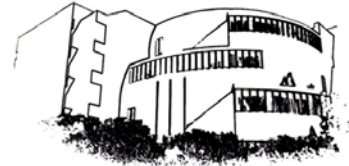




UNIVERSITAT DE
BARCELONA



Facultat de Biologia

COMUNITATS DE QUIRONÒMIDS D'ALTA MUNTANYA: APLICACIONS FRONT EL CANVI CLIMÀTIC

Marina Gil Barba

Grau de Biologia

Departament de Biologia Evolutiva, Ecologia i Ciències Ambientals

Narcís Prat Fornells & Carlos Raúl Acosta Rivas

11/11/2020



Abstract

Chironomid communities from high mountain streams and glacial-fed streams are a fundamental part of fluvial ecosystems and they take special interest facing the Global Change. Therefore, the principal aim of this study is to ascertain the possible applications of these communities in the face of climate change. To achieve it, samples from 2 high mountain streams were collected, both from the Pyrenees, one was glacial influenced (Vallibierna, GL13, Lleida) and the other wasn't (Molleres, GL11, Huesca). The samples were from chironomid pupal exuviae and environmental data. Species from both streams were identified and along with the environmental data, the statistical analysis was done. Comparison between the streams was made and the key species according their risk in front of climate change were fixed. Species from montane but not glacial habitats were registered in the stream without glacial influence (GL11), in addition to wide distribution species, such as *Parametriocnemus stylatus* and *Synorthocladius semivirens*, respectively. Environmental data that best explained the presence of these species were high conductivities and lower IHF values. In glacial-influenced stream, GL13, species from high mountain and glacial streams were identified such as *Borehoeptagya legeri*, *Parametriocnemus boreoalpinus* and *Paratrichocladius skirwithensis*. Environmental data that best explained their presence were low conductivities and higher IHF values. Moreover, beta and gamma diversity were higher when the stream was under glacial influence. All these results, in their majority, agree with the stated differences between glacial and non-glacial streams. Both streams were analysed and finally it was proved that their chironomid communities were different. The Vallibierna (GL13) stream is a priority from the point of view of conservation due to the sensible and limited-distribution species that belong to it, in contraposition with Molleres (GL11). Less abundant species were decisive to choose which stream was a priority. Therefore, the chironomid communities from high mountain streams can be applied in the face of climate change as indicators of fluvial habitats, dealing with some limitations according to the experimental method used.

Keywords: climate change, chironomid communities, glacier-fed streams, high altitude streams, Pyrenees, conservation

Resumen

Las comunidades de quironómidos de alta montaña i de ambientes glaciares son una parte fundamental de los ecosistemas fluviales i cogen un interés especial de cara al cambio climático. Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio es comprobar las posibles aplicaciones de estas comunidades frente al cambio climático. Para conseguirlo se recogieron muestras de exúvias pupales de quironómidos i medidas de las variables ambientales de dos torrentes de alta montaña de los Pirineos, uno con influencia glaciar (Vallibierna, GL13, Huesca) y el otro no (Molleres, GL11, Lleida). Se identificaron las especies de cada uno y juntamente con los datos ambientales se realizó el análisis estadístico. Se compararon los dos torrentes y se identificaron las especies clave según su riesgo frente al cambio climático. En el torrente sin influencia glaciar (GL11) se registraron especies de hábitats montanos, pero no glaciares, además de otras especies de amplia distribución como *Parametriocnemus stylatus* y *Synorthocladius semivirens*, respectivamente. Las variables ambientales que mejor explicaban la presencia de especies fueron la conductividad elevada y valores más bajos de IHF. En el torrente con influencia glaciar (GL13) se encontraron especies propias de torrentes glaciares y de alta montaña como *Borehoeptagya legeri*, *Parametriocnemus boreoalpinus* y *Paratrachocladius skirwithensis*. Las variables ambientales que mejor explicaban su presencia fueron conductividades más bajas y valores de IHF más elevados. Además, las diversidades beta y gamma salieron más elevadas cuando el torrente estaba bajo influencia glaciar. Los resultados, en su mayoría, concuerdan preliminarmente con las diferencias entre torrentes con y sin influencia glaciar. Se comprobó que las comunidades de quironómidos los dos torrentes eran diferentes. Los resultados sugieren que el Vallibierna (GL13) es un torrente prioritario desde el punto de vista de la conservación ya que tiene unas especies más sensibles y de distribución más limitada que el Molleres (GL11). Las especies menos abundantes fueron decisivas a la hora de escoger qué torrente era prioritario. Por tanto, las comunidades de quironómidos de alta montaña se pueden aplicar frente el cambio climático como indicadores de los hábitats fluviales, con ciertas limitaciones según el método experimental que se utilice.

Palabras clave: cambio climático, comunidades de quironómidos, torrentes con influencia glaciar, torrentes de alta montaña, Pirineos, conservación

Resum

Les comunitats de quironòmids d'alta muntanya i d'ambients glaciaris són una part fonamental dels ecosistemes fluvials i prenen un especial interès de cara al canvi climàtic. Per tant, l'objectiu principal d'aquest estudi és comprovar les possibles aplicacions d'aquestes comunitats front el canvi climàtic. Per aconseguir-ho es van recollir mostres d'exúvies pupals de quironòmids i dades de les variables ambientals de dos torrents d'alta muntanya dels Pirineus, un amb influència glaciària (Vallibierna, GL13, Osca) i l'altre no (Molleres, GL11, Lleida). Es van identificar les espècies de cadascun i juntament amb les dades ambientals, es va realitzar l'anàlisi estadístic. Es van comparar els dos torrents i es van identificar les espècies clau segons el seu risc front el canvi climàtic. Al torrent sense influència glaciària (GL11) van registrar-se espècies d'hàbitats montans però no glaciaris, a més d'altres espècies d'àmplia distribució, com *Parametriocnemus stylatus* i *Synorthocladius semivirens*, respectivament. Les variables ambientals que millor explicaven la presència d'espècies van ser la conductivitat elevada i valors més baixos d'IHF. Al torrent amb influència glaciària (GL13) es van trobar espècies pròpies de torrents glaciaris i d'alta muntanya com *Borehoeptagya legeri*, *Parametriocnemus boreoalpinus* i *Paratrachocladius skirwithensis*. Les variables ambientals que millor explicaven la seva presència van ser conductivitats més baixes i valors d'IHF més elevats. A més, les diversitats beta i gamma van sortir més elevades quan el torrent estava sota influència glaciària. Els resultats, en la seva majoria, concorden preliminarment amb les diferències entre torrents amb i sense influència glaciària. Es va comprovar que les comunitats de quironòmids dels dos torrents eren diferents i suggereixen que el Vallibierna (GL13) és un torrent prioritari des del punt de vista de la conservació ja que té unes espècies més sensibles i de distribució més limitada que el Molleres (GL11). Les espècies menys abundants van ser decisives a l'hora d'escollir quin torrent era prioritari. Per tant, les comunitats de quironòmids d'alta muntanya es poden aplicar front el canvi climàtic com indicadors dels hàbitats fluvials, amb certes limitacions segons el mètode experimental que s'utilitzi.

Paraules clau: canvi climàtic, comunitats de quironòmids, torrents amb influència glaciària, torrents d'alta muntanya, Pirineus, conservació

ODS: Identificació i reflexió sobre els objectius pel desenvolupament sostenible

Títol: Comunitats de quironòmids d'alta muntanya: aplicacions front el canvi climàtic.

En aquest cas s'estudien les comunitats de quironòmids dels torrents d'alta muntanya, el motiu principal és la relació que aquestes comunitats tenen amb l'ambient on viuen, el que permet aplicar-les en el seguiment dels efectes del canvi climàtic en els seus hàbitats. Per tant, l'estudi d'aquestes comunitats es pot fer servir com una eina de cara al control i gestió dels recursos per la conservació del medi natural.

El canvi climàtic és problema global que afecta a totes les escales, promogut per l'augment dels gasos d'efecte hivernacle provinents de l'activitat antròpica, es produeix un augment de la temperatura global. Això provoca uns efectes en cascada, entre d'altres, l'augment de la temperatura oceànica, l'augment del nivell del mar pel desglaç dels cossos de gel terrestres i augment en freqüència i intensitat d'esdeveniments climàtics extrems. L'efecte principal que antany aquest treball és la retracció dels glaciars i la pèrdua de la cobertura de neu dels massissos muntanyosos. Des de fa 150 anys els glaciars estan patint una retracció no natural deguda a l'augment de temperatures i que des de fa unes dècades s'ha accelerat.

Aquest treball pretén estudiar les comunitats de quironòmids de dos torrents d'alta muntanya dels Pirineus, un amb influència glacial (GL13, Vallibierna) i l'altre no (GL11, Molleres), mitjançant les exúvies pupals, per establir diferències que permetin escollir, en cas de necessitat, quin dels dos torrents seria necessari conservar amb més prioritat.

Els resultats indiquen que els dos torrents són diferents pel que fa a les seves comunitats de quironòmids, i que seria prioritària la conservació del torrent GL13 (influenciat pel glacial) per la presència d'espècies de distribució limitada, especialistes de l'habitat alpi i de zones de geleres. De totes maneres, els resultats són preliminars i es necessita la millora de les limitacions associades a la metodologia: l'ús d'exúvies com a mostra biològica i la comparació de només dos torrents. La projecció futura a gran escala d'una proposta com la del treball, portaria a un coneixement i una gestió dels ecosistemes amb influència glacial a tot el Pirineu.

El treball s'ha realitzat a la Universitat de Barcelona en col·laboració amb el grup d'investigació FEHM ("Freshwater, Ecology, Hydrology & Management"), específicament en el projecte GLOBIOS. Aquest projecte és internacional i pretén fer ús de l'estudi les comunitats de macroinvertebrats d'alta muntanya front el canvi climàtic per fomentar la seva conservació.

Tenint en compte tot l'esmentat, es considera que els ODS tractats en aquest treball pertanyen al grup del Planeta, específicament al OD 13 "Prendre acció urgent per combatre els efectes

i impactes del canvi climàtic", i al OD 15 "Gestionar de manera sostenible els boscos, combatre la desertificació, aturar i revertir la degradació de les terres i aturar la pèrdua de biodiversitat". En els objectius particulars de cada OD, el treball, si arribés a ser a gran escala, aplicaria per l'objectiu 13.2 "Integrar les mesures de canvi climàtic en les polítiques, estratègies i planificació nacionals" i per l'objectiu 13.3 "Millorar l'educació, la sensibilització i la capacitat humana i institucional sobre mitigació del canvi climàtic, adaptació, reducció d'impacte i alerta precoç". A més, directament aplicable al treball és l'objectiu 15.1 "Per 2020, l'assegurament de la conservació, la restauració i l'ús sostenible dels ecosistemes d'aigua dolça terrestre i d'interior i dels seus serveis, en particular boscos, zones humides, muntanyes i zones seques, d'acord amb les obligacions dels acords internacionals" i l'objectiu 15.4 "Per al 2030, assegurament de la conservació dels ecosistemes de muntanya, inclosa la seva biodiversitat, per millorar la seva capacitat per proporcionar beneficis essencials per al desenvolupament sostenible".

Adaptació del TFG al confinament del COVID-19

Inicialment aquest TFG s'anava a fer amb les larves de quironòmids d'alta muntanya enlloc de les exúvies pupals, però degut a la falta de temps per fer el pràcticum II, es va optar per les exúvies, gràcies als avantatges metodològics a l'hora de fer les preparacions microscòpiques. En cas d'haver-ho fet amb larves no s'hagués pogut arribar, segurament, a uns resultats. La preparació de larves de quironòmids és més lenta i difícil perquè s'han de separar les càpsules cefàliques de la resta del cos de la larva (que s'utilitza per estudis genètics), posteriorment s'han de digerir els teixits interns de la càpsula cefàlica amb potassa i finalment s'ha de fer la deshidratació de les càpsules. A més, els caps de les larves són molt petits i més difícils de manipular per muntar-los en el medi Euparal, cosa que també necessita més temps. En canvi, les exúvies són més ràpides i més fàcils de preparar ja que no s'ha de fer cap digestió ni separació de parts corporals i la seva identificació arriba, normalment, a nivell d'espècie.

Pel mateix motiu, en un principi enlloc de comparar-se només dos torrents d'alta muntanya, es volien comparar un mínim de tres torrents.

També es va plantejar, si donava temps, de comparar els resultats de les exúvies amb els obtinguts de les larves pels mateixos torrents, però tampoc va ser possible, tot i que seria molt interessant per contrastar els forats informatius dels resultats, provinents de només treballar amb les larves.

Índex

Introducció	1
Context general i marc teòric	1
Comunitats de macroinvertebrats d'alta muntanya: quironòmids	3
Plantejament experimental	6
Objectius	7
Mètodes	8
Àrea d'estudi	8
Treball de camp: Mostreig	9
Treball de laboratori	10
Tractament i anàlisi de dades	11
Resultats	13
Discussió	21
Conclusions	25
Referències bibliogràfiques	26
Annexos	29

Introducció

Context general i marc teòric

Actualment vivim a un època en que el planeta està sota l'ombra del canvi climàtic (Annex 1), tema avantguardista per ser uns dels principals reptes al que s'enfronta la societat humana el segle XXI i un dels temes que més preocupa a la comunitat científica. Aquest Treball de Fi de Grau (TFG) s'ha realitzat dintre del projecte GLOBIOS del grup de recerca "Freshwater Ecology, Hydrology & Management" (FEHM) de la Universitat de Barcelona. El projecte GLOBIOS pretén estudiar els invertebrats dels torrents d'alta muntanya (quironòmids i tricòpters, especialment) per poder conèixer els efectes que el canvi climàtic pot exercir sobre ells i així, poder prendre mesures tant preventives com de restauració i conservació. És un projecte d'envergadura internacional, incloent mostres en: els Andes (Perú), Talamanca (Costa Rica), els Alps (Àustria) i Pirineus (Espanya). Els seus principals objectius són:

- a) Realitzar una caracterització genètica, taxonòmica i de diversitat funcional de les comunitats d'invertebrats aquàtics.
- b) Identificar les espècies potencialment vulnerables al canvi climàtic.
- c) Predir canvis en els patrons de distribució de les espècies vulnerables deguts al canvi climàtic.
- d) Identificar les zones actuals i futures prioritàries per la seva conservació degudes al seu interès taxonòmic i la pèrdua de diversitat funcional i genètica que comportaria la seva desaparició.

Per tant, aquest TFG està enfocat en les comunitats de macroinvertebrats (en aquesta cas els quironòmids) dels rius d'alta muntanya dels Pirineus, molts d'ells sota influència glacial, i els perills que corren sota l'efecte del canvi climàtic.

Una de les conseqüències del Canvi Climàtic és la retracció de les glaceres i per tant la destrucció de l'hàbitat (Annex 2) i la modificació dels ecosistemes fluvials que se'n deriven (Annex 3), que pot arribar a la seva desaparició. Els glaciers dels Pirineus, degut a la seva mida relativament petita, poden ser un dels llocs a on el glaç i els seus ecosistemes associats desapareguin més ràpidament. Els estudis sobre els glaciers Pirinenc són més freqüents des de les últimes dècades precisament perquè pot estar propera la seva desaparició (Grima & Campos, 2020).

Actualment, els Pirineus són l'única cadena muntanyosa espanyola que conserva glaciars actius, i els únics massissos on es poden trobar són: Aneto-Maldeta, Monte Perdido, Picos del Infierno i Posets, que pertanyen a les conques dels rius Gállego, Cinca, Ésera-Garona i Noguera Ribagorçana. A principis del segle XX, aquests glaciars tenien una extensió de 3.330ha però actualment no arriben a les 400ha, on aproximadament 206ha són dels Pirineus espanyols. L'origen d'aquests glaciars és a les grans glaciacions quaternàries, específicament a l'última, Würm. Abans de la Petita Edat de Gel (PEG, segles XIV-XIX) havien patit una retracció natural, lenta i gradual (Arenillas *et al.*, 2008). Però és a partir dels últims 100-150 anys i especialment les últimes dècades quan pateixen una gran retracció que no s'explica per causes naturals i que probablement és causada per les emissions de gasos d'efecte hivernacle derivats de l'acció antròpica (Solomina *et al.*, 2016), que provoquen un augment de la temperatura. Les cotes dels glaciars pirinencs han pujat des de la PEG, per exemple, la del Maladeta ha pujat de 2840m (1830) a 3000m (2005). Si la tendència continua molts glaciars dels massissos pirinencs s'extingiran en menys d'un segle (cas del Posets, que per mitjans del segle XXI la seva cota glaciària pujarà a 3100m, on arriben els pics més alts d'aquest massís) (Ieltxu, 2019).

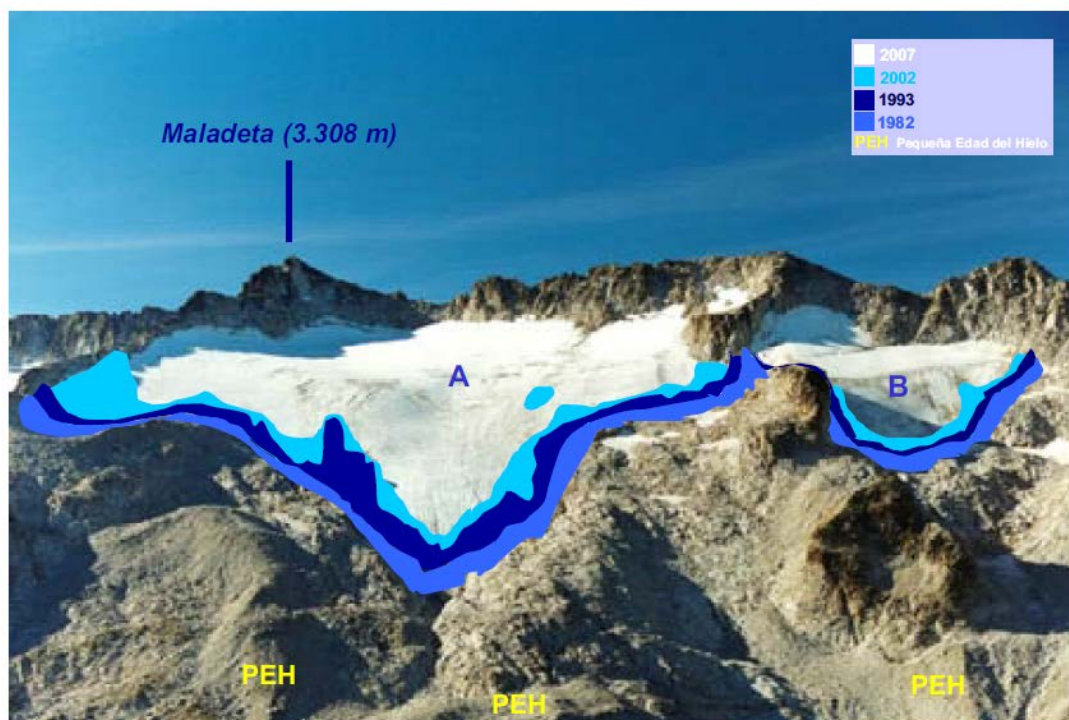


Figura 1. Imatge de la retracció glaciària del massís Maladeta des del 1982 al 2007. Extret de Arenillas *et al.* (2008), Programa EHRIN.

Comunitats de macroinvertebrats d'alta muntanya: Quironòmids

Per veure els possibles efectes de la retracció dels glaciers dels Pirineus, el projecte GLOBIOS ha escollit els quironòmids com a grup que pot ser indicador dels canvis provocats per la desaparició de les glaceres. Els quironòmids (Chironomidae) són una família d'artròpodes del subordre Nematocera, ordre Diptera. Conté 11 subfamílies, 4 de les quals són les que interessen des del punt de vista d'aquest treball: Tanypodinae, Diamesinae, Orthocladiinae i Chironominae. Aquesta última té dos tribus: Tanytarsini i Chironomini. Comunament se'ls coneix com "non-biting midges", degut a que el seu aparell bucal no és xuclador, tot i ser Nematòcers. Són una família àmpliament diversificada i de distribució global (Puntí, 2007), que es troben a tots els continents del món i dels que se'n coenixen fins a 4147 espècies a tot el món (Leonard & Ferrington, 2007; Prat *et al.* 2016). L'etapa larvària és majoritàriament aquàtica, encara que també hi ha algunes espècies que poden desenvolupar-se en ambients terrestres humits. Els quironòmids són coneguts per ser una part molt important de la biodiversitat dels sistemes fluvials arreu del món, formant unes comunitats molt importants des del punt de vista ecològic, de biodiversitat, de conservació i de restauració del medi on habiten. Tenen un cicle de vida holometàbol amb 4 estadis: ou, larva, pupa i adult (Figura 2) (Annex 4).

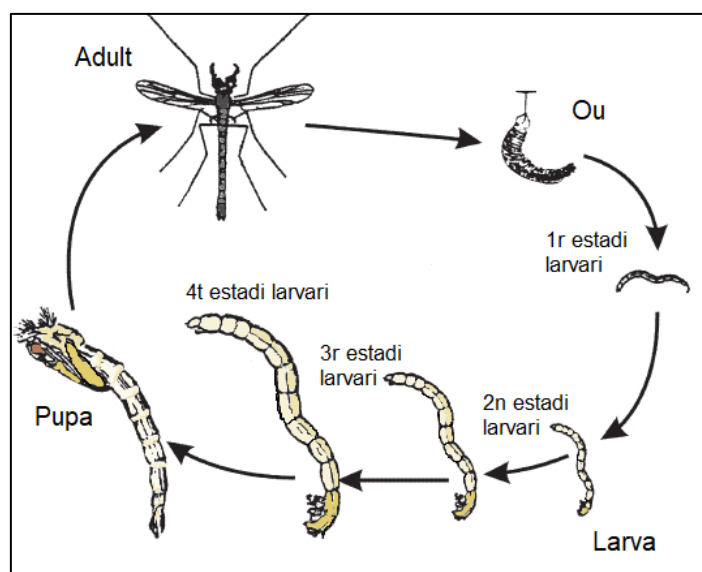


Figura 2. Esquema del cicle de vida de la família Chironomidae.

La majoria dels estudis realitzats amb quironòmids ho són utilitzant les larves o les exúvies de les pupes, cadascun dels dos mètodes aporta els seus beneficis però també comporta una sèrie d'inconvenients.

Les larves de quironòmids són molt útils a l'hora de fer estudis d'ecologia, ja que són les que resideixen en aquell ambient i el medi on es troben és perquè té les característiques

adients pel ser desenvolupament (els individus que es troben en un lloc és més probable que visquin allà i que no vinguin d'altres llocs). Per tant, permeten fer estudis ecològics, relacionant les variables ambientals amb la presència de certes espècies i la seva abundància, s'evita mostrejar espècies que no siguin de la zona que es vol estudiar i les abundàncies obtingudes no són tan dependents dels moments d'emergència (Puntí, 2007). A més, amb les larves es poden fer estudis genètics ja que conserven els teixits.

Per altra banda, les larves suposen un gran repte a l'hora de la seva classificació i identificació, tot i que hi ha diverses claus específiques (Prat & Rieradevall, 2014; Wiederholm 1983; Epler, 2001; Merrit & Cummins, 1984; Vallenduuk & Moller-Pillot, 2007). En molts casos no és possible arribar a nivell d'espècie i fins i tot a vegades es fa difícil arribar al gènere, per tant, els estudis realitzats amb larves no poden estar enfocats a la biodiversitat específica, ja que hi ha molta informació incompleta. Pels estudis ecològics (relacions tròfiques, biomonitoratge) passa una mica el mateix, ja que molts estan aplicats a nivell de subfamília, i es perd una gran quantitat d'informació, ja que a un riu podem trobar fins a 100 espècies, cadascuna amb les seves particulars preferències ecològiques (Prat *et al.*, 2016), però tot sovint amb la identificació no s'arriba a saber-ne realment quantes i quines espècies hi ha. A més, el procés de preparació de les larves és lent i laboriós, més que el de les exúvies. També hi ha problemes a l'hora de mostrejar ja que s'ha de posar èmfasi i atenció a tots els microhàbitats que hi hagin al riu (molses, roques, fusta, bales sense moviment, ràpids, etc.) ja que si no les mostres poden deixar de representar certes espècies que tenen una gran especialització del nínxol, com el cas del gènere *Eukieferiella* (Prat & García-Roger, 2018).

Les exúvies pupals provenen de la pell que es construeix per poder fer el pas de la larva al adult dins de l'aigua. Un cop l'adult emergeix, queden, normalment, flotant a la superfície pel que són fàcilment transportades riu avall. Les exúvies pupals de quironòmids són, normalment, més utilitzades que les larves a l'hora de fer estudis de biodiversitat degut a que la seva identificació és més fàcil, gràcies a que les claus existents (Hirvenoja, 1973; Green *et al.*, 1983; Langton, 1984; Prat *et al.*, 2014) que permeten la identificació fins a nivell d'espècie en la majoria de casos. Per tant, és molt fàcil caracteritzar les comunitats de quironòmids amb les exúvies ja que proporcionen molta informació sobre la composició específica (quines espècies hi ha) de la comunitat. A més, la seva preparació és més ràpida i senzilla que la de les larves. També s'utilitzen exúvies en estudis d'ecologia (Mestre *et al.*, 2018; Kranzfelder *et al.*, 2015), pels avantatges comentats. Tot i això, les exúvies comporten problemes a l'hora d'utilitzar-les per estudis d'ecologia, els resultats poden no ser acurats degut a diversos factors: el moment d'emergència i la recol·lecció d'espècies que no són d'aquell lloc puntual.

Quan es fa el mostreig, les exúvies que es recullen són d'aquelles espècies que han emergit aquell dia o inclús en aquell moment del dia, però pot ser que hi hagi larves al torrent que encara no han emergit i, per tant, allà hi ha espècies de les quals no es recullen exúvies i no consten al l'estudi (Annex 5). La mostra recollida seria aproximada pel que fa les espècies que habiten, i per aconseguir la mateixa exactitud que amb les larves durant un mostreig, s'haurien de fer diversos mostrejos per exúvies en dies i hores diferents (Luoto & Raunio, 2011), ja que l'emergència segueix patrons fenològics i circadians (Oliver, 1971). Quan es fa servir una xarxa de deriva interposada al corrent, les exúvies que floten i que el corrent les arrossega riu avall queden retingudes. Això comporta que, les exúvies que s'han recol·lectat, puguin pertànyer a una zona de més amunt del torrent que s'està estudiant i que hagin sigut arrossegades fins al punt de mostreig actual. Un altre factor que influeix és que les exúvies vinguin d'algun torrent tributari que ha confluït més amunt del punt on es fa el mostreig. A més, poden haver mostrejos amb molt poques exúvies, degut barreres físiques al llit del riu, tal com dics (tant artificials com naturals) que les retinguin, o que el torrent es bifurqui i gran part de les exúvies es perdin. Existeixen estudis que proposen treballar amb mostrejos complementaris de larves i d'exúvies pupals, com per exemple Prat *et al.* (2016) i Luoto & Raunio (2011), podent exprimir al màxim els beneficis d'ambdós mètodes.

Les comunitats de quironòmids dels rius influenciats per glaciers han estat estudiades en diverses parts del món (Lods-Crozet *et al.* (2001a); Milner *et al.*, 2002; ILG & Castella, 2006; Hamerlík & Jacobsen, 2012; Milner *et al.*, 2016; Khamis *et al.* 2016; Lencioni, 2018), amb resultats contraposats en moltes ocasions. En general, a les capçaleres dels glaciers acostuma a haver-hi espècies del gènere *Diamesa* (subfamília Diamesinae), que solen ser de distribució glaciària i alpina. Conforme s'avança riu avall apareixen individus de la subfamília Orthoclaadiinae adaptats a aquests hàbitats com *Eukieferiella brevicar*, *Parametriocnemus boreoalpinus* i *Paratrachocladus skirwithensis*. Finalment, en el tram més baix comencen a haver-hi individus de la subfamília Chironominae com *Micropsectra atrofasciata*. Les variables ambientals que millor expliquen aquesta distribució són la temperatura, distància al glaciària, profunditat, heterogeneïtat del llit, clorofil·la *a* i la pendent. En general, la densitat de la subfamília Diamesinae segueix una relació unimodal amb la temperatura amb un pic intermig a ~8°C, per Orthoclaadiinae la relació és redundant amb màxim entre 10 i 14°C, tot i que es troba que els gèneres *Orthocladus*, *Tvetenia* i *Eukieferiella* també són capaços de colonitzar els punts més propers al glaciària. Pel que fa a l'heterogeneïtat del llit es troba la mateixa funció unimodal per Diamesinae, però menys accentuada que per la temperatura (és a dir, hi ha un pic intermig però la densitat no varia gaire ni a heterogeneïtats altes ni baixes), i per Orthoclaadiinae hi ha una relació lineal negativa, més heterogeneïtat, menys densitat.

Pel que fa a la diversitat, es pot calcular per un conjunt de mostres, la diversitat alfa, beta i gamma. La diversitat alfa és la diversitat local d'un tram particular; la beta és la diversitat que hi ha entre diferents trams, pot anomenar-se la taxa de reemplaçament d'espècies entre els trams que formen un torrent; i la gamma és la diversitat regional, en aquest cas la de tot un torrent (Moreno, 2001). Si es comparen torrents amb i sense influència glaciària per la densitat i la mitjana de tàxons de quironòmids trobats, mostren valors més elevats en torrents sense influència glaciària; la alfa-diversitat és més elevada a llocs sense influència glaciària (Brown *et al.*, 2007). La beta-diversitat és més elevada als torrents amb influència glaciària i també la gamma-diversitat, però no de forma tan acusada (Hamerlík & Jacobsen, 2012). Aquestes diferències entre la alfa i beta-diversitat proposen que a mesura que la pèrdua de massa glaciària sigui més evident, hi pot haver un augment d'alfa-diversitat i una disminució de beta-diversitat en els torrents influenciats pels glaciers. L'alfa-diversitat augmentaria per una colonització d'espècies pròpies de riu avall i la beta-diversitat disminuiria degut a una pèrdua de l'heterogeneïtat del llit (Hamerlík & Jacobsen, 2012; Lods-Crozet *et al.* (2001a); Khamis *et al.*, 2016; ILG & Castella, 2006), ja que és un factor que permet l'establiment de microhàbitats per ser colonitzats per diferents espècies.

Plantejament experimental

Pel plantejament experimental del TFG, primer s'han seleccionat dos torrents d'alta muntanya, un amb influència glaciària i un sense, segon s'han fet els mostrejos al camp per obtenir les dades ambientals i les dades biològiques (en aquest cas s'ha treballat amb les exúvies dels quironòmids) dels dos torrents, tercer s'han classificat i identificat al laboratori els individus mostrejats, utilitzant tècniques macroscòpiques i microscòpiques, quart s'han comparat les comunitats de quironòmids dels dos rius, identificant les espècies amb més interès de conservació per així finalment poder arribar als objectius del TFG.

Objectius

L'objectiu general d'aquest TFG és estudiar les comunitats de quironòmids de rius d'alta muntanya amb influència glaciària i les possibles aplicacions que tenen front el canvi climàtic.

Per poder assolir l'objectiu general, s'han establert els següents objectius específics:

1. Conèixer la morfologia i la taxonomia dels quironòmids.
2. Comparar les comunitats de quironòmids de dos torrents d'alta muntanya, un amb influència glaciària i l'altre no, identificant les espècies amb més interès de conservació per la seva especificitat a aquest hàbitat i el seu risc elevat front el canvi climàtic.
3. Determinar a quin dels dos torrents seria prioritari a l'hora d'aplicar tècniques de conservació per preservar la fauna pròpia de rius d'alta muntanya amb influència glaciària.

Metodologia

Àrea d'estudi

La localització de l'estudi va ser en els Pirineus (Figura 3), a les comunitats autònomes de Catalunya i Aragó. Es van estudiar dos torrents d'origen glacià: el GL11 (Molleres, conca del riu Noguera Ribagorçana) situat en l'Alta Ribagorça (sense àrea protegida) a la província de Lleida, Catalunya; i el GL13 (Vallibierna, conca del riu Ésera) situat en La Ribagorça (àrea protegida de Posets-Maladeta) a la província d'Osca, Aragó. Tot i que l'origen d'ambdós rius és glacià, el GL13 conserva influència del glacià i el GL11 no. La distància entre els torrents és de 11,08km.

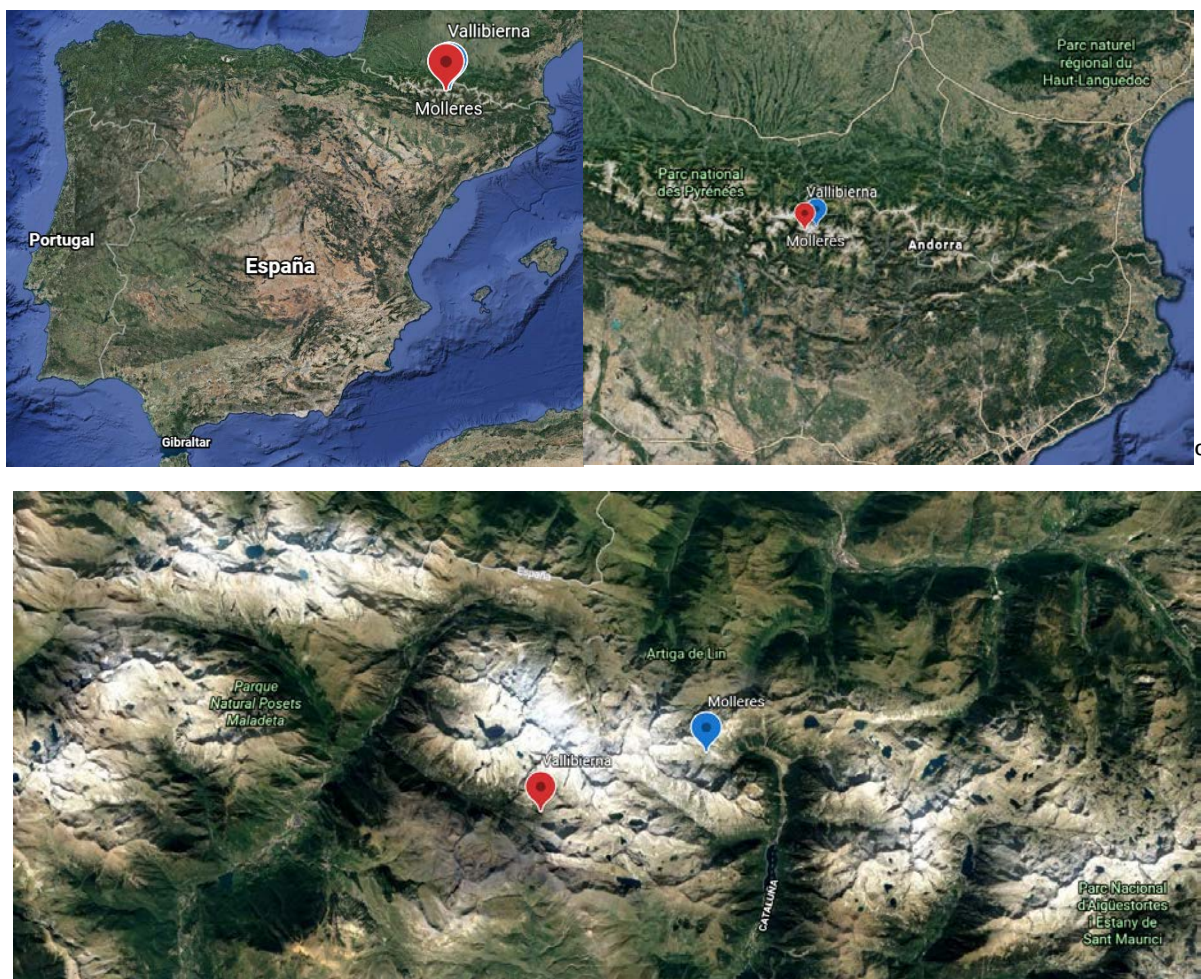


Figura 3. Localització geogràfica de l'àrea d'estudi.

En cada torrent es van escollir 3 punts de mostreig en trams de 100m de longitud (Figura 4). El punt 1 de cada torrent és el de més altitud i ubicat el més a prop possible del seu naixement, els punts 2 i 3 són torrent avall després de la confluència de dos afluents, respectivament.

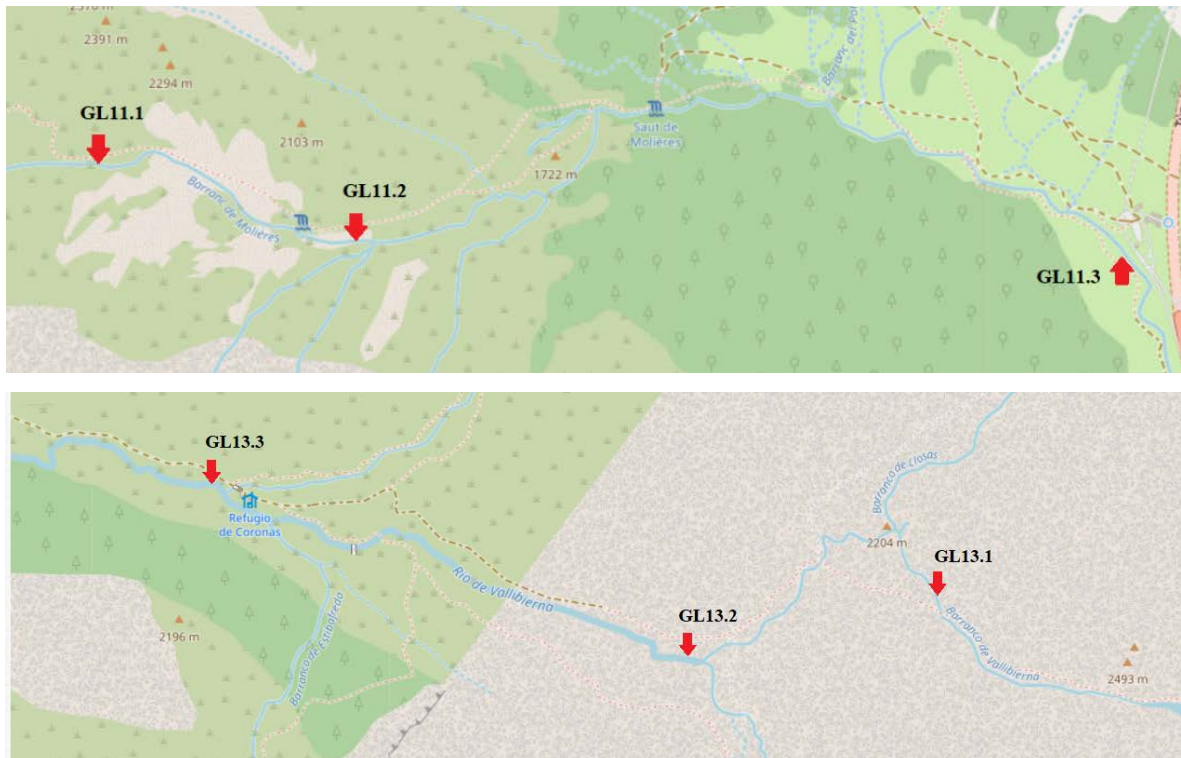


Figura 4. Ubicació dels 3 punts de cada torrent, GL11 (a dalt) i GL13 (a sota).

Els punts de GL11 (GL11.1, 2, i 3) es troben a les següents altituds, respectivament: 2033m, 1819m i 1606m; i els de GL13 a 2277m, 2182m i 2007m. Les distàncies entre trams per GL11 son: 778m (GL11.1-2), 2270 (GL11.2-3) i 2951 (GL11.1-3); i les de GL13 son de 810m (GL13.1-2), 1572m (GL13.2-3) i 2286m (GL13.1-3) (Annex 6).

El primer i segon punt de GL11 es troben per sobre de la línia d'arbres i el tercer per sota (Annex 7). El primer punt de GL13 esta per sobre de la línia d'arbres, el segon al límit de la línia i el tercer per sota (Annex 8). La cobertura vegetal és més densa a GL13 comparat amb els mateixos punts de GL11. Com els dos torrents estan geogràficament en la mateixa àrea, tenen condicions hidromorfològiques i ecològiques relativament semblants. Les diferències són que GL13 encara té influència glacial i es troba en un àrea protegida i GL11 no.

Treball de camp: Mostreig

Els mostrejos (imatges a Annex 9) es van portar a terme durant l'estiu del 2019, seguint el "GLOBIOS Sampling Protocol" (Annex 10). L'estratègia consistia en obtenir diferents conjunts de dades: d'una banda els descriptors ambientals, incloent les variables: geogràfiques (altitud, coordenades), hidromorfològiques i IHF, físico-químiques i biològiques (clorofil·les) i per l'altra banda els macroinvertebrats (larves i pupes de quironòmids en el

nostre cas). L'IHF (Annex 11) és un índex d'hàbitat fluvial, que té en compte factors com el grau d'inclusió dels còdols en el substrat, la freqüència de ràpids, la composició del substrat, el règim de velocitats de l'aigua, l'ombra del riu, elements aporten heterogeneïtat i la composició de la vegetació aquàtica. Valors més elevats indiquen una major qualitat de l'hàbitat fluvial, que es reflectirà en la comunitat de macroinvertebrats.

Per les dades hidromorfològiques, es va mesurar l'amplada (cm), la profunditat (cm), la pendent (%) i el cabal (cm/s). Pel que fa a les dades fisicoquímiques es va mesurar l'oxigen dissolt (mg/l), el pH, la conductivitat ($\mu\text{S/cm}$), la terbolesa (mg/l) i la temperatura puntual ($^{\circ}\text{C}$). També es va mesurar la temperatura de forma detallada ($^{\circ}\text{C}$) amb un mesurador en continu (HOBBO). A més, es va mesurar la clorofil·la a. Pel que fa als macroinvertebrats, per mostrejar les exúvies s'empra una xarxa de deriva (300 μm) (Figura 5) que es col·loca a l'inici de cada tram i es deixa durant una hora. Passat el temps es retira de l'aigua i la mostra sense netejar s'introdueix en un pot amb alcohol de 96°.



Figura 5. Xarxa de deriva.

Treball de laboratori

De cada riu hi havia 3 pots, un de cada tram, amb les exúvies de quironòmids. Primer s'havien de netejar ja que a la xarxa de deriva es queden moltes rames, pedres, etc, un cop netes les mostres, es posen en vials amb alcohol de 96°. Finalment teníem 3 vials de cada riu, un per tram. El tractament de les exúvies consisteix en 3 procediments:

- 1) Separació macroscòpica de gèneres i morfoespècies d'exúvies en vials amb la lupa binocular, utilitzant les claus de Green *et al.* (1983) i Langton (1984), i fer el recompte de l'abundància de cada vial.
- 2) Muntatge de les exúvies en preparacions microscòpiques. Per fer les preparacions es va seguir el "Protocol de muntatge de larves de Chironomidae" (Annex 12), però adaptat a les exúvies: com no tenen teixit intern, no cal fer la digestió amb potassa, ni

la separació de les càpsules cefàliques, ja que tampoc es fan estudis genètics. Llavors es deshidraten i es munten en posició dorsal en medi Euparal.

- 3) Anàlisi al microscopi de les preparacions. Identificació fins al nivell taxonòmic més baix, posant atenció a les morfologies característiques, com: òrgan respiratori, lòbuls anals, patrons als segments abdominals, etc. Utilització de les claus de Hirvenoja (1973), Green *et al.* (1983) i Langton (1984).

Imatges del treball de laboratori a l'Annex 13. Finalment es van obtenir les taules amb les dades de subfamílies, gèneres i espècies (i les seves abundàncies) trobats a cada tram de GL11 i GL13.

Tractament i anàlisi de dades

Primer es va fer una transformació per $\text{Log}(X+0)$ de les dades, tant de les abundàncies d'espècies com de les ambientals. Així s'aconsegueix esmorteir l'efecte de les dades extremes, disminuint el pes de les abundàncies molt altes i, per les dades ambientals, obtenir una magnitud en la que poder comparar-les, ja que, normalment, cada variable ambiental s'expressa en unitats diferents.

Per comprovar quins són els factors que provoquen les diferències en la distribució de les espècies entre els torrents es va realitzar un CCA (Canonical Correspondence Analysis), utilitzant el programa PAST, amb les dades ambientals i les abundàncies d'espècies. Aquest anàlisi permet ubicar els trams en un espai multidimensional segons l'abundància relativa de les espècies, i obtenir les variables que millor expliquen aquesta distribució. Prèviament, es va fer un anàlisi de correlacions amb el moment producte de Pearson amb STATGRAPHICS de totes les variables ambientals mesurades i es van eliminar les que sortien correlacionades, per evitar la redundància entre les dades. Per comprovar quines variables ambientals són significatives es va realitzar un test ANOVA, amb Kruskal-Wallis, ja que permet comparar si els torrents són iguals segons les variables ambientals. Les que surten significatives són les que realment tenen mitjanes estadísticament diferents entre els trams. Per les dades d'espècies es van excloure les espècies rares per evitar biaixos degut a la seva presència, poc representativa quantitativament (Annex 14).

Per establir si hi ha diferències entre els torrents pel que fa a la biodiversitat, es van calcular les diversitats alfa, beta i gamma. L'alfa-diversitat amb Shannon, fent la mitjana amb les alfa-diversitats de cada tram, la beta-diversitat entre els 3 trams de cada torrent, amb Whittaker, i la gamma-diversitat, amb Lande, utilitzant els resultats les alfa i beta-diversitats.

Per comprovar si les comunitats de quironòmids dels dos torrents son diferents es va realitzar un test One-way ANOSIM amb les abundàncies absolutes d'espècies dels 3 trams de cada riu, utilitzant el programa PRIMER 6.0, amb l'índex de similitud de Bray-Curtis com a mesura de similitud. Per representar gràficament les diferències entre les dues comunitats es va generar un MDS (Figura 7) amb PAST utilitzant l'índex de Bray-Curtis.

Per veure les similituds entre els trams de cada torrent es van fer dos clústers (Figura 8 i 9) amb el programa PRIMER 6.0: el primer amb totes les espècies registrades i utilitzant l'índex de presència/absència de Jaccard; i el segon exclouent les espècies rares i utilitzant l'índex de Bray-Curtis. Així, l'índex de Jaccard té en compte quantes espècies hi ha en cada tram i aporta informació de quins són els més semblants tenint en compte quantes espècies comparteixen, no utilitza abundàncies, només presència i absència. En canvi, l'índex de Bray-Curtis és un índex quantitatiu que té en compte les abundàncies relatives i absolutes.

Resultats

La Taula 1 mostra les variables ambientals no correlacionades que van ser seleccionades per realitzar el test ANOVA Krustal-Wallis entre els dos torrents, per les variables ambientals. Només s'han detectat diferències significatives ($p < 0,05$) entre la conductivitat i el IHF.

Taula 1. Anàlisi ANOVA Krustal-Wallis de les variables ambientals no correlacionades pels dos torrents ($p < 0,05$).

	GL11-GL13		
	H	p	Sig.
Pendent (%)	0,047	0,824	ns
Temperatura (°C)	0,428	0,51	ns
Conductivitat ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	3,857	0,046	*
Terbolesa (mg/L)	0,047	0,827	ns
MO Particulada (%)	0,047	0,872	ns
Profunditat (cm)	0,428	0,512	ns
Descàrrega (L/s)	0,428	0,512	ns
IHF	3,857	0,049	*
Substrat	1,714	0,184	ns
Cob. Vegetal aquàtica	0,761	0,345	ns

A la Taula 2 es sintetitzen els valors de les variables ambientals. La pendent és més acusada als primers punts. La temperatura no mostra cap patró clar. La conductivitat és clarament més elevada a GL11. La terbolesa és més elevada als dos primers punts de GL11 i molt més elevada a l'últim punt de GL13. La matèria orgànica particulada és més elevada als últims punts. La profunditat varia segons els punts. La descàrrega és, en general, més elevada a GL13. L'IHF, que és l'índex de qualitat d'hàbitat fluvial (inclou l'heterogeneïtat), és més elevat a GL13. Pel que fa l'equitat del substrat i de la cobertura vegetal aquàtica (components de l'heterogeneïtat), són més elevats a GL13. Com s'esperaria, l'heterogeneïtat és més elevada i la conductivitat més baixa a GL13, que encara té influència glaciària.

Taula 2. Dades ambientals, no correlacionades, utilitzades per fer el test Krustal-Wallis i el CCA.

	Pendent (%)	Temperatura (°C)	Conductivitat ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Terbolesa (mg/L)	MO Particulada (%)	Profunditat (cm)	Descàrrega (L/s)	IHF	Sustrat	Cob. Vegetal aquàtica
GL11.1	28	11,5	40,8	5,2	1,8	9,26	34,37	53	10	15
GL11.2	25	9,4	40,8	2,9	1,9	18,21	32,11	60	12	20
GL11.3	5	9,7	54,5	0,7	15,6	15,72	182,36	63	14	15
GL13.1	31	10,7	31,6	0,9	2,45	7,35	65,69	65	15	15
GL13.2	12	11,2	27,1	0,6	1,85	17,5	157,71	71	12	20
GL13.3	12	10,5	36,5	7,6	14,5	12	55,74	78	17	25

El CCA (Figura 6) il·lustra la situació dels trams segons la distribució de les espècies, que s'explica per les variables ambientals. S'han extret 5 axis, on cadascun explica el següent % de variació: 44.79, 23.89, 18.19, 9.21, 3.31. S'han utilitzat l'axis 1 i 2 que entre els dos expliquen el 68.68% de variació. Els resultats del CCA mostren com l'axis 2 separa els dos torrents (GL13 a la part negativa i GL11 a la part positiva) i l'axis 1 separa els últims punts

(GL11.3 i 13.3) dels dos primers. L'axis 2 està positivament correlacionat amb la conductivitat i negativament correlacionat amb el IHF (índex de qualitat de l'hàbitat fluvial, incloent l'heterogeneïtat). L'axis 1 està positivament correlacionat amb la concentració de matèria orgànica (MO) particulada i negativament correlacionat amb la pendent. Per tant, GL11 es caracteritza perquè té conductivitats més elevades (més concentració d'ions dissolts) i GL13 es caracteritza per tenir uns valors d'IHF més elevats que en GL11. Aquestes variables ambientals són les que millor expliquen les diferències en la composició d'espècies en els dos torrents. GL11.3 i GL13.3 se separen dels primers i segons punts per l'elevat percentatge de MO particulada. Els valors propis i variacions de cada axis i els pesos de cada variable per axis es presenten a la Taula 3.

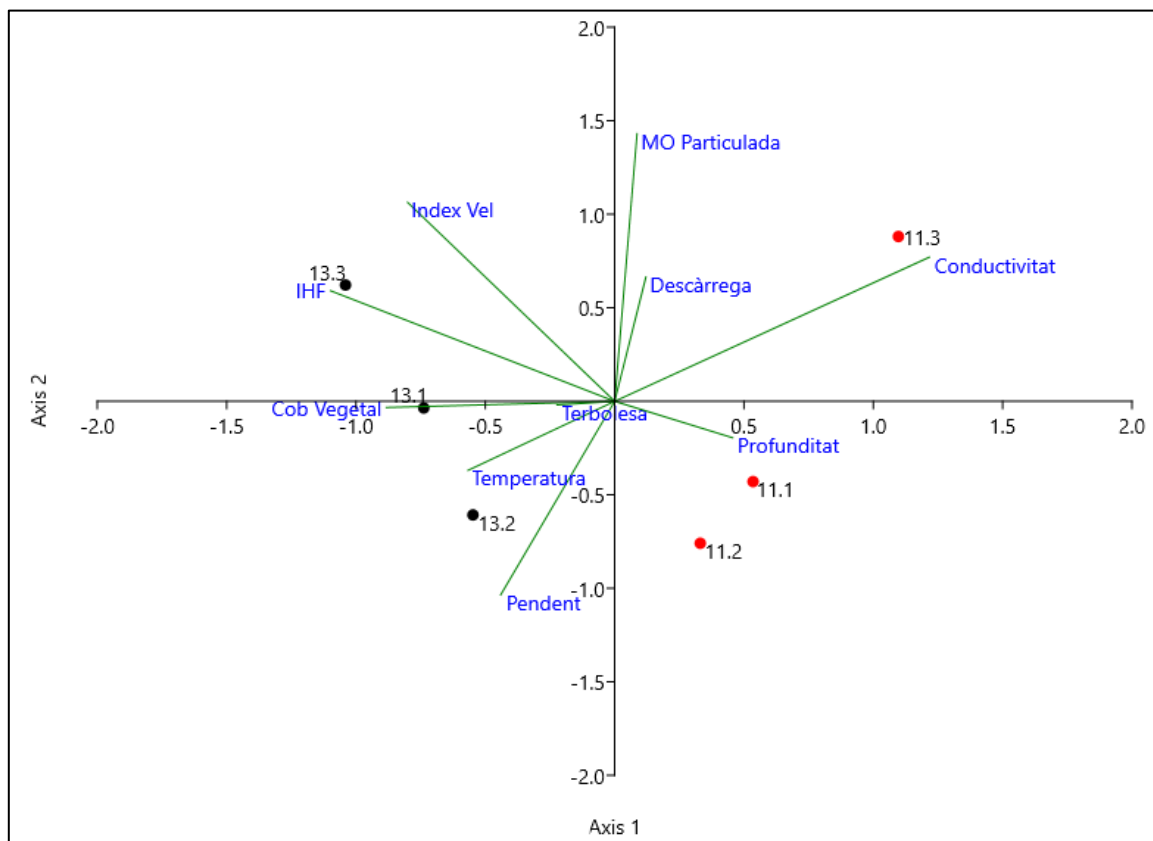


Figura 6. Anàlisi de correspondència canònica (CCA) de les variables ambientals i les espècies dels 6 trams. Vectors de les variables ambientals segons la variabilitat explicada per l'axis 1 i 2.

Taula 3. Valors propis, % variació i variació acumulada dels 5 axis del CCA. Contribució de cada variable ambiental.

	Axis 1	Axis 2	Axis 3	Axis 4	Axis 5
Valors propis	0.60565	0.32295	0.24598	0.13278	0.044694
% Variació	44,79	23,89	18,19	9,21	3,31
Variació acumulada	44,79	68,68	86,87	96,08	99,39
Variables ambientals					
Pendent	-0,293871	-0,690069	-0,311246	-0,381498	0,0333073
Temperatura	-0,377856	-0,24602	0,319791	0,1928	-0,863722
Conductivitat	0,810909	0,513634	-0,498819	-0,32738	0,199327
Terbolesa	-0,148544	-0,013118	-0,831567	0,0798453	-0,0592135
MO Particulada	0,0576935	0,953944	-0,250954	0,0366942	-0,0678476
Profunditat	0,304199	-0,130149	0,293347	0,671057	0,584928
Descàrrega	0,0805297	0,442757	0,770953	0,268895	-0,196323
IHF	-0,73248	0,39413	0,235638	0,467897	0,00566067
Substrat	-0,533736	0,709165	-0,157323	-0,11972	0,0846495
CobVeg Aquàtica	-0,588464	-0,0221322	-0,137171	0,698635	0,28121

En el mateix CCA però afegint les dades d'abundàncies d'espècies (Figura 7), es poden veure determinades relacions d'espècie-variable ambiental. Les espècies localitzades a la part dreta de l'axis 2, que pertanyen a GL11, estan associades a connectivitats més elevades i les espècies a la part esquerra, pertanyents a GL13, estan associades a un IHF més elevat. Les espècies situades a la part inferior de l'axis 1 s'associen amb pendents més acusades i les de la part superior de l'axis 1 es relacionen amb més concentració de MO particulada. Per tant, les relacions preliminars de causalitat que es podrien extreure de la presència d'una espècie-variable ambiental son:

- *S. semivirens* i *P. nigrinus* estan relacionats amb elevades conductivitats i grans concentracions de matèria orgànica.
- *P. stylatus* no es veu associat per la MO particulada però sí per conductivitats elevades.
- *C. celeripes* està molt relacionada amb pendents acusades.
- *R. fuscipes*, *T. calvescens* i *T. Pe 2* estan relacionades amb pendent acusades, però les dues últimes també a conductivitats més elevades.
- *P. rufiventris* i *E. brevicar* s'associen a valors d'IHF i concentracions de MO particulada molt elevats (més elevats per *P. rufiventris*).
- *C. fuscus* només té una petita relació amb la MO particulada.
- *P. skirwithensis* i *T. veralli* estan molt relacionats amb valors elevats d'IHF i relacionats de forma més lleu amb MO particulada elevada.
- *E. devonica* i *E. minor-fittkau* estan igualment associades, no amb gran magnitud, a pendents acusades i a valors d'IHF elevats. El mateix passa amb *Th. Pe 2a* però l'associació és més gran.

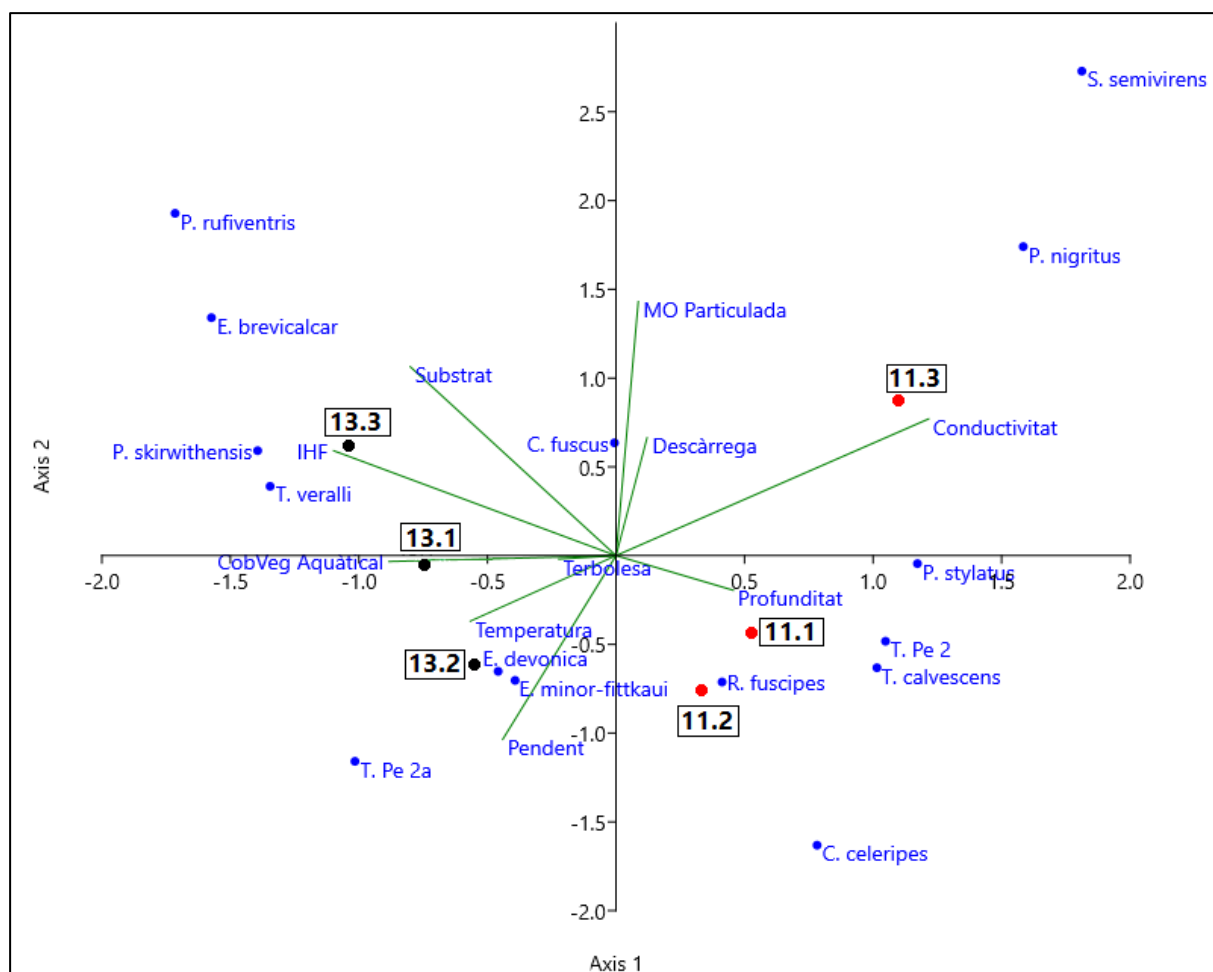


Figura 7. Anàlisi de correspondència canònica (CCA) de les variables ambientals i les espècies dels 6 trams. Posició de les espècies segons les variables ambientals.

El recompte final dels dos torrents va ser de 460 exúvies al GL11 i 364 al GL13, donant un total de 824 exúvies analitzades. Es van obtenir 43 espècies que pertanyen a 27 gèneres, de 4 subfamílies (Tanypodinae, Diamesinae, Orthoclaadiinae, i Chironominidae tribu Tanytarsinii). La subfamília més abundant en ambdós torrents és Orthoclaadiinae amb 449 i 359 individus. Al GL11 es van trobar les 4 subfamílies però al GL13 va faltar la família Tanypodinae (Taula 4).

Taula 4. Nombre d'individus de cada subfamília dels torrents GL11 i GL13.

Subfamília	GL11	GL13
Tanypodinae	3	-
Diamesinae	4	2
Orthoclaadiinae	449	359
Chironominae (T. Tanytarsinii)	4	3

Taula 5. Llistat d'espècies trobades als dos torrents ordenades segons les seves abundàncies absolutes i relatives (%).

Espècie	GL11	%	Espècie	GL13	%
<i>Rheocricotopus fuscipes</i>	117	25,4	<i>Tvetenia veralli</i>	138	37,9
<i>Parorthocladus nigrinus</i>	77	16,7	<i>Eukieferiella minor-fittkai</i>	39	10,7
<i>Parametriocnemus stylatus</i>	70	15,2	<i>Eukieferiella devonica</i>	35	9,6
<i>Eukieferiella minor-fittkai</i>	43	9,3	<i>Eukieferiella brevicar</i>	34	9,3
<i>Tvetenia calvescens</i>	36	7,8	<i>Paratrachocladus skirwithensis</i>	24	6,6
<i>Cricotopus (s.s) fuscus</i>	24	5,2	<i>Cricotopus (s.s) fuscus</i>	17	4,7
<i>Corynoneura celeripes</i>	16	3,5	<i>Rheocricotopus fuscipes</i>	11	3,0
<i>Eukieferiella devonica</i>	15	3,3	<i>Orthocladus (s.s) rubicundus</i>	10	2,7
<i>Thienemaniella Pe 2</i>	14	3,0	<i>Thienemaniella Pe 2a</i>	10	2,7
<i>Synorthocladus semivirens</i>	13	2,8	<i>Paratrachocladus rufiventris</i>	8	2,2
<i>Orthocladus (s.s) frigidus</i>	10	2,2	<i>Orthocladus (s.s) frigidus</i>	7	1,9
<i>Orthocladus (s.s) rubicundus</i>	5	1,1	<i>Cardiocladius capucinus</i>	6	1,6
<i>Heleniella cf. ornamentalis</i>	3	0,7	<i>Parametriocnemus boreoalpinus</i>	5	1,4
<i>Orthocladus (E) rivulorum</i>	3	0,7	<i>Micropsectra atrofasciata</i>	3	0,8
<i>Pseudodiamesa branickii</i>	2	0,4	<i>Cricotopus (s.s) tremulus</i>	3	0,8
<i>Zavrelia ?</i>	2	0,4	<i>Boreoheptagya legeri?</i>	2	0,5
<i>Potthastia gaedii</i>	1	0,2	<i>Eukieferiella clypeata</i>	2	0,5
<i>Syndiamesa edwardsi</i>	1	0,2	<i>Orthocladus (E) saxosus</i>	2	0,5
<i>Eukieferiella similis</i>	1	0,2	<i>Tvetenia calvescens</i>	1	0,3
<i>Krenosmittia sp (boreoalpina?)</i>	1	0,2	<i>Orthocladus (E) rivulorum</i>	1	0,3
<i>Parorthocladus nudipennis</i>	1	0,2	<i>Corynoneura sp</i>	1	0,3
<i>Macropelopia cf. fehlmani/fittkai</i>	1	0,2	<i>Eukieferiella corulescens</i>	1	0,3
<i>Pentaneurini ?</i>	1	0,2	<i>Limnophyes sp</i>	1	0,3
<i>Thienemannimyia cf. laeta</i>	1	0,2	<i>Nanocladius rectinervis</i>	1	0,3
<i>Micropsectra atrofasciata</i>	1	0,2	<i>Orthocladinae (?)</i>	1	0,3
<i>Tanytarsus sp</i>	1	0,2	<i>Orthocladus (s.s) rivinus</i>	1	0,3
	460			364	

Al GL11 com al GL13 es van trobar 26 espècies. Tots dos comparteixen 9 espècies, per tant, 17 espècies es van trobar únicament a cada torrent. Al GL11 les espècies més abundants (>5% d'abundància relativa) són: *Rheocricotopus fuscipes*, *Parorthocladus nigrinus*, *Parametriocnemus stylatus*, *Eukieferiella minor-fittkai*, *Tvetenia calvescens* i *Cricotopus fuscus*. Al GL13 les més abundants són: *Tvetenia veralli*, *Eukieferiella minor-fittkai*, *Eukieferiella devonica*, *Eukieferiella brevicar* i *Paratrachocladus skirwithensis* (Taula 5).

L'anàlisi individual per trams va donar les majors abundàncies en els primers i últims punts, i les menors abundàncies en els segons punts, tant per GL11 com GL13. Les espècies dominants amb >5% d'abundància relativa no són les mateixes entre els torrents ni entre els trams. No obstant això, les dades dels punts 2 del dos torrents són molt baixes, cosa que pot desvirtuar els resultats i fa difícil la comparació entre punts. A GL11.1 l'espècie més abundant és *Rheocricotopus fuscipes* i a GL11.3 és *Parorthocladus nigrinus*. A GL13.1 és *Tvetenia*

veralli i a GL13.3 és *Eukieferiella brevicealcar*. *Eukieferiella minor-fittkau* és una espècie abundant a tots els trams (Taula 6).

Taula 6. Llistat d'abundàncies absolutes de les espècies trobades a cada punt de GL11 i GL13.

Espècie	GL11.1	GL11.2	GL11.3	Espècie	GL13.1	GL13.2	GL13.3
<i>Rheocricotopus fuscipes</i>	112	3	2	<i>Tvetenia veralli</i>	133	1	4
<i>Parametriocnemus stylatus</i>	64	-	6	<i>Eukieferiella devonica</i>	30	2	3
<i>Eukieferiella minor-fittau</i>	32	10	1	<i>Eukieferiella minor-fittau</i>	24	5	10
<i>Tvetenia calvescens</i>	27	5	4	<i>Paratrachocladus skirwithensis</i>	20	-	4
<i>Corynoneura celeripes</i>	13	2	1	<i>Rheocricotopus fuscipes</i>	10	-	1
<i>Eukieferiella devonica</i>	12	3	-	<i>Orthocladus (s.s) rubicundus</i>	10	-	-
<i>Orthocladus (s.s) frigidus</i>	9	-	1	<i>Cricotopus (s.s) fuscus</i>	9	2	6
<i>Thienemaniella Pe.2</i>	8	3	3	<i>Cardiocladius capucinus</i>	6	-	-
<i>Cricotopus (s.s) fuscus</i>	7	-	17	<i>Parametriocnemus boreoalpinus</i>	5	-	-
<i>Paratrachocladus nigratus</i>	3	-	74	<i>Eukieferiella brevicealcar</i>	3	1	30
<i>Orthocladus (s.s) rubicundus</i>	1	-	4	<i>Orthocladus (s.s) frigidus</i>	3	1	3
<i>Heleniella cf. ornaticollis</i>	1	1	1	<i>Thienemaniella Pe 2a</i>	3	7	-
<i>Micropsectra atrofasciata</i>	1	-	-	<i>Boreoheptagya legeri</i>	2	-	1
<i>Orthocladus (s.s) rubicundus</i>	1	-	-	<i>Micropsectra atrofasciata</i>	2	-	-
<i>Syndiamesa edwardsi</i>	1	-	-	<i>Corynoneura sp</i>	1	-	-
<i>Synorthocladus semivirens</i>	-	-	13	<i>Eukieferiella corulescens</i>	1	-	-
<i>Orthocladus (E) rivulorum</i>	-	-	3	<i>Paratrachocladus rufiventris</i>	-	-	8
<i>Pseudodiamesa branickii</i>	-	-	2	<i>Cricotopus (s.s) tremulus</i>	-	-	3
<i>Zavrelia ?</i>	-	-	2	<i>Eukieferiella clypeata</i>	-	-	2
<i>Krenosmittia sp (boreoalpina?)</i>	-	-	1	<i>Orthocladus (E) saxosus</i>	-	-	2
<i>Paratrachocladus nudipennis</i>	-	-	1	<i>Tvetenia calvescens</i>	-	-	1
<i>Pentaneurini ?</i>	-	-	1	<i>Orthocladus (E) rivulorum</i>	-	-	1
<i>Potthastia gaedii</i>	-	-	1	<i>Nanocladius rectinervis</i>	-	-	1
<i>Thienemannimyia cf. laeta</i>	-	-	1	<i>Orthocladinae (?)</i>	-	-	1
<i>Eukieferiella similis</i>	-	1	-	<i>Limnophyes sp</i>	-	1	-
<i>Tanytarsus sp</i>	-	1	-	<i>Orthocladus s.s) rivinus</i>	-	1	-
	292	29	139		262	21	81

És interessant observar que algunes espècies que estan relacionades amb rius d'aigües molt fredes i, per tant, més probables de ser capturades prop de les capçaleres i prop dels glaciers sí que apareixen, però en baixes abundàncies. Veiem, doncs, que *Boreoheptagya legeri*, *Paratrachocladus skirwhitensis* i *Parametriocnemus boreoalpinus* que són espècies pròpies d'ambients alpins, es troben només a GL13 i sobretot al punt GL13.1, el més proper al glacià. Això seria una indicació de la importància d'aquest riu i específicament aquest punt, respecte als altres.

Taula 7. Diversitat alfa, beta i gamma per GL11 i GL13.

	Diversitat		
	alfa (mitjana)	beta	gamma
GL11	1,872	0,772	4,31
GL13	1,968	0,857	5,05

A la Taula 7 s'observa com les tres diversitats van ser més elevades per GL13 que GL11.

Els resultats de l'ANOSIM van ser: $R=0.852$ i el nivell de significació del 10%. Per tant, les dues comunitats de quironòmids dels dos torrents són diferents. Les el·lipses al 95% de confiança de la Figura 8 van mostrar com les espècies es disposaven en l'espai en 3 grups, el de la dreta que correspon a les espècies que només es troben al GL11, el de l'esquerra a les espècies que només són al GL13 i el del mig a les espècies que comparteixen GL11 i GL13.

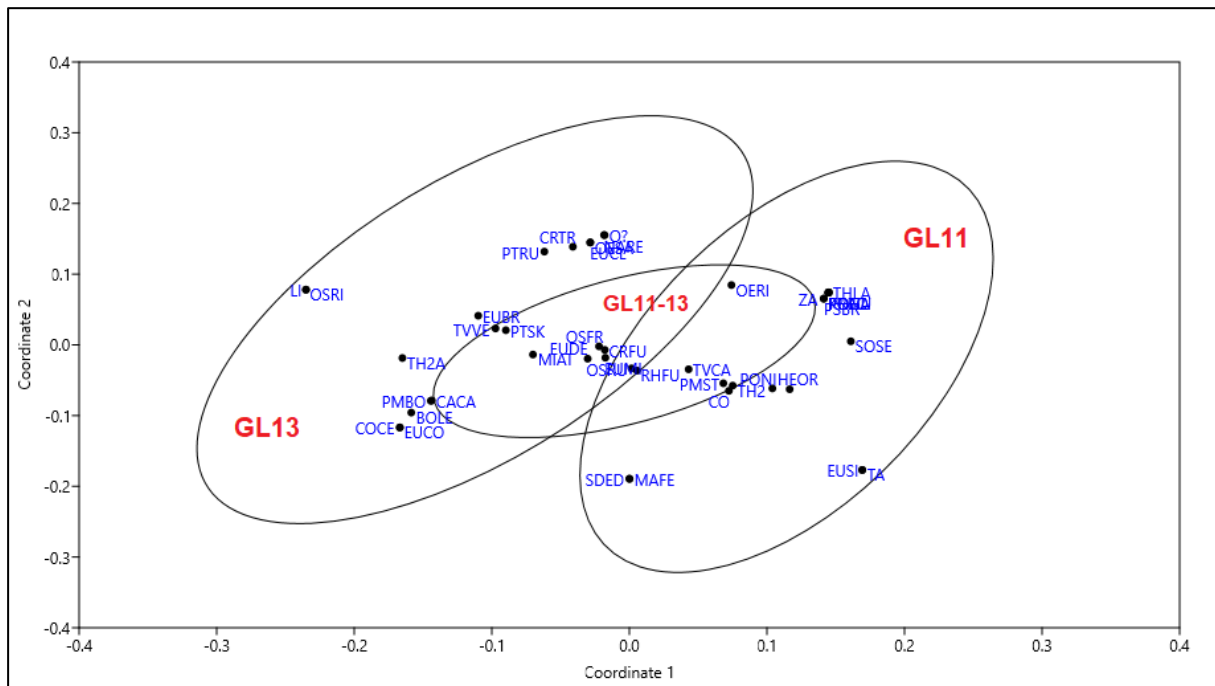


Figura 8. MDS de similituds longitudinals (entre els trams) de les espècies amb les el·lipses al 95% de confiança. Els punts corresponen a cada espècie, etiquetat amb el seu nom abreviat.

El clúster amb l'índex de Jaccard (Figura 9) va mostrar els dos torrents clarament separats (aproximadament un 10% de similitud). En el cas de GL11 els trams amb més similitud són GL11.1 i GL11.3 (~45% similitud), que formen una branca amb GL11.2 (distància de ~25%). En el cas de GL13 els trams més símls són GL13.1 i GL13.2 (40% similitud), formen una branca amb GL13.3 (distància de ~10%). Això vol dir que els trams de GL11 comparteixen un tipus d'espècies i els trams de GL13 comparteixen altres espècies, hi ha dues comunitats diferents segons el torrent. El primer i tercer tram de GL11 són més semblants per què comparteixen més espècies entre ells que amb el segon; el mateix passa amb el primer i segon tram de GL13.

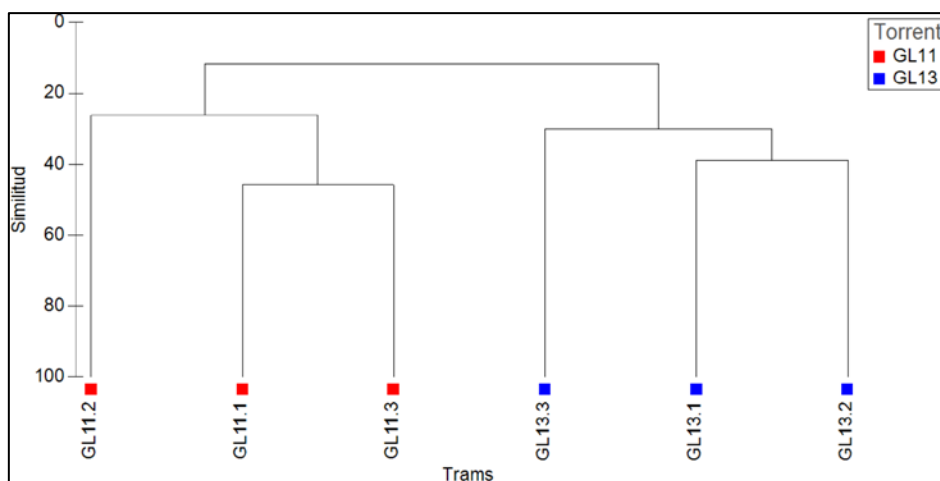


Figura 9. Clúster de similitud entre els trams, amb l'índex de Jaccard i el mètode "complete linkage".

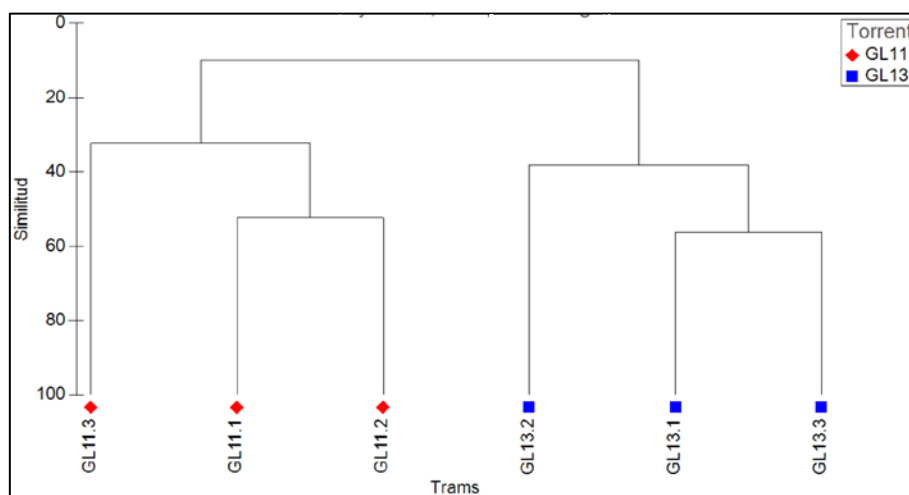


Figura 10. Clúster de similitud entre els trams, amb l'índex de Bray-Curtis i el mètode "complete linkage".

El clúster amb l'índex de Bray-Curtis (Figura 10) separa els dos torrents, per tant, també confirma l'existència de dues comunitats d'espècies diferenciades, no només per la presència i absència, si no també per les abundàncies. Pels trams de GL11, el 1r i 2n són més semblants entre ells que amb el 3r punt i pel GL13 els trams 1 i 3 són més semblants que amb el 2. Aquestes diferències respecte la Figura 9 amb l'índex de Jaccard poden ser degudes a que GL11.1 i GL11.2, per Jaccard, comparteixen menys espècies que GL11.1 amb GL11.3, però quan afegim les abundàncies (Bray-Curtis), les espècies que comparteixen el punt 1 i 2 també tenen unes abundàncies relatives semblants. Passaria exactament el mateix per GL13.1 i GL13.3. Per tant, GL11.2 i GL13.3 tenen espècies compartides amb la resta de trams dels seus torrents, però aquestes espècies tenen unes abundàncies relatives molt diferents entre els trams del torrent: així doncs, tot i que comparteixen espècies, per les abundàncies tant diferents que tenen, són menys símls.

Discussió

Conèixer la morfologia i la taxonomia dels quironòmids

Conèixer la morfologia i taxonomia dels quironòmids ha sigut un punt clau d'aquest estudi, gràcies a les claus Hivenoja (1973), Green *et al.* (1983); Langton (1984) i Moller-Pillot (2013) s'ha pogut profunditzar en l'aprenentatge i l'aplicació pràctica d'aquests coneixements. Han permès conèixer la morfologia de les exúvies pupals i arribar a la seva identificació fins al nivell més baix possible. Tot i així, hi ha hagut alguns problemes associats com, per exemple, identificar fins a nivell d'espècie els gèneres *Thienemaniella* i *Corynoneura*, ja que els individus tenen una mida molt petita i és difícil diferenciar algunes estructures clau; altres problemes han sigut amb quironòmids dels quals només es tenia un individu i la identificació es feia més difícil per no poder comparar les estructures, ja que moltes vegades les exúvies poden estar trencades o doblegades en les preparacions microscòpiques i això impedeix la seva bona identificació. Altres vegades la dificultat ha sigut a l'hora de classificar les morfoespècies dels gèneres *Cricotopus* i *Orthocladius*, ja que presenten un gran número d'espècies i subgèneres diferents, fets que dificulten la seva identificació. A més, moltes vegades les claus utilitzades es basen en estructures que, segons l'experiència fent les identificacions d'aquest estudi, pateixen gran variació, com les sedes laterals del segment VIII abdominal, que sovint han sigut difícils de veure i podien variar entre individus de la mateixa espècie i fins i tot entre els laterals dret i esquerre del mateix individu. El fet d'haver tingut aquesta sèrie de dificultats porta a elevar el grau d'atenció i exactitud a l'hora d'identificar cada morfoespècie. Finalment, és molt interessant aquest tipus d'estudi, ja que dona una visió molt més específica dels hàbitats fluvials, permet comprendre la gran especialització que poden arribar a tenir els quironòmids i l'elevada biodiversitat que es pot trobar. També ajuda a prendre consciència de tot els anys d'estudi i treball que porten sobre l'esquena els i les especialistes de quironòmids i de les dificultats per les que han pogut passar per realitzar-los.

GL11 i GL13: Comparar dues comunitats de quironòmids d'alta muntanya

La comparació de dues comunitats de quironòmids ha sigut entre dos torrents d'alta muntanya, un amb influència glacial (GL13) i l'altre sense (GL11). La comparació s'ha fet mitjançant la identificació de les exúvies pupals de tres trams de cada torrent.

Relació amb les variables ambientals

GL11 està associat a conductivitats elevades i a un menor IHF (Índex d'Hàbitat Fluvial), i GL13 a valors més elevats d'IHF i conductivitats menors. Per tant, GL13 és un torrent amb un hàbitat més favorable a l'hora de l'establiment de comunitats de macroinvertebrats. Un IHF elevat porta associada una heterogeneïtat elevada ja que hi ha més variació de substrats

(còdols, graveta, sorra, argila), vegetació aquàtica (molses, fanerògames, etc.), entre d'altres, que permeten l'establiment d'un major nombre de microhàbitats (Jacobsen *et al.*, 2012). Els torrents amb influència glacial acostumen a tenir conductivitats més baixes i heterogeneïtats més elevades (Khamis *et al.*, 2016; Lods-Crozet *et al.*, 2001b i ILG & Castella, 2006) que els de sense influència glacial, fet que preliminarment concorda amb els resultats obtinguts. Segons els estudis esmentats, l'heterogeneïtat segueix un gradient de valors més alts a més baixos, segons la influència glacial. En els resultats del treball, a diferència, a mesura que s'avança riu avall per GL13 i GL11, l'IHF augmenta (Taula 2), independentment de la influència glacial. És a dir, els primers punts tenen valors d'IHF més baixos que els últims punts. Però en tots els casos els punts de GL13 comparats amb els mateixos punts de GL11 tenen un IHF més elevat.

Per altra banda seria d'esperar que la temperatura fos un factor determinant a l'hora de diferenciar els dos torrents (Brown *et al.*, 2007; Finn *et al.*, 2010; ILG & Castella, 2006; Lencioni *et al.*, 2007) però no s'obté aquest resultat. Una possible explicació és que factors com la profunditat i l'amplada del riu, entre d'altres, poden afectar a la temperatura de l'aigua (Khamis *et al.*, 2016; tampoc va trobar cap relació contundent amb la temperatura). La terbolesa també hauria de ser un factor diferencial, més elevat a torrents d'influència glacial, però segons els resultats de Brighenti *et al.* (2019) a setembre és un mes on els valors de terbolesa a torrents amb influència glacial són menors que als altres mesos d'estiu. Aquesta podria ser una explicació ja que el mostreig d'aquest treball es va fer durant el mes de setembre i la terbolesa sembla que no juga un paper important com a factor ambiental per diferenciar el torrents.

Diferències de biodiversitat

Segons els resultats, tant la diversitat alfa, beta i gamma són més elevades a GL13, torrent amb influència glacial. L'alfa-diversitat s'esperaria que fos més elevada a GL11 degut a no tenir influència glacial (Brown *et al.*, 2007). La beta-diversitat és més elevada al torrent amb influència glacial (GL13), ja que al tenir valors més elevats d'IHF, proporciona unes condicions adients per la creació de diferents microhàbitats, en els quals pot haver més especialització del nínxol i trobar espècies diferents, augmentat així el valor de la beta-diversitat (Jacobsen *et al.*, 2012; Lencioni, 2018; Hamerlík & Jacobsen, 2012). La gamma-diversitat és més elevada a GL13, però no de forma acusada, fet que és un tret característic dels torrents influenciats per glaciers (Finn *et al.*, 2013; Hamerlík & Jacobsen, 2012).

Abundàncies i espècies representatives

Comparant les comunitats de GL11 i GL13 (MDS i clústers) es posa de manifest que les dues comunitats de quironòmids són diferents. En els 2 torrents es troben diferències

longitudinals entre els trams pel que fa a l'abundància i la presència d'espècies mostrejades (Figures 8 i 9). Als trams GL11.2 i GL13.2 es van trobar molt pocs individus, tot i que l'esforç de mostreig va ser el mateix per tots els trams. Realment s'haurien de trobar més individus als punts intermitjos, ja que la densitat total d'individus segueix una relació unimodal amb la distància al glacià, amb un pic intermig (Khamis *et al.*, 2016; Cauvy-Frauné *et al.*, 2014). La possible explicació deriva dels inconvenients a l'hora de mostrejar les exúvies pupals, en aquest cas podria ser que hi hagués algun dic (natural o artificial) més amunt del 2n tram que retingués les exúvies, que el torrent es bifurqués i part de les exúvies es perdessin o que la xarxa de deriva no estigués situada al lloc més adient. Un altre factor podria ser una falta de sincronització entre el moment que va estar situada la xarxa al torrent i el moment d'emergència dels adults.

Si parlem de les espècies més abundants, a GL11 dominen amb més del 5% d'abundància (Taula 5) *R. fuscipes*, *E. minor-fittkau*, *P. styatus*, *P. nigrinus* i *T. calvescens*, que són espècies amb requeriments no tant restrictius i no tan pròpies de torrents glacials, però sí són pròpies de trobar-se en zones de muntanya; i *C. fuscus* que és una espècie generalista sense gaires preferències ambientals (Moller-Pilot, 2013; Šporka *et al.*, 2003). A GL13 dominen *T. veralli*, que és una espècie molt típica als Pirineus, *E. minor-fittkau*, *E. devonica*, *E. brevicar* i *P. skirwithensis*, aquestes tres últimes espècies s'esperaria trobar-les als torrents d'alta muntanya i especialment *E. brevicar* i *P. skirwithensis* a torrents amb influència glacià (Lods-Crozet *et al.*, 2001a; Moller-Pilot, 2013; Šporka *et al.*, 2003).

Pel que fa a les espècies menys abundants però molt importants en termes ecològics a l'hora de caracteritzar les comunitats, es veu que a GL11 es troben espècies depredadores dels gèneres *Thienemannia* i *Macropelopia* i a GL13 no es troba cap quironòmide depredador, resultats concordants amb els obtinguts per Khamis *et al.* (2016) i Cauvy-Frauné *et al.* (2016), que ho justifiquen degut a que els estressos abiòtics són més elevats amb influència glacià i els biòtics (predació, competició) són més elevats sense influència glacià. A GL13 apareixen les espècies *P. borealpinus* i *B. legeri* que són indicatives de torrents d'alta muntanya i típiques de zones molt fredes (Moller-Pilot, 2013; 2011a; Šporka *et al.*, 2003). Sorpren el fet de no trobar individus del gènere *Diamesa* ni a GL11 ni GL13, on a altres estudis és un gènere típic de trobar-se a les capçaleres dels torrents d'alta muntanya, a baixes temperatures i especialment a torrents amb influència glacià (Milner *et al.*, 2002, Hamerlík & Jacobsen, 2012, Khamis *et al.*, 2016 i Lencioni, 2018). Tot i això també hi ha estudis on no s'ha trobat *Diamesa* sp com al de Milner (2016).

Una possible explicació per les baixes abundàncies d'algunes espècies i l'absència del gènere *Diamesa* és el fet de treballar amb exúvies, ja que el seu mostreig depèn molt del

moment d'emergència (Annexos 4 i 5) de cada espècie (Luoto & Raunio, 2011; Lencioni *et al.*, 2007). L'emergència segueix patrons fenològics i diaris (Oliver, 1971), per tant és possible que hi hagués larves però no constin perquè com encara no havien emergit no es van poder mostrejar. Una alternativa és que la temperatura de l'aigua dels dos torrents està en el rang de 10°C i la temperatura preferent del gènere *Diamesa* és 6-7°C a Europa (Castella *et al.*, 2001) tot i que altres estudis apunten que pot viure en rangs de temperatures de fins a 15°C màxim (Lods-Cozet *et al.*, 2001b).

Limitacions experimentals

Un cop realitzat el treball, es posen en evidència les limitacions experimentals. En primer lloc el fet de treballar amb exúvies, que té associats els inconvenients descrits durant el treball. Unes possibles millores serien: incrementar a més d'una hora el temps que es deixa la deriva al riu o posar vàries xarxes en diferents punts, per així minimitzar els biaixos en l'abundància; fer el mostreig en diferents èpoques de l'any o fer mostrejos repetits en el mateix dia o la mateixa estació (exemple, estiu o primavera), per assegurar-nos que l'absència d'espècies és perquè, de fet, aquestes no hi són i no perquè no hagin emergit però que al torrent sí hi hagi larves. La proposta seria implementar tècniques on s'estudiïn complementàriament les exúvies i les larves, per així obtindre una informació molt més global i ajustada del torrent, com també suggereixen Prat *et al.* (2016) i Luoto & Raunio (2011). En segon lloc, fer una comparació de només dos torrents moltes vegades no arriba a ser significativa ja que hi ha molta informació que manca, a més, en aquest cas, els dos torrents els separen només 11,5km cosa que afavoreix que siguin molt semblants hidromorfològicament. Per tant, els resultats obtinguts en aquest estudi són preliminars però aplicables a un estudi més extensiu, reduint aquestes limitacions al màxim possible.

Prioritats a l'hora de la conservació

Aparentment, es confirma que el torrent GL13 (amb influència glacial), encara manté aquesta influència, i que hi ha diferències amb el torrent no influenciat (GL11). Preliminarment, GL13 és el torrent més vulnerable a l'hora de la retracció glacial i l'augment de temperatures, ja que té espècies (*B. legeri*, *P. boreoalpinus* i *P. skirwithensis*) que són especialistes d'aquest tipus d'hàbitat i tenen més restriccions ecològiques. Al GL11 es troben espècies més generalistes i amb una distribució menys restringida, que per tant, el seu perill és menor. Les espècies poc abundants al GL13 són les que expliquen aquesta decisió més que no pas les espècies abundants, ja que la seva presència aporta gran informació del torrent i és un factor diferencial. Per tot això, el torrent GL13 seria prioritari a l'hora d'invertir en despeses i tècniques de conservació.

Conclusions

- Mitjançant l'aprenentatge de la morfologia i la taxonomia dels quironòmids, s'han pogut estudiar les comunitats de quironòmids de torrents d'alta muntanya amb i sense influència glaciària i s'han pogut constatar les seves aplicacions front el canvi climàtic.
- Els resultats obtinguts són preliminars degut a les limitacions experimentals que presenta l'estudi: treballar només amb exúvies i amb un nombre escàs de mostres que comparar.
- Les comunitats de quironòmids del torrent Molleres (GL11) i Vallibierna (GL13) són diferents. El torrent GL13 està sota la influència de les glaceres i s'ha pogut constatar per la presència d'espècies poc abundants però característiques com *B. legeri*, *P. boreoalpinus* i *P. skirwithensis*. Aquestes espècies no es troben al GL11, que en general, té espècies generalistes de més àmplia distribució.
- El torrent GL13 seria prioritari a l'hora d'aplicar despeses i esforços en la seva conservació per la presència d'aquestes espècies més sensibles amb distribució limitada. En canvi, GL11 té espècies de més àmplia distribució que, per tant, no corren tant risc.
- Les comunitats de quironòmids són uns bons indicadors dels sistemes fluvials d'alta muntanya i poden ser una bona eina a l'hora de gestionar els efectes del canvi climàtic.

Referències bibliogràfiques

- Arenillas, M. et al. (2008). Datos sobre la nieve y los glaciares en las cordilleras españolas. *Programa ERHIN (1984-2008)*, 237pp.
- Brighenti, S., Tolotti, M., Bruno, M. C., Engel, M., Wharton, G., Cerasino, L., Mair, V., & Bertoldi, W. (2019). After the peak water: the increasing influence of rock glaciers on alpine river systems. *Hydrological Processes*, 33(21), 2804–2823.
- Brown, L. E., Hannah, D. M., & Milner, A. M. (2007). Vulnerability of alpine stream biodiversity to shrinking glaciers and snowpacks. *Global Change Biology*, 13(5), 958–966.
- Castella, E., Adalsteinsson, H., Brittain, J.E., Gislason, G.M., Lehmann, A., Lencioni, V., Lods-Crozet, B., Maiolini, B., Milner, A.M., Olafsson, J.S., Saltveit, S.J. & Snook, D.L. (2001) Macrobenthic invertebrate richness and composition along a latitudinal gradient of European glacier-fed streams. *Freshwater Biology*, 46, 1811–1831.
- Cauvy-Fraunié, S., Espinosa, R., Andino, P., Dangles, O., & Jacobsen, D. (2014). Relationships between stream macroinvertebrate communities and new flood-based indices of glacial influence. *Freshwater Biology*, 59(9), 1916–1925.
- Cauvy-Fraunié, S., Andino, P., Espinosa, R., Calvez, R., Jacobsen, D., & Dangles, O. (2016). Ecological responses to experimental glacier-runoff reduction in alpine rivers. *Nature Communications*, 7(May), 1–7.
- Epler, John H. Identification Manual for the larval Chironomidae (Diptera) of North and South Carolina. 1st Version (September 2001). *North Carolina Department of Environment and Natural Resources. Division of Water Quality*. 526pp.
- Finn, D. S., Räsänen, K., & Robinson, C. T. (2010). Physical and biological changes to a lengthening stream gradient following a decade of rapid glacial recession. *Global Change Biology*, 16(12), 3314–3326.
- Finn, D. S., Khamis, K., & Milner, A. M. (2013). Loss of small glaciers will diminish beta diversity in Pyrenean streams at two levels of biological organization. *Global Ecology and Biogeography*, 22(1), 40–51.
- Green, J., Wilson, R.S., & McGill, J. (1983). A Practical Key to the Genera of Pupal Exuviae of the British Chironomidae. *Journal of Applied Ecology* 20, 690. 39pp.
- Hamerlík, L., & Jacobsen, D. (2012). Chironomid (Diptera) distribution and diversity in Tibetan streams with different glacial influence. *Insect Conservation and Diversity*, 5(4), 319–326.
- Hirvenoja, Mauri (1973). Revision der Gattung Cricotopus van der Wulp und ihrer Verwandten (Diptera, Chironomidae). *Annales zoologici Fennici*, 10. 363pp.
- Ieltxu, I. (2019). Los glaciares de los Pirineos. Estudio glaciológico y dinámica actual en el contexto del cambio global. *Tesis doctoral*. Universidad del País Vasco. 261pp.
- Ilg, C., & Castella, E. (2006). Patterns of macroinvertebrate traits along three glacial stream continuums. *Freshwater Biology*, 51(5), 840–853.

- Jacobsen, D., Milner, A. M., Brown, L. E., & Dangles, O. (2012). Biodiversity under threat in glacier-fed river systems. In *Nature Climate Change*, 2 (5), 361–364.
- Khamis, K., Brown, L. E., Hannah, D. M., & Milner, A. M. (2016). Glacier-groundwater stress gradients control alpine river biodiversity. In *ECHOHYDROLOGY*, 9 (1263–1275), 40–51.
- Kranzfelder, P., Anderson, A. M., Egan, A. T., Mazack, J. E., Bouchard, R. W., Rufer, M. M., & Ferrington, L. C. (2015). Use of chironomidae (Diptera) surface-floating pupal exuviae as a rapid bioassessment protocol for water bodies. *Journal of Visualized Experiments*, 101(e52558), 1–9.
- Langton, P. H. (1984). A Key to Pupal Exuviae of British Chironomidae. *P. H. Langton*. 324pp.
- Lencioni, V., Rossaro, B., & Maiolini, B. (2007). Alpine chironomid distribution: a mere question of altitude? *Contributions to the Systematics and Ecology of Aquatic Diptera*, 165–180.
- Lencioni, V. (2018). Glacial influence and stream macroinvertebrate biodiversity under climate change: Lessons from the Southern Alps. *Science of the Total Environment*, 622–623, 563–575.
- Lods-Crozet, B., Lencioni, V., Ólafsson, J. S., Snook, D. L., Velle, G., Brittain, J. E., Castella, E., & Rossaro, B. (2001a). Chironomid (Diptera: Chironomidae) communities in six European glacier-fed streams. *Freshwater Biology*, 46(12), 1791–1809.
- Lods-Crozet, B., Castella, E., Cambin, D., Ilg, C., Knispel, S., & Mayor-Simeant, H. (2001b). Macroinvertebrate community structure in relation to environmental variables in a Swiss glacial stream. *Freshwater Biology*, 46(12), 1641–1661.
- Luoto, T. P., & Raunio, J. (2011). A comparison of chironomid-based training sets developed from pupal exuviae and larval head capsules to infer lake trophic history. *Fundamental and Applied Limnology*, 179(2), 93–102.
- Merrit, R. W. & Cummins, K. W. (1984) An introduction to the Aquatic Insects of North America. 2nd Edition. *Kendall/Hunt Publishing Co*. 722pp.
- Mestre, A. P., Paggi, A. C., & Montalto, L. (2018). The Application of Chironomid Pupal Exuvial Technique (CPET) for Ecological Analysis in a Neotropical Large River System. *Neotropical Entomology*, 47(5), 619–627.
- Milner, A. M., Brittain, J. E., Castella, E., & Petts, G. E. (2002). Trends of macroinvertebrate community structure in glacier-fed rivers in relation to environmental conditions: A synthesis. *Freshwater Biology*, 46(12), 1833–1847.
- Milner, A. M. (2016). The Milner and Petts () conceptual model of community structure within glacier-fed rivers: 20 years on. In *River Science* (pp. 156–170). John Wiley & Sons, Ltd.
- Moller-Pillot, H. K. M. (2013). Chironomidae Larvae. Biology and Ecology of the aquatic Orthocladiinae (Primera ed). KNNV. 312pp.

- Moreno, C. E. (2001). Métodos para medir la biodiversidad. M&T-Manuales y Tesis SEA, 1, 86pp.
- Oliver, D. R. (1971). Life History of the Chironomidae. In *Annu. Rev. Entomol*, 211-230pp.
- Prat, N., González-Trujillo, J. D., & Ospina-Torres, R. (2014). Clave para la determinación de exuvias pupales de los quironómidos (Diptera: Chironomidae) de ríos altoandinos tropicales. *Revista de Biología Tropical*, 62(4), 1385-1406.
- Prat, N. & Rieradevall, M. (2014). Guia para el reconocimiento de las larves de Chironomidae (DIPTERA) de los ríos mediterráneos. *Grup de recerca F.E.M.* Universitat de Barcelona. 29pp (F.E.M. Guies; Volum 3).
- Prat, N., Puntí, T., & Rieradevall, M. (2016). The use of larvae and pupal exuviae to study the biodiversity of chironomidae in mediterranean streams. *Journal of Entomological and Acarological Research*, 48(1), 29–36.
- Prat, N., & García-Roger, E. M. (2018). Are there so many congeneric species of chironomid larvae in a small stream? *Journal of Limnology*, 77(Special Issue 1), 65–80.
- Puntí i Casadellà, Tura (2007). Ecology of chironomidae communities in mediterranean reference streams. In *Tesis doctoral*. Universitat de Barcelona.
- Solomina, O. N., Bradley, R. S., Jomelli, V., Geirsdottir, A., Kaufman, D. S., Koch, J., McKay, N. P., Masiokas, M., Miller, G., Nesje, A., Nicolussi, K., Owen, L. A., Putnam, A. E., Wanner, H., Wiles, G., & Yang, B. (2016). Glacier fluctuations during the past 2000 years. In *Quaternary Science Reviews* (Vol. 149, pp. 61–90). Elsevier Ltd.
- Šporka, F., Bitušík, P., Bulánková, E., Cséfalvay, R., Čejka, T., Derka, T., Elexová, E., Halgoš, J., Hamerlík, L., Illéšová, D., Jäch, M. A., Kodada, J., Košel, V., Krno, I., Novíkmec, M., & Zatošičová, Z. (2003). Vodné bezstavovce (makroevertebráta) Slovenska Súpis druhov a autekologické charakteristiky Slovak aquatic macroinvertebrates Checklist and catalogue of autecological notes. *Slovenský Hydrometeorologický Ústav*, 590pp.
- Wiederholm, Torgny (1983). Chironomidae of the holartic region. *Entomologica Scandinavica*, Supplement No.19. 457pp (Key and diagnosis; Part 1 Larvae).

Annexos

Annex 1. Generalitats Canvi Climàtic

El canvi climàtic és el fenomen global provocat per l'augment acusat dels nivells de CO₂ en l'atmosfera des de fa un parell de segles, per l'acció antròpica. Mil·lennis enrere i fins el segle XIX, els nivells de CO₂ no havien superat els 300ppm (NASA, 2020). La causa d'aquest augment sense precedents és la quema de combustibles fòssils des de la revolució industrial al 1789. Històricament han hagut fluctuacions naturals en la concentració de CO₂ atmosfèric, degudes a oscil·lacions en l'òrbita terrestre, durant els períodes interglacials (Schugers *et al.*, 2006).

Els gasos com el CO₂ són gasos d'efecte hivernacle. La radiació solar penetra en l'atmosfera i calenta la superfície terrestre, que emet rajos infrarojos. Els gasos d'efecte hivernacle tenen la capacitat d'absorbir la radiació infraroja i, per tant, eviten la pèrdua de calor per l'atmosfera. Si s'incrementa de forma anòmla el nivell d'aquests gasos, es produeix un feedback positiu en el que la temperatura de la Terra augmenta, provocant el que avui dia es coneix com canvi climàtic o escalfament global (Houghton *et al.*, 1990).

Entre les diferents evidències i efectes del canvi climàtic (NASA, 2020) trobem l'increment de temperatura global. Des de la segona meitat del segle XX la temperatura mundial és 0,99°C més elevada i al 2016 es va obtenir un màxim de temperatura per 3r any consecutiu (NASA, 2016); s'observa un patró anual ascendent d'anomalies tèrmiques per increment de temperatura. Associat a això, s'està produint un escalfament dels oceans, increment 0,22°C des de 1969 (Levitus *et al.*, 2012), a més, un augment del nivell del mar conseqüència del desgel dels glaciars i cossos de gel terrestres i de la pròpia expansió de l'aigua (per l'augment de la temperatura); es prediu que per l'any 2100 el nivell del mar haurà pujat 65cm (Weeman & Lynch, 2018). L'acidificació oceànica és un altre efecte directe de la concentració de CO₂ atmosfèric, on l'oceà absorbeix més CO₂ i, per tant, la concentració de protons dissolts en l'aigua augmenta (Sabine *et al.*, 2004), disminuint el pH. L'augment de temperatura també comporta més freqüència i intensitat d'esdeveniments climàtics extrems (huracans, sequeres, inundacions, onades de calor, etc.) (Wuebbles *et al.*, 2017).

Finalment, l'efecte que atén principalment el TFG és la disminució de la cobertura de neu i la retracció dels glaciars, associat amb l'augment de temperatura global. La cobertura de neu de l'hemisferi nord es redueix cada cop més des de 1960, amb una ràpida acceleració des de 2003 (NSIDC, novembre 2019). Els glaciars en els últims 100 anys han patit una retracció global sense precedents (alguns arribant a desaparèixer completament), tot i que es

troben diferències regionals: per exemple, els glaciers alpins es retireuen des de mitjans del segle XIX i els argentins des de principis del segle XX (NSIDC, juny 2019).

Annex 2. Característiques hidrològiques i biològiques dels torrents alimentats per glaciers.

La caracterització dels gradients que controlen la biodiversitat dels rius alpins alimentats per aigua provinent dels glaciers ha sigut estudiat per molts autors, entre ells: Lods-Crozet *et al.* (2002), Finn *et al.* (2013), Cauvy-Frauné *et al.* (2014) i Jacobsen *et al.* (2012). A continuació, a mode de resum s'expliquen els resultats de l'estudi realitzat per Khamis *et al.* (2016), segons si hi ha més contribució d'aigua glaciària, els torrents presenten les següents característiques:

- Relacions linears positives amb terbolesa, heterogeneïtat del llit (amb concordança amb Lods-Crozet *et al.*, 2001b i ILG & Castella, 2006) i pH.
- Relacions linears negatives amb clorofil·la a i conductivitat elèctrica, mateix resultat que Lods-Crozet *et al.* (2001b).
- La temperatura no mostrava cap relació linear clara (degut a que les variables com l'amplada del llit i profunditat, entre d'altres, poden afectar a la temperatura de l'aigua), oposat als resultats de Finn *et al.* (2010) i ILG & Castella (2006).
- Relació linear negativa amb la beta-diversitat (al contrari que l'estudi de Jacobsen *et al.*, 2012 i Finn *et al.*, 2013) i amb l'abundància relativa de predadors.
- Relacions unimodals amb màxim intermig amb riquesa taxonòmica i densitat total d'individus (resultats que coincideixen amb els de Cauvy-Frauné *et al.*, 2014).
- Relacions unimodals amb mínim intermig amb l'equitat de la comunitat (com de semblants en números són les espècies que formen la comunitat).

Les respostes biòtiques (riquesa de tàxons i densitat total) de les comunitats de macroinvertebrats depenen de la resistència a les condicions ambientals extremes i a la resiliència front les pertorbacions dels ambients glaciers (Cauvy-Frauné *et al.*, 2014). Les relacions unimodals s'associen amb un "trade-off" entre les restriccions ambientals i les biològiques, sent que com més contribució del glaciària, les variables físico-químiques són factors limitants però també ho és la disponibilitat de l'aliment, per tant en aquests ambients es troben unes xarxes tròfiques molt denses i connectades (Khamis *et al.*, 2016).

Annex 3. Efectes ecològics en els torrents alpins causats per la desaparició dels glaciars

Com s'ha indicat, la massa glaciària està desapareixent de forma accelerada des de les últimes dècades i la cobertura de neu cada cop és menor i a cotes més elevades. Això comporta una pèrdua i degradació de l'hàbitat aquàtic associat, els torrents alpins, aquests són caracteritzats per la contribució de les aigües fredes de glaciars o neu i té associades unes comunitats de macroinvertebrats especialistes a aquestes condicions. A més, aquests torrents d'alta muntanya moltes vegades són "illes" aïllades que permeten una forta especiació i tenen una limitada immigració; són hàbitats molt susceptibles. Els riscos que pateixen a causa de la desaparició dels glaciars són: pèrdua o reorganització de les comunitats aquàtiques dels torrents d'alta muntanya, pèrdua o aparició de llacs i la reorganització dels canals hidrològics (Elser *et al.*, 2020).

En l'estudi de Jacobsen *et al.* (2012) (al contrari que en l'estudi de Khamis *et al.*, 2016), en contra del que generalment s'espera (que la beta-diversitat sigui major en ambients menys extrems), van trobar que en aquests ambients extrems, la beta-diversitat augmenta proporcionalment amb el número de famílies d'invertebrats aquàtics que apareixen en zones amb més influència glaciària, distribuïdes en "patches". Per tant, entre regions, la beta diversitat augmenta i la similitud disminueix com més alta sigui la influència del glaciària. Segons Jacobsen *et al.* (2012), en el cas de la desaparició dels glaciars, haurà una reducció de la beta-diversitat i, a nivell local, l'alfa-diversitat potencial màxima es veurà reduïda, per l'eliminació total o parcial d'aquestes espècies especialistes d'hàbitats extrems. El resultat és una homogeneïtzació de les comunitats aquàtiques alpines. En canvi, com s'ha comentat, segons els estudis de Khamis *et al.* (2016) i Cauvy-Frauné *et al.* (2014) seria a la inversa, com menys influència glaciària, augmentaria la beta-diversitat. Per Finn *et al.* (2010) també obtenen resultats que contrasten que l'augment de distància del glaciària està positivament correlacionat amb més diversitat i més riquesa a la comunitat.

Pel que fa a la diversitat genètica, estudis sobre macroinvertebrats com *Baetis alpinus* (Ephemeroptera) indiquen menys diversitat genètica gamma i beta quan habita en torrents sense influència glaciària (Sierra Nevada) que en aquells amb influència glaciària (Pirineus) (Finn *et al.*, 2013). A l'estudi de Giersch *et al.* (2017) es valoren els perills que pateixen els macroinvertebrats associats a torrents molt influenciats per aigua glaciària, com *Lednia tumana* i *Zapada glaciària*. Aquests tàxons es troben en llocs altament associats al gel i neu permanents i la seva presència i densitat van disminuint a la vegada que ho fa la influència glaciària, per tant, el màxim perill al que s'han d'enfrontar per poder perdurar a llarg termini és la disminució

dels glaciars i la cobertura de neu. Aquests resultats es poden extrapolar a altres tàxons amb les mateixes dependències i requeriments ambientals.

Els experiments realitzats per Cauvy-Frauné *et al.* (2015), on a un torrent alimentat per aigües glaciars es treia un terç d'aquesta aportació, podien ajudar a entendre què passaria als torrents a nivell global a causa de la pèrdua progressiva de massa glaciària. Les principals conseqüències abiòtiques van ser l'increment de temperatura de l'aigua ($\sim 1.4^{\circ}\text{C}$) i l'augment de la conductivitat. Pel que fa a les conseqüències en la biota, va augmentar la densitat total però no es va veure cap efecte en la riquesa; els trets alimentaris també van variar, la composició va canviar augmentant els herbívors, els predadors i els col·lectors, tot i que els dos últims contribuïen poc als canvis tròfics observats. L'augment dels herbívors també està associat a una menor influència glaciària.

Annex 4. Cicle de vida dels quironòmids

Els quironòmids tenen un cicle de vida holometàbol (metamorfosi completa) basat en 4 estadis: ou, larva, pupa i adult. La duració del cicle de vida pot ser: univoltina, una generació a l'any; bivoltina, dos generacions; multivoltina, més de dos generacions; i semivoltina, una generació que viu més d'un any (Sporka *et al.*, 2003; Oliver, 1971; Vallenduuk & Moller-Pillot, 2007). Els estadis d'ou, larva i pupa són els estadis juvenils, immadurs, i la majoria de subfamílies els passen a l'aigua (Kranzfelder *et al.*, 2015). Oliver D. R. va descriure de forma general les característiques de cada estadi del cicle de vida al capítol *Life History of the Chironomidae*, al 1971, que és molt útil a l'hora de sintetitzar cada estadi:

1. Els ous estan recoberts d'una matriu protectora gelatinosa que s'expandeix en l'aigua varies vegades la seva mida. Depenent de la subfamília la forma dels ous canvia de lineal a cilíndrica. La duració d'aquest estadi és depenent de la duració total del cicle de vida i moltes vegades és dependent de la temperatura.
2. Un cop eclosiona l'ou surten les larves, a mesura que avança el temps, es van alimentant, van creixent i van passant a diferents estadis larvaris (Figura 3). El tipus de microhàbitat, el règim alimentari, la duració de l'estadi i la mida larvària depenen de cada subfamília. Moltes espècies en el 2n, 3r o 4t estadi larvari pateixen diàpauza, que és un estat de resistència de baixa activitat metabòlica que permet subsistir a ambients extrems (Vallenduuk & Moller-Pillot, 2007).
3. Un cop la larva es troba en l'últim estadi larvari, s'inicia la metamorfosi i comença l'estadi de pupa. La duració de l'estadi pupal és, normalment, més curt que l'estadi larvari i depèn de la temperatura. Un cop s'ha arribat a la pupa madura, es dona

l'emergència, el pas de pupa madura aquàtica a adult aeri. Durant el procés, l'adult surt i deixa enrere l'exúvia, que no és més que la pell de ceres que recobreix la pupa mentre està madurant.

4. L'emergència dels adults és un procés molt ràpid i un cop surten ja són capaços de volar. És un fenomen no arbitrari que segueix una fenologia molt marcada, cada espècie té el seu moment d'emergència característic, que depèn de la duració del cicle (univoltí, bivoltí, etc.). No només segueix un patró fenològic, si no també circadià, on el pic d'emergència normalment és al migdia o a primera hora de la tarda i a la posta de sol, tot i que també pot ocórrer a primera hora del matí, depenent de la subfamília, gènere i espècie. Els factors que controlen els patrons fenològics i diaris són la temperatura i la intensitat lumínica. La duració de l'estat adult dura com a màxim setmanes i és on es porta a terme la reproducció.

Annex 5. Patrons fenològics de l'emergència dels quironòmids i dels règims alimentaris d'algunes subfamílies de quironòmids

Com s'ha indicat a cada un dels estadis, hi ha diferències a nivell de subfamília, gènere i espècie i el mateix passa pels règims alimentaris. A continuació es repassaran aquestes diferències per algunes subfamílies:

Subfamília Tanypodinae (Vallenduuk & Moller-Pillot, 2007)

Els patrons d'emergència són normalment sincronitzats. La majoria de les espècies mostren aquesta sincronització amb un pic primaveral i una menor sincronització a l'estiu.

Pel règim alimentari, majorment tenen un règim depredador, s'alimenten de matèria animal, tot i que s'han trobat restes vegetals al sistema digestiu de diversos individus, que podria ser de la pròpia presa o del predador que també consumeix material vegetal. Per exemple, els gèneres *Macropelopia* i *Thienemannymia* són exclusivament depredadors. Els seus consumidors principals són els peixos.

Subfamília Diamesinae i Orthoclaadiinae (Moller-Pillot, 2013)

Aquestes dues subfamílies tenen moltes característiques semblants entre elles però en molts casos no es pot generalitzar a causa de les grans diferències a nivell de gènere i espècie. L'emergència és un cas pel qual no es poden fer generalitzacions per subfamília, a més, d'algunes espècies encara no es coneix la fenologia (com per exemple: *Boreoheptagya* sp, *Parametriocnemus boreoalpinus* i *Paratrichocladus skirwithensis*).

- Exemples de Diamesinae: *Syndiamesa edwardsi* emergeix de març a octubre amb 2-3 generacions/any i *Potthastia gaedii* de maig a octubre, amb 2-4 generacions/any.
- Exemples d'Orthoclaadiinae: *Rheocricotopus fuscipes* emergeix des de finals de febrer al novembre i té 3 o 4 generacions/any; *Tvetenia veralli* de març a octubre amb pic estiuec i té mínim 3 generacions/any; *Eukieferiella coerulescens* pic a l'estiu (juny) però poden trobar-se casos d'abril a novembre, amb 3 generacions/any; en canvi, *Eukieferiella minor* emergeix des de primavera a finals de l'estiu però als Pirineus només a l'estiu i tardor, pot tenir fins 3 generacions/any.

Pel que fa al regim alimentari, s'observen diferències segons la saprobitat, en zones oligotròfiques s'alimenten majoritàriament de bacteris i en zones eutròfiques de la degradació del fitoplàncton. Per tant, solen ser brostrejadors, raspadors (en corrents d'alta velocitat) o recol·lectors (en corrents de baixa velocitat), s'alimenten de matèria vegetal, bacterial, fúngica i a vegades matèria animal morta o viva. Orthoclaadiinae mai són veritables depredadors (el

consum de matèria animal és accidental), però sí que podem trobar alguns Diamesinae que ho són. Les diatomees prenen gran importància pel seu contingut nitrogenat, molt necessari pels Orthoclaadiinae, sobretot. Els seus principals consumidors són els peixos.

A			
	GL11.1	GL11.2	GL11.3
GL11.1	-	-	-
GL11.2	778	-	-
GL11.3	2951	2270	-
B			
	GL13.1	GL13.2	GL13.3
GL13.1	-	-	-
GL13.2	810	-	-
GL13.3	2286	1572	-

Annex 6. Altituds i distàncies entre trams

Altitud (m)		Altitud (m)	
GL11.1	2033	GL13.1	2277
GL11.2	1819	GL13.2	2182
GL11.3	1606	GL13.3	2007

Altitud (m)		Altitud (m)	
GL 11.1	2033	GL 13.1	2277
GL 11.2	1819	GL 13.2	2182
GL 11.3	1606	GL 13.3	2007

Taula 1. Altitud de cada tram

A			
	GL11.1	GL11.2	GL11.3
GL 11.1	-	-	-
GL 11.2	778	-	-
GL 11.3	2951	2270	-
B			
	GL13.1	GL13.2	GL13.3
GL 13.1	-	-	-
GL 13.2	810	-	-
GL 13.3	2286	1572	-

Taula 2. Distàncies entre els trams de cada torrent.

Annex 7. Imatges dels trams de GL11



Figura 5. Primer tram de GL11.



Figura 6. Segon tram de GL11.



Figura 7. Tercer tram de GL11.

Annex 8. Imatges dels trams de GL13

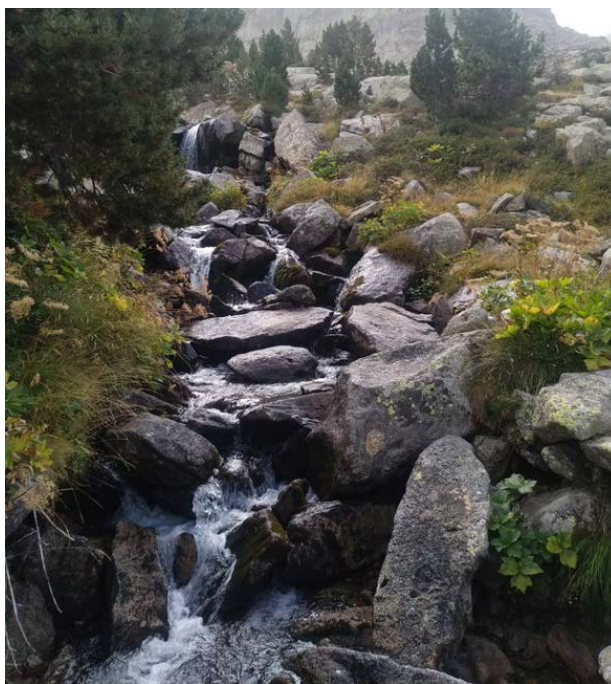


Figura 8. Primer tram de GL13.



Figura 9. Segon tram de GL13.



Figura 10. Tercer tram de GL13.

Annex 9. Imatges del treball de camp



Figura 1. Classificació de macroinvertebrats.



Figura 2. Mesura de dades ambientals, en aquest cas l'amplada del torrent.



Figura 3. Mesura de les variables ambientals i ubicació de la xarxa de deriva (cercle vermell).



Figura 4. Recol·lecta d'exúvies de forma manual a zones on s'acumula escuma.

Annex 10. Protocol de mostreig de GLOBIOS

GLOBIOS SAMPLING PROTOCOL

Selection of streams and sites

In each country, selected streams will be headwaters located in high mountains areas. All sites should also be of reference (protected or in pristine areas) and have a high habitat diversity. Selection will be done using maps and previous experience of the researchers. On each stream, 3 sites (100m) will be selected, where the first one must be as high as possible (if is possible, near to the source or glacier) and the next ones must be located after the incorporation of 2 tributaries, but still in high mountain areas. If no tributaries are present, sites should account, as much as possible, for the environmental variability of the headwaters.

Macroinvertebrates Sampling

All equipment in the field will be thoroughly washed and cleaned with 20% diluted sodium hypochlorite between successive samples for avoiding DNA contamination.

1) Immature stages (larvae and pupae)

A multihabitat sampling will be performed with a kick net (250 µm) until no new families of the target groups (Chironomidae, Trichoptera and Plecoptera) are collected after 2 consecutive samples. From this composite sample, at least 100 larvae and mature pupae of Chironomidae and 20 individuals/family of Trichoptera and Plecoptera will be sorted in the field and preserved in vials with alcohol (96%). In highly diverse families of Trichoptera (as Limnephilidae or Rhyacophilidae) is recommended to capture as many individuals as possible

Because the concentration of alcohol will decrease with the incorporation of individuals into the vials, it will be renewed at the end of the sampling day and in at least the two subsequent days. After the field work, the samples must be kept in a freezer until taxonomical identification.

2) Chironomid pupal exuviae

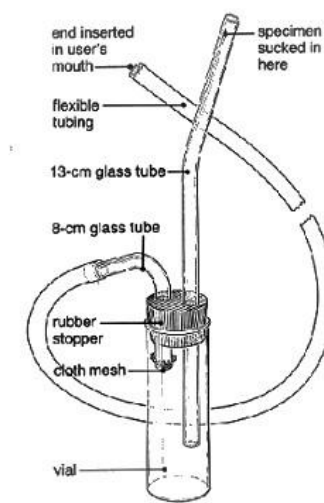
In each site, one drift net (300 μ m) will be placed in the middle of channel (with the highest flow velocity) and few cm of above the bottom substrate. One hour later, the drift net will be removed. Coarse substrates will be sorted and removed. Larvae, exuviae or mature pupae of Chironomidae in the drift sample will be sorted and preserved in alcohol (96%), the remaining samples will be preserved in vials in alcohol (96%). Additionally, surface-floating pupal exuviae will be collected in pool zones (e.g. foam accumulations) and preserved in vials with alcohol (96%).

3) Adults

Adults of Trichoptera, Plecoptera and Chironomidae will be collected from riparian zones and emergent vegetation with aerial nets or manually with vials and an insect aspirator (see photo below). Individuals collected will be preserved in vials with 96% alcohol. Additionally, a light trap as close as possible to the water's edge will be installed in one of the three sites of each stream (preferably in the site in the middle to capture adults from upstream and downstream). A cord will be extended between two supports from which a sheet will be suspended. We can use clothespins or large clips to suspend the sheet. Then, we will hang two types of fluorescent tubes in front of the sheet: one of UV-A black light blue (BLB) and the other of daylight (or blue light). Adults will be collected from the sheet with fine-point forceps and insect aspirator and preserved in vials with 96% alcohol. Fluorescent tubes will be powered by batteries (12V) and installed during at least 1-2 hours, a little before sundown. Because some sampling sites can be difficult to access, we should reduce the weight carried. Thus, we are evaluating getting LED fluorescent tubes that can be powered by AA or AAA batteries. The disadvantage of using LED light is that the UV that produce have a wavelength higher than the BLB one (>380nm) and let pass part of visible light.



Light trap



Insect aspirator

Environmental descriptors

Geographical variables

- 1) Coordinates and elevation will be measured with a GPS or any application for mobile phones (e.g. Wikiloc)
- 2) Distance to source will be calculated in ArcGis.

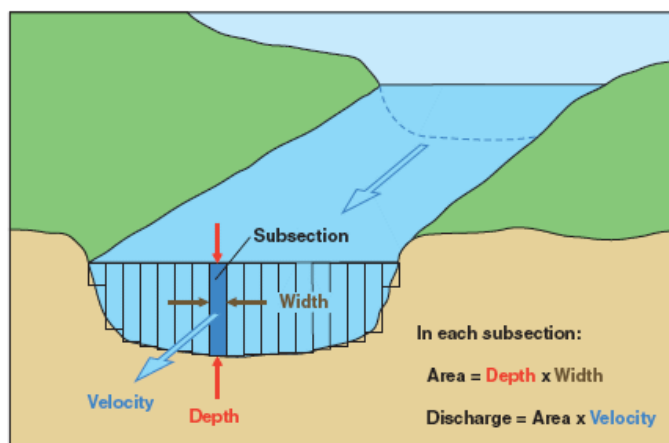
Hydromorphological variables

Width and water depth stream will be measured at 5 transects separated every 20 m along the site. Various measures of depth for transect will be made according to the stream channel width.

The slope of the site will be measured using a clinometer.

Discharge will be measured using a flow meter and calculating the section in 1 randomly selected transect. The area to be monitored should be a stable stream channel or at least not significant alteration. Braided sections will be avoided. If possible, the section to be monitored should have flow moving downstream, parallel to the stream channel, avoiding pool sections or other areas altered by

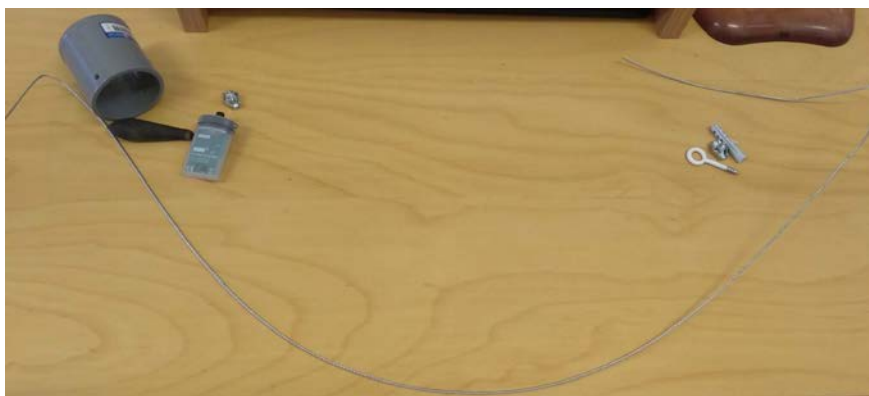
structures (e.g. plants, big stones) that may create backwater areas or reverse the flow of the water. The stream channel cross section will be divided into subsections of the same width. In each subsection, the area will be obtained by measuring the width and depth. The width will be measured using a steel tape, graduate rope or similar piece and the depth using a graduate rod. In each subsection, along the cross-section, water velocity will be determined by means of a current-meter. The discharge in each subsection will be computed by multiplying the subsection area by the measured velocity. The total discharge will be computed by summing the discharge of each subsection. There are many types of current meters (we can also use air flow meters, e.g. MiniAir) but it is important to maintain a resolution of 0.01 m/s.



Current-meter discharge measurements are made by determining the discharge in each subsection of a channel cross section and summing the subsection discharges to obtain a total discharge.

Physicochemical variables

Temperature will be continuously recorded (30 min intervals) by HOBO loggers that will be installed in riffles at each site (3 HOBOs/stream) and fixed with stainless steel wires into the stream channel. A PVC tube (or similar) and a fishing lead should be used to protect the HOBO and maintain it submerged. The other end can be fixed into a boulder using a nail in anchor, a clamp and a drill.





Dissolved oxygen, conductivity (25°), specific conductivity and pH will be measured with portable meters on each sampling site. It is very important, to use appropriate meters. In the case of the dissolved oxygen, particularly, we should use meters with an incorporated barometer to show corrected values according to the effect of local atmospheric pressure. Please, read carefully the equipment manuals before using them and perform the respective calibrations.

Turbidity (TSS). A well-mixed water sample (1L) will be taken with a clean plastic bottle and filtered through a pre-weighed glass filter (pore size 0.7 μm). These filters will be previously heated (at $104 \pm 1^\circ\text{C}$

for the least one hour) and weighed in the laboratory and stored in aluminum paper and labeled. In the field, we will use a hand vacuum pump and a plastic Erlenmeyer flask to filter the water sample. To avoid touching the filters with the hands, we should use a fine-punt forceps to manipulate them. Then, the filters will be saved in the aluminum paper and taken to the laboratory where will be heated back (at $104 \pm 1^\circ\text{C}$ for the least one hour) and weighed. The mass increase divided by the water volume will be equal to the TSS (mg/L).



Biological variables

Chlorophyll a. Nine samples of algal biomass will be taken by scrubbing 4cm^2 in randomly selected pebbles (without moss) in riffle areas. The composite sample will be preserved in glass vials (25-30 mL) with stream water, covered with aluminum paper and maintained on ice or at 4°C . In the lab, samples will be frozen (-20°C) until further analysis (max 1 month).

Extraction procedure:

- 1) Add 10 mL 90% aqueous acetone solution in each vial and store the samples at 4°C for 8 - 12 hours.
- 2) Submit each sample three times to an ultrasonic bath (3min/time. 500 rpm)
- 3) Add a second addition of 5mL of 90% acetone and homogenize the sample.
- 4) Filter the extracts (glass filters, 47mm diameter, and $0.7\ \mu\text{m}$ pore size).
- 5) In the spectrophotometer, read the absorbance at 665 (corresponding to Chlorophyll a) and 750nm (corresponding to turbidity).

$$\text{Chl } a = 11.4 (A_{665} - A_{750}) * V / (LS)$$

Chl a = Chlorophyll a (mg/m^2); *A* = Absorbance to "X" (nm); *V* = volume of extract; *L* = Length of spectrophotometer cuvette; *S* = sampled area.

Particulate Organic Matter will be estimated by 20 visualizations distributed in two cross sections using a plastic or PVC cylinder (20 cm in diameter) closed at the bottom by a transparent methacrylate base

marked in circular sectors. The total percentage of Particulate Organic Matter coverage in each stream channel visualization will be estimated.

IHF (River Habitat Index)

The IHF is a very simple index designed to characterize the heterogeneity of the instream habitat. It includes variables such as frequency of riffles, flow velocity and depth categories, substrate diversity and substrate embeddedness in riffles or sedimentation in pools. The index also evaluates the presence and dominance of heterogeneity elements, which contribute to increasing physical habitat diversity and food sources, such as allochthonous material (leaves, wood) and autochthonous primary producers (algae and macrophytes). IHF will be evaluated throughout the entire site and the final score (up to 100) will be the result of the sum of the 7 blocks detailed below:

Part 1. Embeddedness. We will only evaluate the extent to which the particles of the substrate are fixed in the riffles of the river bed (not sedimentation in pools; which refers in those cases where only pools are present).

Part 2. Regarding riffles frequency, a visual estimate of the presence of riffles with respect to the presence of pools, will be performed.

Part 3. Substrate composition. To fill this section a visual estimate of the average composition of the substrate will be carried out, following the particle diameter categories: Blocks and stones: >64 mm. Pebbles and gravels: 2-64mm. Sand: 0.6-2 mm. Silt and clay: <0.6 mm.

Part 4. Velocity/depth categories. As a general rule, a depth of 0.5 m is considered to distinguish between depth and shallow, whereas a speed of 0.3 m/s is considered to separate fast from slow.

Part 5. Shading of river bed. A visual estimation of the shadow projected by the adjacent vegetation cover will be considered, which determines the amount of light that reaches the river channel and influences the development of the primary producers.

Part 6. Heterogeneity components. We will evaluate the presence of elements such as leaves, branches, trunks or roots in the river bed. These elements provide the physical habitat that can be colonized by aquatic organisms, while providing a source of food for them. In this part, only the presence of the indicated elements will be taken into account. If they did not exist, no points are assigned.

Part 7. Aquatic vegetation cover. This part measures the coverage of aquatic vegetation in the fluvial channel. The greater diversity of morphologies in primary producers increases the availability of habitats and food sources for many organisms. To maximize the heterogeneity the dominance of a group over the total coverage should not exceed 50% (if this were the case, the score will be lower; 5 points). As in the previous part, only the presence of the indicated elements will be taken into account. Plocon: includes organisms fixed to the substrate by one end and in many cases floating (e.g. filamentous algae such as *Cladophora*, Zygnematales or Oedogoniales and mosses). Pecton: includes organisms flattened, lamellar or spherical (e.g. *Nostoc*, *Hildenbrandia*, Chaetoforales, Rivulariaceas and Diatoms). Phanerogams and charales: includes macrophytes, for example, the genera *Potamogeton*, *Ranunculus*, *Ceratophyllum*, *Apium*, *Lemna*, *Myriophyllum*, *Zannichellia* and *Rorippa* and *Chara*.

Field sheet	<i>GLOBIOS Protocol</i>
--------------------	--------------------------------

Date		Hour		Province (or protected area)	
Stream				Site	
Researchers					
Altitude					
Slope					
			Geographical coordinates		

Hydromorphological variables

	Width channel	Depth water						
Transect 1								
Transect 2								
Transect 3								
Transect 4								
Transect 5								

Discharge

Subsection	SS1	SS2	SS3	SS4	SS5	SS6	SS7	SS8	SS9	SS10	SS11	SS12	SS13
Width Subsection (cm)													
Depth (cm)													
Velocity (cm/s)													

Physicochemical variables

pH	Oxygen (mg/l - % sat)	Temperature (°C)	Conductivity (µS/cm)	Specific conductivity (µS/cm)
----	-----------------------	------------------	----------------------	-------------------------------

HOBO Position				

Particulate Organic Matter

Visual.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Transect										
1										
2										

Materials and equipment for the GLOBIOS sampling protocol

Macroinvertebrates Sampling

- *Aquatic immature stages:*
 - o Kicking net (250µm)
 - o Alcohol 96%
 - o Fine-point forceps
 - o Sieve (250µm)
 - o Plastic vials
 - o White trays
 - o Drift net (250 or 300 µm) and iron rods (4)
 - o Labels, pencils, alcohol resistant markers, color adhesive tapes.
 - o Portable cooler
 - o sodium hypochlorite (20% diluted)
- *Adults:*
 - o Aerial entomological net
 - o Insect aspirator
 - o Plastic vials
 - o Alcohol 96%
 - o *Light trap:*
 - Black Light Blue (UV-A) Fluorescent tube
 - Daylight fluorescent tube
 - White sheet
 - Insect aspirator
 - Plastic vials
 - Fine-point forceps
 - Clothespins
 - Cord or rope
 - Batteries 12V
 - Alcohol 96%
- Environmental descriptors
- Geographical variables
 - o GPS or application for mobile

- Hydromorphological variables:
- Slope, width and water depth
 - o Clinometer (or in this link, there is a simple way to measure the slope: <https://www.youtube.com/watch?v=OTQK4lwU7o8>)
 - o Steel tape
 - o Graduate rod
- Discharge:
 - o Current-meter (resolution 0.01 m/s)
 - o Steel tape
 - o Graduate rod
- Physicochemical variables:
- Temperature:
 - o Temperature Hobo loggers (three/stream)
 - o PVC tube
 - o Stainless steel wires
 - o Fishing leads
 - o Nail in anchor, clamp, plier and a drill.
- Dissolved oxygen, conductivity (25°), specific conductivity and pH:
 - o Portable multiparameter with an incorporate barometer.
 - o Calibration solutions
- Turbidity:
 - o Plastic bottle
 - o Whatman glass filters GF/F (47 diameter, 0.7 µm pore size)
 - o Filtration equipment:
 - o Graduated cylinder (1L)
 - o Hand vacuum pump
 - o Plastic Erlenmeyer flask
 - o Aluminum paper envelopes
 - o Fine-point forceps
 - o Markers
- Biological variables:
- Chlorophyll a:
 - o Fieldwork:
 - o Plastic mold (2x2cm)
 - o Toothbrush
 - o Glass vials (25-30 mL)
 - o Aluminum paper
 - o Cool bag and ice gel containers
 - o Labwork:
 - o Aqueous acetone solution (90%)
 - o Whatman glass filters GF/C (47 diameter, 0.7 µm pore size)
 - o Spectrophotometer and cuvettes
 - o Glass vacuum filter assembly
 - o Vacuum pump
 - o Pipets
 - o Clinical centrifuge
 - o Fridge (4°C)
 - o Freezer (-20°C)
- Particulate Organic Matter:
 - o Plastic or PVC cylinder (20cm diameter)

Annex 11. Fitxa de l'índex de qualitat d'hàbitat fluvial IHF

Fluvial Habitat Index for Mediterranean streams. Index IHF			
		Sampling site	
		Data	
		Operator	
Parts		Score	
1. Embeddedness in riffles and runs – sedimentation in pools			
Riffles	Stones, pebbles and gravel embeded in fine sediment in 0 - 30%	10	
	Stones, pebbles and gravel embeded in fine sediment in 30 - 60%	5	
	Stones, pebbles and gravel embeded in fine sediment in > 60%	0	
Pools	Sedimentation 0 - 30%	10	
	Sedimentation 30 - 60%	5	
	Sedimentation > 60%	0	
TOTAL (only one score from pools or from riffles)			
2. Riffle frequency			
High frequency of riffles. Ratio: distance between riffles / stream width < 7		10	
Medium. Ratio: distance between riffles / stream width 7 - 15		8	
Occasional. Ratio: distance between riffles / stream width 15 - 25		6	
Scarce or null. laminar flow. Ratio: distance between riffles / stream width >25		4	
Only pools		2	
TOTAL (only one score)			
3. Substrate composition			
% Boulders and stones	1 - 10%	2	
	> 10%	5	
% Pebbles and gravels	1 - 10%	2	
	> 10%	5	
% Sand	1 - 10%	2	
	> 10%	5	
% Silt and clay	1 - 10%	2	
	> 10%	5	
TOTAL (sum of scores of each class of substrate)			
4. Velocity/depth regime			
<i>shallow: < 0.5 m</i> <i>slow: < 0.3 m/s</i>	4 classes present. Slow-depth, slow-shallow, fast-depth and fast-shallow.	10	
	Only 3 of 4 regimes	8	
	Only 2 of 4 regimes	6	
	Only 1 regime	4	
TOTAL (only one score)			
5. Shading of river bed			
Shaded with some open areas		10	
Completely shaded		7	
Large open areas		5	
Not shaded		3	
TOTAL (only one score)			
6. Heterogeneity components			
Leaf litter		> 10% or < 75%	4
		< 10% or > 75%	2
Presence of branches and wood in the stream		2	
Tree roots in the banks		2	
Natural dams		2	
TOTAL (sum of scores of each class)			
7. Aquatic vegetation cover			
% Plocon + mosses	10 - 50%	10	
	< 10% or > 50%	5	
% Pecton	10 - 50%	10	
	< 10% or > 50%	5	
% Phanerogams + Charales	10 - 50%	10	
	< 10% or > 50%	5	
TOTAL (sum of scores of each class)			
		HID98-0323-C05 ; REN2001-3438-C07	
		FINAL SCORE (Addition of all previous scores)	

The original description of the IHF index was made by Pardo *et al.*, *Limnética in press*

Annex 12. Protocol de muntatge de larves de quironòmids.

1. Col·locació de les larves separades d'un punt de mostreig en una placa de petri amb aigua.
2. Separació de les larves a nivell de subfamília, gènere o morfotip a la lupa binocular (anotar les característiques morfològiques de cada grup).
3. Digestió de la matèria orgànica i deshidratació d'un percentatge de larves de cada grup per fer el muntatge i la identificació.
4. Muntatge de larves sobre portaobjectes per la posterior identificació.
5. Observació al microscopi

Preparació microscòpica

Per tal d'observar els caràcters morfològics requerits per a una correcta identificació és necessari fer preparacions dels individus per tal de poder observar-los al microscopi.

Digestió

Abans del seu muntatge els individus s'han de tractar amb potassa (KOH) 10% entre 15 i 20 minuts a 85 °C, i posteriorment amb aigua destil·lada durant 5 minuts. Aquest primer pas és indispensable per tal de fer desaparèixer la massa muscular i els teixits tous que poden dificultar l'observació dels caràcters morfològics emprats en la identificació (sabem que la digestió ha acabat perquè les larves es tornen semitransparents).



Numera els tubs per saber quin morfotip has posat a cadascun

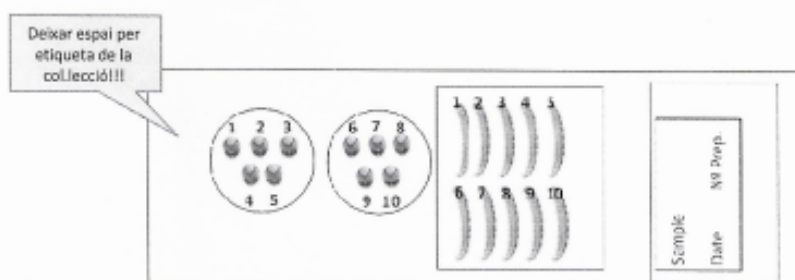


L'estufa ja està calibrada per arribar als 85°C

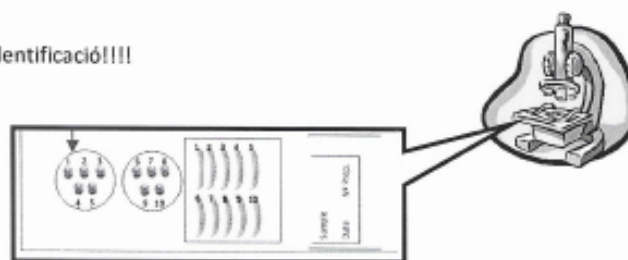
A la temperatura de 85°C accelerem la digestió de la matèria orgànica, però si vols pots deixar les larves en un tub amb potassa durant unes hores i el procés de digestió tindrà lloc igualment.

Recorda utilitzar guants quan manipulis la potassa!!!

- Repetim la mateixa operació diverses vegades. El nombre de larves per portaobjectes depèn de la mida de les mateixes i dels grups morfològics que haguem fet amb antelació (és recomanable muntar els diferents morfotips en portaobjectes diferents).
- És molt important mantenir sempre el mateix ordre de muntatge de les larves, i mantenir sempre la correspondència cos- càpsul. la cefàlica.
- Farem servir el cobreobjectes quadrat de 18x18 mm per les restes dels cossos (únicament el deixarem caure), i el cobreobjectes rodó de 10mm per les càpsul.les cefàliques (farem una lleugera pressió amb el cobreobjectes sobre les càpsul.les per a que s'obrin les estructures de la mandíbula i facilitar la observació).
- Finalment etiquetarem el portaobjectes (etiquetes blanques). Cal posar el codi de la localitat o mostra, la data de recol·lecció i el número de la preparació



I ja podem començar a fer l'identificació!!!!



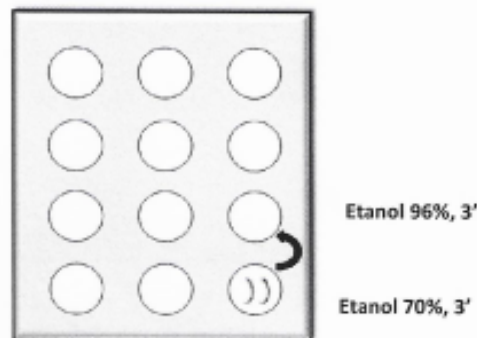
Començar la ident. per aquí ↓

Per fer la Potassa: hi posarem **116 de grams** d' hidròxid de Potassi (del que tenim al laboratori) per un litre d'aigua destil·lada.

Aquí teniu un **model de full** on podeu anotar tota la informació de les vostres preparacions i un model de taula per quan feu les identifications.

Deshidratació

Les mostres es deixen tres minuts amb etanol al 70% i després tres minuts més amb etanol al 96%. Un cop tenim els individus deshidratats ja estan llestos per ser preparats.



Muntatge

Per facilitar l'observació dels caràcters morfològics emprats en la identificació taxonòmica com ara la tipologia de la mandíbula, s'han de separar les càpsules cefàliques de la resta del cos.

Passos:

- Es recomanable netejar abans els portaobjectes amb alcohol per eliminar qualsevol residu.

Es posa una gota del medi de muntatge (Euparal) sobre el portaobjectes, es col·loca la larva a sobre i es separa la càpsula cefàlica de la resta del cos mitjançant les agulles de dissecció.

Si vols una preparació neta i polida, has de procurar que el traspàs d'alcohol des del pouet al portaobjectes sigui mínim.

Per la separació cap-cos s'introdueix l'agulla de dissecció per la base de la càpsula cefàlica, i amb molta cura esquinçem el teixit que els uneix.



La càpsula cefàlica es traspassa a la dreta del portaobjectes on tindrem una gota petita del medi. Es disposa en posició ventral, per a que siguin visibles les estructures de la mandíbula (sedes, dents...).



Annex 13. Imatges del treball de laboratori



Figura 11. Foto macroscòpica feta durant la identificació de morfoespècies. S'observa un adult emergint, com està sortint de la funda (l'exúvia).



Figura 12. Foto microscòpica feta durant la identificació d'una exúvia pupal de *Micropsectra atrofasciata*.

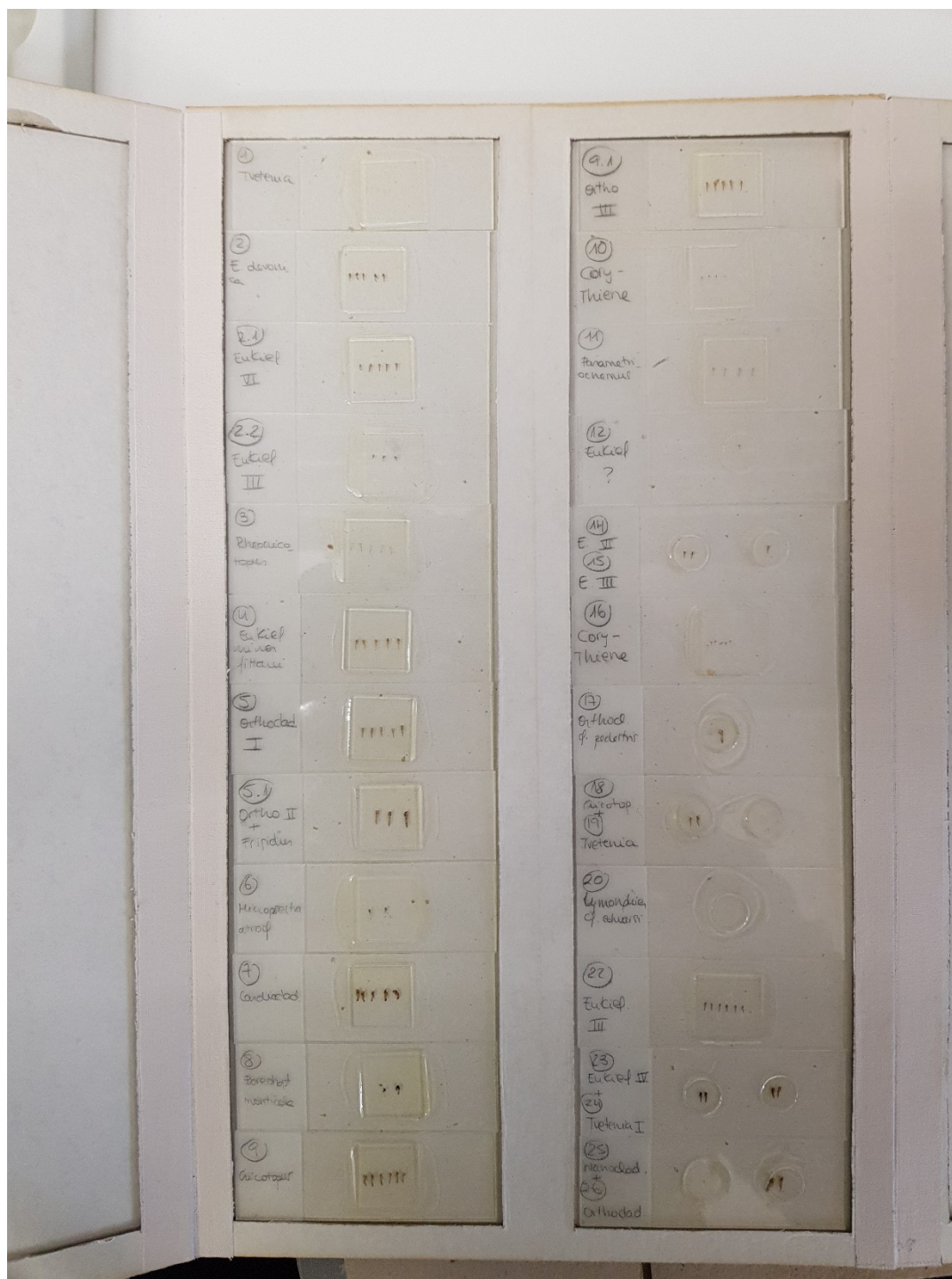


Figura 13. Preparacions microscòpiques d'exúvies pupals, abans de fer la identificació microscòpica.



Figura 14. Preparacions microscòpiques d'exúvies pupals, un cop feta la identificació microscòpica.

Annex 14. Taula sense les espècies rares de cada tram

Taula 3. Abundàncies absolutes de cada tram, sense les espècies rares.

Espècie	Codi	GL11.1	GL11.2	GL11.3	GL13.1	GL13.2	GL13.3
<i>Co. celeripes</i>	CoC	13	2	-	-	-	-
<i>Cr. fuscus</i>	CrF	7	-	17	9	2	6
<i>E. brevicealcar</i>	EB	-	-	-	3	-	30
<i>E. devonica</i>	ED	12	3	-	30	2	3
<i>E. minor-fittkau</i>	EM	32	10	-	24	5	10
<i>Pm. stylatus</i>	PmS	64	-	6	-	-	-
<i>Po. nigrinus</i>	PoN	3	-	74	-	-	-
<i>Pt. rufiventris</i>	PtR	-	-	-	-	-	8
<i>Pt. skirwithensis</i>	PtS	-	-	-	20	-	4
<i>R. fuscipes</i>	RF	112	3	2	10	-	-
<i>S. semividentis</i>	SS	-	-	13	-	-	-
<i>Th. Pe 2a</i>	T2a	-	-	-	3	7	-
<i>Th. Pe.2</i>	T2	8	3	3	-	-	-
<i>Tv. calvescens</i>	TvC	27	5	4	-	-	-
<i>Tv. veralli</i>	TvV	-	-	-	133	-	4