

**Títol del treball:**

**EFFECTOS DIRECTOS E INDIRECTOS DE LA ALTERACIÓN HIDROLÓGICA EN  
UN ARROYO DEL MEDITERRÁNEO**

---

Estudiant: Carmen Espinosa Angona

Grau en Biotecnologia

Correu electrònic: [u1917287@campus.udg.edu](mailto:u1917287@campus.udg.edu)

Tutor: Helena Guasch

Cotutor\*:

Empresa / institució: Facultad de Ciencias, Universidad de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor\*):

Nom del tutor: Helena Guasch

Nom del cotutor\*:

Empresa / institució: Facultad de Ciencias, Universidad de Girona

Correu(s) electrònic(s): [helena.guasch@udg.edu](mailto:helena.guasch@udg.edu)

\*si hi ha un cotutor assignat

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a Helena Guasch por permitirme colaborar con ella en el proyecto "Towards a sustainable use of Mediterranean stream ecosystems: direct and indirect effects of hydrological alteration on fish: STREAMFISH", concretamente en la tarea "WP2. EXCLOSURE EXPERIMENT IN TWO SECTIONS OF THE RIVER WITH DIFFERENT HYDROLOGICAL ALTERATION". Así como por el soporte ejercido a la hora de ayudarme a comprender la finalidad y el procedimiento de las tareas realizadas. También agradecer la ayuda proporcionada por Baigal-Amar Tuulaikhuu y Francesc Rubio, tanto en las tareas de campo como en las de laboratorio y al resto de integrantes del proyecto, cuyas tareas han ofrecido soporte a los resultados obtenidos en este estudio.

## RESUMEN

Se llevó a cabo un estudio para demostrar el efecto de la alteración hidrológica causada por la sequía (debida tanto al clima mediterráneo como a la acción del ser humano) y de la presencia de peces sobre un ecosistema dado. Se llevó a cabo en la Riera del Llèmena, un arroyo eutrófico en el que se van a diferenciar dos sitios (el sitio 1 con un régimen hidrológico permanente y el sitio 2, con un régimen intermitente). Se construyeron unas jaulas o *enclosures*, cada una de las cuales se utilizó para un tratamiento diferente: uno en el que los peces eran excluidos (FE), uno que mantuvo las condiciones basales (Ctrl) y uno en el que se adicionaron peces (BM). El estudio duró quince días, y se evaluó la excreción de amonio por parte de los peces, la estequiometría de peces, macroinvertebrados y epilíton, y el consumo de nutrientes por parte del epilíton, tomándose las muestras al final del experimento. La comparación entre sitios y tratamientos mostró una mayor cantidad de biomasa en el sitio permanente, sin embargo esta resultó menos activa, debido a la acumulación de pigmentos accesorios y de productos de degradación de la clorofila, mientras que en el sitio intermitente el epilíton fue menor pero más rico en organismos fotosintéticos. La pérdida de biomasa algal se encontró asociada a la presencia de macroinvertebrados, siendo estos superiores en el tramo intermitente debido a la menor densidad de peces. Finalmente, los resultados de este estudio sugieren un efecto negativo generado por la presencia de los peces, que impiden el rejuvenecimiento del epilíton y provocan una saturación del medio.

Es va realitzar un estudi per demostrar l'efecte de l'alteració hidrològica causada per la sequera (deguda tant pel clima mediterrani com per a l'acció humana) i de la presencia de peixos sobre l'ecosistema donat. Es va dur a terme a la riera del Llèmena, una torrent eutròfic en el qual es van seleccionar 2 llocs (lloc 1 amb règim hidrològic permanent i lloc 2 amb règim hidrològic intermitent).. Es van a construir uns tancats o *enclosures*, cadascun dels quals es van utilitzar per a un tractament diferent: un en el qual els peixos van ser exclosos (FE), un on es van mantenir les condicions basals (Ctrl) i un en el qual es van afegir peixos (BM). El estudi va durar 15 dies, i es va avaluar l'excreció d'amoni per part dels peixos, l'estequiometria de peixos, els macroinvertebrats i l'epilíton, i el consum de nutrients per part de l'epilíton, prenent les mostres al final de l'experiment. La comparació entre els llocs i els tractaments va mostrar una major quantitat de biomassa en el lloc permanent, tot i que aquesta va resultar menys activa, degut a l'acumulació de pigments accessoris i de productes de degradació de la clorofil·la, mentre que en el lloc intermitent l'epilíton va ser menor però més ric en organismes fotosintètics. La pèrdua de biomassa algal es va relacionar amb la presencia de macroinvertebrats, sent aquests superiors en el tram intermitent degut a la menor densitat de peixos. Finalment, els resultats d'aquest estudi suggereixen un efecte negatiu generat per la presencia dels peixos, que impedeixen el rejuveniment de l'epilíton i provoquen una saturació del medi.

A study was conducted to demonstrate the effect of an hydrological alteration caused by drought (due both to the Mediterranean climate and human action) and the presence of fish on a given ecosystem. It was held in Llémena stream, a eutrophic one, where it will differentiated two sites (site 1 with a permanent water regime and site 2, with an intermittent regime). Cages or *enclosures* were built, each of which was used for a different treatment: one in which the fish were excluded (FE), one that maintained the basal conditions (Ctrl) and one in which fish were added (BM). The study lasted fifteen days, and ammonia excretion by the fish, the stoichiometry of fish, macroinvertebrates and epilithon, and nutrient uptake by the epilithon were evaluated, taking samples at the end of the experiment. The comparison between sites and treatments showed a higher amount of biomass in the permanent site, but this was less active, due to the accumulation of accessory pigments and of degradation products of chlorophyll, whereas intermittent site epilithon was lower but richer in photosynthetic organisms. Algal biomass loss was found associated with the presence of macroinvertebrates, these being higher in the intermittent site due to the lower density of fish. Finally, the results of this study suggest a negative effect generated by the presence of fish, preventing epilithon rejuvenation and causing the saturation of the milieu.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	Pág. 1
– Sequía y arroyos del mediterráneo	Pág. 1
– Epilítion	Pág. 2
– Macroinvertebrados	Pág. 2
– Papel de los peces en la dinámica de nutrientes ( <i>Barbus meridionalis</i> )	Pág. 2
– Dinámica de nutrientes	Pág. 2
– Estequiometría	Pág. 3
OBJETIVOS	Pág. 4
HIPÓTESIS	Pág. 4
– Relacionadas con la sequía	Pág. 4
• Relativas a la estequiometría	Pág. 4
• Relativas a la composición molecular	Pág. 5
– Relacionadas con los peces	Pág. 5
– Relacionadas con la interacción sequía + peces	Pág. 5
METODOLOGÍA EMPLEADA	Pág. 6
– Descripción de la zona de estudio	Pág. 6
– Diseño experimental	Pág. 7
– Excreción de amonio por parte de los peces	Pág. 8
• Protocolo	
• Tratamiento de datos	
– Análisis del epilítion	Pág. 9
• Protocolo	
– Análisis de nutrientes	Pág. 11
❖ Riera	Pág. 11
• Protocolo	
❖ Consumo de nutrientes	Pág. 11
• Protocolo	
• Tratamiento de datos	
– Análisis elemental	Pág. 12
• Protocolo	
• Tratamiento de datos	
– Tratamiento de datos estadísticamente	Pág. 14
RESULTADOS	Pág. 14
– Nutrientes Riera del Llèmena	Pág. 14
– Excreción de amonio por parte de los peces	Pág. 14
– Atributos estructurales del epilítion	Pág. 15
– Consumo de fosfato y amonio por parte del epilítion	Pág. 17
• Relación aporte vs. consumo de amonio	

– Estequiometría muestras Riera del Llémena	Pág. 20
• Músculo e hígado de peces	
• Macroinvertebrados	
DISCUSIÓN	Pág. 24
CONCLUSIONES	Pág. 26
BIBLIOGRAFÍA	Pág. 27

## INTRODUCCIÓN

Se define ecosistema como cualquier parte de la biosfera, constituida por numerosos elementos, los cuales están relacionados por una serie compleja de flujos de materia y de energía, además de bucles interactivos. Un ecosistema está constituido por un componente abiótico y un componente biótico, comunidad de seres vivos que se adaptan a las características ambientales a la vez que las modifican. Estos componentes interactúan entre sí siguiendo patrones complejos (Elosegi & Sabater, 2009).

La biota de los ecosistemas fluviales está conformada por microorganismos (bacterias, hongos y algas) que en pequeños arroyos forman el biofilm, productores primarios (macrófitos), invertebrados y peces. La presencia y abundancia de estos últimos, incluso su tamaño, puede causar importantes efectos sobre otros niveles tróficos, y finalmente sobre el funcionamiento del ecosistema (Allan, 1969). Esto se denomina cascada trófica, se trata de un efecto encadenado que producen unos niveles tróficos sobre otros. Estos animales, además, resultan muy sensibles a las perturbaciones, como la detracción del caudal, que compromete su supervivencia (Elosegi & Sabater, 2009).

Un ecosistema lleva a cabo diversas funciones que generan beneficios para la calidad de vida de las sociedades humanas, esto se define como servicios ecosistémicos. Así mismo, la actividad del ser humano puede afectar de manera notable las características de un ecosistema, por lo que es importante estudiar y conocer su estructura y funcionamiento (Ferrer, 2012).

### – Sequía y arroyos del mediterráneo

Los arroyos mediterráneos son ecosistemas muy fluctuantes, caracterizados por sequías predecibles en verano que a menudo implican la intermitencia del flujo, provocando regímenes hidrográficos y funcionamientos ecológicos marcadamente diferentes (Elosegi & Sabater, 2009). Comprender los efectos del secado de este es necesario para poder predecir las posibles consecuencias para sistemas fluviales con riesgo de desecación (Mas, 2014). Y es que, cuando se interrumpe el flujo de un arroyo, no sólo se reduce la disponibilidad de hábitat, sino también su adecuación puede ser alterada por los cambios físico-químicos relacionados con la fragmentación del curso del agua.

Situaciones de sequía pueden llevar, por ejemplo, a un incremento en la temperatura del agua, y a un crecimiento microbiano y su actividad, y estos microorganismos, a través de sus actividades enzimáticas, pueden transformar polímeros recalcitrantes en formas de carbono más fácilmente asimilables, mejorando así el valor nutricional de los consumidores secundarios (Graça, 2001). Por tanto, se espera que las temperaturas más cálidas proporcionen recursos de mayor calidad para transmitir a las cadenas alimentarias.

- Epilimon

Las uniones algales presentes en el agua dulce pertenecen al fitoplacton o al fitobentos. Este último término incluye todos los grupos algales que no flotan libremente en el agua. Está conformado por varias asociaciones algales: el epifitton, el epizoon el epipelon y el epilimon. Este último es un biofilm que crece sobre las superficies rocosas o cantos rodados (Roldán & Ramírez, 1992).

- Macroinvertebrados

Los invertebrados juegan un papel fundamental en la transferencia de recursos basales (biofilm, macrófitos, detritus, etc) hacia los consumidores superiores de las redes tróficas (vertebrados acuáticos, aves), y constituyen el principal recurso alimentario para muchas especies de peces. En el caso del biofilm, la respuesta a la presión de los macroinvertebrados herbívoros se puede detectar de varias maneras, ya que mientras que la biomasa total se reducirá, la actividad fotosintética y la tasa de recambio de la comunidad aumentará (Elosegi & Sabater, 2009).

- Papel de los peces en la dinámica de nutrientes (*Barbus meridionalis*)

Los peces pueden desempeñar importantes funciones en la dinámica de nutrientes de los arroyos. La acumulación de nutrientes tiene el potencial de generar áreas de mayor actividad biogeoquímica. Estos peces pueden generar áreas de mejora de la tasa de reciclaje de nutrientes o hotspots biogeoquímicos, que pueden influir en la productividad primaria en los ecosistemas terrestres y acuáticos. Estos focos de actividad influyen también en los patrones de remineralización de nutrientes, pudiendo alterar su dinámica (Capps & Flecker 2013).

El pez con el que se trabaja en este estudio es el que predomina en la riera del Llàmena y en la zona noreste de Cataluña, el *Barbus meridionalis* o Barbo de montaña. Este pez presenta una estrategia alimenticia principalmente bentónica, asociada a su morfología corporal y bucal. En base a estudios de contenidos estomacales, se ha sugerido que se alimenta principalmente de quironómidos, efemerópteros, presas terrestres y anfípodos. Presenta también abundancia de detritos aunque estos podrían tener relación con el tipo de ingesta (Zamora, 2011).

Los detritus son la principal vía de energía y flujo de materiales en la mayoría de los ecosistemas, siendo compatible con los niveles tróficos superiores y una importante fuente de regeneración de nutrientes orgánicos. Pérdidas en la cantidad de detritívoros podrían alterar los ecosistemas (Taylor, 2006).

- Dinámica de nutrientes

Los nutrientes son solutos, materiales que se encuentran químicamente disueltos en el agua, esenciales para la vida, entre los que se encuentran cationes y aniones. Estos generalmente se encuentran en baja concentración pero resultan esenciales para el



crecimiento, mantenimiento y reproducción de ciertos organismos. Entre los nutrientes esenciales destacan el N y el P por su importancia biológica (Gómez)

El N y el P pueden llegar a ser limitantes de determinados procesos si su concentración en el medio es demasiado baja para suplir la demanda biológica. En general, las concentraciones de P tienden a ser menores que las de N en los medios acuáticos debido a su menor movilidad (al ser adsorbido por los sedimentos) y por lo tanto suele ser el nutriente limitante de la producción primaria.

El estudio de la dinámica de nutrientes es importante porque permite conocer las variaciones de su disponibilidad en el medio y entender el funcionamiento de estos ecosistemas y además aporta información útil para el diseño de planes de gestión de calidad del agua y la adopción de medidas para su conservación.

En los sistemas acuáticos los nutrientes pueden aparecer bajo varias formas químicas. En el caso del N este puede estar presente en la columna de agua como nitrógeno disuelto o particulado y puede ser orgánico o inorgánico (en forma de nitratos y amonio). El P también se puede encontrar en estas formas y un 99% del fósforo inorgánico se encuentra en forma de fosfato.

Dado que el aporte externo de nutrientes a los sistemas acuáticos no es continuo, el reciclado interno de nutrientes es fundamental para asegurar el funcionamiento del sistema. Además existe una elevada variabilidad espacial en la disponibilidad de nutrientes en los sistemas acuáticos, teniendo en cuenta que muchos factores ambientales presentan una elevada variabilidad. Esta es especialmente acusada en sistemas acuáticos de escaso caudal como los sistemas temporales de zonas áridas o los localizados en el área del Mediterráneo en los que los efectos de la interacción agua-sedimento son mucho más notorios al no existir un caudal de agua suficiente para diluir tal efecto (Canals, 2006).

#### – Estequiometría

Uno de los puntos importantes de este estudio es la estequiometría, ya que determinar la estequiometría de una comunidad permite relacionar posibles desequilibrios entre C, N y P en los diferentes compartimentos y los procesos que tienen lugar en el ecosistema. Las proporciones de C, N y P pueden indicar la ruta metabólica que la comunidad necesita utilizar para obtener estos elementos. Al mismo tiempo, si la composición de los recursos difiere mucho de la relación estequiométrica característica de la comunidad, la tasa de descomposición del material puede cambiar, y la calidad del alimento puede limitar el crecimiento de los consumidores. La composición elemental de la comunidad bentónica microbiana depende, también, de la proporción de los distintos grupos (bacterias, hongos, algas), por lo que informa sobre la composición de la misma (Elosegi & Sabater, 2009).

En el paso entre niveles tróficos sucesivos ocurre un cambio en las proporciones isotópicas, debido al propio metabolismo de los compuestos de carbono y nitrógeno. Los tejidos animales se enriquecen levemente en C respecto a su comida, pero el enriquecimiento es mayor en

nitrógeno. La abundancia relativa de C respecto a N y P se halla estrechamente asociada con la tasa de crecimiento tanto en autótrofos como heterótrofos. Como principio general, los elementos limitantes se transfieren en la red trófica con una alta eficiencia. Cuando un consumidor tiene una dieta con cocientes C:N o C:P elevados, el N y P son utilizados con una alta eficiencia por el animal, mientras que buena parte del C no se asimila y es rechazado, excretado o respirado (Cross *et al.* 2003).

## OBJETIVOS

The main purpose of this project is to evaluate the drought effect (caused both by Mediterranean climate and by human activity) and the presence of fishes on a given ecosystem.

As a more specific goal is to study of the influence of hydrological alteration in:

- nutrients uptake by the epilition
- mineralization rates
- fishes, epilition and macroinvertebrates stoichiometry

## HIPÓTESIS

Las hipótesis de partida se pueden diferenciar en función de la variable de estudio (sequía, peces y sequía + peces).

- Relacionadas con la sequía

- Relativas a la estequiometría

a. La variación en la proporción de nutrientes genera cambios en la actividad microbiana, en la producción y en los recursos basales. Lo que genera efectos bottom-up que pueden provocar diferencias en la velocidad de crecimiento y de producción secundaria en los arroyos con flujo temporal vs. permanente. Sin embargo, los organismos podrían compensar el déficit de nutrientes cuando ellos mismos comen menos comida nutritiva (Mas, 2014).

b. Los consumidores resultarían más homeostáticos y deberían regular sus proporciones de nutrientes dentro de un rango estrecho. Las limitaciones, tanto evolutivas como fisiológicas, determinan la cantidad de energía y el equilibrio de los elementos necesarios para el crecimiento, la reproducción y mantenimiento. En este caso los consumidores resultarían más ricos en nutrientes que sus posibles fuentes de alimento. Tal disimilitud entre los recursos y la estequiometría resultaría en un desequilibrio elemental, que puede limitar el crecimiento y desarrollo de estos consumidores. Por otra parte, si los cambios inducidos por el clima en la calidad de los recursos no proporcionan un suministro equilibrado de los elementos clave para los consumidores, efectos más drásticos podrían producirse debido a la falta de correspondencia entre el aumento de la demanda metabólica de los consumidores y la falta de recursos para satisfacerlas.

c. De acuerdo con la hipótesis de la tasa de crecimiento (Elser *et al.* 2003), se espera que los organismos con tasas de crecimiento más altas presenten un mayor contenido de P debido al ARN ribosomal rico en P.

- Relativas a la composición molecular
  - a. Se puede esperar también que el contenido de polisacáridos, aminoácidos y lípidos sea menor en los recursos bentónicos de una corriente intermitente, y una proporción inferior de carbono:nutrientes (Mas, 2014).

- Relacionadas con los peces

- a. Los peces pueden jugar un papel importante en la dinámica de nutrientes en los ecosistemas de agua dulce a través del secuestro y remineralización de los nutrientes y esto puede influir en la biomasa de los productores primarios y la productividad (Flecker *et al.* 2013).

- b. De manera alternativa, el barbo podría modificar la composición de la comunidad de macroinvertebrados al escoger sus presas de manera selectiva (Belmonte, 2013).

- Relacionadas con la interacción sequía + peces

Inicialmente, se asume que los arroyos que se secan de manera periódica tendrán un número menor de peces que los arroyos permanentes.

En el proyecto se evaluará el efecto de la adición o exclusión de peces en un ecosistema dado. En un principio, la exclusión de peces debería de proporcionar datos más similares a la situación que se presenta en el sitio intermitente mostrando la acción de los macroinvertebrados que podrán vivir sin la presión ejercida por los peces. Así mismo, la adición de peces permitirá evaluar cómo estos animales interaccionan con un ecosistema y cómo esta acción puede variar en función de la historia del lugar. Si es cierto que los peces ejercen una gran influencia en el medio, se puede suponer que en el sitio permanente evitarían que los macroinvertebrados controlaran el desarrollo algal mientras que en el sitio intermitente podrían llegar a simular las características del sitio permanente.

En ambos casos, la concentración de nitrato y fosfato es elevada, por lo que inicialmente el epilíton puede encontrarse saturado. Aumentando el número de peces puede ocurrir que causen un efecto barrido o escoba, ya que estos animales son bentónicos y se alimentan de detritus.

## METODOLOGÍA EMPLEADA

### Descripción de la zona de estudio

Se escogió como escenario para llevar a cabo el experimento la Riera del Llèmena, a la altura de Sant Gregori, porque se sabe de la existencia de una presa en esta zona, que emplean los agricultores en verano con el fin de regar las tierras de cultivo próximas. Esta presa hace que el caudal de la riera se vea reducido y la materia particulada queden retenida, lo que tiene un efecto en todo el ecosistema a partir de esta.

Por tanto, se puede diferenciar un tramo cuyo caudal es permanente a lo largo del año y que se corresponde con la parte de la riera previa a la presa (Sitio 1), y un tramo con un caudal intermitente, que se corresponde con la parte situada aguas abajo (Sitio 2).



**Figura 1.** Localización geográfica de la riera del Llèmena junto al municipio de Sant Gregori e imagen de la presa situada entre los dos tramos de análisis y que afecta al sitio 2 de la riera. En el círculo azul se encuentra el tramo correspondiente al sitio 1 del estudio y en granate al sitio 2. La flecha verde señala el punto intermedio donde se localiza la presa.

Antes de comenzar el experimento se caracterizaron ambos sitios y se diferenciaron tres zonas (A, B y C) en cada uno de ellos, que se emplearían para estudiar la variabilidad ambiental.

En base a la cartografía realizada, se puede señalar que los dos tramos fluviales tienen características parecidas con el lecho fluvial cubierto por rocas, cantos rodados y arena. Sin embargo, las rocas y arena son más abundantes en el sitio permanente, mientras que los cantos rodados dominan en el sitio intermitente. Así mismo, este sitio presenta una menor colonización algal que el sitio permanente. Las zonas establecidas en el sitio permanente tienen una sección ligeramente más grande que en el sitio intermitente ( $2,58 \pm 0,12$  y  $1,82 \pm 0,78$  m<sup>2</sup> respectivamente), sin embargo la profundidad máxima es similar (entre 26,5 y 30 cm), las diferencias no son estadísticamente significativas.

El caudal en el sitio 1 es cuatro veces superior que en el sitio 2 (800 L/min frente a 206 L/min).

En ambos tramos predomina la presencia de *Barbus meridionalis* (BM) (en el sitio 1 un 99,80% y en el sitio 2 un 93,15%). Sin embargo la densidad es tres veces superior en el sitio 1 (0,6 individuos/m<sup>2</sup> y 0,2 individuos/m<sup>2</sup> en el sitio 2). Estos valores, junto con los del caudal se sabe que son debidos a la presencia de la presa. La distribución del tamaño de estos peces es similar, las diferencias no son estadísticamente significativas.

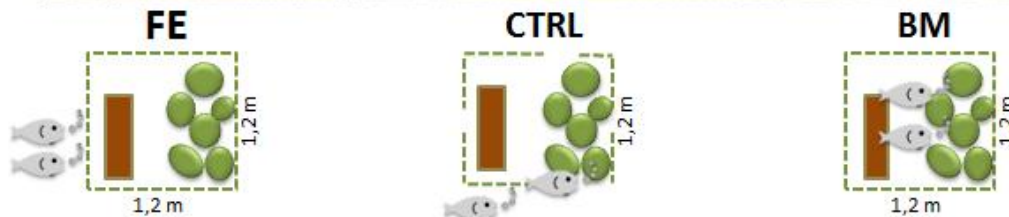
En cuanto a las condiciones físico-químicas, estas resultaron prácticamente idénticas en los dos sitios, exceptuando la sección A del sitio 2, donde la temperatura era algo mayor. Esto podía deberse a que la zona estaba más descubierta y no había muchos árboles que proporcionaran sombra.

### Diseño experimental

Con el fin de estudiar tanto el efecto de la sequía como el de la presencia de peces en esta riera, se construyeron unas jaulas o enclosures, cada una de las cuales se emplearía para un tratamiento diferente.

- Enclosures FE (Fish Enclosure): consiste en una jaula formada por una malla de red de 1,2 metros de lado y anclada al suelo por 8 varas de hierro. Esta jaula está completamente cerrada y se usa para evitar la entrada de peces.
- Enclosures Ctrl (Control): esta jaula presenta las mismas dimensiones, pero en este caso se realizan unos agujeros de 20x20 cm en cada uno de los laterales, de esta manera los peces podrán atravesarla. Esto permite observar exactamente como la sequía ha afectado al epilíton y a la población de macroinvertebrados al circular en su interior los peces que habitan la sección objeto de estudio.
- Enclosure BM (*Barbus meridionalis*): es una jaula igual que las anteriores, completamente cerrada, con la diferencia de que en este enclosure se añade un número determinado de peces (n = 10). De esta manera se puede estudiar el efecto de los peces en el sustrato al contrastar los resultados con los obtenidos en el tratamiento de exclusión (FE).

Así mismo, en todas las enclosures, se rellenó el fondo con cantos rodados colonizados extraídos de las zonas y una baldosa, esta última sirve para evaluar la acumulación de biomasa y algas a lo largo del experimento.



**Figura 2.** Imagen procedente de la sección C del sitio 1 de la riera del Llèmena, donde se encuentran localizadas las tres enclosures correspondientes a cada tratamiento. Estos tratamientos son FE (Fish enclosure), Ctrl (control) y BM (*Barbus meridionalis*) y vienen esquematizados en los dibujos situados bajo la imagen.

Al inicio del experimento se tomaron muestras del agua de ambos sitios para analizar la concentración de nutrientes presentes ( $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4$  y  $\text{PO}_4$ ). Así mismo, se evaluó la excreción de amonio por parte de los peces en cada sitio.

El experimento se llevó a cabo durante 15 días (la segunda quincena del mes de mayo). Se tomaron piedras al séptimo y al quinceavo día para analizar el epilíton y el consumo de nutrientes por parte de este. El último día también se tomaron muestras de macroinvertebrados y epilíton y se pescaron los peces que se habían añadido a la enclosure BM, todo ello para el análisis estequiométrico.

### Excreción de amonio por parte de los peces

La técnica empleada consiste en evaluar la concentración de amonio excretado por los peces a lo largo de un tiempo determinado, permitiendo conocer como la presencia de estos animales puede llegar a influir en los procesos que se producen en el ambiente en el que se encuentran.

#### – Protocolo

##### • Obtención de muestras

Con el fin de evaluar la concentración de amonio excretada por los peces propios de cada tramo de la riera se emplearon seis acuarios, cada uno de ellos con 2 litros de agua. En cinco de estos se puso un pez (el cual se había obtenido previamente mediante la técnica de la pesca eléctrica y había sido caracterizado) y en uno no, el cual se empleó como control.

Nada más incorporar el pez al acuario se tomó una muestra, esta se correspondería al tiempo cero ( $t = 0$ ). El experimento se llevó a cabo a lo largo de cuatro horas, tomando muestras cada hora. En cada tiempo se rellenabas tres viales con 10 mililitros de agua del acuario, la cual era

previamente filtrada. Estas muestras se dejaban en una nevera y eran congeladas hasta su posterior análisis.

Al mismo tiempo que se tomaban las muestras se medía el oxígeno y la temperatura de cada acuario, con el fin de evaluar si las condiciones eran adecuadas para el pez o si este se encontraba bajo una situación de mucho estrés.

- Análisis de las muestras

El protocolo que se sigue en el laboratorio es el descrito por Reardon *et al.* (1966).

- Tratamiento de datos

Se tienen los valores de la concentración de amonio por pez y tiempo en  $\text{mg NH}_4/\text{L}$ . Para saber la velocidad de excreción se calcula la diferencia de las concentraciones por hora y se hace el promedio ( $\text{mg NH}_4/\text{L}\cdot\text{h}$ ). Como también se conoce el volumen de agua presente en el acuario y el peso de cada pez, se puede calcular la cantidad de amonio por hora ( $\text{mg NH}_4/\text{h}$ ) y la cantidad de amonio por hora y gramo de pez ( $\text{mg NH}_4/\text{h}\cdot\text{g}$ ).

A partir de este último valor, se puede realizar una gráfica de barras que represente la tendencia que sigue la excreción de amonio en función del peso del pez que lo excreta. También se puede realizar un gráfico de dispersión con estos datos y obtener una ecuación que relacione el peso del pez con la cantidad de amonio que excreta. Todos los peces puestos en las enclosures BM habían sido caracterizados, por lo tanto se conocía su peso. Con la ecuación obtenida anteriormente se puede calcular, entonces, la cantidad de amonio que esos peces habrían excretado de manera aproximada ( $\text{mg NH}_4/\text{h}\cdot\text{g}$ ) y estos valores se multiplican por el peso del pez correspondiente ( $\text{mg NH}_4/\text{h}$ ). Se hace el sumatorio de estos últimos valores y se divide por el volumen de la enclosure ( $\text{mg NH}_4/\text{h}\cdot\text{L}$ ). Finalmente este valor se multiplica por 1.000 ( $\mu\text{g NH}_4/\text{h}\cdot\text{L}$ ).

### Análisis del epilíton

- Protocolo

- Obtención de muestras y conservación

Las piedras que se emplearon para el análisis del consumo de fosfato y amonio fueron rascadas una vez terminado el experimento. Para ello se empleó un “cell scraper” o un cepillo de dientes. El epilíton obtenido se guardó en botes de plástico y se congeló hasta su posterior análisis. La superficie rascada fue dibujada en papel de aluminio, de manera que más adelante se pudiera conocer su valor (en  $\text{m}^2$ ).

- Análisis de las muestras

Estas muestras se emplearon para obtener el valor de diversas variables: clorofila, AFDM, DM, MI e AI.

En primer lugar los filtros (GFF 0,45  $\mu\text{m}$ ) que se iban a emplear se dejaron un mínimo de 24 horas en la estufa y antes de su uso estos fueron tarados.

Se descongelaron las muestras y, mediante una bomba, se filtraron, separando la parte sólida (que se emplearía para obtener el valor de AFDM) de la parte líquida (empleada para conocer el valor de la clorofila).

La parte sólida se dejó en la estufa un mínimo de 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo estas muestras fueron pesadas. La diferencia entre este peso y el del filtro tarado proporciona

el valor del peso seco (DM) de la muestra (en gramos). A continuación, la muestra (junto con el filtro) se colocaba en un recipiente de cerámica, previamente tarado, y se ponía en la mufla durante 4 horas a 440°C. Generalmente se dejaba todo un día para que la mufla recuperara la temperatura ambiente y estas muestras volvían a ser pesadas. La diferencia entre este peso y el peso previo a la mufla proporciona el valor de AFDM (Ash Free Dry Mass) (en gramos), es decir, de la materia orgánica que estaba presente en la muestra y que ha sido incinerada.

Para obtener tanto el valor de DM como de AFDM en g/m<sup>2</sup> se ha de calcular el área de la superficie raspada. Para ello se dibuja la superficie de la piedra del papel de aluminio en papel milimetrado, se recorta y se pesa. Se sabe que este papel (Canson milimetrado) presenta una relación de 100g/m<sup>2</sup>. Por tanto, en función del peso se puede obtener el área de todas las superficies raspadas.

La parte líquida se empleó para extraer la clorofila *a* presente en la muestra, y para ello se siguió el siguiente protocolo:

- Se añaden 20 mL de acetona al 90% en cada vial hasta cubrir totalmente la muestra
- Se guarda la muestra en la nevera durante 24 horas. El disolvente orgánico extrae la clorofila de las muestras
- Se someten las muestras a un baño de ultrasonidos durante 2 minutos
- Se leen las absorbancias a 430, 665 y 750 nm, mediante un espectrofotómetro. La clorofila *a* absorbe principalmente a los 665 nm. El valor a 750 nm se utiliza para descontar la turbidez de la muestra, que no debe ser menor a 0,001 (en caso de no serlo la muestra se filtra de nuevo). El valor de la absorbancia a 430 indica la concentración de carotenoides y otros pigmentos accesorios.
- Se estima la concentración de clorofila mediante la siguiente ecuación:

$$Chl\ a = 11,4 (A_{665} - A_{750})V / (LS)$$

donde Chl *a*: clorofila *a* (mg/m<sup>2</sup>), A<sub>x</sub>: absorbancia a x nm, V: volumen del extracto (mL); L: longitud de la cubeta del espectrofotómetro (cm), y S: superficie de sustrato muestreado (cm<sup>2</sup>).

Con los valores de la absorbancia a 430 nm y a 665 nm se puede calcular el índice de Margalef:

$$MI = abs\ 430 / abs\ 665$$

Este índice proporciona información acerca del estado de la clorofila, si es elevado quiere decir que las algas están más envejecidas o han acumulado pigmentos accesorios, mientras que si es bajo indica que la comunidad algal es más joven.

Así mismo, con los valores de AFDM y de clorofila *a*, se puede obtener el AI (Autotrophic Index):

$$AI = AFDM / Chl - a$$

Este valor indica si dominan las algas en el conjunto de la biomasa, cuanto menor es su valor mayor es la dominancia.



## Análisis de nutrientes

### ❖ Riera

#### – Protocolo

- Obtención de muestras

Se tomaron muestras para analizar  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4$  y  $\text{PO}_4$  en la caracterización del arroyo y al inicio del experimento. Para ello se cogió un volumen de unos 10 mililitros de agua que fue filtrado (filtros GFF 0,45  $\mu\text{m}$ ), guardado en viales y congelado hasta su posterior análisis. Para cada nutriente se tomaron tres replicas.

- Análisis de las muestras

Para el análisis de la concentración de nitrato presente en las muestras se empleó un kit específico (AQUANAL<sup>®</sup>-plus Nitrat ( $\text{NO}_3$ ) de FLuka), que permite medir la concentración de este compuesto en un rango de 0,1 a 30 mg/L. El protocolo a seguir se detalla a continuación:

- Se emplean 5 ml de muestra y se ponen en un vial de vidrio
- Se añade el reactivo 1
- Se agita durante 30 segundos
- Se añade el reactivo 2
- Se agita durante 30 segundos
- Se espera 5 minutos para que ambos reactivos hagan efecto
- Se analiza la muestra en un microespectrofotómetro

Para el análisis de las muestras de amonio se empleó el protocolo descrito por Reardon (1966) y para el análisis de la concentración de fosfato se empleó el protocolo descrito por Murphy & Riley (1962).

### ❖ Consumo de nutrientes

#### – Protocolo

- Obtención de muestras

Se tomó una piedra de cada enclosure (un día por sitio) y se llevaron al laboratorio de experimentación del CEAB de Blanes. Esto se realizó cuatro veces a lo largo del experimento, dos veces por cada sitio (a la mitad y al final del experimento). En este centro se cuantificó el consumo de amonio y fosfato a partir de una adición de concentración conocida. Para ello se emplearon 10 cajas de metacrilato (cámaras de incubación), todas ellas de 10 litros de capacidad. Se les puso 8 litros de agua procedente de un tramo intermedio del arroyo, con el fin de que la situación fuera lo más parecida a la realidad, y a 9 de ellas se les puso una piedra colonizada, cada una de estas procedía de una enclosure. Aquella cámara a la que no se le puso piedra se empleó como control.

Por cada cámara se tomaban tres replicas cada tiempo. Antes de añadir los nutrientes (amonio y fosfato) se tomó una muestra, esta se denominó tiempo -30 minutos. En cuanto se añadieron estas concentraciones se tomaron muestras, y este sería el tiempo 0 minutos. A partir de aquí se recogieron a los 15 y 30 minutos, y a la hora, dos y 4 horas.

Las muestras eran tomadas con una jeringa, filtradas (con filtros GFF 0,45  $\mu\text{m}$ ) y puestas en un falcon. El volumen de cada réplica era de unos 10 mililitros aproximadamente.

Todas las cámaras presentaban una bomba, de manera que el agua se mantuviera a lo largo de toda la incubación, evitando la formación de gradientes. Así mismo, se tomaron los valores de oxígeno y temperatura de las cámaras varias veces, para verificar que estos se asemejaban a los presentes en el arroyo. En caso de que la temperatura fuera superior a la deseada se añadía hielo al agua del baño.

Una vez obtenidas todas las muestras, estas se congelaron hasta que el laboratorio de Análisis de agua del CEAB las analizó.

- Análisis de las muestras

Para el análisis se empleó un autoanalizador (Automatic Continuous Flow Analyser FUTURA – ALLIANCE INSTRUMENTS) esta es una máquina diseñada para medir diferentes sustancias químicas en un número de muestras elevado, con una asistencia humana mínima. En el caso del fosfato la densidad óptica se medía con una longitud de onda de 880 nm y el amonio a 360 nm.

- Tratamiento de datos

Una vez se tienen los valores de la concentración de amonio y fosfato para cada tiempo, se elabora una gráfica de dispersión con los datos de la concentración de cada nutriente (en  $\mu\text{mol/L}$ ) por el tiempo (min) y se ajustan los datos a una curva exponencial. (Proia, 2012)

$$y = ae^{-bx}$$

Este valor exponencial es el coeficiente de la velocidad de consumo (K), en  $\text{min}^{-1}$ , y en función de si es positivo o negativo indica un consumo o una excreción del nutriente respectivamente.

La velocidad de consumo (U) se obtiene con la siguiente ecuación:

$$U = \frac{(C_i \cdot V_i) - (C_f \cdot V_f)}{\text{Área} \cdot \text{tiempo}_f}$$

donde  $C_i$ : concentración inicial ( $\mu\text{mol/L}$ ),  $V_i$ : volumen inicial (L),  $C_f$ : concentración final ( $\mu\text{mol/L}$ ),  $V_f$ : volumen final (L), área: área de la piedra ( $\text{m}^2$ ) y  $\text{tiempo}_f$ : tiempo final (min).

Esta velocidad de consumo también se puede dividir por el valor de la clorofila ( $\mu\text{mol/mg chl} \cdot \text{min}$ ) y por la biomasa ( $\mu\text{mol/g AFDM} \cdot \text{min}$ ).

### Análisis elemental

- Protocolo

- Obtención de muestras

Para el epilíton se tomó una piedra de cada enclosure y se rascó la superficie, y para macroinvertebrados fueron cinco las piedras rascadas. Todas las muestras se guardaron en botes de plástico y se congelaron.

Una vez concluido el experimento se verificó que todos los peces añadidos permanecían en su enclosure. Estos fueron pescados mediante pesca eléctrica y sacrificados con sobredosis de anestesia (aceite de clavo en alta concentración). Se guardaron en bolsas de plástico y se congelaron.

- Análisis de las muestras

El objetivo de este análisis era conocer la relación C:N:P de distintos componentes del ecosistema: comunidades de macroinvertebrados, epiliton y peces.

En la universidad se llevó a cabo la preparación de las muestras. Con las de epiliton se realizó una filtración, y la parte sólida se guardó en botes pequeños. Los macroinvertebrados fueron separados por familias y organizados por sitio y tratamiento, con el fin de obtener un peso adecuado para un correcto análisis y los peces fueron diseccionados y se les extrajo una porción de tejido muscular y el hígado.

Todas estas muestras fueron congeladas a menos 80°C durante dos horas, liofilizadas durante 24 horas y finalmente homogeneizadas mediante un mortero. Se guardaron en un desecador hasta ser analizadas en los Servicios Técnicos de la UdG.

En este Servicio se analizó el carbono y nitrógeno presente. Allí, las muestras fueron pesadas para obtener una cantidad aproximada de 1,5 mg, necesaria para el análisis correcto. El contenido de C y N se analizaron con un espectrómetro de masas que complementa el analizador elemental de carbono y nitrógeno mediante combustión, de forma que ambos resultados se obtuvieron a la vez. Se utilizan diferentes estándares para calibrar la señal isotópica, en este caso se empleó acetanilida. Los estándares se analizaron varias veces para garantizar la linealidad. Los resultados se referencian a la composición isotópica del N atmosférico para el N y de la roca carbonatada PeeDee belemnita (PDB) para el C (Elosegi & Sabater, 2009).

La concentración de fosfato se determinó en el laboratorio de la universidad previa digestión mediante el protocolo de Murphy & Riley (1962).

- Tratamiento de datos

El objetivo era conocer el nivel de fósforo presente en la muestra, por lo que la concentración de fosfato obtenida (en  $\mu\text{mol PO}_4/\text{L}$ ) se transformó a  $\mu\text{g P}$  de la siguiente manera:

$$\mu\text{g P} = \frac{\mu\text{mol PO}_4}{L} \cdot \frac{30,97 \mu\text{g P}}{\mu\text{mol PO}_4} \cdot V(L)$$

donde V: volumen de muestra total analizada (L).

Para tener el porcentaje total de fósforo presente en la muestra esta cantidad se dividió por el peso de la muestra analizada y se multiplicó por 100.

Una vez que se tuvieron todos los valores totales de carbono, nitrógeno y fósforo (en %), se calcularon las relaciones C:N, C:P y N:P.

### Tratamiento de datos estadísticamente

Con el fin de conocer si las diferencias observadas para cada variable, sitio y tratamiento eran significativamente diferentes se empleó el programa estadístico SPSS (acrónimo de *Statistical Package for the Social Sciences*) y se realizaron ANOVAS de dos factores.

Un ANOVA de dos factores tiene como objetivo estudiar si los valores de una variable dependiente dependen de los niveles de dos factores o de la interacción entre ambas. Existe interacción entre dos factores cuando el efecto de un factor sobre la variable dependiente depende de cuál sea el nivel del otro factor.

## RESULTADOS

### Nutrientes Riera del Llèmena

Comparando los resultados de nutrientes entre ambos sitios (**Tabla 1**) se puede establecer que, de manera general, la concentración de nutrientes disueltos es ligeramente mayor en el sitio 2, aunque en el caso del fosfato estos valores se pueden considerar iguales.

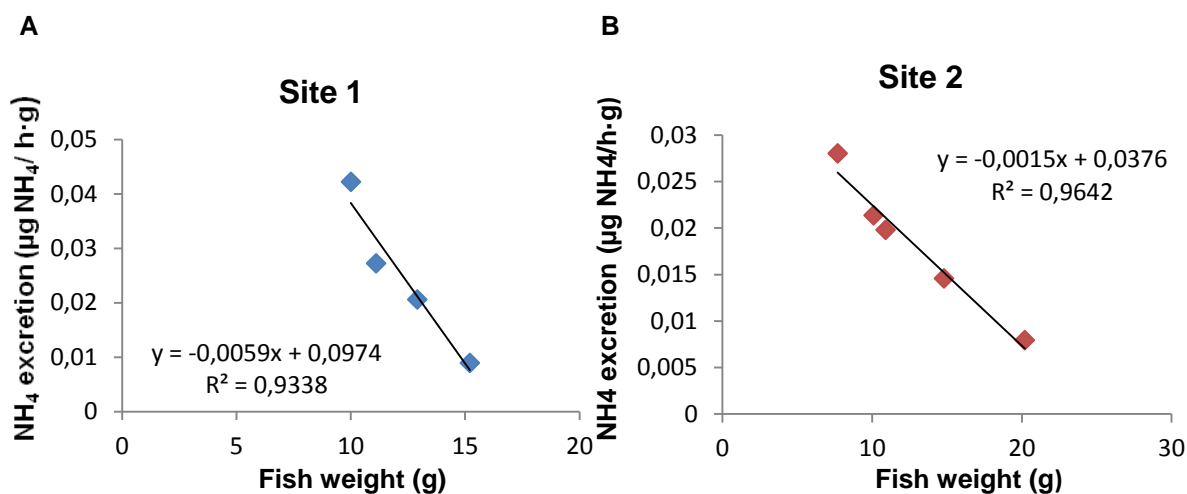
**Tabla 1.** Valores de la media y la desviación estándar (SD) para el fósforo disuelto total (TDP), el fosfato (PO<sub>4</sub>), el amonio (NH<sub>4</sub>), el nitrógeno total disuelto (TDN) y el nitrato (NO<sub>3</sub>) en los dos sitios.

Sitio	Parámetros	TDP (µgP/L)	PO <sub>4</sub> (µgPO <sub>4</sub> /L)	NH <sub>4</sub> (µgNH <sub>4</sub> /L)	TDN (mg/L)	NO <sub>3</sub> (mg/L)
1	Media	24,3	31,6	19,4	2,30	2,05
	SD	±1,50	±0,76	±8,58	±1,46	±0,32
2	Media	35,7	33,0	36,3	3,50	3,02
	SD	±8,64	±3,09	±18,60	±1,66	±1,45

### Excreción de amonio por parte de los peces

Los valores de excreción de amonio, mostraron una relación negativa con el peso del pez en ambos sitios, exceptuando el valor correspondiente al pez del sitio 1 cuyo peso es de 9,2 gramos.

Los resultados se ajustaron a un modelo lineal (**Fig. 3**).

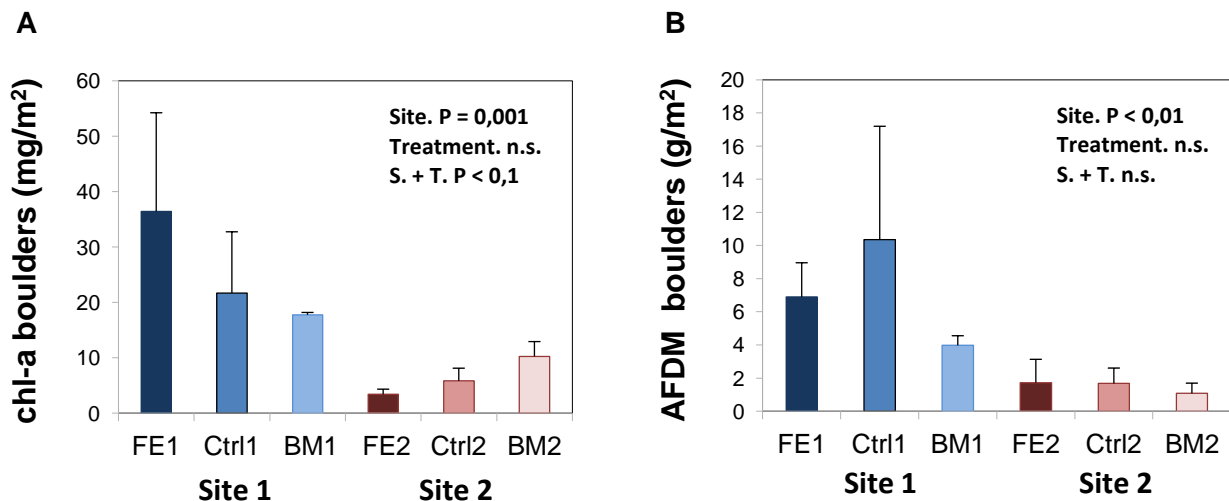


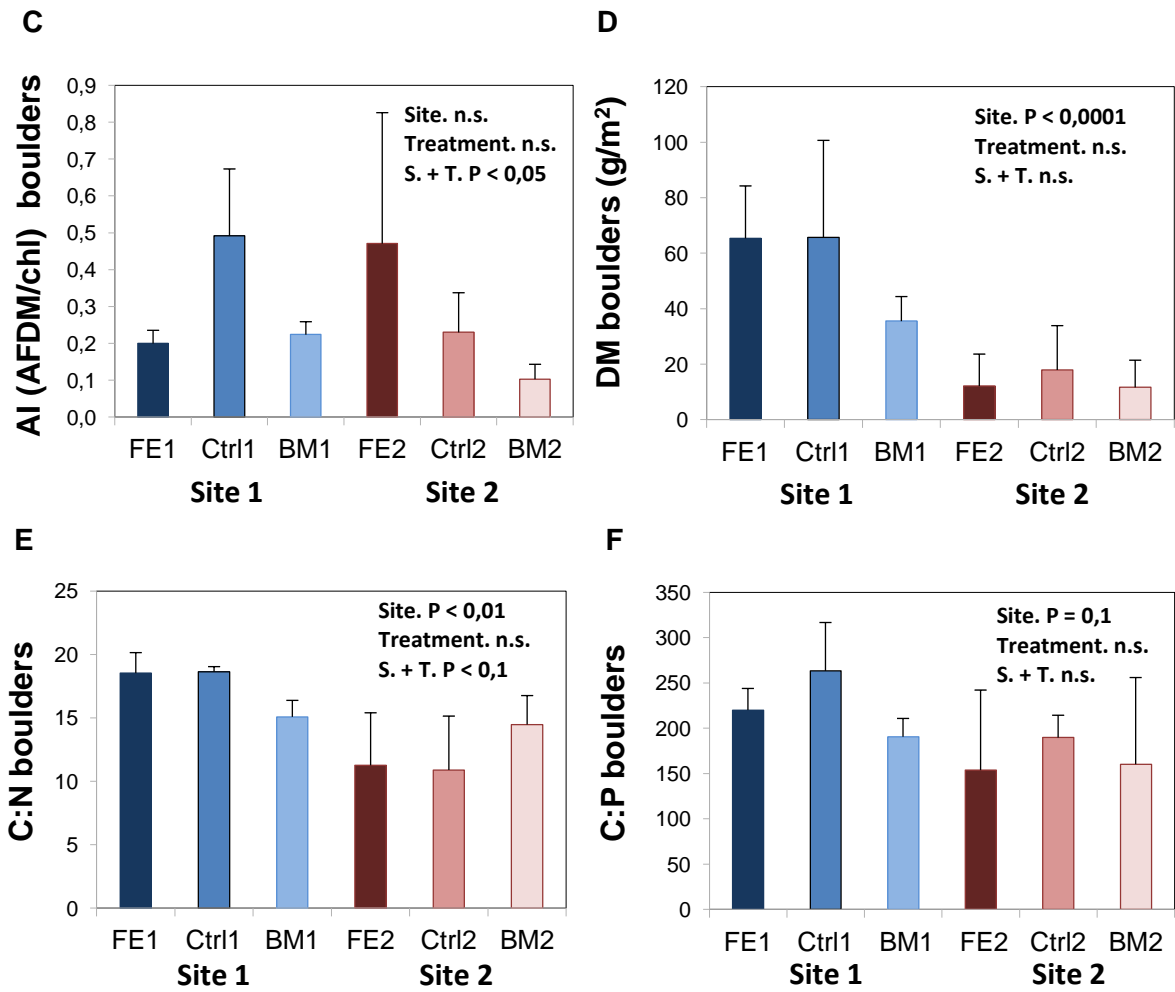
**Figura 3.** Regresión lineal de los valores de excreción de amonio en función del peso así como la ecuación obtenida y el valor de la  $r^2$ , tanto para el sitio 1 (A) como para el sitio 2 (B).

### Atributos estructurales del epilítion

Los resultados obtenidos muestran que cambios tanto en la estructura del epilítion como su consumo de nutrientes difieren entre sitios y/o variaciones en la densidad de peces (**Fig. 4**).

La biomasa algal (clorofila) es superior en el tramo con caudal permanente (unas cuatro veces más) que en el intermitente. Así mismo, se observa un efecto leve del tratamiento que difiere entre tramos (como indica la diferencia parcialmente significativa de la interacción). Mientras que en el tramo permanente la tendencia es que la clorofila disminuya cuando aumenta el número de peces, el tramo intermitente muestra una tendencia opuesta, haciendo que los valores de biomasa del tratamiento BM de los dos tramos acaben convergiendo. Los valores de AFDM, DM y del índice de Margalef siguen un patrón similar al de la biomasa algal (**Fig. 4** y **Tabla 2**), superiores en el tramo permanente, indicando que la acumulación de material es superior con mayor contenido de pigmentos accesorios y de productos de degradación de la clorofila (**Fig. 4 C y E**). En relación al índice de autotrofia (AI), sólo se encuentran diferencias significativas en la interacción, como muestra la respuesta diferencial al tratamiento FE entre tramos: superior al control en el tramo permanente e inferior en el intermitente. Además, se puede señalar que en el tramo intermitente el tratamiento BM favorece a las algas puesto que el valor del índice es menor. De la misma manera, la relación C:N también es ligeramente superior en el tramo permanente (**Fig. 4 E**). Así mismo, al igual que se observa con la biomasa algal, la respuesta al incremento de la densidad de peces es opuesta (diferencia parcialmente significativa en la interacción), aumentan en el tramo permanente y disminuye en el intermitente. Al ser la relación C:N menor en el tramo intermitente se puede deducir que este tramo, a pesar de tener menor biomasa, esta es más nutritiva (se encuentra enriquecida en nitrógeno). Este epilítion también es rico en fósforo puesto que la relación C:P también es significativamente menor (**Fig. 4 F**).





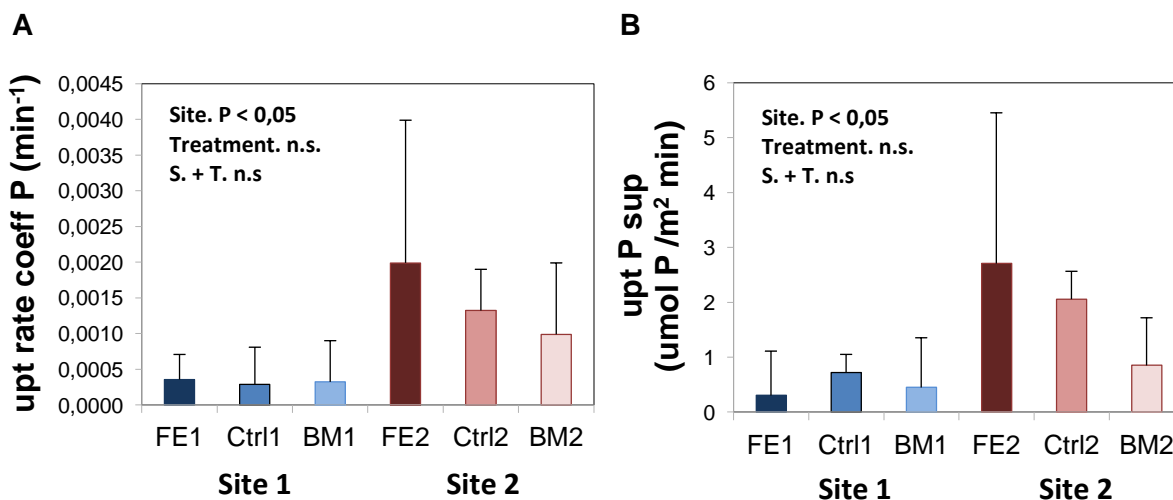
**Figura 4.** Características estructurales del epilithon al final del experimento. **(A)** Valores correspondientes a la cantidad de clorofila (en mg/m<sup>2</sup>), **(B)** biomasa total (Ash Free Dry Mass) (en g/m<sup>2</sup>), **(C)** valores del índice AI (Autotrophic Index), **(D)** valores del peso seco (Dry Mass), **(E)** relación carbono:nitrógeno (C:N) y **(F)** relación carbono:fósforo (C:P). Todas las gráficas muestran la media y la desviación estándar de los resultados para cada sitio y tratamiento (n = 3), así como los resultados de la ANOVA de dos factores realizada.

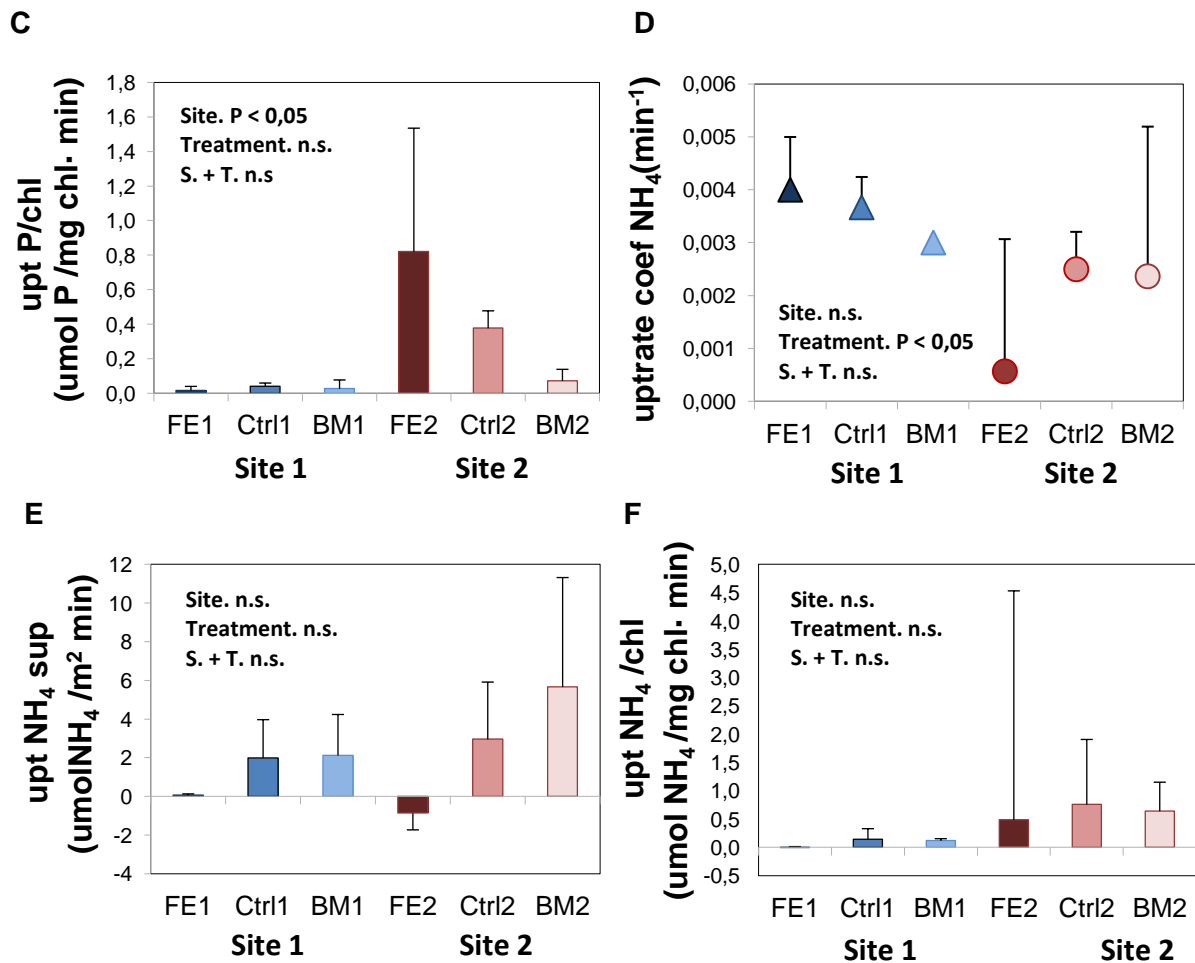
**Tabla 2.** Valores de la media y la desviación estándar (SD) para cada tratamiento (FE, Ctrl y BM) en los dos sitios para todas las variables analizadas (clorofila, AFDM, AI, DM, MI (Índice de Margalef), relación C:N, relación C:P y relación N:P) así como los valores de F y nivel de significación (Sig.) obtenidos al realizar un ANOVA de dos factores (Site y Treatment). Las siglas P.E. hacen referencia a parámetros estadísticos.

Variable dependiente	P.E.	Site 1			Site 2			P.E.	ANOVA		
		FE	Ctrl	BM	FE	Ctrl	BM		Site	Treatment	S * T
Clorofila	Media	36,4	21,7	17,8	3,39	5,84	10,3	F	21,1	0,957	3,36
	SD	17,8	11,1	0,43	0,96	2,30	2,68	Sig.	0,001	0,411	0,070
AFDM	Media	6,36	10,4	3,98	1,73	1,68	1,08	F	10,4	0,978	1,11
	SD	2,07	6,84	0,58	1,41	0,93	0,62	Sig.	0,007	0,404	0,361
AI	Media	0,20	0,49	0,22	0,47	0,23	0,10	F	0,509	1,88	4,55
	SD	0,04	0,18	0,04	0,36	0,11	0,04	Sig.	0,489	0,196	0,034
DM	Media	2,42	2,37	2,42	2,29	2,24	2,43	F	0,518	0,665	0,854
	SD	0,08	0,16	0,05	0,03	0,09	0,13	Sig.	0,485	0,532	0,450
MI	Media	2,42	2,37	2,42	2,29	3,18	2,43	F	36,2	1,28	1,93
	SD	0,08	0,16	0,05	0,03	1,64	0,13	Sig.	0,001	0,313	0,188
C:N	Media	18,5	18,6	15,1	11,3	10,9	14,5	F	16,2	0,005	3,18
	SD	1,62	0,41	1,30	4,15	4,25	2,28	Sig.	0,002	0,995	0,078
C:P	Media	220	263	190	153	189	160	F	4,12	1,17	0,236
	SD	23,9	53,3	20,2	88,5	24,7	95,7	Sig.	0,065	0,344	0,793
N:P	Media	11,9	14,2	12,7	13,1	18,7	10,6	F	0,449	2,54	1,05
	SD	23,9	53,3	20,2	88,8	26,9	95,7	Sig.	0,516	0,121	0,379

### Consumo de fosfato y amonio por parte del epilíton

La comparación entre sitios y tratamientos (**Fig. 5**) muestra que los valores medios de consumo de fosfato es más elevado (unas tres veces más) en el tramo con menor biomasa algal (tramo intermitente) (**Fig. 5 A**). En este tramo, el epilíton resulta ser más eficiente en el consumo de fosfato, lo que también se observa al valorar este consumo por superficie (**Fig. 5 B**) por biomasa (**Tabla 3**) y sobre todo al expresarlo por unidad de clorofila (**Fig. 5 C**). A diferencia del fosfato, el consumo de amonio (**Fig. 5 D**) es parecido en los dos tramos, sin embargo donde se encuentran diferencias significativas es entre tratamientos, disminuyendo en el tratamiento de exclusión del tramo intermitente.





**Figura 5.** Consumo de nutrientes del epiliton al final del experimento. **(A)** Valores de la velocidad de consumo de fosfato (en  $\text{tiempo}^{-1}$ ), **(B)** valores del consumo de fosfato por superficie de piedra (en  $\mu\text{mol P}/\text{m}^2\cdot\text{min}$ ), **(C)** valores del consumo de fosfato por unidad de clorofila (en  $\mu\text{mol P}/\text{mg chl}\cdot\text{min}$ ), **(D)** valores de la velocidad de consumo de amonio (en  $\text{tiempo}^{-1}$ ), **(E)** valores del consumo de amonio por superficie de piedra ( en  $\mu\text{mol NH}_4/\text{m}^2\cdot\text{min}$ ) y **(F)** valores del consumo de amonio por unidad de clorofila (en  $\mu\text{mol NH}_4/\text{mg chl}\cdot\text{min}$ ). Todas las gráficas muestran la media y la desviación estándar de los resultados para cada sitio y tratamiento ( $n = 3$ ), así como los resultados de la ANOVA de dos factores realizada.



**Tabla 3.** Valores de la media y la desviación estándar (SD) para cada tratamiento (FE, Ctrl y BM) en los dos sitios para todas las variables analizadas (velocidad de consumo de fosfato, consumo de fosfato por superficie, consumo de fosfato por unidad de clorofila, consumo de fosfato por biomasa, velocidad de consumo de amonio, consumo de amonio por superficie, consumo de amonio por unidad de clorofila y consumo de amonio por biomasa) así como los valores de F y nivel de significación (Sig.) obtenidos al realizar un ANOVA de dos factores (Site y Treatment). Las siglas P.E. hacen referencia a parámetros estadísticos.

Variable dependiente	P.E.	Site 1			Site 2			P.E.	ANOVA		
		FE	Ctrl	BM	FE	Ctrl	BM		Site	Treatment	S * T
Upt. Rate P	Media	4E <sup>-4</sup>	3E <sup>-4</sup>	3E <sup>-4</sup>	0,002	0,001	0,001	F	5,501	0,420	0,354
	SD	4E <sup>-4</sup>	5E <sup>-4</sup>	6E <sup>-4</sup>	0,002	6E <sup>-4</sup>	0,001	Sig.	0,037	0,667	0,709
U P/sup	Media	0,30	0,72	0,45	2,71	2,06	0,85	F	5,044	0,763	0,890
	SD	0,81	0,33	0,91	2,75	0,51	0,87	Sig.	0,044	0,488	0,436
U P/chl-a	Media	0,02	0,04	0,03	0,82	0,38	0,07	F	7,979	2,323	2,480
	SD	0,02	0,02	0,05	0,72	0,10	,07	Sig.	0,015	0,140	0,125
U P/biomass	Media	0,38	0,35	0,01	1,53	0,77	3,40	F	6,022	0,993	1,76
	SD	0,28	0,36	0,16	0,41	0,70	3,37	Sig.	0,030	0,399	0,213
Upt. Rate NH4	Media	4E <sup>-3</sup>	4E <sup>-3</sup>	3E <sup>-3</sup>	6E <sup>-4</sup>	3E <sup>-3</sup>	2E <sup>-3</sup>	F	0,244	4,521	0,378
	SD	1E <sup>-3</sup>	6E <sup>-4</sup>	5E <sup>-19</sup>	3E <sup>-3</sup>	7E <sup>-4</sup>	3E <sup>-3</sup>	Sig.	0,631	0,037	0,694
U NH4/sup	Media	0,07	1,99	2,12	-0,86	2,96	5,66	F	0,885	0,812	0,843
	SD	0,81	1,78	0,64	12,53	4,27	3,79	Sig.	0,367	0,469	0,457
µmol NH4/chl-a	Media	-4E <sup>-4</sup>	0,14	0,12	0,49	0,76	0,64	F	0,677	0,096	0,053
	SD	0,02	0,19	0,04	4,05	1,15	0,51	Sig.	0,428	0,909	0,948
µmol NH4/biomass	Media	0,07	1,56	0,94	6,37	17,97	4,78	F	3,137	2,071	1,98
	SD	0,18	2,38	0,65	19,10	31,14	5,87	Sig.	0,104	0,172	0,185

– Relación aporte vs. consumo de amonio

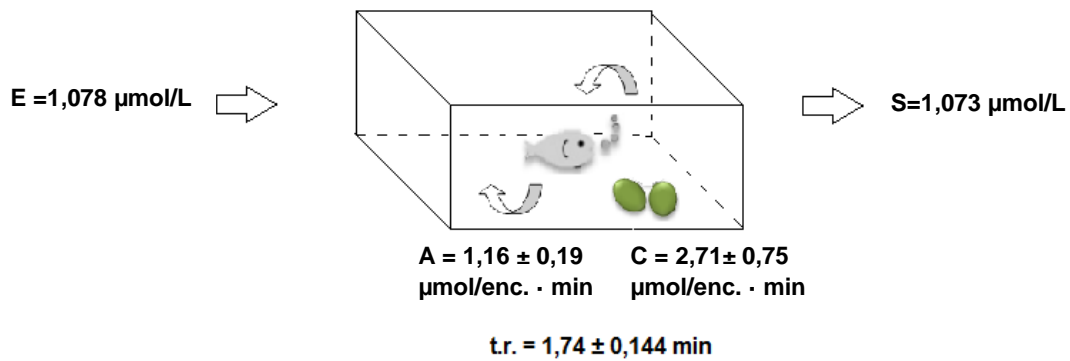
El aporte de amonio por excreción es siempre inferior al consumo, hecho que llevaría a un consumo neto. Sin embargo, la concentración basal es muy elevada en relación al consumo neto, sobre todo en el tramo intermitente y la tasa de renovación bastante elevada (se renueva completamente en menos de 2 minutos).

**Tabla 4.** Valores de aporte y consumo de amonio (en µmol NH<sub>4</sub>/enclosure-min), del amonio presente en el río, el balance de amonio (aporte neto) y la tasa de renovación (en minutos) para cada sección del tramo y para cada sitio.

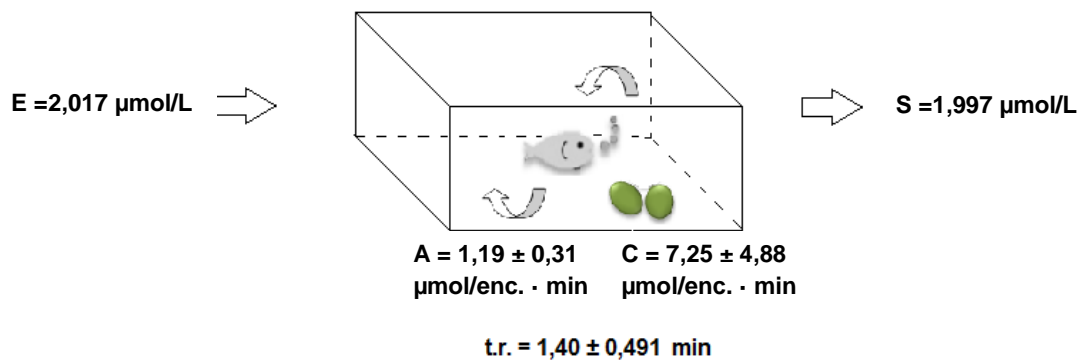
Sitio	Sección	Aporte NH <sub>4</sub>	Consumo NH <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> río	Balance	Tasa de renovación del agua
1	A	1,34	2,24	305	304	1,80
	B	0,956	2,31	394	393	1,58
	C	1,18	3,57	367	365	1,85
2	A	0,902	1,83	726	725	1,95
	B	1,14	8,62	651	643	0,99
	C	1,52	11,30	471	462	1,27

En la **Figura 6**, se muestra un esquema del balance de amonio que se produce en los dos sitios de la riera. Estos valores muestran que la eficiencia del sitio intermitente es casi 100 veces mayor que en el sitio permanente (en el sitio permanente se consume un 0,5% de amonio en un minuto mientras que en el sitio intermitente un 49% en el mismo tiempo).

### Site 1



### Site 2



**Media ± Desviación estándar (n = 3)**

**Figura 6.** Esquema del balance de amonio (en  $\mu\text{mol/L}$ ) que se produce en las jaulas con tratamiento BM. Siendo E la entrada, A el aporte, C el consumo y S la salida de amonio, y t.r. el tasa de renovación del agua.

### Estequiometría muestras Riera del Llèmena

- Músculo e hígado de peces

En las muestras de músculo de pez no se observan diferencias significativas para ninguno de los elementos entre ambos sitios ni entre secciones del tramo. El rango en que se encuentra el porcentaje de carbono total va desde 42 a 45%, mientras que el nitrógeno total se encuentra en un rango de entre 10,7 y 11,1 % y el fósforo total presenta un porcentaje de entre 0,68 y 0,72%.

**Tabla 5.** Valores de la media y la desviación estándar (SD) por sección (A,B y C) y sitio (1 y 2) para el músculo de pez para las diferentes variables analizadas: % carbono total, % nitrógeno total, % fósforo total, relación C:N, relación C:P y relación N:P. Las siglas P.E. hacen referencia a parámetros estadísticos.

Sitio	Sección	P.E.	%C total	%N total	%P total	C:N	C:P	N:P
1	A	Media	46,7	11,03	7,42E <sup>-3</sup>	4,23	659	155
		SD	1,38	0,30	0,01	0,16	85,22	16,33
	B	Media	42,7	10,7	7,21E <sup>-3</sup>	4,05	602	148
		SD	2,86	0,50	0,003	0,40	62,88	10,28
	C	Media	43,6	11,1	7,09E <sup>-3</sup>	3,93	615	156
		SD	2,36	0,62	0,008	0,42	40,31	7,58
2	A	Media	45,2	11,03	6,78E <sup>-3</sup>	4,12	668	163
		SD	1,26	1,16	0,005	0,41	46,99	27,26
	B	Media	47,2	10,8	6,91E <sup>-3</sup>	4,38	687	156
		SD	2,29	0,53	0,005	0,08	71,24	18,38
	C	Media	45,2	11,14	7,13E <sup>-3</sup>	4,05	634	156
		SD	1,83	0,57	0,003	0,04	46,02	12,99

Al igual que en el músculo de pez, los elementos analizados en las muestras de hígado no muestran diferencias significativas entre sitios ni entre secciones. El rango en que se encuentra el porcentaje de carbono total va desde 46,4 a 51,3%, mientras que el nitrógeno total se encuentra en un rango de entre 8,8 y 10,7% y el fósforo total presenta un porcentaje de entre 1,2 y 1,6%. En este caso hay un menor número de muestras debido a que en ocasiones el hígado de los peces era demasiado pequeño como para poder realizar un análisis completo.

**Tabla 6.** Valores de la media y la desviación estándar (SD) por sección (A, B y C) y sitio (1 y 2) para el hígado de pez para las diferentes variables analizadas: % carbono total, % nitrógeno total, % fósforo total, relación C:N, relación C:P y relación N:P. Las siglas P.E. hacen referencia a parámetros estadísticos.

Sitio	Sección	P.E.	%C total	%N total	% P total	C:N	C:P	N:P
1	A	Media	50,79	8,87	1,22	5,75	45,67	7,50
		SD	1,03	0,75	0,24	0,55	7,96	1,74
	B	Media	46,48	10,29	1,40	4,52	33,01	7,03
		SD	0,17	0,58	0	0,23	0	0
	C	Media	46,49	10,13	1,32	4,58	35,77	7,79
		SD	1,65	0,23	0,18	0,17	5,95	1,17
2	A	Media	46,88	10,74	1,22	4,36	41,09	9,46
		SD	1,88	0,52	0,52	0,13	16,40	3,48
	B	Media	51,05	9,93	1,30	5,14	39,14	7,61
		SD	0	0	0	0	0	0
	C	Media	51,26	10,36	1,63	4,99	37,06	7,17
		SD	4,89	1,20	0,92	0,72	18,18	2,81

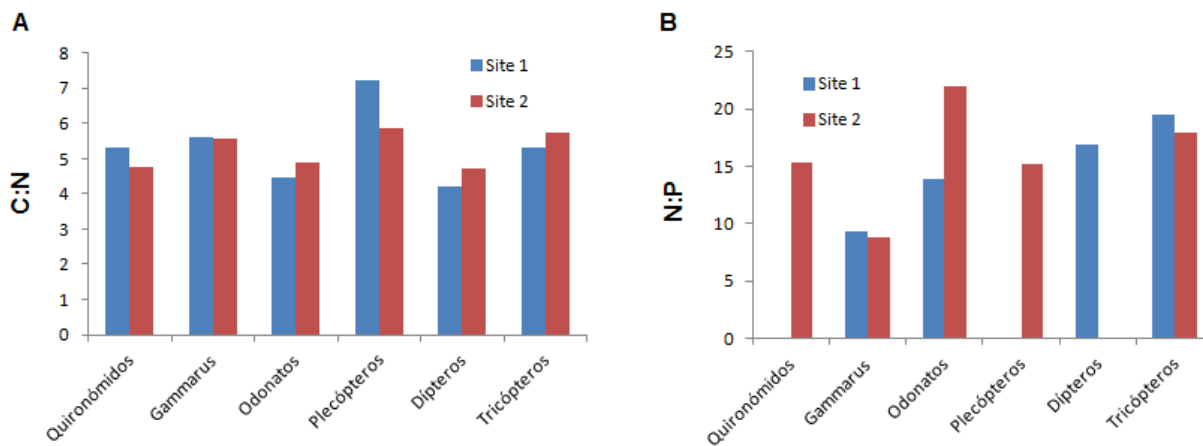
– Macroinvertebrados

Al comparar los dos sitios se puede destacar que la diferencia no es tanto en el tipo de tratamiento empleado sino en una mayor o menor presencia de un tipo específico de macroinvertebrado, así como la relación estequiométrica entre estos. Por ejemplo, en el sitio permanente los quironómidos y plecópteros presentan una mayor proporción de carbono y los odonatos, dípteros y tricópteros de nitrógeno.

**Tabla 7.** Valores de carbono, nitrógeno y fósforo total (en porcentaje) presente en las distintas familias de macroinvertebrados agrupadas por sitios, así como los valores de la relación de carbono:nitrógeno (C:N), carbono:fósforo (C:P) y nitrógeno:fósforo (N:P) obtenidos a partir de los datos totales de estos elementos. La “X” hace referencia a la falta de datos.

Sitio	Familia	% C total	% N total	% P total	C:N	C:P	N:P
1	Quironómidos	35,6	7,56	X	5,31	X	X
	Gammarus	33,9	6,03	0,64	5,63	52,5	9,33
	Odonatos	47,8	10,7	0,77	4,46	61,9	13,9
	Plecóptero	44,9	6,23	X	7,21	X	X
	Larva de díptero	32,2	7,63	0,45	4,21	71,3	16,9
	Tricóptero	68,6	12,86	0,65	5,34	104	19,5
2	Simúlidos	42,78	9,67	0,82	4,43	52,1	11,8
	Efemeróptidos	47,4	9,18	0,54	5,17	89,3	16,7
	Tricóptero	52,3	9,21	0,52	5,74	102	17,9
	Gammarus	34,9	6,28	0,71	5,55	49,3	8,87
	Coleóptero	48,1	10,42	0,50	4,62	96,2	20,8
	Larva de díptero	49,9	10,6	X	4,71	X	X
	Odonatos	47,1	9,60	0,44	4,91	107	22,0
	Plecóptero	48,5	8,29	0,54	5,85	89,2	15,3
	Quironómidos	47,7	10,05	0,66	4,75	72,6	15,3
Larva de tricóptero	50,2	9,84	0,69	5,10	73,0	14,3	

Destacar que en el sitio permanente no se pudieron analizar los valores de fósforo de los quironómidos y los efemerópteros porque no había suficiente muestra, ya que estos macroinvertebrados presentan una densidad menor. Esto concuerda con lo que se conoce de los *Barbus meridionales*, quienes se alimentan principalmente de estas dos familias de macroinvertebrados (Zamora 2011).



**Media  $\pm$  Desviación estándar (n = 3)**

**Figura 7. (A)** Gráfica de los valores de la relación C:N de diferentes familias presentes en ambos sitios (quironómidos, gammarus, odonatos, plecópetero, díptero y tricóptero) y **(B)** gráfica de los valores de la relación N:P de diferentes familias presentes en ambos sitios (gammarus, odonatos y tricóptero).

## DISCUSIÓN

La riera del Llèmena, a la altura de Sant Gregori, presenta las características propias de un río del mediterráneo, que junto con la actividad antropogénica (construcciones de infraestructuras, actividades agrícolas, desviaciones de caudales, etc), sufre durante las épocas estivales una reducción de su caudal, llegando incluso a secarse río abajo. Elevadas tasas de nutrientes procedentes del desarrollo agrícola y urbano pueden resultar en la eutrofización del medio y en la contaminación de aguas subterráneas (Whitehead, 2011) y esta es la situación en la que se encuentra esta riera.

En este estudio se ha evaluado el efecto tanto de las características hidrológicas de la riera como de la presencia o ausencia de peces en el funcionamiento del ecosistema. Se sabe que el caudal juega un papel preponderante en la estructura y funcionamiento de los ríos. Sin embargo, los efectos de las sequías en peces varían en función de la especie y el efecto de la alteración hidrológica en las poblaciones de ciprínidos ibéricos, que son dominantes en los ríos catalanes y que están en fuerte declive, se conoce muy poco (Benejam *et al.* 2010a). En este caso, el primer efecto que se encuentra como resultado de la sequía es la presencia de un menor número de peces en el sitio intermitente de la riera.

Puesto que el epilíton es una fuente importante de alimento en los ecosistemas lóticos, es importante comprender los factores ecológicos clave que afectan a la acumulación o pérdida de la biomasa algal y la sedimentación en el biofilm (Schneck, 2013). En la situación evaluada se observa que el tramo permanente presenta una mayor cantidad de materia orgánica bentónica sin embargo, esta resulta menos eficiente en el consumo de nutrientes, como el fosfato. Esto se debe a que la biomasa es menos activa puesto que acumula una mayor proporción de pigmentos accesorios y productos de degradación de la clorofila, mientras que en el sitio intermitente, el epilíton es menor en cuanto a biomasa pero más rico en organismos que realizan la fotosíntesis (algas y cianobacterias). Esta pérdida de biomasa se debe a la acción de los macroinvertebrados, cuya presencia es superior en este sitio. En un estudio realizado en un arroyo tropical también se determinó el rol de los herbívoros como contribuyentes a la regulación de las fuentes algales, reduciendo su biomasa (Barbee, 2005) y en otro llevado por Schneck (2013) se demostró que la presencia de peces exclusivamente herbívoros también contribuyeron a que hubiera menor presencia de biomasa algal.

Resultados obtenidos por Herrmann (2012) indican que la depredación llevada a cabo por los peces genera efectos considerables en la comunidad invertebrada bentónica en los arroyos. Esto se corresponde con los datos obtenidos por otros investigadores del proyecto, puesto que el tramo intermitente presenta un mayor número de macroinvertebrados que atribuyen a una menor presencia de barbos (datos no publicados). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio. En muchas de las variables analizadas también se observa que la respuesta al incremento de la densidad de peces es opuesta en los dos sitios, haciendo que diversas variables acaben convergiendo (por ejemplo: clorofila, AI y relación C:N). Esto lleva a sugerir que la presión de herbivoría generada por la presencia de más macroinvertebrados en el sitio intermitente es la que puede generar una menor presencia de biomasa algal pero más activa, mientras que el tratamiento BM puede explicar que la biomasa del sitio permanente sea mayor (debido a que los peces pueden controlar la presión de herbivoría alimentándose de

estos macroinvertebrados) pero menos activa ya que en su mayoría se encuentra en estado senescente.

Los consumidores bentónicos pueden influir en la estequiometría de los nutrientes disueltos y en los recursos basales mediante el consumo o la excreción de nutrientes (Cross *et al.* 2005). El epilíton presenta valores de carbono, nitrógeno y fósforo superiores en el sitio intermitente. Sin embargo, la relación C:N y C:P muestra que el sitio permanente es más rico en carbono y el sitio intermitente más rico en nitrógeno y fósforo. Los mayores valores de nitrógeno en este sitio también se observan al comparar su presencia en el agua, que cuenta con una mayor concentración de amonio y de nitratos. Esta mayor disponibilidad de nutrientes puede deberse a una menor capacidad de ser diluidos al haber un menor caudal así como a la acción antropogénica generada por las tierras de cultivo mayoritarias en esta zona. Al realizar el balance de amonio en ambos sitios se observa que su concentración es bastante elevada. Sin embargo, esta concentración se ve poco afectada por el aporte de los peces. Sin embargo, en el caso estudiado por Von Schiller *et al.* (2011) en un afluente oligotrófico de la cuenca de la Tordera que también presentaba intermitencia en su caudal, veía afectada de manera marcada la disponibilidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos y a las relaciones estequiométricas, cobrando mayor importancia los procesos biogeoquímicos en relación a los aportes externos.

En lo referente a la estequiometría de los peces y de los macroinvertebrados no se observan diferencias significativas entre sitios debido a que ambos presentan una concentración de nutrientes elevada.

Un estudio similar realizado por Capps & Flecker (2013) muestra que los peces pueden generar áreas de mejora de la tasa de reciclaje de nutrientes o hotspots biogeoquímicos, que pueden influir en la productividad primaria en los ecosistemas acuáticos. Estos focos de actividad influyen también en los patrones de remineralización de nutrientes, pudiendo alterar su dinámica. Sin embargo, en nuestro estudio, lo que se observa es que los peces ejercen un efecto negativo en la capacidad de autodepuración del ecosistema, puesto que al alimentarse de los macroinvertebrados generan un aumento de biomasa senescente que se satura, siendo incapaz de participar en la dinámica de nutrientes.

## CONCLUSIONES

Freshwater ecosystems in Catalonia are mostly affected by agricultural and livestock activities carried out by humans. This has led that most of these streams have a high concentration of nutrients.

In our case, the stream is characterized as a eutrophic ecosystem and being hydrologically disturbed by the presence of a dam.

Surprisingly, the results of this study show a negative effect generated by the presence of fish, by indirectly causing the epilithon saturation and hindering the nutrient dynamics. This is due to their control over the presence of herbivores, allowing the biomass rejuvenation and a greater nutrient uptake. This effect also generates an epilithon richer in N and P. However, the stoichiometry of fish and macroinvertebrates does not show variations between sites, that is regulated by the chemical characteristics of the milieu, which in both places has a high concentration of nutrients.

If the rate of water renewal notably decreases during summer, an accumulation of nutrients, which in the case of ammonium may reach toxic levels, which would also explain the low density of fish found in the intermittent site due to low survival during episodes of drought.

In future studies could be evaluated the action of these fish in a nutrient-poor oligotrophic stream, and see if, in this case, the animals would have a different effect and be able to generate biogeochemical hotspots as described in other parts of the world.



## BIBLIOGRAFÍA

- Allan, J. D. 1969. *Stream ecology. Structure and function of running waters*. London, Chapman & Hall.
- Barbee, N.C. 2005. *Grazing insects reduce algal biomass in a neotropical stream*. *Hydrobiologia* 535:153-165
- Belmonte, M. 2013. *Efectos del barbo de montaña (Barbus meridionalis) sobre la comunidad de macroinvertebrados en un río mediterráneo*. Máster universitario en biodiversidad. Universidad de Barcelona.
- Benejam, L., Angermeier, P.L., Munné, A. & García-Berthou, E. 2010. *Assessing effects of wáter abstraction on fish assemblages in Mediterranean streams*. *Freshwater Biology* 55:628-642.
- Canals, M.G. 2006. *La dinámica de nutrientes y el metabolismo en los arroyos mediterráneos afectados por los aportes de nutrientes de las actividades humanas*. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona.
- Capps, K.A. & Flecker A.S. 2013. *Invasive fishes generate biogeochemical hotspots in a nutrient-limited system*. *PLoS ONE* 8(1):eS4093. Doi:10.1371/journal.pone.0054093
- Cross, W.F., Benstead P.J., Rosemond, A.D. & Wallace, J.B. 2003. *Consumer-resource stoichiometry in detritus-based streams*. *Ecology Letters* 6: 721 - 732
- Cross, W.F. Benstead, P.J., Crost, P.C. & Thomas, S.A. 2005. *Ecological stoichiometry in freshwater benthic systems: recent progress and perspectives*. *Freshwater Biology* 50:1895-1912. Doi:10.1111/j.1365-2427.2005.01458.x
- Elosegi, A. & Sabater, S. 2009. *Conceptos y técnicas en ecología fluvial*. Primera edición, Bilbao, Fundación BBVA.
- Elser, J.J., Acharya, K, Kyle, M. & Makino, W. 2003. *Growth rate-stoichiometry couplings in diverse biota*. *Ecology Letters* 6: 936–943.
- Ferrer, G., La Roca, F. & Gual M. 2012. *Servicios ecosistémicos: ¿una herramienta útil para la protección o para la mercantilización de la naturaleza?* XIII Jornadas de Economía Crítica. Sevilla.
- Gómez, R. *Los nutrientes: origen, ciclos y balances. Distribución espacial y temporal*. Departamento Ecología e Hidrología. Universidad de Murcia.
- Graça, M. A. 2001. *The role of invertebrates on leaf litter decomposition in streams: a review*. *International Review of Hydrobiology*, 86(4-5): 383-393.

- Herrmann, P., Townsend, C. & Matthaei, C. 2012. *Individual and combined effects of fish predation and bed disturbance on stream benthic communities: a streamside channel experiment*. *Freshwater Biology* 57:2487-2503. Doi:10.1111/fwb.12019
- Mas, E. 2014. *Effects of increased water temperature on leaf litter quality and detritivore performances: a whole-reach manipulative experiment*. *Freshwater Biology* 60:184-197. DOI:10.1111/fwb.12485
- Murphy, J. & Riley, J. 1962. *A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters*. *Analytica Chimica Acta* 27:31-36
- Proia, L. 2012. *Biofilm responses to multiple stressors associated to global change in river ecosystems*. Tesis doctoral. Universidad de Girona.
- Reardon, J., Foreman, J.A. & Searcy, R.L. 1966. *New reactants for colorimetric determination of ammonia*. *Clin. Chim. acta* 14, 403–405. doi:10.1016/0009-8981(66)90120-3
- Roldán, G. & Ramírez, J.J. 1992. *Fundamentos de limnología neotropical*. Editorial Universidad de Antioquia. Colombia.
- Schneck, F., Schwarzbald, A. y Sanches, A. 2013. *Substrate roughness, fish grazers, and mesohabitat type interact to determine algal biomass and sediment accrual in a high-altitude subtropical stream*. *Hydrobiologia* 711: 165-173.
- Taylor, W.B., Flecker, A.S. & Hall, R. O. 2006. *Loss of harvested fish species disrupts carbon flow in a diverse tropical river*. *Science*. 313:833-836. Doi:10.1126/science.1128223
- Von Schiller, D. et al. 2011. *Contraction, fragmentation and expansion dynamics determine nutrient availability in a Mediterranean forest stream*. *Aquatic Sciences* 73:485-497
- Whitehead, P.G. et al. 2011. *Modelling phosphorus dynamics in multi-branch river systems: a study of the Black river, Lake Simcoe, Ontario, Canada*. *Science*: 315-323. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.09.073
- Zamora, L. 2011. *Barbo de montaña – Barbus meridionalis*. Enciclopedia virtual de los Vertebrados Españoles.