

Efectes subletals de la salinització en *Hydropsyche exocellata*

Miquel Sala Prat

Tutors: Miguel Cañedo-Argüelles i Narcís Prat

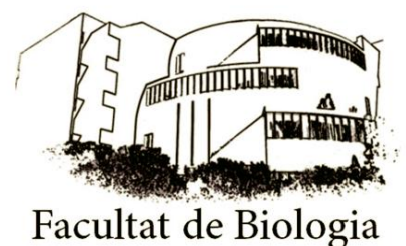
Freshwater Ecology and Management Research Group

Grup de recerca BETA

Departament d'Ecologia de la UB

14 de Setembre de 2015

Màster d'Ecologia, Gestió i Restauració del Medi Natural



DADES DEL TREBALL

Títol del treball: Efectes subletals de la salinització en *Hydropsyche exocellata*

Alumne: Miquel Sala Prat

Tutors: Miguel Cañedo-Argüelles i Narcís Prat

Grups de recerca: Freshwater Ecology and Management Research Group (FEM)
Biodiversitat, Ecologia, Tecnologia i Gestió Ambiental (BETA)

Departament: Departament d'Ecologia de la Universitat de Barcelona

Data d'entrega: 14 de Setembre de 2015

Màster: Ecologia, Gestió i Restauració del Medi Natural

Resum

La salinització dels rius és un problema global que va a l'alça. La legislació vigent se centra en la conductivitat i la salinitat, sense tenir en compte la concentració dels ions que la provoquen. L'objectiu d'aquest estudi és avaluar la toxicitat del Cl^- i el SO_4^{2-} utilitzant *Hydropsyche exocellata* com a organisme model. Hem quantificat la proporció Cl/SO_4 de diferents efluents salins i els hem reproduït al laboratori a una conductivitat de 2500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ per estudiar els efectes d'un increment de cada ió en *H. exocellata*. També hem volgut comprovar si existeix una possible adaptació poblacional causada per la exposició a llarg termini d'una alta salinitat, per això hem utilitzat individus de dues poblacions exposades a diferents conductivitats. Els experiments s'han dut a terme en un microcosmos dissenyat per imitar l'hàbitat del riu i permetre'ns una fàcil manipulació dels *H. exocellata*. Hem analitzat dos indicadors de resposta a l'estrès: la freqüència dels contraccions abdominals i la regularitat de les xarxes que teixeixen per capturar l'aliment. La regularitat de les xarxes s'ha avaluat fent fotografies d'alta resolució i analitzant-les mitjançant tècniques de processat d'imatge. Per acabar, hem estudiat l'estat fisiològic dels *H. exocellata* analitzant set biomarcadors. Els nostres resultats ens mostren que els individus d'una població de baixa salinitat es trobaven significativament més estressats, fet que ens indica que existeix una adaptació poblacional a la salinitat. Pel que fa a la composició iònica, els nostres resultats suggereixen que el Cl^- és més tòxic que el SO_4^{2-} i que la proporció Cl/SO_4 pot ser més important que la conductivitat total pel que fa a la resposta dels organismes aquàtics a la salinització. Creiem que la normativa hauria de tenir en compte la composició iònica dels efluents i hi hauria d'haver un límit específic per a cada ió per tal de protegir la biodiversitat aquàtica.

Abstract

River salinisation is a global and growing environmental problem. Current legislation focuses on conductivity or salinity, disregarding of the concentration of each ion contributing to total salinity. This study aims at evaluating the different toxicity of Cl^- and SO_4^{2-} using the aquatic invertebrate *Hydropsyche exocellata* as a test organism. We characterised Cl/SO_4 ratio from three wastewater effluents and reconstituted them at a conductivity of 2500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ to study the sub-lethal effects of increased of Cl^- and SO_4^{2-} concentrations on *H. exocellata*. We also wanted to check a possible population adaptation due to long-term exposition to high conductivities, so we used individuals from two populations exposed to different conductivities. The experiments were performed in microcosms, designed to mimic the river habitat and, at the same time, allowing for an easy manipulation of *H. exocellata*. We analysed two different endpoints related to the stress response of *H. exocellata*: the frequency of their abdominal contractions and the regularity of the nets they build to capture food. The net regularity was assessed by taking high-resolution pictures of the nets and then analysing them using image-processing techniques. Finally we studied the physiological state of *H. exocellata* by analysing seven biomarkers. Ours results showed that individuals from a low salinity population had significantly higher levels of stress, which indicates that there is a population adaptation to salinity. Regarding the ionic composition our results suggest that Cl^- is more toxic than SO_4^{2-} and that the Cl/SO_4 ratio might be more important than the total conductivity in determining the response of aquatic organisms to salinisation. We think that the legislation should take into account the ionic composition of wastewaters and there should be a specific limit for each ion in order to protect freshwater biodiversity.

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS	2
METODOLOGIA	6
RESULTATS	15
DISCUSSIÓ	19
CONCLUSIONS	23
AGRAÏMENTS.	24
BIBLIOGRAFIA	25

INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

La salinització, l'augment de la concentració de ions dissolts en l'aigua, és un dels majors problemes als que s'enfronten els rius avui en dia per a poder arribar a un estat ecològic sa (Cañedo-Argüelles et al., 2012). Diferenciem dos tipus de salinització: la primària i la secundària. La primària és aquella que existeix per causes naturals, normalment relacionades amb la geologia i la naturalesa del sòl. La salinització secundària, molt més freqüent, és aquella provocada per activitats humanes com l'agricultura, la desforestació, la mineria i molts tipus d'indústria (paperera, tèxtil, càrnia...), que provoquen un augment de la concentració de ions en l'aigua. Hi ha altres fenòmens que magnifiquen el problema, com la reducció del cabal dels rius provocada pel consum d'aigua, la reducció de les precipitacions derivada del canvi climàtic i el clima àrid i poc plujós del nostre país (Sereda et al., 2011).

Les activitats antropogèniques que provoquen salinització generen efluent de diferents composicions iòniques. Una de les principals causes de salinització dels rius són les empreses mineres (Richter et al., 2010), per exemple les mines de Cardona i Súria que contaminen el riu Llobregat (Fernández-Turiel et al., 2003). Els ions clorur (Cl^-) i sulfat (SO_4^{2-}) són els que més abunden en els vessaments de la mineria, SO_4 domina en les extraccions de carbó però Cl domina en la mineria de potassa (Cormier et al., 2013b). L'agricultura és una altra activitat que també col·labora en la salinització dels rius, ja que per una banda comporta un augment de sals derivades de l'ús de fertilitzants, i d'altra banda és una de les activitats que més aigua consumeix. Un exemple d'ecosistema molt afectat per la salinització provocada per l'agricultura és el mar d'Aral, que ha augmentat la salinitat provocant l'extinció de la major part dels organismes aquàtics i danys socioeconòmics importants (Aladin et al., 2009). La indústria paperera també ha estat assenyalada com a responsable de l'augment de la salinitat del sòl i, en conseqüència, de les aigües que es percolen per aquest sòl (Maheshwari et al., 2012). Altres activitats com el canvi d'ús del sòl (Jolly et al., 2001), l'extracció de petroli (Moquet et al., 2014) i la sobreexplotació d'aqüífers (Custodio, 2002) també són causes de la salinització secundària.

S'ha comprovat que la salinització pot provocar reduccions important de la biodiversitat aquàtica (Pinder et al., 2005), que poden desembocar a canvis en el funcionament de l'ecosistema, com per exemple una disminució de la descomposició de fullaraca causada per la desaparició d'efemeròpters, plecòpters i tricòpters (Cañedo-Argüelles et al., 2015; Schäfer et al., 2012), que són molt sensibles a la salinitat (Cormier, 2013). Tot i el seu efecte nociu sobre els organismes aquàtics, la salinització dels rius es

troba poc regulada mundialment. Per exemple, en els països membres de la Unió Europea tan sols existeixen recomanacions sobre els límits de conductivitat en les aigües superficials que es basen més en la palatabilitat per al consum humà i el dany per corrosió per a les infraestructures que en la protecció de la biodiversitat aquàtica. La normativa catalana considera que 6000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ és el límit permès per als vessaments industrials (Catalunya, 2003), però s'ha vist que en macroinvertebrats no halofílics a valors més baixos ja hi ha una disminució de la biodiversitat i que es pot arribar a produir l'extinció d'algunes espècies (Pinder et al., 2005).

No existeixen gaires estudis sobre els efectes de diferents tipus de salinitat, ja que normalment s'estudia l'efecte clorur sòdic o simplement la conductivitat total. És per això que en aquest estudi hem volgut analitzar no la conductivitat total sinó l'efecte dels diferents ions causants d'aquesta conductivitat, jugant amb diferents proporcions relatives. Existeix algun estudi centrat en aquest aspecte que afirma que és important diferenciar entre diferents tipus de conductivitat (Kunz et al., 2013).

S'han dut a terme nombrosos experiments de toxicitat del NaCl al laboratori en els que s'ha pogut determinar les dosis letals de sal per a diferents espècies de macroinvertebrats aquàtics (Berezina, 2003; Kefford et al., 2007). Tot i així, són pocs els estudis que s'han centrat en els efectes subletals de la salinització (Hassell et al., 2006; Zalizniak et al., 2009). Sota condicions d'alta salinitat, els organismes han de destinar molta energia a l'osmoregulació i això pot tenir conseqüències en la seva supervivència. Els efectes subletals recullen aquests canvis que no provoquen directament la mort de l'individu però que en condicionen el seu funcionament i, en conseqüència, la viabilitat de la població. La varietat d'efectes subletals estudiats és molt àmplia i recull molts processos fisiològics de l'individu (Cañedo-Argüelles et al., 2013). En aquest estudi ens centrarem en alguns d'aquests efectes subletals per explicar la toxicitat dels ions

Hem escollit *Hydropsyche exocellata* com a organisme model ja que reflecteix molt bé l'estat ecològic (Solà & Prat, 2006). *Hydropsyche exocellata* és un tricòpter molt abundant als rius catalans i tolerant a la contaminació (Bonada et al., 2003), fet que ens permet aplicar-los uns tractaments de salinitat sense temor que siguin massa agressius. A més a més, són organismes relativament grans i amb una resistència física que ens permetrà poder-los manipular tant en la recol·lecció al riu com en la manipulació al laboratori. Són fàcilment identificables a simple vista, ja que tenen una pigmentació molt característica al cap (Tachet et al., 2000). Si a tot això afegim que és

una espècie que ha estat estudiada en nombrosos estudis de contaminació fluvial, el converteix en un organisme ideal per al nostre estudi.

Per tenir una referència real hem analitzat la composició química de diferents efluentes que originen algunes indústries típiques del nostre país: la indústria càrnia, la indústria paperera i la indústria minera. Amb els resultats de la proporció Cl/SO_4 obtinguts es reproduiran al laboratori unes solucions amb els mateixos valors, així analitzarem els efectes d'aquests dos ions exclusivament. Aplicarem tractaments amb aquestes solucions sobre els *H. exocellata* per analitzar-ne alguns efectes subletals. La nostra primera hipòtesi és que una proporció més alta de clorurs provocarà uns nivells d'estrès més elevats.

Hydropsyche exocellata teixeix unes xarxes que utilitza per captar l'aliment i construir-se un refugi. La regularitat i simetria d'aquestes xarxes ha estat estudiada (Millet) i ens va semblar una eina d'estudi molt interessant. Per això hem dissenyat uns microcosmos on els individus podran teixir les xarxes i les podrem fotografiar per analitzar-les informàticament. Una major irregularitat en les xarxes reflectirà un major estat d'estrès en els individus. Aquesta anàlisi ens permetrà obtenir un indicador del nivell d'estrès de l'individu des d'un punt de vista comportamental.

Aquesta espècie ha estat objecte de molts estudis de contaminació fluvial (Bonada et al., 2005; Barata et al., 2003) i això ens facilitarà una base de coneixements i experiència que ens permetrà un estudi més exhaustiu. Utilitzarem l'anàlisi de biomarcadors, que porta ja un important bagatge en l'estudi d'aquests tipus d'individus (Barata et al., 2005). Els biomarcadors són una mesura dels nivells d'estrès com a resposta a qualsevol pressió que produeix efectes a nivell fisiològic en l'individu. Analitzarem diferents enzims i productes dels *Hydropsyche* per quantificar el nivell d'estrès des d'un punt de vista fisiològic.

Per completar aquesta tríada de variables estudiades, s'ha volgut provar un sistema d'anàlisi de l'estrès que, al nostre coneixement, no té precedents. Els tricòpters, com alguns altres invertebrats de riu, tenen un sistema de respiració per brànquies. Quan la corrent d'aigua és suficientment ràpida aquestes es troben ben ventilades, però quan aquest no és el cas les ventilen activament mitjançant contraccions laterals de l'abdomen (Philipson, 1978). És un moviment molt característic i que es pot veure a simple vista, molt típic quan es manipula l'insecte i se l'introdueix en un recipient amb aigua on no hi ha corrent. Així doncs, hem volgut aprofitar la simplicitat de l'anàlisi d'aquesta variable i buscar una relació entre un major estat d'estrès amb una menor

activitat en les contraccions. S'ha decidit utilitzar la freqüència d'aquestes contraccions com a estudi de l'estrès des d'un punt de vista d'estat físic.

Per acabar, hem analitzat un altre aspecte de la salinització que ha estat poc estudiat: la capacitat de les poblacions d'adaptar-se a alts nivells de salinitat. Per això es recol·lectaran individus de dues localitats amb conductivitats diferents. La segona hipòtesi és que els individus de la població que ha estat sotmesa a uns valors de conductivitat més elevats toleraran millor els tractaments de salinitat i es reflectirà en uns nivells d'estrès més baixos.

Resumint, volem testar l'efecte tòxic de diferents proporcions dels ions clorur i sulfat analitzant els efectes subletals de dues poblacions d'*Hydropsyche exocellata*. Les nostres hipòtesis són que el clorur té un efecte més tòxic que el sulfat i que la toxicitat dels ions es veurà pal·liada en les poblacions que han estat exposades a salinitats més elevades.

METODOLOGIA

Obtenció dels organismes per als experiments al laboratori

L'obtenció dels individus d'*Hydropsyche exocellata* per als experiments s'ha fet en dos punts de diferents característiques pel que fa a la salinitat. Un primer punt el trobem a El Pont de Vilomara (L102), amb una salinitat mitjana 1316 $\mu\text{S/cm}$ (Prat et al, 2012). El segon punt es troba al municipi de La Garriga (B10), amb una salinitat mitjana de 437 $\mu\text{S/cm}$. Els dos punts formen part de la xarxa Ecostrimed, que recull dades biològiques i fisicoquímiques des de fa més de 20 anys (Prat et al., 2000). La diferència de conductivitat entre ambdós punts és significativa (Figura 1). L'extracció es va dur a terme aixecant còdols del riu i agafant els individus cuidadosament amb unes pinces i dipositant-los dins una nevera portàtil amb aigua freda (a temperatura similar a la del riu).

Per evitar estrès als insectes i així reduir possible error per culpa d'aquest factor, l'experiment es va començar immediatament després de la recol·lecció dels *H. exocellata*. Es van recollir, de cadascuna de les dues localitzacions, un total de 80 individus de l'últim estadi larvari, evitant individus petits per tal de reduir la variabilitat deguda a la major mortalitat que tenen els individus en estadis inferiors en front a l'estrès.

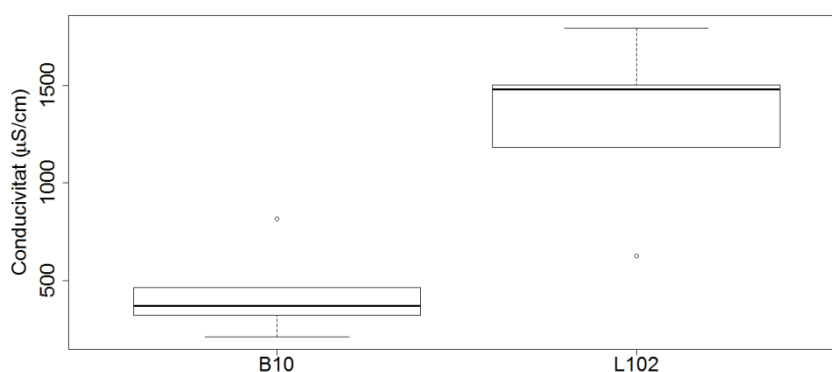


Figura 1. Conductivitats en $\mu\text{S/cm}$ dels dos punts d'extracció d'*Hydropsyche* (B10 correspon a La Garriga i L102 al Pont de Vilomara). Els valors usats un total de 10 mesures realitzades entre el 2007 i el 2011. La diferència és significativa (**$p=0.00434$**).

El disseny del microcosmos

El disseny final del microcosmos on es va dur a terme l'experiment va comportar múltiples modificacions des del primer disseny que s'havia fet basant-se en uns dissenys que s'havien fet servir anteriorment per a un experiment similar (Millet). L'objectiu del muntatge era aconseguir un sistema on es trobés en equilibri la comoditat dels insectes amb la possibilitat, per part nostra, d'observar les xarxes i poder-los manipular fàcilment. El procés va passar per diferents fases, que es poden trobar a l'Annex.

Dels dissenys provats el que millors resultats va oferir va ser el de la superfície llisa cara amunt amb escuradents disposats en quadrícula i separats 1 cm entre ells. Es va optar per la disposició quadriculada de mitjos escuradents i no sencers, ja que així hi ha més espai per a la fotografia de les xarxes. Una innovació al sistema anterior va ser unir tots els escuradents amb un fil de cosir negre, ja que ofereix un nou punt de suport als *Hydropsyche* per a poder teixir la xarxa i, en ser de color negre, no interferirà en la fotografia. D'aquesta manera, trobarem un quadrat complet de 1 cm de costat entre cada escuradents.

El material necessari per cada muntatge és:

- Safata de PVC de 34 cm d'amplada i 50 cm de llargada.
- Planxa de poliestirè extruït llis de 2 cm de gruix.
- 560 escuradents rodons partits per la meitat.
- Fil de cosir negre.
- Pintura amb base de silicona.
- Arena fina neta (sense pols).
- Malla de 1,2 mm de porus.
- Cinta americana.
- Bomba d'aigua submergible.
- Tubs de polietilè i de silicona que s'adaptin al sortidor de la bomba.
- Colzes de 90° i taps que s'adaptin al tub de polietilè.
- Brides petites de plàstic.
- Eines varies: cúter, tenalles, alicates, pinzell, tisores...

Primer de tot ens cal retallar la planxa de poliestirè perquè mesuri 33 cm d'amplada i 35 de llargada. Per a un millor resultat, es pot retallar els laterals de la planxa perquè s'adaptin a la inclinació dels laterals de la safata. El segon pas és retallar un tros de malla de 1,2 mm de porus perquè limiti el pas dels insectes i els obligui a estar sobre la planxa de poliestirè, necessitarem un tros de 34 cm d'amplada i aproximadament 10 cm d'alçada. Amb cinta americana, que és resistent a l'aigua, ho enganxarem tot tal com podem veure a la Figura 2, procurant que la cinta americana segelli completament la planxa de poliestirè i eviti el pas de l'aigua cap a la part de sota.

El següent pas és el recobriment amb arena, com ja hem fet en els muntatges anteriors. Es tracta d'escampar una fina capa de pintura de silicona i cobrir-ho amb abundant arena, que retirarem per inclinació al cap de pocs minuts. L'arena queda enganxada i forma un substrat ideal per als *H. exocellata*, ja que té rugositat per a poder-se desplaçar, a la vegada que és una capa molt fina que no interfereix en la forma de les xarxes.

Un cop la pintura s'ha assecat, procedirem a clavar els 560 mitjos escuradents amb 1 cm de separació entre ells. És recomanable ajudar-se d'alguna plantilla, com podria ser una reixeta (Figura 3) per aconseguir regularitat en la disposició dels escuradents.

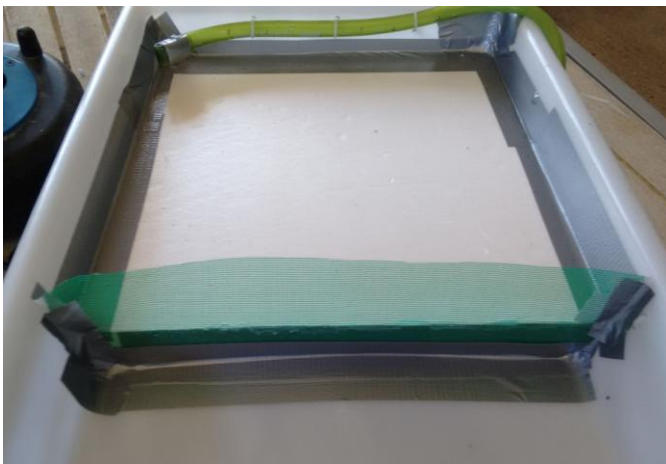


Figura 2. Cal segellar bé tots els costats i, sobretot, la part de sota de la planxa per evitar el pas de l'aigua. Si arribés a entrar aigua sota la planxa, aquesta suraria i quedaria exposada fora de l'aigua.

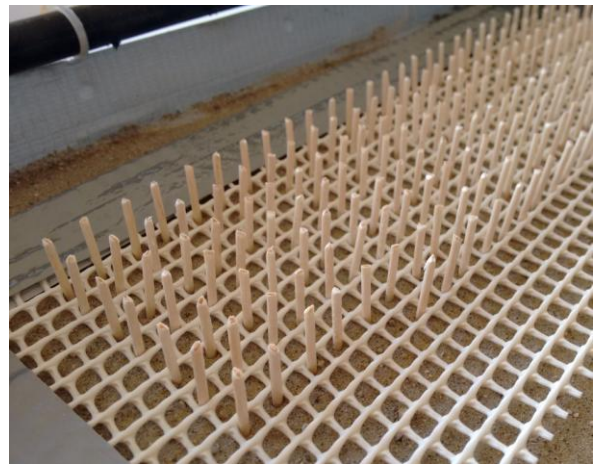


Figura 3. Per mantenir 1 cm de separació entre els escuradents ens podem ajudar d'una plantilla. En el nostre cas ens hem ajudat d'una reixeta, però qualsevol altre sistema també serviria.

En el nostre muntatge hem agrupat els escuradents en dos rectangles de 10 x 28 unitats, separats per 10 cm d'espai buit, de manera que hem obtingut el que podem veure a la Figura 4. Tot i així, mentre es respecti la distància de separació entre escuradents la seva distribució no és important.

Un cop col·locats els escuradents, podem prosseguir i afegir-hi el fil de cosir negre. La manera més ràpida i senzilla consisteix en, amb un sol tros de fil llarg, unir tots els escuradents d'un rectangle donant una volta a cada escuradents. S'ha d'intentar mantenir sempre una altura d'aproximadament 1 cm, d'aquesta manera aconseguim crear un marc on els *Hydropsyche* tinguin tot el suport necessari per a teixir-hi la xarxa (Figura 5). Els extrems del fil es nusen a l'escuradents final i inicial i, per assegurar que no es desfacin, s'hi aplica una gota de cola instantània.

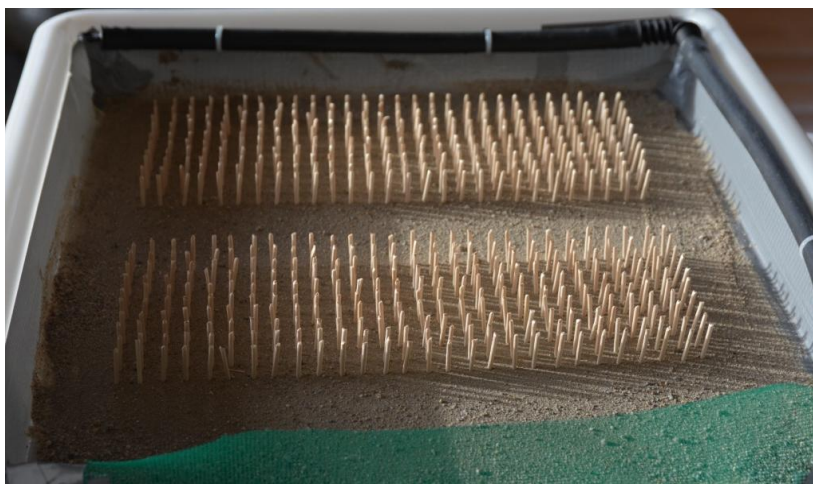


Figura 4. Distribució final dels escuradents, en aquest cas els hem distribuït en dos blocs i mantenint una distància de separació de les parets de la safata.



Figura 5. Detall del fil de cosir que uneix lateralment els escuradents. La rugositat dels escuradents juntament amb la tensió del fil impedeix que aquest es desplaci amunt o avall, de manera que queda fixat.



Figura 6. Muntatge acabat i en funcionament del microcosmos definitiu per a *Hydropsyche exocellata*.

Finalment, i per acabar, només falta muntar la canalització de l'aigua. El sistema consisteix en dos tubs, units entre ells per un colze de 90° i unit a la bomba per un tros de tub de silicona més petit (Figura 6). Amb uns petits forats a la safata i unes brides de plàstic, es fixa el tub a una altura superior al nivell de l'aigua per evitar que els *Hydropsyche* utilitzin l'espai entre el tub i la safata com a refugi. L'extrem del tub que no es troba connectat a la bomba es tapa amb un tap i es fa un total de 6 forats al tub, orientats de tal manera que no impactin directament contra el rectangle d'escuradents. La bomba se situa al reservori d'aigua que hi ha al tros de safata que no queda recobert per la planxa de poliestirè.

Elaboració dels efluents salins

Si es vol estudiar els efectes de les diferents proporcions iòniques no ens podem limitar a utilitzar els propis efluents, ja que aquests poden tenir altres ions o productes químics que no controlem i que ens alterin els resultats. Per tal d'aconseguir uns solucions que només difereixin en la concentració de sulfat i clorur, es va quantificar els efluents reals de les tres indústries i del riu i es va fer una reproducció al laboratori del seu contingut en sals. El procediment de quantificació de clorur i sulfat es va fer seguint els mètodes estàndards segons Cleceri et al. (1998). Els resultats es poden veure a la Figura 7. Per tal de reproduir les concentracions de sals dels diferents efluents es va utilitzar NaCl per al clorur i Na₂SO₄ per al sulfat per fer unes solucions a 250 g/L, d'aquesta manera amb una petita addició a les safates que pràcticament no altera el volum d'aigua s'aconsegueixen grans canvis en la conductivitat.

	Sulfats (mg/L)	Clorurs (mg/L)	Cl ⁻ /SO ₄
Riu	0,1325	248,5	1875,2
Minera	1,2462	213000	170923,7
Càrnia	0,1359	74,55	548,9
Paperera	0,1978	1065	5384,2

Figura 7. Concentracions obtingudes en les valoracions volumètriques dels efluents de les indústries minera, càrnia i paperera i de l'aigua del riu. A la tercera columna es mostra la proporció Cl⁻/SO₄, que és el que ens interessa a l'experiment.

Disseny experimental

Els dos factors que volem estudiar són el tractament i la població. El tractament comprèn quatre nivells (Control, Minera, Càrnia i Paperera) i la població dos (Pont de Vilomara i La Garriga). Es van utilitzar 8 safates per cobrir totes les 8 possibles combinacions.

Les safates es van preparar amb el muntatge d'escuradents explicat anteriorment en una cambra frigorífica a 10°C, simulant la temperatura aproximada de l'aigua del riu quan es van capturar els individus. La cambra es trobava a les fosques, ja que els *Hydropsyche* viuen sota les pedres i preferentment en llocs amb poca llum, exceptuant els breus moments en que hi entravem per fer les observacions. Cada safata contenia 3 litres d'aigua del riu on es van recollir els *Hydropsyche* corresponents (Figura 8). L'experiment es va dur a terme els dies 3, 4, 5 i 6 de març a la Universitat de Vic.

El primer dia al matí es va anar a col·locar les safates a la cambra frigorífica i a fer la comprovació per tal que totes funcionessin bé, que no hi hagués fuites d'aigua i les bombes fessin circular l'aigua adequadament. A la tarda es va procedir a recol·lectar els *Hydropsyche exocellata* de les dues localitats, seleccionar els que estaven més actius i col·locar-ne 15 a cada safata.

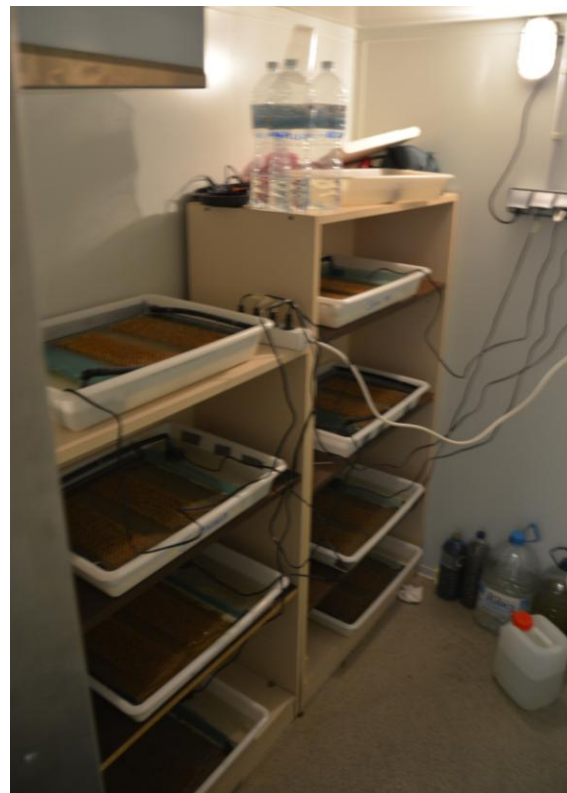


Figura 8. Les 8 safates en la cambra frigorífica a 10°C.

El segon dia, 4 de març, al matí es va fer el recompte d'individus vius i es van fotografiar les xarxes que havien teixit durant la nit. Després de ser fotografiada i anotada, cada xarxa es retirava. Les fotografies es van fer amb una càmera Nikon D7100 amb un objectiu Sigma 17-70 mm 1:2.8-4 DC Ø 72. Per aconseguir una millor il·luminació i reduir les ombres es van utilitzar dues làmpades. En acabat, es van fer les addicions de les solucions que simulaven els efluents fins aconseguir una conductivitat de 2500 µS/cm, excepte en el control.

El tercer i quart dia al matí es va dur a terme el mateix procediment: recompte d'individus, fotografia i extracció de les xarxes. L'últim dia es van guardar 5 individus de cada safata (10 en el tractament control) en gel sec per a l'anàlisi de biomarcadors i per fer l'estudi de l'activitat es van gravar 5 individus de cada safata en un fons blanc, per més tard analitzar-ho.

Els resultats comporten la quantificació de tres variables: estat físic (contraccions abdominals), estat fisiològic (biomarcadors) i estat comportamental (regularitat de les xarxes).

Estudi de l'estat físic

Les contraccions abdominals depenen de la salut general de l'insecte i del seu estat físic, és a dir, de la falta d'estrès que engegui els mecanismes d'homeòstasi. Si un individu es troba en mal estat no podrà invertir tanta energia en el moviment. S'ha agafat una safata amb un fons blanc per donar més contrast d'imatge, s'ha omplert d'aigua i s'hi ha enfocat una càmera que gravava un vídeo. Amb unes pinces i la màxima suavitat possible s'han anat introduint fins un total de 5 *Hydropsyche* a la safata, mentre la càmera gravava. Més tard s'ha comptat el nombre de contraccions que duïen a terme els insectes els primers 10 segons que estaven a la safata i s'han calculat les contraccions per segon de cada individu.

Estudi de l'estat fisiològic

Per saber quin és el dany que la salinitat fa a l'organisme s'han utilitzat biomarcadors. Els biomarcadors estudiats en aquest experiment són la superòxid dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), el glutatió (GSH), el glutatió S transferasa (GST), la acetil colinesterasa (AChE), la peroxidació dels lípids (LPO), el dany en el DNA i el lactat deshidrogenasa (LDH). Els biomarcadors recullen un ampli ventall de funcions

fisiològiques que ens mostren un estat d'estrès fisiològic dels *Hydropsyche exocellata* (Figura 9). Abans de dur a terme un estudi de biomarcadors per una espècie s'ha de fer el que s'anomena optimització, que consisteix en estudiar la concentració de proteïna òptima per a l'estudi. Cal dur a terme el mateix protocol que per al propi estudi de biomarcadors però amb diferents concentracions de proteïna, per així trobar quina de les concentracions ens ofereix millors resultats. Aquest procediment es duu a terme amb individus del tractament control. El protocol seguit en cadascun dels biomarcadors es basa en treballs realitzats pel grup de recerca F.E.M. juntament amb el laboratori de Carlos Barata del CSIC (Barata et al., 2005; Damásio et al., 2011; Prat et al., 2013).

Biomarcador		Descripció general
Superòxid (SOD)	Dismutasa	Enzim antioxidant. Dismutació de $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 i oxigen.
Catalasa (CAT)		Enzim antioxidant. Descomposició de H_2O_2 en aigua i oxigen.
Glutatió (GSH)		Antioxidant endogen. Elimina ROS (espècies reactives de l'oxigen)
Glutatió (GST)	S-transferasa	Es conjuga amb metabòlits de fase I, consumint GSH i excretant-lo.
Acetil (AChE)	Colinesterasa	Implicat en la hidròlisi del neurotransmissor acetilcolina. La seva inhibició provoca neurotoxicitat.
Peroxidació lipídica (LPO)		Estrès oxidatiu provocat per l'excés de ROS.
Lactat (LDH)	Deshidrogenasa	Toxicitat general.

Figura 9. Llista dels biomarcadors analitzats i una breu descripció de cadascun.

Estudi de la regularitat de les xarxes

En aquesta part s'ha treballat conjuntament amb un enginyer que ens ha programat amb *Matlab* un procediment per analitzar la regularitat de les xarxes de forma automàtica.

Primer de tot cal tractar la imatge per a eliminar el soroll de fons i deixar tan sols el dibuix de la xarxa teixida pels insectes. Per això s'han emfatitzat els contorns aplicant filtres passaalt de tipus Prewitt a la fotografia. Gràcies a això obtenim una imatge on només veurem la xarxa de color blanc sobre un fons negre (Figura 10).

Acte seguit, s'aplica la transformació directa del cosinus (DCT). En passar a aquest domini, si una imatge presenta molta regularitat serà representada per pocs coeficients (amb molta energia cadascun) mentre que si és més irregular necessitarà més coeficients (amb menys energia cadascun). Es tracta d'una base de senyals, com més regularitat té la imatge menys senyals es necessitaran, però hi haurà una major repetició d'aquestes. Del punt anterior deduïm que si totes les transformacions tenen la mateixa energia total la suma dels coeficients és la mateixa, ja que es normalitza. Si mirem quants coeficients representen el 90% de l'energia total, en el cas de les imatges més regulars aquest nombre serà menor. Així doncs, aquest és el criteri per comparar la regularitat de les imatges.

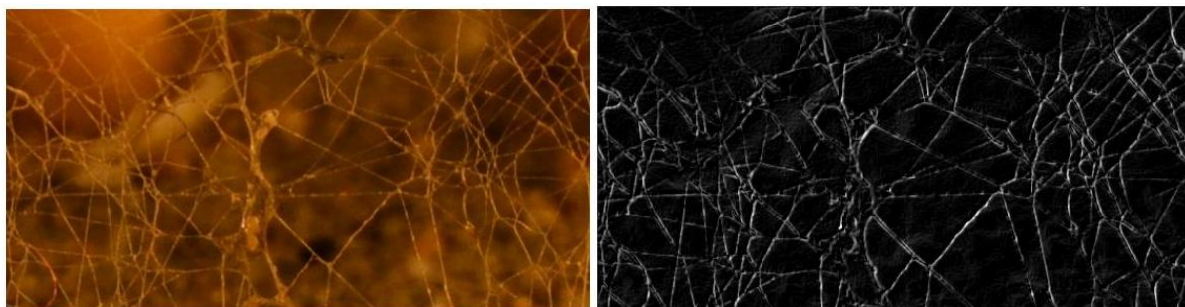


Figura 10. Fotografia d'una xarxa teixida pels *H. exocellata* abans (esquerra) i després del tractament d'imatge amb un filtre passaalt de tipus Prewitt.

Anàlisi estadístic

L'anàlisi estadístic dels resultats s'ha fet amb el programa R (R Development Core Team, 2011). S'ha dut a terme anàlisis de la variància i test de Tukey per tal de comprovar la significació de la diferència entre els tractaments que hem aplicat i, per representar-ho gràficament, s'han utilitzat boxplots. Un p-valor per sobre de 0.05 s'ha considerat no significatiu.

RESULTATS

Eficàcia del microcosmos

Els dispositius on s'ha dut a terme l'experiment han resultat ser molt eficaços. Es van utilitzar un total de 8 safates en les quals es va introduir 15 individus d'*Hydropsyche exocellata* a cadascuna. La mortalitat de l'experiment va ser molt baixa, només van morir 2 individus al llarg dels tres dies. Si bé alguns individus es van fixar fora de la zona dels escuradents, la majoria van fer-ho dins de la zona dissenyada, i els que no ho van fer també van teixir xarxes fotografiables utilitzant altres elements de la safata com a suport. Tot i que no tot els individus van teixir xarxes, el nombre total va ser satisfactori (Figura 11).

Per tant, podem dir que els experiments no es van veure afectats per problemes tècnics o la falta d'eficàcia dels muntatges per acollir els *Hydropsyche*.

Tractament	Nombre de xarxes	Individus morts
PDV-Control	34	1
PDV-Mineria	29	1
PDV-Paperera	39	0
PDV-Argal	25	0
G-Control	10	0
G-Mineria	33	0
G-Paperera	29	0
G-Argal	38	0

Figura 11. Total de xarxes teixides i individus morts per a cada tractament al llarg de l'experiment.

Estat físic dels *Hydropsyche* en finalitzar l'experiment

El comptatge de contraccions abdominals per segon ha mostrat diferències significatives tant entre poblacions com entre tractaments. La freqüència de contraccions dels *Hydropsyche* ha fluctuat entre 2,2 contr/s i 4 contr/s, amb una mitjana de 3,2 contr/s. Pel que fa a l'estudi poblacional ha mostrat que els individus de La Garriga tenien una freqüència de contracció major que els del Pont de Vilomara (Figura 12), tot i que aquests últims venien d'una població exposada a una conductivitat més elevada. La resposta entre tractaments ha estat significativament diferent entre "Paperera" i "Càrnia", sent aquesta última significativament més elevada (Figura 13).

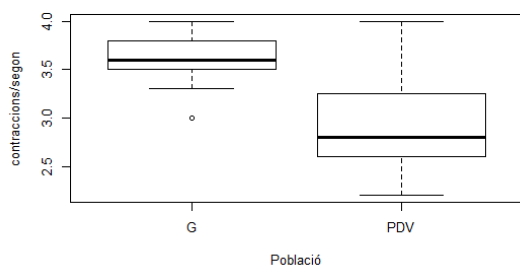


Figura 12. Boxplot de la freqüència de contraccions dels *H. exocellata* segons la variable Població. La població de La Garriga (G) mostra uns valors més elevats que la del Pont de Vilomara (PDV) ($p=3e^{-6}$).

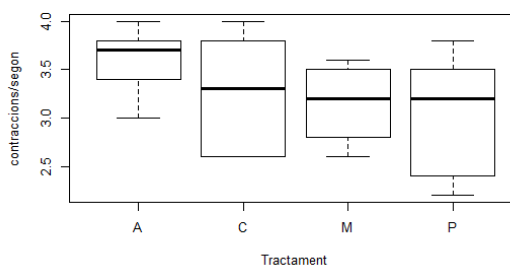


Figura 13. Boxplot de la freqüència de contraccions dels *H. exocellata* segons la variable Tractament. El tractament "Càrnia" (A) té valors més elevats que "Paperera" (P) ($p=0.0114$).

Biomarcadors

Hi ha hagut diferents biomarcadors que han respost de manera significativa als tractaments, hem trobat diferències significatives en el nivell d'estrès entre poblacions i també entre tractaments. La peroxidació dels lípids (LPO), el glutatió S-transferasa (GST) i la superòxid dismutasa (SOD) han mostrat valors d'estrès més elevats en els *H. exocellata* extrets de La Garriga (Figura 14). Només el glutatió (GSH) mostrava valors significativament més elevats en la població del Pont de Vilomara.

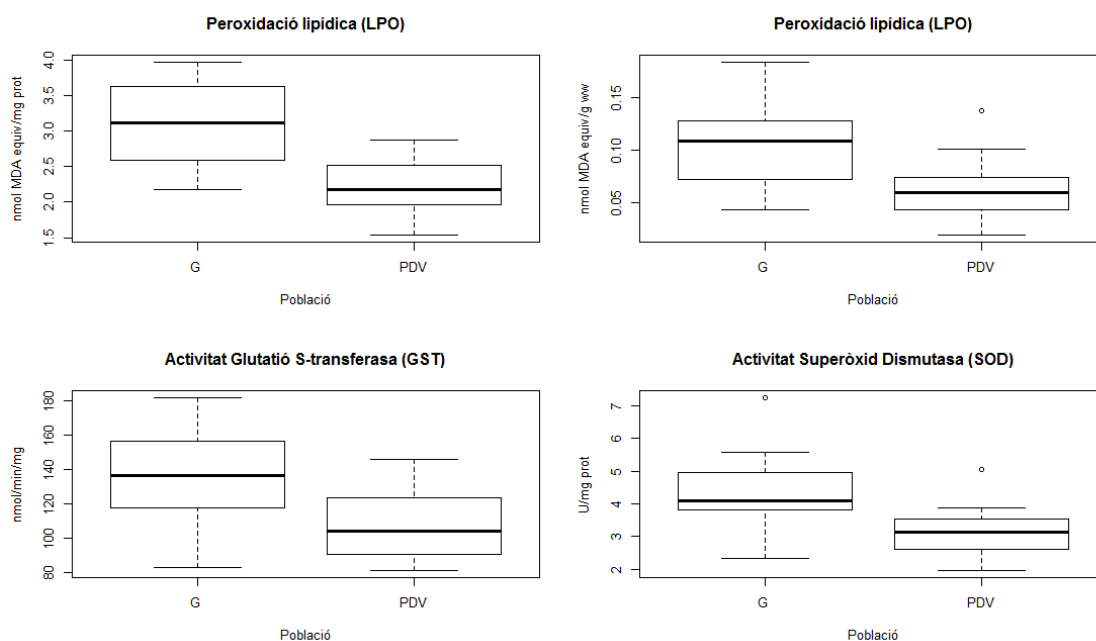


Figura 14. Boxplots dels resultats dels biomarcadors que mostren valors significativament més elevats en La Garriga (G) que en el Pont de Vilomara (PDV). ($p=3e^{-6}$ en tots quatre casos)

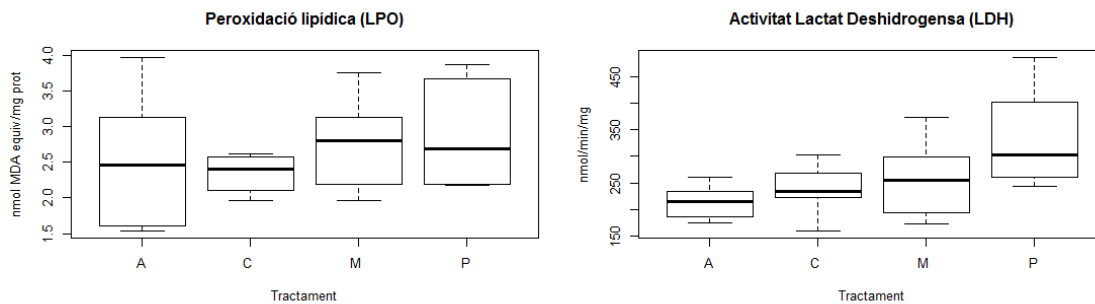


Figura 15. Boxplots dels resultats dels biomarcadors en funció del tractament. En LPO el tractament “Paperera” (P) és significativament més alt que “Control” (C) ($p=0.044$). En LDH el tractament “Paperera” (P) és significativament més alt que “Càrnia” (A) ($p=0.004$) i que “Control” ($p=0.028$)

Pel que fa a la composició iònica, la peroxidació lipídica (LPO) mostrava valors significativament més elevats en el tractament “Paperera” que en el “Control” i el lactat deshidrogenasa (LDH) mostrava valors més elevats en el tractament “Paperera” que en “Càrnia” i “Control” (Figura 15).

Regularitat de les xarxes

La regularitat es mesura en el nombre de coeficients necessaris per representar el 90% de l'energia total, tal com hem explicat anteriorment en la metodologia. Recordem que un nombre major de coeficients suposarà una xarxa més irregular i viceversa. Recordem, també, que les xarxes es van fotografiar al llarg de tres dies diferents.

En l'anàlisi de regularitat del segon dia vam obtenir valors d'irregularitat significativament més elevats als individus de la població de La Garriga, una població menys exposada a altes conductivitats, que en els individus del Pont de Vilomara (Figura 16).

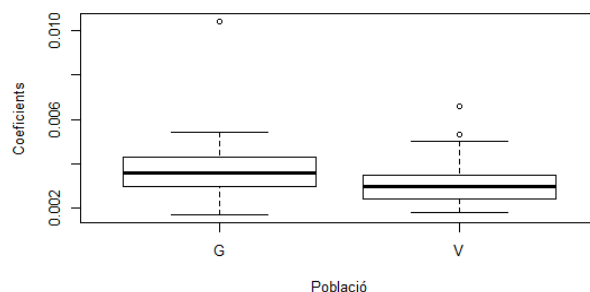


Figura 16. Boxplot de la irregularitat de les xarxes mesurada en coeficients necessaris per explicar el 90% de l'energia. La població de La Garriga té uns valors més elevats que la del Pont de Vilomara ($p=0.034$).

Hem obtingut un total de 10 resultats significatius de l'anàlisi de biomarcadors, el desordre de les xarxes i el moviment dels individus. (Figura 17). Els individus de La Garriga s'han mostrat significativament més estressats amb els biomarcadors LPO, GST i SOD; en canvi el biomarcador GSH ha donat valors d'estrès significativament més elevats als individus del Pont de Vilomara. Els individus que han rebut el tractament "Paperera", baix en sulfat, s'han mostrat significativament més estressats pels biomarcadors LPO i LDH. El segon dia els individus de La Garriga han teixit xarxes significativament més irregulars que els del Pont de Vilomara. Els individus de La Garriga han mostrat una freqüència de contraccions abdominals significativament superior, igual que els del tractament "Càrnia" en comparació a "Paperera".

Biomarcadors (nivell d'estrès)			Xarxes (desordre de les xarxes)			Moviment (contraccions/segon)		
	Població	Tractament		Població	Tractament		Població	Tractament
LPO (mg prot)	G>PDV	P>C	Dia 1	no sign.	no sign.	Contr/s	G>PDV	A>P
LPO (g ww)	G>PDV	no sign.	Dia 2	G>PDV	no sign.			
GSH (g ww)	PDV>G	no sign.	Dia 3	no sign.	no sign.			
GST	G>PDV	no sign.						
LDH	no sign.	P>A						
CAT	no sign.	no sign.						
SOD	G>PDV	no sign.						
AchE	no sign.	no sign.						

Figura 17. Taula resum dels resultats que han mostrat diferències significatives ($p < 0.05$). Mostra els resultats de biomarcadors, desordre de les xarxes i el moviment dels *Hydropsyche*. Població: **PDV** (Pont de Vilomara, població exposada a conductivitat alta), **G** (Garriga, població exposada a conductivitat baixa). Tractament: **C** (Control, no addició), **A** (Carnisseria, Cl/SO₄ baixa), **P** (Paperera, Cl/SO₄ mitja), **M** (Mineria, Cl/SO₄ alta).

DISCUSSIÓ

L'objectiu d'aquest estudi és testar la toxicitat de diferents combinacions dels ions clorur i sulfat i comprovar si afecta d'igual manera a una població que ha estat més exposada a la salinitat que a una que no ho ha estat tant. D'altra banda, hem volgut experimentar amb uns sistemes per analitzar l'estrès dels individus que no han estat estudiats fins el moment, la regularitat de les xarxes teixides i la freqüència de contraccions abdominals. Per contrastar-ho amb mètodes ja utilitzats prèviament hem utilitzat l'anàlisi de biomarcadors.

L'estat físic, reflectit en la freqüència de les contraccions abdominals, s'ha mostrat superior en el tractament "Càrnia" que en el "Paperera", (Figura 13) confirmant la hipòtesi de que el clorur té un efecte més tòxic que el sulfat. Contràriament al que esperàvem, els individus de la població de La Garriga han mostrat un millor estat físic que els del Pont de Vilomara, aquest últims provenint d'una població més exposada a la salinitat (Figura 12). Cal tenir en compte que, quan analitzem el moviment dels individus, estem suposant que una freqüència més alta de contraccions significa un millor estat físic. No coneixem del cert aquesta relació i podria ser que estiguéssim fent una mala interpretació dels resultats. Podria donar-se el cas que en un pitjor estat físic els *Hydropsyche* mostressin més activitat per tal de buscar aliment o refugi. La freqüència de les contraccions és un fenomen que ha estat poc estudiat i no se'n disposa de gaire informació.

Pel que fa a la regularitat des les xarxes, la nostra hipòtesi era que una població exposada a més salinitat toleraria millor els tractaments i teixiria unes xarxes més regulars. El segon dia d'experiment s'han trobat valors d'irregularitat significativament superiors en els individus de la població de La Garriga, exposada a menys salinitat (Figura 16). Això ens confirma la hipòtesi i ens fa pensar que existeix algun mecanisme d'adaptació poblacional a la salinitat.

Els resultats obtinguts en l'anàlisi dels biomarcadors LPO, GST i SOD recolzen la hipòtesi que afirma que els individus de La Garriga tenen nivells d'estrès més elevats que els del Pont de Vilomara quan se'ls exposa a condicions de major salinitat (Figura 14). Els valors obtinguts mostren nivells d'estrès relativament baixos si ho comparem amb altres dades d'estudis similars (Barata et al., 2005) i mostren estrès a diferents nivells. La causa de la diferència entre ambdues poblacions es pot trobar en una adaptació poblacional, ja que el Pont de Vilomara ha registrat al llarg dels últims anys una conductivitat major que La Garriga (Figura 1). L'adaptació poblacional a la salinitat es coneix en bacteris (Kartal et al., 2006) i en plantes (Hameed & Ashraf, 2008), però

quan parlem d'invertebrats les evidències són més limitades. S'ha comprovat que hi ha copèpodes, com *Eurytemora affinis*, que mostren una ràpida adaptació a sistemes no salins quan provenen d'ambients marins (Posavi et al., 2014). D'ambients no salins a salins se'n coneixen pocs casos en invertebrats, un cas és *Daphnia pulex*, tot i que es discuteix si el mecanisme és evolutiu o ecològic (Wider & Hebert, 1987). Seria interessant aprofundir en aquest aspecte per a poder demostrar realment que existeix una adaptació poblacional com la que estem estudiant. Un experiment interessant seria dur a terme el mateix procediment però analitzar la resposta en poblacions amb registres de salinitats molt més extremes i, en comptes de sotmetre els individus a diferents proporcions de Cl/SO₄, oblidar-nos del sulfat i dissenyar tractaments amb diferents concentracions absolutes de clorur. D'aquesta manera podríem aïllar l'efecte de l'adaptació poblacional al clorur.

Els tractaments aplicats, ja que s'han basat en efluents reals, no recullen un rang ampli de les proporcions Cl/SO₄ possibles. El tractament Control no sembla provocar respostes més positives per als *Hydropsyche*, malgrat sigui el que té una conductivitat més baixa (1407 i 1075 µS/cm per a Pont de Vilomara i La Garriga, respectivament), tan sols en el biomarcador LPO tenim millors resultats en el tractament "Control" quan el comparem amb el tractament "Paperera". El tractament "Càrnia", en canvi, ofereix millors resultats en el biomarcador LDH i en la freqüència de contraccions. És el tractament al que millor han reaccionat els individus, fins i tot millor que el "Control". Una possible explicació a aquest fet seria que el tractament "Càrnia" és el que té la proporció Cl/SO₄ més baixa i ens convidaria a pensar que importa més la proporció de ions que no pas el total. Tenint en compte que la diferència de conductivitat entre el tractament "Control" i els altres tractaments és d'entre 1000 i 1500 µS/cm, uns valors relativament baixos, podríem arribar a concloure que és més important la composició iònica que no pas la conductivitat total dels efluents. Aquest fet coincideix amb els resultats de Kunz et al. (2013) en els que es demostra que la salinitat té diferents efectes sobre els macroinvertebrats segons la seva composició iònica, i amb els resultats de Mount et al. (1997) que afirmen que el ió clorur és més tòxic que el ió sulfat. Veient que en el tractament "Càrnia", més ric en sulfats que el "Control", els individus es mostren menys estressats podríem considerar que la presència de sulfat té un efecte positiu i que compensa l'efecte perjudicial del clorur.

Els individus del tractament "Càrnia" que han estat exposats a aigua de riu durant un dia i posteriorment se'ls ha aplicat un tractament de salinització que ha provocat una disminució de la proporció Cl/SO₄, s'han mostrat menys estressats que els individus del tractament "Control" exposats tan sols a aigua de riu, tot i que aquests tenien una

conductivitat més baixa. Els nostres resultats suggereixen que la presència de NaSO_4 disminueix la toxicitat del NaCl . Existeixen uns resultats encara no publicats (Popova et al.) on demostren un fenomen similar en *Daphnia*, que amb uns tractaments de salinització amb barreja de ions (NaCl , MgCl_2 i KCl) els individus pateixen menys mortalitat que amb un tractament de salinització amb un sol ió (NaCl). Igual que la presència de Mg i K ha reduït la toxicitat del Cl en els experiments de Popova et al., el ió SO_4 ha mostrat la propietat de reduir la toxicitat del ió Cl en els nostres experiments.

Aspectes a millorar per a futures investigacions

El disseny experimental ha donat uns resultats molt satisfactoris pel que fa a supervivència dels individus i a la seva activitat, però tractant-se d'un disseny experimental sense precedents li falta una mica de rodatge i dedicar-hi temps per a perfeccionar-lo. Vistos els resultats, tenim una llista de possibles millores al disseny experimental que ens podrien oferir millors i més sòlids resultats si les apliquéssim.

L'anàlisi de biomarcadors es troba sovint limitat per la biomassa disponible per a l'anàlisi, sobretot quan es treballa amb animals de petites dimensions. Amb més individus destinats a aquest anàlisi s'hagués pogut obtenir més rèpliques, dur a terme una millor optimització i utilitzar majors concentracions de proteïna per a l'anàlisi. Centrant-nos en els biomarcadors, hagués estat interessant no analitzar-los tan sols l'últim dia d'experiment, sinó prendre'n mostres cada dia per així poder veure'n l'evolució, tal i com hem fet amb la regularitat de les xarxes.

Els tractaments de salinitat als que s'ha sotmès els *Hydropsyche* estan basats en les concentracions reals dels afluents de les indústries i ens dóna una idea sobre com afecten realment la indústria als individus, però no ens ofereix un rang de proporcions Cl/SO_4 gaire complet. Seria interessant escollir les proporcions per recollir un conjunt de valors més ben repartit i que no tingués valors tan alts com el tractament "Mineria", que pràcticament no contenia sulfats. Hem vist que hi ha hagut molt poques morts dels individus durant l'experiment i les poques que hi ha hagut han estat abans d'aplicar-los el tractament, per tant seria raonable pensar que es pot aplicar concentracions més altes de sals per obtenir una resposta més significativa i no provocar una mortalitat rellevant. L'altra via per obtenir més resposta és allargar el temps d'exposició a la sal, de tan sols 2 dies en aquest experiment. Seria interessant introduir diferents tractaments amb un únic ió com a causant de la salinitat, sempre restringint-nos als límits que es troba en la realitat, per així poder aïllar l'efecte que aquest té sobre els

individus. Hi ha, però, la limitació de la química, ja que no es pot afegir un ió sense el que l'acompanya. En aquest experiment, per exemple, per augmentar la concentració de clorurs s'afegeix NaCl, per tant també augmentem la concentració de sodi. Hi ha indicis, però, per pensar que el catió Na no és tòxic, sinó que ho és l'anió que l'acompanya (Mount et al., 2009).

Tal com hem comentat anteriorment, les salinitats registrades en els dos punts de recol·lecció són, encara que significativament diferents, de nivells força similars. Si es determinessin com a punts de recol·lecció dues localitzacions amb valors més extrems, per exemple un riu amb alta salinització natural i un altre amb valors mínims de conductivitat, s'hauria pogut testar amb més eficàcia l'efecte de l'adaptació poblacional a la salinitat.

CONCLUSIONS

Hem fet un disseny molt econòmic, de fàcil muntatge i que ha donat uns resultats molt positius. Tot i així, calen algunes millores en el disseny experimental per aconseguir millors resultats.

Existeixen indicis per pensar que una població exposada a valors més alts de conductivitat tolera millor els tractaments de salinització. Seria interessant aprofundir en els mecanismes que provoquen aquesta adaptació poblacional.

Els tractaments han sorgit efecte i han demostrat que el clorur té més toxicitat que el sulfat. S'ha vist que és més important la composició iònica que no pas la conductivitat total i fins i tot s'ha pogut detectar que el sulfat pot tenir un efecte compensatori de la toxicitat del clorur. Creiem que és una línia d'investigació molt interessant que pot aportar molts beneficis a la gestió de vessaments industrials.

Vistos els resultats, cal recordar que la normativa actual tan sols té en compte la conductivitat dels vessaments i no para atenció a la causa d'aquesta conductivitat, és a dir, les concentracions dels diferents ions. Creiem que és important establir un límit per a cada ió depenent de la toxicitat i els efectes que aquest pugui tenir sobre l'ecosistema. D'aquesta manera es pot aconseguir una gestió més optimitzada dels vessaments industrials i reduir el dany que aquests provoquen al medi ambient.

AGRAÏMENTS

Aquest projecte no hagués estat possible sense l'ajuda de totes i cadascuna de les persones que, en algun moment o altre, han col·laborat en la seva realització.

A la Melisa i el Carlos per introduir-me a l'abstracte món dels biomarcadors, a la Núria i el Cesc per fer-me entendre com pensa un *Hydropsyche*, al Nacho per intentar ensenyar-me com funciona el *Matlab* i al meu pare per evitar que les safates es quedessin sense aigua.

I un especial agraïment al Narcís, per l'aplom, i al Miguel, per l'empenta.

BIBLIOGRAFIA

- Aladin, N. V., Plotnikov, I. S., Micklin, P., & Ballatore, T. (2009). Aral Sea: Water level, salinity and long-term changes in biological communities of an endangered ecosystem-past, present and future. *Natural Resources and Environmental Issues*, 15(1), 36.
- Barata, C., Lekumberri, I., Vila-Escalé, M., Prat, N., & Porte, C. (2005). Trace metal concentration, antioxidant enzyme activities and susceptibility to oxidative stress in the tricoptera larvae *Hydropsyche exocellata* from the Llobregat river basin (NE Spain). *Aquatic Toxicology*, 74(1), 3-19.
- 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-Ecology and Management of Inland Waters*, 41(2), 125-133.
- Berezina, N. A. (2003). Tolerance of freshwater invertebrates to changes in water salinity. *Russian Journal of Ecology*, 34(4), 261-266.
- Bonada, N., Vives, S., Rieradevall, M., & Prat, N. (2005). Relationship between pollution and fluctuating asymmetry in the pollution-tolerant caddisfly *Hydropsyche exocellata* (Trichoptera, Insecta). *Archiv für hydrobiologie*, 162(2), 167-185.
- 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.
- Cañedo-Argüelles, M., Sala, M., Peixoto, G., Prat, N., Faria, M., Soares, A. M., Barata, C. & Kefford, B. (2015). Can salinity trigger cascade effects on streams? A mesocosm approach. *Science of The Total Environment*.
- Catalunya. Llei 13/2003, de 13 de maig, maig, pel qual s'aprova el Reglament dels serveis públics de sanejament. (DOGC, núm. 3894 – 29.5.2003, pàg. 11149).
- Cleceri, L. S., Greenberg, A. E., & Eaton, A. D. (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. *American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Association, Washington, DC, USA*.
- Cormier, S. M., Wilkes, S. P., & Zheng, L. (2013b). Relationship of land use and elevated ionic strength in Appalachian watersheds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(2), 296-303.

- Custodio, E. (2002). Aquifer overexploitation: what does it mean?. *Hydrogeology Journal*, 10(2), 254-277.
- Damásio, J., Fernández-Sanjuan, M., Sánchez-Avila, J., Lacorte, S., Prat, N., Rieradevall, M., Soares, A. & Barata, C. (2011). Multi-biochemical responses of benthic macroinvertebrate species as a complementary tool to diagnose the cause of community impairment in polluted rivers. *Water research*, 45(12), 3599-3613.
- Fernandez-Turiel, J. L., Gimeno, D., Rodriguez, J. J., Carnicero, M., & Valero, F. (2003). Spatial and seasonal variations of water quality in a Mediterranean catchment: the Llobregat River (NE Spain). *Environmental geochemistry and health*, 25(4), 453-474.
- Hameed, M., & Ashraf, M. (2008). Physiological and biochemical adaptations of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. from the Salt Range (Pakistan) to salinity stress. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 203(8), 683-694.
- Hassell, K. L., Kefford, B. J., & Nugegoda, D. (2006). Sub-lethal and chronic salinity tolerances of three freshwater insects: *Cloeon* sp. and *Centroptilum* sp.(Ephemeroptera: Baetidae) and *Chironomus* sp.(Diptera: Chironomidae). *Journal of Experimental Biology*, 209(20), 4024-4032.
- Jolly, I. D., Williamson, D. R., Gilfedder, M., Walker, G. R., Morton, R., Robinson, G., Jones, H., Dowling, I. T., Dyce, P., Nathan, J. R., Nandakumar, N., Clarke, R., & McNeill, V. (2001). Historical stream salinity trends and catchment salt balances in the Murray–Darling Basin, Australia. *Marine and Freshwater Research*, 52(1), 53-63.
- Kartal, B., Koleva, M., Arsov, R., van der Star, W., Jetten, M. S., & Strous, M. (2006). Adaptation of a freshwater anammox population to high salinity wastewater. *Journal of Biotechnology*, 126(4), 546-553.
- Kefford, B. J., Fields, E. J., Clay, C., & Nugegoda, D. (2007). Salinity tolerance of riverine microinvertebrates from the southern Murray–Darling Basin. *Marine and Freshwater Research*, 58(11), 1019-1031.
- Kunz, J. L., Conley, J. M., Buchwalter, D. B., Norberg-King, T. J., Kemble, N. E., Wang, N., & Ingersoll, C. G. (2013). Use of reconstituted waters to evaluate effects of elevated major ions associated with mountaintop coal mining on freshwater invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(12), 2826-2835.

- Maheshwari, R., Rani, B., Saxena, A., Prasad, M., & Singh, U. (2012). Analysis of effluents released from recycled paper industry. *Journal of Advanced Scientific Research*, 3(1), 82-85.
- Moquet, J. S., Maurice, L., Crave, A., Viers, J., Arevalo, N., Lagane, C., ... & Guyot, J. L. (2014). Cl and Na fluxes in an Andean foreland basin of the Peruvian Amazon: An anthropogenic impact evidence. *Aquatic Geochemistry*, 20(6), 613-637.
- Mount, D. R., Gulley, D. D., Hockett, J. R., Garrison, T. D., & Evans, J. M. (1997). Statistical models to predict the toxicity of major ions to *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna* and *Pimephales promelas* (fathead minnows). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(10), 2009-2019.
- Philipson, G. N. The undulatory behaviour of larvae of *Hydropsyche pellucidula* Curtis and *Hydropsyche siltalai* Döhler. (1978). Proceedings of the 2nd International Symposium on Trichoptera. Springer Netherlands.
- 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.
- Popova, O. et al.. Unpublished results.
- Posavi, M., Gelembiuk, G. W., Larget, B., & Lee, C. E. (2014). Testing for beneficial reversal of dominance during salinity shifts in the invasive copepod *Eurytemora affinis*, and implications for the maintenance of genetic variation. *Evolution*, 68(11), 3166-3183.
- Prat, N., Munné, A., Rieradevall, M., Solà, C., & Bonada, N. (2000). ECOSTRIMED: Protocol to establish the ecological status of Mediterranean rivers and streams. *Diputació de Barcelona. Àrea de Medi Ambient (Estudis de la Qualitat Ecològica dels Rius, 8)*.
- Prat, N., Rieradevall, M., Barata, C., & Munné, A. (2013). The combined use of metrics of biological quality and biomarkers to detect the effects of reclaimed water on macroinvertebrate assemblages in the lower part of a polluted Mediterranean river (Llobregat River, NE Spain). *Ecological Indicators*, 24, 167-176.
- Prat, N.; Rieradevall, M.; Fortuño, P.; Acosta, R.; Bonada, N.; Cañedo-Argüelles, M.; Cid, N.; Pace, G.; Rodríguez-Lozano, P.; Sánchez, N.; Verkaik, I.; Villamarín, C. (2013). Diagnosi ambiental de les conques dels rius de la Província de Barcelona. Informe 2012. Diputació de Barcelona. Àrea d'Espais Naturals (Estudis de la Qualitat Ecològica dels Rius; 22).

- R Development Core Team (2011), R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria : the R Foundation for Statistical Computing. ISBN: 3-900051-07-0.
- Richter, S., Borchardt, D., Ewen, C., & Brinckmann, H. Runder Tisch Gewässerschutz Werra/Weser und Kaliproduktion. (2010). Grubenwässer– Herausforderungen und Lösungen “10. und 11.
- Schäfer, R. B., Bundschuh, M., Rouch, D. A., Szöcs, E., Peter, C., Pettigrove, V., Schulz, R.; Nuggeoda, D. & Kefford, B. J. (2012). Effects of pesticide toxicity, salinity and other environmental variables on selected ecosystem functions in streams and the relevance for ecosystem services. *Science of the Total Environment*, 415, 69-78.
- Sereda, J., Bogard, M., Hudson, J., Helps, D., & Dessouki, T. (2011). Climate warming and the onset of salinization: rapid changes in the limnology of two northern plains lakes. *Limnologia-Ecology and Management of Inland Waters*, 41(1), 1-9.
- Solà, C., & Prat, N. (2006). Monitoring metal and metalloid bioaccumulation in Hydropsyche (Trichoptera, Hydropsychidae) to evaluate metal pollution in a mining river. Whole body versus tissue content. *Science of the Total Environment*, 359(1), 221-231.
- Tachet, H., Richoux, P., Bournaud, M., & Usseglio-Polatera, P. (2000). *Invertébrés d'eau douce: systématique, biologie, écologie (pp. 1-588)*. Paris: CNRS éditions.
- Weider, L. J., & Hebert, P. D. (1987). Ecological and physiological differentiation among low-arctic clones of *Daphnia pulex*. *Ecology*, 188-198.
- Xavier Millet, tesina.
- Zalizniak, L., Kefford, B. J., & Nuggeoda, D. (2009). Effects of different ionic compositions on survival and growth of *Physa acuta*. *Aquatic Ecology*, 43(1), 145-156.

Efectes subletals de la salinització en *Hydropsyche exocellata*

ANNEX



Freshwater Ecology and
Management
Research Group



Facultat de Biologia

Dissenys previs del microcosmos

El primer disseny es va basar en un experiment ja dut a terme per Xavier Millet en la seva tesina (Millet). El disseny original consisteix en un canal de plàstic plexiglàs, de 150 cm de llarg, 2,5 cm d'ample i 15 cm d'alt i unes petites cel·les de 1 cm d'ample i 2 cm d'alt recobertes d'arena (Figura Annex 1) on els *Hydropsyche* teixien les seves xarxes i s'analitzen al laboratori.

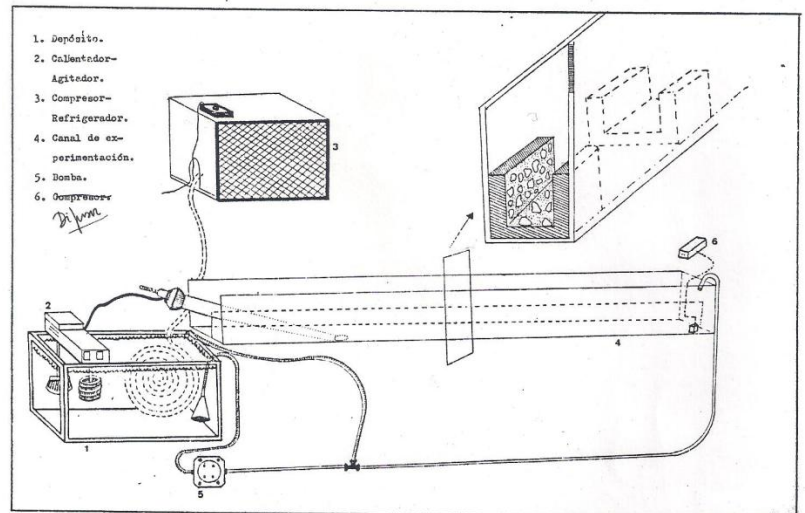


Figura Annex 1. Esquema del muntatge utilitzat en la tesi doctoral de Xavier Millet per a estudiar les xarxes d'*Hydropsyche*. Figura extreta de la seva tesi na.



Figura Annex 2. Procediment seguit per a la preparació dels canals de 2x1cm en les planxes de poliestirè extruït. **1)** Escalfament de la barra de ferro a les brases. **2)** Col·locació de la barra de ferro, subjectada amb un tros de fusta i manipulat sempre amb guants, sobre la planxa de poliestirè. Intentant, sempre, que quedi al màxim perpendicular possible. **3)** Pressió ràpida sobre la barra de ferro amb una peça de fusta i extracció de la barra de ferro el més ràpid possible per evitar que la calor cremi massa la planxa de poliestirè. **4)** Repetició del procediment fins a un total de 7 vegades. El primer pas, l'escalfament de la barra, pot servir per diversos canals.

El disseny que vam dur a terme basant-nos en l'explicat anteriorment consisteix en unes planxes de poliestirè extruït, amb unes dimensions de 30 cm d'amplada, 10 cm de llargada i 3 cm de gruix, on se li van fer uns canals de 2 centímetres de fondària per 1 centímetre d'amplada. Per fer els canals es van provar diferents sistemes i el que millor resultats va proporcionar va ser escalfar una barra de ferro al roig viu i pressionar-lo sobre les planxes de poliestirè amb rapidesa i precisió (Figura Annex 2).

El següent pas consisteix en proporcionar una textura arenosa als canals per tal que els insectes tinguin un substrat adient per a desplaçar-s'hi i teixir-hi les seves xarxes. En l'experiment de Millet que hem mencionat anteriorment s'utilitza una resina orgànica per enganxar-hi arena. Nosaltres hem utilitzat una cola universal sense dissolvent, és molt important que la cola no contingui dissolvent ja que aquest pot dissoldre el poliestirè i fondre'l, tal i com vam poder comprovar.

El resultat final obtingut seria unes planxes de poliestirè amb uns canals recoberts d'arena on esperem que els *H. exocellata* construeixin les seves xarxes (Figura Annex 3).

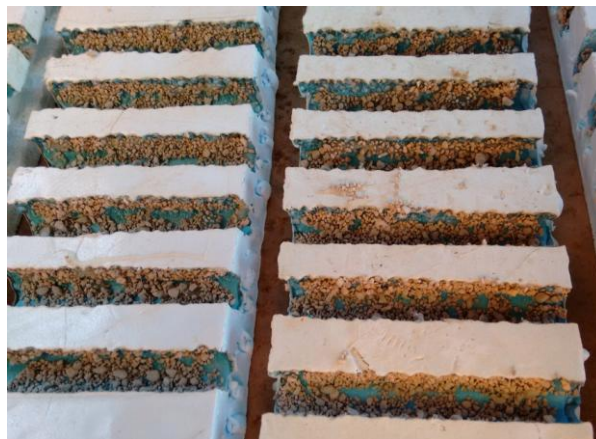


Figura Annex 3. Planxes de poliestirè extruït amb canals recoberts d'arena on els *H. exocellata* podran teixir les seves xarxes. Es van fer un total de 16 planxes com les que veiem a la fotografia

Aquestes planxes van ser col·locades de dues en dues en unes safates de PVC de 34 cm d'amplada i 50 cm de llargada que disposaven d'una bomba que feia circular l'aigua creant un flux laminar gràcies a unes canyes connectades al tub. Per evitar que flotessin les planxes, ja que són de poliestirè, s'hi va col·locar una llamborda a cada costat (Figura Annex 4). Per limitar el desplaçament i impedir que els insectes sortissin dels canals s'hi va col·locar pedres d'aproximadament 1 cm de diàmetre a cada costat del canal, més com a mesura dissuasòria que com a impediment físic real.

Es van muntar les 8 safates i es va col·locar un individu a cada canal per estudiar l'eficàcia del disseny. Es va deixar una nit sencera en funcionament dins una cambra frigorífica a 10°C per mantenir l'aigua a una temperatura similar a la del riu i l'endemà es va comprovar el resultat. Malauradament els individus no van teixir xarxes als canals com esperàvem, sinó que alguns van buscar refugi a sota les planxes, altres van morir i fins i tot algun va ser absorbit per la bomba i es va quedar a viure dins del tub. La bona notícia va ser que alguns individus van teixir xarxes, tot i que no va ser als canals com esperàvem i eren de molt mal fotografiar. Vam veure, també, que moltes de les pedres enganxades al canal s'havien després i que havien quedat zones molt irregulars en la secció del canal.

Vam arribar a la conclusió, doncs, que calia un disseny diferent que restringís la mobilitat als individus, que els "obligués" a quedar-se a una zona de bona visibilitat per així poder fotografiar les xarxes i manipular-los més fàcilment. Calia evitar que els individus s'amaguessin sota la planxa de poliestirè. Per aconseguir uns bons resultats en la formació de xarxes s'havia d'aconseguir uns espais molt homogenis on els insectes poguessin teixir-les, i en el disseny dut a terme tot això no ho teníem.



Figura annex 4. Muntatge final en una de les safates. Les planxes de poliestirè es mantenen enfonsades gràcies a les llambordes. Les canyes permeten dirigir el flux d'aigua perquè no impacti directe sobre els canals.

Degut a la poca eficiència del microcosmos dissenyat per als *Hydropsyche*, vam decidir nous models per així poder triar el que ens oferís millors resultats en l'obtenció de xarxes i en la comoditat per fotografiar-les. Els nous dissenys combinen la idea del sistema de canals del primer disseny amb la idea de que els insectes tenen tendència a “amagar-se” sota les planxes de poliestirè. Ens tots s'ha intentat aconseguir unes peces de poliestirè que encaixessin millor en la safata i no haver d'utilitzar llambordes o altres pesos per mantenir l'estructura quieta. També s'ha muntat una xarxa que impedeixi el pas dels insectes cap a la bomba i un sistema d'irrigació que no utilitza canyes, sinó que el raig d'aigua va dirigit avall i així no impacta contra l'hàbitat dels *H. exocellata*, a la vegada que es crea un flux més laminar.

Una altra innovació va ser la utilització d'una pintura amb base de silicona per enganxar l'arena, més fina que en el disseny anterior. Aquesta pintura, normalment utilitzada en fontaneria per arreglar goteres en les teulades, té la propietat de ser molt líquida i de fàcil manipulació en fresc i a la vegada molt elàstica quan s'asseca, ja que adquireix textura de silicona. D'aquesta manera si immediatament després d'aplicar una capa d'aquesta pintura s'hi afegia arena de textura fina, aquesta quedava enganxada i formava un substrat molt homogeni i adequat per als *H. exocellata*. A més a més, en ser una pintura dissenyada per evitar goteres, és molt resistent a l'aigua, fet que també ens interessa en el nostre muntatge. Un cop seca la pintura, l'arena queda enganxada i l'aigua no la pot arrossegar. Partint d'aquestes innovacions comunes, es van plantejar 4 dissenys.

El **primer disseny** consisteix en una planxa de poliestirè extruït acanalat (Figura Annex 5) recoberta de sorra enganxada amb pintura de silicona, com hem explicat anteriorment. Aquesta planxa, de la mateixa amplada que la safata i de 35 cm de llargada, s'acobla a la safata amb els canals cara amunt i se segellen tots els laterals amb cinta americana, per evitar el pas de l'aigua a la part inferior de la planxa i que aquesta floti. La planxa es troba acoblada a la safata per tres costats: els dos laterals i la part anterior, on comença el flux d'aigua. La part posterior es troba limitada per una malla que permet el pas de l'aigua però no dels insectes, ja que té 1,2 mm de porus. D'aquesta manera queda un reservori d'aigua a la zona de la safata que no queda coberta per planxa, on es troba la bomba que fa circular l'aigua. (**Figura Annex 6**)

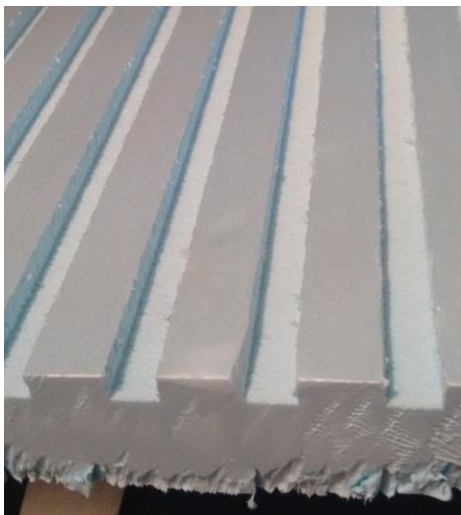


Figura Annex 5. Planxa de poliestirè extruït acanalat. Els canals que s'observen venen de fàbrica i la secció té una amplada d'1 cm i una alçada de 5 mm.

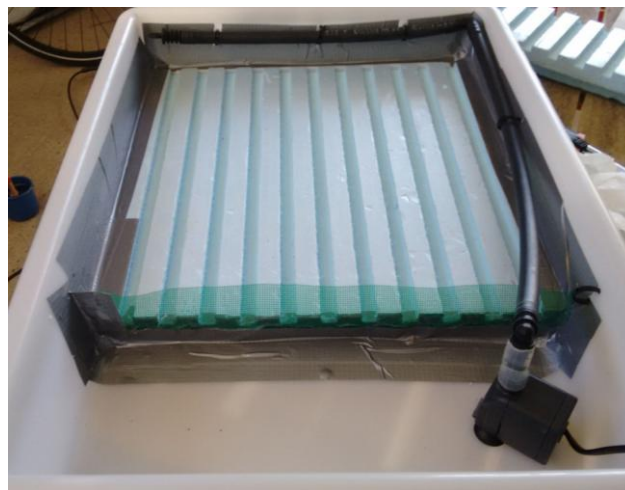


Figura Annex 6. Disseny amb superfície acanalada cara amunt. Fotografia feta abans del recobriment amb la pintura de silicona i arena.

El **segon disseny** es basa en una planxa de poliestirè extruït acanalat, com en el disseny anterior. La diferència és que es troba orientada cap per avall, amb els canals en contacte al terra de la safata (Figura Annex 7). Per tal de mantenir-ho enfonsat s'hi col·loca un pes a sobre, sempre procurant que la superfície del pes no estigui en contacte amb l'aigua, ja que els *Hydropsyche* podrien colonitzar-lo i no és el que ens interessa. Per evitar-ho es van clavar escuradents al poliestirè, per així mantenir el pes per sobre la superfície de l'aigua (Figura Annex 8). Com en l'anterior, la cara dels canals es va recobrir amb arena. La planxa de poliestirè és més curta en aquest cas, ja que si arribés fins a la part anterior l'aigua lliscaria per sobre la superfície i no es crearia un flux per sota, que és on es troben els insectes.

Aquest disseny ofereix un refugi més còmode per als *H. exocellata*, l'inconvenient és que si les xarxes es teixeixen utilitzant el terra de la safata com a punt de suport en aixecar les planxes per observar-les aquestes es trenquen i no les podem estudiar. Tot i així existeix la possibilitat que només utilitzin el substrat de la planxa com a suport de les xarxes, en aquest cas el disseny seria òptim tant en comoditat dels *Hydropsyche* com en facilitat d'observació.

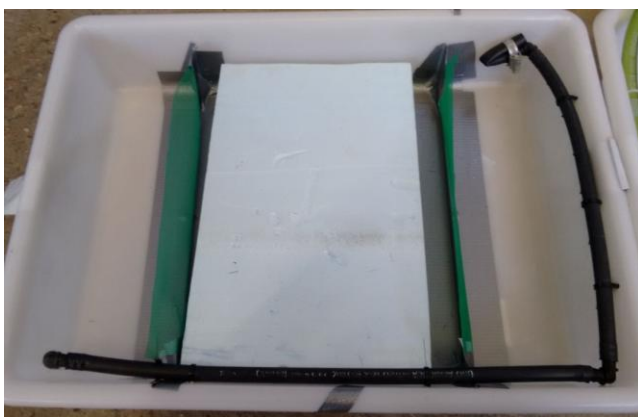


Figura Annex 7. Disseny de la superfície acanalada cara avall. Fotografia amb el muntatge sense la bomba que fa circular l'aigua ni el pes que manté la planxa enfonsada.

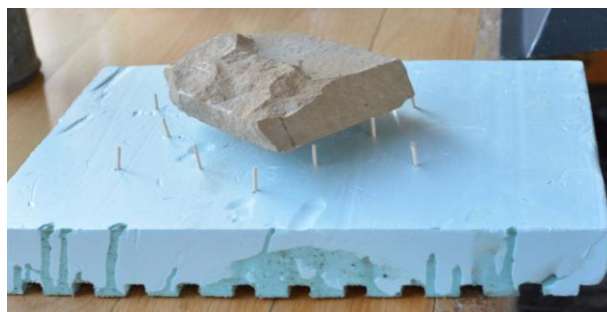


Figura Annex 8. El pes, aïllat de l'aigua pels escuradents, manté la planxa enfonsada i evita que floti en l'aigua.

El **tercer disseny** té el mateix fonament que l'anterior, però en comptes d'utilitzar una planxa de poliestirè acanalada, se n'utilitza una de llisa, també cara avall com l'anterior. Per tal de deixar una mica d'espai entre la base inferior de la planxa i la safata es van clavar cinc xinxetes de cap rodó (Figura Annex 9), quatre als vèrtexs i una al mig. Aquest muntatge no és gaire prometedor en el sentit de que no ofereix als insectes gaires punts de suport per teixir les xarxes, però resulta ser un disseny de fàcil construcció i ofereix un bon refugi als *Hydropsyche*. Com l'anterior, també necessita un pes a sobre per mantenir-lo enfonsat.



Figura Annex 9. Les xinxetes clàssiques (o de cap rodó) permeten mantenir un petit espai de pocs mil·límetres entre la planxa de poliestirè i la base de la safata. Se'n van utilitzar un total de cinc.

Finalment, el **quart disseny** consisteix en una superfície plana acoblada a tres costats de la safata. Com en el primer disseny, tenim una xarxa que evita que els insectes s'escapin i la superfície també està recoberta d'arena. En aquest cas, els punts de suport per teixir les xarxes són uns escuradents clavats a la superfície del poliestirè. Com que no sabem quina és la separació òptima entre escuradents, ni la disposició, ni la inclinació d'aquests; s'han provat diferents disposicions (Figura Annex 10). Aquest sistema ofereix poc refugi als insectes, però en canvi proporciona una gran comoditat a l'hora de fotografiar les xarxes que aquests teixeixin.



Figura Annex 10. Muntatge complet del disseny amb superfície llisa cara amunt i escuradents com a punts de suport. Es van provar diferents disposicions per veure quina oferia millors resultats. En la fotografia es pot observar el sistema en funcionament amb els *H. exocellata*.

Es van deixar els quatre models en funcionament amb els *Hydropsyche* durant un dia sencer i l'endemà es van observar els resultats. Els dos dissenys que funcionaven cara avall (segon i tercer) van resultar uns bons habitats per als insectes, però aquests van teixir molt poques xarxes i aquestes estaven molt acoblades a la superfície, de manera que costava molt obtenir bones fotografies. El primer disseny, superfície acanalada cara amunt, va resultar oferir més xarxes que els anteriors, però molts individus no van sobreviure. El millor resultat es va obtenir amb el quart disseny, superfície llisa cara amunt amb escuradents. Els insectes van teixir nombroses xarxes que a més a més eren fàcilment fotografiables (Figura Annex 11).

De les diferents disposicions dels escuradents, la que va obtenir millors resultats tan en quantitat de xarxes com en comoditat de fotografia va ser la disposició en forma de quadrícula amb una separació de 1 cm entre cada escuradent. A partir d'aquí es va dissenyar el muntatge definitiu.



Figura Annex 11. Detall d'un *Hydropsyche exocellata* amb una xarxa teixida a la vora. Fotografia del muntatge de superfície llisa cara amunt amb escuradents.