



Universitat de Girona
Facultat de Ciències

Memòria del Treball Final de Grau

Títol del treball: Efectes d'un gradient de salinitat en l'estructura i el funcionament del biofilm epilític en una riera salada

Estudiant: Meritxell Torres i Roig

Grau en Biologia

Correu electrònic: meritxelltr@gmail.com

Tutor: Anna Romani i Cornet, cotutora: Juanita Mora i Gómez

Cotutor*:

Empresa / institució: Institut d'Ecologia Aquàtica, Facultat de Ciències de la Universitat de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor*):

Nom del tutor: Anna Romani, cotutora Juanita Mora

Nom del cotutor*:

Empresa / institució: IEA, Facultat de Ciències de la UdG

Correu(s) electrònic(s): anna.romani@udg.edu
juanita.mora@udg.edu

*si hi ha un cotutor assignat



Efectes d'un gradient de salinitat en l'estructura i el funcionament del biofilm epilític en una riera salada

Meritxell Torres i Roig

Tutora: Anna Romaní i Cornet

Cotutora: Juanita Mora i Gómez

TFG- Grau en Biologia

Juliol de 2015

Efectes d'un gradient de salinitat en l'estructura i el funcionament del biofilm epilític en una riera salada

Resum

La Riera Salada és un ecosistema aquàtic caracteritzat per tenir un elevat contingut de sals dissoltes en alguns dels seus trams les quals provenen dels sediments de la conca d'on deriva. El punt més proper al naixement de la riera que s'ha mostrejat té una conductivitat de 43,53 ms/cm i el més llunyà (uns 4 km aigües avall) de 0,60 ms/cm respectivament. L'objectiu d'aquest estudi ha estat analitzar l'efecte d'aquest gradient de salinitat sobre la biomassa dels diferents grups microbians (bacteris, algues i fongs) que conformen el biofilm epilític de la riera. També s'ha centrat en determinar la seva funció analitzant les activitats enzimàtiques (fosfatasa, β -glucosidasa i leucineaminopeptidasa) que duen a terme bacteris, fongs i algues amb l'objectiu de comparar si hi ha relació entre la funció i l'estructura d'aquest biofilm. Per reforçar les dades obtingudes s'han analitzat els nutrients de l'aigua i la matèria orgànica dissolta (MOD). S'ha trobat que la composició dels grups microbians en % ha vingut afavorida per les algues, el qual ha estat el grup amb més representació en cada punt, després pels bacteris i finalment pels fongs. Els resultats obtinguts determinen que hi ha una inhibició de la biomassa microbiana per part de la salinitat, sent els bacteris i les algues els grups més afectats, i els fongs, el grup que ha presentat més resistència al llarg de tot el gradient. De totes maneres, en el tram amb la major salinitat dels quatre punts, s'ha observat que hi havia una elevada biomassa microbiana deguda a l'elevat contingut de nutrients a causa d'una eutrofització local que probablement contraresta l'efecte de la salinitat. En quant a la funció del biofilm determinada mitjançant les activitats enzimàtiques, s'ha vist que aquestes no es veien gaire afectades pel gradient de salinitat, sent la β -glucosidasa la més sensible i la fosfatasa la menys sensible. Finalment, la leucineaminopeptidasa també presenta certa relació amb la salinitat tot i que també està relacionada amb contingut de nitrats del medi. Els resultats obtinguts suggereixen canvis en la composició microbiana del biofilm al llarg del gradient estudiat, i per tant, en estudis posteriors seria interessant analitzar la diversitat i riquesa microbiana per tal de veure quines espècies poden ser més o menys resistents a la salinitat.

Summary

The Riera Salada is an aquatic ecosystem characterized by having a high content of dissolved salts in some sections which come sediment basin where drift. The closest site to the birth of the stream has been sampled has a conductivity of 43.53 mS/cm and most distant (about 4 km downstream) of 0.60 mS/cm respectively. The objective of this study was to analyze the effect of the salinity gradient on the biomass of different microbial groups (bacteria, algae and fungi) that form the stream epilithic biofilm.

It also focused on determining its function by analyzing the enzymatic activities (phosphatase, β -glucosidase and leucineaminopeptidasa) that carried out bacteria, fungi and algae in order to compare whether there is a relationship between the function and structure of this biofilm. To reinforce the obtained data were analyzed the water nutrients and the dissolved organic matter (MOD). It has been found that the composition of the microbial groups in % has been favored by the algae, which has been the group most represented at each site, then by bacteria and finally the fungi. The results determined that there is an inhibition of microbial biomass micro-by salinity, being algae and bacteria, the most affected groups, and fungi, the group has presented more resistance throughout the gradient. However, in the section with higher salinity has been observed that there was a high microbial biomass due to the high content of nutrients because in this site there is a local eutrophication that probably counteracts the effect of salinity. Regarding the role of biofilms determined by the enzymatic activity has been seen that these were not seen very affected by the salinity gradient, being the β -glucosidase the most sensitive and less sensitive the phosphatase. Finally, leucineaminopeptidasa also presents certain relationship with the salinity but also is related nitrate content of the medium. The results suggest changes in the composition of microbial biofilm along the gradient studied, and therefore, further studies would be interesting to analyze microbial diversity and richness to see which species can be more or less resistant to salinity.

Resumen

La Riera Salada es un ecosistema acuático caracterizado por tener un elevado contenido de sales disueltas en algunos de sus tramos las cuales provienen de los sedimentos de la cuenca de donde deriva. El punto más cercano al nacimiento del arroyo que se ha muestreado tiene una conductividad de 43,53 ms/cm y el más lejano (unos 4 km aguas abajo) de 0,60 ms/cm respectivamente. El objetivo de este estudio ha sido analizar el efecto de este gradiente de salinidad sobre la biomasa de los diferentes grupos microbianos (bacterias, algas y hongos) que conforman el biofilm epilítico del arroyo. También se ha centrado en determinar su función analizando las actividades enzimáticas (fosfatasa, β -glucosidasa y leucineaminopeptidasa) que llevan a cabo las bacterias, hongos y algas con el objetivo de comparar si hay relación entre la función y la estructura de este biofilm. Para reforzar los datos obtenidos se han analizado los nutrientes del agua y la materia orgánica disuelta (MOD). Se ha encontrado que la composición de los grupos microbianos en % ha venido favorecida por las algas, el cual ha sido el grupo con más representación en cada punto, luego por las bacterias y finalmente por los hongos. Los resultados obtenidos determinan que hay una inhibición de la biomasa microbiana por parte de la salinidad, siendo las bacterias y las algas los grupos más afectados, y los hongos, el grupo que ha presentado más resistencia a lo largo de todo el gradiente. De

todos modos, en el tramo con la mayor salinidad de los cuatro puntos, se ha observado que había una elevada biomasa microbiana debida al elevado contenido de nutrientes a causa de una eutrofización local que probablemente contrarresta el efecto de la salinidad. En cuanto a la función del biofilm determinada mediante las actividades enzimáticas, se ha observado que estas no se veían muy afectadas por el gradiente de salinidad, siendo la β -glucosidasa la más sensible y la fosfatasa la menos sensible. Finalmente, la leucineaminopeptidasa también presenta cierta relación con la salinidad aunque también está relacionada con contenido de nitratos del medio. Los resultados obtenidos sugieren cambios en la composición microbiana del biofilm a lo largo del gradiente estudiado, y por tanto, en estudios posteriores sería interesante analizar la diversidad y riqueza microbiana para ver qué especies pueden ser más o menos resistentes a la salinidad.

ÍNDIX

Introducció.....	1
Objectius i hipòtesis.....	3
Material i mètodes.....	4
Zona d'estudi.....	4
Disseny experimental.....	4
Paràmetres fisicoquímics.....	5
Anàlisi dels nutrients.....	5
Fosfats: Fòsfor reactiu soluble (PRS)	5
Nitrats.....	6
Amonis: mètode del silicat.....	6
Matèria orgànica dissolta (MOD).....	7
Índex de fluorescència.....	7
Absorbància a 254 nm i Índex d'absorbància.....	7
Paràmetres biològics.....	8
Biomassa Bacteriana.....	8
Biomassa Algal.....	9
Biomassa de fongs.....	10
Activitats enzimàtiques extracel·lulars.....	12
Anàlisi de dades.....	13
Resultats.....	16
Característiques dels punts de mostreig.....	16
Paràmetres fisicoquímics.....	17
Paràmetres biològics.....	20
Discussió.....	24
Conclusions.....	27
Bibliografia.....	29

Efectes d'un gradient de salinitat en l'estructura i funcionament del biofilm epilític en una riera salada

INTRODUCCIÓ

Els ecosistemes aquàtics continentals salins es caracteritzen per tenir una composició i un contingut elevat de sals dissoltes provinents dels sediments de la conca d'on deriven. Aquest fet és degut a les successives transgressions i regressions marines que van deixar sediments carregats de sals (Arribas et al., 2009). Els ecosistemes amb aquestes característiques són propis de regions amb un clima àrid o semiàrid com el mediterrani (Millán et al., 2011), per aquest motiu en el territori català hi podem trobar rius i rieres amb un grau de salinitat molt elevat. L'origen de l'elevada salinitat en la zona d'estudi d'aquest treball rau en la dissolució de les evaporites Keuper corresponents al Triàsic superior formades d'halita i guix (Mata-perelló, 2000).

En els rius de capçalera, com el d'aquest estudi, la comunitat bentònica microbiana (biofilm) és la responsable de bona part del metabolisme fluvial. Els biofilms són comunitats complexes de microorganismes presents en ambients naturals que s'associen de manera molt semblant als organismes multicel·lulars (María Vanegas et al., 2009), estan envoltats en una matriu de substàncies polimèriques extracel·lulars que ells mateixos produeixen (Marić et al., 2007). Els biofilms dels ecosistemes aquàtics colonitzen diferents substrats com pedres (biofilms epilítics), fullaraca o sediment i juguen un paper molt important en el consum i transformació dels nutrients orgànics i inorgànics.

En rieres d'aigua dolça, durant el període de tardor, la biomassa microbiana heteròtrofa (fongs i bacteris) és, generalment, més elevada que no pas la biomassa autòtrofa (algues) (Artigas et al., 2009). En canvi, en condicions de més llum, les algues són els microorganismes que predominen en el biofilm mentre que la biomassa bacteriana disminueix. A més a més, pel que fa a la proporció de carboni total del biofilm epilític en aquestes condicions, les algues ocupen el 60-90 % del biofilm, el 10-40 % és ocupat pels bacteris i només un 1 % pels fongs (Dür et al., 2010). Ara bé, com actuen aquests grups microbians pel què fa al seu metabolisme i a la seva estructura enfront un gradient de salinitat? Tal i com confirma Millán et al., 2011 s'han realitzat pocs estudis sobre la salinització primària (produïda per efectes naturals i no per l'acció humana) i els que s'han realitzat s'han centrat generalment en l'estudi de les comunitats de macroinvertebrats d'aquestes zones. Tot i així, alguns estudis apunten que determinades algues (diatomees) disminueixen en riquesa i en abundància enfront un augment de salinitat (Nielsen et al., 2003). Per altra banda, pel què fa a la comunitat bacteriana no s'han trobat diferències significatives en la fisiologia d'aquests microorganismes entre els que viuen en sistemes d'aigua dolça i els que viuen en sistemes d'aigua salada (Cole et al., 1988), en canvi pel comportament d'aquesta comunitat són més importants factors com la disponibilitat de carboni i la temperatura que no pas la salinitat (Findlay et al., 1991).

Els possibles efectes de la salinitat en la composició del biofilm pot afectar en la seva funció i per tant en el metabolisme fluvial. Gràcies als enzims extracel·lulars dels microorganismes que componen el biofilm, aquestes comunitats són capaces de degradar compostos orgànics complexos i intervenir, així, en el cicle del carboni, ja sigui incorporant-lo per al seu creixement o respirant-lo (Romaní et al., 1995). Els enzims extracel·lulars més comuns que generalment s'analitzen són els que intervenen en la descomposició de polisacàrids, pèptids i compostos orgànics del fòsfor i els canvis en la seva expressió estan relacionats amb l'ús de diferents fonts de matèria orgànica disponible en l'ecosistema. Els enzims més importants involucrats en l'adquisició de nitrogen i fosfats per part dels microorganismes també tenen relació amb el contingut de nutrients disponibles al medi. A més a més, les activitats enzimàtiques extracel·lulars del biofilm van variant a causa del reciclatge intern de la matèria orgànica i de les interaccions microbianes (competència/ sinèrgia) del mateix biofilm com són les interaccions entre algues-bacteris i fongs-bacteris (els principals grups microbians que componen el biofilm) (Romaní et al., 1995).

Els bacteris produeixen enzims extracel·lulars que estan involucrats principalment en la degradació senzilla de polisacàrids, pèptids i lípids i la seva activitat està altament regulada per la disponibilitat de compostos alliberats per les algues o pels compostos degradats prèviament pels fongs. Els fongs són els principals responsables de la descomposició de la matèria vegetal (cel·lulosa, hemicel·lulosa i lignina) i la seva activitat pot ser regulada per les interaccions amb determinats bacteris. Pel què fa a les algues, són un dels grups responsables de descompondre els compostos orgànics del fòsfor, a més dels bacteris i els fongs, per tal d'obtenir fòsfor inorgànic. Les relacions enzimàtiques amb cada grup microbià del biofilm descrits fins ara són les més importants, no obstant això, també existeixen altres relacions com la capacitat d'alguns bacteris per degradar compostos de lignina, algunes algues heterotròfiques amb capacitat d'utilitzar polisacàrids o bé alguns fongs que poden fer servir pèptids (Romaní et al., 1995).

Com s'ha pogut veure, en referència a aquest tema hi ha moltes llacunes sobre la relació dels paràmetres descrits anteriorment. Per aquesta raó aquest estudi ha volgut centrar-se en l'efecte que té un determinat gradient de salinitat, sobre la composició dels diferent grups microbians del biofilm epilític i sobre el metabolisme heterotròfic d'aquests. I, així, poder determinar si hi ha una relació directe d'aquest paràmetre amb la funció del biofilm epilític.

L'objecte d'aquest estudi, doncs, ha estat Riera Salada (Berguedà), determinant un gradient de salinitat a partir de quatre trams d'aquesta i analitzant l'efecte que té aquest sobre la composició i estructura dels tres grups microbians que formen el biofilm epilític. Això s'ha estudiat a partir de les biomasses de fongs, bacteris i algues i a partir de l'anàlisi de les activitats enzimàtiques com la β -glucosidasa, la fosfatasa i la leucineaminopeptidasa.

OBJECTIVES

- ❖ Determine the effect of a salinity gradient on the composition of the different microbial biofilm epilithic groups (fungi, bacteria and algae).

Hypothesis: Expected to the salinity inhibit the epilithic biofilm, being algae the most affected microorganisms, followed by fungi and finally by bacteria.

- ❖ Determine the effect of salinity gradient in the heterotrophic and autotrophic metabolism and observe if is related to the results of the response of the different microbial groups.

Hypothesis: Expected that the results are related to the first objective, so metabolism that should prevail in front of salinity increase would be related to the polysaccharides degradation and peptides, and finally the metabolism related to the degradation of organic phosphorus because it is the enzymatic activity that share the three microbial groups.

MATERIAL I MÈTODES

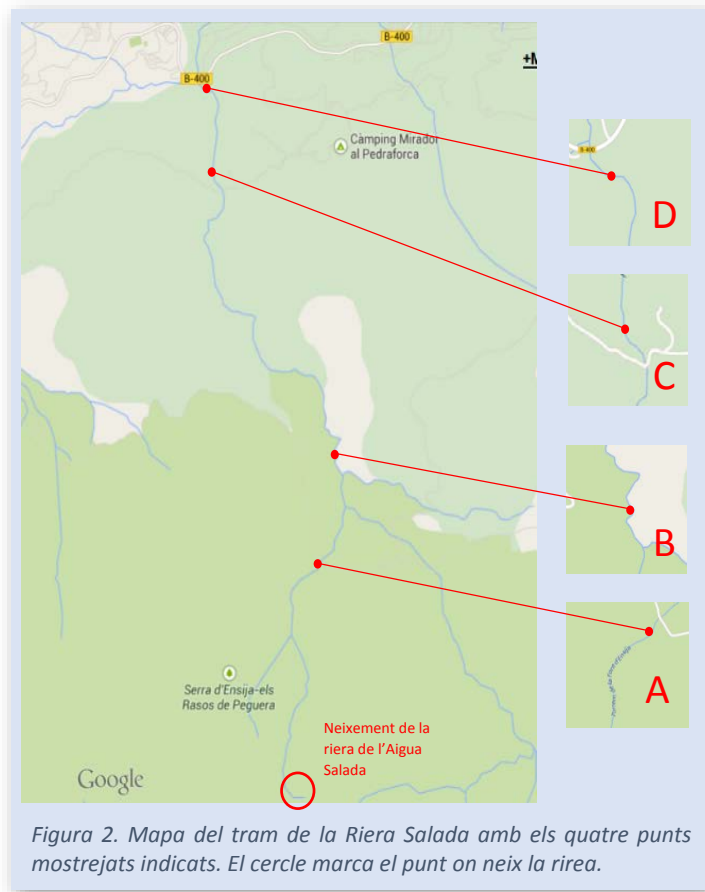
ZONA D'ESTUDI:

La riera que s'analitza en aquest estudi s'anomena Riera Salada i es troba al municipi de Saldes, a la comarca del Berguedà (figura 1). Neix de la Font Salada, al vessant nord de la Serra d'Ensija, sobre la Pleta de la Vila, a uns 1700 m d'altitud. Aquesta font és la responsable de la hipersalinitat d'aquesta zona. Al llarg del recorregut de la riera va rebent aigües d'altres torrents fins a desembocar al riu Saldes, prop del Molí del Ferrer (Mata-perelló, 2000). La zona concreta de mostreig correspon a un tram de 3,68 km compresos entre els 1670 m i els 5350 m respecte el naixement de la riera (Font Salada), formant en aquest mateix sentit un clar gradient de salinitat. Així doncs, en el tram més proper a la Font Salada hi ha els valors més elevats de salinitat, mentre que en el tram més llunyà al naixement de la riera es troben els valors més baixos d'aquesta.



DISSENY EXPERIMENTAL:

El mostreig es va dur a terme el 13 de novembre del 2014. Es van mostrejar quatre punts de la Riera Salada (figura 2). El primer punt, codificat amb la lletra A, es troba a 1670 m respecte al seu naixement, és el més proper a la Font Salada i també és el punt més alt; a 1680 m d'altitud. Riera avall es troba el



punt B a 2410 m del naixement de la riera i a 1580 m d'altitud, el punt C a 4800 m del naixement i a 1235 m d'altitud i finalment el punt D, el qual és el punt més allunyat de la font, a 5350 m, amb una altitud de 1125 m.

A cadascun dels quatre punts es van recollir mostres de pedres d'uns 2,5 cm de llarg per 2 cm d'ampla aproximadament. Es van agafar 3 rèpliques de 10 pedres de cada punt, recollides en pots de plàstic. De manera que en total hi havia 12 mostres (3 per a cada punt). En pots de plàstic d'1,5 litres també es va agafar aigua de la riera per prendre les dades necessàries al laboratori. *In*

situ es va mesurar la conductivitat, la temperatura, la concentració d'oxigen i el pH dels quatre punts amb els aparells corresponents. També es van anotar les característiques ambientals i paisatgístiques de cada zona.

PARÀMETRES FISCOQUÍMICS

Tots els mètodes i aparells es poden consultar a la taula resum 2.

➤ Anàlisi dels nutrients

▪ Fosfats: Fòsfor reactiu soluble (PRS)

Per tal d'analitzar els fosfats s'ha seguit el mètode del molibdat de Murpy et al.,1962. És una tècnica colorimètrica que consisteix en fer reaccionar el molibdat amb el fòsfor, donant una coloració blava.

En primer lloc es van preparar els patrons (0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 μM) a partir de la solució mare de KH_2PO_4 1000 μM i aigua mQ, i posteriorment es van processar com la resta de mostres. En paral·lel també es va fer el reactiu mixte, el qual està compost de Molibdat d'amoni, Àcid sulfúric, Àcid ascòrbic

i d'Antimoni tartrat potassi. S'ha de tenir en compte que aquest reactiu no es pot guardar, per tant es va fer la quantitat necessària per fer l'anàlisi de les 12 mostres i la patró.

Un cop es van tenir preparats els 10 ml de cada mostra filtrada a temperatura ambient, les patrons i el reactiu mixte, es va afegir 1 ml d'aquest últim a totes les mostres a analitzar i a les patrons. Es va barrejar amb l'ajuda del vòrtex i es va deixar a la foscor durant 2 hores aproximadament. Finalment es va llegir l'absorbància a l'espectrofotòmetre a 890 nm.

Per a fer aquest anàlisi s'ha utilitzat el següent material: espectrofotòmetre (Shimatzu UV-1800), reactius descrits, campana extractora, cubetes de vidre, estufa, balança de precisió, pinces, espàtula, vòrtex, micropipetes, matrassos aforats, vials de vidre, cambra fosca, paper de plata, filtres Whatman GF/F.

▪ Nitrats

L'anàlisi dels nitrats presents a les aigües de la riera s'ha fet amb la tècnica del Cromatògraf iònic.

El procediment es tracta de descongelar les mostres prèviament filtrades que van estar reservades per a fer aquesta anàlisi en vials de vidre, i seguidament, es processen en el cromatògraf iònic. Aquest proporciona els valors en mg/L de NO_3^- presents a cada mostra.

El material necessari és: Cromatògraf iònic (Metrohm), vials de vidre, micropipetes, filtres Whatman GF/F i pinces.

▪ Amonis: mètode del silicat

L'anàlisi dels amonis s'ha dut a terme seguint el mètode del silicat descrit per *Reardon et al., 1966*. És una tècnica colorimètrica que consisteix en afegir dos reactius que reaccionen amb l'amoni dissolt en l'aigua el quals donen una coloració determinada, la intensitat de la qual està relacionada amb la concentració d'amoni.

Primerament es va preparar una sèrie de patrons de concentració coneguda d'amoni (0; 0,1; 0,2; 0,5; 1, 5, 10, 20 μM) i un blanc, la qual cosa va permetre convertir les lectures d'absorbància en valors de concentració. Aquestes patrons es van processar de la mateixa manera que la resta de mostres.

Per tal de fer l'anàlisi es van preparar 1 L de cadascun dels reactius necessaris. El reactiu 1 està compost de sodi salicilat, citrat sòdic, sodi nitroprussiat i aigua mQ. El reactiu 2 es compon d'hidroxid de sodi, sodi dicloroisocianurat i aigua mQ. Seguidament es van filtrar les 12 mostres d'aigua i es van transvasar 10 ml en tubs d'assaig. En cada tub s'hi va afegir 1 mL de reactiu 1 i es va vortejar. Al cap d'un minut es va afegir 1 altre mL del reactiu 2 i es va tornar a barrejar. Es va deixar 1 hora a les fosques. Finalment es va llegir a l'espectrofotòmetre a 690 nm.

El material necessari per a fer aquest anàlisi ha estat el següent: Reactius descrits, espectrofotòmetre (Shimatzu UV-1800), cubetes de vidre, vòrtex, estufa, balança de precisió, vials de vidre, filtres Whatman GF/F, pinces i espàtula.

➤ **Matèria orgànica dissolta (MOD)**

▪ **Índex de fluorescència**

Aquesta tècnica es basa en la fluorescència que emet la matèria orgànica, especialment els compostos húmics i es determina a partir d'un fluorímetre. La fluorescència ens pot indicar el contingut de materials húmics que hi ha a les aigües i la qualitat de la matèria orgànica dissolta. McKnight et al., 2001 va desenvolupar un índex el qual indica l'origen de la MOD. Aquest índex es fa a partir del ràtio $(370/450)/(370/500)$, on el 370 nm és la longitud d'ona d'excitació, i els 450 nm i els 500 nm són les longituds d'ona d'emissió. Un índex de fluorescència baix indica que l'origen de la MOD és més terrestre (prové de la vegetació que hi ha prop del riu). Mentre que un índex alt determina que la MOD té un origen més microbià.

Els passos que es van dur a terme són; filtrar l'aigua amb filtres muflats, acidificar la mostra fins a un pH= 2 amb àcid clorhídric 2N, preparar el blanc amb aigua mQ acidificada a pH= 2, mesurar la fluorescència amb cubetes de quars a 370 nm d'excitació i 450 i 500 nm d'emissió, corregir la fluorescència de la mostra amb el blanc i finalment fer els càlculs necessaris per obtenir l'índex de fluorescència.

Per a fer aquesta anàlisi s'ha utilitzat: reactius descrits anteriorment, fluorímetre (Kontron SFM 25), cubetes de quars, forn-mufla, estufa, filtres Whatman GF/ F, vials de vidre i micropipetes.

▪ **Absorbància a 254 nm i Índex d'absorbància**

L'absorbància a baixes longituds d'ona és un indicador del contingut de compostos húmics que hi ha en una mostra d'aigua i per tant, l'absorbància a 254 nm és una mesura indirecta que està molt ben correlacionada amb la quantitat de matèria orgànica dissolta (MOD) (Jager et al., 2009). Quan més elevada sigui l'absorbància voldrà dir que hi ha més quantitat de material humic. L'índex d'absorbància es mesura a partir del ràtio $Abs\ 250 / Abs\ 365$. Aquest índex, descrit per (De Haan et al., 1987), dóna una idea de la mitjana de la mida molecular dels compostos. Si els valors d'aquest índex són elevats voldrà dir que la mitjana de la mida molecular serà baixa, mentre que a valors baixos ens indicarà la que mitjana molecular és elevada.

Per a fer aquesta anàlisi s'ha utilitzat: espectrofotòmetre (Shimatzu UV-1800), cubetes de quars, filtres Whatman GF/ F, vials de vidre i micropipetes.

PARÀMETRES BIOLÒGICS:

Tots els mètodes i aparells es poden consultar a la taula resum 3.

➤ Biomassa Bacteriana

Per saber la densitat de bacteris (n° bacteris / cm^2) d'una mostra i poder determinar la biomassa bacteriana d'aquesta, s'ha utilitzat el mètode de la tinció d'una mostra líquida amb DAPI (4,6-dimidino-2 fenilindol), la filtració d'aquesta amb filtres de policarbonat de $0,2 \mu\text{m}$ de color negre i l'observació i recompte amb el microscopi d'epifluorescència (Porter et al., 1980). Aquesta tècnica ens permet quantificar el total de bacteris d'una mostra gràcies al color blau que emeten aquests quan són exposats a la llum del microscopi.

Abans de dur a terme aquest procés, però, s'ha d'extreure la major part dels bacteris de la superfície de les pedres de cada mostra. Així doncs, primer de tot es va posar les mostres amb aigua de riu filtrada en vials de vidre prèviament esterilitzats (hi ha 4 punts de mostreig, cada un té 3 rèpliques i cada rèplica 3 pedres) i per tal de fixar els bacteris fins el moment d'analitzar-los, s'hi va afegir formol.

Per realitzar l'extracció de bacteris es van sonicar les mostres en tres cicles d'1 minut. Les pedres tenien molt sediment degut al medi llimós on es trobaven, per aquest motiu, després de sonicar, es van deixar reposar durant 5 minuts, amb l'objectiu de que el llim sedimentés i no obstruís el filtre en el moment de la filtració. En un nou vial de caramel es van posar $50 \mu\text{L}$ de mostra sonicada i posteriorment vortejada + $9950 \mu\text{L}$ de pirofosfat (dilució 1:200). Aquesta dilució es va fer per a les mostres dels punts A i B les quals tenien una densitat major de bacteris. Per a les mostres del punt C i D, que tenien una densitat bacteriana menor que els altres punts, es van posar $200 \mu\text{L}$ de la mostra sonicada i posteriorment vortejada + $9800 \mu\text{L}$ de pirofosfat (dilució 1:50). El pirofosfat és un compost que ajuda a desfer els agregats cel·lulars per tal de facilitar i minimitzar l'error a l'hora de fer el recompte al microscopi. Posteriorment es va posar 25 minuts a l'agitador. Acabats aquests minuts es va inocular $200 \mu\text{L}$ de DAPI prèviament vortejat. En aquest pas s'ha d'evitar que les mostres els hi incideixi la llum per tal de garantir el màxim de fluorescència en el moment del recompte. Es va tornar a vortejar i es va posar les mostres altre cop a l'agitador durant 30 minuts a la foscor. Finalment es van filtrar les mostres amb filtres foscos de policarbonat amb un porus de $0.2 \mu\text{m}$ i es va muntar la mostra per tal de ser observada al microscopi d'epifluorescència (Shimatzu UV-1800).

Per tal de fer el càlcul de la biomassa bacteriana s'ha utilitzat aquesta fórmula:

$$\frac{N. \text{Bacteria}}{\text{cm}^2} = \frac{n \left(\frac{A}{at} \right) d \left(\frac{Vm}{Vf} \right)}{S}$$

n = n° total de bacteris contats; A = àrea filtració (mesurada a partir del diàmetre de la columna); at = àrea total contada del filtre (n° de camps contats x superfície contada de cada camp); d = factor dilució; Vm = volum total mostra; Vf = volum submostra tenyida i filtrada i S = superfície mostra.

En cada un dels protocols, per tal de poder mesurar les àries de les pedres de cada rèplica, s'han embolicat en paper de plata tenint cura que no se solapés cap tros de paper, posteriorment s'ha pesat i hem utilitzat el factor de conversió següent: 1 cm^2 de paper de plata = 0,00295 g.

Per tal de saber els μg de Carboni/ cm^2 s'han convertit els nº de bacteris/ cm^2 a volum (μm^3 / cm^2) multiplicant per $0,1 \mu\text{m}^3$, que és el volum que es considera que té un bacteri (Theil-Nielsen et al., 1998), i posteriorment, aquest valor es multiplica per $2,2 \times 10^{-7}$ que és el carboni que hi ha per μm^3 (Bratbak, 1985).

El material emprat per a realitzar aquest protocol ha estat: reactius descrits anteriorment, vòrtex, agitador, equip de filtració, filtres de Whatman, filtres negres de policarbonat, micropipetes automàtiques, vials de vidre, aigua mQ, oli d'immersió, portaobjectes i cobreobjectes, pinces i microscopi d'epifluorescència (Nikon) equilibrat amb filtre UV, excitació 340- 380 nm. El material que entra en contacte directa amb les mostres ha d'estar prèviament autoclavat.

➤ Biomassa Algal (Jeffrey et al., 1975)

Per tal de determinar la biomassa algal es parteix de la concentració de clorofil·la bentònica continguda en el biofilm de les pedres mostrejades a partir de la lectura de l'absorbància a diferents longituds d'ona. L'anàlisi permet estimar la quantitat de la clorofil·la (es considera que la major part d'aquests són clorofil·la *a*).

El procediment consisteix en submergir les mostres (3 pedres per rèplica i 3 repliques per cadascun dels 4 punts mostrejats) en 10 ml d'acetona al 90% en vials de vidre. Introduir les mostres amb l'acetona al bany d'ultrasons durant 4 minuts (extracció activa). Filtrar l'extracte per tal de reduir la terbolesa de les mostres. Els pigments de clorofil·la són molt sensibles a la llum i a la temperatura, per això tot aquesta anàlisi s'ha fet en una cambra amb llum verda i a una temperatura no gaire elevada.

Per acabar l'anàlisi, llegir l'absorbància de les 12 mostres a l'espectrofotòmetre a 430, 665 i 750 nm.

L'absorbància a 750 nm ha de prendre uns valors propers a 0, ja que a aquesta longitud d'ona, la clorofil·la no emet color. Si donés valors molt superiors a 0, voldria dir que la mostra és molt tèrbola i s'hauria de filtrar altra vegada. La lectura a 665 nm indica la quantitat de clorofil·la *a* que conté l'extracte. L'absorbància a 430 nm descriu la presència de pigments carotenoides o productes de degradació de la clorofil·la (feofitines).

Un altre índex que ens dóna informació sobre l'estat algal de les mostres és l'Índex d'absorbància de Margalef:

$$\text{Índex d'absorbància de Margalef} = \text{Abs } 430 / \text{Abs } 665$$

Si aquest índex assoleix valors propers a 2, indica que la clorofil·la està activa i per tant que les algues es troben en bon estat, en canvi, si els valors són molt superiors a 2, és un indicador que hi ha molts productes de degradació (feofitines) i que per tant les algues estan en mal estat.

Per calcular el contingut de clorofil·la s'utilitza la següent fórmula:

$$\text{Clorofil} \cdot \text{la } (\mu\text{g}/\text{cm}^2) = 11,4 \times (\text{Abs } 665 - \text{Abs } 750)V/B$$

V= Volum de l'extracte en mL.; B= Superfície en cm² de les pedres.

Per tal de mesurar les àrees de les pedres s'ha realitzat la mateixa tècnica que en el cas de la biomassa bacteriana (veure protocol anterior).

El material necessari per dur a terme aquesta anàlisi és: filtres de fibra de vidre amb porus de 1,4 µm Whatman GF/F, vials de plàstic, acetona, bany d'ultrasons, aparell de filtració, pinces, micropipetes, cubetes de vidre i espectrofotòmetre (Shimatzu UV-1800).

➤ Biomassa de fongs

La biomassa de fongs es quantifica a partir de la concentració d'ergosterol (µg/cm²) que hi ha a les mostres, ja que hi ha una bona correlació entre aquests dos paràmetres (Sthal et al., 1996). L'ergosterol és una molècula que es troba a la membrana cel·lular dels fongs i té la funció d'estructurar i d'impermeabilitzar els lípids d'aquesta.

Aquesta tècnica es basa en l'extracció de lípids en fase sòlida i una separació de l'ergosterol mitjançant una cromatografia líquida (Gessner et al., 1996). Finalment l'ergosterol es mesurarà per absorbància.

Per tal de processar les mostres primerament es van liofilitzar, pesar (pes sec) i introduir en tubs d'assaig. Després s'hi va afegir 10 ml de KOH 0,14 M en metanol a cada mostra i es van tancar els tubs hermèticament per tal que no s'evaporés el líquid (el metanol és molt volàtil). Seguidament es va posar al bany maria a 80 °C durant 30 minuts. Un cop va transcórrer aquest temps, es van deixar refredar les mostres a temperatura ambient i sense llum. Posteriorment es va transferir l'extracte en tubs més grans, de 40 ml, i es van fer dos rentats de 10 mL de metanol de manera que hi hagués un volum final de 30 mL.

Per tal de condicionar els cartutxos en fase sòlida (Waters Sep- Pak®, Vac RC, tC 18,500 mg), primerament, es va afegir 7,5 ml de metanol pur a cada un d'ells. Es van obrir les vàlvules i la bomba per tal de generar un flux suau i constant del dissolvent. Després s'hi va afegir 7,5 ml de dissolvent condicionador acidificat (6 parts KOH 0,12 M + 1 part HCl 0,75 M; pH < 3). Quan va quedar 1 mL de dissolvent condicionador en la columna es van tancar les vàlvules, és molt important que la columna no s'assequi.

Per a fer l'elució de l'extracte de lípids a través dels cartutxos en fase sòlida es va afegir 5 ml d'HCl 0,75 M a cada extracte i posteriorment es van transferir en els cartutxos corresponents. Es va engegar la bomba i es van obrir les vàlvules a poc a poc fins aconseguir un flux lent i constant. Un cop va passar tot l'extracte de cada columna, es va afegir 2,5 mL de KOH 0,4 M en metanol per tal de fer el rentat. Després, amb la bomba i les vàlvules obertes, es van deixar assecar els cartutxos durant 60 minuts.

Per avaluar la capacitat de retenció de l'ergosterol a través de les columnes es va afegir un cartutx amb una concentració coneguda d'ergosterol diluït en metanol el qual es va processar com la resta de mostres.

El següent pas va ser fer l'elució de l'ergosterol. Primer es van posar els vials de vidre per HPLC prèviament pesats a la sortida de les vàlvules dels cartutxos, seguidament es va afegir 1,6 mL d'isopropanol a cadascun d'aquests i es va obrir la bomba per tal de començar l'elució. Finalment es van tornar a pesar els vials plens per saber el pes de l'isopropanol, i les 12 mostres van ser processades per l'HPLC (Waters) juntament amb el blanc i la recta patró.

Càlculs per a la estimació del contingut d'ergosterol ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de les mostres:

$$[\text{Ergosterol}] = \frac{A + 1566,5}{13215}$$

A= àrea del pic d'ergosterol que marca l'HPLC; Constants obtingudes a partir de la recta patró de l'ergosterol.

$$\text{Ergosterol } (\mu\text{g}/\text{cm}^2) = \frac{V_{\text{iso}} \times [\text{ergosterol}]}{A_m}$$

V_{iso} = volum isopropanol; [ergosterol]= concentració d'ergosterol; A_m = àrea de les pedres de cada mostra

Per a calcular la biomassa de fongs (mg/cm^2) s'utilitza els factor de conversió següent; es considera que hi ha 5,5 μg d'ergosterol en 1 mg de biomassa de fongs (Gessner et al., 1993).

Per determinar la biomassa de fons en quantitat de carboni, es considera que un 43% de la massa fúngica està en forma de carboni (Baldy et al., 1997).

Per tal de mesurar les àries de les pedres s'ha realitzat la mateixa tècnica que en el cas de la biomassa bacteriana i algal (veure protocol biomassa bacteriana).

En aquest anàlisi s'ha utilitzat el següent material: liofilitzador, balança, pinces, tubs d'assaig de les mides indicades anteriorment, bany tèrmic, sistema del buit en fase sòlida, bomba, cartutxos per a la extracció en fase sòlida (Waters Sep- Pak, Vac RC, tC 18,500 mg), pipetes, matrassos aforats, vasos de precipitats, reactius descrits anteriorment, campana extractora, vials de vidra i aparell HPLC (Waters).

➤ Activitats enzimàtiques extracel·lulars

Els enzims extracel·lulars són sintetitzats principalment per bacteris, fongs i per algunes algues i protozous. Aquests enzims estan lligats a la superfície de les cèl·lules d'aquests microorganismes i actuen fora d'aquestes (Chróst, 1991). També poden ser enzims lliures que formen part de la matriu polimèrica del biofilm. Aquests enzims descomponen molècules de diferents pesos moleculars, que poden incorporar directament els microorganismes per tal de ser metabolitzats i ser utilitzats com a fons de matèria orgànica (C, N i P). La taxa de descomposició de matèria orgànica és directament depenent d'aquesta activitat enzimàtica.

La tècnica que es va dur a terme per mesurar les activitats enzimàtiques es va fer a partir de la determinació de la fluorescència de les mostres. Aquesta tècnica es basa en la utilització de substrats artificials que contenen l'enllaç sobre el qual actua l'enzim. En un extrem d'aquest enllaç hi ha una molècula fluorescent (metilumbeliferona, MUF, en el cas de la fosfatasa i la β -glucosidasa i aminometilcumarina, AMC, en el cas de la leucineaminopeptidasa), que emet fluorescència només quan està lliure gràcies a l'acció de l'enzim. Les mostres s'incuben amb el substrat artificial i es mesura la fluorescència final, és dir, els enllaços que han estat trencats a causa de l'activitat dels enzims presents les mostres.

El procediment que es va dur a terme per a mesurar les activitats va ser: Posar les mostres (una pedra per rèplica, 3 rèpliques per cada un dels 4 punts) en vials (falcons de plàstic) de 15 ml. Afegir 4 mL de l'aigua de la riera filtrada per 0,2 μ m a cada una de les 12 mostres. Afegir 120 μ L del substrat artificial (MUF-enzim o AMC-enzim, depenent de l'activitat que es va mesurar) amb una concentració final de 0,3 nM (abans de fer aquest protocol es va realitzar la cinètica enzimàtica per tal de determinar quina concentració s'havia d'utilitzar per a fer l'anàlisi). Per tal de preparar els substrats artificials (taula 4) per a cada anàlisi es van diluir en aigua destil·lada autoclavada i en vials (tapats de la llum) per a obtenir una concentració 10 mM. Aquesta solució es va guardar al congelador a -20 °C. Alguns substrats artificials de MUF són difícils de diluir i per tant es va afegir 1-2 mL de hidroximetil éter. A més a més de les mostres també s'ha d'incubar un blanc amb l'aigua de riu, un blanc amb aigua mQ + substrat per tal de controlar la degradació del substrat artificial (un per cada tipus d'enzim), diferents estàndards de MUF i AMC (0, 0,1, 0,25, 0,5, 2,5, 5, 10, 50, 100 μ M) amb aigua de la riera esterilitzada. Seguidament incubar les mostres, els blancs i els estàndards 1 hora a la foscor en agitació i a un 20 °C de temperatura. Després de la incubació afegir el tampó de glicina (pH= 10,4) 1/1 v/v a les mostres, blancs i estàndards. Finalment, per tal de determinar la fluorescència, els compostos MUF van ser mesurats a 365/455 nm d'excitació/emissió i els compostos d'AMC a 364/445 nm amb el fluorímetre (Kontron SFM 25).

Càlculs de les activitats enzimàtiques:

Les activitats enzimàtiques s'expressen en nanomols de MUF o AMC alliberats per hora i cm² de biofilm epilític. Poden variar en funció de factors, com de la quantitat i la qualitat de la matèria orgànica. El rang de valors és molt ampli i varia en funció de l'enzim que es mesuri (Romaní et al., 1995).

$$\text{Fosfatasa} \left(\frac{\text{nmol MUF}}{\text{cm}^2 \cdot \text{h}} \right) = \frac{[\text{fosfatasa}] \times V}{t \cdot A}$$

A= àrea de les pedres de cada mostra en cm²; [fosfatasa] en μmols/L; V= volum final; t= temps d'incubació

$$\beta - \text{glucosidasa} \left(\frac{\text{nmol MUF}}{\text{cm}^2 \cdot \text{h}} \right) = \frac{[\beta - \text{glucosidasa}] \times V}{1,88 \cdot A}$$

A= àrea de les pedres de cada mostra en cm²; [β-glucosidasa] en μmols/L; V= volum final; t= temps d'incubació

$$\text{Leucineaminopeptidasa} \left(\frac{\text{nmol AMC}}{\text{cm}^2 \cdot \text{h}} \right) = \frac{[\text{Leucineaminopeptidasa}] \times V}{1,88 \cdot A}$$

A= àrea de les pedres de cada mostra en cm²; [leucineaminopeptidasa] en μmols/L; V= volum final; t= temps d'incubació

Els enzims amb els que s'han fet aquesta anàlisi són:

Taula 4. Substrats artificials utilitzats en l'anàlisi de les activitats enzimàtiques.

ENZIMS	SUBSTRAT ARTIFICIAL	RELACIONADA AMB EL METBOLISME DE
β-glucosidasa	MUF-β-D-glucòsid	C (últim pas de la descomposició de la cel·lulosa, cel·lobiosa o petits oligòmers amb enllaços β-D-glucosa)
Leucineaminopeptidase	Leu-AMC (L-leucina-4-metil-7-cumarinilamida)	N, C (descomposició de pèptids)
Fosfatasa	MUF-fosfat	P (descomposició de èsters de fosfat)

El material utilitzat va ser: Reactius i compostos descrits, vials de vidre i de plàstic, equip de filtració, filtres Whatman GF/F, agitador, matrassos aforats, pipetes automàtiques i fluorímetre (Kontron SFM 25).

ANÀLISI DE DADES:

En aquest estudi s'han tractat les dades obtingudes amb el programa estadístic SPSS. Les anàlisis que s'han realitzat són:

MANOVA I ANOVA d'un factor: Les anàlisis de variància permeten comparar els resultats de la variable independent (punts de mostreig) respecte les variables dependents. Si es fa un anàlisi multivariant (MANOVA) es poden comparar el comportament de tres o més variables al mateix temps i saber la relació entre els diferents grups d'aquestes. També s'ha fet el post-tractament de Tuckey-b per tal de determinar les diferències significatives o no entre els punts de mostreig d'una mateixa variable.

Correlacions de Pearson: Aquesta anàlisi estableix la relació o dependència que existeix entre les dues variables que intervenen en una distribució bidimensional. És a dir, determina si els canvis en una de les variables co-varia amb els canvis d'una altra

Taula 2. Taula-resum de tots els mètodes utilitzats per a l'anàlisi dels paràmetres fisicoquímics.

PARÀMETRE ESTUDIAT					METODOLOGIA
PARÀMETRES FISCOQUÍMIC	Conductivitat	Determinar la salinitat de la riera.			Conductímetre
	[Oxigen]	Determinar la concentració d'oxigen de la riera.			Oxímetre
	Temperatura	Determinar la temperatura de la riera.			Oxímetre
	pH	Determinar el pH de la riera.			pH- metre
	Fosfats (PRS)	Absorbància	890 nm		Espectrofotòmetre (Shimatzu UV-1800) (Mètode del molibdat Murphy- Riley)
	Nitrats	Separació de cations i anions per determinar els mg/L de NO ₃ de cada mostra.			Cromatògraf iònic (Metrohm)
	Amonis	Absorbància	690 nm		Espectrofotòmetre (Shimatzu UV-1800) (Reardon et al., 1966)
	Matèria orgànica dissolta (MOD)	Fluorescència	Ràtio (370/450)/(370/500) (McKnight et al., 2001)	Contingut de material húmic i estat qualitatiu de la matèria orgànica (MO) dissolta. ↓ Ràtio→ origen terrestre (provinent de la vegetació) de la MO dissolta. ↑ Ràtio→ origen microbià de la MO dissolta.	Fluorímetre (Kontron SFM 25)
Absorbància			254 nm (Jager et al., 2009)	Contingut de material húmic (↑ Abs 254→ ↑ mat hum ↑DOC	Espectrofotòmetre (Shimatzu UV-1800)
		Ràtio Abs 250/Abs 365 (De Haan et al., 1987)	El Ràtio és un indicador de la mitjana de la mida molecular. ↑ Ràtio→ ↓ mitjana mida molecular. ↓ Ràtio→ ↑ mitjana mida molecular.		

Tabla 3. Taula-resum de tots els mètodes utilitzats per l'anàlisi dels paràmetres biològics.

PARÀMETRE ESTUDIAT					METODOLOGIA
PARÀMETRES BIOLÒGICS	Biomassa Bacteriana	Comptatge bacteris per fluo-rescència blava	Recompte directe de bacteris (Porter et al., 1980)		DAPI (4,6-dimidino-2 fenilindol). Microscopi d'epifluorescència (Nikon).
	Biomassa Algal	Absorbància. Estimació de la biomassa algal a partir de la concentració clo-rofil·la <i>a</i> .	750 nm	Ha de prendre valors propers a 0, ja que a 750 nm la clorofil·la no emet color. Si Abs > 0, indica que la mostra és molt tèrbola i que s'ha de tornar a filtrar.	Espectrofotòmetre (Shimatzu UV-1800) Extracció amb acetona i filtració.
			665 nm	Indica la quantitat de clorofil·la a que conté l'extracte.	
			430 nm	Presència de pigments carotenoides o feofiti-nes.	
			Índex Margalef 430/665	Índex Margalef 430/665 proper a 2 → Bon estat algal. Índex Margalef 430/665 > 2 → ↑ compostos de degradació (feofitines). Mal estat algal.	
	Biomassa de Fongs	Absorbància de l'ergosterol. (Gessner & Schmitt, 1996)	Estimació de la biomassa de fongs a partir de la concentració d'ergosterol present a les membranes d'aquests (Sthal et al., 1996).		Extracció en fase sòlida (lípid). Cromatografia líquida (elució er-gosterol). HPLC (Waters)
	Activitats enzimàtiques extra-cel·lulars	Fluorescència	Determinació de les activitats enzimàtiques (Chróst, 1991; Romaní et al., 1995).		Fluorímetre (Kontron SFM 25). Substrats artificials (veure taula 4).

RESULTATS

CARACTERÍSTIQUES DELS PUNTS DE MOSTREIG

Les característiques dels punts de mostreig s'especifiquen a la figura 3 i a la taula 1.



Figura 3. Fotografies dels quatre punts de mostreig (A, B, C, D)

Tabla 1. Descripció de les característiques paisatgístiques i flubials dels quatre punts amb el codi de la fotografia (figura 3) corresponent de cada punt.

PUNTS MOSTREIG	DESCRIPCIÓ DELS PUNTS	CODI FOTOGRAFIA
A	Aigua molt tèrbola. Subsòl molt llimós. Poc cabal. Hi havia molta femta de vaca i molta alga. A pocs centímetres de la superfície es trobava condicions d'anòxia. Fulles de Pi.	A1, A2
B	Al costat de la riera hi havia una muntanya de sorra (grava). Sediment fi.	B1, B2
C	Subsòl molt llimós. Poca sorra. Fulles d'Auró	C1, C2
D	La riera es trobava prop d'un habitatge i hi havia molta brossa (bosses de plàstic, etc.).	D1, D2

PARÀMETRES FISCOQUÍMICS

Com es pot observar a la figura 4 les dades fisicoquímiques obtingudes *in situ* mostren que hi ha un clar gradient de **conductivitat** comprès entre els 43,5 i els 0,6 mS, obtenint els valors més alts a prop del naixement de la riera i els més baixos en els punts més llunyans d'aquest (riera avall). Pel què fa a la **temperatura** no hi ha diferències significatives entre punts (taula 4), la temperatura mitjana d'aquests és de 5 °C. Els valors de **pH** oscil·len entre 8 i 9, obtenint els valors més alts en el punt B i els més baixos en el punt C, els punts A i D són significativament semblants (taula 4). La **concentració d'oxigen** també és força constant entre els quatre punts de mostreig, tot i que entre els punts A i B (Mitjana=10 mg/L) no s'observen diferències significatives però sí amb els punts C i D (Mitjana=10,6 mg/L), que entre ells també són significativament semblants (taula 4). Així doncs, es pot observar que mentre que hi ha un clar gradient de conductivitat, els valors de temperatura, pH i oxigen es mantenen força constants entre punts.

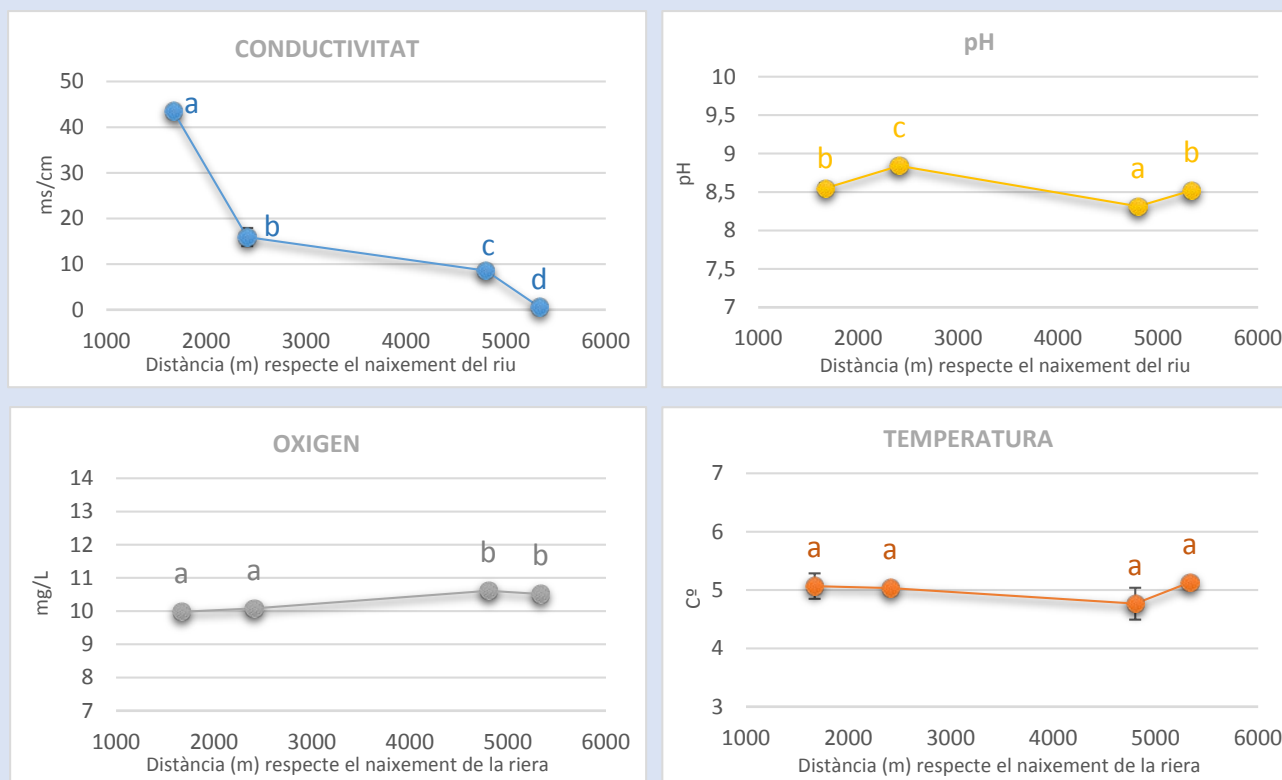
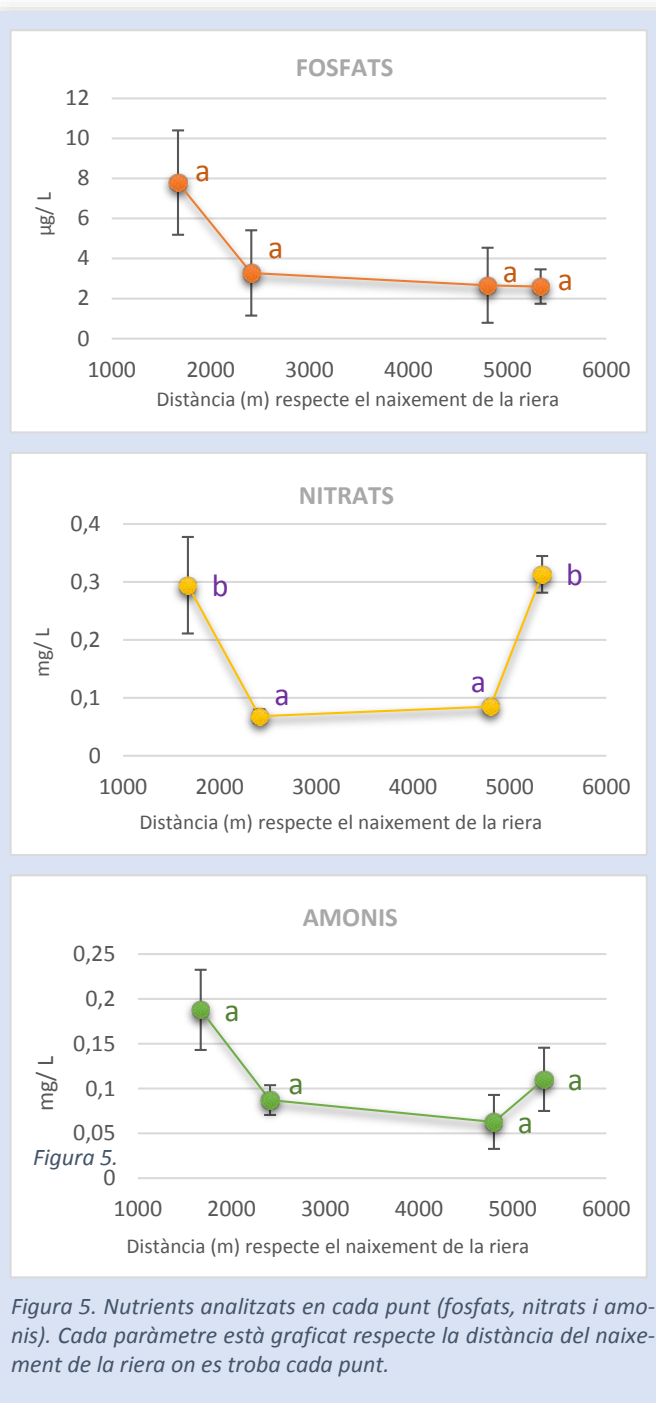


Figura 4. Paràmetres fisicoquímics mesurats in situ (conductivitat, pH, oxigen i temperatura). Cada paràmetre està graficat respecte la distància del naixement de la riera on es troba cada punt.

Taula 4. Resultats de l'anàlisi estadística (ANOVA) per cada un dels paràmetres estudiats.

		Graus de Llibertat	F de Fisher	p- valor*
PARÀMETRES FÍSICOQUÍMICS	Temperatura	3	0,833	0,512
	pH	3	35,366	<0,001
	Conductivitat	3	346,612	<0,001
	Oxigen	3	32,307	<0,001
	Fosfats	3	1,184	0,375
	Nitrats	3	10,272	0,004
	Amonis	3	2,623	0,122
	Fluorescència 370/450	3	164,548	<0,001
	Fluorescència 370/500	3	323,974	<0,001
	Ràtio Fluorescència 450/500	3	0,439	0,731
	Absorbància 254 nm	3	2,027	0,189
	Ràtio Absorbància 250/365	3	1,998	0,193
PARÀMETRES BIOLÒGICS	Bacteris	3	15,795	0,001
	Biomassa Bacteris	3	15,794	0,001
	[Clorofil·la]	3	4,506	0,039
	Biomassa Algal	3	9,711	0,005
	Índex Margalef	3	0,975	0,451
	[Ergosterol]	3	1,541	0,277
	Biomassa Fongs	3	1,820	0,221
	% Bacteris	3	1,438	0,302
	% Clorofil·la	3	2,765	0,111
	% Fongs	3	4,137	0,048
	Carboni total de cada punt	3	18,425	0,001
	Fosfatasa	3	3,152	0,086
	β- glucosidasa	3	7,301	0,011
	Leucineaminopeptidasa	3	2,877	0,103

*El nivell de significació utilitzat en aquesta anàlisi ha estat de $p \leq 0,05$



Si s'observa el comportament dels **nutrients** (figura 5), els **fosfats** van disminuint riu avall. Entre els quatre punts no s'observen diferències significatives (taula 4), de totes maneres el punt A és el que pren els valors més elevats respecte els punts B, C i D.

En els **nitrats**, els punts B i C són significativament semblants, però diferents amb els punts A i D, que, entre ells, tampoc hi ha diferències significatives (taula 4). Tot i així, excepte el punt A, es pot veure com del punt B al D va augmentant la seva concentració a mesura que augmenta la distància respecte el naixement de la riera (figura 5).

Si s'observen els valors dels **amonis** (figura 5) es pot veure com no existeixen diferències significatives entre punts (Taula 4). Tal i com passa amb els fosfats, els valors més alts d'amoni es donen en el punt A, seguidament van disminuint riu avall (punts B i C), mentre que el punt D torna augmentar, lleugerament la seva concentració.

La **MOD** (Matèria Orgànica Dissolta) (figura 6) a partir de l'**absorbància a 254 nm**, s'observa que els quatre punts són significativament semblants (taula 4) i que el valor d'absorbància va augmentant aïgues avall.

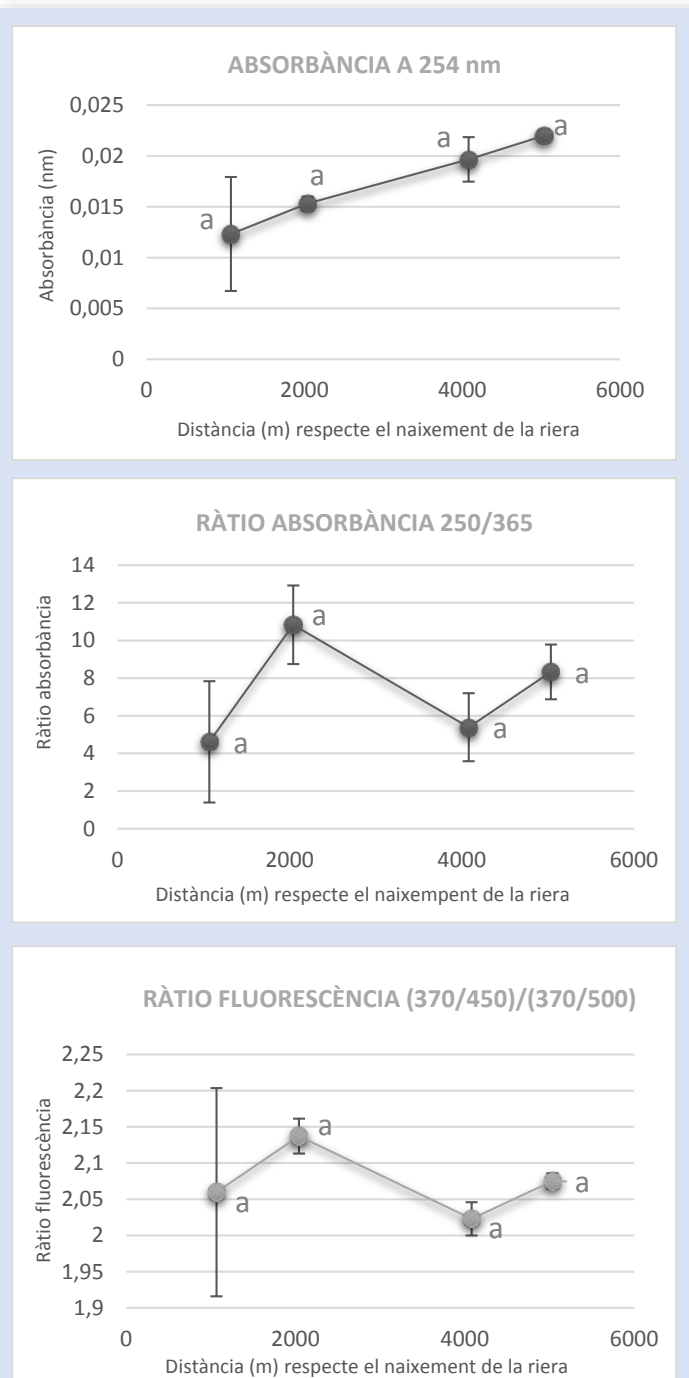


Figura 6. Paràmetres analitzats per determinar la MOD del medi. Cada paràmetre està graficat respecte la distància del naixement de la riera on es troba cada punt.

Els valors de la ràtio o **índex d'absorbància 250/365** (figura 6) indiquen que tampoc no hi ha diferències significatives entre punts (taula 4). El punt amb els valors més alts és el B, següentament el D, el C i per últim, el punt que pren els valors més baixos d'aquesta ràtio és el punt A.

La ràtio o **índex de fluorescència (370/450) / (370/500)** (figura 6) és un altre dels paràmetres que no presenten diferències significatives entre els quatre punts (taula 4). L'ordre dels punts de més a menys valor de ràtio és B > C > A > D.

PARÀMETRES BIOLÒGICS

La figura 7 mostra els gràfics dels resultats obtinguts del nombre de bacteris per cm², dels µg de clorofil·la per cm² i dels µg d'ergosterol per cm². Per tal de determinar la biomassa de bacteris, algues i fongs s'ha utilitzat un factor de conversió (explicat a l'apartat de mètodes) el qual ha transformat les dades en µg de carboni per cm² i a més a més ha permès poder comparar aquests tres paràmetres entre ells.

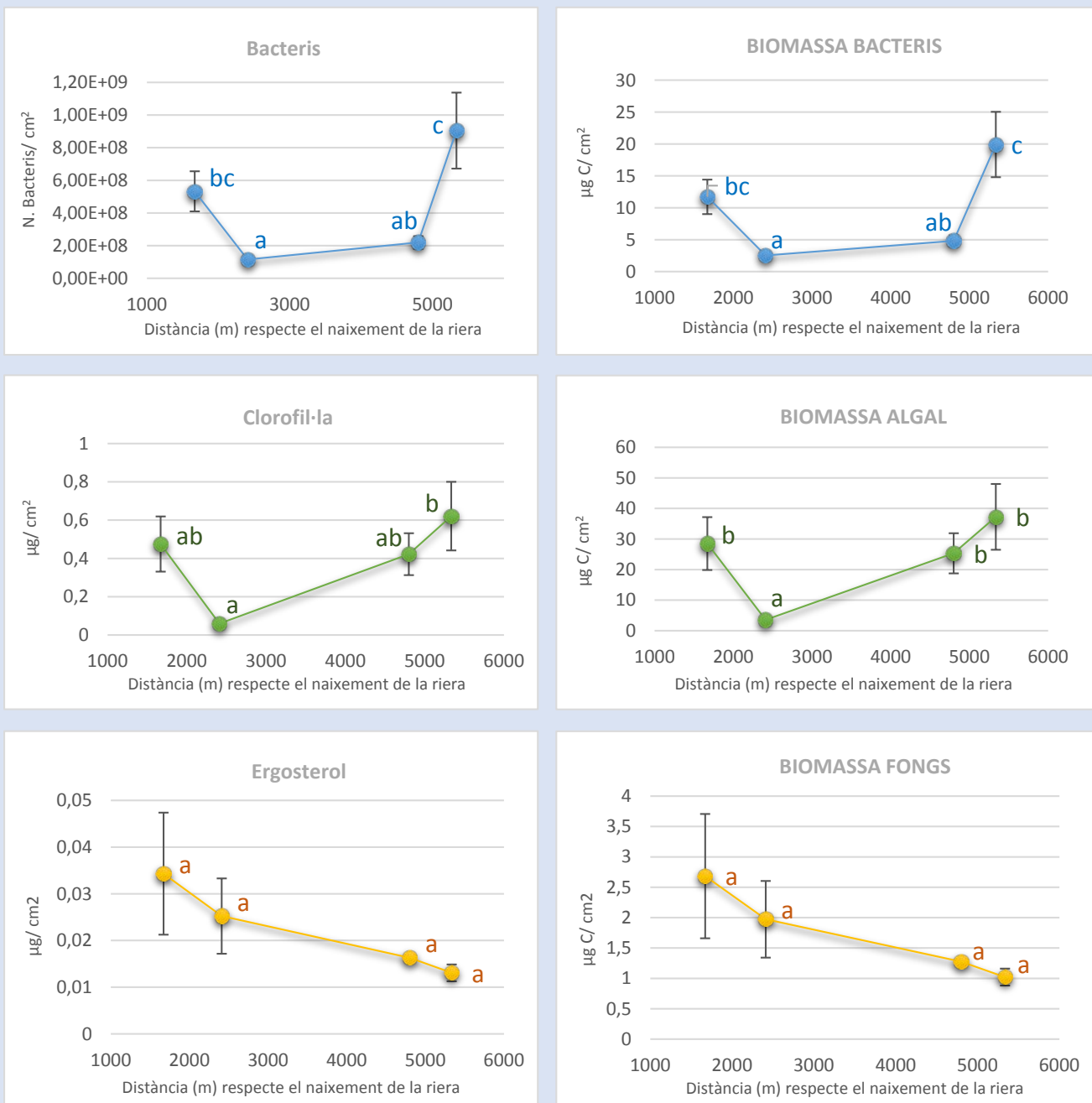


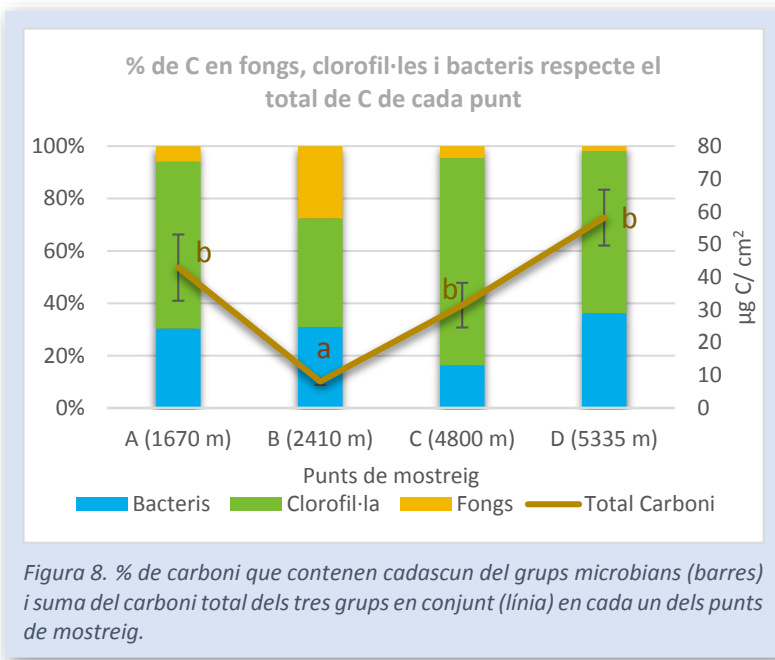
Figura 7. Relació de bacteris (nombre bacteris/cm²), clorofil·la i ergosterol (µg/cm²) amb les biomasses microbianes de bacteris, algues i fongs. Cada paràmetre està graficat respecte la distància del naixement de la riera on es troba cada punt.

Pel què fa a la **biomassa de bacteris** (figura 7) es poden observar diferències significatives entre els punts A i B i entre els punts B i D (taula 4). Excepte el punt A, la resta de punts, van augmentant el seu valor a mesura que augmenta la distància respecte el naixement de la riera.

En la **biomassa algal** (figura 7) els punts A, C i D no presenten diferències significatives mentre que el punt B difereix significativament dels altres (taula 4). Excepte el punt A, pel què fa a la resta de punts,

s'observa un increment de la biomassa algal quan també incrementa la distància respecte el naixement de la riera.

La **biomassa de fongs** (figura 7) presenta un comportament força diferent respecte les altres biomasses. Tot i que no s'observa cap diferència significativa entre punts (taula 4), hi ha una disminució dels seus valors riu avall. Per això, tal i com mostra la taula 5 hi ha una correlació negativa amb la distància respecte el naixement de la riera (a mesura que augmenten els metres, disminueix la biomassa fúngica).



La figura 8 mostra el % de carboni que contenen cadascun dels grups microbians (barres) i la suma del carboni total dels tres grups en conjunt (línia) en cada un dels punts de mostreig.

En referència al **carboni total**, el punt B és l'únic que difereix significativament respecte a la resta de punts, prenent els valors més baixos d'aquest paràmetre (taula 4), així doncs, és el punt amb menys presència dels tres grups microbians en

conjunt. Tret del punt A, hi ha un increment del carboni total a mesura que va augmentant la distància respecte el naixement de la riera.

Respecte a la distribució de **bacteris, algues i fongs en %** (figura 8), el punt D és el que té el % més elevat de biomassa bacteriana (36%), seguit de B (30%), d'A (31%) i per últim de C (16%). Pel que fa al % de biomassa algal, el punt amb el valor més elevat és el C (79%), seguit d'A (64%), de D (62%) i finalment de B (41%). En el % de biomassa de fongs la relació de més % a menys és B (28%) > A (6%) > C (5%) > D (2%).

A trets generals, en tots els punts, la composició del biofilm ve afavorida per les algues, després pels bacteris i finalment pels fongs, el grup microbià amb menys representació en %. D'altra banda cal esmentar que, així com observant les dades estadístiques de la biomassa de fongs no hi ha diferències significatives entre punts, quan els valors s'analitzen en %, sí que se n'observen (taula 4).

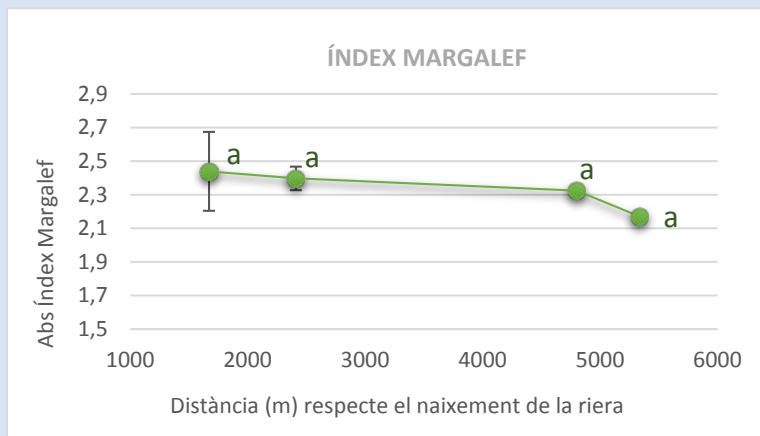


Figura 9. Valors de l'Índex de Margalef. Cada paràmetre està graficat respecte la distància del naixement de la riera on es troba cada punt.

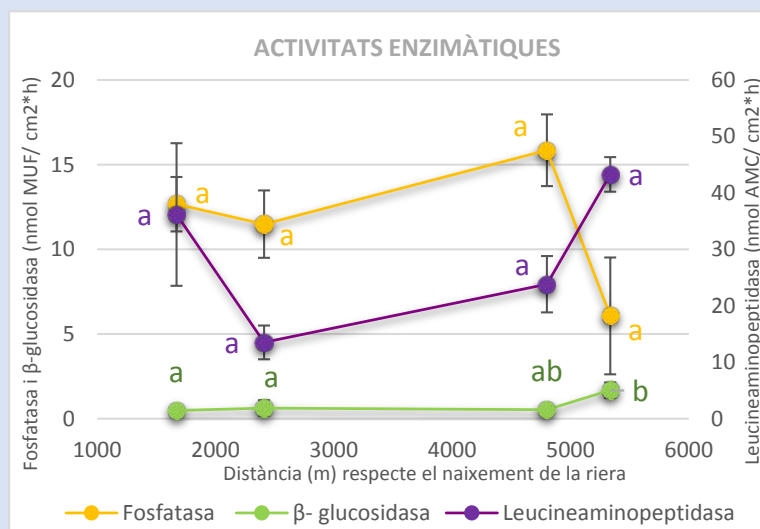


Figura 10. Activitats enzimàtiques (fosfatasa, β-glucosidasa i leucineaminopeptidasa) del biofilm. Cada paràmetre està graficat respecte la distància del naixement de la riera on es troba cada punt.

L'Índex de Margalef (figura 9) no presenta diferències significatives (taula 4) entre punts. A, B i C prenen valors al voltant de 2,3 i 2,5, mentre que el D, el valor més baix, té un valor de 2,17.

En els gràfics de les **activitats enzimàtiques** (figura 10), es veu com la **fosfatasa** no presenta diferències significatives entre els quatre punts (taula 4). El punt D, però, és on s'han obtingut els valors més baixos d'aquest enzim (6,07 nmol MUF·cm⁻²·h⁻¹) respecte els altres punts, els valors dels quals estaven al voltant de 13,34 nmol MUF·cm⁻²·h⁻¹.

En la **β-glucosidasa** (figura 10), els punts A, B i C no presenten diferències significatives entre ells, tampoc en presenten el punt C amb el D. En canvi, els punts A i B sí que són significativament diferents amb D (principalment), i el punt C, és significativament similar amb la resta de punts (taula 4).

L'enzim **leucineaminopeptidasa** (figura 9), tampoc presenta diferències significatives entre els quatre punts (taula 4). Observant els punts B, C i D es pot determinar que augmenten el seu valor riu avall.

Si s'observa la taula 5 es pot veure com hi ha una correlació positiva entre nitrats i bacteris, de manera que quan aquest nutrient augmenta, la biomassa bacteriana també. El mateix passa amb la biomassa algal, el carboni total de cada punt i l'activitat enzimàtica de la leucineaminopeptidasa.

D'altra banda, els amonis tenen una correlació positiva amb la biomassa de fongs.

A la taula 5 es pot veure com hi ha una correlació positiva entre l'absorbància a 254 nm aquest i la distància respecte el naixement de la riera, ja que a mesura que augmenta, també augmenta aquest paràmetre.

Tabla 5. Resultats de les correlacions significatives entre els paràmetres estudiats.

		Distància respecte naixement riera	Nitrats	Amonis
Biomassa bacteris	R		0,657	
	p*		0,020	
Biomassa fongs	R	-0,593		0,663
	p*	0,042		0,019
Biomassa algal	R		0,605	
	p*		0,037	
Abs 254	R	0,656		
	p*	0,021		
Carboni Total	R		0,717	
	p*		0,009	
Leucineaminopeptidasea	R		0,683	
	p*		0,014	

*El nivell de significació utilitzat en aquesta anàlisi ha estat de $p \leq 0,05$

DISCUSSIÓ

Els valors obtinguts de conductivitat corroboren que la Riera Salada és una riera hipersalina, la qual va rebent entrades d'aigua dolça que fan que aquesta conductivitat (salinitat) vagi disminuint a mesura que avança el seu curs riera avall (Bodelón et al., 1994). Així doncs, entre el punt A i el punt D hi ha un clar gradient de salinitat, sent el punt A el que té els valors més elevats i el D, el que té els valors més baixos (semblants al d'un riu d'aigua dolça). Pel què fa a les dades fisicoquímiques mesurades *in situ* (temperatura, oxigen i pH), no es veuen afectades per la salinitat. Tot i que l'oxigen i el pH presenten diferències significatives entre punts, si s'observen els valors de les seves mitjanes, oscil·len en un gradient molt petit com per parlar de que hi ha algun tipus de relació amb aquest paràmetre.

En relació als objectius d'aquest treball, la determinació de l'estructura i el funcionament del biofilm epilític d'aquesta riera, s'han observat canvis que venen donats pel gradient de salinitat. Pel que fa als resultats obtinguts del carboni total del biofilm de cada punt, s'observa que, excepte el punt A, el gradient de salinitat té un efecte directe en el contingut microbià total d'aquest, de manera que, del punt B al D va augmentant el contingut total de carboni mentre va disminuint la salinitat, sent el B (8,08 $\mu\text{gC}/\text{cm}^2$) el punt amb el contingut més baix de carboni total i el punt D (58,18 $\mu\text{gC}/\text{cm}^2$) el punt amb el contingut més alt (Jackson et al., 2009).

Tal i com s'ha comentat, el punt A, no segueix el patró de la resta de punts enfront la salinitat. És el punt amb la conductivitat més elevada (43,53 ms/cm) i, tot i així, tant en el paràmetre anterior, com en algunes de les biomasses que s'explicaran més endavant, en aquest tall de la riera és on es troben uns dels valors més elevats de la biomassa del biofilm dels quatre punts. Aquest fet podria ser degut a que hi

havia una eutrofització local en aquest tram en l'època en la que es va mostrejar, possiblement deguda a que hi havia molta femta de vaca.

En el punt A és on es troba el valor més alt de biomassa algal després del punt D, tot i així, l'Índex de Margalef indica que, a diferència del punt D on les algues es troben en força bon estat, en aquest punt A és on l'estat algal es troba en pitjors condicions ja que hi ha un elevat contingut de productes de degradació de la clorofil·la, com ho indiquen els valors superiors a 2 de l'Índex de Margalef (Margalef, 1983). Aquests resultats del punt A suggereixen que probablement hi ha hagut una selecció de les algues que han desenvolupat resistència a la salinitat i que, degut a la disponibilitat de nutrients han pogut créixer i augmentar la seva biomassa. Una possible ampliació d'aquest estudi seria identificar quines algues estan presents en aquest punt per poder determinar la seva adaptació i el seu funcionament davant aquest estrès. Pel què fa a la biomassa de bacteris, en aquest tram també és on hi ha el segon valor més alt tot i que no concorda amb els resultats obtinguts d'absorbància a 254 d'aquest punt. L'absorbància a aquesta longitud d'ona, habitualment es correlaciona positivament amb el contingut de carboni orgànic dissolt (COD) a l'aigua (Jager et al., 2009), de manera que com més elevat sigui aquest valor, hi haurà més carboni disponible per ser captat pels bacteris i afavorirà el seu creixement. En aquest tram però, tot i que, com ja s'ha dit, la biomassa bacteriana és elevada, l'absorbància a 254 nm pren els valors més baixos, això pot ser degut a que els bacteris segurament es veuen afavorits per les algues del biofilm més que per la COD present al medi d'aquets punt. En el cas de la biomassa fúngica és on s'ha obtingut el valor més alt dels quatre punts.

Aquesta situació que s'ha produït al punt A es creu que pot ser deguda a l'elevada disponibilitat de nutrients en el medi a causa de l'eutrofització local. Els resultats dels nutrients determinen que en el punt A hi ha molta disponibilitat de fosfats, nitrats i amonis en el medi. En el cas dels fosfats i els amonis no s'observen diferències significatives entre punts, tot i així, mirant les mitjanes es veu com el punt A és el que assoleix els valors més alts d'aquests dos nutrients. A més a més, els amonis és possible que afavoreixin el creixement de la biomassa de fongs ja que existeix una correlació positiva entre aquests dos paràmetres. En els nitrats sí que s'observen diferències significatives entre punts, sent el punt A i D els que tenen més contingut de nitrats i el B i el D els que en tenen menys. Així doncs, en aquest tram de riera, el creixement de la biomassa microbiana ve donat per la quantitat de nutrients disponibles en el medi els quals contraresten o gairebé anul·len l'efecte que l'elevada salinitat pot provocar (Jackson et al., 2009). D'altra banda, la correlació positiva que existeix entre nitrats i biomassa algal i bacteriana indica que aquest nutrient pot ser que afavoreixi el creixement d'aquests dos grups de microorganismes, per això, se suposa que també s'ha obtingut una correlació positiva d'aquest nutrient amb el carboni total.

Pel què fa als resultats de les biomasses del biofilm epilític en relació al gradient de salinitat (exceptuant el punt A), el grup microbià amb més representació en % respecte els tres grups microbians en cadascun

dels quatre punts és el grup algal. A partir del punt B, la biomassa algal (expressada en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) va augmentant a mesura que disminueix la salinitat. Tot i així, sembla ser que aquest paràmetre no està tant afectat per la salinitat com en el cas dels bacteris ja que no es troben diferències significatives entre el punt C i D. En canvi, el punt C té una salinitat força més elevada que no pas el punt D, el qual té un contingut de sals semblants als rius d'aigua dolça. En aquest cas s'esperava que les algues fos el grup més afectat de tots tres tal i com s'ha observat en altres estudis (Nielsen et al., 2003).

El grup microbià que és el que sembla més afectat pel gradient de salinitat és el bacterià el qual assoleix el valor més baix al punt B amb una conductivitat de 15,91 ms/cm. Els valors de biomassa van augmentant del punt B al D a mesura que la salinitat va disminuint. Altres estudis (Hart et al., 1990) indiquen una afectació negativa de la comunitat bacteriana per part d'un gradient elevat de salinitat al medi. Per altra banda, l'absorbància a 254 nm va augmentant riu avall indicant que, com ja s'esperava, hi hagi una relació positiva amb la biomassa bacteriana a partir del punt B (Farjalla et al., 2002). En l'estructura del biofilm expressada en % de biomassa respecte els tres grups, els bacteris són el segon grup amb més representació microbiana del biofilm. El fet de que sigui el grup més afectat pel gradient de salinitat pot ser degut a que els bacteris que habiten en aquesta riera no siguin prou resistents a la pressió osmòtica produïda per les sals dissoltes i la seva membrana plasmàtica es lisi produint una mortalitat superior a la que es podria trobar en rius d'aigua dolça.

Els valors obtinguts de la biomassa de fongs informen que no hi ha diferències significatives entre punts i que, per tant, els fongs s'han mantingut força constants enfront el gradient de salinitat. Fins i tot, mirant els valors de les mitjanes dels quatre punts de la biomassa fúngica, es pot observar com hi ha una relació directament proporcional amb aquest paràmetre. Pel que fa al % de biomassa fúngica en comparació al dels altres grups, on es troba el valor més elevat amb força diferència respecte els altres és en el punt B (28%). Això sembla indicar que és el grup microbià que es troba menys afectat per la salinitat. Aquests resultats no s'haguessin esperat, ja que altres estudis observen una sensibilitat dels fongs a la salinitat (Mohamed et al., 2011). Una possible explicació és que les característiques de la paret que constitueixen els fongs formada de quitina els hi confereix més resistència a la pressió osmòtica produïda per la salinitat que en el cas d'algues i bacteris i, en comparació als altres grups, els fongs es veuen menys afectats.

El segon objectiu d'aquest estudi era observar si hi havia relació entre els resultats obtinguts de les biomasses microbianes amb els obtinguts de les activitats metabòliques. Al contrari del què s'havia esperat, en general les activitats no s'han vist gaire afectades per la salinitat. La que ha sigut més sensible tot i que molt lleugerament ha estat la β -glucosidasa, la qual augmenta la seva activitat en el punt D on la salinitat és més baixa. Així doncs, sembla ser que la salinitat inhibeix la descomposició dels compostos de carboni (Jackson et al., 2009). Encara que no s'ha trobat una correlació entre l'activitat β -glucosidasa i les biomasses de fongs i bacteris (responsables d'aquesta activitat), els resultats suggereixen que la

baixa activitat de descomposició de compostos de carboni estigui lligada a l'efecte de la salinitat sobre la biomassa bacteriana (especialment als punts B i C), que en canvi es recupera al punt D.

La fosfatasa no té cap relació amb la salinitat. Aquesta activitat la duen a terme els tres grups microbians però les algues hi contribueixen majoritàriament. Les algues, davant d'un alt contingut de fosfats al medi com els que hi ha en el punt A, en principi, no els hi caldria dur a terme l'activitat fosfatasa per degradar els compostos del fòsfor. Tot i així veiem que hi ha certa activitat, per això, tal i com s'ha apuntat anteriorment podria ser interessant fer una ampliació d'aquest estudi per tal de realitzar la identificació de l'alga del punt A per determinar la seva fisiologia específica davant la degradació de compostos.

Tot i que no hi ha diferències significatives entre punts, la leucineamiopeptidasa podria tenir certa relació amb la salinitat i alhora amb els nutrients, ja que en el punt A que és on hi ha el pic de salinitat més elevat, aquesta activitat augmenta, després disminueix en el punt B i D i torna a augmentar en el D, on hi ha els valors més baixos. A més a més hi ha una correlació positiva entre aquesta activitat i el contingut de nitrats al medi. Així doncs és possible que en el punt A no hi hagi hagut una inhibició de l'activitat per part de la salinitat a causa de la elevada disponibilitat de nitrats del medi, que utilitzen els microorganismes com a font d'energia i que contraresta l'efecte d'aquesta salinitat. Aquesta activitat la fan majoritàriament els bacteris i els fongs, en aquest cas, però, sembla que més aviat estigui relacionada amb els bacteris i també amb les algues (Zhang et al., 2006). Segons Ylla et al., 2009 aquesta activitat pot estar relacionada amb la utilització de pèptids alliberats per les algues per part dels bacteris i per tant, augmenta en els punts on el biofilm mostra majors biomasses algals.

Seria interessant, en propers estudis, fer una anàlisi de la diversitat i la riquesa microbiana en aquest ecosistema hipersalí per tal de veure quines espècies han modificat la seva fisiologia desenvolupant mecanismes de resistència a la salinitat i comparar aquests resultats amb la fisiologia de microorganismes que habiten en rius d'aigua dolça.

CONCLUSIONS

The conclusions derived from this study are the following:

- Downstream (from site A to D) of the Riera Salada there is salinity gradient ranging from 43.53 mS/cm at the upstream site to 0.60 mS/cm at the downstream site /about 4 km downstream from site A).
- The more saline upstream site (A) is further affected by local eutrophication. Microorganisms of this site may be favoured by the high concentrations of nutrients which may offset the negative effect that the salinity can produce allowing the growth of resistant species.

- The salinity gradient (from site B to D), has a direct effect on the structure and composition of the epilithic biofilm as shown by the lowest content of total carbon at site B which was increasing downstream while the salinity was decreasing.
- The fungal biomass is the group least affected by salinity and this might be linked to fungal cell wall characteristics which could give more resistance to osmotic pressure.
- Bacteria were affected by the salinity gradient as shown by the lowest biomass at site B. Bacterial biomass recovery downstream might be linked to the increase in the availability of dissolved organic matter together with the more favourable salinity conditions.
- B-glucosidase was the only extracellular enzyme sensitive to the salinity gradient and only increased at the downstream site. Its inhibition could be related to the effect of salinity on bacterial biomass.
- The leucineamiopeptidasa, however, may have some relation to salinity and nutrients at the same time because there is a positive correlation with the content of nitrates in the environment. This activity could be related to the bacterial use of peptides released by the algae which seems to be enhanced at the more eutrophic site A and at the downstream least salty site D.

BIBLIOGRAFIA

- Arribas, P., Gutiérrez-Cánovas, C., Abellán, P., Sánchez-Fernández, D., Picazo, F., Velasco, J., & Millán, A. (2009). Tipificación de los ríos salinos ibéricos. *Ecosistemas*, 18(3), 1–13. Retrieved from <http://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/58>
- Artigas, J., Romaní, A. M., Gaudes, A., Muñoz, I., & Sabater, S. (2009). Organic matter availability structures microbial biomass and activity in a Mediterranean stream. *Freshwater Biology*, 54, 2025–2036. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.02140.x>
- Baldy V., & Gessner M.O. (1997). Towards a budget of leaf litter decomposition in a first-order woodland stream. *Comptes rendus de l'Academie des Sciences III- Vie* 320, 747-758.
- Bodelón, O. G., Bernués, M., Baltanás, Á., & Montes, C. (1994). Conductividad y salinidad en los ecosistemas acuáticos del parque nacional de doñaña (SO, España). *Limnética*, 10, 27–31.
- Bratbak, G. (1985). Bacterial biovolume and biomass estimations. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Chróst R.J. (1991). *Microbial enzymes in aquatic environments*. New York: Springer-Verlag.
- Cole J.J., Findlay S., Pace M.L. (1988) Bacterial production in fresh and salt water ecosystems: a cross-system overview. *Marine Ecology Progress Series* 43, 1-10.
- De Haan, H., & De Boer, T. (1987). Applicability of light absorbance and fluorescence as measures of concentration and molecular size of dissolved organic carbon in humic Lake Tjeukemeer. *Water Research*.

- Dür S., Thomason J.C. (2010) *Biofouling*. Ames: Wiley-Blackwell
- Farjalla, V. F., Faria, B. M., & Esteves, F. A. (2002). The relationship between DOC and planktonic bacteria in tropical coastal lagoons. *Archiv Fur Hydrobiologie*, 156(1), 97–119. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000180181000007
- Findlay S, Pace ML, Lints D, Cole JJ, Caraco NF, Peierls B (1991) Weak coupling of bacterial and algal production in a heterotrophic ecosystem: the Hudson River estuary. *Limnology and Oceanography* 36, 268-278
- Gessner M.O. & Chauvet E. (1993). Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquàtic hyphomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 502-507.
- Gessner M.O., Schmitt A.L. (1996). Use of soil-phase extraction to determine ergosterol concentration in plant tissue colonized by fungus. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 415-419.
- Hart, B. T., Bailey, P., Edwards, R., Hortle, K., James, K., McMahon, A., ... Swadling, K. (1990). Effects of salinity on river, stream and wetland ecosystems in Victoria, Australia. *Water Research*.
- Jackson, C. R., Vallaire, S. C. (2009). Effects of salinity and nutrients on microbial assemblages in Louisiana wetland sediments. *Wetlands*.
- Jager, D. F., Wilmking, M., Kukkonen, J. V. K. (2009). The influence of summer seasonal extremes on dissolved organic carbon export from a boreal peatland catchment: Evidence from one dry and one wet growing season. *Science of the Total Environment*, 407(4), 1373–1382. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.10.005>
- Jeffrey, S.W., Humphrey, G.F. (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b and c in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie and Physiologie der Pflanzen*, 167, 191-194.
- Margalef R. (1983). Ecologia del fitoplàncton. *Limnologia* 247- 329. Barcelona: Ediciones Omega.
- María Vanegas, L., Nancy Correa, C., Ana Morales, M., Aída Martínez, L., Laura Rúgeles, G., & Francy Jiménez, I. (2009). Resistencia a antibioticos de bacterias aisladas de biopelículas en una planta de alimentos. *Revista MVZ Cordoba*, 14(2), 1677–1683.
- Marić, S., Vraneš, J. (2007). Characteristics and significance of microbial biofilm formation. *Periodicum Biologorum*, 109(2), 115–121.
- Mata-perelló, J. M. (2000). SALINAS CONTINENTALES DEL PIRINEO CATALÁN, 449–452.
- McKnight D., Boyer E., Westerhoff P., Doran P., Kuble T., & Andersen D. (2001) Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnology and Oceanography* 46, 38-48
- Millán, a., Velasco, J., Gutiérrez-Cánovas, C., Arribas, P., Picazo, F., Sánchez-Fernández, D., & Abellán, P. (2011). Mediterranean saline streams in southeast Spain: What do we know? *Journal of Arid Environments*, 75(12), 1352–1359. <http://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2010.12.010>
- Mohamed, D. J., Martiny, J. B. H. (2011). Patterns of fungal diversity and composition along a salinity gradient. *The ISME Journal*, 5(3), 379–388.

- Murphy J., y Riley J. (1962) A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27 31-36.
- Nielsen, D. L., Brock, M. a., Rees, G. N., & Baldwin, D. S. (2003). Effects of increasing salinity on freshwater ecosystems in Australia. *Australian Journal of Botany*, 51, 655–665. <http://doi.org/10.1071/BT02115>
- Porter K.G., Feig Y.S. (1980). The use of dapi for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25, 943-948
- Reardon J., Foreman J.A., & Searcy R. L. (1966). New reactants for the colorimetric determination of ammonia. *Clinica Chimica Acta* 14: 403-405
- Romaní, A. M., Artigas, J., Ylla, I. (1995). Extracellular Enzymes in Aquatic Biofilms: Microbial Interactions versus Water Quality Effects in the Use of Organic Matter.
- Sthal P.D., Parkin, T.B. (1996) Relationship of soil ergosterol concentration and fungal biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 847-855.
- Theil-Nielsen, J., Sondergaard, M. (1998). Bacterial carbon biomass calculated from biovolumes. *Archiv Für Hydrobiologie*, 141(2), 195–207. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=2178530>
- Ylla, I., Borrego, C., Romaní, A. M., Sabater, S. (2009). Availability of glucose and light modulates the structure and function of a microbial biofilm: Research article. *FEMS Microbiology Ecology*, 69, 27–42. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00689.x>
- Zhang, Y., Jiao, N., Cottrell, M. T., Kirchman, D. L. (2006). Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production along a salinity gradient in the South China Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 43(3), 233–241.