

**Títol del treball:** Efecte del gradient de salinitat en la comunitat del biofilm de la Riera Salada.

---

Estudiant: Juan González Gámez  
Correu electrònic: juangonzalezigamez@hotmail.com

Grau en Biologia

Tutor: Anna M. Romaní Cornet, Co-tutora: Luciana Cibils  
Empresa/Institució: UdG, Institut d'Ecologia Aquàtica

**Vistiplau tutor:**

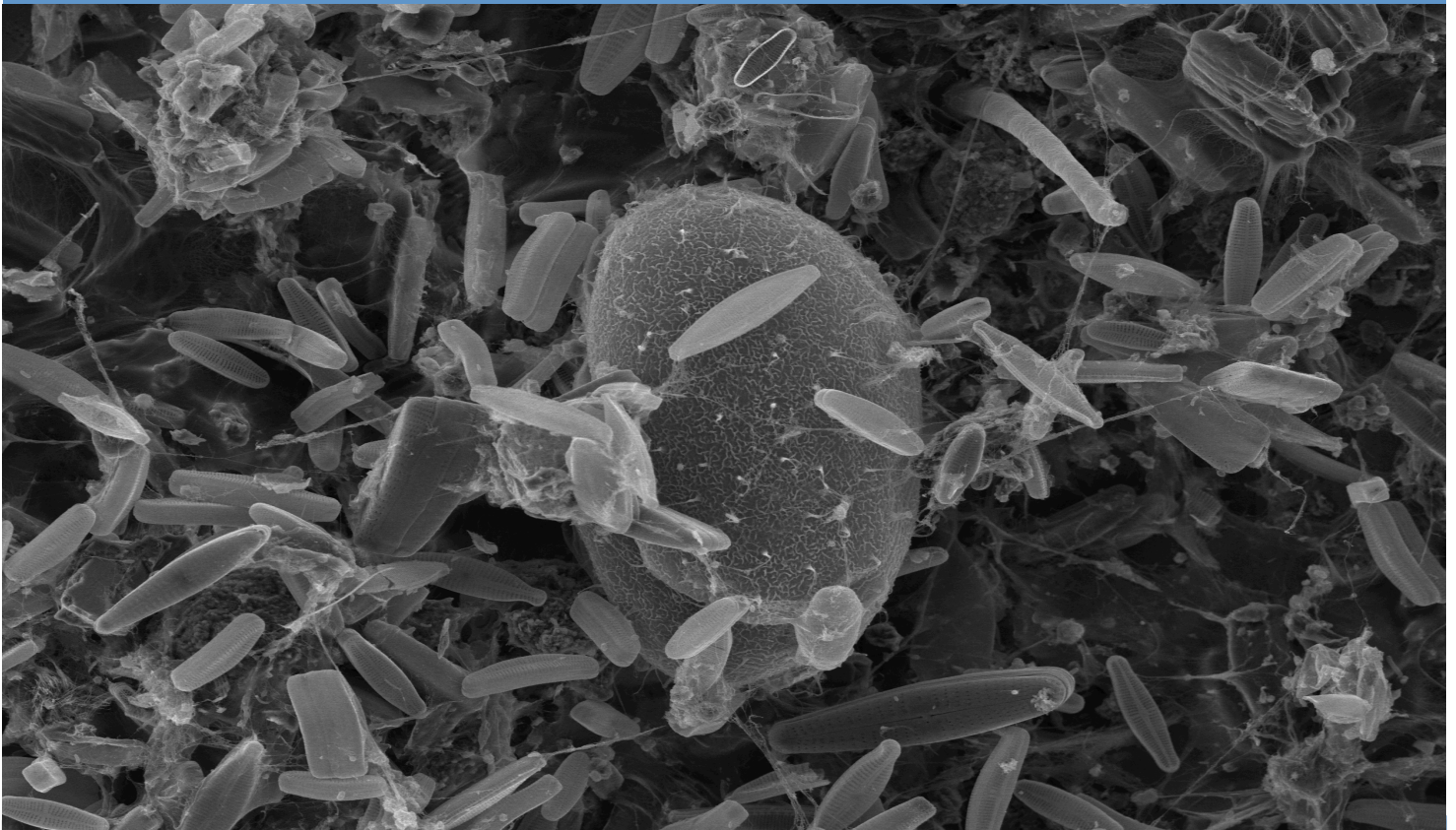
Nom del tutor: Anna M. Romaní Cornet

Departament de Ciències Ambientals, àrea d'Ecologia, Institut d'Ecologia Aquàtica.

Correu electrònic: anna.romani@udg.edu

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació:

# **Efecte del gradient de salinitat en la comunitat del biofilm de la Riera Salada.**



  
**Universitat  
de Girona**  


Juan González Gámez

Grau en Biologia

Tutora: Anna M. Romaní

Cotutora: Luciana Cibils

## RESUM

La Riera Salada és un ecosistema fluvial únic, ja que presenta una salinitat molt elevada d'origen natural, al seu punt màxim, a capçalera té una conductivitat de 43,53 mS/cm aproximadament tres vegades més que la conductivitat del mar. L'elevada salinitat és provocada per les evaporites de Keuper, uns sediments que es troben presents en algun tram del riu. La curiositat d'aquest riu és el gradient tan marcat de salinitat que presenta, com a conseqüència de la successiva entrada d'aigua dels diversos afluents. Al punt final del mostreig la conductivitat baixa fins a 0,60 mS/cm, la conductivitat d'un riu d'aigua dolça normal.

L'objectiu principal és veure i identificar quines espècies habiten aquestes condicions tan halòfiles, veure com va variant la seva composició al llarg del gradient de salinitat i també observar si hi ha diferències significatives segons els diferents substrats del llit fluvial (sediments, còdols i fulles).

L'estudi se centra en els productors primaris com algues i diatomees. Com que el grup més representatiu en percentatge d'abundància eren les diatomees es va realitzar un protocol específic per a la seva observació. Aquest protocol consistia en cremar totes les restes de carboni i deixar tan sols els frústuls de les diatomees per a la seva observació al microscopi. A partir de les dades s'han calculat diversos índex de diversitat.

S'ha trobat que la salinitat no és el factor més determinant sinó que és la presència o absència de nutrients, sembla ser que la absència de nutrients afecta més a la diversitat i abundància que no pas la salinitat. També es veu que el substrat amb més clorofil·la i diversitat són les fulles, seguides dels còdols. S'observa que els organismes més representatius són les diatomees seguides per la *Bangia atropurpurea* i *Enteromorpha* unes espècies halòfiles presents en els punts més salats. Dins del grup de les diatomees el gènere més abundant és *Acnathes*. Els resultats suggereixen canvis significatius en la composició del biofilm entre els punts de mostreig i el tipus de substrat.

Finalment s'observa que el substrat més afectat per la salinitat són els sediments i encara que els índexs de diversitat siguin significativament iguals, la comunitat varia molt d'espècies i generes presents.

## RESUMEN

La Riera Salada es un ecosistema fluvial único, ya que presenta de manera natural una salinidad muy elevada, en su punto más elevado, tiene una conductividad de 43,53 mS/cm aproximadamente tres veces más que la conductividad del mar. La elevada salinidad esta provocada por las evaporitas de Keuper, unos sedimentos que están presentes en alguna parte del lecho fluvial. La curiosidad de este rio es el gradiente tan marcado de salinidad, provocado como consecuencia de la continua entrada de agua de los otros afluentes.

En el punto final de mostreo, la conductividad baja hasta 0,60mS/cm, la conductividad de un rio de agua dulce normal. El objetivo principal consiste en ver e identificar que especies viven en estas condiciones tan halófilas, ver como varían su composición en el transcurso del gradiente de salinidad y también observar si hay diferencias significativas según los diferentes substratos del lecho fluvial (sedimentos, rocas y hojas).

El estudio se centra en los productores primarios como algas y diatomeas. Como el grupo mas representativo en porcentaje de abundancia eran las diatomeas se realizó un protocolo específico para su observación. Este protocolo consistía en quemar todos los restos de carbono para dejar solamente los frústulos de las diatomeas para ser observadas en el microscopio. A partir de los datos se han calculado diversos índices de diversidad.

Se ha visto que la salinidad no es el factor más determinante sino que es la presencia o ausencia de nutrientes, para ser que la ausencia de nutrientes afecta mas a la diversidad y la abundancia que la salinidad. También se ve que el substrato con más clorofila y diversidad son las hojas seguidas por las piedras.

Los organismos más representativas son las diatomeas, seguidas por *Bangia atropurpurea* y *Enteromorpha*, unes especies halófilas que se hayan en los puntos mas salados. Dentro del grupo de las diatomeas el genero mas abundante es *Acnantes*. Los resultados sugieren cambios significativos en la composición del biofilm entre los puntos de muestreo y el tipo de sustrato.

Finalmente se observa que el sustrato más afectado por la salinidad son los sedimentos y que aunque los índices de diversidad sean significativamente iguales, la comunidad varía mucho de especies y géneros presentes.

## ABSTRACT

The Riera Salada is a unique river ecosystem, as it presents a very high salinity of natural origin, being the highest peak (at the start of the river) of 43.53 conductivity mS/cm approximately three times more than the conductivity of the sea. The high salinity is caused by evaporites of Keuper, sediments that are found in different sites of the river. One of the curious facts is the strong gradient of salinity which results as a consequence of the successive entrance of water of the tributaries. At the end point of the sampling it falls down to 0.60 mS/cm, the conductivity of a freshwater river. The main objective is to see and identify which species inhabit these conditions (halophilic conditions) and how they may vary along the salinity gradient, as to identify if there are significant differences according to the different substrates of the river bed (sediments, pebbles and leaves). In this study they are especially observed the primary producers, algae and diatoms. As they were the most representative group as a percentage of abundance, a specific protocol for their observation was realised. It consisted to burn all the remains of organic matter and leave only the frustules of the diatoms for their observation under the microscope. From the various data have been calculated diversity index.

It has been found that the salinity is not the determining factor, but it is the presence or absence of nutrients, it seems that the absence of nutrients affects more to the diversity and abundance than salinity does. It is also noticed that the substrate with more chlorophyll and diversity are the leaves, and then the boulders.

It appears that the most representative organisms are diatoms followed by *Bangia atropurpurea* and *Enteromorpha*, halophiles species present in most salted sites. Within the group of diatoms the most abundant genus is *Acnanthes*. The results suggest significant changes in the composition of the biofilm between the sampling points and the type of sediment.

Finally we noted that the substrate most affected by salinity is sediments, although the diversity index are equal, the community changes a lot of species and genera.

# ÍNDEX

<b>1. Introducció</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Objectius</b> .....	<b>3</b>
<b>3. Metodologia</b>	
<b>3.1 Àrea d'estudi</b> .....	<b>4</b>
<b>3.2 Recollida de mostres i dades de camp</b> .....	<b>5</b>
<b>3.3 Anàlisi fisicoquímic de l'aigua i de la biomassa algal</b> .....	<b>6</b>
Anàlisi de nutrients.....	
Anàlisi de la biomassa algal .....	
<b>3.4 Anàlisi de la comunitat algal</b> .....	<b>10</b>
<b>3.5 Anàlisi de la comunitat de diatomees</b> .....	<b>11</b>
<b>3.6 Anàlisi de dades</b> .....	<b>12</b>
<b>3.7 Criteris ètics i de sostenibilitat</b> .....	<b>13</b>
<b>4. Resultats</b>	
<b>4.1 Característiques dels punts de mostreig</b> .....	<b>13</b>
<b>4.2 Paràmetres fisicoquímics</b> .....	<b>13</b>
<b>4.3 Anàlisi de clorofil·la</b> .....	<b>15</b>
<b>4.4 Anàlisi de la comunitat</b> .....	<b>17</b>
<b>4.5 Anàlisi de la comunitat de diatomees</b> .....	<b>19</b>
<b>5. Discussió</b> .....	<b>23</b>
<b>6. Conclusions</b> .....	<b>25</b>
<b>7. Bibliografia</b> .....	<b>26</b>

## INTRODUCCIÓ

El biofilm és un consorci de microorganismes i generalment format per algues, bacteris, cianobacteris, fongs i protozous, que queden adherits en una matriu extracel·lular polimèrica (Romaní, 2009). Els biofilms els podem trobar en tots els ecosistemes aquàtics des del casc d'un vaixell al substrat d'un llac glaçat. Els biofilms també poden ser molt diversos i la seva complexitat està relacionada amb dos factors principals, el tipus de substrat i els factors ambientals on viuen i creixen (Karatan & Watnick, 2009). Aquests dos factors determinen la composició, estructura, metabolisme i funció del biofilm (Romaní, 2004; Terlizzi & Faimali, 2010). A més a més també podem entendre la comunitat dels biofilms i la seva associació com si fossin organismes multicel·lulars (Vanegas *et al.*, 2009).

Tot i la gran diversitat de biofilms que es poden trobar i les seves grans diferències, també tenen característiques generals en la seva estructura, com l'existència de la matriu de compostos polimèrics (sobretot polisacàrids però també proteïnes i ADN lliure) que els envolta i que ells mateixos produeixen (Marió *et al.*, 2007). Aquesta matriu de substàncies polimèriques extracel·lulars (EPS) és de gran importància ja que confereix estabilitat, adhesió a superfícies, una estructura cohesiva i tridimensional que immobilitza i connecta les cèl·lules que conformen el biofilm (Wingender and Flemming, 2011; Decho, 2000; Gerbersdorf *et al.*, 2008). A més a més, confereix protecció envers la depredació (López *et al.*, 2010), estrès biològic, substàncies tòxiques, dessecació i altres alteracions físiques típiques d'ecosistemes aquàtics (Romaní, 2009; Zhang & Feng, 2001, Berry *et al.*, 2006; Emtiazi *et al.*, 2004). L'augment de salinitat afecta a la comunitat bacteriana molt estrictament ja que les espècies de la comunitat bacteriana són reemplaçades per altres halotolerants, tot i així aquestes comunitats presenten capacitats metabòliques similars. A més, la descomposició de la matèria orgànica es veu reduïda amb l'augment de salinitat (Nielsen *et al.*, 2003).

Cal destacar que els biofilms juguen un rol essencial en el manteniment i la millora de la salut ecològica de tot l'ecosistema gràcies a la seva excel·lent capacitat per degradar i transformar substàncies contaminants. (Underwood *et al.*, 2005; Davey & O'Toole, 2000; Pusch *et al.*, 1998; Anderson-Glena *et al.*, 2008; Mora-Gómez *et al.*, 2016) Aquest és un dels motius principals que fa que sigui tant interessant investigar la seva comunitat i comprendre millor el seu funcionament.

Com he dit anteriorment el substrat és un dels paràmetres més importants a l'hora d'estudiar la complexitat del biofilm (Karatan & Watnick, 2009). El biofilm ocupa i colonitza les superfícies aquàtiques de diversos indrets principalment bentònics. Les superfícies en les quals el biofilm pot adherir-se són pedres (biofilm epilític), sediments (biofilm epipsàmnic), material vegetal inert (biofilm epixílic) o material vegetal viu (epifític) (Lock, 1993; Romaní, 2009; Vadeboncoeur & Steinman, 2002). El biofilm epilític es caracteritza per ser més estable

a les fluctuacions estacionals i presenten una major complexitat estructural amb més quantitat de biomassa algal (Romaní & Sabater, 2001).

El biofilm epipèlic es caracteritza per estar clarament dominat per organismes heterotròfics com a conseqüència de que el sediment és un substrat inert petit i no es pot desenvolupar una comunitat gaire complexa degut al seu transport al llarg del transcurs del riu (Romaní & Sabater, 2001). Per últim el biofilm epixílic presenta una elevada quantitat de fongs i microorganismes amb habilitat per degradar cel·lulosa (Nikolcheva & Bärlocher, 2004)

L'altre factor important són les condicions ambientals (temperatura, concentració de nutrients inorgànics, oxigen, pH, corrents, onatge i mareas i salinitat) que alteren la comunitat del biofilm, intervenen en l'espessor, gruix i arquitectura de la matriu de l'EPS així com la seva funcionalitat (Karatan & Watnick, 2009). Podem trobar biofilms en tots els ecosistemes aquàtics, però la seva comunitat variarà segons el conjunt de factors ambientals específics de cada ecosistema (Mora-Gómez *et al.*, 2016).

Aquest estudi investiga l'efecte de la salinitat sobre la comunitat del biofilm, especialment la comunitat algal, i considerant els diferents substrats del llit del riu: còdols, sediments i fulles. La investigació es basa en l'estudi de la comunitat del biofilm de la Riera Salada del Berguedà, un riu que de forma natural presenta una salinitat molt elevada amb uns valors màxims de conductivitat de 43,8mS/cm que va disminuint en pocs quilòmetres i per tant genera un gradient marcat de salinitat. L'origen d'aquesta elevada salinitat rau en la dissolució de les evaporites de Keuper, corresponents al Triàsic superior formades d'halita i guix (Mata-perelló, 2000; Torres, 2015).

Generalment, la salinitat és un factor determinant quan es parla de biofilms d'ecosistemes marins però en estuaris, aiguamolls, llacs i rius és un factor especialment important en el metabolisme i estructura del biofilm. Depenent de l'estació de l'any, s'observa que a l'estiu el paràmetre que més afecta és la salinitat però a l'hivern, la comunitat es veu més afectada pel fred que per la salinitat (Chiu *et al.*, 2006). A més a més hi ha molt pocs estudis basats en l'estructura del biofilm de rieres salades (Millán *et al.*, 2011) i els estudis existents es centren en l'estudi de la comunitat de macroinvertebrats. Però un estudi realitzat per Nielsen *et al.* (2003) apunta que les diatomees disminueixen en riquesa i abundància quan la salinitat augmenta, mentre que la comunitat bacteriana no es veu alterada significativament si la comparem amb la típica d'un ecosistema d'aigua dolça (Cole *et al.*, 1988) en canvi són més importants factors com la disponibilitat de carboni i la temperatura que no pas la salinitat (Findlay *et al.*, 1991).

Un TFG anterior realitzat per l'estudiant Meritxell Torres i Roig a la mateixa Riera Salada i centrat en l'estudi de l'estructura i funció del biofilm que es desenvolupa en els còdols, va concloure que el punt més salí es veu més afectat per l'elevada concentració de nutrients que per la salinitat, això pot permetre el creixement d'espècies resistents, i suggereix l'existència d'una comunitat diferenciada als punts més salats de la riera (Torres 2015).



En aquest estudi per tant ens interessa trobar quines són aquestes espècies resistents a la salinitat que poden viure en l'indret més salat, i veure com el gradient de salinitat afecta a la comunitat del biofilm. En aquest estudi ens basem en la identificació de la comunitat algal dels diferents substrats bentònics, però sobretot en les diatomees ja que són abundants i són un bon bioindicador de l'ecosistema.

La finalitat d'aquest estudi per tant, és identificar les espècies presents en la comunitat del biofilm de la Riera Salada del Berguedà, on existeix un gradient de salinitat al llarg del tram del riu.

### **OBJECTIVES:**

The objective of this study is to analyze the community of microorganisms that form the biofilm in Riera Salada, mainly algae and diatoms.

- ❖ To observe how the different physicochemical conditions affect the biofilm community, especially focusing on the effect of salinity on the composition of the biofilm community, mainly algae.

**Hypothesis:** As a result of the high salinity, we expect a change in the composition of the community and an inverse relationship between diversity and salinity.

- ❖ To define how different substrates (rocks, sediments and leaves) affect the biofilm community and their interaction with salinity.

**Hypothesis:** It is expected to measure higher diversity in the community developed on pebbles because the biofilm community in pebbles is more independent to the seasonal fluctuations than the community developed on other substrata (sediment and leaves) and favours the development of a more structured community. It is expected to be most affected by the salinity is the community developing in sediments because they are more affected by the fluctuations of environmental conditions.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Àrea d'estudi

L'àrea on s'ha realitzat l'estudi és la Riera Salada a la comarca del Berguedà, aquesta riera s'origina quan les aigües del Torrent de la Font d'Ensija i el Barranc de les Llobateres reben l'aigua provinent de la Font d'Aigua Salada on formen el riu Aigua Salada, i acaba poc després d'arribar al municipi de Saldes en adjuntar-se amb el Riu Saldes, posteriorment desemboca més avall al riu Llobregat després de passar per Guardiola de Berguedà. La Font Salada és la principal responsable de la hipersalinitat de la Riera Salada, neix al vessant nord de la Serra d'Ensija, just al costat del refugi Delgado Úbeda, a uns 1700m i a l'est del naixement del Torrent de la Font d'Ensija.



Figura 1. Mapa de la ubicació de la Riera Salada (1), el Torrent d'Ensija (2), el Barranc de les Llobateres (3) i l'Aigua Salada (4).

La zona de mostreig correspon a un tram de 3,68km compresos entre els 1670m i els 5350m respecte el naixement de la Font Salada. Així doncs, el tram més proper a la Font Salada presenta uns valors més elevats de salinitat, mentre que en el tram més llunyà proper a Saldes troben valors molt més baixos (Torres, 2015).

## 4.2 Recollida de mostres i dades de camp

L'estudi del biofilm de la Riera Salada és una investigació que es va iniciar l'any 2014, on el mostreig i la recollida de mostres es van realitzar amb la finalitat de realitzar un TFG anterior, el de l'estudiant Meritxell Torres i Roig. El mostreig es va realitzar el dia 13 de Novembre del 2014, amb totes les mesures possibles per no distorsionar el medi i provocant el menor efecte possible en les comunitats de la riera.

Per poder realitzar l'estudi d'aquest ecosistema fluvial, es van establir 4 punts de mostreig. El punt A, situat poc després de la unió de la Font Salada i el torrent d'Ensija, és el punt més proper a la Font Salada situat a 1670m respecte el naixement i també el més elevat, 1680m. El punt B, s'ubica poc després de la unió amb el barranc de les Llobateres, està situat a 2410 m del naixement i a una distància de 740m del punt A, la seva altitud és de 1580m. El punt C està situat a 4.800m del naixement i a 2.990m del punt anterior (B) amb una altitud de 1.235m. L'últim punt de mostreig, el més allunyat de la Font Salada i el més proper al municipi de Sardes és el punt D, es posiciona a 5.350m del naixement i a 1125m d'altitud i és el punt amb menys salinitat.

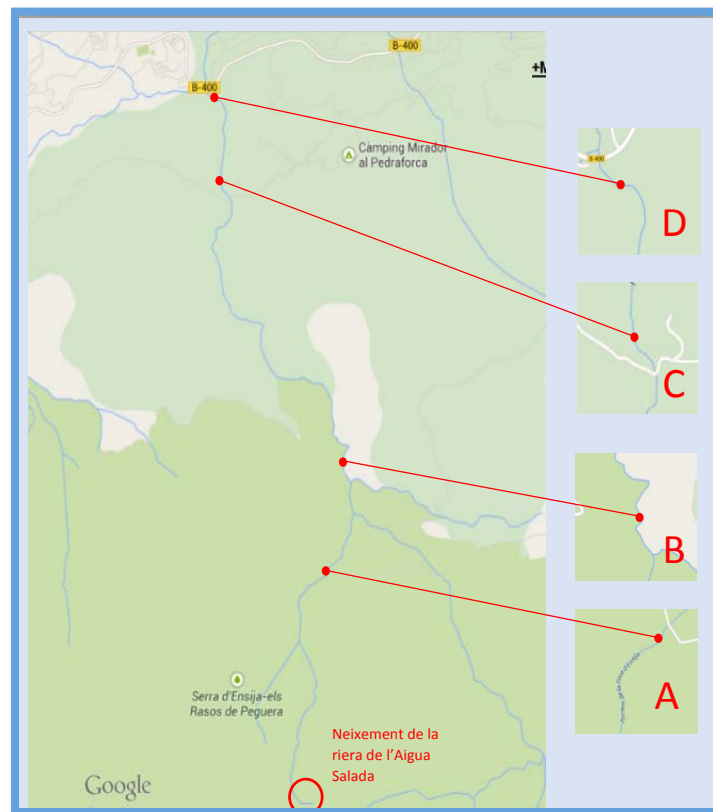


Figura 2. Mapa del tram de la Riera Salada amb els quatre punts mostrejats indicats. El cercle marca el punt on neix la riera, La font d'Aigua Salada. (Imatge de la Meritxell Torres i Roig).

En cada un d'aquests punts es van recollir mostres de substrat: sediments, còdols i fulles de pi. En el cas dels còdols com que n'hi ha de moltes mides diferents es van agafar pedres d'uns 2,5 cm de llarg i 2 cm d'amplada aproximadament. En cada un dels 4 punts es van recollir 3 mostres de cada tipus de substrat, per tant de cada punt tenim 3 rèpliques per a cada substrat, un total de 12 mostres per a cada punt, amb l'excepció que al punt de mostreig D com que hi havia presència d'una altra espècie d'arbre a la ribera també és van agafar fulles d'*Acer opalus*, en aquest cas, al punt D tenim 15 mostres. Les mostres es van agafar en vials de vidre i es van conservar amb formol al 2%, i amb 10ml d'aigua de la riera filtrada per 0.2 micròmetres. També es van recollir mostres d'aigua en pots de plàstic de 1,5L per prendre les dades necessàries al laboratori. In situ es va mesurar la conductivitat, la temperatura, la concentració d'oxigen, el pH dels quatre punts amb els aparells corresponents. També es van anotar les característiques ambientals i paisatgístiques de cada zona. Per separar el biofilm, envoltat per la EPS, del substrat les mostres van ser sonicades per poder prosseguir amb els diferents protocols i la seva observació.

### **4.3 Anàlisi fisicoquímic de l'aigua i la biomassa algal**

Al Novembre de 2014 es va anar al camp i es van recollir les mostres, posteriorment es van realitzar les anàlisis fisicoquímiques. Aquest apartat és un breu resum dels mètodes que es van portar a terme.

A la Taula 1 hi ha un resum dels mètodes utilitzats per l'anàlisi dels paràmetres fisicoquímics i de biomassa.

#### ➤ **Anàlisi dels nutrients**

- **Fosfats:**

Per analitzar els fosfats es va seguir el mètode del molibdat de Murpy *et al.* (1962). Una tècnica colorimètrica on es fa reaccionar el molibdat amb el fòsfor, donant una coloració blava. Es van preparar els patrons (0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20  $\mu\text{M}$ ) a partir de la solució mare de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1000  $\mu\text{M}$  i aigua mQ. També es va preparar un reactiu mixt, format per Molibdat d'amoni, àcid sulfúric, àcid ascòrbic i d'antimoni tartrat de potassi. Aquest reactiu no es pot conservar, per tant es va fer la quantitat necessària per realitzar l'anàlisi de les 12 mostres i la patró. Una vegada es van tenir preparats els 10ml de cada mostra filtrada a temperatura ambient,

es va afegir 1ml del reactiu mixt a totes les mostres a analitzar i a les patrons. Posteriorment es van barrejar amb un vòrtex i es van deixar 2 hores a la foscor. Finalment es va llegir l'absorbància amb un espectrofotòmetre (Shimatzu UV-1800) a 890nm. 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:**

Per analitzar els nitrats presents a les aigües de la riera es van descongelar les mostres prèviament filtrades que van estar reservades a fer aquest anàlisi en vials de vidre. Posteriorment s'analitzen amb el cromatògraf iònic (Metrohm). Aquest proporciona els valors en mg/L de NO<sub>3</sub> presents a cada mostra.

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

- **Amoni:**

L'anàlisi dels amonis es va dur a terme seguint el mètode del silicat descrit per *Reardon et al. (1966)*. Consisteix en afegir dos reactius que reaccionen amb l'amoni dissolt en l'aigua el quals donen una coloració determinada, la intensitat de color està relacionada amb la concentració d'amoni. Es va establir una sèrie de patrons de concentració d'amoni (0; 0,1; 0,2; 0,5; 1, 5, 10, 20 µm) i un blanc, per permetre convertir les lectures d'absorbància en valors de concentració. Per fer l'anàlisi es va preparar 1 L de cada reactiu. Els reactius són: sodi salicilat, citrat sòdic, sodi nitroprussiat i aigua mQ; Hidròxid de sodi, sodi dicloroisocianurat i aigua mQ.

Es van filtrar les 12 mostres d'aigua i es van transvasar 10ml en tubs d'assaig, a cada tub es van afegir 1mL del primer reactiu i es va vortejar. Després de 1 min es va fer el mateix afegint el segon reactiu. Es van llegir al espectrofotòmetre (Shimatzu Uv-1800) a 690nm després de reposar 1 hora a les fosques.

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.

➤ **Anàlisi de la biomassa algal**

Per poder determinar la biomassa algal es parteix de la concentració de clorofil·la bentònica que conté el biofilm de les pedres, sediment i fulles mostrejades a partir de la lectura de l'absorbància a diferents longituds d'ona, estimant que la major part són clorofil·les a (Jeffrey et al., 1975).

Es van submergir les mostres (en el cas de les pedres, 3 pedres per rèplica i 3 rèpliques per cadascun dels 4 punts mostrejats; per al sediment: un volum d'1cm<sup>3</sup> de sediment per a cada una de les 3 rèpliques de cada punt mostrejat; per a les fulles: un conjunt d'acícules de pi, considerant 3 rèpliques per a cada punt mostrejat) en 10 ml d'acetona al 90% en vials de vidre. Es van introduir al bany d'ultrasons durant 4 minuts i posteriorment es va filtrar l'extracte, amb filtres de fibra de vidre de 1,4 µm, per així reduir la terbolesa de les mostres. Els pigments de clorofil·la són molt sensibles a la llum i temperatura, per això aquesta en aquesta part de l'experiment es va procedir en fer l'anàlisi en una cambra de llum verda i a una temperatura no gaire elevada.

Es va mirar l'absorbància a 430, 655 i 750nm. A 430nm llegeix la presència de carotenoides i feofitines mentre que a 655nm indica la quantitat de clorofil·la a que conté l'extracte i a 750nm els valors han de ser pròxims a 0, si no ho són indica que la mostra és molt tèrbola.

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

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

On V= Volum de l'extracte en ml; B= Superfície en cm<sup>2</sup> de la mostra (superfície de les pedres, superfície projectada del sediment o superfície de les acícules)

PARÀMETRE ESTUDIAT				Metodologia	
Fisicoquímics	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	
	Nitrats	Separació de cations i anions per determinar els mg/L de NO <sub>3</sub> de cada mostra		Cromatògraf iònic (Metrohm)	
	Fosfats	Absorbància a 890nm		Espectrofotòmetre (Shimatzu UV-1800) (Mètode del molibdat Murphy-Riley)	
	Amoni	Absorbància a 690nm		Espectrofotòmetre (Shimatzu UV-1800)	
Biomassa	Algal	Absorbància. Estimació de la biomassa algal a partir de la concentració de clorofil·la a.	750 nm	Valors propers a 0, ja que a 750nm la clorofil·la no emet color. Si l'absorbància és elevada indica que la mostra és molt tèrbola i 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 feofitines. (mal estat algal)	

**Taula 1. Resum dels mètodes utilitzats per l'anàlisi dels paràmetres fisicoquímics i de biomassa.**

#### **4.4 Anàlisi de la comunitat algal.**

Amb la finalitat d'identificar quins organismes formen la comunitat del biofilm dels diferents substrats mostrejats de Riera Salada, es va procedir a realitzar observacions al microscopi, classificant-los fins al nivell de taxonomia més detallat possible. L'objectiu de la observació era fer una anàlisi qualitativa de la comunitat.

Per a la classificació i observació de la comunitat del biofilm es va utilitzar un microscopi òptic (Nikon). Es va agafar una gota del vial de vidre, prèviament agitat manualment amb una pipeta Pasteur. Posteriorment cada gota es va col·locar sobre un portaobjectes i es va cobrir amb un cobreobjectes, amb molta cura per a no deixar bombolles d'aire que puguin disminuir la resolució de la mostra. Aquest procés es va repetir 2 vegades més per a cada vial de vidre, amb un total de 3 subrèpliques per vial, considerant que hi ha 4 punts de mostreig i a cada punt s'agafen 3 tipus de substrat on a cada substrat es fan 3 rèpliques, a excepció del punt D on hi ha 4 substrats diferents ja que hi ha dues tipologies de fulles, fulles de pi i fulles d'*Acer opalus*. En total es van realitzar 117 observacions.

Per l'observació primer es realitzava una visió general de la mostra amb l'objectiu de 4 augments, posteriorment es va utilitzar l'augment de 10 i es van fer tots els camps de la mostra per tal d'identificar els individus més grans (quan se'n trobava algun s'augmentava la resolució.). Finalment es van realitzar 10 camps a 40 augments, per poder identificar els individus més petits.

Per realitzar la identificació dels individus que formen la comunitat del biofilm es va utilitzar el llibre: "Atlas de los Microorganismos de Agua Dulce. La vida en una gota de agua" i altres guies d'identificació de microorganismes amb fotografies il·lustrades. La conservació de les mostres en formol i el temps que portaven conservades va fer que les mostres estiguessin una mica deteriorades, pèrdua de coloració i poca resolució de certes estructures fisiològiques. Una vegada es van identificar els organismes es van classificar amb el màxim detall possible, generalment fins a gènere. En el cas de les diatomees tan sols es va arribar a la classificació de classe, es per això que es van realitzar estudis i protocols posteriors específics per a diatomees.

Per aquest anàlisi es va utilitzar el següent material: microscopi òptic, pipetes Pasteur, vials amb mostres de sediment prèviament sonicades, cobreobjectes, portaobjectes i aigua destil·lada per la neteja de les plaques de vidre.



#### **4.5 Anàlisi de la comunitat de diatomees.**

Com es comenta en l'apartat anterior, amb l'objectiu de 40 augments del microscopi no es van poder apreciar els petits detalls que presenten les diatomees als seus frústuls i per tant no es podien classificar apropiadament i al mateix temps aquest grup era força abundant en la majoria de mostres, especialment als còdols on també es va observar una major abundància d'organismes. Per la seva correcta observació i identificació es va prosseguir a realitzar un protocol de digestió de diatomees. Aquest protocol consisteix en l'eliminació de les restes de carboni i matèria orgànica present a la mostra, on només quedaran els frústuls de sílice de les diatomees i algun petit residu inorgànic.

Per la digestió de les mostres es va utilitzar un digestor de 16 tubs. Les mostres que es van utilitzar eren mostres de còdols ja que anteriorment s'havien identificat gran quantitat de diatomees en aquest substrat. Es van col·locar 4ml de mostra al tub de digestió corresponent, prèviament enumerat i identificat amb cinta adhesiva (ja que l'augment de temperatura pot esborrar les marques fetes al vidre directament). Cada vegada que s'agafava una mostra es va canviar la punta de la micropipeta. Es van afegir 2 ml d'HCl al 37%, posteriorment també es van afegir 8 ml de peròxid d'hidrogen. Finalment es deixen al digestor durant 2 hores a 100°C. Passades les dues hores, es van tornar a afegir 8ml més d'aigua oxigenada i va tornar a engegar 2 hores a 100°C. Els volums finals després de la digestió van ser diferents ja que al digestor la temperatura dels extrems és menor i hi ha menys evaporació.

Una vegada es va acabar la digestió, els tubs es van vortejar i el seu contingut es va filtrar amb filtres de 0,8 µm de nitrat de cel·lulosa (omplint amb aigua mQ els tubs per rentar i acabar d'agafar mostra). Finalment el contingut filtrat (el filtre + el seu contingut) es va guardar en vials de vidre amb 10 ml d'aigua mQ. La mostra BC2 degut a la seva elevada quantitat de matèria inorgànica haver de filtrar dues vegades i per tant es van afegir 20ml d'aigua mQ.

Per identificar les diatomees es van utilitzar diverses guies d'identificació, es va utilitzar el llibre "Atlas de los Microorganismes de Agua Dulce. La vida en una gota de agua" i una guia d'identificació situada als creada per la meua cotutora, Luciana Cibils.

Posteriorment per poder realitzar les observacions al microscopi òptic es va agafar una gota de cada vial (prèviament sacsejat) i es va deixar assecar sobre la placa calefactora. Finalment una vegada la gota es va assecar es va muntar la mostra amb Naprhax, un producte que permet una observació molt nítida de les mostres de diatomees amb oli d'immersió i guardar les mostres de forma permanent per a la seva observació.

Per aquest anàlisi es va utilitzar el següent material: Digestor amb 16 tubs de digestor, vials de vidre amb les mostres, cinta adhesiva, guants de làtex, aigua oxigenada al 33%, HCL al 37%, vòrtex, microscopi òptic, Naprhax, placa calefactora, campana d'extracció de gasos, aigua mQ, filtres de 0,47 µm i oli d'immersió.

## 4.6 Anàlisi de dades

En aquest estudi s'han tractat les dades obtingudes amb el programa estadístic SPSS, R i amb el suport l'Excel.

Per descriure la comunitat i comparar la seva estructura s'ha utilitzat l'índex de Shannon i el d'Equitativitat. Són diferents índexs amb l'objectiu de descriure quantitativament les comunitats, fent referència a la seva riquesa específica (S) i l'abundància relativa de cada espècie dins de la comunitat. Si s'obté una baixa diversitat vol dir que al ecosistema hi han poques espècies amb abundàncies relatives diferents. Pel contrari si la diversitat és elevada l'ecosistema presenta forces espècies amb abundàncies semblants.

L'índex de Shannon (H') es un índex per calcular la diversitat tenint en compte la riquesa i l'abundància relativa de cada una de les espècies o tàxons identificats.

Pren aquesta forma:

$$H' = -\sum p_i \cdot \log_2 \cdot p_i$$

On  $p_i$ = abundància relativa de l'espècie.

L'Equitativitat mesura la relació entre la diversitat real H' i la diversitat teòrica màxima. Pren valors de 0 a 1.

Pren aquesta forma:

$$E = \frac{H'}{\log_2 S}$$

On H'= índex de Shannon-Wiener; S= riquesa específica

Amb el programa SPSS per a les clorofil·les s'ha realitzat una ANOVA de dos factors, on el primer factor és el punt de mostreig i el segon factor el tipus de substrat.

Per als paràmetres fisicoquímics i de la comunitat de diatomees (diversitat de Shannon i Equitativitat) s'ha realitzat un ANOVA d'un factor tenint en compte el punt de mostreig.

Amb el programa R s'ha realitzat un anàlisi MDS a observar visualment les diferències entre les comunitats de diatomees dels diferents punts de mostreig a partir d'una matriu de distàncies. A més a més s'ha aplicat un ajust de la matriu amb el llistat de diatomees per a indicar aquelles espècies més significativament correlacionades amb la distribució espacial de les mostres en el MDS

Amb el programa de Excel s'han realitzat els diferents càlculs de diversitat, Shannon i equitativitat.

#### 4.7 Criteris ètics i de sostenibilitat.

Al treballar directament en ecosistemes naturals cal tenir en compte que la nostra presència ja pot distorsionar el medi, és per això que cal extremar la seguretat per no malmetre l'ecosistema i provocar una distorsió significativa. Per aquest motiu en la presa de dades es va intentar ser el més eficients possible, per no haver de repetir els processos i distorsionar més l'ecosistema. Es van extremar les precaucions i es va procedir amb extrema cautela.

Una vegada ja al laboratori tot el material d'observació al microscopi va ser rentat i reutilitzat, (els cobreobjectes i els portaobjectes) i es va deixar assecat a l'aire lliure. La resta de residus com vials de vidre vuits, taps de plàstic i àcids provinents dels protocols van ser eliminats segons les normatives vigents i en el cas del material plàstic i de vidre reciclat.

### RESULTATS

#### ➤ Característiques dels punts de mostreig

PUNTS DE MOSTREIG	DESCRIPCIÓ DELS PUNTS
A	Aigua molt tèrbola. Subsòl molt llimós. Poc cabal. Hi havia molta femta de vaca i molta quantitat d'algues. A pocs centímetres de la superfície es trobaven condicions d'anòxia. Molta fulla de pi. Zona molt clara.
B	Al costat de la riera i havia una muntanya de sediments (grava). Sediment molt fi, aigua tèrbola. Zona molt clara.
C	Subsòl molt llimós, poca sorra, Fulles d'Auró. Zona amb força vegetació als voltants.
D	La riera es trobava prop d'un habitatge i hi havia molta brossa. Zona completament rodejada per arbres. Presència de fulles d' <i>Acer opalus</i>

Taula 2. Descripció de les característiques paisatgístiques i fluvials dels quatre punts.

#### ➤ Paràmetres fisicoquímics

Es van obtenir *in situ* les següents dades fisicoquímiques: temperatura, pH, conductivitat i concentració d'oxigen. Els gràfics amb cada punt de mostreig i les seves dades sindiquen a continuació a la Figura 3 mentre que els resultats estadístics es mostren a la Taula 3.

Com es pot observar (Figura 3) el primer paràmetre analitzat és la temperatura, aquest paràmetre no presenta diferències significatives entre els diferents punts ( $p$  valor=0,512), la temperatura mitjana és de 5 °C.

Pel que fa a la conductivitat sí que s'observa un gradient de salinitat molt marcat, al punt més proper a la font salada (A) s'observen valors de conductivitat de 43,5mS/cm mentre que al punt més llunyà (D) presenta una conductivitat de 0,6 mS/cm, els resultats mostren diferències significatives (p valor<0,001).

La concentració d'oxigen és força constant entre els 4 punts de mostreig, tot i que entre els punts A i B no s'observen diferències significatives (p valor<0,001) però amb els punts C i D sí.

Els valors de pH oscil·len entre 8 i 9, el valor més elevat 8,84 correspon al punt B, mentre que el valor més baix 8,31 pertany al punt C, els punts A i D són significativament semblants (p valor<0,001).

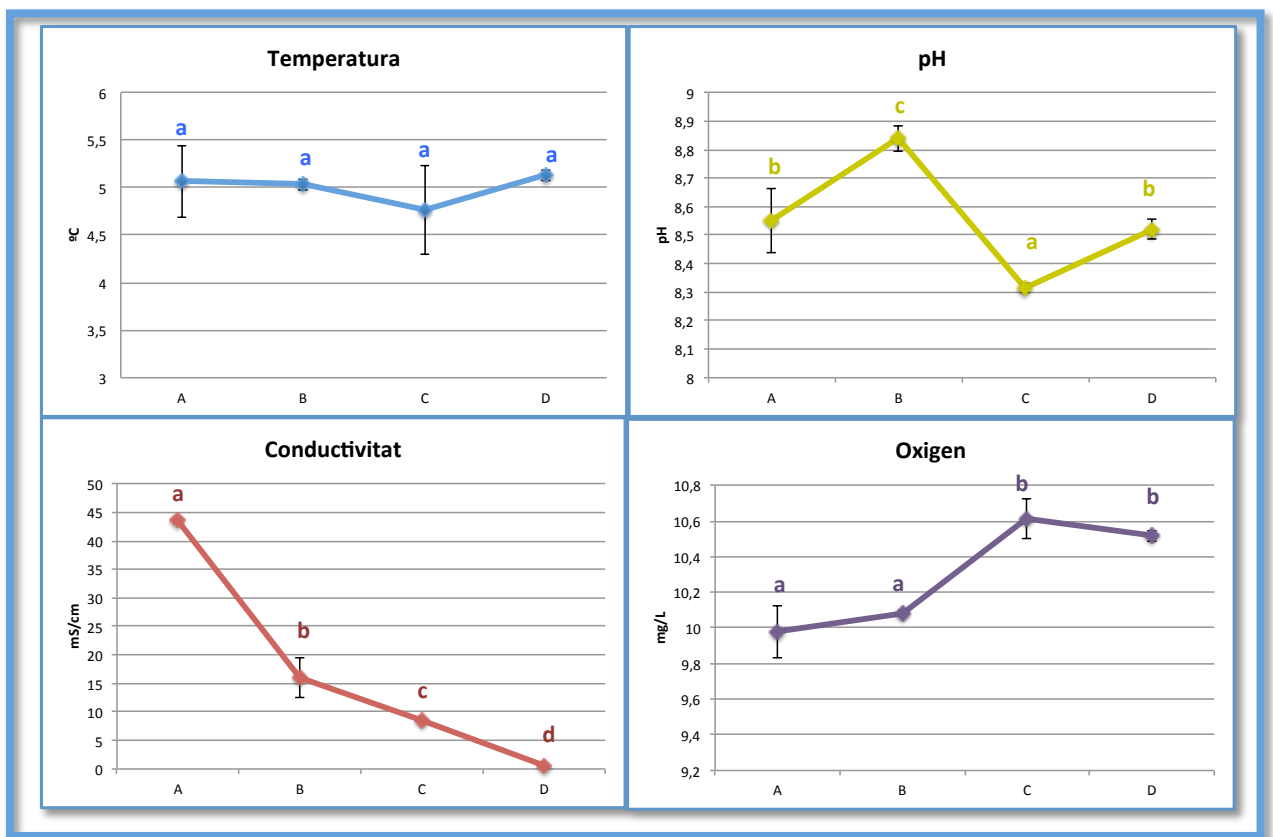


Figura 3. Paràmetres fisicoquímics mesurats *in situ* (temperatura, pH, conductivitat, oxigen i temperatura). S'indiquen les mitjanes amb els  $\pm$  del error estàndard (n=3). Les lletres minúscules indiquen el resultat del test post hoc de Tukey on es mostra la similitud estadística entre les mostres.

Si s'observa el comportament dels nutrients (figura 4), els fosfats van disminuint aigües avall, tot i que els valors oscil·len entre 2,59 a 7,78 no hi ha diferències significatives (p valor=0,32). El punt A és el que presenta major concentració de fosfats respecte el punt D que és el més allunyat.

Els nitrats (NO<sub>3</sub>) tenen una clara disminució als punts B i C, els quals són significativament similars, però a la vegada diferents dels punts A i D que, entre ells també son significativament

similars (Figura 4, p-valor<0,001). Els punts amb major concentració de nitrats són el punt A i el punt D, mentre que els que tenen menor concentració són els punts B i C.

Si s'observen els amonis (NH<sub>4</sub>), es pot veure com no existeix cap diferència significativa entre els 4 punts. Tal com passa amb els fosfats, els valor més elevats d'amoni en troben al punt A, seguidament van disminuint progressivament fins al punt D on tornen a augmentar lleugerament.

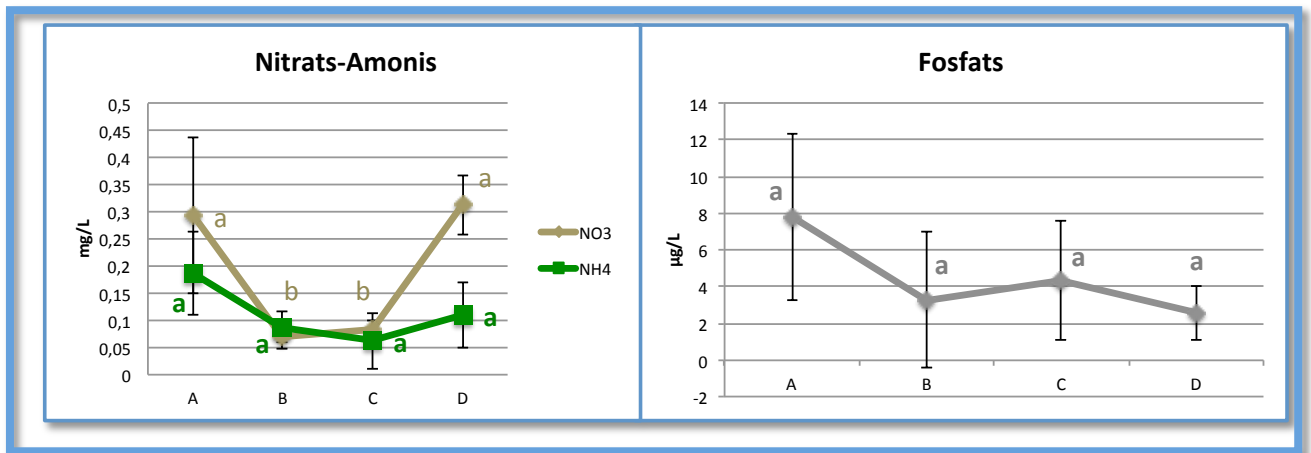


Figura 4. Nutrients analitzats en cada punt (fosfats, nitrats i amonis). S'indiquen les mitjanes amb les barres d'error estàndard (N=3). Les lletres en minúscula indiquen els resultats d'un test post hoc, el test de Tukey on es mostra la similitud estadística entre mostres.

### ➤ Anàlisi de clorofil·la

Els resultats de la clorofil·la s'indiquen a la figura 5. Hi ha diferències significatives entre el tipus de substrat (sediments, còdols i fulles) però també hi ha diferències significatives entre els diferents punts (Taula 3). Els resultats estadístics ens indiquen que el punt de mostreig influeix més que el tipus de substrat (Taula 3). També es pot observar que el substrat on més clorofil·la hi ha és el sediment, seguit de les fulles i per últim els còdols pel contrari si ens fixem en la clorofil·la present a cada punt del mostreig s'observa que el punt amb més clorofil·la és el punt amb més conductivitat (A), seguit per el punt D i C que gairebé no tenen diferències significatives, per últim el punt amb menys presència de clorofil·la és el punt B.

Si s'observa el gràfic (figura 5) és pot veure com el punt amb més clorofil·les és del punt A al substrat sediment. Si es mira a nivell més general s'observa que la major part de clorofil·les es troben als substrats còdols i fulles. Al punt D com que hi havia certa presència de fulles d'*Acer opalus* també es va decidir agafar mostres d'aquestes fulles.

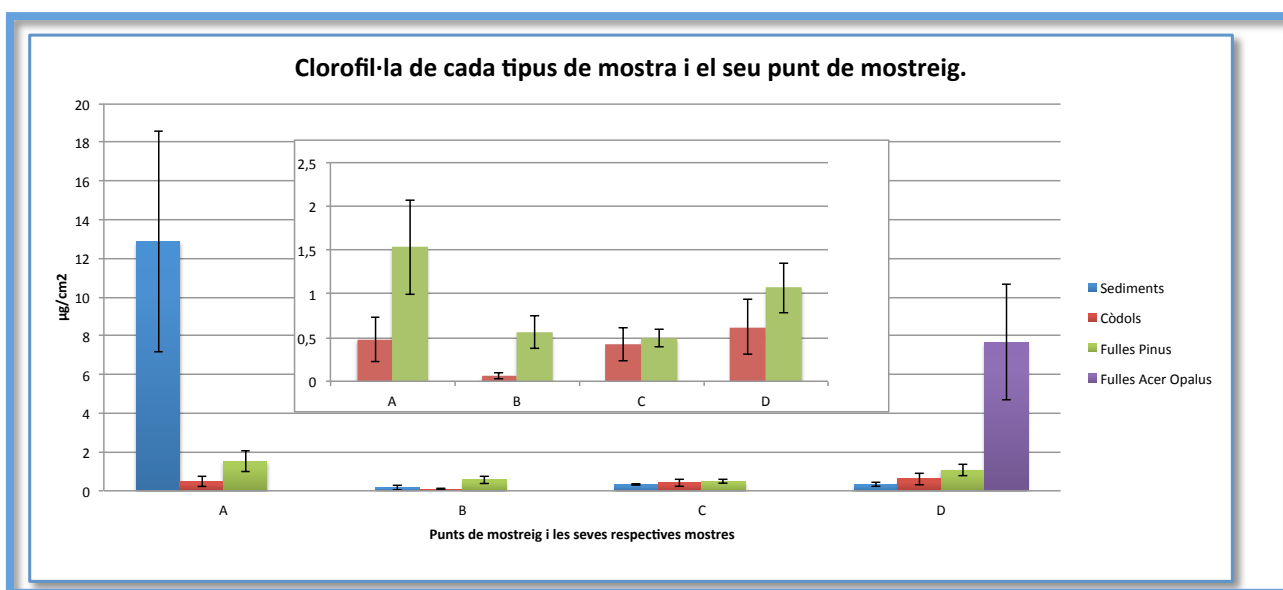


Figura 5. Gràfic detallat dels valors de clorofil·la segons els punts de mostreig i les seves respectives mostres de substrat. Al mig es pot veure el inserit un gràfic més detallat dels valors de clorofil·la dels còdols i les fulles. Els valors que s'indiquen són les mitjanes amb el  $\pm$  de les barres d'error estàndard.

Paràmetres	F de Fisher	p-valor
Temperatura	0,833	0,512
pH	35,366	<0,001
Conductivitat	346,612	<0,001
Oxigen	33,067	<0,001
Fosfats	1,368	0,320
Nitrats	8,498	0,007
Amonis	2,654	0,120
Clorofil·la	Punt	69,479
	Substrat	26,172
	Punt X Substrat	37,624

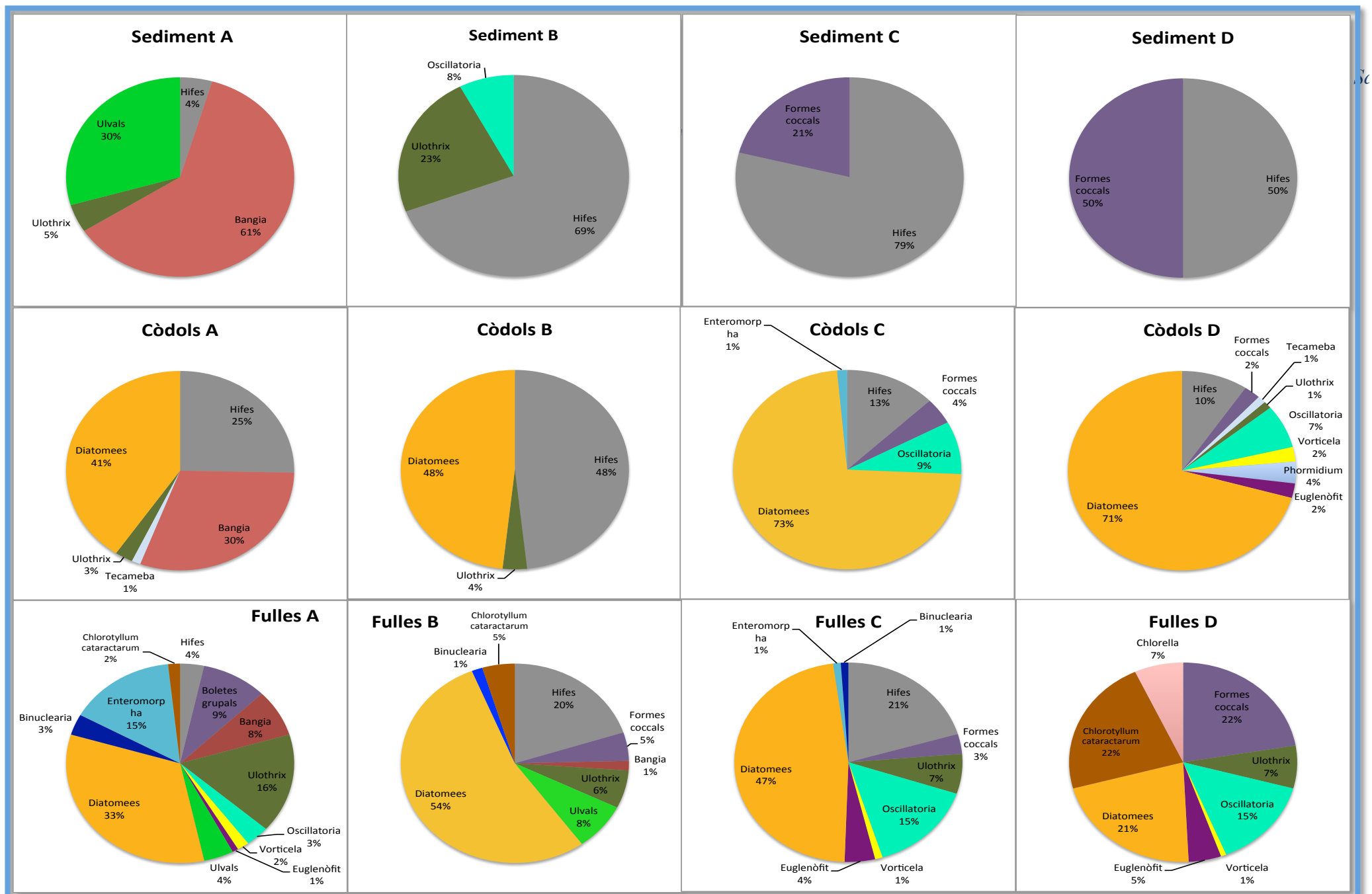
Taula 3. Resultats de l'anàlisi ANOVA per a cada un dels resultats. El nivell de significació utilitzat és de  $p \leq 0.05$ . Tots els paràmetres fisicoquímics i de nutrients tenen  $N=3$ . L'anàlisi de la clorofil·la és una ANOVA de dos factor son  $N=12$ .

➤ **Anàlisi de la comunitat**

A partir de les observacions al microscopi de tots els organismes que es trobaven en les submostres observades de cada rèplica, es van poder observar diferències entre els diferents substrats i punts de mostreig. Cal indicar però que com que el nombre d'individus trobat va ser petit, es va decidir sumar els individus trobats a les diferents rèpliques per tal de calcular el percentatge d'abundància de cada organisme trobat (Figura 6)

A les mostres de sediment la comunitat del punt A està dominada per *Bangia* i seguidament per algues de la família de les ulvals, unes espècies haplotolerants. Als còdols del punt A, la comunitat està dominada per les diatomees, seguidament per *Bangia*.

A les fulles del punt A s'observa que la riquesa augmenta considerablement i la comunitat està dominada per les diatomees però més baix que als còdols. Al punt B s'observa que als sediments la comunitat està liderada per les hifes mentre que als còdols hi ha la mateixa proporció d'hifes que de diatomees. A les fulles del punt B també augmenta la riquesa, la comunitat està clarament dominada per les diatomees. Al punt C com es pot apreciar el sediment està completament dominat per les hifes, als còdols i les fulles la comunitat està dominada per les diatomees. Per veure la diversitat de cada grup d'individus i com es reparteixen aquests organismes és pot consultar la figura 7 on es veu la diversitat de Shannon i l'Equitativitat. Es van utilitzar les mostres de còdols per analitzar la comunitat de diatomees ja que a les mostres de sediment l'observació era molt tèrbola, es va trobar poca densitat d'organismes i després d'obtenir els resultats de la Figura 6 on s'observa que a tots els punts de mostreig, els còdols estan dominats per les diatomees.



Juan González Gámez

Figura 6: Gràfics de sectors de cada zona de mostreig i els seus respectius substrats on s'observen els diferents individus que formen la comunitat.



A continuació es mostren els gràfics que es van obtenir realitzant els càlculs de diversitat. S'utilitza Shannon-Wiener i l'equitativitat. Com es pot observar a la figura 7, el punt amb més diversitat és el punt que més salinitat presenta, el punt A, seguit del punt D en la gran majoria de casos, excepte al sediment on el punt B presenta una major diversitat. De manera general es veu com la màxima diversitat es troba a les fulles seguit dels còdols i finalment on menor diversitat s'observa és als sediments. Com a conseqüència de la poca quantitat d'individus comptats s'han tingut que adjuntar les rèpliques per poder obtenir una mostra suficientment representativa. Pel que fa a la equitativitat, al sediment va augmentant progressivament, als còdols va disminuint progressivament i a les fulles disminueix entre A i C per després augmentar en el punt D.

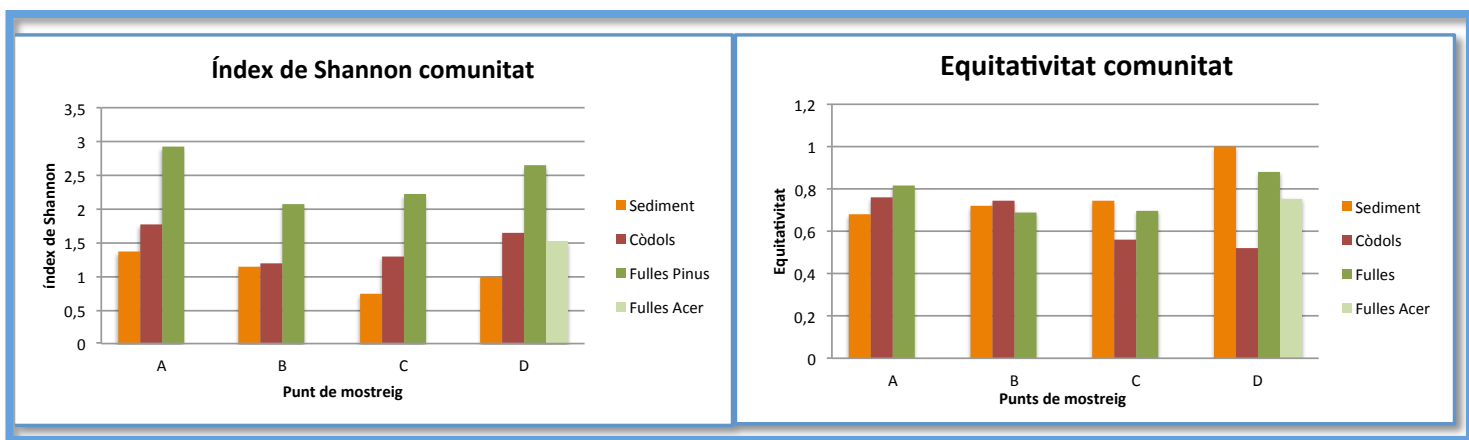


Figura 7: Càlcul del índex de Shannon-Wiener i l'equitativitat per a tota la comunitat del biofilm i per a cada tipus de substrat segons el punt de mostreig.

### ➤ Anàlisi de la comunitat de diatomees

S'utilitzen només les mostres de còdols per a l'anàlisi de les diatomees pels motius esmentats anteriorment, nitidesa de la mostra i bona representació del grup diatomees als còdols de totes les mostres.

Els resultats que es poden observar a la Figura 8, indiquen que les diatomees que dominen el punt més salat (A) són del gènere *Acnantes*, seguides per *Encyonopsis* i *Navícula*. Al punt B, les diatomees que dominen la comunitat són *Acnantes* seguides per *Gomphonoema*. Al punt c, una s'observa una clara dominància del gènere *Acnantes* seguida molt de lluny per *Encyonopsis*. Finalment al punt D s'observa una clara riquesa ja que apareixen molts més gèneres de diatomees però amb molt poca presència, en aquest punt la comunitat està dominada per *Acnantes* i en menor presència per *Encyonopsis*, *Gomphonoema* i *Navícula*.

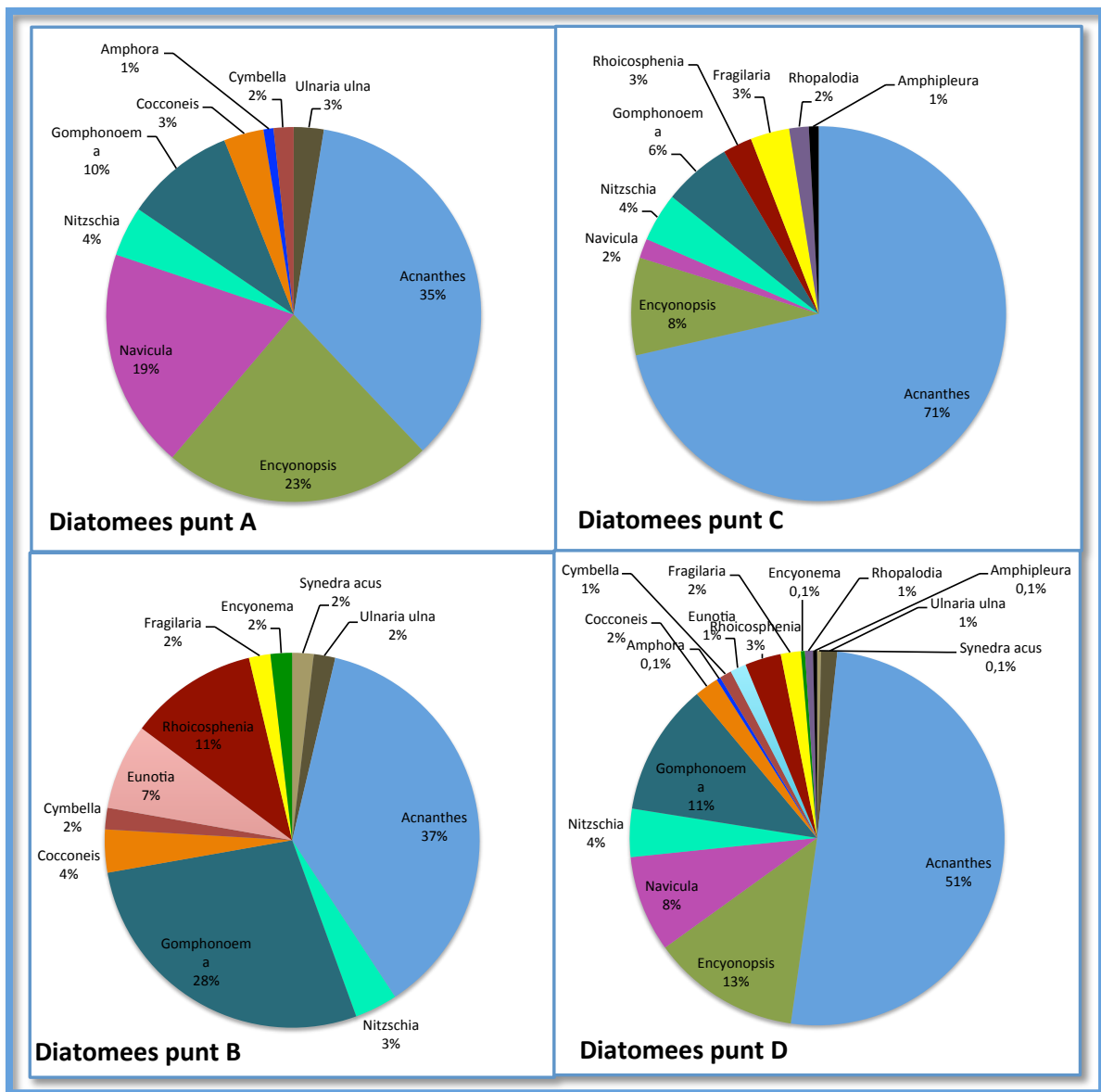


Figura 8. Gràfic de sectors de cada punt de mostreig on s'observen els diferents individus i el seu % dins de la comunitat de diatomees.

Els resultats que es van obtenir dels anàlisis de diversitat de la comunitat de diatomees queda detallat a la Figura 9. Es pot observar com l'Índex de Shannon cau al punt C no obstant tots els 4 punts no presenten gairebé diferències significatives (p-valor 0,065)

Pel contrari l'equitativitat, el punt A, B i D no tenen diferències significatives però el punt C sí (p-valor 0,065).

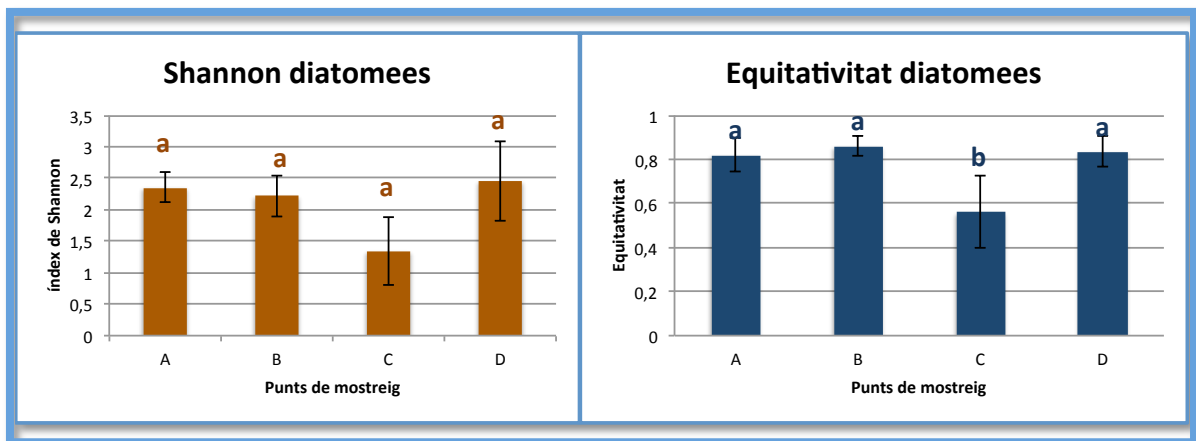
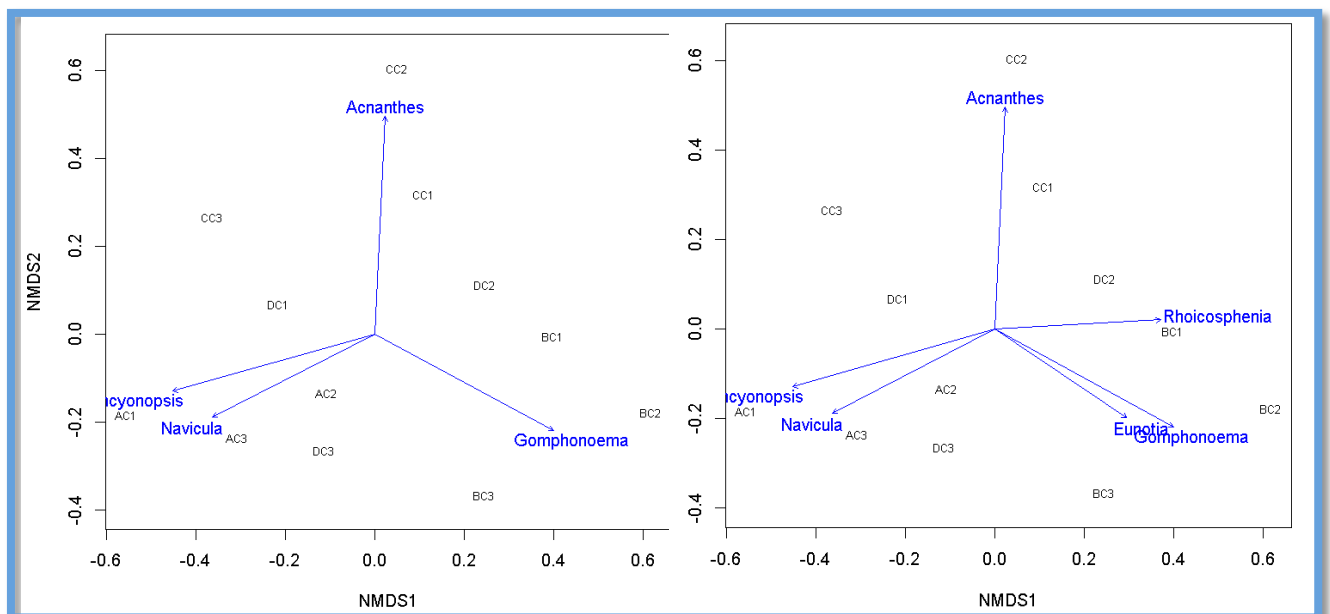


Figura 9. Càlcul de l'Índex de Shannon i l'equitativitat per a tota la comunitat de diatomees. Al gràfic es mostren les mitjanes amb les seves respectives barres d'error (N=3). Les lletres sobre les barres indiquen la similitud estadística entre variables segons els criteris del test de Tukey.

Per tal de determinar quins individus de la comunitat de diatomees eren els més significatius per a cada punt es va realitzar un anàlisi MDS que es pot veure a la Figura 10. Es pot observar com les diatomees més significatives per al punt A són *Encyonopsis* i *Navícula*, la més significatives del punt B és *Gomphonoema* (p-valor 0.01) i també *Eunotia* amb un rang de tolerància més gran (p-valor 0.05). La diatomea més significativa per al punt C sembla ser *Acnantes* mentre que si s'utilitza un p-valor 0.05 *Rhoicosphenia* és la més significativa per al punt D.

Figura 10. Resultats de l'anàlisi MDS on s'observen els diferents punts i quines diatomees determinen més el punt. A



l'esquerra el gràfic amb un p-valor 0.01 i a dreta p-valor 0.05.

La següent figura (Figura 11) mostra el número d'individus observats als còdols de cada punt i la quantitat d'individus dels 18 gèneres de diatomees que s'hi han trobat. Es pot veure clarament que el gènere més trobat és *Acnantes* i sobretot com varia la comunitat

Diatomees	AC1	AC2	AC3	BC1	BC2	BC3	CC1	CC2	CC3	DC1	DC2	DC3
Synedra acus	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Ulnaria ulna	1	2	0	0	0	1	0	0	0	7	0	5
Acnantes	19	11	11	7	8	5	23	41	21	30	3	20
Encyonopsis	17	5	5	0	0	0	0	1	9	5	0	7
Navicula	15	2	5	0	0	0	1	0	1	3	0	1
Nitzschia	1	1	3	0	0	2	3	2	0	2	0	2
Gomphonoema	3	6	2	3	9	3	5	1	1	4	1	4
Cocconeis	1	1	2	0	0	2	0	0	0	1	1	5
Amphora	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cymbella	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	1	4
Eunotia	0	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	2
Rhoicosphenia	0	0	0	2	4	0	0	3	0	0	0	0
Fragilaria	0	0	0	1	0	0	0	0	4	3	0	3
Encyonema	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Rhopalodia	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
Amphipleura	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
Diploneis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
Hantzschia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2

Figura 11. Taula on s'observen els diferents gèneres ( i alguna espècie) de diatomees trobats mitjançant l'observació a partir de microscopi òptic. S'indiquen el nombre d'individus observats per a cada mo

## DISCUSSIÓ

A partir dels resultats obtinguts de la conductivitat es demostra que la Riera Salada és una riera hipersalina amb un gradient de salinitat molt marcat i significatiu com a conseqüència de l'entrada d'aigua dels seus afluents. El punt amb més salinitat (A) és el punt que presenta més concentració de nutrients (fosfat, nitrats i amoni) això pot ser a conseqüència d'una de les condicions d'aquest punt ja que hi havia molta presència de femtes de vaca i això justificaria aquests resultats. Pel què fa a les dades fisicoquímiques mesurades (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 mitjanes, oscil·len en un gradient molt petit com per parlar de que hi ha algun tipus de relació amb aquest paràmetre.

El primer objectiu del treball consisteix en veure com afecten els paràmetres fisicoquímics (especialment la salinitat) i quines espècies s'hi troben en els punts de mostreig. Segons la hipòtesi proposada per a aquest primer objectiu, esperàvem veure un augment gradual de la diversitat i la riquesa quan la conductivitat baixa, però en canvi els resultats no ho demostren. Tot i que l'índex de Shannon i l'Equitativitat són valors significativament semblants, la comunitat del biofilm sí que pateix un canvi en quan als microorganismes que la formen, així ho indiquen les dades globals i les diatomees (Figures 6 i 8). Podem observar en aquestes figures que la comunitat varia, si ens fixem en les dades globals la comunitat en el seu punt més salí esta formada principalment per *Bangia atropurpurea* (un rodòfit que viu en ambients salins), *Enteromorpha* (una alga verda molt comú en aiguamolls salats), *Ullothrix* també és força abundant en els punts amb més salinitat. La comunitat a mesura que disminueix la salinitat varia considerablement de tàxons ja que al punt B (el segon més salat), l'espècie *Bangia atropurpurea* ja no està present, dominen aquest indret les hifes, les diatomees i l'alga més representativa és *Ullothrix*. La comunitat de diatomees reacciona igual amb la diversitat, no mostres diferències significatives tot i que a l'Equitativitat el punt C si presenta diferències significatives, si observem la comunitat de diatomees tot i no variar l'índex de Shannon, també s'observa un canvi en la comunitat. A tota la comunitat de diatomees del biofilm el gènere més abundant es *Acnathes* però el gènere més representatiu del punt més salí és *Encyonopsis*, al segon punt més salí (B) es *Gomphonoema*. L'anàlisi MDS ens permet observar visualment les diferències entre les comunitats de diatomees dels diferents punts de mostreig a partir d'una matriu de distàncies, si l'observem podem veure que el gènere *Navicula* i *Encyonopsis* són els que determinen més el punt de mostreig més salat (A). *Acnathes* ,tot i ser la més abundant a tots els punts de mostreig ja que es una bona colonitzadora i es estratega de la r, es el gènere que més determina el punt C. El punt B si el mirem amb un criteri estricte (d'un p-valor de 0,01) veiem que l'espècie que més el determina és *Gomphonoema*, si el mirem amb un criteri més baix (p-valor 0,05) també ho és *Eunotia*. El punt D queda entre mig de tots els altres punts i amb aquests criteris no podem observar

quina diatomea representa més aquest grup tot i que la més abundant és *Acnanthes* i *Gomphonoema*.

Per respondre al segon objectiu d'aquest treball ens hem de fixar en com varia la comunitat respecte als diferents substrats, la nostra hipòtesi inicial postulava que el substrat més afectat per la salinitat era el sediment. Si ens fixem en la Figura 6, es pot apreciar molt clarament com el sediment canvia d'un punt a un altre, al punt A el sediment presenta una gran quantitat de *Bangia* i *Ulvals*, als altres punts van desapareixent espècies essent cada vegada més abundants les hifes.

Mitjançant l'anàlisi de la clorofil·la (Figura 5) s'observa que al substrat on més quantitat hi ha son les fulles, la diversitat més elevada la podem trobar a les fulles, un medi molt ric en microorganismes i matèria en descomposició que la comunitat del biofilm utilitza com a nutrients. El següent substrat amb més diversitat son els còdols. Tornant a fer un cop d'ull al gràfic (Figura 5) es veu que hi ha un gran pic de clorofil·la als sediments del punt A, quan es van observar les mostres al microscopi no es van poder detallar un gran número de microorganismes, es van trobar restes de *Bangia atropurpurea* però tampoc era molt abundant. La gran diferència entre el càlcul de la clorofil·la i l'observació podria ser deguda a que una part important de clorofil·la detectada en aquest substrat estava degradada.

La major diversitat també la trobem en les fulles, seguida pels còdols i per últim el sediment. La gran diversitat trobada a les fulles segurament és deu a la gran quantitat de microorganismes descomponedors que hi habiten en aquest substrat tan ric.

Si ens fixem en la comunitat del biofilm també podem veure que hi ha una gran diferència entre els sediments i els còdols i fulles. Mentre que en el punt C i D al sediment només tenim 2 grups de tàxons, els altres substrats tenen mínim 6 microorganismes diferents.

Els resultats indiquen que la biomassa algal del biofilm esta més influenciada pel punt de mostreig (A,B,C,D) que pel tipus de substrat (sediments, còdols i fulles).

## CONCLUSIONS

The conclusions derived from this study are the following:

- ❖ Although the Shannon index and equitativity have similar values, microorganisms that form the biofilm community change considerably with the salinity gradient.
- ❖ The most adapted microorganisms of the biofilm community to live in hypersaline conditions is: *Bangia*, *Ullothrix* and *Ulvals* and the diatoms more features diatomees are *Encyonopsis* and *Gomphonoema*.
- ❖ Algal biomass is most influenced by the sampling point (A,B,C,D) than by the type of substrate (sediment, stones and leaves)

## BIBLIOGRAFIA

- Anderson-Glenna MJ, Bakkestuen V, Clipson NJW (2008) Spatial and temporal variability in epilithic biofilm bacterial communities along an upland river gradient. *FEMS Microbiol Ecol* **64**: 407-418
- Berry, D., Xi, C., and raskin, L., (2006). Microbial ecology of drinking water distribution systems. *Curr. Opin. Biotech.* **17**, 297-302.
- 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.
- Bratbak, G. (1985). Bacterial biovolume and biomass estimations. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Chiu, J.M.Y., Thiyagarajan, V., Tsoy, M.M.Y. and Qian, P.Y. (2006). Qualitative and quantitative changes in marine biofilms as a function of temperature and salinity in summer and winter. *Biofilms*, **2**, 1-13.
- Cole J.J., Findlay S., Pace M.L. (1988) Bacterial production in fresh and salt water ecosystems: a crosssystem overview. *Marine Ecology Progress Series* **43**, 1-10.
- Davey, M.E. and O'Toole, G.A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 847-867.
- Decho, A.W. (2000). Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Cont. Shelf Res.* **20**, 1257-1273.
- Emtiazi, F., Schwartz, T., Marten, S.M., Korolla-Sindenstein, P. And Obst, U. (2004). Investigation of natural biofilms formed during the production of drinking water from surface water embankment filtration. *Water Res.* **38**, 1197-1206.
- 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
- Gerbersdorf, S.U., Jancke, T., Westrich, B., and Peterson, D.M. (2008). Microbial stabilization of riverine sediments by extracellular polymeric substances. *Geobiology.* **6**, 57-69.
- Gessner M.O. & Chauvet E. (1993). Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic 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.
- Streble, H. and Krauter, D., (1985). Atlas de microorganismos de agua dulce. La vida en una gota de agua. 84-282-0800-X. pp, 114-258.
- 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.
- Karatan, E., and Watnick, P., (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 310-347.
- Lock, M.A. (1993). Attached microbial communities in rivers. In *Aquatic microbiology: An Ecological Approach*, Ford, T.E., ed. (Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK) pp. 57-76.
- López, D., Vlamakis, H., and Koler, R. (2010). Biofilms. *Cold spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a000398, 1-11.
- Magalhães, C.M., Joye, S.B., Moreira, R.M., Weibe, W.J., and Bordalo, A.A. (2005). Effect of salinity and inorganic nitrogen concentrations on nitrification and denitrification rates in intertidal sediments and rocky biofilms of the Douro River estuary, Portugal. *Water Res.* **39**, 1783-1794.
- Mata-perelló, J. M. (2000). SALINAS CONTINENTALES DEL PIRINEO CATALÁN, 449-452.
- Marić, S., Vraneš, J. (2007). Characteristics and significance of microbial biofilm formation. *Periodicum Biologorum*, **109**(2), 115-121.
- 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?



- Mora-Gómez, J., Freixa, A., Perjuro, N., and Barral-Farga, L. (2016). Limits of the biofilm concept and types of aquatic biofilms. *Freshwater biofilms*, chapter 1 <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=2178530>
- 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>
- Nikolcheva, L.G., and Bärlocher, F. (2004). Taxon-specific fungal primers reveal unexpectedly high diversity during leaf decomposition in a stream. *Mycol. Prog.* 3, 41-50
- Porter K.G., Feig Y.S. (1980). The use of dapi for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25, 943-948
- Pusch, M., Fiebig, D., Brettar, I., Eisenmann, H., Ellis, B.K., Kaplan, L.A., Lock, M.A., Naegeli, M.W., and Traunspurger, W. (1998). The role of microorganisms in the ecological connectivity of running waters. *Freshwater biol.* 40, 453-495.
- 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., and Sabater, S. (2001). Structure and activity of rock and sand biofilms in a Mediterranean stream. *Ecology* 82, 3232-3245
- Romaní, A.M., Guasch, H., Muñoz, I., et al. (2004) Biofilm structure and function and possible implications for riverine DOC dynamics. *Microbial ecology*. 47, 1702-1711.
- Romaní, A.M., (2009), *Freshwater biofilms*. Chapter 10
- Sthal P.D., Parkin, T.B. (1996) Relationship of soil ergosterol concentration and fungal biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 847-855.
- Terlizzi, A. & Faimali, M. (2010). Fouling on artificial substrata. In *biofouling*, Dürr, S., and Thomason, J.C., eds. (Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK), pp. 170-179.
- Theil-Nielsen, J., Sondergaard, M. (1998). Bacterial carbon biomass calculated from biovolumes. *Archiv Für Hydrobiologie*, 141(2), 195–207. Retrieved from
- Torres, M. (2015). Efectes d'un gradient de salinitat en l'estructura i el funcionament del biofilm epilític en una riera salada. Ed. Romaní, A.M. and Mora-Gómez, J.
- Underwood, G.J.C., Perkins, R.G., Consalvey, M.C., Hanlon, A.R.M., Oxboroug, K., Baker, N.R., and Peterson, D.M. (2005). Patterns in microphytobenthic primary productivity: species-specific variation in migratory rhythms and photosynthetic efficiency in mixed-species biofilms. *Limnol. Oceanogr.* 50, 755-767.
- Vadeboncoeur, Y., & Steinman, A.D. (2002). Periphyton function in lake ecosystems. *Sci. World J.* 2, 1449-1468.
- María Vanegas, L., Nancy Correa, C., Ana Morales, M., Aída Martínez, L., Laura Rügeles, 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.
- Wingender, J., & Flemming, H.C. (2011). Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 214, 417-423.
- Zhang, T., & Feng, H.H.P. (2001). Quantification of extracellular polymeric substances in biofilms by confocal laser scanning microscopy. *Biotech. Letters* 23, 405-409.