

EFFECTES DELS EFLUENTS DE DEPURADORA SOBRE ELS BIOFILMS FLUVIALS

Natalia Mingorance García

Grau en Biologia

natalia.mingorancegarcia@gmail.com

Tutor: Sergi Sabater Cortés

Cotutora: Mira Petrović

Empresa / institució: Institut Català de Recerca de l'Aigua (ICRA)

Vistiplau tutor (i cotutora):

Nom del tutor: Sergi Sabater Cortés

Nom del cotutor: Mira Petrović

Empresa / institució: Institut Català de Recerca de
l'Aigua (ICRA)

Correu(s) electrònic(s): ssabater@icra.cat



***EFFECTES DELS EFLUENTS
DE DEPURADORA SOBRE
ELS BIOFILMS FLUVIALS***


**Universitat
de Girona**

Natalia Mingorance García

Tutor: Sergi Sabater

Cotutora: Mira Petrović

TFG – Grau en Biologia

Juliol de 2018

ABSTRACT

Freshwater ecosystems continuously receive chemical stressors contributed by Wastewater Treatment Plant (WWTP) effluents. These effluents can produce important changes in receiving stream biological communities, particularly affecting their composition and functioning. One major impact of WWTP effluents into aquatic ecosystems is through river biofilms, which have a key role in the uptake and retention of inorganic and organic nutrients. Algae are part of river biofilms and rapidly respond to changes occurring in the river environment, making them very good indicators of the ecological status of river ecosystems. This study evaluates the effects of a long-term exposure of epilithic biofilm communities to a realistic urban WWTP effluent gradient (ranging from pure WWTP effluent to clean water) on the structure and composition of algal communities. The experiment was performed using artificial streams in a replicated regression design. The initial hypotheses were that algal communities would: change as a result of the multiple stressors with an inverse relationship between diversity and pollution (i); the algal communities would shift towards tolerant taxa as a result of WWTP effluent exposure (ii); that algal communities would show a taxa succession during exposure and recovery phases, driving the community towards tolerant taxa during the exposure, and returning to the most sensitive taxa after recovery (iii). Results indicate that several taxa within the algal community were negatively affected by the WWTP effluents, while some others were favored. Overall, the algal diversity and taxa richness decreased at the end of the exposure and did not recover. The scores of the two first principal components of a PCA performed with the taxa abundance of algal communities were the best descriptors of the distribution patterns of the biological communities against the WWTP effluent exposure. Besides, these two principal components were fairly related with nitrites and DIN concentration. The results of the experiment allow to conclude that the environmental risk of WWTP effluents on the algal communities is high and produces long lasting and persistent effects.

RESUM

Els ecosistemes aquàtics continentals reben contínuament estressors químics contribuïts per efluents d'estacions depuradores d'aigües residuals (EDAR). Aquests efluents poden produir canvis importants a les comunitats biològiques dels rius receptors, afectant particularment a la seva composició i el seu funcionament. Un impacte important dels efluents d'EDAR als ecosistemes aquàtics és a través dels biofilms fluvials, els quals tenen un paper clau en l'absorció i la retenció de nutrients orgànics i inorgànics. Les algues formen part dels biofilms fluvials i responen ràpidament als canvis que es donen al medi ambient del riu, la qual cosa els fa molt bons indicadors de l'estat ecològic dels ecosistemes fluvials. Aquest estudi avalua els efectes de l'exposició a llarg termini de comunitats de biofilms epilítics a un gradient realista d'efluent d'EDAR urbà (des d'efluent d'EDAR pur fins a aigua neta) en l'estructura i la composició de les comunitats algals. L'experiment es va realitzar emprant rius artificials en un disseny regressiu replicat. Les hipòtesis inicials eren que les comunitats algals: canviarien com a resultat dels estressors múltiples amb una relació inversa entre la diversitat i la contaminació (i); les comunitats algals canviarien cap a tàxons tolerants com a resultat de l'exposició a l'efluent d'EDAR (ii); que les comunitats algals mostrarien una successió de tàxons durant les fases d'exposició i de recuperació, portant la comunitat cap a tàxons tolerants durant l'exposició, i tornant cap als tàxons més sensibles després de la recuperació (iii). Els resultats indiquen que alguns tàxons dins la comunitat algal van ser afectats negativament pels efluents d'EDAR, mentre alguns altres van ser afavorits. En general, la diversitat algal i la riquesa dels tàxons va disminuir al final de l'exposició i no es va recuperar. Els *scores* de les dues primeres components principals del PCA realitzat amb l'abundància dels tàxons de les comunitats algals van ser els millors descriptors dels patrons de distribució de les comunitats biològiques contra l'exposició a l'efluent d'EDAR. A més, aquestes dues components principals estaven bastant relacionades amb les concentracions de nitrats i DIN. Els resultats de l'experiment permeten concloure que el risc medi ambiental dels efluents d'EDAR en les comunitats algals és elevat i produeix efectes de llarga durada i persistents.

RESUMEN

Los ecosistemas acuáticos continentales reciben continuamente estresores químicos contribuidos por efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR). Estos efluentes pueden producir cambios importantes en las comunidades biológicas de los ríos receptores, afectando a su composición y funcionamiento. Un impacto importante de los efluentes en los ecosistemas acuáticos es mediante los biofilms fluviales, los cuales tienen un papel clave en la absorción y la retención de nutrientes orgánicos e inorgánicos. Las algas forman parte de los biofilms fluviales y responden rápidamente a los cambios que se dan en el medio ambiente del río, lo cual las hace muy buenos indicadores del estado ecológico de los ecosistemas fluviales. Este estudio evalúa los efectos de la exposición a largo plazo de las comunidades de biofilms epilíticos a un gradiente realista de efluente de EDAR urbano (desde efluente puro hasta agua limpia) en la estructura y la composición de las comunidades algales. El experimento se realizó utilizando canales artificiales en un diseño regresivo replicado. Las hipótesis iniciales eran que las comunidades algales: cambiarían como resultado de los estresores múltiples con una relación inversa entre la diversidad y la contaminación (i); las comunidades algales cambiarían hacia taxones tolerantes como resultado de la exposición al efluente (ii); que las comunidades algales mostrarían una sucesión de taxones durante las fases de exposición y de recuperación, llevando a la comunidad hacia taxones tolerantes durante la exposición, y volviendo hacia los taxones más sensibles después de la recuperación (iii). Los resultados indican que algunos taxones dentro de la comunidad algal fueron afectados negativamente por los efluentes, mientras algunos otros fueron favorecidos. En general, la diversidad algal y la riqueza de los taxones disminuyó al final de la exposición y no se recuperó. Los *scores* de las dos primeras componentes principales del PCA realizado con la abundancia de los taxones de las comunidades algales fueron los mejores descriptores de los patrones de distribución de las comunidades biológicas contra la exposición al efluente. Además, estas dos componentes principales estaban bastante relacionadas con las concentraciones de nitritos y DIN. Los resultados del experimento permiten concluir que el riesgo medio ambiental de los efluentes de EDAR en las comunidades algales es elevado y producen efectos de larga duración y persistentes.

AGRAÏMENTS

No tinc prou paraules per agrair tot el que m'heu ajudat... Em sento realment molt afortunada d'haver estat tan ben acompanyada al llarg d'aquesta emocionant experiència. Gràcies a vosaltres he arribat a ser qui sóc ara i aconseguir tots els meus propòsits... no sé què hauria fet sense vosaltres!

En primer lloc, Sergi gràcies per la gran oportunitat que m'has donat per créixer personal i professionalment al fer possible la meva participació a l'ICRA. Gràcies per confiar en mi, per tot el que m'has ensenyat, pel suport, per la teva paciència i pels consells que m'has donat, tant a nivell personal com professional. També gràcies per encaminar-me quan m'he perdut i pels els valors que m'has transmès i que m'han donat força i inspiració per continuar!

Ferran, gràcies per ser un pilar fonamental... i és que tot el que m'has aguantat no es pot pagar ni amb tot l'or del món. Gràcies per orientar-me i aconsellar-me sempre que ho he necessitat... En definitiva, gràcies per tot el que has fet per mi, perquè sense la teva ajuda i els teus ànims no seria qui sóc avui. N'he après tant de tu!

Beth, gràcies per la teva dedicació, la teva atenció i per guiar-me al llarg de totes les hores que hem compartit davant del microscopi. Sense la teva ajuda no hauria pogut arribar fins aquí!

Maria, Juan David, Laia i Míriam gràcies per tots els consells, per la vostra paciència i per tot l'afecte que m'heu donat... Sempre m'heu ajudat amb un somriure a la cara i la vostra actitud positiva i plena d'energia m'ha fet sentir com a casa.

Gràcies a tots els companys i amics de l'ICRA, que em vau acollir amb els braços oberts i ara em sento part d'aquesta gran família.

Tània, Anna, Meloud, Ivan... Gràcies a vosaltres he trobat refugi als dies més grisos i m'heu empès a continuar cap a endavant en bona direcció. També gràcies per totes les bones estones que m'heu regalat, tinc molta sort de tenir-vos a la meva vida.

Gràcies als meus pares i la meva germana, per la vostra comprensió, la confiança, la tranquil·litat i la paciència. Gràcies per estar sempre que us he necessitat, per tot el que heu fet per mi i així fer-me tan fàcil lluitar per complir totes les meves aspiracions. En definitiva, per fer-me feliç. Sense vosaltres no hagués estat possible res del que he somiat... Sou el millor que tinc.

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	1
OBJECTIVES	3
METODOLOGIA	3
Disseny experimental	3
Condicions experimentals	4
Química de l'aigua.....	5
Caracterització de la comunitat algal	5
Anàlisi de dades	6
Criteris ètics i sostenibilitat	7
RESULTATS	7
Condicions experimentals	7
Característiques físiques i químiques	8
Caracterització de la comunitat algal i de cianobacteris	11
Composició taxonòmica	11
Riquesa i diversitat dels tàxons	16
Tàxons característics.....	17
Evolució de la comunitat algal	18
Relació entre la comunitat algal i la química de l'aigua.....	21
DISCUSSIÓ.....	22
Variables químiques durant l'experiment.....	22
Resposta de la comunitat d'algues.....	22
Causes de la variació a la comunitat d'algues durant l'experiment	24
Consideracions generals de l'estudi	25
CONCLUSIONS	26
BIBLIOGRAFIA.....	26

INTRODUCCIÓ

L'aigua és un dels recursos naturals més importants del món i constitueix l'hàbitat de la major part de la biodiversitat global (Elosegi & Sabater, 2013). Malauradament, els ecosistemes aquàtics estan fortament impactats per l'activitat humana (Dudgeon et al., 2006; Strayer & Dudgeon, 2010), ja que com a conseqüència de la intensificació de la pressió antropogènica hi ha una creixent arribada d'efluents als sistemes fluvials (Connor et al., 2017). Les EDAR tenen la funció de reduir la concentració i risc ambiental d'aquests contaminants (Tchobanoglous & Burton, 1991), però a la vegada contribueixen puntualment amb els seus efluents (Rodríguez-Mozaz et al., 2015).

Els efluents d'EDAR són mesclades complexes d'un ampli espectre de productes químics que inclouen nutrients, metalls pesants i microcontaminants orgànics tals com fàrmacs, tensioactius, metalls, pesticides, ftalats, hidrocarburs aromàtics policíclics i disruptors endocrins (Deblonde, Cossu-Leguille & Hartemann, 2011; Barber et al., 2013; Aristi et al., 2015). La combinació i concentració d'aquests contaminants als ecosistemes aquàtics continentals varia segons l'origen i el factor de dilució (ràtio entre l'aigua que porta el riu i la contribució de la depuradora) (Barceló & Sabater, 2010; Altenburger et al., 2015). Els contaminants es poden classificar en dos tipus: i) aquells que estimulen l'activitat biològica a baixes concentracions però poden resultar tòxics si es troben massa concentrats (contaminants assimilables, com els nutrients i la matèria orgànica), i ii) aquells que redueixen l'activitat biològica a totes les concentracions (contaminants tòxics, com els pesticides) (Odum, Finn & Franz, 1979). Ambdós tipus de contaminants poden alterar l'estructura i la funció de les comunitats biològiques (Smith, 2003; Wilson, Smith, deNoyelles & Larive, 2003; Sutton et al., 2011). Amb tot, l'efecte global dels efluents en els sistemes fluvials inclou l'eutrofització de rius i rieres i la posterior reducció dels nivells d'oxigen (Carpenter et al., 1998; Smith, 1998), malgrat que els efectes no només depenen del factor de dilució, sinó també del temps d'exposició. Per exemple, en una revisió dels efectes de la contaminació de nitrogen als ecosistemes aquàtics, el llindar entre l'efecte de subsidi i el de estrès pel nitrogen va ser 0,1 mg L⁻¹ d'amoni i 17 mg L⁻¹ de nitrats en tests de toxicitat a curt termini (96 h), però de 0,05 i 1,1 mg L⁻¹ en tests de toxicitat a llarg termini (>30 dies). (Camargo & Alonso, 2006).

Els efectes dels efluents als sistemes fluvials s'han estudiat clàssicament al *in-situ* mitjançant l'elecció d'un riu impactat, la determinació del punt de descàrrega de l'efluent d'EDAR al riu, l'establiment d'una zona "control" riu amunt i d'una zona "impacte" riu avall, el mesurament de les variables d'interès i, finalment, l'anàlisi de les

diferències entre les zones control i impacte mitjançant per exemple l'anàlisi de variància (Sabater et al., 2016; Ponsatí et al., 2016; Chonova et al., 2018). Aquest tipus d'estudis sovint es veuen afectats per la quantitat de variables ambientals presents als sistemes naturals (flux d'aigua, temperatura, radiació...), fet que complica l'obtenció i interpretació dels resultats. Això ha portat a realitzar aproximacions de laboratori emprant mesocosmos, és a dir, sistemes que simulen ecosistemes però de manera simplificada. Un tipus de mesocosmos consisteix en canals que funcionen com ecosistemes aquàtics artificials que permeten simplificar els escenaris naturals. D'aquesta manera, mitjançant el control de variables ambientals com són les hores de llum, la temperatura o el cabal als mesocosmos és possible determinar de forma acurada l'efecte d'una variable independent (en aquest cas, la concentració d'efluent d'EDAR) i una resposta biològica (Sabater & Borrego, 2015).

Una forma d'estudiar l'impacte dels efluent als ecosistemes aquàtics és mitjançant l'estudi dels biofilms, també anomenats perífiton. Els biofilms són complexos agregats de bacteris, algues, fongs, protozous i meiofauna adherits a una superfície i envoltats per una matriu de mucíl·lag (Elosegi & Sabater, 2009; Romaní, 2009; Battin, Besemer, Bengtsson, Romaní & Packmann, 2016). De manera natural en ecosistemes aquàtics continentals, el biofilm es desenvolupa en una àmplia diversitat de superfícies (sorra, fusta, fulles, sediments, pedres i roques), les quals, juntament amb les condicions fisico-químiques (presència de nutrients, oxigen i/o substàncies tòxiques, incidència de la llum, velocitat de flux i variacions de pH i temperatura) en determinen la composició, funció i estructura (Elosegi & Sabater, 2009; Romaní, 2009). Així doncs, la interacció dels microorganismes que formen el biofilm entre ells i amb l'aigua que flueix al seu voltant determina el paper metabòlic del biofilm, el qual influirà a l'hàbitat aquàtic (Romaní, 2009). Per tant, els biofilms són de gran importància als rius, ja que el seu metabolisme microbià és responsable de l'assimilació de nutrients inorgànics així com de l'ús i la descomposició de la matèria orgànica (Romaní, 2009).

Aquest estudi investiga l'efecte en les comunitats algals del biofilms epilítics (és a dir, que es desenvolupen sobre còdols) a l'exposició d'un gradient d'efluent urbà d'EDAR en un experiment dut a terme al laboratori mitjançant rius artificials. El biofilm inòcul prové d'un riu no contaminat, el Llémena (Sant Esteve de Llémena, Girona), mentre que l'efluent d'EDAR prové de la depuradora de Quart (Girona). En aquest experiment, l'efecte de l'efluent es mesura mitjançant l'impacte en l'estructura de la comunitat algal, la qual està composta essencialment de cianobacteris, algues verdes, diatomees i algues vermelles (Necchi, 2016). Les algues bentòniques constitueixen la base de productors primaris a les xarxes tròfiques fluvials i juguen un paper molt important en

quant al manteniment dels equilibris biogeoquímics (Minshall, 1978; Wetzel, 2001; Elosegi & Sabater, 2009) gràcies a la seva capacitat de realitzar la fotosíntesi partint de nutrients inorgànics dissolts en l'aigua i l'energia de la llum solar. A més, l'avaluació de la composició de les comunitats algals s'empra sovint com a indicador de les condicions ecològiques d'un hàbitat determinat i, per tant, la diversitat algal pot ser un bon indicador de l'efecte de les perturbacions, ja que els seus canvis poden estar associats a canvis en les condicions ambientals (Cardinale et al., 2006; Cardinale et al., 2012) tals com els imposats pels efluentes d'EDAR.

OBJECTIVES

The main objective of this study is to determine the effect of the increasing concentration of urban WWTP effluents on the algal community composition from epilithic biofilms.

Hypotheses:

- A change in the composition of the algal community and an inverse relationship between diversity and pollution could be expected as a result of the contaminants.
- The composition of the algal community will shift towards tolerant taxa as a result of WWTP effluent exposure, favoring tolerant taxa and negatively affecting sensitive others.
- A taxa succession will be produced as a result of increasing (exposure) or decreasing (recovery) phases. During the exposure the succession will drive the community towards tolerant taxa, whereas the recovery will favor sensitive taxa.

METODOLOGIA

Disseny experimental

L'experiment del qual forma part l'estudi es va realitzar a la sala de rius experimentals (Experimental Streams Facility) de l'Institut Català de Recerca de l'Aigua (Girona), entre el 19 de gener i el 31 de març de 2017.

Es van emprar 24 rius artificials als quals se'ls va assignar aleatòriament vuit tractaments (100, 86, 72, 58, 43, 29, 14 i 0% d'efluent d'EDAR), seguint un gradient de concentració d'efluent d'EDAR, cada un d'ells amb 3 rèpliques. Els biofilms fluvials es van aclimatar en aigua neta durant 3 setmanes, i a continuació van ser exposats al gradient d'efluent durant 5 setmanes i, finalment es van exposar durant 3 setmanes a l'aigua neta per dur a terme la fase de recuperació.

Les mostres per a l'anàlisi de les comunitats algals emprades en aquest estudi es van recollir els dies 8, 29 i 49 de l'experiment, on els dos primers corresponen a la fase d'exposició i el darrer a la fase de recuperació.

Condicions experimentals

Cada riu artificial consistia en un canal independent de metacrilat (l – a – p = 200 cm – 10 cm – 10 cm), i un tanc d'aigua de 70L que permetia la recirculació de l'aigua. Cada canal rebia un flux constant de 50 mL s⁻¹ provinent del tanc que operava com un sistema tancat durant 72 h alhora que el 100% de l'aigua es renovava cada tres dies, moment en el que es portava nova aigua de l'EDAR, que era preparada selectivament per a les diferents dilucions. La velocitat mitjana de l'aigua era 0,71 cm s⁻¹ i la fondària de l'aigua mesurava entre 3 i 5 cm. Cada canal artificial es va emplenar amb 5 L de sediment fi i còdols extrets d'un segment no contaminat del riu Llémena (Sant Esteve de Llémena, Girona). La sorra estreta (d₅₀ = 0.74 mm) i els còdols (aprox. 4 cm²) es van transportar en menys d'una hora als canals artificials i es va distribuir uniformement pel canal. En condicions de saturació completa d'aigua, la porositat del sediment sorrenc donava un contingut d'aigua del 25% respecte del pes humit.

L'aigua pels rius artificials resultava del filtratge d'aigua de pluja a través de filtres de carbó activat i l'efluent d'EDAR de Quart (Girona). L'aigua de la EDAR era transportada en tancs de 200 L i era transferida als rius artificials en menys de dues hores. Els cicles diaris de radiació fotosintèticament activa (RFA) es va definir com 10 h de llum i 14 h de fosc i es van simular amb llums LED (Ligtech, Girona). La RFA es va mantenir constant a 174 ± 33 µE m⁻² s⁻¹ durant el dia i es registrava cada 10 min emprant 4 sensors localitzats al llarg de tot el sistema de rius (sensor LI-192SA, LiCOR Inc, Lincoln, EUA). La temperatura de l'aire es va mantenir a 10 °C durant el període d'aclimatació i a 15 °C durant el període d'exposició, alhora que es mantenia una humitat del 30% de l'aire. La temperatura de l'aigua es registrava cada 10 min emprant VEMCO Minilog (TR model, AMIRIX Systems Inc, Halifax, NS, Canadà) enregistradors de temperatura (-5 fins 35 °C, ± 0.2 °C). En general, les condicions físic-químiques als rius artificials (velocitat de l'aigua, temperatura i cicles de llum) emulaven les del riu Llémena durant els inicis de la primavera. Durant el període d'aclimatació, el biofilm es va deixar créixer als rius artificials i aquest provenia de l'inòcul present als sediments del riu Llémena.

Química de l'aigua

L'oxigen dissolt, el pH i la conductivitat específica es van mesurar setmanalment al migdia a cada riu artificial emprant sondes de mà WTW (Weilheim, Alemanya). Les concentracions de nutrients, anions i cations majoritaris i la matèria orgànica total es van mesurar 24 hores després de la renovació de l'aigua dels rius artificials a partir de l'aigua recollida de la sortida del canal. L'aigua es va filtrar immediatament a través de filtres de niló de 0,2 µm de diàmetre de porus (Whatman, Kent, Regne Unit) en contenidors de polietilè prèviament rentats pels nutrients. La concentració de P-PO₄³⁻ es va determinar colorimètricament emprant un analitzador discret completament automatitzat Alliance Instruments Smartchem 140 (AMS, Frépillon, França). Les concentracions d'anions (Cl⁻, SO₄²⁻, Br⁻, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻) i de cations (Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺, and N-NH₄⁺) es van determinar a un cromatògraf iònic Dionex ICS-5000 (Dionex Corporation, Sunnyvale, EUA). Pel carboni orgànic dissolt (COD), les mostres d'aigua es van filtrar a través de filtres de 0,7 µm de fibra de vidre prèviament muflats (Whatman GF/F, Kent, Regne Unit). La concentració de COD es va analitzar emprant un Shimadzu TOC-V CSH acoblat a un TNM module (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japó).

Caracterització de la comunitat algal

Els dies 8, 29 i 49 de l'experiment es van recollir mostres de tots els tractaments per tal d'analitzar la composició algal del biofilm. Amb aquesta finalitat, es va realitzar un rascat de la superfície d'una pedra seleccionada aleatòriament del canal. A continuació, al producte resultant del rascat se li va addicionar 5 gotes de formol al 40% i, finalment, se li va addicionar aigua recollida de la sortida del canal filtrada amb filtres de niló de 0,45 µm de diàmetre (Whatman, Kent, Regne Unit) fins a aconseguir un volum total de 10 ml, tot conservant-ho en vials de vidre.

Pel muntatge de cadascuna de les preparacions es va treballar sota la campana d'extracció de gasos, a la qual s'agitava el vial per homogeneïtzar la mostra i amb una pipeta Pasteur es dipositava el material en un portaobjectes. A continuació, es cobria la mostra amb un cobreobjectes i, finalment, es segellava la mostra amb l'aplicació d'una capa molt prima d'esmail d'ungles transparent (per tal de fixar la mostra i evitar l'entrada d'aire al seu interior).

Un cop assecat l'esmail, es realitzava la observació microscòpica de les mostres amb llum directa i, en cas que fos necessari, aplicant contrast de fase (Nikon E200, Tokyo, Japó). En primer lloc, s'utilitzaven els objectius 40X, 100X, 400X per comprovar que la

mostra era homogènia i apreciar com era la visualització dels diferents organismes aplicant diversos augments.

Tot seguit, un cop realitzada la observació global de la mostra, es va efectuar el comptatge i la identificació d'individus a nivell de gènere aplicant un augment de 1000X i emprant oli d'immersió, tot realitzant transsectes al llarg del cobreobjectes amb un desplaçament vertical. En aquest procés s'anotava el nombre de camps observats totals i el nombre d'individus de cada gènere observats fins arribar a un mínim de 400 cèl·lules, per tal de garantir la observació de la gran majoria de gèneres presents a la mostra. La identificació dels tàxons es realitzava amb el suport de monografies especialitzades (Prygiel & Coste, 2000; Wehr, Sheath & Kociolek, 2015) i en el cas de les diatomees, es feia referència a individus com a valves, ja que era difícil trobar els organismes intactes amb les dues valves.

Un cop finalitzada l'observació, es netejaven les restes d'oli de l'objectiu del microscopi amb l'ajuda de paper. Així mateix, es netejava curosament el portaobjectes, el qual contenia la mostra, amb etanol sota la campana d'extracció de gasos i, finalment, tots els residus generats es dipositaven al bidó de residus absorbents.

Anàlisi de dades

L'anàlisi de les dades es va realitzar mitjançant el programa estadístic R i amb el suport de Excel.

Prèviament al tractament de les dades, es van descartar tres tàxons del total que s'havien identificat, ja que es tractava de casos en els quals s'havia observat un únic organisme en una de les tres rèpliques de un dels 8 tractaments. D'aquesta manera, es va considerar que aquestes mostres agregaven variabilitat a les dades i es van eliminar d'acord amb aquest criteri.

Per l'anàlisi de les dades corresponents a la composició de la comunitat algal es va realitzar un Anàlisi de Components Principals (PCA). El PCA és un mètode d'ordenació que permet simplificar la complexitat d'espais mostrals (amb moltes dimensions) i alhora conservar la informació mitjançant la creació de noves variables o components principals. Cada component principal s'obté per la combinació lineal normalitzada de les variables originals, on la primera component explica una major variància que la segona. A més, la segona component principal és ortogonal a la primera, és a dir, cadascuna de les noves components que es generen són independents entre elles. Les dades es van centrar i estandarditzar per la realització del PCA així com transformar logarítmicament per tal d'obtenir una distribució normal.

Un cop obtinguts els scores de les dues primeres components principals es va realitzar la mitjana dels scores de les tres mostres corresponents a cadascun dels tractaments per tal de facilitar la visualització dels patrons de la comunitat algal en l'espai ecològic. Posteriorment, es va realitzar un anàlisi de correlacions de Spearman per tal d'estudiar si les condicions físico-químiques i les components principals del PCA estaven relacionades linealment i així determinar la força d'aquesta associació.

El nombre d'espècies i l'índex de diversitat de Shannon es van estimar a partir de les dades corresponents a la composició de la comunitat algal (Shannon & Weaver, 1948). La riquesa correspon al recompte del nombre de taxons presents en cada mostra, mentre que l'índex de Shannon calcula la diversitat tenint en compte tant la riquesa com l'abundància relativa de cadascun dels taxons identificats. Finalment, amb l'objectiu de determinar quins tàxons eren característics d'un tractament o dia determinat es va realitzar l'índex *Indicator Value* (IndVal) (Dufrêne & Legendre, 1997).

Criteris ètics i sostenibilitat

Al realitzar tot l'estudi al laboratori, tant al llarg de l'experiment com al moment de l'anàlisi de les mostres, cal actuar rigorosament, ja que es treballa amb substàncies tòxiques constantment i s'ha de tenir en compte que la nostra conducta pot malmetre l'ecosistema. Per aquest motiu durant la presa de mostres es va procurar ser el més eficient possible per tal d'evitar haver de repetir procediments i generar residus innecessàriament. A més, els efluents d'EDAR ja estan tractats i, per tant, a l'hora d'eliminar-los s'abocaven a un col·lector general sense que això suposés un problema. En quant a la observació al microscopi, els portaobjectes van ser rentats i reutilitzats i es van deixar assecar a l'aire lliure. La resta de residus com pipetes Pasteur, cobreobjectes i àcids provinents dels protocols van ser eliminats segons les normatives vigents en contenidors homologats.

RESULTATS

Condicions experimentals

La temperatura de l'aigua i de l'aire es van mantenir estables al llarg de l'experiment i entre els diferents tractaments amb valors mitjans de $20,2 \pm 1,2$ °C i $21,0 \pm 2,2$ °C, respectivament. Els cicles RFA també es van mantenir estables durant tot l'experiment, així com la hidràulica. Les condicions ambientals (oxigen dissolt, pH i conductivitat) no van mostrar diferències significatives entre els canals artificials abans de l'inici de l'aplicació dels tractaments. L'establiment dels tractaments (exposició a

gradient d'efluent d'EDAR) implica canvis en les concentracions dels nutrients, ions, oxigen dissolt, conductivitat, pH i carboni orgànic total (TOC).

Característiques físiques i químiques

Pel que fa al pH, a l'inici de l'exposició (dia 8 de l'experiment) es va mantenir estable a tots els tractaments amb un valor mitjà de $8,4 \pm 0,04$ al control (0% d'efluent d'EDAR) excepte als tractaments 86 i 100%, als quals va experimentar una lleu disminució arribant així a un pH de $7,8 \pm 0,02$ al 100% (Taula 1). Al final de l'exposició (dia 29) la disminució de pH era més evident a partir del tractament del 43% i va passar de 8 ± 0 al 0% a $7,7 \pm 0,03$ al 100% (Taula 1). Al final de recuperació (dia 49) el pH es va mantenir estable amb lleus fluctuacions al llarg de tots els tractaments (Taula 1).

La conductivitat tant a l'inici com al final de l'exposició augmentava progressivament conforme incrementava el percentatge d'efluent d'EDAR. En el primer cas arribava fins a $1314 \pm 3,6 \mu\text{S/cm}$ al 100% i en el segon cas a $1568,3 \pm 9,9 \mu\text{S/cm}$ al 100% (Taula 1). Al final de la recuperació es va mantenir estable als diferents tractaments, tot i que els més elevats tenien una conductivitat lleugerament més alta (Taula 1).

L'oxigen dissolt tant a l'inici com al final de l'exposició es va mantenir estable amb petites fluctuacions al llarg dels tractaments. A partir del tractament del 58%, però, l'oxigen va disminuir continuadament fins arribar a $6,9 \pm 0,02 \text{ mg/L}$ al 100% a l'inici de l'exposició i $6,2 \pm 0,4 \text{ mg/L}$ al 100% al final de l'exposició (Taula 1). Al final de la recuperació, l'oxigen va augmentar lleugerament passant de $9,2 \pm 0,2 \text{ mg/L}$ al 0% a $10 \pm 0,1 \text{ mg/L}$ al 43% i a partir d'aquest novament va disminuir, tot i que va assolir concentracions més elevades que a l'exposició ($9,4 \pm 0,1 \text{ mg/L}$ al 100%) (Taula 1).

Taula 1. Mitjana i desviació estàndard de variables químiques mesurades per cadascun dels tractaments als dies 8, 29 i 49 de l'experiment.

Dia experiment	Tractament (% efluent d'EDAR)	pH	Conductivitat ($\mu\text{S/cm}$)	Oxigen dissolt (mg/L)
8	0	$8,49 \pm 0,04$	$196,90 \pm 1,87$	$9,04 \pm 0,05$
	14	$8,46 \pm 0,03$	$395,67 \pm 18,15$	$8,97 \pm 0,03$
	29	$8,52 \pm 0,03$	$551,33 \pm 20,65$	$9,23 \pm 0,13$
	43	$8,37 \pm 0,04$	$743,33 \pm 7,23$	$8,93 \pm 0,06$
	58	$8,24 \pm 0,05$	$905,33 \pm 6,66$	$8,54 \pm 0,10$
	72	$8,09 \pm 0,03$	$1072,33 \pm 19,86$	$8,01 \pm 0,05$
	86	$7,95 \pm 0,03$	$1162,67 \pm 11,72$	$7,40 \pm 0,13$
	100	$7,87 \pm 0,02$	$1314,00 \pm 3,61$	$6,91 \pm 0,02$
29	0	$8,01 \pm 0,00$	$221,33 \pm 0,58$	$8,22 \pm 0,00$
	14	$8,10 \pm 0,05$	$410,00 \pm 23,39$	$8,99 \pm 0,05$

	29	8,00 ± 0,04	654,00 ± 15,88	8,57 ± 0,08
	43	7,92 ± 0,04	883,67 ± 2,08	8,24 ± 0,06
	58	7,77 ± 0,04	1046,00 ± 9,54	7,15 ± 0,15
	72	7,78 ± 0,06	1259,67 ± 25,42	6,83 ± 0,16
	86	7,67 ± 0,03	1385,33 ± 19,09	6,01 ± 0,28
	100	7,70 ± 0,03	1568,33 ± 9,87	6,20 ± 0,36
49	0	8,33 ± 0,05	321,33 ± 1,53	9,16 ± 0,15
	14	8,37 ± 0,01	311,33 ± 4,93	9,41 ± 0,05
	29	8,43 ± 0,01	317,33 ± 4,73	9,76 ± 0,22
	43	8,45 ± 0,01	328,33 ± 8,51	9,95 ± 0,12
	58	8,47 ± 0,01	334,00 ± 4,58	9,79 ± 0,13
	72	8,46 ± 0,01	348,67 ± 2,08	9,71 ± 0,04
	86	8,47 ± 0,01	348,67 ± 6,66	9,61 ± 0,09
	100	8,45 ± 0,00	353,67 ± 1,155	9,38 ± 0,07

Els nitrats a l'inici de l'exposició eren molt alts, de $17,7 \pm 0,5$ ppm al tractament del 100% (Taula 2). Al final de l'exposició eren més baixos, de $1,21 \pm 0,3$ ppm al 100% (Taula 2). Les concentracions disminuïen d'acord amb la dilució fins a mínims al 0% (Taula 2). Al final de la recuperació no hi havia nitrats a cap dels tractaments (Taula 2).

Els nitrats a l'inici de l'exposició eren baixos, de $0,03 \pm 0,04$ ppm al 100% (Taula 2). Al final de l'exposició eren molt més alts, de $17,4 \pm 4,03$ ppm al 100% (Taula 2). Les concentracions disminuïen d'acord amb la dilució fins a mínims al 0% al final de l'exposició. Al final de la recuperació els nitrats eren molt baixos a tots els tractaments i es mantenien estables amb fluctuacions puntuals (p. ex. $1,2 \pm 0,01$ al 100%) (Taula 2).

Les concentracions d'amoni, el nitrogen inorgànic dissolt (DIN), el fosfat, el clor i el TOC disminuïen d'acord amb la dilució fins a mínims al 0% tant a l'inici com al final de l'exposició (Taula 2).

L'amoni a l'inici de l'exposició era alt, de $19,9 \pm 0,7$ ppm al 100% (Taula 2). Al final de l'exposició era més elevat, de $22,32 \pm 6,6$ ppm al 100% (Taula 2). Al final de la recuperació l'amoni era gairebé inexistent a tots els tractaments i es mantenia estable amb petites fluctuacions (p. ex. $0,01 \pm 0$ ppm al 43%) (Taula 2).

El DIN a l'inici de l'exposició era alt, de $37,8 \pm 0,8$ ppm al 100% (Taula 2). Al final de l'exposició era lleugerament més elevat, de $40,9 \pm 10,4$ ppm al 100%. Al final de la recuperació el DIN era molt baix i es mantenia estable de manera general als diferents tractaments (p. ex. $1,2 \pm 0,01$ ppm al 100%) (Taula 2).

Els fosfats a l'inici de l'exposició eren baixos, de $0,5 \pm 0,06$ ppm al 100% (Taula 2). Al final de l'exposició eren més alts, de $1,5 \pm 0,08$ ppm al 100% (Taula 2). Al final de la recuperació eren molt baixos i oscil·laven entre 0 ± 0 ppm al 0% i $0,02 \pm 0,01$ ppm al 100% (Taula 2).

El clor a l'inici de l'exposició era molt alt, de $207,3 \pm 3,8$ ppm al 100% (Taula 2). Al final de l'exposició també era alt, de $203,6 \pm 45,2$ ppm al 100% (Taula 2). Al final de la recuperació el clor era molt més baix i es mantenia estable de manera general als diferents tractaments (p. ex. $21,2 \pm 0,5$ ppm al 100%) (Taula 2).

El TOC a l'inici de l'exposició era elevat, de $15,5 \pm 0,2$ ppm (Taula 2). Al final de l'exposició també era alt, de $14,6 \pm 0,3$ ppm al 100%. Al final de la recuperació el TOC era baix i oscil·lava entre $2,3 \pm 0,2$ ppm al 0% i $2 \pm 0,2$ ppm al 100% (Taula 2).

Taula 2. Mitjana i desviació estàndard de les principals variables químiques mesurades per cadascun dels tractaments als dies 8, 29 i 49 de l'experiment.

Dia experiment	Tractament (% efluent d'EDAR)	NO ₂ (ppm)	NO ₃ ⁻ (ppm)	NH ₄ ⁺ (ppm)	DIN (ppm)	PO ₄ ³⁻ (ppm)	Cl (ppm)	TOC (ppm)
8	0	0,04 ± 0,04	1,26 ± 0,04	0,00 ± 0,00	1,30 ± 0,00	0,01 ± 0,00	17,97 ± 7,64	1,12 ± 0,21
	14	0,61 ± 0,10	1,82 ± 0,15	4,18 ± 0,71	6,61 ± 0,49	0,03 ± 0,01	41,00 ± 2,23	2,95 ± 0,28
	29	0,79 ± 0,21	1,17 ± 0,03	9,42 ± 0,33	11,38 ± 0,56	0,09 ± 0,02	67,58 ± 2,29	4,86 ± 0,28
	43	3,16 ± 0,53	1,09 ± 0,07	12,97 ± 0,42	17,21 ± 0,39	0,24 ± 0,04	107,15 ± 11,29	7,47 ± 0,20
	58	7,10 ± 0,56	1,02 ± 0,14	14,74 ± 0,73	22,86 ± 0,08	0,32 ± 0,07	131,44 ± 1,96	9,33 ± 0,15
	72	10,35 ± 1,10	0,58 ± 0,08	18,29 ± 1,10	29,21 ± 0,10	0,31 ± 0,06	159,95 ± 0,47	11,79 ± 0,30
	86	14,07 ± 0,58	0,36 ± 0,02	18,08 ± 0,78	32,51 ± 0,22	0,33 ± 0,04	178,36 ± 0,91	12,98 ± 0,11
	100	17,69 ± 0,47	0,27 ± 0,04	19,87 ± 0,71	37,84 ± 0,78	0,47 ± 0,06	207,29 ± 3,75	15,48 ± 0,22
29	0	0,01 ± 0,01	1,39 ± 0,14	0,00 ± 0,00	1,40 ± 0,14	0,01 ± 0,01	13,21 ± 0,87	1,07 ± 0,07
	14	0,42 ± 0,26	5,04 ± 1,05	1,55 ± 0,57	7,01 ± 0,94	0,03 ± 0,05	44,49 ± 5,23	2,94 ± 0,33
	29	1,16 ± 0,27	5,97 ± 0,38	6,34 ± 0,37	13,47 ± 0,49	0,13 ± 0,09	80,58 ± 4,18	5,03 ± 0,06
	43	0,80 ± 0,16	8,54 ± 0,64	12,13 ± 1,19	21,47 ± 0,86	0,58 ± 0,06	117,32 ± 2,38	7,32 ± 0,04
	58	1,52 ± 0,43	12,61 ± 0,17	12,52 ± 0,37	26,65 ± 0,08	0,82 ± 0,06	145,36 ± 3,57	9,32 ± 0,26
	72	1,16 ± 0,18	14,81 ± 2,47	17,60 ± 2,24	33,56 ± 0,38	1,14 ± 0,08	186,24 ± 6,0	11,74 ± 0,11
	86	1,40 ± 0,17	19,21 ± 0,61	17,28 ± 1,91	37,89 ± 1,56	1,27 ± 0,01	208,22 ± 0,93	12,15 ± 0,45
	100	1,21 ± 0,29	17,37 ± 4,03	22,32 ± 6,60	40,89 ± 10,43	1,46 ± 0,08	203,60 ± 45,18	14,56 ± 0,32
49	0	0,00 ± 0,00	1,24 ± 0,06	0,00 ± 0,00	1,24 ± 0,07	0,00 ± 0,00	21,52 ± 0,44	2,29 ± 0,23
	14	0,00 ± 0,00	1,11 ± 0,05	0,00 ± 0,00	1,12 ± 0,05	0,00 ± 0,00	21,41 ± 0,05	2,32 ± 0,22
	29	0,00 ± 0,00	1,11 ± 0,03	0,00 ± 0,00	1,11 ± 0,03	0,01 ± 0,00	21,38 ± 0,38	2,14 ± 0,10
	43	0,00 ± 0,00	1,01 ± 0,08	0,01 ± 0,00	1,02 ± 0,08	0,01 ± 0,00	19,54 ± 2,08	2,27 ± 0,15

58	0,00 ± 0,00	1,05 ± 0,07	0,01 ± 0,00	1,06 ± 0,07	0,01 ± 0,00	20,31 ± 1,27	2,28 ± 0,15
72	0,00 ± 0,00	1,14 ± 0,02	0,01 ± 0,00	1,15 ± 0,02	0,01 ± 0,00	21,35 ± 0,45	2,04 ± 0,17
86	0,00 ± 0,00	1,14 ± 0,05	0,00 ± 0,00	1,15 ± 0,05	0,02 ± 0,00	21,30 ± 0,83	2,25 ± 0,17
100	0,00 ± 0,00	1,16 ± 0,01	0,00 ± 0,00	1,16 ± 0,01	0,02 ± 0,01	21,24 ± 0,50	1,99 ± 0,17

D'altra banda, algunes de les variables químiques estaven relacionades significativament (p -valor < 0,05) entre elles, de manera que: els nitrats es relacionaven amb l'amoni, el DIN, el clor i el TOC amb coeficients de correlació (ρ) de 0,9 i amb els fosfats amb $\rho = 0,8$; els nitrats es relacionaven amb el DIN i els fosfats ($\rho = 0,3$); l'amoni es relacionava amb el DIN, els fosfats, el clor i el TOC ($\rho = 0,9$); el DIN es relacionava amb els fosfats, el clor i el TOC ($\rho = 0,9$); els fosfats es relacionaven amb el clor ($\rho = 0,9$) i el TOC ($\rho = 0,8$) i, finalment, el clor es relacionava amb el TOC ($\rho = 0,9$) (Taula 7). Per tant, la majoria de les variables químiques tenien una associació molt elevada entre elles ($\rho \approx 0,9$) (Taula 7).

Caracterització de la comunitat algal i de cianobacteris

➤ Composició taxonòmica

L'estructura de la comunitat analitzada estava essencialment formada pels 4 grans grups algals Euglenophyta (euglenes), Chlorophyta (algues verdes), Rodophyta (algues vermelles), Ochrophyta (diatomees) i el gran grup de cianobacteris Cyanobacteria. Tenint això en compte, tot i pertànyer a grups diferents, per a la simplificació de la lectura del text subsegüent s'empren els termes 'tàxons algals' i 'grups algals' per fer referència tant a cianobacteris com a algues.

A l'inici de l'exposició, les diatomees eren el component més abundant de la comunitat (50–70%), seguides per les algues verdes (10–30%), els cianobacteris (10–25%), les algues vermelles (2–10%) i, finalment, els euglenòfits (<1% en la majoria dels tractaments) (Figura 1). En aquest cas, els canvis més pronunciats es donaven al comparar el tractament 0% amb el 14% i el 100%, on l'abundància de les diatomees passava d'un 50% a aproximadament un 75% i, d'altra banda, si es comparava el 0% amb el 29% on l'abundància de les algues verdes passava aproximadament d'un 15% a un 35% (Figura 1).

Al final de l'exposició hi havia un canvi molt marcat entre el control i la resta de tractaments en comparació amb l'inici de la exposició (Figura 2). D'aquesta manera, les diatomees eren el component més abundant de la comunitat al control (70%) i al tractament del 100% (55%), mentre que a la resta de tractaments el component més abundant eren les algues verdes (60–85%), seguides dels cianobacteris (5–20%) i les

algues vermelles (1–8%) (Figura 2). En aquest cas, el canvi més pronunciat es produïa entre el 0% i la resta de tractaments excepte el 100%, on l'abundància de les diatomees disminuïa sobtadament i passava d'un 70% a un 10–20% (Figura 2). D'altra banda, el control del final de l'exposició presentava una major abundància de diatomees respecte el control de l'inici de l'exposició (Figures 1 i 2).

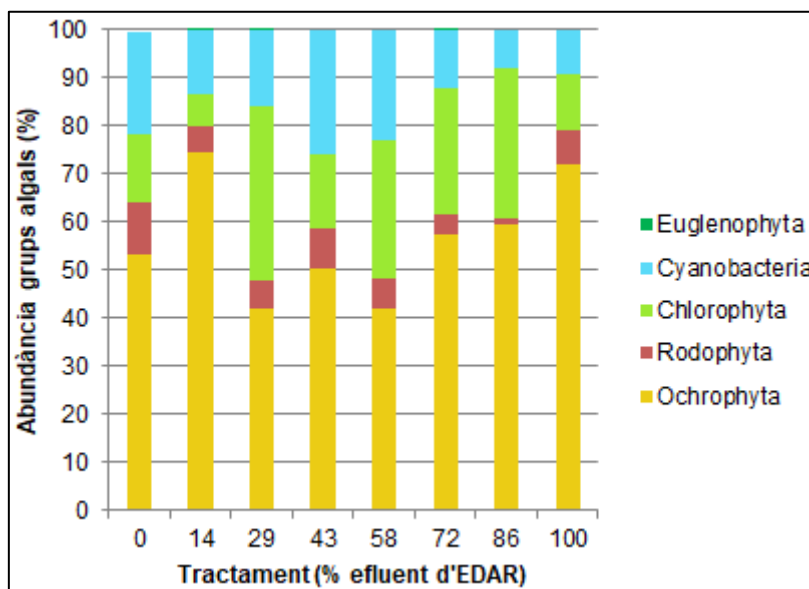


Figura 1. Abundància relativa dels grups algal (Euglenophyta, Chlorophyta, Rodophyta, Ochrophyta i Cyanobacteria) pels diferents tractaments a l'inici de la exposició (dia 8).

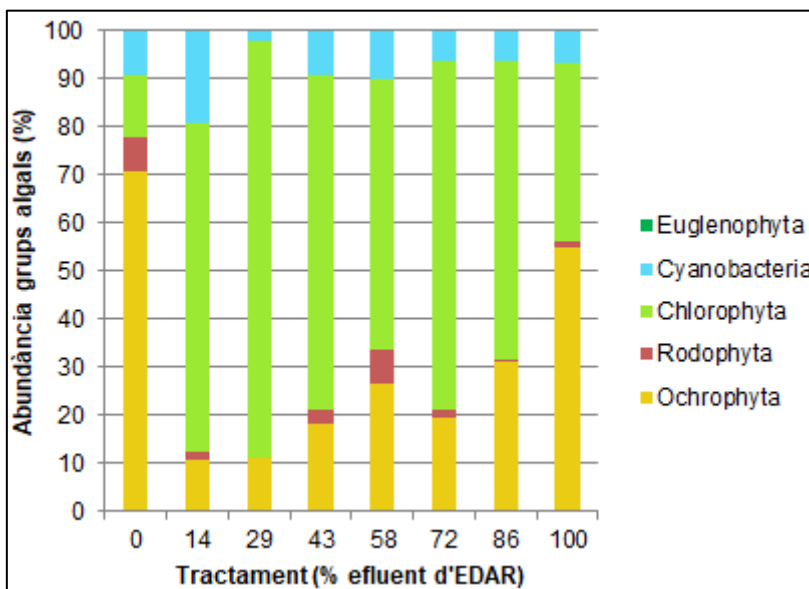


Figura 2. Abundància relativa dels grups algal (Euglenophyta, Chlorophyta, Rodophyta, Ochrophyta i Cyanobacteria) pels diferents tractaments al final de la exposició (dia 29).

Pel que fa al final de la recuperació, la comunitat algal no presentava diferències molt marcades respecte el final de l'exposició (Figures 2 i 3). Les algues verdes eren el grup més abundant (40–70%) a la majoria dels tractaments excepte al control, al 58% i al 100% (Figura 2). Així doncs, les diatomees eren el grup més abundant al control i al

100% i els cianobacteris eren el grup més abundant al 58% (Figura 2). D'altra banda, l'abundància de les diatomees al control era similar a la que es va obtenir a l'inici de l'exposició (Figures 1 i 3). Per altra part, l'abundància de les algues vermelles al control era inferior a la que es va obtenir a l'inici de l'exposició. A més, l'abundància dels cianobacteris era superior al final de la recuperació si es comparava amb les que es van obtenir tant a l'inici com al final de l'exposició (Figures 1, 2 i 3).

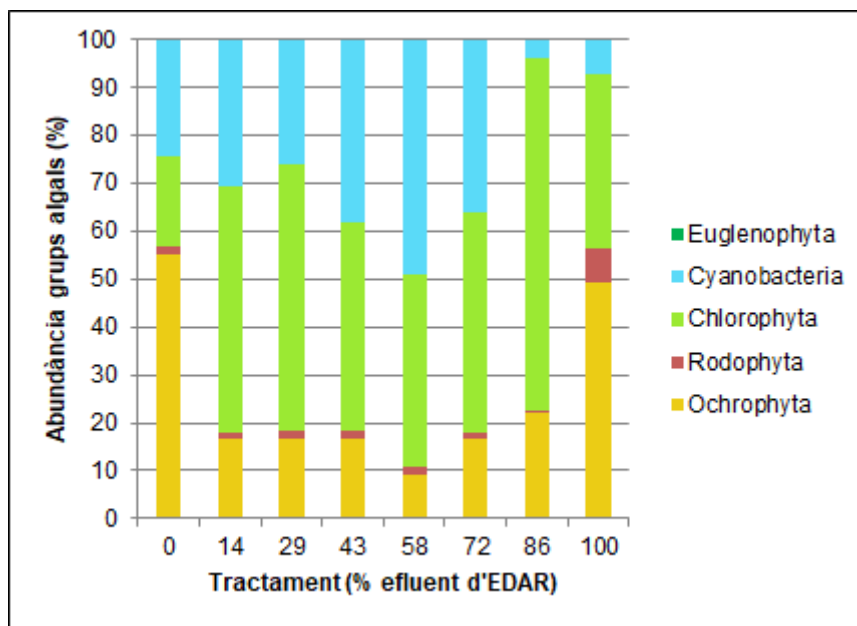


Figura 3. Abundància relativa dels grups algal (Euglenophyta, Chlorophyta, Rodophyta, Ochrophyta i Cyanobacteria) pels diferents tractaments al final de la recuperació (dia 49).

Al control i a l'inici de l'exposició la comunitat algal presentava abundàncies elevades dels tàxons *Gomphonema*, *Cymbella*, *Phormidium*, *Audouinella*, *Achnanthes*, *Navicula*, *Chlorococcal* unicel·lular indeterminat 1 i *Chlorococcal* colonial (Figura 4). Tot i que la majoria d'aquestes abundàncies eren també elevades a la resta de tractaments, hi havia variacions puntuals respecte el control: al 86% hi havia una reducció de *Phormidium* i d'*Audouinella*; al 14% hi havia un increment de *Gomphonema* i una reducció de *Navicula*, *Audouinella*, *Chlorococcal* unicel. indet. 1 i *Chlorococcal* colonial indet.; al 100% hi havia una disminució de *Phormidium*, *Chlorococcal* unicel. indet. 1 i de *Chlorococcal* colonial indet.; al 43% hi havia una reducció de *Chlorococcal* unicel. indet. 1 i *Chlorococcal* colonial indet. i al 29, 58 i 72% hi havia una disminució de *Navicula* i de *Chlorococcal* colonial indet. (Figura 4). D'altra banda, als tractaments 29, 43, 58, 72 i 86% hi havia un increment de l'abundància de *Scenedesmus* respecte el control i als tractaments 14, 58 i 86% hi havia un increment de l'abundància de *Achnanthes* cf. respecte el control (Figura 4).

En comparació amb els tàxons presents al final de l'exposició, alguns dels que eren més abundants a l'inici de l'exposició van perdre protagonisme (Figures 4 i 5). Els controls eren diferents entre ells, ja que al final de l'exposició va augmentar lleugerament l'abundància de *Achnanthes* cf. (passant d'un 1,2% a un 6,8% al final de l'exposició), *Nitzschia* (passant d'un 2,7% a un 5,2%), *Cocconeis* (passant d'un 0,3% a un 1,4%), *Scenedesmus* (passant d'un 1,1% a un 3,9%) i *Denticula* (passant d'un 0,6% a un 5,7%) mentre que va disminuir la de *Phormidium* (passant d'un 12,8% a un 6,5%) i *Audouinella* (passant d'un 11,0% a un 7,3%) (Figures 4 i 5).

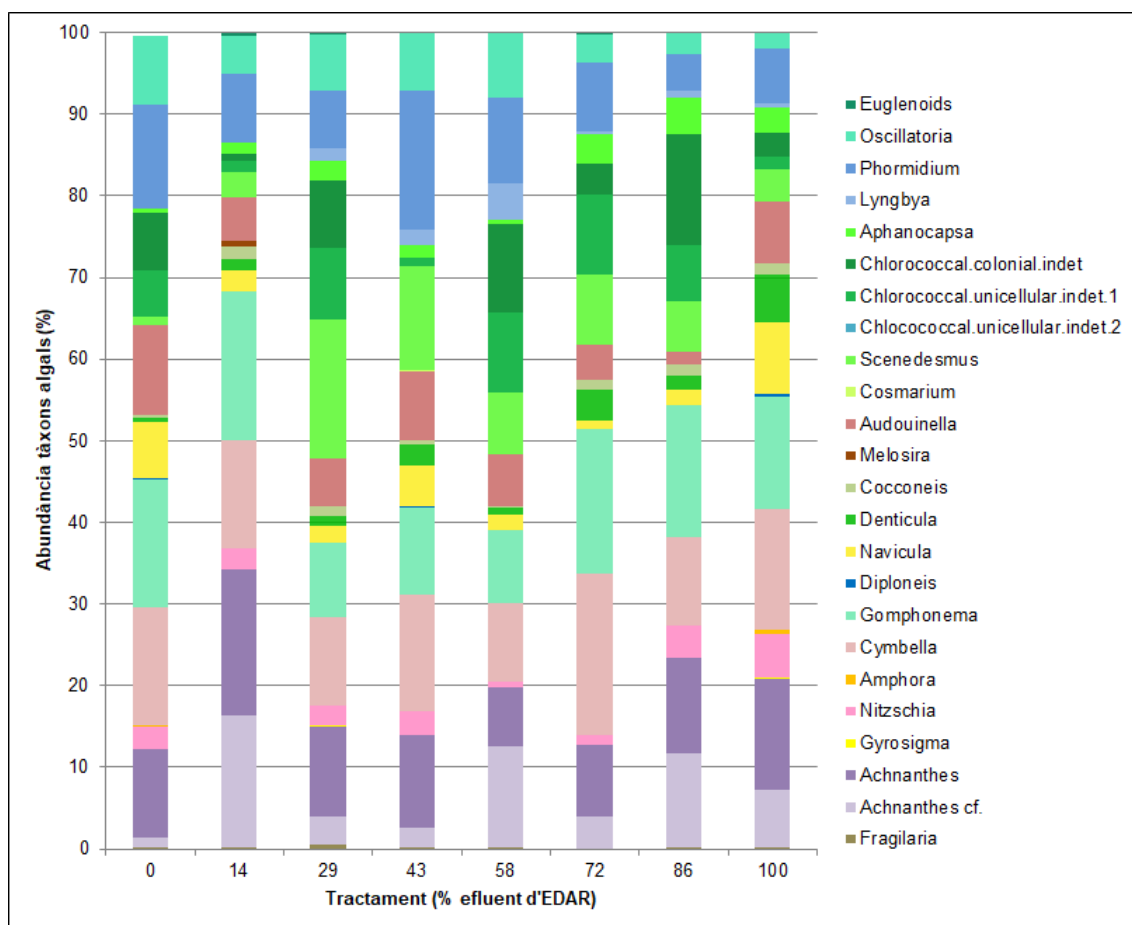


Figura 4. Abundància relativa dels tàxons algals identificats pels diferents tractaments a l'inici de la exposició (dia 8).

D'altra banda, els tàxons al final de l'exposició diferien molt dels presents a l'inici de l'exposició (Figures 4 i 5) per a la resta de tractaments, anàlogament al que es va obtenir pels grans grups (Figura 1 i 2). D'aquesta manera, al final de l'exposició hi havia un increment molt marcat de l'abundància de *Scenedesmus* (24–50%) i *Chlorococcal* unicel. indet. 1 (13–20%) a tots els tractaments respecte el propi control (amb abundàncies 3,9% i 1,6%, respectivament) (Figura 5), i també respecte els tractaments de l'inici de l'exposició (Figura 4), ja que aquests tàxons van augmentar la seva abundància alhora que la de la resta de tàxons disminuïa. El mateix succeïa en el

cas d'*Aphanocapsa* als tractaments 14, 29, 43, 58 i 100% i d'*Achnanthes* cf. als tractaments 58, 86 i 100% (Figura 5). D'altra banda, *Achnanthes*, *Cymbella*, *Navicula* i *Audouinella* eren molt abundants al control (amb abundàncies 13,4%, 14,6%, 8,7% i 7,29%, respectivament) però a la resta de tractaments del final de l'exposició no ho eren (Figura 5).

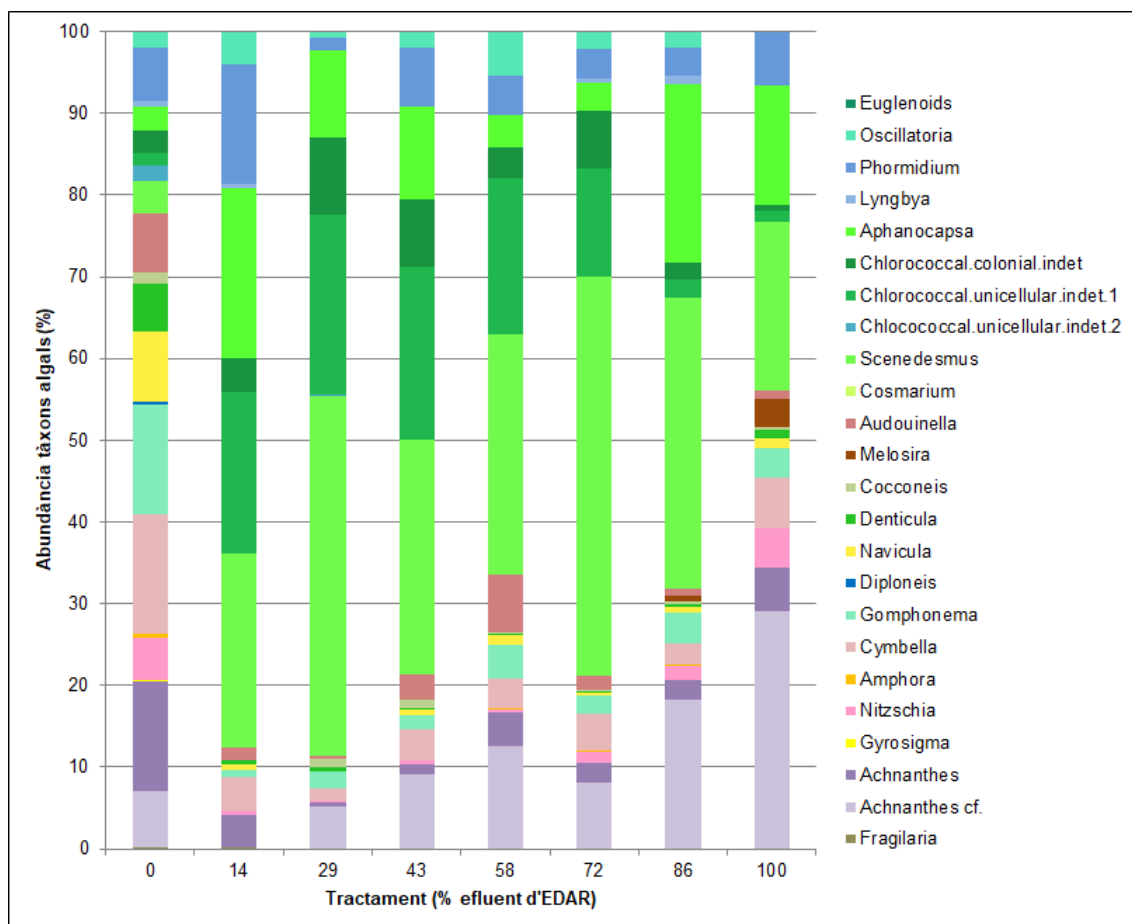


Figura 5. Abundància relativa dels tàxons algal·s identificats pels diferents tractaments al final de la exposició (dia 29).

Finalment, pel que fa a la comunitat del final de la recuperació, novament el control diferia tant de l'inici com del final de l'exposició (Figures 4, 5 i 6). Concretament, l'abundància d'*Achnanthes* cf. (8,7%), *Chlorococcal* unic. indet. 1 (12,2%) i de *Phormidium* (23,9%) augmentava respecte els altres dies de l'experiment (Figures 4, 5 i 6). D'altra banda, al final de la recuperació tots els tractaments excepte el 86 i el 100% presentaven una major abundància de *Phormidium* (23–47%) mentre que la majoria dels tàxons restants de la comunitat tenien una abundància molt reduïda en comparació amb l'inici i el final de l'exposició (Figura 4, 5 i 6). D'aquesta manera, els únics tàxons que no van patir una forta reducció de la seva abundància (excepte al control) eren *Scenedesmus* (13–38%) i *Aphanocapsa* (13–34%), la qual cosa no diferia del final de l'exposició però sí de l'inici (Figures 4, 5 i 6). En contrast, el tractament del 100% presentava un increment de l'abundància de tàxons com *Gomphonema* (6,7%),

Melosira (7,4%) i *Audouinella* (7,2%) en comparació amb la resta de tractaments (1,5–2,5%, 0,0–0,7% i 0,1–1,7%, respectivament) (Figura 6).

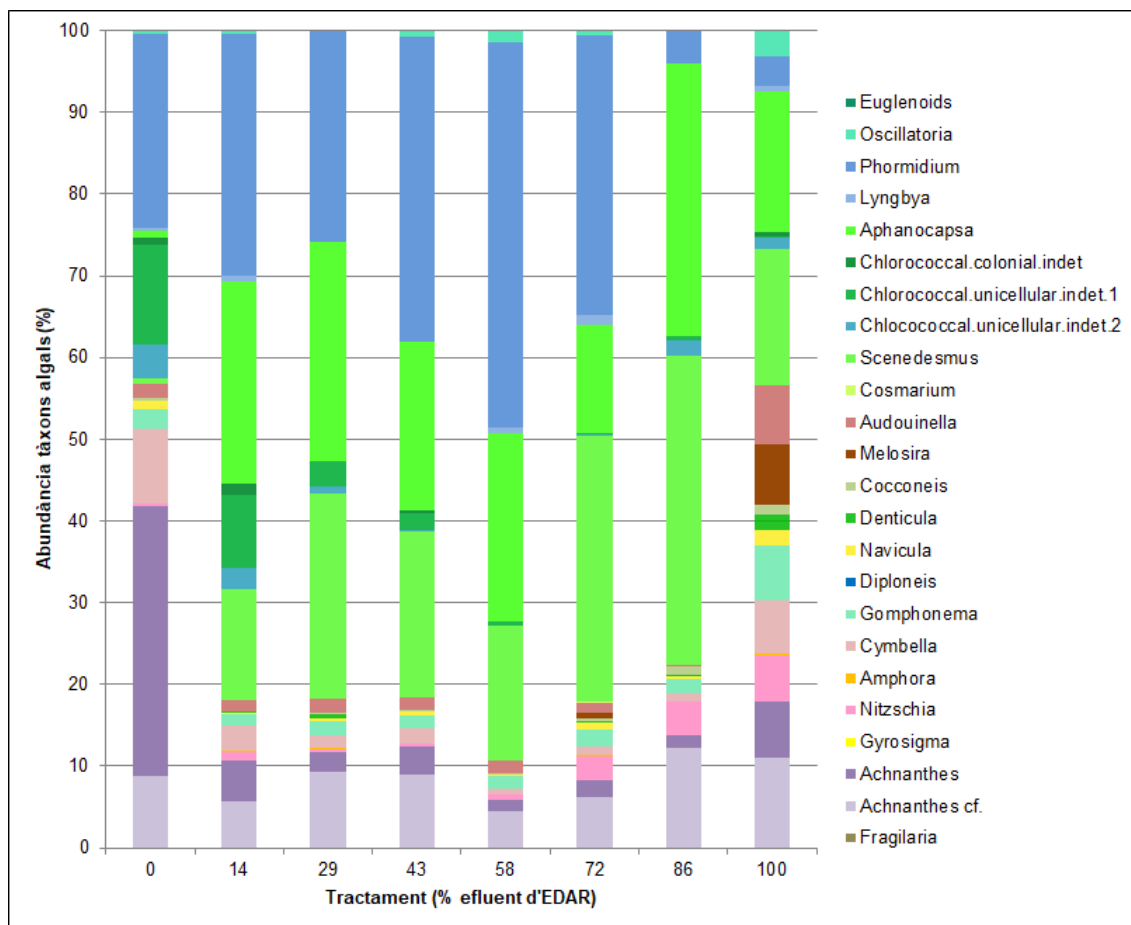


Figura 6. Abundància relativa dels tàxons algals identificats pels diferents tractaments al final de la recuperació (dia 49).

➤ Riquesa i diversitat dels tàxons

La comunitat algal present a l'inici de l'exposició tenia una riquesa i una diversitat elevada tant al control (15 ± 2 tàxons i $2,2 \pm 0,2$, respectivament) com al 100% ($16,3 \pm 0,6$ tàxons i $2,4 \pm 0,17$, respectivament). D'altra banda, al final de l'exposició el control presentava una major riquesa ($17,3 \pm 0,6$ tàxons) respecte al control de l'inici de l'exposició, però conforme s'aplicava més efluent d'EDAR la riquesa disminuïa fins arribar a $13,7 \pm 0,6$ tàxons al 100%. De la mateixa manera, la diversitat també era més elevada al control al final de l'exposició ($2,5 \pm 0,2$) en comparació amb el control de l'inici de l'exposició i conforme es passava a tractaments més elevats aquesta disminuïa fins arribar a $2 \pm 0,2$ al 100%. Pel que fa al final de la recuperació, tant la riquesa com la diversitat eren més elevades al 100% (16 ± 0 tàxons i $2,3 \pm 0,12$, respectivament) que no pas al control ($13,3 \pm 0,6$ tàxons i $1,9 \pm 0,11$, respectivament).

Taula 3. Mitjana i desviació estàndard dels índexs de riquesa (S) i de diversitat de Shannon (H') mesurats per cadascun dels tractaments als dies 8, 29 i 49 de l'experiment.

Dia experiment	Tractament (% efluent d'EDAR)	Índex de Riquesa (nº tàxons)	Índex de Shannon
8	0	15,00 ± 2,00	2,21 ± 0,16
	14	14,33 ± 1,53	2,19 ± 0,13
	29	17,67 ± 0,58	2,45 ± 0,03
	43	16,00 ± 2,65	2,28 ± 0,07
	58	15,00 ± 1,00	2,30 ± 0,09
	72	15,00 ± 1,73	2,25 ± 0,23
	86	16,00 ± 1,00	2,37 ± 0,14
	100	16,33 ± 0,58	2,42 ± 0,17
29	0	17,33 ± 0,58	2,46 ± 0,19
	14	13,00 ± 2,00	1,88 ± 0,15
	29	11,00 ± 2,65	1,57 ± 0,25
	43	14,00 ± 1,00	1,98 ± 0,30
	58	14,00 ± 1,00	2,06 ± 0,04
	72	12,67 ± 1,53	1,57 ± 0,44
	86	15,00 ± 1,00	1,80 ± 0,17
	100	13,67 ± 0,58	1,96 ± 0,17
49	0	13,33 ± 0,58	1,87 ± 0,11
	14	13,00 ± 1,73	1,71 ± 0,22
	29	13,00 ± 2,00	1,72 ± 0,17
	43	12,33 ± 3,22	1,60 ± 0,38
	58	12,33 ± 1,16	1,40 ± 0,33
	72	14,33 ± 2,52	1,57 ± 0,34
	86	10,33 ± 1,16	1,51 ± 0,17
	100	16,00 ± 0,00	2,29 ± 0,12

➤ Tàxons característics

Tots els tàxons identificats com a característics per a un determinat dia o tractament tenien un p-valor igual o inferior a 0,05, és a dir, eren significativament característics.

Els grups característics de la comunitat algal a l'inici de l'exposició eren Ochrophyta (IndVal = 0,6) i Rodophyta (IndVal = 0,5), el primer dels quals incloïa els tàxons *Gomphonema* (IndVal = 0,7), *Oscillatoria* (IndVal = 0,6), *Cymbella* (IndVal = 0,6), *Fragilaria* (IndVal = 0,6), *Navicula* (IndVal = 0,6) i *Cocconeis* (IndVal = 0,5) i el darrer incloïa *Audouinella* (IndVal = 0,6) (Taula 4). El grup característic al final de l'exposició era Chlorophyta (IndVal = 0,5), el qual incloïa els tàxons *Chlorococcal* unicel. indet. 1 (IndVal = 0,6), *Chlorococcal* unicel. indet. 2 (IndVal = 0,7) i *Scenedesmus* (IndVal = 0,5) (Taula 4). El grup característic del final de la recuperació era Cyanobacteria (IndVal = 0,5) i aquest incloïa els tàxons *Phormidium* (IndVal = 0,6) i *Aphanocapsa*

(IndVal = 0,6) (Taula 4). D'altra banda, el tàxon característic del tractament 100% era *Nitzschia* (IndVal = 0,3) (Taula 5).

Taula 4. Grups i tàxons característics dels dies 8, 29 i 49 de l'experiment segons l'IndVal.

		Dia experiment	IndVal	p-valor	Freqüència
Grup característic	Rodophyta	8	0,56	0,01	24
	Ochrophyta	8	0,50	0,00	24
	Chlorophyta	29	0,47	0,02	24
	Cyanobacteria	49	0,52	0,01	24
Tàxon característic	Gomphonema	8	0,69	0,00	24
	Oscillatoria	8	0,64	0,01	21
	Cymbella	8	0,62	0,00	24
	Fragilaria	8	0,62	0,01	13
	Navicula	8	0,61	0,04	23
	Audouinella	8	0,56	0,01	24
	Cocconeis	8	0,49	0,05	22
	Chlorococcal unicel. indet. 1	29	0,58	0,03	24
	Scenedesmus	29	0,51	0,01	24
	Chlorococcal unicel. indet. 2	49	0,74	0,01	9
	Phormidium	49	0,63	0,00	24
	Aphanocapsa	49	0,60	0,00	24

Taula 5. Tàxons característics del tractament 100% segons l'IndVal.

Tàxon característic	Tractament (% efluent d'EDAR)	IndVal	p-valor	Freqüència
Nitzschia	100	0,30	0,01	24

Evolució de la comunitat algal

El PCA realitzat a partir de les abundàncies relatives dels tàxons de la comunitat algal explicava un 24,4% de la variació a la primera component principal (Figura 7). Aquest eix separava la gran contribució de les diatomees (localitzades a la part dreta) de la contribució dels cianobacteris i les algues verdes (localitzats a la part esquerra) (Figura 7). Concretament, les diatomees que més contribuïen a la primera component eren *Navicula*, *Gomphonema*, *Achnanthes*, *Cymbella*, els cianobacteris que més contribuïen eren *Aphanocapsa* i *Oscillatoria* i l'alga verda que més contribuïa era *Scenedesmus* (Figura 7). De la mateixa manera, pel que fa a la segona component (la qual explicava

un 11,9% de la variació) la diatomea que més contribuïa era *Nitzschia* i les algues verdes que més contribuïen eren *Chlorococcal unic. indet. 1* i *Chlorococcal colonial indet.* Així doncs, la primera component resumeix la distribució dels tàxons de la comunitat durant el temps d'exposició a l'efluent d'EDAR, mentre que la segona component indica la distribució dels tàxons de la comunitat al llarg del gradient d'efluent d'EDAR. En el primer cas, els tàxons menys tolerants a l'efluent es localitzen a la dreta i els més tolerants a l'esquerra, mentre que en el segon cas els tàxons més tolerants són precisament els que contribueixen més a aquesta component.

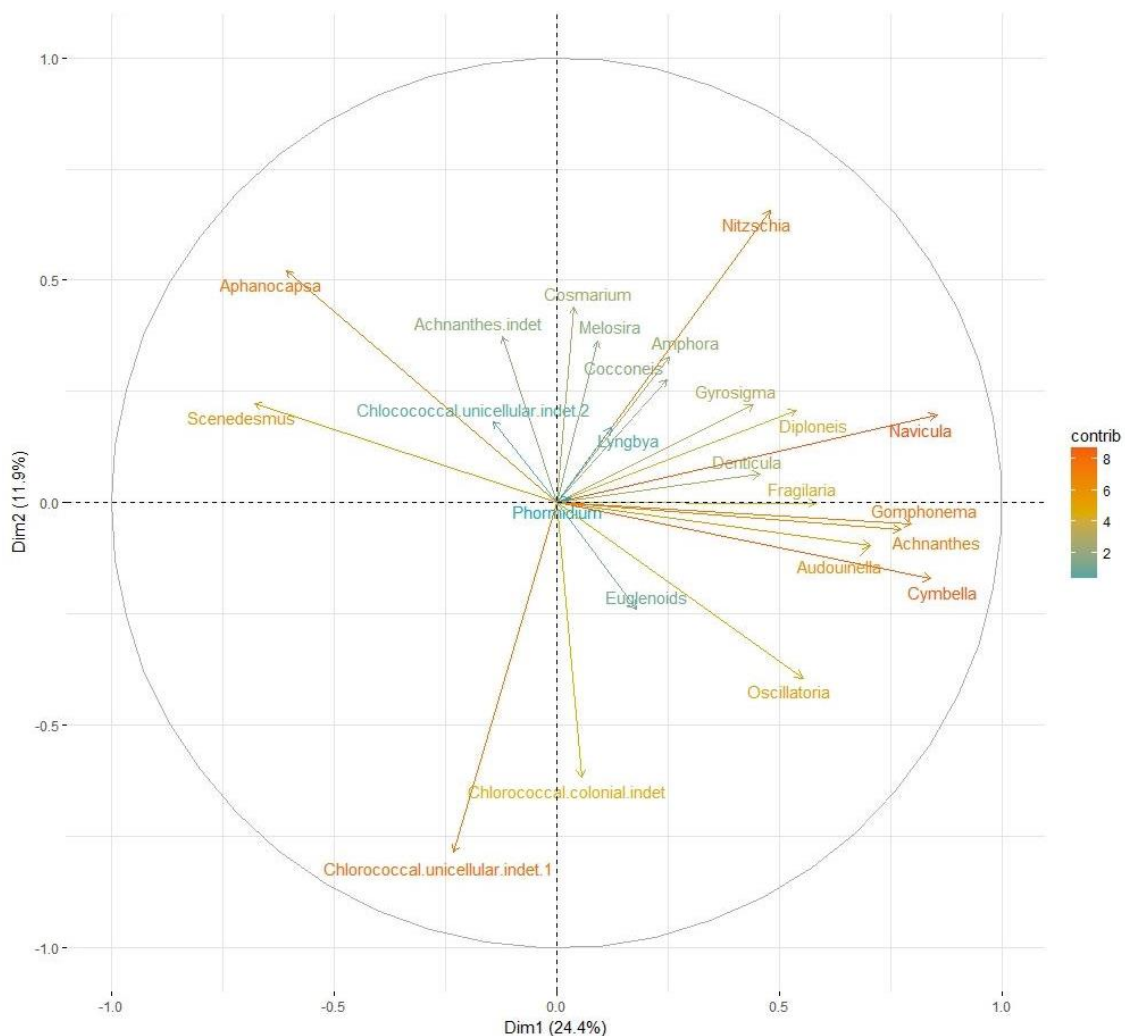


Figura 7. Anàlisi de Components Principals (PCA) basat en les abundàncies relatives dels tàxons que conformen la comunitat algal. La llargada i la direcció dels vectors reflecteix la importància de la contribució de cadascuna de les variables a cadascun dels dos eixos. De la mateixa manera, les variables que contribueixen més a qualsevol dels dos eixos es representen de color vermell i aquelles que contribueixen menys es representen de color blau. La primera component principal (Dim1) explica un 24,4% de la variabilitat i la segona component principal (Dim2) explica un 11,9% de variabilitat.

Els scores de la primera component principal indica la distribució des de l'inici de l'exposició (localitzat a la part dreta) al final de l'exposició i de la recuperació (expandits des del centre cap a la part esquerra) (Figura 8). El segon eix (el qual

explica un 11,3% de la variació total) separa el gradient dels tractaments aplicats tot i que sense descriure un patró de distribució definit (Figura 8).

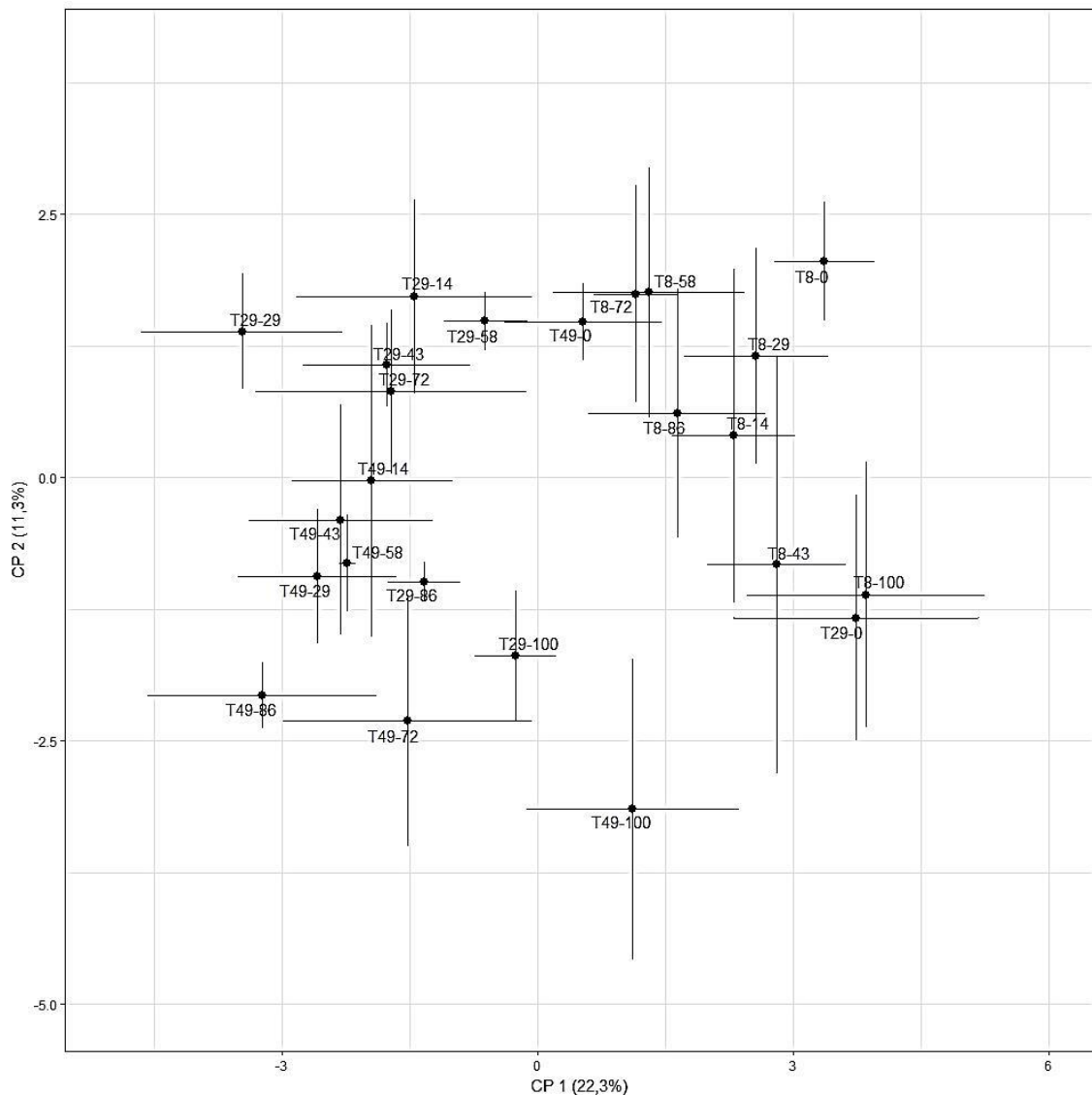


Figura 8. Anàlisi de Components Principals (PCA) que indica la mitjana dels scores de les dues primeres components principals. La primera component principal (CP1) explica un 22,3% de la variabilitat i la segona component principal (CP2) explica un 11,3% de variabilitat.

Per tant, els tractaments 0, 29, 14, 43 i 100% de l'inici de l'exposició juntament amb el tractament 0% del final de l'exposició presentaven una contribució molt marcada per part de les diatomees *Achnanthes*, *Cymbella*, *Gomphonema* i *Navicula* i també per part de l'alga verda *Scenedesmus* a la primera component principal, anàlogament al que es va obtenir anteriorment (Figures 7 i 8). A més, els tractaments 14, 29 i 43% del final de l'exposició juntament amb els tractaments 29, 43, 58 i 86% del final de la recuperació presentaven una contribució molt marcada per part de les algues verdes *Scenedesmus* i el cianobacteri *Aphanocapsa* a la primera component principal, anàlogament al que es va obtenir anteriorment (Figures 7 i 8). Per altra part, els

tractaments 0, 58 i 72% de l'inici de l'exposició presentaven una contribució molt marcada per part de les diatomees *Achnanthes*, *Cymbella* i *Gomphonema* i també per part de les algues verdes *Scenedesmus*, *Chlorococcal* unic. indet. 1 i *Chlorococcal* colonial indet. a la segona component principal, anàlogament al que es va obtenir anteriorment (Figures 7 i 8). També els tractaments 14, 29, 43, 58 i 72% del final de l'exposició presenten una contribució molt marcada per part de les algues verdes *Scenedesmus* i *Chlorococcal* unic. indet. 1 i *Chlorococcal* colonial indet. i el cianobacteri *Aphanocapsa* a la segona component principal, anàlogament al que es va obtenir anteriorment (Figures 7 i 8). De la mateixa manera, els tractaments 72, 86 i 100% del final de la recuperació presenten una contribució marcada per part de l'alga verda *Scenedesmus* i del cianobacteri *Aphanocapsa* a la segona component principal (Figura 8).

Relació entre la comunitat algal i la química de l'aigua

Les variables químiques relacionades significativament (p -valor $< 0,05$) amb la primera component principal (CP1) són els nitrats i el DIN amb coeficients de correlació (ρ) de 0,4 i 0,3, respectivament. De la mateixa manera, els nitrats i el DIN es relacionen negativament (i de manera significativa) amb la segona component principal (CP2) amb coeficients de correlació (ρ) de -0,3 i -0,2, respectivament. D'aquesta manera, es considera que les relacions de les variables químiques amb les dues primeres components tenen una associació mitjana ($\rho \approx 0,3$).

Taula 7. Correlacions de Spearman entre les dues primeres components principals (CP1 i CP2) i les variables químiques mesurades per cadascun dels tractaments als dies 8, 29 i 49 de l'experiment. Els valors indicats en negreta corresponen a correlacions significatives amb un p -valor $< 0,05$.

	CP1	CP2	NO ₂	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	DIN	PO ₄ ³⁻	CI	TOC
CP1	1	-0,04	0,36	-0,20	0,16	0,30	0,12	0,09	0,10
CP2	-0,04	1	-0,32	-0,15	-0,16	-0,24	-0,07	-0,21	-0,19
NO ₂	0,36	-0,32	1	-0,02	0,87	0,89	0,78	0,87	0,88
NO ₃ ⁻	-0,20	-0,15	-0,02	1	0,07	0,30	0,33	0,20	0,07
NH ₄ ⁺	0,16	-0,16	0,87	0,07	1	0,89	0,86	0,92	0,94
DIN	0,30	-0,24	0,89	0,30	0,89	1	0,88	0,93	0,87
PO ₄ ³⁻	0,12	-0,07	0,78	0,33	0,86	0,88	1	0,87	0,84
CI	0,09	-0,21	0,87	0,20	0,92	0,93	0,87	1	0,93
TOC	0,10	-0,19	0,88	0,07	0,94	0,87	0,84	0,93	1

DISCUSSIÓ

Variables químiques durant l'experiment

Les diferències entre tractaments a cadascuna de les variables són més marcades al final de l'exposició, ja que l'ingrés dels components de l'efluent s'ha donat de manera perllongada en el temps. En el cas de l'oxigen, la seva disminució durant les fases d'exposició s'explica perquè quan augmenta la disponibilitat de nutrients hi ha més organismes realitzant la respiració. Pel que fa als nitrats, són molt abundants al tractament del 100% a l'inici de l'exposició, mentre que la concentració de nitrats és comparativament més baixa; això s'explica perquè els nitrats precisen d'oxigen per passar a nitrats, el qual és baix en tractaments elevats, tot i que al final de l'exposició els nitrats són elevats perquè l'efluent va carregat d'aquests. Al final de la recuperació, les variables químiques presenten valors estables generalment a tots els tractaments, ja que no hi ha entrada d'efluent als canals. L'oxigen dissolt i la conductivitat són excepcions, ja que el primer disminueix i la segona augmenta, tot indicant que la comunitat no s'ha recuperat completament.

Resposta de la comunitat d'algues

Els resultats revelen que als tractaments control dels diferents dies analitzats hi ha una successió natural, on a tots ells generalment predominen les diatomees però la composició taxonòmica canvia. A la resta de tractaments es produeixen canvis en la composició de la comunitat algal com a conseqüència de la creixent descàrrega de substàncies orgàniques i inorgàniques. El canvi de dominància de diatomees a l'inici de l'exposició a algues verdes al final de l'exposició indica que les algues verdes són competidores més eficients que les diatomees envers les condicions establertes per l'efluent, ja que les diatomees responen de manera directa i sensible a canvis químics, físics i biològics específics (Hill et al., 2001; Stevenson, Pan & van Dam, 2010). Així doncs, l'augment de diatomees a l'inici de l'exposició al tractament del 14% i l'augment d'algues verdes al 29% respecte al control indica que les diatomees són tolerants a la presència d'efluent fins a una determinada concentració o llindar, ja que la situació canvia amb l'alteració de les condicions. D'altra banda, l'establiment de la comunitat té lloc en períodes de temps que van des de setmanes fins a anys (Lavoie, Campeau, Darchambeau, Cabana & Dillon, 2008) i aquest depèn dels factors ambientals (Biggs, 1996; Stevenson, 1997). Per tant, tot i haver aplicat efluent pur durant molt poc temps (inici de l'exposició) les diatomees són més abundants al tractament del 100% que al control perquè la comunitat encara no ha tingut temps per experimentar grans canvis. Al final de l'exposició les diatomees continuen dominant al tractament del 100% a

través de tàxons tolerants a les condicions imposades per l'efluent, i és que el gènere *Achnanthes* és un dels més tolerants a pertorbacions (Palmer, 1969). Així mateix, *Scenedesmus* augmenta al final de l'exposició de manera generalitzada a tots els tractaments, ja que també és un dels gèneres més tolerants a la contaminació d'aigües (Palmer, 1969; Jafari & Gunale, 2006; Wu, Song & Li, 2008). Al final de la recuperació les diatomees són dominants als tractaments 0% i 100%. Al 100% augmenten *Gomphonema*, *Melosira* i *Audouinella* respecte a la resta de tractaments, la qual cosa s'explica perquè *Gomphonema* i *Melosira* també són gèneres tolerants a la contaminació d'aigües (Palmer, 1969; Garg & Garg, 2003; Jafari & Gunale, 2006). En contrast, a la resta de tractaments del final de la recuperació les algues verdes dominen la comunitat, concretament els tàxons *Scenedesmus* i *Chlorococcal unic. indet. 1*. En aquest sentit, la comunitat al final de la recuperació és molt similar a la que hi ha al final de l'exposició, però amb la diferència que els cianobacteris són més abundants a la majoria dels canals. Així doncs, els tàxons *Phormidium* i *Aphanocapsa* són molt abundants (excepte als tractaments 86 i 100%), dels quals *Phormidium* també es considera un dels gèneres més tolerants a la contaminació de les aigües (Palmer, 1969; Loza, Perona, Carmona & Mateo, 2013). Tenint en compte tot això, és evident que la comunitat algal no s'ha recuperat o almenys no en direcció cap a l'estat inicial.

Els resultats també mostren com a l'inici de l'exposició es parteix d'una comunitat diversa, on hi ha molts tàxons poc abundants i únicament uns pocs dominen i són, per tant, tolerants a l'efluent. Al final de la exposició hi ha una pèrdua de riquesa i de diversitat a causa de l'efecte de l'efluent. D'aquesta manera, es passa a obtenir una comunitat algal formada per pocs tàxons i molt abundants, és a dir, es constitueix un *pool* de tàxons a causa de l'augment de *Scenedesmus* i *Chlorococcal. unic. indet. 1*, entre d'altres. Al final de la recuperació, la riquesa i la diversitat segueixen sent inferiors respecte a les fases d'exposició exceptuant el tractament del 100%, on augmenten lleugerament respecte al final de l'exposició. Això pot ser resultat al canal corresponent al 100% d'unes condicions que han canviat sobtadament, és a dir, ha passat d'exposar-se a efluent pur a exposar-se a aigua neta. Així doncs, al donar-se un canvi de condicions bruscament, la comunitat algal incorpora espècies resistents amb d'altres menys tolerants i això deriva en un augment de la riquesa.

Tal i com s'ha vist anteriorment, les diatomees són clarament el grup característic de l'inici de l'exposició, concretament els tàxons *Gomphonema*, *Cymbella*, *Fragilaria*, *Navicula* i *Cocconeis*. *Gomphonema*, *Cymbella* i *Navicula* tenen una elevada abundància a l'inici de l'exposició però al final de l'exposició i de la recuperació

aquesta disminueix. En el cas de *Fragilaria* i *Cocconeis*, tot i no ser els tàxons més abundants a l'inici de l'exposició, com a la resta de dies són gairebé inexistent són característics del dia 8. Les algues verdes són característiques del final de l'exposició, ja que tal i com s'ha vist anteriorment l'abundància dels tàxons *Chlorococcal* unic. indet. 1 i *Scenedesmus* augmenta sobtadament respecte a l'inici de l'exposició. De la mateixa manera, els cianobacteris són característics del final de la recuperació, concretament *Phormidium* i *Aphanocapsa*. A més, *Chlorococcal* unicel. indet. 2 (alga verda) també s'ajusta fortament a l'índex de caracterització en aquesta etapa, ja que gairebé no està present a les etapes d'exposició però al final de la recuperació té una abundància relativa més elevada, és a dir, tot i no ser dels tàxons més abundants la seva presència és rellevant a la darrera etapa. També cal tenir en compte que tot i no ajustar-se massa bé a l'índex de caracterització, el tàxon *Nitzschia* és característic del tractament 100%, ja que a aquest tractament té una abundància lleugerament més elevada que a la resta de tractaments. A més, *Nitzschia* conté moltes espècies reconegudes com a tolerants a la contaminació (Cholnoky, 1968; Palmer, 1969; Lowe, 1974; Patrick, 1977).

A l'espai ecològic delimitat al PCA, la primera component principal del PCA és la millor descriptora dels patrons de distribució de les comunitats algals amb el pas del temps. Així doncs, la comunitat algal passa d'estar constituïda principalment per les diatomees *Navicula*, *Gomphonema*, *Cymbella* i *Achnanthes* a l'inici de l'exposició, mentre que al final de l'exposició i de la recuperació dominen les algues verdes (entre les quals destaca *Scenedesmus*) i els cianobacteris (entre els quals destaca *Aphanocapsa*). D'altra banda, segons el tractament al qual estigui sotmès la mostra, la composició de la comunitat algal també es veu alterada tot i que les diferències no són tant a nivell de canvi en els tàxons que la conformen sinó en les variacions de l'abundància dels tàxons.

Causes de la variació a la comunitat d'algues durant l'experiment

Les variables químiques relacionades significativament amb les dues primeres components del PCA són els nitrats i el DIN, la qual cosa fa referència a que d'entre els nutrients, el nitrogen és el més rellevant per la distribució de la comunitat algal. De fet, aquest nitrogen prové de la matèria orgànica no degradada completament per part de l'EDAR (Carey & Migliaccio, 2009). El fet que siguin aquests els elements que afecten a la composició de la comunitat s'explica perquè la fotosíntesi algal incrementa quan augmenta la disponibilitat dels nutrients, és a dir, nitrogen, fòsfor i ferro (Moroney,

2001), ja que el nitrogen és un factor limitant de la productivitat primària a molts ecosistemes (Bernhard, 2010).

Paral·lelament, les variables químiques analitzades estan relacionades entre elles en menor o major mesura, ja que l'efluent va carregat amb tots aquests components (en concentracions determinades) i la relació entre elles ve determinada per les concentracions presents en el propi efluent, les quals poden variar.

Consideracions generals de l'estudi

La utilització dels mesocosmos ha possibilitat el control rigorós dels estressors ecològics i alhora la disposició de suficient poder de detecció dels principals efectes i les interaccions (Sabater & Borrego, 2015). D'aquesta manera, l'ús dels mesocosmos ha permès la reducció de la variabilitat ambiental alhora que ha incrementat la replicació, amb la qual cosa s'ha obtingut robustesa estadística de les observacions realitzades (Sabater & Borrego, 2015).

En referència a la primera hipòtesi d'aquest estudi, es compleix per una part, ja que l'efluent provoca canvis en la composició de la comunitat algal. D'altra banda, però, no hi ha una relació inversa entre la diversitat i la quantitat d'efluent aplicat en el cas de l'inici de l'exposició. Posteriorment, al final de l'exposició sí que es dona de manera general una reducció de la diversitat conforme augmenta el percentatge d'efluent d'EDAR aplicat.

Pel que fa a la segona hipòtesi, aquesta es compleix, ja que amb l'exposició a l'efluent la composició de la comunitat algal canvia de tal manera que la riquesa i la diversitat de la comunitat disminueix i passa a estar formada per poques espècies molt abundants (dominants, tolerants a l'efluent) mentre que la resta d'espècies disminueix la seva abundància pel fet de ser sensibles a l'efluent.

La tercera hipòtesi es compleix parcialment, ja que els resultats obtinguts revelen una successió de la comunitat algal al llarg de la fase d'exposició envers tàxons tolerants. Pel que fa a la fase de recuperació, no hi ha una successió de tàxons de manera evident a tots els canals que afavoreixi el restabliment d'espècies sensibles a l'efluent i, per tant, no es compleix la hipòtesi per aquesta part.

Finalment, seria interessant analitzar la composició de la comunitat algal a un llarg termini més gran en futurs estudis, ja que en l'estudi present no s'ha pogut visualitzar una recuperació d'aquesta després de l'exposició a l'efluent d'EDAR. A més, seria molt profitós realitzar propers estudis a nivell d'espècies per tal de superar les limitacions

que ha presentat aquest estudi. De la mateixa manera, estudis futurs haurien de centrar l'atenció en analitzar l'efecte conjunt dels contaminants orgànics, metalls pesants i nutrients presents en l'efluent d'EDAR, ja que en el present estudi només s'han considerat les dades corresponents als nutrients, per tal d'aconseguir realitzar una millor interpretació de la resposta de les comunitats algals.

CONCLUSIONS

The conclusions derived from this study are the following:

- The WWTP effluent gradient exposure affects the structure and the composition of the algal community from epilithic biofilm, where the most sensitive taxa are affected and the tolerant ones are favored up to a certain threshold
- The WWTP effluent gradient long-term exposure decreases the diversity of the algal community
- The algal community requires more than 20 days to recover from long-term WWTP effluent gradient exposure
- The environmental risk of WWTP effluents on the algal communities is high and produces long lasting and persistent effects
- The analysis of more chemical variables (such as pesticides and heavy metals) are needed to determine which exactly causes changes in the algal community

BIBLIOGRAFIA

- Altenburger, R., Ait-Aissa, S., Antczak, P., Backhaus, T., Barceló, D., Seiler, T. B., ... & de Aragão Umbuzeiro, G. (2015). Future water quality monitoring—adapting tools to deal with mixtures of pollutants in water resource management. *Science of the total environment*, 512, 540-551.
- Aristi, I., Schiller, D., Arroita, M., Barceló, D., Ponsatí, L., García-Galán, M. J., ... & Acuña, V. (2015). Mixed effects of effluents from a wastewater treatment plant on river ecosystem metabolism: subsidy or stress?. *Freshwater biology*, 60(7), 1398-1410.
- Barber, L. B., Keefe, S. H., Brown, G. K., Furlong, E. T., Gray, J. L., Kolpin, D. W., ... & Zaugg, S. D. (2013). Persistence and potential effects of complex organic contaminant mixtures in wastewater-impacted streams. *Environmental science & technology*, 47(5), 2177-2188.
- Barceló, D., & Sabater, S. (2010). Water quality and assessment under scarcity: prospects and challenges in Mediterranean watersheds. *J Hydrol*, 383(1-2), 1-4
- Battin, T. J., Besemer, K., Bengtsson, M. M., Romani, A. M., & Packmann, A. I. (2016). The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 14(4), 251.
- Bernhard, A. (2010) The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. *Nat. Educ. Knowl.* 2(2), 12
- Biggs, B. J. (1996). Patterns in benthic algae of streams. *Algal ecology: freshwater benthic ecosystems*, 31-56.

- Camargo, J. A., & Alonso, Á. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environment international*, 32(6), 831-849.
- Cardinale, B. J., Duffy, J. E., Gonzalez, A., Hooper, D. U., Perrings, C., Venail, P., ... & Kinzig, A. P. (2012). Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature*, 486(7401), 59.
- Cardinale, B. J., Srivastava, D. S., Duffy, J. E., Wright, J. P., Downing, A. L., Sankaran, M., & Jouseau, C. (2006). Effects of biodiversity on the functioning of trophic groups and ecosystems. *Nature*, 443(7114), 989.
- Carey, R. O., & Migliaccio, K. W. (2009). Contribution of wastewater treatment plant effluents to nutrient dynamics in aquatic systems: a review. *Environmental Management*, 44(2), 205-217.
- Carpenter, S. R., Caraco, N. F., Correll, D. L., Howarth, R. W., Sharpley, A. N., & Smith, V. H. (1998). Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecological applications*, 8(3), 559-568.
- Cholnoky, B. J. (1968). *Die ökologie der Diatomeen in Binnengewässern*. Cramer.
- Chonova, T., Labanowski, J., Cournoyer, B., Chardon, C., Keck, F., Laurent, É., ... & Bouchez, A. (2018). River biofilm community changes related to pharmaceutical loads emitted by a wastewater treatment plant. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(10), 9254-9264.
- Connor, R., Renata, A., Ortigara, C., Koncagül, E., Uhlenbrook, S., Lamizana-Diallo, B. M., ... & Hendry, S. (2017). The united nations world water development report 2017. wastewater: The untapped resource. *The United Nations World Water Development Report*.
- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., & Hartemann, P. (2011). Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *International journal of hygiene and environmental health*, 214(6), 442-448.
- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z. I., Knowler, D. J., Lévêque, C., ... & Sullivan, C. A. (2006). Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological reviews*, 81(2), 163-182.
- Dufrêne, M., & Legendre, P. (1997). Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological monographs*, 67(3), 345-366.
- Elosegi, A., & Sabater, S. (2009). *Conceptos y técnicas en ecología fluvial*. Recuperat de https://www.fbbva.es/wp-content/uploads/2017/05/dat/DE_2009_conceptos_ecologia_fluvial.pdf
- Elosegi, A., & Sabater, S. (2013). *River conservation: Challenges and Opportunities*. Recuperat de http://www.grupobbva.com/TLFU/dat/DE_2013_river_conservation.pdf
- Garg, J., & Garg, H. K. (2003). Algae as indicators of eutrophication: A microcosmal approach. *Environment and Ecology*, 21(2), 313-316.
- Hill, B. H., Stevenson, R. J., Pan, Y., Herlihy, A. T., Kaufmann, P. R., & Johnson, C. B. (2001). Comparison of correlations between environmental characteristics and stream diatom assemblages characterized at genus and species levels. *Journal of the North American Benthological Society*, 20(2), 299-310.
- Jafari, N. G., & Gunale, V. R. (2006). Hydrobiological study of algae of an urban freshwater river. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 10(2).
- Lavoie, I., Campeau, S., Darchambeau, F., Cabana, G., & Dillon, P. J. (2008). Are diatoms good integrators of temporal variability in stream water quality?. *Freshwater Biology*, 53(4), 827-841.

- Lowe, L. R. (1974). Environmental requirements and pollution tolerance of freshwater diatoms. *National environmental research Center*, 333.
- Loza, V., Perona, E., Carmona, J., & Mateo, P. (2013). Phenotypic and genotypic characteristics of Phormidium-like cyanobacteria inhabiting microbial mats are correlated with the trophic status of running waters. *European Journal of Phycology*, 48(2), 235-252.
- Minshall, G. W. (1978). Autotrophy in stream ecosystems. *BioScience*, 28(12), 767-771.
- Moroney, J. V. (2001). Algal photosynthesis. e LS.
- Necchi Jr., O. (2016). *River Algae*. (1a ed.). São José do Rio Preto: Springer.
- Odum, E. P., Finn, J. T., & Franz, E. H. (1979). Perturbation theory and the subsidy-stress gradient. *Bioscience*, 29(6), 349-352.
- Palmer, C. M. (1969). A Composite rating of algae tolerating organic pollution 2. *Journal of Phycology*, 5(1), 78-82.
- Patrick, R. (1977). Ecology of freshwater diatoms and diatom communities. *The biology of diatoms*, 13, 284-332.
- Ponsatí, L., Corcoll, N., Petrović, M., Picó, Y., Ginebreda, A., Tornés, E., ... & Sabater, S. (2016). Multiple-stressor effects on river biofilms under different hydrological conditions. *Freshwater Biology*, 61(12), 2102-2115.
- Prygiel, J., & Coste, M. (2000). Guide méthodologique pour la mise en oeuvre de l'Indice Biologique Diatomées NF T 90-354. *Agences de l'Eau*, 89.
- Rodriguez-Mozaz, S., Ricart, M., Köck-Schulmeyer, M., Guasch, H., Bonnineau, C., Proia, L., ... & Barceló, D. (2015). Pharmaceuticals and pesticides in reclaimed water: efficiency assessment of a microfiltration–reverse osmosis (MF–RO) pilot plant. *Journal of hazardous materials*, 282, 165-173.
- Romaní, A. M. (2009). Freshwater biofilms. *Biofouling*, 137.
- Sabater, S., & Borrego, C. (2015). Application of Microcosm and Mesocosm Experiments to Pollutant Effects in Biofilms. In *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols* (pp. 135-151). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Sabater, S., Barceló, D., De Castro-Català, N., Ginebreda, A., Kuzmanovic, M., Petrovic, M., ... & Muñoz, I. (2016). Shared effects of organic microcontaminants and environmental stressors on biofilms and invertebrates in impaired rivers. *Environmental pollution*, 210, 303-314.
- Shannon, C. E., & Weaver, W. (1948). A Mathematical Theory of Communication. *Bell. Syst. Techn. J*, 27, 379-423.
- Smith, V. H. (1998). Cultural eutrophication of inland, estuarine, and coastal waters. In *Successes, limitations, and frontiers in ecosystem science* (pp. 7-49). Springer, New York, NY.
- Smith, V. H. (2003). Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems a global problem. *Environmental Science and Pollution Research*, 10(2), 126-139.
- Stevenson, R. J. (1997). Scale-dependent determinants and consequences of benthic algal heterogeneity. *Journal of the North American Benthological Society*, 16(1), 248-262.
- Stevenson, R. J., Pan, Y., & van Dam, H. E. R. M. A. N. (2010). Assessing environmental conditions in rivers and streams with diatoms. *The diatoms: applications for the environmental and earth sciences*, 2, 57-85.

- Strayer, D. L., & Dudgeon, D. (2010). Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. *Journal of the North American Benthological Society*, 29(1), 344-358.
- Sutton, M. A., Oenema, O., Erisman, J. W., Leip, A., van Grinsven, H., & Winiwarter, W. (2011). Too much of a good thing. *Nature*, 472(7342), 159.
- Tchobanoglous, G., & F.L., Burton. (1991). *Wastewater engineering: Treatment, disposal, and reuse*. (3a ed.). New York: McGraw-Hill.
- Wehr, J. D., Sheath, R. G., & Kociolek, J. P. (Eds.). (2015). *Freshwater algae of North America: ecology and classification*. Elsevier.
- Wetzel, R. G. (2001). *Limnology: lake and river ecosystems*. (3a ed.). San Diego: Academic Press.
- Wilson, B. A., Smith, V. H., deNoyelles, F., & Larive, C. K. (2003). Effects of three pharmaceutical and personal care products on natural freshwater algal assemblages. *Environmental science & technology*, 37(9), 1713-1719.
- Wu, Z., Song, L., & Li, R. (2008). Different tolerances and responses to low temperature and darkness between waterbloom forming cyanobacterium *Microcystis* and a green alga *Scenedesmus*. *Hydrobiologia*, 596(1), 47-55.