

Títol del treball:

Efecte de la granulometria i la profunditat en l'estructura del biofilm microbià en sediments fluvials de dos rius de capçalera

Estudiant: Sònia Anguita Romagós

Grau en Ciències Ambientals

Correu electrònic: u1922438@campus.udg.edu

Tutora: Anna M. Romaní Cornet; Cotutora: Núria Perujo Buxeda

Cotutor*:

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

Vistiplau tutor (i cotutor*):

Nom del tutor: Anna M. Romaní; Cotutora: Núria Perujo

Nom del cotutor*:

Empresa / institució: IEA Facultat de Ciències UdG

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

nuria.perujo@udg.edu

*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: 23 de maig de 2017

Efecte de la granulometria i la profunditat en l'estructura del biofilm microbià en sediments fluvials de dos rius de capçalera

RESUM

S'ha realitzat aquest estudi per conèixer les variacions en l'estructura del biofilm fluvial en funció de la profunditat i el tipus de sediment (granulometria) en dos rius de capçalera. S'han analitzat els components del biofilm en el sediment de la riera d'Arbúcies i la riera de Gualba, dos afluents del riu Tordera. Mitjançant treball de camp s'han recollit mostres de sediment i aigua, que s'han analitzat al laboratori de forma paral·lela segons els punts de mostreig establerts i la fondària del sediment.

Les mostres del camp es varen recollir mitjançant un mostrejador de sediment. A cada punt de mostreig es varen recollir per separat mostres de la superfície i mostres de la profunditat, i es varen analitzar les condicions fisicoquímiques de l'aigua. També es varen agafar mostres d'aigua a cada punt. Al laboratori es va analitzar per una banda els paràmetres generals de cada punt, incloent l'anàlisi de nutrients, la granulometria i l'anàlisi de matèria orgànica, i per altra banda, els paràmetres de l'estructura del biofilm mitjançant l'anàlisi de la clorofil·la, la densitat de bacteris i la matriu de polisacàrids (EPS). S'han dut a terme anàlisis estadístiques per veure la relació entre els diferents paràmetres estudiats.

Els anàlisis fisicoquímics han mostrat una similitud entre les dues rieres mostrejades. Els resultats del sediment han presentat diferències en l'estructura del biofilm en funció de la profunditat del sediment, obtenint concentracions més elevades de matèria orgànica, clorofil·la, densitat de bacteris i EPS a les capes superiors. Fet que pot estar relacionat amb la major radiació solar, disponibilitat d'oxigen i nutrients. La granulometria només afecta significativament el contingut de matèria orgànica que és més elevat en el sediment fi que en el groller.

S'ha trobat relació entre els paràmetres que componen l'estructura dels biofilms. Gràcies a una matriu de correlació s'ha vist que les relacions varien en funció de la profunditat del sediment. Els resultats mostren que en superfície, les algues tenen un rol més important en la formació de la matriu EPS i en la concentració de matèria orgànica, mentre que en fondària la concentració de matèria orgànica està relacionada amb la densitat de bacteris.

Paraules clau: ecosistemes fluvials, hiporreos, granulometria, algues, bacteris, biomassa, sediment, biofilm

RESUMEN

El presente estudio se ha realizado para conocer las variaciones en la estructura del biofilm fluvial, en función de la profundidad y el tipo de sedimento (granulometría) de dos ríos de cabecera. Se han analizado los componentes del biofilm en el sedimento de la riera de Arbúcies y la riera de Gualba, dos afluentes del río Tordera. Mediante trabajo de campo se han recogido muestras de sedimento y agua, que han sido analizadas en el laboratorio de forma paralela según los puntos de muestreo establecidos y la profundidad del sedimento.

Las muestras del campo fueron recogidas mediante un muestreador de sedimento. En cada punto de muestreo se recogieron por separado muestras del sedimento en superficie y en profundidad, y se analizaron las condiciones fisicoquímicas del agua. También se recogieron muestras de agua en cada punto. En el laboratorio se analizaron por un lado los parámetros generales de cada punto, incluyendo el análisis de nutrientes, la granulometría y el análisis de materia orgánica, y por otro lado los parámetros de la estructura del biofilm mediante el análisis de la clorofila, la densidad de bacterias y la matriz de polisacáridos (EPS). Se llevaron a cabo análisis estadísticos para ver la relación entre los diferentes parámetros estudiados.

Los análisis fisicoquímicos han mostrado una similitud entre los dos arroyos muestreados. Los resultados del sedimento han presentado diferencias en la estructura del biofilm en función de la profundidad del sedimento, obteniendo concentraciones más elevadas de materia orgánica, clorofila, densidad de bacterias y EPS a las capas superiores. Hecho que puede estar relacionado con una mayor radiación solar, disponibilidad de oxígeno y nutrientes. La granulometría solo afecta significativamente el contenido de materia orgánica que es más elevado en el sedimento fino que en el grueso.

Se ha encontrado la relación entre los parámetros que componen la estructura de los biofilms. Gracias a una matriz de correlación se ha visto que las relaciones varían en función de la profundidad del sedimento. Los resultados muestran que en superficie las algas tienen un rol más importante en la formación de la matriz EPS y en la concentración de materia orgánica, mientras que en profundidad la concentración de materia orgánica está relacionada con la densidad de bacterias.

Palabras clave: Ecosistemas fluviales, hiporreos, granulometría, algas, bacterias, biomasa, sedimento, biofilm

ABSTRACT

The following study was carried out to determine the structural variations in fluvial biofilm depending on the depth and type of sediment (particle size) taken from headwaters of two tributaries. Biofilm parameters were analysed from sediment obtained at two different sampling points from Arbúcies and Gualba rivers, two different tributaries of the Tordera river. Both water and sediment samples were obtained through field work, and analysed at a laboratory in accordance to sampling location and sediment depth.

The field samples were taken using a sediment sampler. In each sampling point, samples from surface and depth had been analysed separately, and physicochemical conditions of water had been analysed too. Samples of water had been taken in each point. On the laboratory on the one hand, the general parameters of each point were analysed, those include nutrients, particle size and organic matter analysis, and on the other hand the parameters of biofilm structure through chlorophyll, bacterial density and EPS analysis. Statistical analysis has been performed to see the relation between these parameters.

The physicochemical analysis showed a similarity between the two streams sampled. The results from sediment revealed differences in biofilm structure depending on the depth of sediment, being the highest concentrations of organic matter, chlorophyll, bacterial density and EPS at surface layers. This can be related to the presence of high solar radiation and availability of oxygen and nutrients in the surface compared to deeper sediment layers. Particle size only affects significantly on organic matter concentration that is higher in fine sediment than coarse.

A relation has been found between the parameters composing the biofilm structure. Thanks to a correlation matrix it has been observed that these relations may vary depending on the depth of the sediment. The results revealed that on the surface, algae have a more important role in the EPS matrix formation and in organic matter concentration, whilst at depth the concentration of organic matter is related to bacterial density.

Keywords: Fluvial ecosystems, hiporreic, particle size, algae, bacteria, biomass, sediment, biofilm

Efecte de la granulometria i la profunditat en l'estructura del biofilm microbià en sediments fluvials de dos rius de capçalera

ÍNDEX

Resum	i
Resumen	ii
Abstract	iii
Introducció	1
Objectives	3
Metodologia	4
<i>Àrea d'estudi</i>	4
<i>Presa i conservació de les mostres</i>	6
<i>Anàlisi de nutrients</i>	7
<i>Anàlisi granulomètric</i>	8
<i>Matèria orgànica</i>	9
<i>Anàlisi de clorofil·la</i>	9
<i>Densitat de bacteris</i>	10
<i>EPS (“extracellular polymeric substances”)</i>	12
<i>Anàlisi de Dades</i>	13
Resultats	15
<i>Anàlisis fisicoquímiques</i>	15
<i>Anàlisi del sediment</i>	17
Granulometria	17
Contingut de matèria orgànica	18
Contingut de clorofil·la	19
Densitat de bacteris	20
Contingut d'EPS.....	21
Contingut en unitats de carboni de biomassa algal, bacteriana i EPS als diferents biofilms del sediment	22
Discussió	24
Conclusions	26
Bibliografia	27

INTRODUCCIÓ

Els ecosistemes fluvials com rius, rierols i rieres han tingut un paper important en l'evolució de l'home. Al llarg de la història dels éssers humans, els processos biofísics i les funcions dels ecosistemes han aportat, i segueixen aportant, serveis per al benestar humà (Haines-Young & Potschin, 2009) com per exemple energia hidroelèctrica i recursos alimentaris. És per aquest motiu que és interessant conèixer l'estructura i el funcionament dels sistemes que ens aporten aquests beneficis. La interacció entre la vegetació i la fauna, i factors com els processos ambientals que configuren les comunitats, són els que defineixen els ecosistemes fluvials actuals. Tot i així, el factor principal que els caracteritza és la connectivitat lateral, longitudinal i vertical, que forma en el seu conjunt la conca hidrogràfica de cada riu. La conca d'un riu és l'àrea de terreny drenada pel conjunt d'afluents que alimenta un riu (Gran Enciclopèdia Catalana, 2017).

Horton (1945) va desenvolupar un sistema de classificació jeràrquica, modificat a posteriori per Strahler (1957). La classificació es mostra a la *Figura 1* extreta de Allan (2007), on al llarg del recorregut del riu, es diferencien tres trams numerats segons l'ordre en el qual pertanyen: la capçalera (1-2), el tram mig (3-4) i el tram baix (4-5).



Figura 1. Xarxa de drenatge, s'ordenen els corrents segons quatre ordres.

Els rius de capçalera com els d'aquest estudi, es caracteritzen per ser d'aigües ràpides i fredes. En aquests trams els rius solen ser estrets, això permet que la vegetació de ribera proporcioni molta ombra i una important entrada de matèria orgànica grollera (>1mm) d'origen al·lòcton com fullaraca o matèria orgànica particulada. En definitiva, els rius de capçalera són heterotròfics degut a que la producció primària és baixa, i que hi ha poca acumulació de nutrients (Allan, 2007). La baixa concentració de nutrients dóna lloc a una dinàmica de reciclatge dels mateixos. Els nutrients participen en un reciclatge dut a terme gràcies a processos continus de lixiviació i mineralització d'elements no conservatius (Allan, 2007) com el nitrat, l'amoni i el fosfat. D'altra banda, els rius de capçalera són importants processadors i transportadors de materials del medi terrestre gràcies a la vegetació de ribera, també són els responsables de la retenció eficient i la oxidació de la matèria orgànica (Mcdowell & Fisher, 1976).

La matèria orgànica particulada grollera (MOPG, més d'1 mm de mida de partícula) com fulles o restes de fusta, és una font potencial de matèria orgànica particulada fina (MOPF, menys d'1 mm i més de 0.5 µm) i matèria orgànica dissolta (MOD, menys de 0.5 µm) (Allan, 2007). La producció heterotròfica requereix una font de matèria orgànica morta, i la presència de microorganismes (fongs i bacteris) capaços de descompondre la matèria orgànica i alliberar l'energia emmagatzemada (Allan, 2007).

Les comunitats microbianes bentòniques són aquelles que es troben associades amb qualsevol interfície sòlida-líquida. Són comunitats formades per comunitats d'algues, fongs, bacteris i protozous, units per una matriu polisacàridica mucilaginoso (Romaní, 2001) que habiten en roques, graves, fusta i sediments, i estan associades amb el substrat d'un sistema aquàtic (Sierra & Gomez, 2007). Aquestes comunitats bentòniques reben el nom de biofilm (Wetzel, 2001).

Per entendre el funcionament d'un ecosistema fluvial és important conèixer les interaccions que es donen en les comunitats heterotròfiques i autotròfiques que formen el biofilm (Wetzel, 2001). Les propietats del biofilm varien segons factors ambientals, com la distribució en l'espai de les comunitats, la capacitat d'emmagatzematge dels nutrients, l'efecte de les forces hidrodinàmiques, la temperatura i la radiació solar entre altres. Els bacteris produeixen una matriu de compostos polimèrics (descrita com EPS a partir d'ara), per tal d'obtenir adhesió al substrat (Low, 1989; Marshall, 1988) i protecció contra l'erosió i la força del corrent d'aigua (Lock, 1993).

En el sediment, la mida del gra de sorra determina l'àrea superficial disponible per a la colonització i formació del biofilm (Romani et al., 1998), però la profunditat del sediment també pot influir en el metabolisme del biofilm. S'ha comprovat que en profunditat, la disponibilitat de llum disminueix i hi dominen els processos heterotròfics (Lock, 1993).

S'ha vist que existeix un efecte entre els processos microbians i el sediment, de fet es pot predir l'activitat bacteriana a l'hiporreos gràcies a la distribució dels sediments. Boulton et al. (1998) varen observar una disminució de les activitats enzimàtiques microbianes en profunditat. La zona hiporreica és la que es desenvolupa a la zona de sediments del fons del riu, amb un lligam hidrològic amb el canal del riu obert i per sobre o dins de l'aigua subterrània (Romaní, 2001). Es creu doncs, que diferents granulometries i profunditats de sediment poden estar lligats a diferents comportaments en la formació del biofilm microbià i en la utilització de la matèria orgànica, ja que els processos metabòlics varien segons la fondària (Romaní et al., 1998). Les característiques físiques i químiques dels substrats de sorra i còdols condicionen l'estructura i el metabolisme de les comunitats microbianes que s'hi desenvolupen (Lock, 1993). Hudson, Roff & Burnison (1992) varen observar diferències clares entre la productivitat dels autòtrofs i la dels heteròtrofs en hàbitats de sediment groller i hàbitats de sediment més fi. Els autòtrofs dominaven en sediments grollers, mentre que els heteròtrofs eren més productius en sediments més fins.

Per aprofundir més en la influència de la granulometria i profunditat del sediment sobre l'estructura dels biofilms fluvials, el present treball analitzarà la composició del biofilm (biomassa algal, bacteriana, EPS i matèria orgànica) en diversos tipus de sediment (fi, groller o mixt) i profunditats, en dos rius de capçalera.

OBJECTIVES

The aim of this study is to find differences in the structure of fluvial biofilms in river sediments, depending on the sediment particle size and depth.

It has been proposed to investigate those differences in sampling sites located in two tributaries from Tordera River. These sampling sites have different sediment grain sizes.

From this general objective, it has been defined the following specific objectives and work hypotheses

- To identify the grain size of the sediments from the interpretation of the grading curves.

Hypothesis: We expect the particle size analysis to show a clear difference between coarse and fine sediment. It is expected that sediments in general will be classified as sand.

- To determine if there are differences between biofilm parameters in depth

Hypothesis: On one hand, differences are expected in the analysis of biofilm structure between samples of sediment from the surface versus samples in depth. It has been considered that in the surface, the concentration of chlorophyll, bacterial density and EPS will be higher due to the decrease of light and concentration of oxygen and nutrients in depth. The decrease of solar radiation means a reduction of photosynthetic activities and the synthesis of polysaccharides that form the EPS matrix.

- To see if there are differences in the biofilm structure depending on the particle size of the sediment.

Hypothesis: Fine sediment has more surface than coarse sediment; this means that probably it will be high quantity of organic matter and EPS in fine sediment.

- To link components of biofilms structure (chlorophyll, bacterial density and EPS) taking into account the characteristics of sediment and water from the two river tributaries

Hypothesis: It is expected a relation between biofilm structure parameters, especially between chlorophyll and EPS concentration in surface and bacterial density and EPS concentration in depth.

METODOLOGIA

ÀREA D'ESTUDI

L'àrea d'estudi comprèn dos afluent del riu Tordera: la riera de Gualba i la riera d'Arbúcies (*Fig. 2*). S'han seleccionat aquestes rieres degut a que el sediment presenta un ampli rang de granulometries. A més, el substrat sorrenc permet estudiar el sediment superficial i hiporreic, i es troben sobre el mateix substrat geològic, una terrassa fluvial del Quaternari composta principalment per graves, sorres i lutites (Institut Cartogràfic i Geològic de Catalunya, 2017).

S'han escollit un total de cinc punts de mostreig repartits entre els dos afluent. Els punts de mostreig corresponen a zones amb sediment de diferent granulometria (fi, groller o groller i fi). La diferència entre sediment fi i groller s'ha fet primer visualment durant el mostreig, i posteriorment mitjançant una corba granulomètrica en l'anàlisi del sediment.

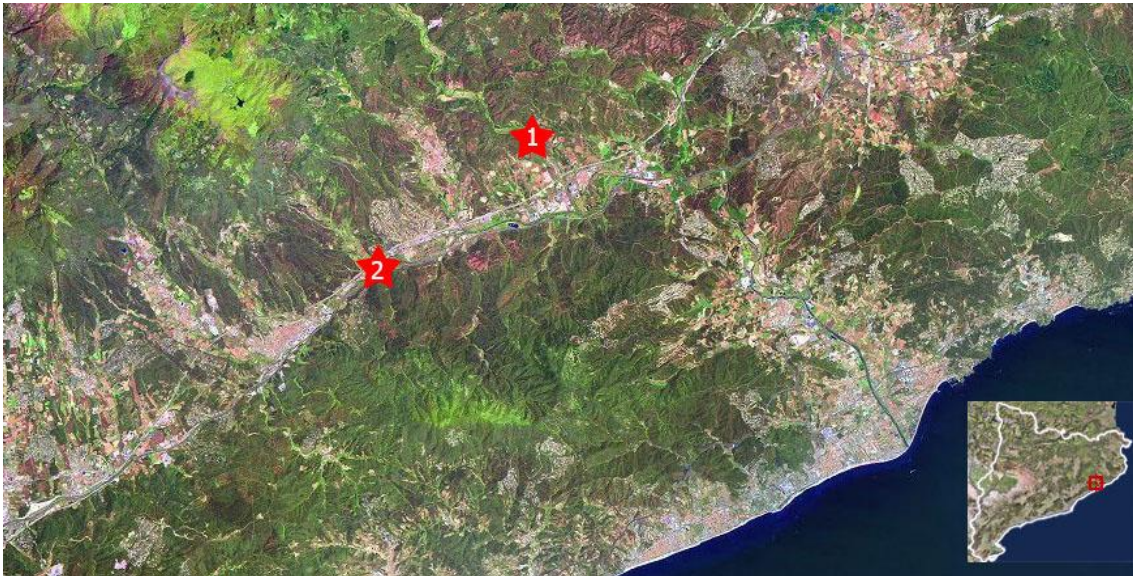


Figura 2. Localització general dels punts de mostreig situats a la riera d'Arbúcies (1) i riera de Gualba (2). Escala 1:20. Font: Imatge satèl·lit 1:250.000, www.icc.cat/vissir3

La riera d'Arbúcies neix al massís del Montseny, dins el terme municipal d'Arbúcies, i ocupa una superfície total de 99.89 hectàrees. Concretament, es troba localitzada entre el riu Tordera i la riera de la Pineda, creuant els bloc granítics del Montnegre (SW) i Blanes (NE) fins que s'incorpora al riu Tordera (Gran Enciclopèdia Catalana, 2017).

Aquesta riera es troba inclosa dins del Pla d'Espais d'Interès Natural (PEIN) (Generalitat de Catalunya, 2017). Destaca pel seu bon estat de conservació general, tant del curs fluvial com de la vegetació de ribera, que la converteixen en un punt d'especial interès per a la fauna. A més, és considerada un dels sistemes humits d'aigües corrents i estancades faunísticament més ric i divers del conjunt Montseny-Montnegre (Boada, Mayo, Maneja Zaragoza, & Institució Catalana d'Història Natural., 2008).

La següent imatge mostra la localització concreta dels dos punts de mostreig escollits a la riera d'Arbúcies (A_GF i A_F) (Fig. 3).



Figura 3. Imatge satèl·lit de la riera d'Arbúcies, els punts taronges marquen la posició concreta dels punts mostrejats (Punt 1: A_F; Punt 2: A_GF). Escala 1:1.000. Font: www.icc.cat/vissir3

Pel que fa a la riera de Gualba, neix també al cor del Parc Natural del Montseny, i està regularitzada per el Pantà de Santa Fe del Montseny (Gran Enciclopèdia Catalana, 2017). Alguns espais de la riera es troben sota la protecció del Pla d'Espais d'Interès Natural (Agència Catalana de l'Aigua, 2017) o bé estan catalogats com àrees d'interès faunístic o hàbitats d'interès comunitari. La *Figura 4* mostra els punts de mostreig a la riera de Gualba (G_mo, G_G i G_F).



Figura 4. Imatge satèl·lit de la localització dels punts de mostreig a la riera de Gualba (Punt 1: G_G; Punt 2: G_F; Punt 3: G_mo). Escala 1:4.000. Font: www.icc.cat/vissir3

Els codis dels punts de mostreig s'han definit segons les diferències en la granulometria del sediment observades *in situ*. La *Taula 1* resumeix els codis dels 5 punts de mostreig escollits.

Taula 1. Resum dels punts de mostreig, segons la riera i el tipus de sediment.

Riera	Punt	Tipus de sediment
Arbúcies	A_F	Fi
	A_GF	Groller en superfície, Fi en profunditat
Gualba	G_MO	Fi amb força contingut de matèria orgànica
	G_F	Fi
	G_G	Groller

Abans d'anar al riu a mostrejar es va seleccionar un dia el qual el temps anterior a aquest dia hagués estat sense precipitacions, i el riu presentés un cabal basal on s'assegurés un flux d'aigua constant sense avingudes. D'aquesta manera es va assegurar la presència del biofilm, i l'obtenció de mostres representatives.



Figura 5. Un dels punts de mostreig a Gualba. Font: imatge pròpia

PRESA I CONSERVACIÓ DE LES MOSTRES

Aquest treball es basa en un únic mostreig realitzat el dia 18 de novembre, en època de cabal basal en els punts d'estudi descrits anteriorment (*Fig. 3 i 4*). El procediment descrit a continuació es va realitzar seguint la mateixa metodologia en cada punt mostrejat. En total es varen obtenir 30 mostres, resultants del mostreig de sediment superficial i profund en els 5 punts d'estudi seleccionats i realitzant 3 rèpliques per mostreig.



Figura 6. Extracció de la mostra utilitzant el mostrejador de sediment. Font: imatge pròpia

Primerament, es varen analitzar els paràmetres fisicoquímics de l'aigua superficial en les dues zones d'estudi de la riera de Gualba i la riera d'Arbúcies. Es varen fer mesures de pH, O₂, conductivitat i temperatura mitjançant les sondes de camp corresponents (Multisonda HQd Field Case, HACH).

A continuació, mitjançant el mostrejador de sediment (*Sediment core sampler type Beeker Eijkelkamp*) es van extreure tres rèpliques de sediment (20 cm de fondària) per cada punt (*Fig. 6*). Durant l'extracció es va tenir cura d'evitar que l'aigua no es barrejés amb el sediment.

De tot el *core* extret (Fig. 7), es varen dipositar en pots de plàstic (prèviament retolats) els primers 5 cm de sediment (corresponent a la superfície) i els últims 5 cm de sediment (corresponent a la fondària). Els pots de plàstic s'emmagatzemaven dins d'una nevera amb gel, per tal d'optimitzar la conservació de les mostres fins arribar al laboratori.



Figura 7. Core extret de la riera d'Arbúcies. Font: imatge pròpia

Cal esmentar que en un dels punts de la riera de Gualba (G_G) el sediment era groller, de manera que l'extracció amb el mostrejador de sediment es feia difícil. És per aquest motiu que es varen extreure 10 cm mitjançant un mostrejador de sediment, construït amb un tub de metacrilat i un tap de goma per fer el buit i facilitar l'extracció del sediment.

Un cop recollides les mostres, es varen preparar per mantenir-les òptimes fins a ser analitzades. Cada paràmetre necessita una conservació diferent, de manera que un cop al laboratori es varen etiquetar 150 vials (60 de vidre i 90 de plàstic), i es va col·locar 1 ml de sediment al vial corresponent.

El sediment utilitzat per a l'anàlisi d'EPS i per l'anàlisi de matèria orgànica es varen dipositar en vials de plàstic i es varen congelar, mentre que el sediment utilitzat per l'anàlisi de la densitat de bacteris i la clorofil·la es varen col·locar en vials de vidre. En el cas de les mostres per a l'anàlisi de la densitat de bacteris, els vials havien estat autoclavats durant 20 min a 121°C, i es varen manipular amb pinces esterilitzades amb etanol. En el sediment per a l'anàlisi de la densitat de bacteris s'hi va afegir 10 ml d'una solució de despreniment preparada, anomenada a partir d'ara *detaching solution* (Perujo et al. (2016) adaptació de Amalfitano et al. (2009)) i es va guardar a la nevera, mentre que el sediment per a l'anàlisi de la clorofil·la es va tapar amb paper d'alumini (per evitar la degradació de la clorofil·la) i es va congelar. Una part del sediment sobrant es va guardar en vials de plàstic i es va congelar per si durant les anàlisis es requeria més mostra. Amb la resta de sediment sobrant es van ajuntar les rèpliques dels mateixos punts i es va deixar assecar a l'estufa (50°C) per al posterior anàlisi granulomètric.

Complementàriament, es varen recollir mostres d'aigua per analitzar la concentració de nutrients a cada punt. Un cop al laboratori, es varen filtrar amb filtres de Nylon de 0.2µm i es varen congelar en tubs Falcon de 50 ml fins al moment de fer l'anàlisi.

ANÀLISI DE NUTRIENTS

Per conèixer la concentració de nutrients a l'aigua, es va realitzar una cromatografia d'intercanvi iònic a partir de les mostres d'aigua congelada (es varen descongelar abans d'analitzar). Per a la cromatografia iònica es va utilitzar una columna per anions (METROSEP A SUPP5), amb un eluent a base de carbonat.

Es varen utilitzar 5 solucions mare amb els ions PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , NO_3^- , NO_2^- i Cl^- , i es varen preparar les solucions patrons per a les concentracions de 100 ppb, 500 ppb, 1 ppm, 2 ppm, 10 ppm i el blanc (0 ppm).

Abans de llegir les mostres es va fer córrer una mica d'eluent pel sistema per eliminar restes de la solució de neteja. Es va col·locar la columna i el sistema supressor, es va purgar el sistema, i es va mesurar el *baseline* durant aproximadament una hora fins que el sistema es va estabilitzar. Es va carregar el carro amb les mostres i la patrò preparada.

Un cop es varen llegir totes les mostres, es va anotar el valor de *height* i *area* de cada component per cada mostra. Es va buidar el pot de residus i es va netejar el sistema.

Els valors de *height* indiquen l'alçada dels pics per a cada ió, mentre que els valors d'*area* indiquen la superfície que representa el pic de cada ió.

ANÀLISI GRANULOMÈTRIC

Per l'anàlisi granulomètric del sediment es va ajuntar el sediment sobrant de les rèpliques de cada punt (incloent fondària i superfície) excepte pel punt A_GF. En aquest punt es va diferenciar l'anàlisi granulomètric pel sediment superficial i el profund, ja que es va observar que el sediment de les capes superiors era notablement diferent al de les capes inferiors.

Es va repetir la mateixa metodologia per a cada mostra recollida. Es va utilitzar un joc de cinc tamisos amb malles de diferents grandàries. Les malles tenien passos de llum de 0.075, 0.25, 0.9, 2 i 4.75 mm (*Fig. 8*). Es va netejar un recipient de plàstic que recollís el sediment, i es varen col·locar els tamisos sobre aquesta base en ordre progressiu de malla (el tamís amb el pas de llum més gran es va col·locar a dalt).



Figura 8. Alguns dels tamisos utilitzats amb el sediment retingut. Font: imatge pròpia

Primerament es va pesar el sediment ja sec, es va abocar en el joc de tamisos, i es va sacsejar durant uns minuts fins que no s'observaven diferències en el sediment retingut a cada tamís.

Finalment, es va pesar la quantitat de sediment que va quedar retinguda en cada tamís i es va anotar, per així calcular el percentatge de partícules retingudes als sedassos respecte del pes total de la mostra inicial. A partir d'aquest resultat es va calcular el percentatge de pes acumulat, que es va representar respecte la mida de les partícules mitjançant un gràfic logarítmic.

S'utilitzarà l'escala Udden-Wentworth (*Taula 2*) per classificar el sediment segons la mida de les partícules (Wentworth, 1922).

Taula 2. Adaptació de l'escala de Wentworth on es classifica el sediment segons la mida de la partícula (mm). Extret de (TSI Aquatic Module 1 Physical, 2017)

Category	Type	Grain diameter (mm)
Boulder	Boulders	250–100
Gravel	Cobbles	65–250
	Pebbles	4–65
	Granules	2–4
Sand	Very coarse sand	1–2
	Coarse sand	0.5–1
	Medium sand	0.25–0.5
	Fine sand	0.125–0.25
	Very fine sand	0.0625–0.125
Mud	Coarse silt	0.031–0.625
	Medium silt	0.0156–0.031
	Fine silt	0.0078–0.0156
	Very fine silt	0.0039–0.0078
	Clay	<0.0039
	Dust	<0.0005

MATÈRIA ORGÀNICA

Per analitzar la matèria orgànica del sediment, es varen recuperar les mostres congelades en vials de plàstic (Fig. 9), es varen deixar descongelar i assecat a l'estufa (50°C) fins que el pes sec s'estabilitzés, i es varen pesar a la balança amb l'ajuda d'un gresol de ceràmica i una espàtula. Abans de pesar la mostra amb el gresol, es va pesar el gresol per separat i es va anotar el pes.



Figura 9. Mostres extretes del congelador, a punt per ser pesades. Font: imatge pròpia

Un cop pesades totes les mostres, es varen posar a la mufla (550°C, 4 hores; Bourasa and Cattaneo, 1998), es varen deixar refredar i es varen tornar a pesar amb el gresol.

Així doncs, es va calcular el pes sec lliure de cendres (AFDW, “Ash free dry weight”) segons la fórmula:

$$AFDW = \frac{\text{pes abans mufla (g)} - \text{pes després mufla (g)}}{\text{pes abans mufla (g)} - \text{pes cassoleta (g)}} = \frac{gAFDW}{g \text{ pes sec}}$$

Per a interpretar els valors obtinguts, es valora que la matèria orgànica de les mostres s'ha volatilitzat, per tant, el resultat de la operació mostra una aproximació de la matèria orgànica present en cada mostra de sediment.

ANÀLISI DE CLOROFIL·LA

Per preparar les mostres, es varen descongelar i s'hi va afegir 10 ml d'acetona al 90% per extreure'n la clorofil·la. Es varen deixar reposar les mostres durant aproximadament 10 hores, a 4°C i protegides de la llum.

Passat aquest temps, es va sonicar (bany d'ultrasons Selecta) durant un minut, es va agitar amb el Vortex i es va sonicar un minut més. A continuació, mitjançant un matràs Kitasato assegurat amb una pinça a un embut de filtració connectat a una bomba de buit, es va filtrar al buit una mica d'acetona al 90% amb filtres GF/C de 1.2 µm, per netejar el filtre, i seguidament es va filtrar la mostra (Fig. 10). El filtrat de cada rèplica es recollia en un tub diferent.



Figura 10. Material utilitzat per a l'anàlisi de clorofil·la. Font: imatge pròpia

Un cop filtrat, es llegia l'absorbància a l'espectrofotòmetre *Shimadzu UV-1800* a les longituds d'ona de 430 nm, 665 nm i 750 nm amb cubeta curta (1 cm de pas de llum). Abans de llegir les absorbàncies de les mostres filtrades es va fer un *Base Correction* amb acetona al 90% a les dues cubetes.

Per conèixer l'estat de conservació de la clorofil·la es va calcular l'Índex de Margalef a partir del quocient entre els pics d'absorbància a 430 nm i els valors d'absorbància a 665 nm. Aquest índex reflexa la composició relativa en l'espectre d'absorbància (Margalef, 1983). Valors superiors a 2 indica que s'ha donat una degradació de la clorofil·la, i valors inferiors a 2 mostren que la clorofil·la es troba en bon estat.

A partir dels valors obtinguts s'ha fet el càlcul de la concentració de clorofil·la segons la fórmula següent:

$$Chl - a = \frac{(11.4 * (Abs665 - Abs750) * V)}{L * pes\ sec} = \mu g\ Chl/g\ pes\ sec$$

On V és el volum d'acetona afegit (ml), L és la longitud de la cubeta (cm). El resultat obtingut es va dividir pel pes sec de cada mostra (en grams) obtenint la concentració de clorofil·la (µg de clorofil·la/g de pes sec), i es transformava en biomassa algal segons el factor 1g Chl = 60 g C algal.

DENSITAT DE BACTERIS

Per analitzar la densitat de bacteris és important utilitzar el màxim de material possible auto clavat, el major nombre de material esterilitzat proporcionarà uns resultats més fiables.

El mètode utilitzat per a la determinació de la densitat de bacteris del sediment es basa en el descrit a (Perujo et al., 2016), adaptació de (Amalfitano et al. 2009). Abans de començar a tractar les mostres es va preparar el *detaching solution*, que s'afegiria per facilitar la disgregació dels bacteris en el sediment. Per preparar-la es va barrejar en 1 litre d'aigua MilliQ els següents reactius seguint l'ordre descrit: 7.54 g de NaCl, 0.99 g de Na₂HPO₄, 0.36 g de NaH₂PO₄, 50 ml de formaldehid al 37%, 1 g de pirofosfat sòdic i 5 ml de tween 20. Es va enrasar amb aigua MilliQ.

Abans de preparar la mostra per analitzar-la es va procedir a disgregar-la i purificar-la. Així doncs per disgregar els bacteris del sediment, es van recuperar les mostres guardades a la nevera amb els 10 ml de *detaching solution* i es varen agitar amb el vòrtex uns 10 segons. Seguidament es varen col·locar en un recipient tapades amb paper d'alumini, i es varen deixar durant 30 minuts a 200 rpm a temperatura ambient (Fig. 11). Un cop agitada, es varen deixar refredar a 4°C durant 10 min a la nevera i es varen sonicar amb gel en 2 cicles d'un minut (és important treballar en fred per evitar que les cèl·lules es trenquin). Altre cop, es varen agitar amb vòrtex durant 15 segons, i es varen deixar sedimentar durant 2 minuts. Finalment, es va extreure 1 ml del sobrenedant i es va dipositar en Eppendorfs estèrils de 2 ml prèviament etiquetats.



Figura 11. Mostres preparades per començar el procés d'agitació

Es va continuar amb el procés de purificació. Primer es va agitar amb el vòrtex i mitjançant una agulla es va afegir 1 ml de Nycodenz al fons de l'Eppendorf. Seguidament es va centrifugar 14.000 rpm durant 90 minuts a 4°C (es va tenir cura de col·locar els Eppendorfs de forma equilibrada). Es van extreure 2 ml de sobrenedant i es van dipositar en Eppendorfs de 2 ml estèrils, per agafar només medi líquid. La Figura 12 mostra la diferència entre el medi líquid i el *pellet* format després de la centrifugació. Finalment, tot el sobrenedant recollit es va agitar amb el vòrtex per homogeneïtzar les dues capes que es formaven en el sobrenedant després de centrifugar.

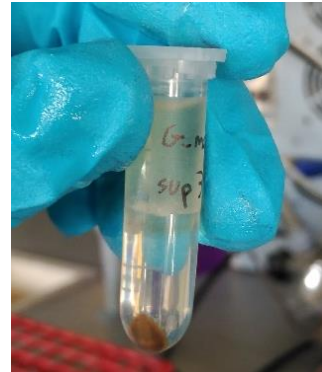


Figura 12. Eppendorf extret de la centrifuga, es mostra el *pellet* resultant. Font: imatge pròpia

Es va diluir 1 ml de l'extracte amb 9 ml d'aigua sintetitzada al laboratori a partir d'aigua destil·lada, ja que anteriorment s'havia comprovat que la mostra sense diluir presentava una densitat de bacteris superior al rang de la mostra patró interna. Es va agitar la dilució amb el vòrtex, i es van pipetejar 400 µl que es varen dipositar en un tub de citòmetre. Arribat a aquest punt, es va procedir a tintar i preparar la mostra per fer la lectura amb el citòmetre de flux. Es varen afegir 4 µl de SYTO 13 (FISHER, 5 µM) per tenyir el DNA de les cèl·lules, i es va incubar a les fosques durant 20 minuts aproximadament. Paral·lelament, es va preparar la solució de *beads*, que es va sonicar durant 2 minuts i es va agitar amb el vòrtex. Es varen afegir 10 µl (solució 10⁶ *beads*/ml, FISHER, 1.0 µm) a les mostres dipositades als tubs de citòmetre, i es va procedir a fer la lectura amb el citòmetre (FACSCalibur, Becton-Dickinson).

Es varen anotar els valors d'*events* (R2) i *beads* (R1). Els valors d'*events* (R2) són representatiu del nombre de bacteris de la mostra, i el valor de *beads* (R1) mostra el nombre de *beads* detectats pel citòmetre i són utilitzats com a referència interna.

Ambdós valors s'utilitzen per calcular la concentració de bacteris de la mostra en relació al pes sec segons la fórmula següent:

$$\frac{\text{bacteris}}{\text{pes sec (g)}} = \frac{R2 \cdot \frac{\text{concentració beads}}{\text{volum beads (mL)}} \cdot \text{volum beads afegit (mL)}}{R1 \cdot \text{volum de mostra (mL)} \cdot \frac{\text{g pes sec}}{\text{mL detaching solution}}} \cdot \text{factor de dilució}$$

A partir de la concentració de bacteris per pes sec (g) s'han calculat els µg de carboni en relació al pes sec (g) a partir de la fórmula següent.

$$\frac{\mu\text{gC}}{\text{pes sec (g)}} = \frac{\text{cèl. bacteris}}{\text{pes sec(g)}} \cdot \frac{0.1 \mu\text{m}^3}{1 \text{cèl. bacteri}} \cdot \frac{1 \text{cm}^3}{10^{12} \mu\text{m}^3} \cdot \frac{0.22 \text{gC}}{1 \text{cm}^3} \cdot \frac{10^6 \mu\text{gC}}{1 \text{gC}}$$

S'ha transformat la biomassa bacteriana a micrograms de carboni a partir de la relació 0.22 gC/cm³ (Bratbak & Dundas, 1984), i considerant que una cèl·lula bacteriana ocupa 0.1 µm³ (Theil-Nielsen, 1998).

EPS (“EXTRACELLULAR POLYMERIC SUBSTANCES”)

L'anàlisi de l'EPS permet determinar el contingut de polisacàrids de la matriu polimèrica extracel·lular que embolcalla les cèl·lules del biofilm microbià. Per facilitar l'extracció d'EPS de les mostres, es va utilitzar una resina d'intercanvi catiònic (CER) que va se condicionada durant la setmana anterior a l'anàlisi d'EPS (Romaní et al., 2008).

Així doncs, per al condicionament es varen omplir flascons de vidre de 300 ml amb 20 g de CER, s'hi va afegir 200 ml d'aigua MilliQ, i es va deixar tota la nit a temperatura ambient. Al matí següent es va canviar l'aigua MilliQ per 200 ml de HCl (4M), es varen agitar els flascons suaument i es varen incubar una hora amb agitació suau (150 rpm) a temperatura ambient. A continuació, es va rentar la resina amb aigua MilliQ cinc vegades, i es va incubar la resina en 200 ml de NaOH (1M) durant 4 hores (Fig. 13). Finalment, la resina es va rentar amb aigua MilliQ fins a arribar a un pH neutre. Aquest procediment es va repetir fins a 3 vegades més. L'última repetició, a diferència de les altres, es va guardar la resina en HCl (5M) amb 1 cm mínim de sobrenedant que cobrés la CER.

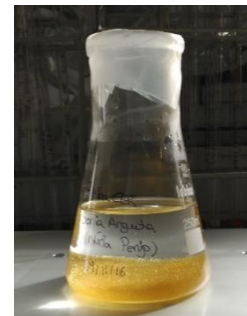


Figura 13. Erlenmeyer amb resina. Font: imatge pròpia

Abans de començar amb l'extracció de l'EPS es va neutralitzar el pH de la resina, es varen descongelar les mostres de sediment guardades, i es varen dipositar en Eppendorfs de 2 ml, amb 1 ml d'aigua MilliQ i 0.3 g de resina catiònica (seguint aquest ordre). A continuació, es va incubar en gel durant una hora i en agitació a 200 rpm, es varen centrifugar els Eppendorfs a 11000 rpm durant 15 minuts a 4°C, i es van pipetejar 500 µl del sobrenedant que es varen col·locar en tubs de vidre per practicar l'assaig Phenol/H₂SO₄ (Dubois et al. 1956) a sota la campana. Aquest assaig extreu l'EPS de les mostres, i l'extracte es digereix per a analitzar-ne la glucosa. Les mostres donen una coloració que es llegeix a l'espectrofotòmetre.

A partir d'una solució *stock* de glucosa 10.000 µM, en un matràs aforat de 100 ml, amb 0.18 g de glucosa i enrasant amb aigua MilliQ, es varen preparar solucions intermitges de 1.000, 100 i 10 µM. Mitjançant les quals es varen preparar les concentracions de 5, 10, 15, 20, i 50 µmol/L.

Així doncs, es varen necessitar fins a set tubs de 15 ml (Falcon) per preparar la recta patró. Cada tub estava etiquetat amb les solucions que finalment es llegiria: 0 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 50 µM i 100 µM; preparades a partir de les solucions *stock*. Per acabar, es van pipetejar 500 µl de cada concentració de la patró en tubs de vidre per realitzar l'assaig Phenol/H₂SO₄ (Dubois et al. 1956) de la mateixa manera que amb les mostres.

Per a l'assaig Phenol/H₂SO₄, es van afegir 12.5µl de la solució fenol als 500 µl de l'extracte i es va barrejar curosament, després es va afegir 1.25 ml d'àcid sulfúric concentrat amb l'ajuda d'una pipeta graduada. Es va procurar que el volum d'àcid caigués directament en el centre de l'extracte en un sol moviment, d'aquesta manera s'assegurava la barreja total de la solució amb l'àcid sulfúric. Es varen tapar els tubs i es varen deixar reposar durant 10 minuts perquè es refredessin. Seguidament, es varen barrejar cautelosament i es varen incubar a 30°C durant 20 minuts en un bany d'aigua.

Finalment, es va mesurar l'absorbància a 485nm amb una cubeta de vidre de quars curta reduïda. Primer es varen llegir les mostres de la patró, i a continuació les mostres del sediment. El blanc a l'espectrofotòmetre es va fer amb aigua MilliQ. Un cop obtingudes les absorbàncies es va calcular la recta patró, per així poder trobar la concentració de glucosa per a cada mostra en µM. A partir de la concentració de glucosa es va calcular la concentració d'EPS (µg glucosa/g pes sec), segons la fórmula:

$$EPS = \frac{\mu\text{mol glucosa}}{1L} \cdot \frac{180 \mu\text{g glucosa}}{1 \mu\text{mol glucosa}} \cdot \frac{1L}{1000 mL} \cdot \frac{1 mL \text{ MilliQ}}{g \text{ pes sec}} = \frac{\mu\text{g glucosa}}{g \text{ pes sec}}$$

A partir del contingut d'EPS en µg glucosa/g pes sec, s'ha estimat el contingut d'EPS en unitats de Carboni, segons la fórmula següent:

$$\frac{\mu\text{g glucosa}}{g \text{ pes sec}} = \frac{1 \mu\text{mol glucosa}}{180 \mu\text{g glucosa}} \cdot \frac{6 \mu\text{mol C}}{1 \mu\text{mol glucosa}} \cdot \frac{12 \mu\text{g C}}{1 \mu\text{mol C}} = \frac{\mu\text{g C}}{g \text{ pes sec}}$$

On es relaciona estequiomètricament la glucosa i el carboni. Sabent que la molècula de la glucosa és C₆H₁₂O₆, 180 g/mol glucosa contenen 6 mol de carboni de massa atòmica 12 u.

ANÀLISI DE DADES

S'ha organitzat l'anàlisi de dades segons l'anàlisi dels paràmetres generals de les condicions en els diferents punts i tipus de sediment que inclou els anàlisi de nutrients, granulometria i matèria orgànica, i l'anàlisi dels paràmetres de l'estructura del biofilm que inclou els anàlisis de clorofil·la, biomassa de bacteris i concentració d'EPS.

Per a l'anàlisi de nutrients s'han dibuixat dues rectes patró a partir dels temps de retenció en els valors de *height* i *area* dels cromatogrames per seleccionar la recta que presentés una major qualitat del model (R^2 propera a 1). Un cop decidit, s'han calculat les concentracions (ppm) dels ions per cada punt, i s'han calculat les mitjanes i desviacions estàndard que s'han resumit en una taula (*Taula 4*). Les dades s'han tractat mitjançant una ANOVA d'un sol factor (punt de mostreig), i s'ha realitzat el test de Tukey ($p < 0.1$) per comprovar les diferències entre punts. A l'anàlisi granulomètric s'ha calculat el percentatge de pes que ha passat en cada tamís (% que passa) per cada punt i s'ha representat mitjançant una corba granulomètrica (Escuela de Ingeniería en Construcción, 2017).

Per l'anàlisi de matèria orgànica s'ha aplicat el mateix anàlisi de dades que a l'anàlisi de clorofil·la, biomassa de bacteris i concentració d'EPS detallat a continuació. Primerament, s'han detectat els *outliers* per tal de descartar els valors fora de rang. S'ha definit el valor límit superior com la suma entre el 3r quartil i 1.5 vegades el rang interquartílic, i el límit inferior com la resta entre el 1r quartil i 1.5 vegades el rang interquartílic; així doncs, els valors que es troben fora d'aquests límits s'han descartat a l'hora de fer les mitjanes i les desviacions estàndards.

Per a les variables de matèria orgànica, clorofil·la, densitat de bacteris i EPS s'han calculat les mitjanes i desviacions estàndard dels valors de g mat. orgànica/g pes sec, $\mu\text{g Chl-a/g pes sec}$, cèl·lules de bacteris/g pes sec i $\mu\text{g glucosa/g pes sec}$ i s'han representat mitjançant gràfics de barres i barres d'error utilitzant el programa Microsoft Excel 2016. El contingut de carboni de biomassa algal, bacteriana i EPS al biofilm s'ha representat en dos gràfics de barres. S'ha separat la clorofil·la de les altres dues variables, ja que la biomassa de carboni de la clorofil·la era molt superior a les altres. A més, s'ha calculat una *ratio* en unitats de carboni entre la biomassa de bacteris i el contingut d'EPS.

En l'anàlisi de clorofil·la s'ha calculat l'Índex de Margalef tal i com s'ha detallat anteriorment, i s'ha aplicat un tractament estadístic de les dades igual que en els paràmetres de l'estructura del biofilm.

S'han tractat les dades amb tres anàlisis estadístics, una ANOVA bifactorial tipus II considerant els factors punt de mostreig i profunditat i la seva interacció, una ANOVA unifactorial tipus III considerant el factor granulometria. També s'ha realitzat una ANOVA unifactorial independent per a cada profunditat (superior i inferior), on s'ha aplicat el test de Tukey ($p\text{-valor} < 0.1$) per als factors punt de mostreig. El programari utilitzat per l'anàlisi estadístic dels resultats ha estat l'R comander. Cal fer esment que s'han comprovat els supòsits de normalitat i homoscedasticitat abans d'aplicar-hi estadística paramètrica. Aquells paràmetres que no complien algun d'ambdós supòsits se'ls hi ha fet una transformació logarítmica de la variable per aconseguir major simetria de les dades.

Finalment, s'han dibuixat dues matrius de correlació entre els components de l'estructura dels biofilms (clorofil·la, biomassa de bacteris, concentració d'EPS i matèria orgànica), diferenciant el sediment en superfície i en profunditat.

RESULTATS

ANÀLISIS FÍSICOQUÍMIQUES

Els resultats obtinguts de les anàlisis fisicoquímiques de les dues rieres analitzades (Arbúcies i Gualba) es mostren a la *Taula 3*. Aquestes anàlisis s'han utilitzat per comprovar que les dues rieres es troben en condicions ambientals similars. Les característiques fisicoquímiques de les aigües superficials mostren valors similars entre les rieres. Sobretot pel que fa a la temperatura i l'oxigen dissolt, en canvi, la conductivitat i el pH és lleugerament superior a la riera d'Arbúcies.

Taula 3. Resultats obtinguts de les anàlisis fisicoquímiques en un punt de les rieres d'Arbúcies i Gualba.

Paràmetres	Arbúcies	Gualba
Oxigen dissolt (mg/L;%sat)	11.13; 100.7	10.10; 97.7
Temperatura (°C)	10.7	10
Conductivitat(μS/cm)	329	208.8
pH	8.3	7.44

D'altra banda, els nutrients presents a l'aigua analitzats mitjançant la cromatografia d'intercanvi iònic, s'han calculat a partir del temps de retenció en els valors de *height*, ja que presenten una correlació més bona que els valors d'*area* (els coeficients de determinació (R^2) són de major qualitat en els *height* que no pas en l'*area*). Les concentracions dels ions s'han determinat utilitzant les rectes patró que es mostren a la *Figura 14*.

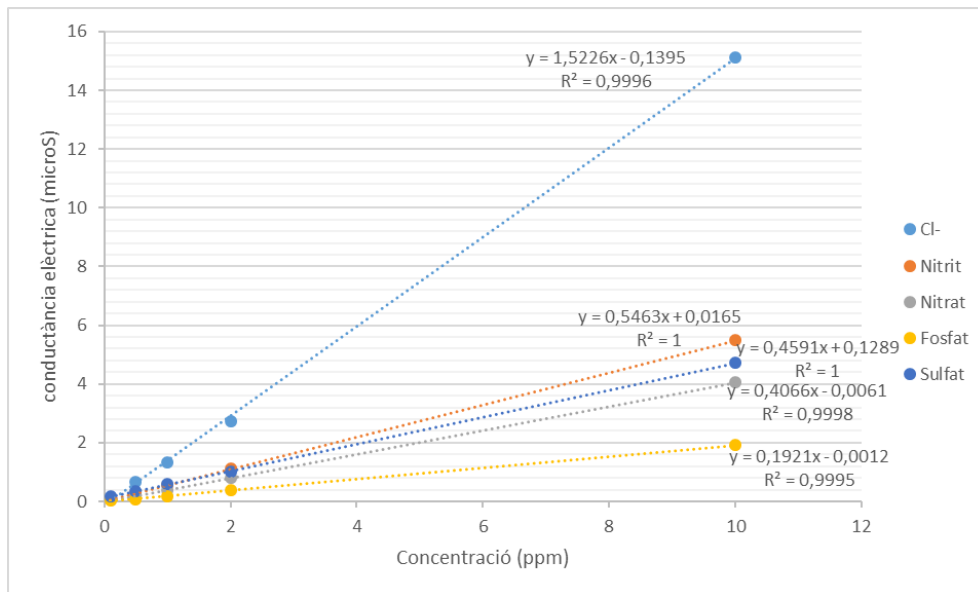


Figura 14. Rectes patró amb els coeficients de determinació per a cadascun dels anions llegits en el cromatògraf. Valors de R propers a 1 mostren una major qualitat del model.

El cromatògraf va dibuixar un cromatograma per cada mostra analitzada, segons el temps de retenció de cada ió. A la *Figura 15* es mostra un dels cromatogrames obtinguts, en aquest cas, el de la recta patró, on es poden observar clarament els pics de cada ió.

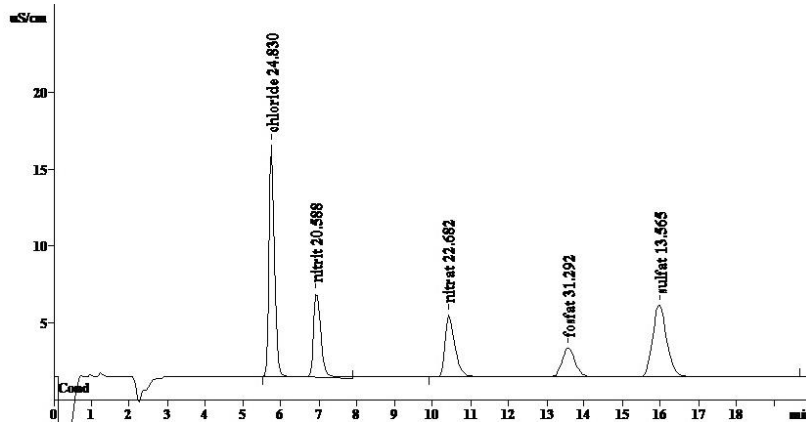


Figura 15. Cromatograma de la recta patró de les concentracions de nutrients.

Les mitjanes i desviacions estàndards de les concentracions dels anions, de cada punt de mostreig, es troben a la *Taula 4*. L'anàlisi ANOVA per el factor Punt (*Taula 4*) mostra diferències significatives entre els punts de mostreig en les concentracions de clorurs, nitrats i sulfats ($p < 0.05$). Els ions clorur i sulfat presenten concentracions superiors en els punts d'Arbúcies respecte els punts de Gualba, mentre que l'ió nitrat diferencia el punt G_F de la resta, sent aquest inferior als altres.

Taula 4. Conjunt de mitjanes i desviacions estàndard de les concentracions de nutrients (ppm) obtingudes en l'anàlisi de l'aigua. Els resultats del test de Tukey es mostren en els superíndexs, els grups es diferencien amb lletres. Significació del test de Tukey < 0.1 .

Punt de mostreig	Concentració (ppm)				
	Cl-	Nitrit	Nitrat	Fosfat	Sulfat
A_GF	26±1 ^a	0.23±0.03 ^a	5.3±0.2 ^a	0.39±0.02 ^a	51±1 ^a
A_F	25±1 ^a	0.33±0.09 ^a	5.4±0.4 ^a	0.41±0.06 ^a	51±4 ^a
G_MO	18±2 ^b	0.3±0.2 ^a	5.1±0.2 ^a	0.42±0.06 ^a	23.5±0.9 ^b
G_G	15.8±0.4 ^b	0.3±0.2 ^a	5.2±0.1 ^a	0.5±0.1 ^a	22.8±0.3 ^b
G_F	13±3 ^b	0.13±0.01 ^a	3.9±0.9 ^b	0.2±0.1 ^a	20±4 ^b

Així doncs, l'anàlisi de l'aigua presenta diferències entre la riera de Gualba i Arbúcies, tenint la riera d'Arbúcies concentracions superiors d'ions clorurs i sulfat.

ANÀLISI DEL SEDIMENT

GRANULOMETRIA

Els pesos obtinguts en l'anàlisi granulomètric, s'han utilitzat per representar la corba granulomètrica a partir dels percentatge de partícules que ha passat cada tamís. D'aquesta manera s'ha definit el tipus de sediment de cada punt, segons si es tracta de grava, sorres o llims. A la *Figura 16* es mostren els resultats de la granulometria practicada a les mostres de cada punt.

Cal fer esment que en el punt A_GF es varen tamisar mostres de diferents profunditats, ja que en el mostreig de camp es varen observar diferències entre la granulometria del sediment de la zona superior vers el sediment més profund.

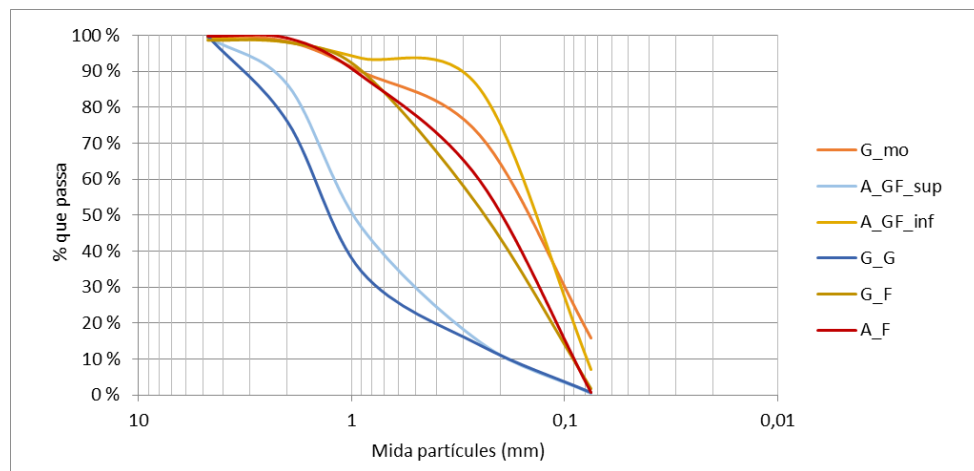


Figura 16. Corba granulomètrica dels sediments extrets a cada punt de mostreig. Es representa el percentatge de sediment que passa respecte la mida de les partícules.

Del total de punts mostrejats es diferencien dues tendències clares corresponents a sediments fins (línies grogues i vermelles) i sediments grollers (línies blaves). Les línies grogues i vermelles presenten una major proporció de partícules fines, mentre que la resta de punts es classificarien com a sorra molt gruixuda amb un elevat percentatge de retenció de partícules de major mida.

Les diferències observades al camp en el punt A_GF es confirmen amb les corbes que representen les dues profunditats d'aquest punt a la *Figura 16*, ja que la capa superficial visualitzada com a més grollera es classifica com a sorra molt gruixuda, mentre que la capa inferior vista més fina es classifica com a sorra fina.

CONTINGUT DE MATÈRIA ORGÀNICA

Els resultats del contingut de matèria orgànica del sediment es representen a la *Figura 17*.

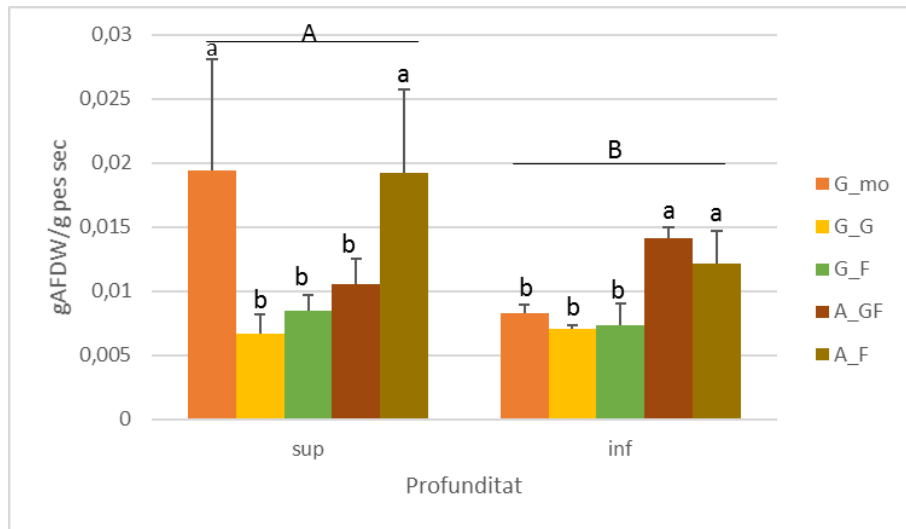


Figura 17. Gràfic de barres representatiu de les mitjanes de g AFDW/g pes sec en superfície i en profunditat (sup = superior; inf=inferior). Es mostren les desviacions estàndard amb barres d'error, el resultat de l'ANOVA (factor profunditat) i el test de Tukey per al factor punt dins de cada profunditat per separat. Els grups significativament diferents s'han representat mitjançant lletres.

En general les capes superiors tenen una acumulació de matèria orgànica superior que les capes inferiors (ANOVA, $p < 0.05$, *Taula 6*), però aquestes diferències depenen del punt (interacció Punt:Profunditat, *Taula 5*). D'altra banda, es presenten diferències entre punts dins de les dues profunditats (ANOVA, $p < 0.05$, *Taula 5*). Els sediments de mida més fina presenten valors més elevats de matèria orgànica (*Taula 5*, factor granulometria).

Taula 5. Resultats p-valor obtinguts de l'anàlisi de mitjanes ANOVA bifactorial entre els factors punt i profunditat, i ANOVA type III pel factor granulometria, per als paràmetres analitzats al laboratori. Amb negreta es mostren els valors significatius (p-valor < 0.05). Programari utilitzat: Rcmdr

	Matèria orgànica	Clorofil·la	Í. Margalef	Densitat de bacteris	EPS
Profunditat	0.034	0.004	0.097	0.007	0.020
Punt	0.001	0.007	0.355	4.892E-05	0.141
Punt:Profunditat	0.017	0.003	0.463	0.049	0.318
Granulometria	0.034	0.303	0.313	0.949	0.959

Taula 6. Resultats p-valor obtinguts de l'anàlisi estadístic ANOVA unifactorial per a cada profunditat per veure diferències entre punts per a cada una d'elles. Amb negreta es mostren els valors significatius (p-valor < 0.05). Programari utilitzat: Rcmdr

Profunditat	Matèria orgànica	Clorofil·la	Í. Margalef	Densitat de bacteris	EPS
superior	0.027	0.014	0.031	0.002	0.266
inferior	0.0003	0.064	0.442	1.06E-06	0.141

En definitiva, en l'anàlisi de la matèria orgànica s'observa una variació de la concentració de matèria orgànica segons la profunditat del sediment i la seva granulometria.

CONTINGUT DE CLOROFIL·LA

La *Figura 18* mostra les mitjanes i desviacions estàndard dels $\mu\text{g Chl/g}$ segons la profunditat, i per a cada punt de mostreig.

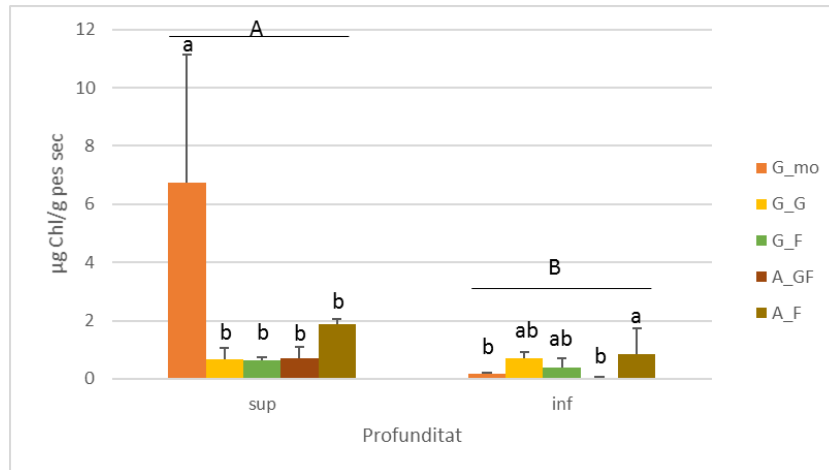


Figura 18. Gràfic de barres representatiu de les mitjanes de $\mu\text{g Chl/g pes sec}$ en superfície i en profunditat (*sup* = superior; *inf*=inferior). Es mostren les desviacions estàndard amb barres d'error, el resultat de l'ANOVA (factor profunditat) i el test de Tukey per al factor punt dins de cada profunditat per separat. Els grups significativament diferents s'han representat mitjançant lletres.

Els resultats de l'ANOVA bifactorial (*Taula 5*), confirmen diferències significatives entre els factors punt i profunditat i la seva interacció. De manera que, es pot afirmar que tant la profunditat del sediment com el punt de mostreig pot alterar el contingut de clorofil·la del biofilm. S'observen majors concentracions de clorofil·la en superfície que en profunditat, aquesta diferència és major al punt G_mo.

El test de Tukey mostra diferències entre punts dins de la profunditat superior i inferior. En profunditat no es presenten diferències significatives entre punts (ANOVA p-valor <0.05 , *Taula 6*), encara que el test Tukey diferencia alguns punts (*Figura 18*). Això és degut a que utilitzen diferents nivells de significança. En superfície, el punt G_mo presenta una concentració de clorofil·la molt més elevada que la resta de punts, mentre que en fondària el punt A_F és el que presenta major biomassa algal. No es veuen diferències entre sediments fins i grollers.

S'ha calculat l'Índex de Margalef (*Taula 7*), que indica de l'estat de la clorofil·la. Cal recordar que aquest índex és un quocient entre dues absorbències indicador de l'estat de la clorofil·la (mirar apartat Metodologia: Anàlisi de clorofil·la) però depèn de molts factors (com ara la composició de la comunitat algal), el això el fa poc precís. Tot i així, mostra una gran coherència amb la distribució d'alguns factors i les propietats de l'ecosistema (Margalef, 1983).

Alguns punts presenten valors superiors en profunditat mentre que d'altres presenten valors semblants a la superfície i en fondària (Taula 6). L'anàlisi estadístic per als resultats de l'Índex de Margalef sols ha mostrat diferències significatives entre les mostres recollides en superfície (ANOVA p-valor < 0.05, Taula 6). El test de Tukey determina que el punt G_mo presenta un índex major que els punts A_GF i A_F.

Taula 7. Resultats de l'Índex de Margalef per cada punt de mostreig i profunditat. Els superíndexs indiquen el resultat de Tukey per a les mostres de la superfície (factor: punt).

Punt	Profunditat	Índex de Margalef
G_mo	Sup	2.71 ^a
G_mo	Inf	2.66
G_G	Sup	2.59 ^{ab}
G_G	Inf	2.66
G_F	Sup	2.58 ^{ab}
G_F	Inf	3.00
A_GF	Sup	2.34 ^b
A_GF	Inf	2.22
A_F	Sup	2.32 ^b
A_F	Inf	2.82

DENSITAT DE BACTERIS

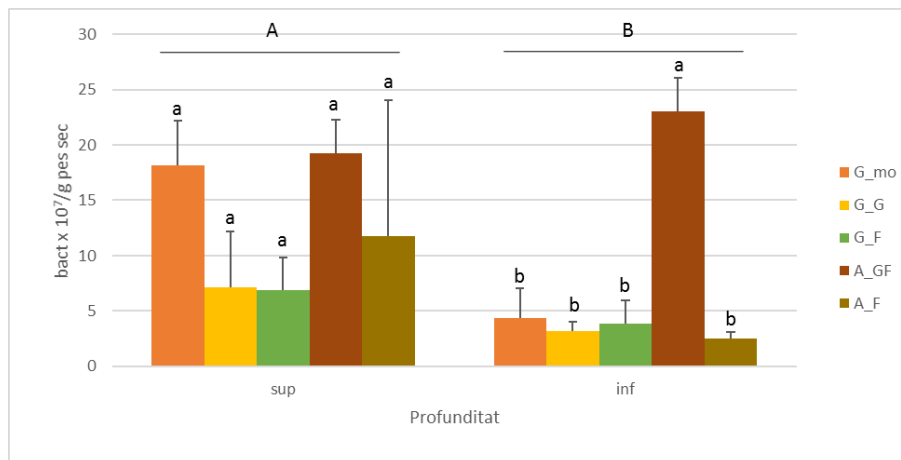


Figura 19. Gràfic de barres representatiu de les mitjanes de 10⁷ cèl·lules de bacteris/g pes sec en superfície i en profunditat (sup=superior; inf=inferior). Es mostren les desviacions estàndard amb barres d'error, el resultat de l'ANOVA (factor profunditat) i el test de Tukey per al factor punt dins de cada profunditat per separat. Els grups significativament diferents s'han representat mitjançant lletres.

Els resultats de la densitat de bacteris es representen a la Figura 19. L'anàlisi estadístic mostra diferències entre profunditats. El sediment de la zona superior presenta un nombre més elevat de cèl·lules bacterianes/g pes sec, i no mostra diferències entre punts. Mentre que el sediment de la zona inferior presenta un nombre de bacteris més baix en general, però es diferencia el punt A_GF amb un elevat nombre de bacteris. No hi ha diferències entre sediments fins i grollers (Taula 5).

CONTINGUT D'EPS

Els resultats de l'anàlisi de l'EPS es representen a la *Figura 20* amb unitats de μg glucosa/g pes sec.

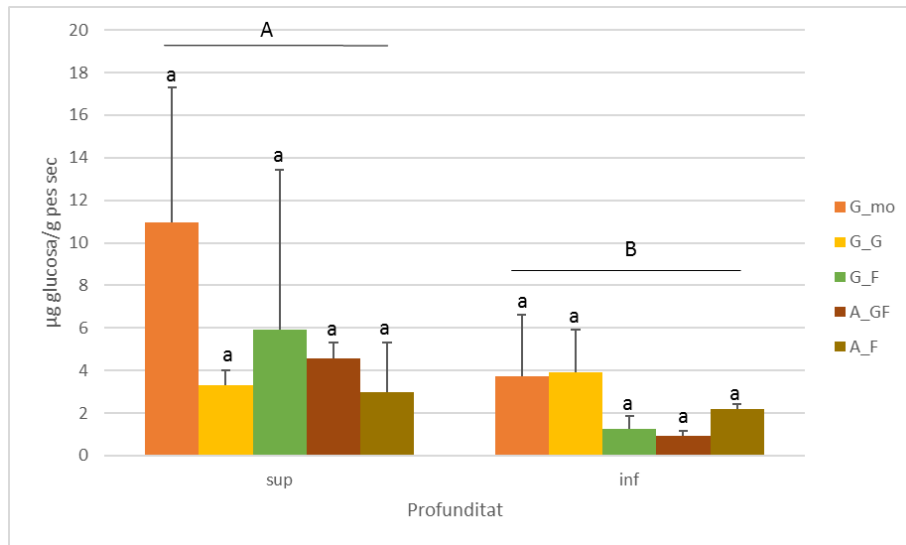


Figura 20. Gràfic de barres representatiu de les mitjanes de contingut d'EPS (en μg glucosa-equivalents/g pes sec) en superfície i en profunditat (sup = superior; inf=inferior). Es mostren les desviacions estàndard amb barres d'error, el resultat de l'ANOVA (factor profunditat) i el test de Tukey per al factor punt dins de cada profunditat per separat. Els grups significativament diferents s'han representat mitjançant lletres.

S'observen continguts d'EPS més alts a les capes superficials del sediment en comparació amb els resultats en fondària (ANOVA $p < 0.05$, *Taula 6*), mentre que no s'observen diferències significatives entre els punts de mostreig ni tampoc interacció entre punts i profunditat. No hi ha diferències significatives entre sediments fins i grollers (*Taula 5*).

S'han calculat les matrius de correlació entre les variables que componen el biofilm segons la profunditat del mostreig (*Taula 8*).

Taula 8. Matrius de correlació entre les variables que componen el biofilm, en superfície i en profunditat. Es diferencien els resultats de les mostres en superfície en verd, i els de les mostres en profunditat en taronja. Les correlacions significatives es troben marcades en negreta (p -valor < 0.1)

	Matèria orgànica	Clorofil·la	Densitat de bacteris	EPS	
Matèria orgànica	-	0.47	0.33	0.36	SUPERIOR
Clorofil·la	0.291	-	0.42	0.55	
Densitat de bacteris	0.655	-0.38	-	0.34	
EPS	-0.287	0.12	-0.35	-	
					INFERIOR

La matriu de correlació per al sediment en superfície presenta relacions positives entre la Clorofil·la i el contingut de matèria orgànica i EPS. En canvi, en profunditat s'observa una relació positiva entre la densitat de bacteris i la matèria orgànica.

CONTINGUT EN UNITATS DE CARBONI DE BIOMASSA ALGAL, BACTERIANA I EPS ALS DIFERENTS BIOFILMS DEL SEDIMENT

Les concentracions de carboni obtingudes mitjançant factors de conversió a partir dels resultats de les anàlisis de clorofil·la, densitat de bacteris i EPS s'han estimat per poder comparar el contingut de biomassa algal, bacteriana i d'EPS. Tot i així la comparació del carboni utilitzant els tres mètodes és força complexa, ja que en el cas de la clorofil·la, la biomassa algal conté una major proporció de carboni respecte les altres anàlisis.

S'han representat els resultats en dos gràfics de barres (*Figs 21 i 22*), on s'observa una major proporció de biomassa algal respecte la resta. Tot i així, també es mostra com la proporció de biomassa de bacteris i el contingut d'EPS varia en els diferents punts, ja que a la riera de Gualba és la concentració d'EPS més alta que la de densitat de bacteris, mentre que a la riera d'Arbúcies el contingut de bacteris és superior en el punt A_GF_inf, és inferior en el punt A_F_inf i s'igualen en el punt A_F_sup i A_GF_sup.

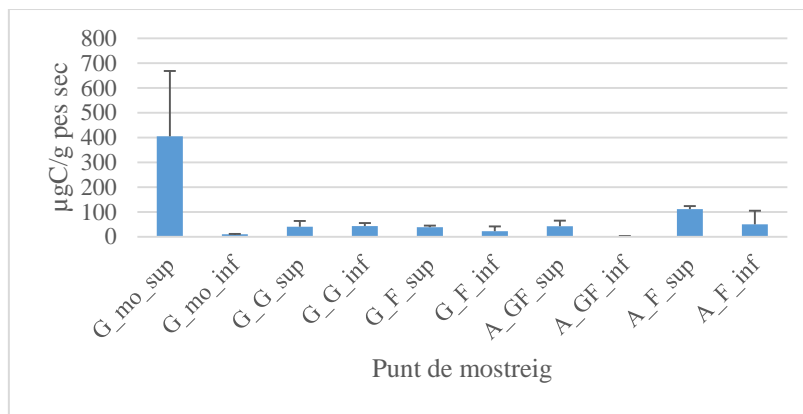


Figura 21. Gràfic de barres de les mitjanes de les concentracions de clorofil·la en µg C/g pes sec per cada punt de mostreig i profunditat (inferior i superior). La desviació estàndard es mostra amb les barres d'error.

Si es comparen les profunditats, també s'observa una alta variabilitat, en alguns paràmetres i punts els valors són superiors a la superfície, mentre que en altres són superiors en fondària o bé són iguals.

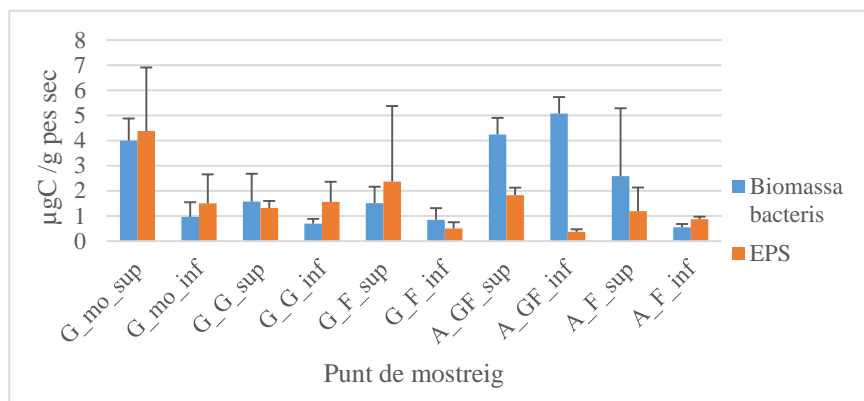


Figura 22. Gràfics de barres de les mitjanes de les concentracions de biomassa de bacteris i contingut d'EPS en µg C/g pes sec per cada punt de mostreig i profunditat (inferior i superior). La desviació estàndard es mostra amb les barres d'error.

A la *Taula 9* es mostren els resultats de la *ratio* entre el contingut de carboni de la biomassa de bacteris i el contingut de carboni de l'EPS ($\frac{\mu\text{g C bacteris}}{\mu\text{g C EPS}}$).

Taula 9. Resultats de les mitjanes i desviacions estàndard de les ratio entre la biomassa de carboni provinent de la densitat de bacteris i EPS, en funció dels punts de mostreig i les profunditats, per cada rèplica de cada punt de mostreig.

Punt de mostreig	Profunditat	
	sup	inf
G_mo	1.2 ± 0.6	0.8 ± 0.7
G_G	1.1 ± 0.5	0.5 ± 0.2
G_F	2 ± 1	3 ± 3
A_GF	2.4 ± 0.8	14 ± 1
A_F	3 ± 2	0.6 ± 0.1

La *ratio* entre la densitat de bacteris i EPS juntament amb el gràfic de barres (*Figura 22*), permet conèixer quina de les dues variables és present amb major proporció. En aquest cas, valors propers a 1 mostren proporcions similars de bacteris i EPS, mentre que valors superiors a 1 indiquen una major proporció de bacteris, i valors inferiors a 1 indiquen una major proporció de concentració d'EPS.

En superfície els valors de la *ratio* es troben pròxims a 1 o per sobre d'1 indicant major proporció de bacteris respecte EPS. En fondària, en canvi, a excepció dels punts G_F i A_GF la proporció d'EPS és major que la de bacteris.

DISCUSSIÓ

L'anàlisi dels paràmetres fisicoquímics permet afirmar que les dues rieres són similars pel que fa a les característiques fisicoquímiques, tot i que es diferencien en la composició iònica. La riera d'Arbúcies presenta concentracions més altes de clorurs i sulfats, possiblement degut a la proximitat del punt de mostreig a la desembocadura de la depuradora municipal (Agència Catalana de l'Aigua, 2017).

Tal i com s'esperava, els sediments de les dues rieres són de tipus sorrenc. Dins d'aquesta classificació s'han mostrat dues tendències clares, un grup amb major proporció de partícules de mida petita, i un segon grup amb major proporció de partícules grolleres. Així doncs, els resultats de l'anàlisi granulomètric han confirmat les observacions visuals de la mida de partícules de les mostres de sediment.

S'ha demostrat que el sediment de la capa superior presenta una estructura del biofilm diferent que el sediment de més profunditat. En superfície la concentració de matèria orgànica, la biomassa algal, la densitat de bacteris i el contingut d'EPS són superiors que en fondària. Aquestes diferències es relacionen probablement amb una baixa disponibilitat d'oxigen, baixa disponibilitat de material derivat de les algues (que és una font de matèria orgànica d'alta qualitat), i d'una acumulació de biomassa algal en descomposició en profunditat (Perujo et al., 2017; Romaní et al., 1998). Mentre que en superfície l'alta disponibilitat de nutrients gràcies al transport de l'aigua, i la presència d'algues actives que realitzen fotosíntesi degut a la major quantitat de llum i les majors concentracions de matèria orgànica (Romaní et al., 1998), permeten que hi hagi concentracions superiors de clorofil·la i densitat de bacteris.

En el cas de la clorofil·la, sorprèn que la major diferència sigui entre el punt G_{mo} respecte els altres. D'altra banda, l'índex de Margalef ha resultat ser més elevat a les capes inferiors en els punts G_F i A_F, possiblement degut a la presència de productes de la descomposició de la clorofil·la (Margalef, 1983).

De la mateixa manera, es considera que la biomassa bacteriana i la concentració d'EPS és major en superfície gràcies a la major concentració de matèria orgànica en superfície, ja que la matèria orgànica que es troba al sediment és una font de nutrients per a la colonització de bacteris (Bott & Kaplan, 1985). A més, tal i com s'ha dit anteriorment, la major radiació solar a la superfície permet una major activitat fotosintètica per part de les algues, que juntament amb els bacteris, contribueixen a la formació de la matriu EPS. S'ha vist que en superfície, les algues estableixen un rol més important que els bacteris en la formació de la matriu EPS, en canvi, en fondària la densitat de bacteris no es veu tant afectada per l'extinció de la llum en fondària, ja que són organismes heterotròfics capaços d'utilitzar matèria orgànica i productes excretats per les algues per viure (Siuda et al., 1991).

El punt A_GF presenta més densitat de bacteris i matèria orgànica en profunditat, degut a les diferències en la granulometria. A diferència dels altres punts de mostreig, aquest presenta sorres grolleres en superfície i sorres fines en profunditat. La major densitat de bacteris i matèria orgànica en profunditat podria venir donat pel fet que el sediment groller a la superfície permet una infiltració major de nutrients i matèria orgànica en profunditat els quals en arribar al sediment fi que es troba en profunditat queden atrapats (Perujo et al. 2017).

La matèria orgànica en superfície probablement és d'origen autòcton com a resultat dels processos fotosintètics dels organismes autotròfics (algues i cianobacteris, macròfits i molses), però també al·lòcton degut a la proximitat del bosc de ribera.

Pel que fa a la granulometria del sediment, sols s'ha mostrat relació amb la variació de l'estructura del biofilm en l'anàlisi de la matèria orgànica. S'ha comprovat que els components de l'estructura del biofilm (clorofil·la, densitat de bacteris i concentració d'EPS) no depenen de la granulometria del sediment, sinó dels factors profunditat i punt de mostreig. En sediments fins s'esperaria major colonització degut a concentracions més altes de matèria orgànica (Romani et al., 1998) i degut a major superfície. Per altra banda, altres estudis han vist que la concentració de matèria orgànica és més important que la mida de la partícula a l'hora de determinar la biomassa de bacteris (Bott & Kaplan, 1985).

Per a pròxims estudis sobre l'efecte de la mida del sediment en la composició del biofilm fluvial, es podria considerar un rang més ampli de granulometries i el mateix nombre de rèpliques segons cada mida de partícula. Podria ser que en aquest estudi només s'hagin vist diferències en l'estructura del biofilm en un paràmetre degut a que el rang de mides d'aquest estudi no és prou ampli.

Pel que fa a la biomassa de carboni, cal considerar que s'ha dut a terme una comparació entre paràmetres de diferent escala. La biomassa algal conté una major proporció de carboni respecte els altres components de l'estructura del biofilm. Els resultats de la *ratio* bacteris:EPS presenten una elevada variabilitat entre punts, profunditat i granulometria fet que no permet identificar una tendència clara.

S'esperava que existís relació entre els components de l'estructura dels biofilms. En superfície les relacions més fortes s'han trobat entre la clorofil·la i la concentració d'EPS i matèria orgànica, indicant la forta influència que tenen les algues en l'estructura del biofilm a la superfície. En canvi, en profunditat la relació més significativa es troba entre la concentració de matèria orgànica i la densitat de bacteris indicant la importància del component heterotròfic en fondària.

CRITÈRIS ÈTICS

Durant la pràctica d'aquest estudi s'han aplicat mesures sostenibles respectuoses amb el medi. Els residus generats al laboratori es varen dipositar en el corresponent cubell o bidó.

CONCLUSIONS

- Grain sizes of sediments were identified thanks to the grading curves. Collected sediments were classified as sands, four of them were classified as fine sands and the other two were classified as coarse sands.
- Analysis of organic matter, chlorophyll, bacterial density and EPS concentration showed differences between surface and subsurface samples. All the parameters had highest concentrations on surface sediments, probably due to the higher solar radiation and availability of nutrients and oxygen.
- The only parameter influenced by particle size was the concentration of organic matter. Settlement is expected to be higher in fine sediment due to higher accumulation of organic matter and higher surface on small particle sizing.
- The correlation matrix has shown a relation between the parameters of biofilm structure (algae biomass, bacterial density and EPS concentration). On surface sediment, the best resulting link was between chlorophyll with organic matter and EPS, showing the relevance of chlorophyll in the EPS matrix on surface. While on subsurface the best link was between bacterial density and organic matter, showing the presence of heterotrophic strategies.

BIBLIOGRAFIA

- Agència Catalana de l'Aigua . (17 / febrer / 2017). Planificació de l'espai fluvial de la conca de la Tordera. Recollit de http://aca-web.gencat.cat/aca/documents/ca/publicacions/espais_fluvials/publicacions/altres_estudis/050P0001/01108_1D513_EIN_Gualba_19agost_1
- Agència Catalana de l'Aigua. (15 / abril / 2017). Depuradores en servei. Recollit de http://aca-web.gencat.cat/aca/appmanager/aca/aca?_nfpb=true&_pageLabel=P1225554461208201540084
- Allan, J. D. (2007). *Stream Ecology: Structure and function of running waters*. Dordrecht: Springer Science & Business Media.
- Amalfitano, S. F. (2009). Flow cytometric analysis of benthic prokaryotes attached to sediment particles. A S. F. Amalfitano, Flow cytometric analysis of benthic prokaryotes attached to sediment particles (p. 246-249). *Journal of microbiological methods*.
- Amalfitano, S., Puddu, A., & Fazi, S. (2009). Flow cytometric analysis of benthic prokaryotes attached to sediment particles. *Journal of Microbiological Methods*, 79(2), 246–249. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.09.005>
- Boada, M., Mayo, S., Maneja Zaragoza, R., & Institució Catalana d'Història Natural. (2008). *Els Sistemes socioecològics de la conca de la Tordera*. Barcelona: Institució Catalana d'Història Natural. Retrieved from http://cataleg.udg.edu/record=b1262601~S10*cat
- Bott, T. L., & Kaplan, L. A. (1985). Bacterial biomass, metabolic state, and activity in stream sediments: relation to environmental variables and multiple assay comparisons. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(2), 508–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16346867>
- Boulton, A. J., Findlay, S., Marmonier, P., Stanley, E. H., & Valett, H. M. (1998). The Functional Significance of the Hyporheic Zone in Streams and Rivers. *Source: Annual Review of Ecology and Systematics*, 29(1998), 59–81.
- Bratbak, G., & Dundas, I. (1984). Bacterial dry matter content and biomass estimations. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(4), 755–757. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6508285>
- Escuela de Ingeniería en Construcción. (09 / febrer / 2017). Anàlisi granulomètric. Recollit de http://icc.ucv.cl/geotecnia/03_docencia/02_laboratorio/manual_laboratorio/granulometria.pdf
- Generalitat de Catalunya. (25 / febrer / 2017). Superfície dels espais inclosos en el PEIN. Recollit de http://mediambient.gencat.cat/web/.content/home/ambits_dactuacio/patrimoni_natural/senp_catalunya/el_sistema/el_pla_despais_dinteres_natural_de_catalunya/dades_i_superficie/superficie_dels_espais_inclosos_en_el_pein/annex_2_superficie_per_comarca/annex2.p

- Gran Enciclopèdia Catalana. (26 / febrer / 2017). Riera d'Arbúcies. Recollit de <http://www.enciclopedia.cat/EC-GEC-0004823.xml>
- Gran Enciclopèdia Catalana . (26 / febrer / 2017). La Tordera. Recollit de Recuperat de <http://www.enciclopedia.cat/EC-GEC-0066475.xml>
- Gran Enciclopèdia Catalana. (09 / maig / 2017). Enciclopèdia Catalana. Recollit de <http://www.diccionari.cat/lexicx.jsp?GECART=0033029>
- Haines-Young, R. H., & Potschin, M. B. (2009). The links between biodiversity, ecosystem services and human well-being. *Ecosystems Ecology: A New Synthesis*, 31. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511750458>
- Horton, R. E. (1945). Erosional development of streams and their drainage basins; Hydrophysical approach to quantitative morphology. *Bulletin of the Geological Society of America*, 56(3), 275–370. [https://doi.org/10.1130/0016-7606\(1945\)56\[275:EDOSAT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1130/0016-7606(1945)56[275:EDOSAT]2.0.CO;2)
- Hudson, J. J., Roff, J. C., & Burnison, B. K. (1992). BACTERIAL PRODUCTIVITY IN FORESTED AND OPEN STREAMS IN SOUTHERN ONTARIO. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49(11), 2412–2422. <https://doi.org/10.1139/f92-267>
- Institut Cartogràfic i Geològic de Catalunya. (14 / febrer / 2017). VISSIR v3.26. Recollit de <http://www.icc.cat/vissir3/>
- Lock, M. A. (1993), Attached microbial communities in rivers. In: Ford TE (ed) *Aquatic microbiology: an ecological approach*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p 113 – 138
- Low, C. S. (1989). Regulation of External Polymer Production in Benthic Microbial Communities. *Microbial Mats: physiological ecology of benthic microbial communities*. American Society for Microbiology, 228-238.
- Margalef, R. (1983). *Limnología*. A R. Margalef, *Limnología*. Barcelona: Ediciones Omega.
- Marshall, K. C. (1988). Adhesion and growth of bacteria at surfaces in oligotrophic habitats. *Canadian Journal of Microbiology*, 34(4), 503–506. <https://doi.org/10.1139/m88-086>
- Mcdowell, W. H., & Fisher, S. G. (1976). Autumnal processing of dissolved organic matter in a small woodland stream ecosystem. *Ecology*, 57(3), 561–569. <https://doi.org/10.2307/1936440>
- Ortuño, L. (28 / febrer / 2017). Mecanica del suelo. Conceptos. Recollit de http://delegacion.camino.upm.es/apuntes/ICCP/4_cuarto/Geotecnia/MECANICA_DEL_SUELO-1.pdf
- Perujo N., Sanchez-Vila X., Proia L. and A.M. Romaní (2017). Interaction between physical heterogeneity and microbial processes in subsurface sediments: a laboratory-scale column experiment. *Environmental Science & Technology*. doi: 10.1021/acs.est.6b06506

- Perujo, N., Freixa, A., Vivas, Z., Gallegos, A. M., Butturini, A., & Romaní, A. M. (2016). Fluvial biofilms from upper and lower river reaches respond differently to wastewater treatment plant inputs. *Hydrobiologia*, 765(1), 169–183. <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2411-1>
- Romaní, A. (2001). Introducció. A A. M. Romaní i Cornet, *Biofilms fluvials : metabolisme heterotròfic i autotròfic en rius mediterranis* (p. 17-20). Barcelona: Institut d'Estudis Catalans.
- Romani, A. M., Butturini, A., Sabater, F., & Sabater, S. (1998). Heterotrophic metabolism in a forest stream sediment: Surface versus subsurface zones. *Aquatic Microbial Ecology*, 16(2), 143–151. <https://doi.org/10.3354/ame016143>
- Romaní, A. M., Fund, K., Artigas, J., Schwartz, T., Sabater, S., & Obst, U. (2008). Relevance of Polymeric Matrix Enzymes During Biofilm Formation. *Microbial Ecology*, 56(3), 427–436. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9361-8>
- Sierra, M. V., & Gomez, N. (2007). Structural characteristics and oxygen consumption of the epipelic biofilm in three lowland streams exposed to different land uses. *Water, Air, and Soil Pollution*, 186(1–4), 115–127. <https://doi.org/10.1007/s11270-007-9469-y>
- Siuda, W., R. Weisło, and R. J. Chróst. (1991). Composition and bacterial utilization of photosynthetically produced organic matter in an eutrophic lake. Stuttgart: Archiv für Hydrobiologie.
- Siuda, W., R. Weisło, and R. J. Chróst. (1991). Composition and bacterial utilization of photosynthetically produced organic matter in an eutrophic lake. A Composition and bacterial utilization of photosynthetically produced organic matter in an eutrophic lake. (p. 473-484). Stuttgart: Archiv für Hydrobiologie.
- Strahler, A. N. (1957). Quantitative analysis of watershed geomorphology. *Eos, Transactions American Geophysical Union*, 38(6), 913–920. <https://doi.org/10.1029/TR038i006p00913>
- Theil-Nielsen, J. &. (1998). Bacterial carbon biomass calculated from biovolumes. Stuttgart: Archiv für Hydrobiologie.
- TSI Aquatic Module 1 Physical. (27 / febrer / 2017). University of Hawaii. Recollit de <https://manoa.hawaii.edu/exploringourfluidearth/sites/default/files/M1U5-Table5.5.%20The%20Wentworth%20scale.pdf>
- Universitat de Barcelona. (2005). *Pràctiques de tecnologia farmacèutica I*. Barcelona: Universitat de Barcelona.
- Wentworth, C. K. (1922). *A Scale of Grade and Class Terms for Clastic Sediments*. Chicago: The University of Chicago Press.
- Wetzel, R. G. (2001). *Limnology : lake and river ecosystems*. A R. G. Wetzel, *Limnology : lake and river ecosystems*. San Diego: Academic Press, cop. 2001.