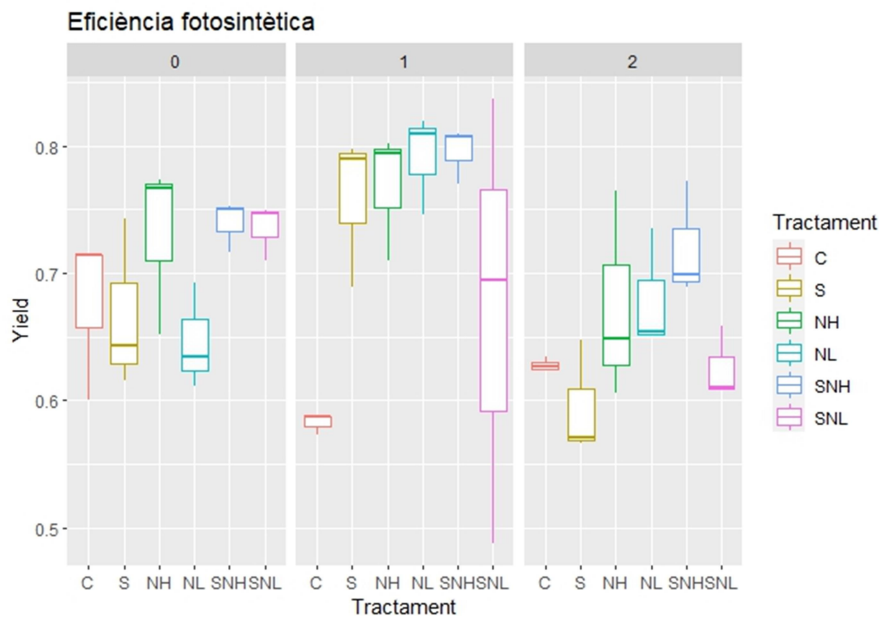
**Taula 2.- Paràmetres físico químics de l'aigua inicials i durant el temps d'exposició als tractaments: Control (C), Sal (S), Alta Concentració de Nutrients (NH), Baixa Concentració de Nutrients (NL) i les interaccions entre les condicions de sal i nutrients.**

### 3.2.- Respostes funcionals del biofilm

#### 3.2.1.- Eficiència fotosintètica

L'eficiència fotosintètica presenta diferències significatives al llarg del temps d'exposició i també entre tractaments (Gràfic 1). Específicament, les diferències es troben entre els tractaments S-NL ( $p < 0.05$ ) i S-SNH ( $p < 0.05$ ). El tractament S va presentar l'eficiència fotosintètica més baixa al final del temps d'exposició ( $0.59 \pm 0.04$ ). En el cas dels tractaments NL ( $0.68 \pm 0.04$ ) i SNH ( $0.72 \pm 0.04$ ) van presentar una major eficiència fotosintètica que el tractament S, destacant de totes formes que l'eficiència fotosintètica va resultar notablement afectada en els 3 tractaments. El tractament SNL presenta la major variància (min=0.488 i màx=0.837) després de la primera setmana d'exposició, però el resultat comparatiu entre l'inici i final de l'exposició al tractament mostra clarament una disminució de l'eficiència

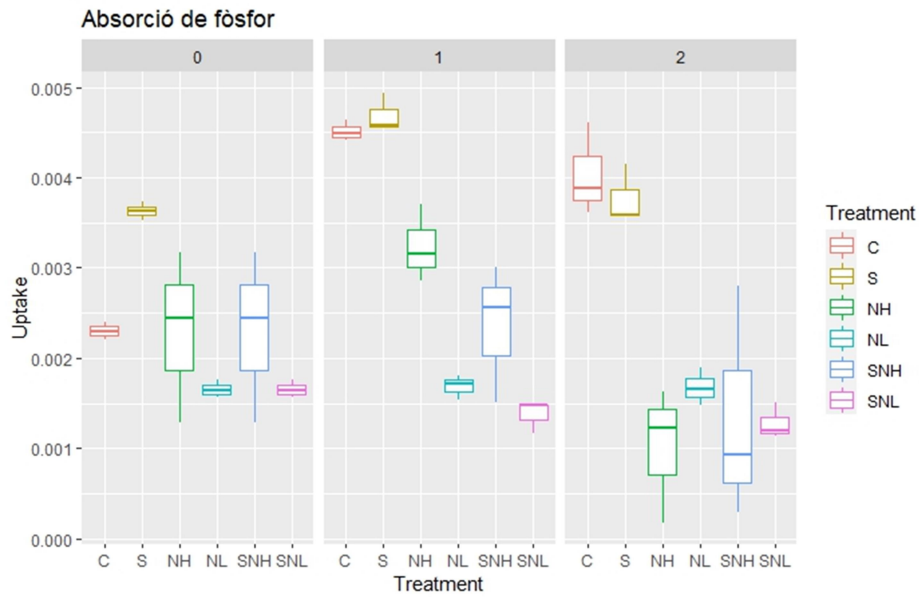
fotosintètica. A nivell global, la majoria de tractaments semblen presentar una disminució al llarg del temps de la seva eficiència fotosintètica.



**Gràfic 1.-Evolució en el temps de l'eficiència fotosintètica del biofilm segons tractaments: Control (C), Sal (S), Alta Concentració de Nutrients (NH), Baixa Concentració de Nutrients (NL) i les interaccions entre les condicions de sal i nutrient (SNH i SNL)**

### 3.2.2.- Capacitat d'absorció de fòsfor

La capacitat d'absorció de fòsfor (Fòsfor Soluble Reactiu (SRP)) va presentar diferències significatives per l'efecte dels tractaments i l'efecte del temps (Gràfic 2). Pel que fa als tractaments s'han observat diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre les següents combinacions: C-NL, C-SNL, S-NH, S-NL, S-SNH, S-SNL. SNL ( $0.001 \pm 0.0004 \text{ ugP/h}\cdot\text{cm}^2$ ) i SNH ( $0.001 \pm 0.0005 \text{ ugP/h}\cdot\text{cm}^2$ ) van presentar una tendència a la disminució d'absorció de fòsfor des del moment d'exposició al tractament, mentre que la condició NH va primer augmentar l'absorció la setmana 1 ( $0.003 \pm 0.001 \text{ ugP/h}\cdot\text{cm}^2$ ) i, posteriorment, una reducció en finalitzar el temps d'exposició ( $0.001 \pm 0.001 \text{ ugP/h}\cdot\text{cm}^2$ ). Els valors d'absorció de fòsfor van resultar més alts en els tractaments control ( $0.004 \pm 0.001 \text{ ugP/h}\cdot\text{cm}^2$ ) i de sal ( $0.003 \pm 0.001 \text{ ugP/h}\cdot\text{cm}^2$ ) respecte a la resta de tractaments durant el temps d'exposició, no obstant aquests dos tractaments no presenten diferències entre ells. En el cas del temps, es van trobar diferències significatives ( $p < 0.05$ ) per al tractament S entre les setmanes 1 i 2, i per al tractament NH també entre les setmanes 1 i 2.

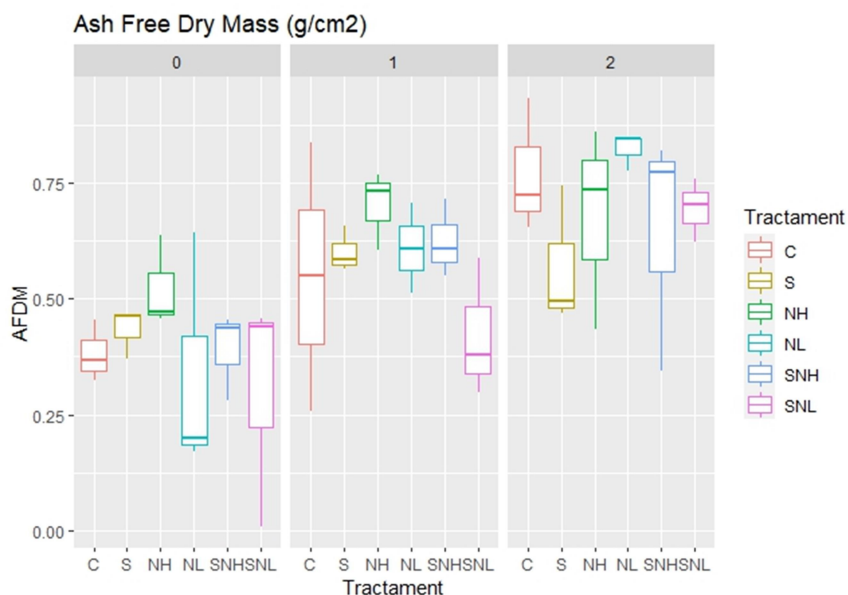


**Gràfic 2.- Evolució en el temps de les taxes d'absorció de fòsfor segons tractaments: Control (C), Sal (S), Alta Concentració de Nutrients (NH), Baixa Concentració de Nutrients (NL) i les interaccions entre les condicions de sal i nutrient (SNH i SNL)**

### 3.3.- Respostes estructurals de la comunitat fotosintètica del biofilm

#### 3.3.1.- Massa Seca Lliure de Cendres (AFDM)

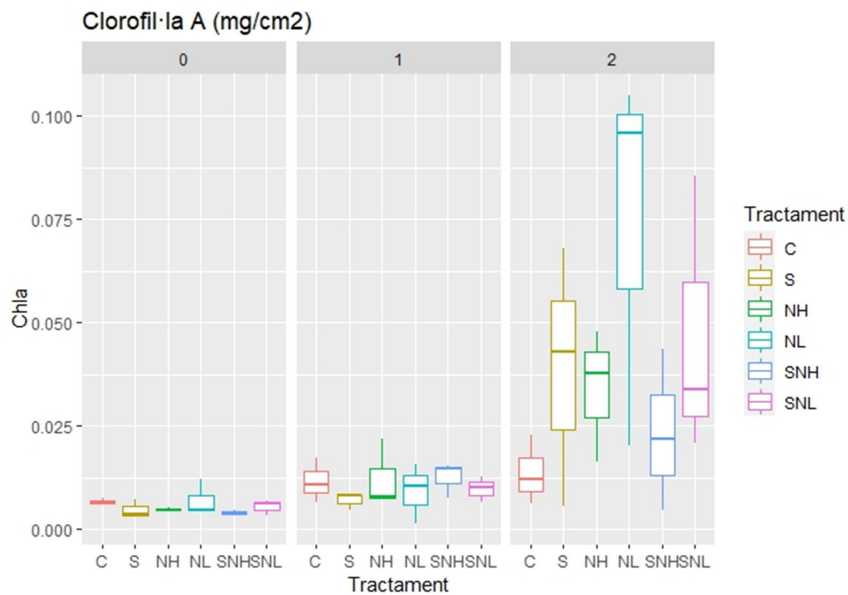
Els valors d'AFDM no van presentar diferències significatives entre tractaments en cap dels moments. Tanmateix, en el temps si que es va observar diferències entre el moment inicial i les dades durant l'exposició als tractaments (temps 0-1,  $p < 0.05$  i temps 0-2,  $p < 0.05$ ). S'observa un augment d'aquesta variable per a tots els tractaments.



**Gràfic 3.- Evolució en el temps de les dades de la massa seca lliure de cendres per cada tractament: Control (C), Sal (S), Alta Concentració de Nutrients (NH), Baixa Concentració de Nutrients (NL) i les interaccions entre les condicions de sal i nutrient (SNH i SNL)**

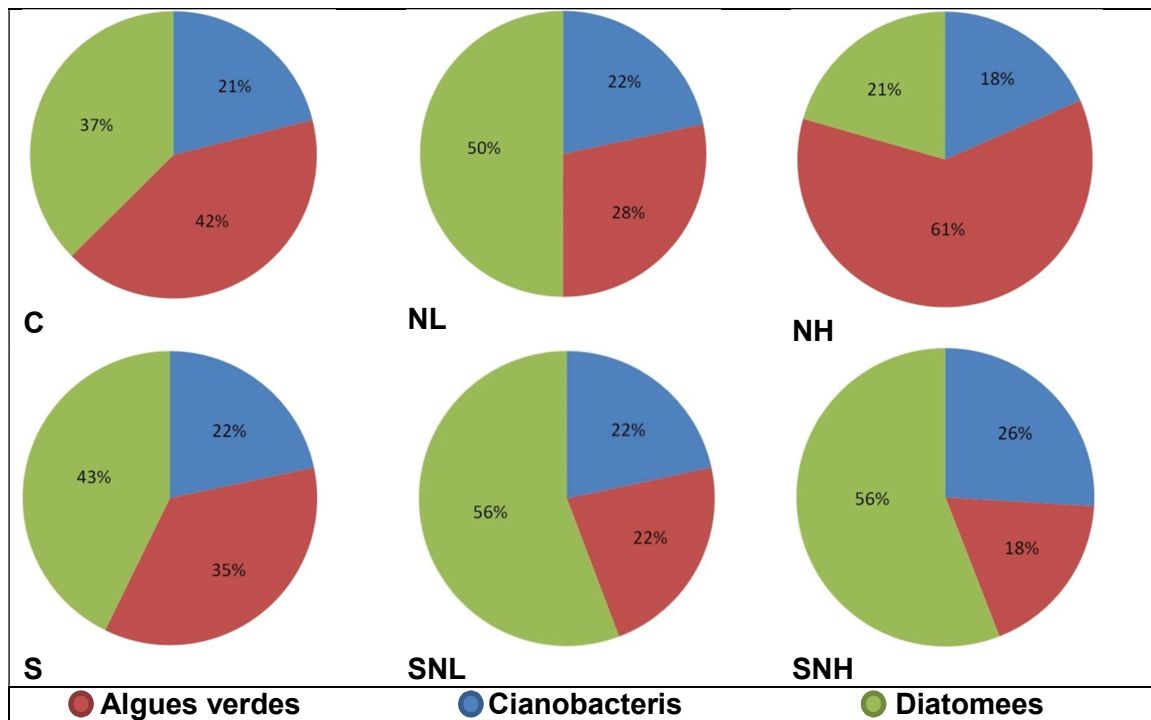
### 3.3.2.- Clorofil·la A (Chl-a)

Les mesures de Chl-a (com aproximació de la biomassa total) no van diferir significativament entre tractaments en cada moment de mesura. Al llarg del temps sí que va mostrar diferències significatives entre les setmanes 0 i 2 ( $p < 0.05$ ), i entre les setmanes 1 i 2 ( $p < 0.05$ ), mostrant l'última setmana de presa de mostres, en la finalització del temps d'exposició, valors de Chl-a majors en tots els tractaments respecte al moment inicial d'exposició i la primera setmana.



**Gràfic 4.-Evolució en el temps de les dades de Chl-A per cada tractament: Control (C), Sal (S), Alta Concentració de Nutrients (NH), Baixa Concentració de Nutrients (NL) i les interaccions entre les condicions de sal i nutrient (SNH i SNL)**

### 3.3.3.- Composició de la comunitat del biofilm

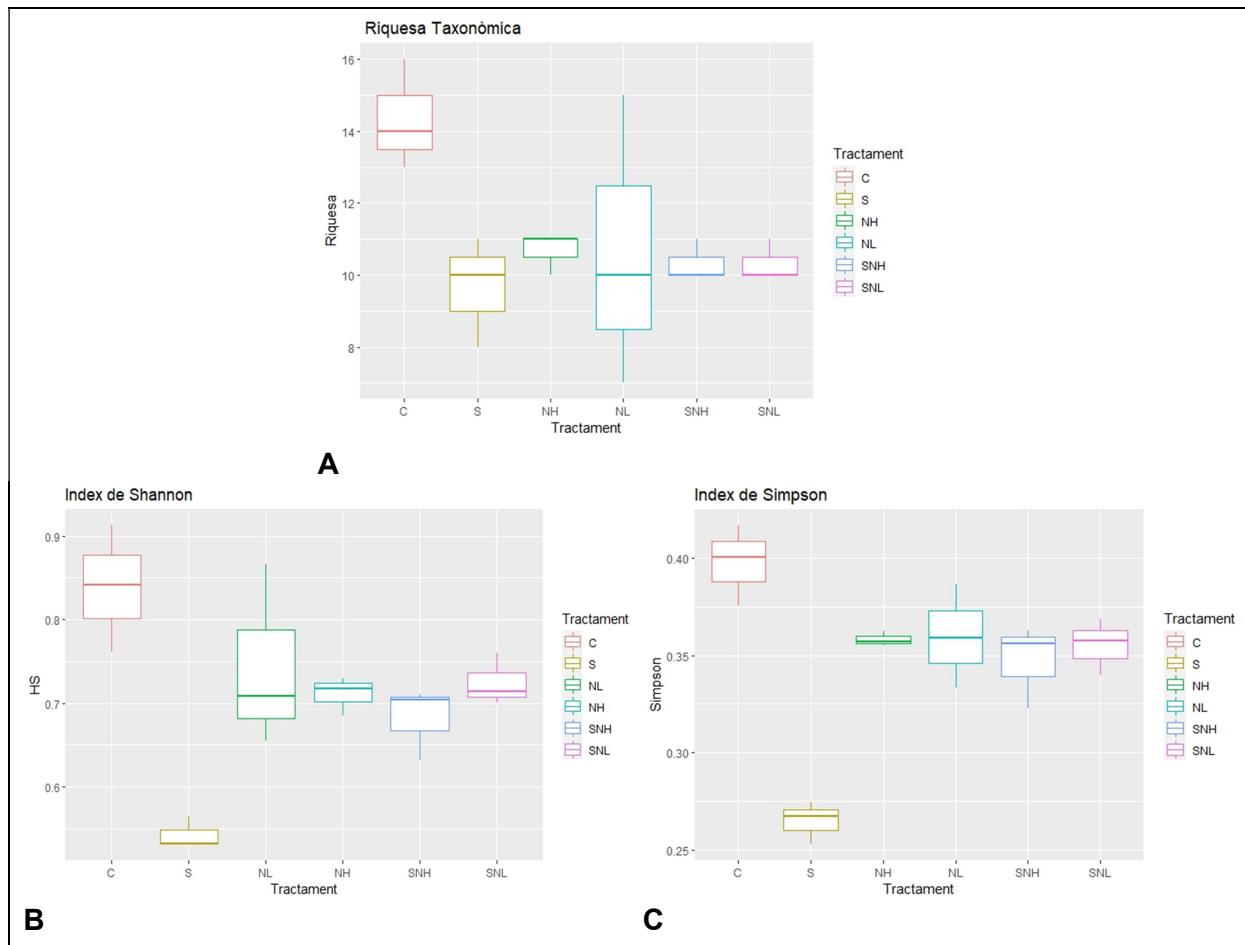


Gràfic 5.- Composició dels grans grups del biofilm a la finalització del temps d'exposició segons cada tractament: Control (C), Sal (S), Alta Concentració de Nutrients (NH), Baixa Concentració de Nutrients (NL) i les interaccions entre les condicions de sal i nutrient (SNH i SNL).

Les dades de composició dels grans grups del biofilm (Gràfic 5), mostren variacions segons cada tractament. Al final del temps d'exposició, veiem que l'efecte de la sal ha promogut un augment del percentatge de diatomees (43% respecte al control 37%) en detriment de les algues verdes (37% respecte al 42% en el control), accentuat en el cas de la interacció amb els nutrients SNH i SNL (56 %, respecte al 37% del control o el 43% del tractament només salí). En el cas d'altres concentracions de nutrients, les algues verdes van dominar la comunitat (reduint el percentatge de diatomees a un 21%). Aquest efecte no es va veure en el cas del tractament NL, on les diatomees van dominar respecte als altres dos grups (50%). Pel que respecta als cianobacteris, en qüestió de percentatges no va patir gaires diferències entre tractaments, però sí que s'observa una petita reducció en les del tractament NH (18% respecte al control 21%), i en el cas del tractament SNH es van veure lleugerament afavorits (26%).

### 3.4.- Respostes de la comunitat de macroinvertebrats

#### 3.4.1.- Índexs de biodiversitat i abundàncies



**Gràfic 6.- Representació dels Índexs de biodiversitat calculats per a les comunitats de macroinvertebrats de cada tractament: Control (C), Sal (S), Alta Concentració de Nutrients (NH), Baixa Concentració de Nutrients (NL) i les interaccions entre les condicions de sal i nutrient (SNH i SNL)**

A la figura A del Gràfic 6 veiem les dades de la riquesa (S) per cada tractament. En el test anova no va presentar diferències significatives entre tractaments, tot i això, sí que es veu diferències en el nombre total de famílies de cada condició.

A la figura B, les dades del índex de Shannon sí que van mostrar diferències significatives ( $p < 0.05$ ) segons tractaments. Concretament, els tractaments amb test de comparació dos a dos van ser significatius en les següents combinacions: C-S, NL-S, NH-S i SNL-S.

En últim lloc, a la figura C del Gràfic 5, es mostren les dades de l'índex de Simpson, que sí que van mostrar diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre tractaments. Les comparacions dos a dos dels tractaments que van resultar significatives van ser: C-S, SNH-C, NL-S, NH-S, SNH-S i SNL-S.

A la taula 3, es mostren les dades d'abundància mitjanes (i desviació estàndard) dels diferents taxons de la comunitat de macroinvertebrats per a cada tractament al qual ha estat exposada a la comunitat.

Nº Individus	Tractament					
	C	S	NL	NH	SNL	SNH
Chironomidae	1227(±31.6)	1863(±109.1)	1128(±283)	1233(±27)	1233(±27)	1173(±34.1)
Hydroptilidae	13.67(±0.6)	9.3(±0.6)	7.3(±1.5)	3.3(±2.5)	11(±1)	6.3(±2.1)
Rhyacophilidae	1(±0)	1(±1.7)	2(±1)	1.3(±1.2)	2.7(±3.1)	1.3(±0.6)
Ceratopogonidae	3.7(±2.1)	0.7(±1.2)	0.7(±0.6)	0.3(±0.6)	2(±2)	0.3(±0.6)
Elmidae	32.3(±7.5)	24(±5)	24.3(±3.1)	27(±7)	34(±7.5)	18.7(±4)
Baetidae	14(±1.7)	10.3(±3.2)	15.7(±9.3)	22(±18.2)	11(±2)	8.7(±3.1)
Caenidae	22(±4.4)	12.7(±5)	13.7(±6.5)	15.3(±5.5)	16.3(±7.1)	9(±4.4)
Oligochaeta	285.3(±3.1)	271.3(±8.6)	233.7(±67.7)	266.7(±18.5)	252(±15.9)	258.7(±27)
Gastropoda	2.7(±3.1)	0.3(±0.6)	0(±0)	1.7(±2.1)	2(±1)	4.3(±5.1)
Bivalvia	0(±0)	0(±0)	0(±0)	0.3(±0.6)	0(±0)	0(±0)
Leuctridae	2.3(±2.5)	0.3(±0.6)	1.7(±2.9)	1.3(±0.6)	1(±1)	3.7(±3.2)
Mollusca	0(±0)	0(±0)	0(±0)	0(±0)	1(±1.7)	0(±0)
Limoniidae	1(±1)	1.7(±1.2)	2(±2)	2(±1.7)	1.7(±1.5)	1(±1)
Athericidae	0(±0)	0.3(±0.6)	0(±0)	0(±0)	0(±0)	0.3(±0.6)
Empididae	2(±1.7)	0.3(±0.6)	1.7(±2.9)	0(±0)	0(±0)	0(±0)
Hydropsychidae	0.3(±0.6)	0.3(±0.6)	0(±0)	0(±0)	0(±0)	0(±0)
Gyrinidae	0.3(±0.6)	0.3(±0.6)	0(±0)	0(±0)	0(±0)	0(±0)
Polycentropodidae	3.3(±1.2)	0(±0)	1.7(±2.1)	1(±1)	0.3(±0.6)	2.7(±2.3)
Simuliidae	2.7(±3.8)	0(±0)	0.7(±1.2)	0.3(±0.6)	0(±0)	0(±0)
Hydracarina	9.7(±9.5)	0(±0)	3(±5.2)	0(±0)	0(±0)	0(±0)
Philopotamidae	0.3(±0.6)	0(±0)	0(±0)	0(±0)	0(±0)	0(±0)
Megaloptera	0.3(±0.6)	0(±0)	0(±0)	0(±0)	0(±0)	0(±0)
Erpobdellidae	0(±0)	0(±0)	0.3(±0.6)	0(±0)	0(±0)	0(±0)
<b>Abundància total</b>	<b>1624(±29.9)</b>	<b>2196(±112.6)</b>	<b>1436.3(±340.6)</b>	<b>1575.7(±37.0)</b>	<b>1568(±15.7)</b>	<b>1488(±71.0)</b>

**Taula 3.- Valors d'abundància ( mitjana i desviació estàndard) de cada taxó segons tractament: Control (C), Sal (S), Alta Concentració de Nutrients (NH), Baixa Concentració de Nutrients (NL) i les interaccions entre les condicions de sal i nutrient (SNH i SNL)**

A la taula d'abundàncies, s'observa que el tractament control és el que manté un nombre d'individus més elevat respecte a la resta de tractaments, exceptuant el tractament només salí, que mostra major densitat. Això es deu a la diferència de quironòmids que presenta aquest tractament. Es pot veure que els taxons amb major nombre d'individus en tots els tractaments van ser els quironòmids i els oligoquets.



### 3.4.2.- Valor Indicador

A la taula 4 es presenten el valor indicador, i la seva significació, dels taxons que s'han identificat com a indicadors d'algun tractament.

	Tractament	Valor Indicatiu	p-valor	Freqüència
Hydroptilidae	C	0,267	0,005	18
Oligochaeta	C	0,182	0,047	18
Chironomidae	S	0,237	0,007	18

Taula 4.- Resultats de l'anàlisi de taxons indicadors de cada tractament: Control (C), Sal (S), Alta Concentració de Nutrients (NH), Baixa Concentració de Nutrients (NL) i les interaccions entre les condicions de sal i nutrients (SNH i SNL)

Els resultats de l'anàlisi d'espècies indicadores mostra només la identificació de 3 grups taxonòmics. Pel que fa al tractament control, els taxons significatius de la situació original del medi aquàtic resulten ser els hidroptílids i els oligoquets. En el cas del tractament salí, el tàxon indicador resulta ser els quironòmids.

#### 4. DISCUSSIÓ

En relació amb la primera hipòtesi, s'ha comprovat que les condicions de salinitat i augment de nutrients al medi afecten la funcionalitat del biofilm provocant una reducció en els paràmetres funcionals d'absorció de fòsfor i eficiència fotosintètica (Berry & Dowton, 1982; Martínez et al., 2020). No obstant això, contràriament a altres estudis (Vendrell-Puigmitja et al., 2021, 2022), el tractament només salí no sembla presentar diferències amb el control. La interacció sal-nutrients sembla provocar una major reducció de l'absorció de fòsfor, però en el cas de l'eficiència fotosintètica, la interacció sembla causar un efecte compensatori per part dels nutrients (Kamer & Fong, 2001), ja que la condició només salina resulta ser la més perjudicial (Velasco et al., 2018), reduint-se el seu efecte amb l'augment dels nutrients.

Sobre els efectes de la salinitat en el funcionament del biofilm, se sap que els estressors químics poden afectar la capacitat d'absorció de fòsfor del biofilm, donant-se una reducció (Proia et al., 2017). Aquest fet concorda amb els resultats exposats, excepte pel cas només salí, que no sembla diferenciar-se del control. Quant a l'activitat fotosintètica, es coneix que l'alta concentració d'ions juga un paper clau en la regulació de les reaccions fotoquímiques primàries (Berry & Dowton, 1982). Quan la salinitat augmenta, la fotosíntesi de les algues epilítiques també canvia a causa dels efectes iònics i osmòtics, que afecten tant les reaccions fotosintètiques com a la fisiologia cel·lular general (Martínez et al., 2020). Per tant, l'augment de la salinitat podria provocar canvis en l'eficiència fotosintètica. Per altra banda, se sap que la toxicitat d'un químic per a un organisme aquàtic està influenciada pel seu subministrament d'aliments. Com més gran sigui l'exposició d'un organisme a un tòxic, més energia i, per tant, més aliment necessitarà aquest organisme per a contrarestar el mal del tòxic (Heugens et al., 2001; Kamer & Fong, 2001). Com es dona en el nostre cas, sembla que l'aportació de nutrients desenvoluparia aquesta funció, permetent compensar el dany causat per la sal.

Pel que fa a la segona hipòtesis, també es confirma que les diferents condicions del medi provoquen un canvi en la composició del biofilm sense observar-se cap canvi en la biomassa ni tampoc en la fracció orgànica d'aquest. Anteriorment a aquest estudi, s'havia vist que en concentracions de sal inferiors als 30 g/L, la biomassa total no disminuïa, i si ho feia es recuperava per efecte de la substitució de grups en la composició del biofilm (Vendrell-Puigmitja et al., 2022), fet que hem pogut veure en aquest experiment on la màxima exposició de sal era de 3 g/L. De fet, es considera que el llindar de salinitat que provocaria un gran estrès oxidatiu, produint danys cel·lulars, es trobaria en les concentracions entre 15 i 30 g/L (Vendrell- Puigmitja et al., 2022).

El recanvi dels grups de la comunitat del biofilm respon força bé d'acord amb estudis previs, on les diatomees semblen establir-se millor en les condicions de major salinitat (Cañedo-Argüelles et al., 2014; Vendrell-Puigmitja et al., 2022). També es confirma que en condicions tan sols enriquides amb nutrients, a partir de certa concentració, són les algues verdes les dominants de la comunitat (Greco et al., 2021).

Una limitació d'aquest treball és que només tenim grans grups d'algues, però que segurament si ho miréssim a nivell d'espècie trobaríem espècies diferents en cada tractament i això podria explicar les diferències que trobem en els paràmetres funcionals (Cañedo-Argüelles et al., 2014).

Pel que fa a la comunitat de macroinvertebrats, els resultats es contradiuen amb el que esperàvem amb la tercera hipòtesis, ja que la interacció de la sal i els nutrients ha resultat menys perjudicial que el tractament només salí. Si bé l'efecte en el tractament salí s'ajusta a altres estudis amb la reducció de la riquesa taxonòmica i la diversitat (Cañedo-Argüelles et al., 2012; Kefford et al., 2011; Pinder et al., 2005), en el cas de la interacció amb nutrients, el que s'observa és un efecte compensatori dels nutrients vers la sal en la comunitat de macroinvertebrats. Això es podria explicar perquè al compensar els nutrients l'efecte de la sal en les comunitats vegetals (Heugens et al., 2001), com s'intueix en els resultats d'eficiència fotosintètica, aquestes podrien mantenir certes condicions de refugi i alimentació per a la fauna aquàtica que els permet sobreviure (Cacabelos et al., 2020), i alimentar-se d'algues. Tanmateix, cal remarcar que els valors dels índexs de diversitat són força baixos, denotant que l'estat de la comunitat no resulta adequat, trobant una versió simplificada de la del riu, segurament perquè hi ha espècies que no s'adapten a les condicions experimentals.

Els resultats de taxons indicadors per les condicions de salinitat i enriquiment de nutrients, tot i no trobar grups significativament indicadors en la majoria de tractaments, sí que ens mostra que en el cas de salinitat els quironòmids són clars dominadors. En els medis amb contaminants solen ser els organismes més generalistes els que acaben sobrevivint i dominant la comunitat (Arribas et al., 2019), sent els quironòmids un dels màxims exponents d'aquesta característica. Per tant, no és d'estranyar que una situació d'estrès d'aquest tipus, un grup taxonòmic com aquesta larva sigui la que més sobreviu i ocupa el medi, atenent que sol ser un tàxon dominant amb espècies tolerants a la contaminació i la salinitat (Armitage et al., 2012) i això els permet mantenir la seva biomassa a l'ecosistema, o fins i tot augmentar-la (Menzie, 1981; Marques et al., 1999).

En la mateixa línia que les limitacions en el biofilm, l'anàlisi dels macroinvertebrats ha arribat a nivell de família. Si s'hagués arribat a gènere o espècies, probablement s'haurien trobat més diferències.

## 5. CONCLUSIONS

En relació amb els resultats discutits anteriorment, arribem a les següents conclusions:

1. La funcionalitat de la comunitat del biofilm es veu afectada significativament per la salinització reduint-se la seva capacitat d'absorció de fòsfor i la seva eficiència fotosintètica. No obstant, la interacció amb els nutrients genera un efecte compensatori en la comunitat pel que respecta a la seva capacitat fotosintètica.
2. No s'han trobat evidències que permetin determinar un canvi en la biomassa total de la comunitat del biofilm. Tot i això, sí que s'ha observat canvis en la composició pel que respecta als tres grans grups analitzats del biofilm. La salinització afavoreix el domini de les diatomees, efecte que es veu potenciat per la interacció amb l'enriquiment del medi amb nutrients.
3. Pel que fa a la diversitat de la comunitat de macroinvertebrats, es confirma un efecte advers en tots els tractaments respecte al control, sent la condició només salina la més perjudicial. Contràriament a la nostra hipòtesi, la interacció dels nutrients amb aquest altre estressor genera un efecte compensatori, probablement degut al manteniment dels seus recursos primaris.
4. Només s'ha pogut identificar el taxó de la família dels quironòmids com indicador de la situació d'estrès salí en els medis aquàtics d'aigua dolça. No obstant, els quironòmids han estat dominants en tots els tractaments, sense mostrar canvis en la dominància de la comunitat, augmentant la seva densitat sobretot en el tractament salí, fet que reafirma que resulti indicador.

Finalment, atès que la salinització i els efectes combinats amb altres factors d'estrès és una línia de recerca força recent, cal remarcar la necessitat d'ampliar la recerca emmarcada en aquest context per a dilucidar les respostes d'aquests ecosistemes front aquest tipus d'interacció, així com la interacció amb altres estressors dels sistemes aquàtics.

## **AGRAÏMENTS**

Aquest treball no hauria estat possible sense el suport de diverses persones i institucions a les quals es vol mostrar el seu agraïment.

En primer lloc, al doctor Miguel Cañedo Argüelles per la seva labor com a tutor durant la qual ha demostrat no sols un gran coneixement i ajuda, sinó també una comprensió i empatia sense les quals el treball no hagués estat possible.

En segon lloc, agraeixo a Alvaro Moyano S. tota la seva ajuda i temps dedicat a la realització de la pràctica i la redacció d'aquest treball.

Agraeixo també al grup de recerca Applied Ecology and Global Change, BETA Technological Center de la Universitat de Vic pel seu suport logístic facilitant l'espai de treball experimental, així com moltes de les eines que han possibilitat l'elaboració d'aquest treball.

Finalment, agrair al grup de recerca Freshwater Ecology and Hydrology Management i al departament de Biologia Evolutiva, Ecologia i Ciències Ambientals l'oportunitat de col·laborar i fer ús de les seves instal·lacions per desenvolupar aquest estudi.

## BIBLIOGRAFIA

- Armitage, P. D., Pinder, L. C., & Cranston, P. S. (Eds.). (2012). *The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges*. Springer Science & Business Media.
- Arribas P., Gutiérrez-Cánovas C., Botella-Cruz M., Cañedo-Argüelles M., Antonio Carbonell J., Millán A., Pallarés S., Velasco J. & Sánchez-Fernández D. (2019). Insect communities in saline waters consist of realized but not fundamental niche specialists. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, 374, 20180008 <http://doi.org/10.1098/rstb.2018.0008>
- Bätke, J. & Coring, E. (2011). Biological effects of anthropogenic salt-load on the aquatic Fauna: A synthesis of 17 years of biological survey on the rivers Werra and Weser. *Limnologica*, 41(2), 125-133. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2010.07.005>
- Berger, E., Frör, O., & Schäfer, R. B. (2018). Salinity impacts on river ecosystem processes: a critical mini-review. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374 (1764), 20180010. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0010>
- Berry, J. A.; Downton, W. J. S. (1982). Environmental regulation of photosynthesis. In: Govindjee; editor, editor/s. Photosynthesis. Vol. 2. Development, carbon metabolism, and plant productivity. *New York: Academic Press*. 263-343. <http://hdl.handle.net/102.100.100/287736?index=1>
- Besemer, K. (2015). Biodiversity, community structure and function of biofilms in stream ecosystems. *Research in Microbiology*, 166(10), 774–781. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.05.006>
- Böhme, D. (2011). Evaluation of brine discharge to rivers and streams: Methodology of rapid impact assessment. *Limnologica*, 41(2), 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2010.08.003>
- Brown, A. H., & Yan, N. D. (2015). Food Quantity Affects the Sensitivity of Daphnia to Road Salt. *Environmental Science & Technology*, 49(7), 4673–4680. <https://doi.org/10.1021/es5061534>
- Cacabelos, E., Ramalhosa, P., Canning-Clode, J., Troncoso, J. S., Olabarria, C., Delgado, C., Dobretsov, S. & Gestoso, I. (2020). The Role of Biofilms Developed under Different Anthropogenic Pressure on Recruitment of Macro-Invertebrates. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 2030. <https://doi.org/10.3390/ijms21062030>
- Cañedo-Argüelles, M., Grantham, T. E., Perrée, I., Rieradevall, M., Céspedes-Sánchez, R., & Prat, N. (2012). Response of stream invertebrates to short-term salinization: A mesocosm approach. *Environmental Pollution*, 166, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.03.027>

- Cañedo-Argüelles, M., Kefford, B. J., Piscart, C., Prat, N., Schäfer, R. B., & Schulz, C. J. (2013). Salinisation of rivers: An urgent ecological issue. *Environmental Pollution*, 173, 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.10.011>
- Cañedo-Argüelles, M., Bundschuh, M., Gutiérrez-Cánovas, C., Kefford, B. J., Prat, N., Trobajo, R. & Schäfer, R. B. (2014). Effects of repeated salt pulses on ecosystem structure and functions in a stream mesocosm. *Science of The Total Environment*, 476–477, 634-642. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.067>
- Cañedo-Argüelles, M. (2020). A review of recent advances and future challenges in freshwater salinization. *Limnetica*, 39(1), 185–211. <https://doi.org/10.23818/limn.39.13>
- Cochero, J., Licursi, M., & Gómez, N. (2017). Effects of pulse and press additions of salt on biofilms of nutrient-rich streams. *Science of The Total Environment*, 579, 1496–1503. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.152>
- De Castro-Català, N., Muñoz, I., Armendáriz, L., Campos, B., Barceló, D., López-Doval, J., Pérez, S., Petrovic, M., Picó, Y., & Riera, J. (2015). Invertebrate community responses to emerging water pollutants in Iberian river basins. *Science of The Total Environment*, 503-504, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.110>
- Dufrêne, M., & Legendre, P. (1997). Species assemblages and indicator species: The need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological Monographs*, 67(3), 345–366. <https://doi.org/10.2307/2963459>
- Estévez, E., Rodríguez-Castillo, T., González-Ferreras, A. M., Cañedo-Argüelles, M. & Barquín, J. (2018). Drivers of spatio-temporal patterns of salinity in Spanish rivers: a nationwide assessment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1764), 20180022. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0022>
- Greco, D. A., Arnott, S. E., Fournier, I. B., & Schamp, B. S. (2021). Effects of chloride and nutrients on freshwater plankton communities. *Limnology and Oceanography Letters*. <https://doi.org/10.1002/lol2.10202>
- Hart, B. T., Bailey, P., Edwards, R., Hortle, K., James, K., McMahon, A., Meredith, C., & Swadling, K. (1991). A review of the salt sensitivity of the Australian freshwater biota. *Hydrobiologia*, 210(1–2), 105–144. <https://doi.org/10.1007/bf00014327>
- Heugens, E. H. W., Hendriks, A. J., Dekker, T., Straalen, N. M. V. & Admiraal, W. (2001). A Review of the Effects of Multiple Stressors on Aquatic Organisms and Analysis of Uncertainty Factors for Use in Risk Assessment. *Critical Reviews in Toxicology*, 31(3), 247-284. <https://doi.org/10.1080/20014091111695>
- Hintz, W. D. & Relyea, R. A. (2019). A review of the species, community, and ecosystem impacts of road salt salinisation in fresh waters. *Freshwater Biology*, 64(6), 1081-1097. <https://doi.org/10.1111/fwb.13286>

- Igbinsosa, E. O., & Okoh, A. I. (2009). Impact of discharge wastewater effluents on the physico-chemical qualities of a receiving watershed in a typical rural community. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 6(2), 175–182. <https://doi.org/10.1007/bf03327619>
- Kamer, K. & Fong, P. (2001). Nitrogen enrichment ameliorates the negative effects of reduced salinity on the green macroalga *Enteromorpha intestinalis*. *Marine Ecology Progress Series*, 218, 87-93. <https://doi.org/10.3354/meps218087>
- Kaushal, S. S., Groffman, P. M., Likens, G. E., Belt, K. T., Stack, W. P., Kelly, V. R., Band, L. E., & Fisher, G. T. (2005). Increased salinization of fresh water in the northeastern United States. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(38), 13517–13520. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506414102>
- Kefford, B.J. (1998). The relationship between electrical conductivity and selected macroinvertebrate communities in four river Systems of south-west Victori, Australia. *International Journal of Salt Lake Research* 7, 153-170, <https://doi.org/10.1007/BF02441884>
- Kefford, B., Marchant, R., Schäfer, R., Metzeling, L., Dunlop, J., Choy, S., & Goonan, P. (2011). The definition of species richness used by species sensitivity distributions approximates observed effects of salinity on stream macroinvertebrates. *Environmental Pollution*, 159, 302-310. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.08.025>
- Kefford, B. J., Buchwalter, D., Cañedo-Argüelles, M., Davis, J., Duncan, R. P., Hoffmann, A., & Thompson, R. (2016). Salinized rivers: degraded systems or new habitats for salt - tolerant faunas? *Biology Letters*, 12(3), 20151072. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2015.1072>
- Lawrence, J., Scharf, B., Packroff, G. & Neu, T. (2002). Microscale Evaluation of the Effects of Grazing by Invertebrates with Contrasting Feeding Modes on River Biofilm Architecture and Composition. *Microbial Ecology*, 44(3), 199-207. <https://doi.org/10.1007/s00248-001-1064-y>
- Le, T. D. H., Kattwinkel, M., Schützenmeister, K., Olson, J. R., Hawkins, C. P. & Schäfer, R. B. (2019). Predicting current and future background ion concentrations in German surface water under climate change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1764), 20180004. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0004>
- Lind, L., Schuler, M. S., Hintz, W. D., Stoler, A. B., Jones, D. K., Mattes, B. M., & Relyea, R. A. (2018). Salty fertile lakes: how salinization and eutrophication alter the structure of freshwater communities. *Ecosphere*, 9(9), e02383. <https://doi.org/10.1002/ecs2.2383>



- Marques, M. M. G. S. M., Barbosa, F. A. R. & Callisto, M. (1999). Distribution and abundance of Chironomidae (Diptera, Insecta) in an impacted watershed in South-east Brazil. *Revista Brasileira de Biologia*, 59(4), 553-561. <https://doi.org/10.1590/s0034-71081999000400004>
- Martí, E., Aumatell, J., Godé, L., Poch, M., & Sabater, F. (2004). Nutrient Retention Efficiency in Streams Receiving Inputs from Wastewater Treatment Plants. *Journal of Environmental Quality*, 33(1), 285–293. <https://doi.org/10.2134/jeq2004.2850>
- Martínez, A., Gonçalves, A. L. & Canhoto, C. (2020). Salinization effects on stream biofilm functioning. *Hydrobiologia*, 847(6), 1453-1459. <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04199-w>
- Menzie, C. A. (1981). Production ecology of *Cricotopus sylvestris* (Fabricius) (Diptera: Chironomidae) in a shallow estuarine cove. *Limnology and Oceanography*, 26(3), 467-481. <https://doi.org/10.4319/lo.1981.26.3.0467>
- Morrison, G., Fatoki, O., Persson, L., & Ekberg, A. (2001). Assessment of the impact of point source pollution from the Keiskammahoek Sewage Treatment Plant on the Keiskamma River - pH, electrical conductivity, oxygen- demanding substance (COD) and nutrients. *Water SA*, 27(4). <https://doi.org/10.4314/wsa.v27i4.4960>
- Olson, J. R. (2018). Predicting combined effects of land use and climate change on river and stream salinity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1764), 20180005. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0005>
- Pereda, O., Acuña, V., von Schiller, D., Sabater, S., & Elosegi, A. (2019). Immediate and legacy effects of urban pollution on river ecosystem functioning: A mesocosm experiment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169, 960–970. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.103>
- Pinder, A. M., Halse, S. A., McRae, J. M., & Shiel, R. J. (2005). Occurrence of aquatic invertebrates of the wheatbelt region of Western Australia in relation to salinity. *Hydrobiologia*, 543(1), 1–24. <https://doi.org/10.1007/s10750-004-5712-3>
- Proia, L., Romani, A. & Sabater, S. (2017). Biofilm phosphorus uptake capacity as a tool for the assessment of pollutant effects in river ecosystems. *Ecotoxicology* 26, 271–282. <https://doi-org.sire.ub.edu/10.1007/s10646-017-1761-z>
- Remane, A. and Schlieper, C.(1971). Biology of Brackish Water. *Wiley Interscience*, New York
- Sabater, S., Guasch, H., Ricart, M., Romani, A., Vidal, G., Klünder, C., & Schmitt-Jansen, M. (2007). Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4), 1425–1434. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-1051-8>

- Tachet, H., Richoux, P., Bournaud, M. & Usseglio-Polatera, P. (2010). *Les Invertébrés d'eau douce : systématique, biologie, écologie*. CNRS EDITIONS.
- Velasco, J., Gutiérrez-Cánovas, C., Botella-Cruz, M., Sánchez-Fernández, D., Arribas, P., Carbonell, J. A., Millán, A., & Pallarés, S. (2018). Effects of salinity changes on aquatic organisms in a multiple stressor context. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1764), 20180011. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0011>
- Vendrell-Puigmitja, L., Llenas, L., Proia, L., Ponsa, S., Espinosa, C., Morin, S., & Abril, M. (2021). Effects of an hypersaline effluent from an abandoned potash mine on freshwater biofilm and diatom communities. *Aquatic Toxicology*, 230, 105707. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105707>
- Vendrell-Puigmitja, L., Proia, L., Espinosa, C., Barral-Fraga, L., Cañedo-Argüelles, M., Osorio, V., Casas, C., Llenas, L., & Abril, M. (2022). Hypersaline mining effluents affect the structure and function of stream biofilm. *Science of The Total Environment*, 843, 156966. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156966>
- Walsh, C. J., Roy, A. H., Feminella, J. W., Cottingham, P. D., Groffman, P. M. & Morgan, R. P. (2005). The urban stream syndrome: current knowledge and the search for a cure. *Journal of the North American Benthological Society*, 24(3), 706-723. <https://doi.org/10.1899/04-028.1>
- Williams, W.D., Sherwood, J.E. (1994). Definition and measurement of salinity in salt lakes. *International Journal of Salt Lake Research* 3, 53–63 <https://doi-org.sire.ub.edu/10.1007/BF01990642>
- Williams, W. D. (1999). Salinisation: A major threat to water resources in the arid and semi-arid regions of the world. *Lakes & Reservoirs: Science, Policy and Management for Sustainable Use*, 4(3–4), 85–91. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1770.1999.00089.x>
- Williams, W. D. (2001). Anthropogenic salinisation of inland waters. *Saline Lakes*, 329-337. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2934-5\\_30](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2934-5_30)
- Wolf, B., Kiel, E., Hagge, A., Krieg, H. J., & Feld, C. K. (2009). Using the salinity preferences of benthic macroinvertebrates to classify running waters in brackish marshes in Germany. *Ecological Indicators*, 9(5), 837–847. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2008.10.005>