

Universidad de Barcelona
Facultad de Biología
Departamento de Ecología

RESPUESTA ECOTOXICOLÓGICA DE COMUNIDADES MICROBENTÓNICAS DE RÍOS MEDITERRÁNEOS

Tesis doctoral presentada por Enrique Navarro Rodríguez
para optar al grado de Doctor en Biología
Programa de Ecología
Bienio 1996-1998



Universidad de Barcelona
Facultad de Biología
Departamento de Ecología

RESPUESTA ECOTOXICOLÓGICA DE COMUNIDADES MICROBENTÓNICAS DE RÍOS MEDITERRÁNEOS

Tesis doctoral presentada por Enrique Navarro Rodríguez
para optar al grado de Doctor en Biología
Programa de Ecología
Bienio 1996-1998

Vº y Bº del director de la tesis

Sergi Sabater i Cortés
Profesor titular de Ecología
Facultad de Biología

ÍNDICE

Agradecimientos	7
Capítulo 1: Introducción	
1.1 Antecedentes	9
1.2 Aproximaciones ecotoxicológicas	10
1.3 Uso de ríos artificiales	10
1.4. Efecto de los herbicidas sobre las comunidades de algas microbentónicas. El caso de la atrazina.	11
1.5. Efecto de los metales pesados sobre las comunidades de algas microbentónicas. El caso del cobre.	13
1.6. Objetivos generales de la investigación	15
1.7. Objetivos específicos de la investigación	16
Capítulo 2: Materiales y métodos	
2.1. Experimentación con canales artificiales	17
2.2. Análisis físicos y químicos	19
2.2.1. Analítica del agua y cálculo de la velocidad en los canales	19
2.2.2 Analítica de tóxicos	20
2.3. Análisis biológicos	20
2.3.1. Clorofilas	20
2.3.2. Valoración de la actividad fotosintética mediante incorporación de carbono-14	20
2.3.3. Valoración de la actividad fotosintética mediante fluorimetría	21
2.3.4. Composición y estructura de las comunidades microbentónicas	24
2.3.5. Observaciones con Microscopio Electrónico de Scanning	24
2.4. Confección de curvas dosis-respuesta, y cálculos de EC50, N.O.E.C. y F.E.C.	24
2.5. Herramientas estadísticas	25
Fotografías del capítulo 2	27
Capítulo 3: Influencia de la velocidad del agua en el efecto tóxico del cobre y la atrazina	
Influencia de la velocidad del agua en el efecto tóxico de la atrazina sobre las comunidades microbentónicas	33
3.1. Introducción	33
3.2. Material y métodos	34
3.3. Resultados	34
3.4. Discusión	35
Influencia de la velocidad del agua en el efecto tóxico del cobre sobre las comunidades microbentónicas	37
3.5. Introducción	37
3.6. Material y métodos	38
3.7. Resultados	40
3.8. Discusión	44

Capítulo 4: Influencia del herbivorismo en el efecto tóxico del cobre y la atrazina	49
Influencia del herbivorismo en el efecto tóxico de la atrazina sobre las comunidades microbentónicas	49
4.1. Introducción	49
4.2. Material y métodos	50
4.3. Resultados	52
4.4. Discusión	55
Influencia del herbivorismo en el efecto tóxico del cobre sobre las comunidades microbentónicas	57
4.5. Introducción	57
4.6. Material y métodos	58
4.7. Resultados	60
4.8. Discusión	63
Capítulo 5: Uso de las comunidades algales microbentónicas en tests ecotoxicológicos para la valoración de la calidad del agua. El caso del río Ter	67
5.1. Introducción	67
5.2. Material y métodos	68
5.3. Resultados	70
5.4. Discusión	72
Fotografías del capítulo 5	77
Capítulo 6: La respuesta ecotoxicológica en condiciones extremas: el caso del río Tinto	83
6.1. Introducción	83
6.2. Material y métodos	84
6.3. Resultados	86
6.4. Discusión	89
Fotografías del capítulo 6	95
Capítulo 7: Resumen y conclusiones	99
Bibliografía	103

AGRADECIMIENTOS

La lista de personas que de un modo u otro me han ayudado podría abarcar varias páginas. Seguramente me dejaré a alguien por el camino, pero espero que sepa perdonarlo. Si alguien cree que debería estar en esta lista y no lo está, que no se preocupe; ocupará siempre algún lugar entre mis recuerdos. Simplificando al máximo, la lista podría ser:

-A mi familia, Carmen, Enrique y Eduardo, que no ha dejado nunca de presionarme y animarme para que acabara lo que había empezado.

-A mi director, Sergi, por lo mismo que a mi familia. Además me ha enseñado que si quieres dedicarte a la ciencia, en general, y a la ecología en particular debes prestar atención a los detalles y mantener la capacidad de asombrarte e ilusionarte.

-A mis compañeros del grupo de trabajo, del despacho y del departamento. Para los que leáis estas líneas, sabed que habéis contribuido a hacer de mi estancia en el departamento uno de los periodos más felices de mi vida. No pongo nombres, por miedo a dejarme a alguno...pero os llevo a todos junto a los buenos momentos pasados en el departamento.

-Pero vamos a ver...¿cuándo lees?--; la eterna pregunta de mis amigos...esos amigos, con los que he compartido el tiempo de ocio durante estos años y que gracias a su lejanía con el departamento y con la ecología, me han ayudado a “desconectar” y a tener una visión más amplia y crítica de esta ciencia y de este estilo de vida. Además, el que mes tras mes tuviera que contestarles con la misma coletilla: -...dentro de tres meses...- también ha servido como acicate.

A Ricardo y al resto del personal del “Servicio de Campos experimentales de la Universidad de Barcelona”, su ayuda técnica en la fase de diseño y construcción del sistema de canales artificiales y el alojamiento una vez puesto en marcha.

A los “Servicios Científicos y Técnicos de la Universidad de Barcelona” el servicio prestado en forma de instalaciones y de apoyo técnico, en el trabajo de análisis de atrazina, cobre y nutrientes.

A los “Guasos”(encargados de parte del mantenimiento de la División III), la ayuda técnica y el material prestados durante todo este tiempo.

Además durante estos últimos años he disfrutado del soporte económico de tres proyectos europeos: “Effects of chemicals on benthic micro-algae in pristine and polluted european rivers: physiological tests or community analysis”(EV5VB-CT94-0402); “Microbenthic communities in european rivers used to assess effects of land-derived toxicans” (EV5VB-CT96-0298) y “Use of Biofilms as high-tech conditioners for drinking waters” (EV5VB-CT96-0298). También he recibido 3 ayudas económicas de la Universidad de Barcelona para asistir a congresos.

INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Anualmente la industria química fabrica 400 millones de toneladas de productos químicos en forma de 70.000 compuestos diferentes. Sobre el 75 % de ellos no se tienen datos precisos de su toxicidad (EEA-UNEP, 2000). Muchos de ellos, por su finalidad o por accidente acaban liberándose en el medio ambiente. La ecotoxicología es la parte de la toxicología que intenta conocer los efectos de estos productos cuando son liberados en los ecosistemas, como por ejemplo en los ríos.

Los ríos son, desde los albores de la civilización, una de las vías usadas por el hombre para desprenderse de parte de sus desechos. Desde esta posición de transportador entre la tierra y el mar, los sistemas fluviales han sido espectadores privilegiados de la evolución industrial y tecnológica del hombre, sufriendo en sus aguas los vertidos de sustancias cada vez más tóxicas para las comunidades naturales. Una parte del agua que circula por estos sistemas, llega directamente por precipitación de lluvia o nieve, pero la mayor parte llega tras circular sobre la superficie o tras infiltrarse en los terrenos de la cuenca (Giller *et al.*, 1998), entrando en íntimo contacto con todos los materiales depositados en ellos, incluyendo los tóxicos. Por este motivo los sistemas fluviales poseen un gran valor como puntos de control ecotoxicológico.

A lo largo del curso de un río encontramos un gradiente continuo de diferentes variables ambientales, que condicionan la distribución y actividad de las comunidades de organismos que podemos encontrar (Vannote *et al.*, 1980). Uno de los aspectos a tener en cuenta al trabajar con ríos mediterráneos es la marcada variabilidad espacial y temporal que presentan. La acentuada estacionalidad del caudal es una de las responsables de los cambios observados en el río y sus comunidades (Sabater *et al.*, 1989). Por este motivo, cualquier estudio que pretenda valorar la respuesta de las comunidades de este tipo de ríos, debe contemplar estudios en diferentes épocas del ciclo anual.

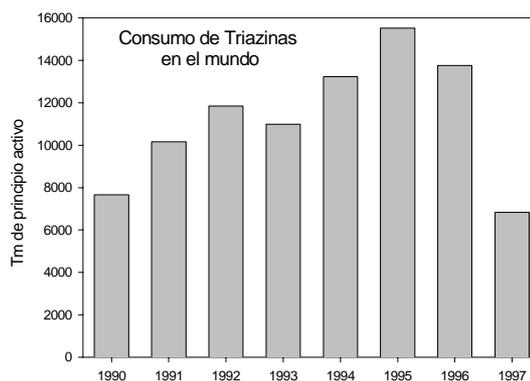
Un ecosistema fluvial funciona como un sistema de procesado y transporte de materiales orgánicos e inorgánicos. Estas funciones le son conferidas por sus características hidrodinámicas y por la presencia de comunidades de organismos. El término comunidad se refiere al conjunto de poblaciones de diferentes especies que interaccionan unas con otras coincidiendo en el tiempo y en el espacio (Krebs, 1985; Chapman and Reiss, 1992). La comunidad que nos interesa en este estudio es la compuesta por algas, hongos, bacterias y microinvertebrados que aparece compartiendo espacio con detritus y partículas minerales englobadas en una matriz gelatinosa de polisacáridos. Esta comunidad se desarrolla sobre sustratos sumergidos y se denomina microbentos, perifiton o biofilm (Lewis, 1995) siendo capaz de procesar, asimilar y liberar de nuevo al medio gran cantidad de compuestos. Además es una importante fuente de alimento para numerosos organismos (Stevenson, 1996). En los últimos años y ante la necesidad de contar con instrumentos de control que ayuden a la gestión de la calidad de las aguas los investigadores se han fijado en estos componentes de la comunidad acuática. Ciertas características, como su fijación en el sustrato, su periodo de crecimiento, la variabilidad en la composición específica y su facilidad de recolección la convirtieron en base de numerosos índices de calidad del agua. Esas mismas razones son las que hemos valorado a la hora de seleccionar esta comunidad como sujeto de nuestros experimentos (Kelly *et al.*, 1995; Whitton and Kelly, 1995; Prygiel and Coste, 1996).

1.2. Aproximaciones ecotoxicológicas

Frente a la necesidad de valorar la toxicidad de los compuestos liberados al medio, se han ido desarrollando métodos de trabajo que han permitido conocer el efecto que estos tienen sobre los organismos a los que no están destinados. Uno de los más utilizados es el test de dosis-respuesta mono-específico. Una vez obtenido un cultivo puro del organismo en cuestión se exponen diferentes submuestras de éste a concentraciones crecientes del tóxico. Generalmente se puede obtener una ecuación que relaciona la cantidad de tóxico con el efecto sobre el parámetro valorado (crecimiento, mortalidad, fotosíntesis, síntesis de proteínas, etc.). Así se han calculado multitud de NOEC (Non Observed Effect Concentration). También se calculaban los valores de EC_x (X% Effect Concentration), LC_x (X% Lethal Concentration), FEC (First Effect Concentration). Todos estos parámetros vienen descritos en la OECD Guideline 201 de 1984 (OECD, 1984). Este tipo de cálculos, aunque totalmente correctos desde el punto de vista fisiológico, no son extrapolables al valorar una exposición en condiciones naturales. Los valores calculados de EC_{50} se obtienen tras exponer a los organismos a concentraciones que difícilmente, por no decir nunca, se presentarán en condiciones naturales. Aunque este tipo de pruebas podía aportar mucha información desde el punto de vista fisiológico de la especie, contribuía poco al conocimiento de su comportamiento dentro de la red de relaciones interespecíficas que se mantienen en la comunidad biológica.

Durante gran parte del desarrollo de la ecotoxicología se prestó especial atención a las especies. Kimball y Levin supervisaron 699 trabajos, relacionados con ecotoxicología entre 1980 y 1982. Tan solo el 12 % de ellos evaluaba los efectos al nivel de comunidad o ecosistema. Dada su simplicidad, bajo coste y potencial de estandarización, los tests mono-específicos jugaron un papel primordial en el establecimiento de criterios de gestión de calidad de aguas frente a metales y pesticidas.

Los métodos basados en test mono-específicos están limitados cuando se pretenden extrapolar los resultados a los ecosistemas (Kimball and Levin, 1985). La idea de trabajar con las especies clave para determinar la sensibilidad de un



Grafica 1. Evolución en el consumo de triazinas, entre las cuales se encuentra la atrazina. El grafico se ha confeccionado con datos extraídos de la web de la FAO.

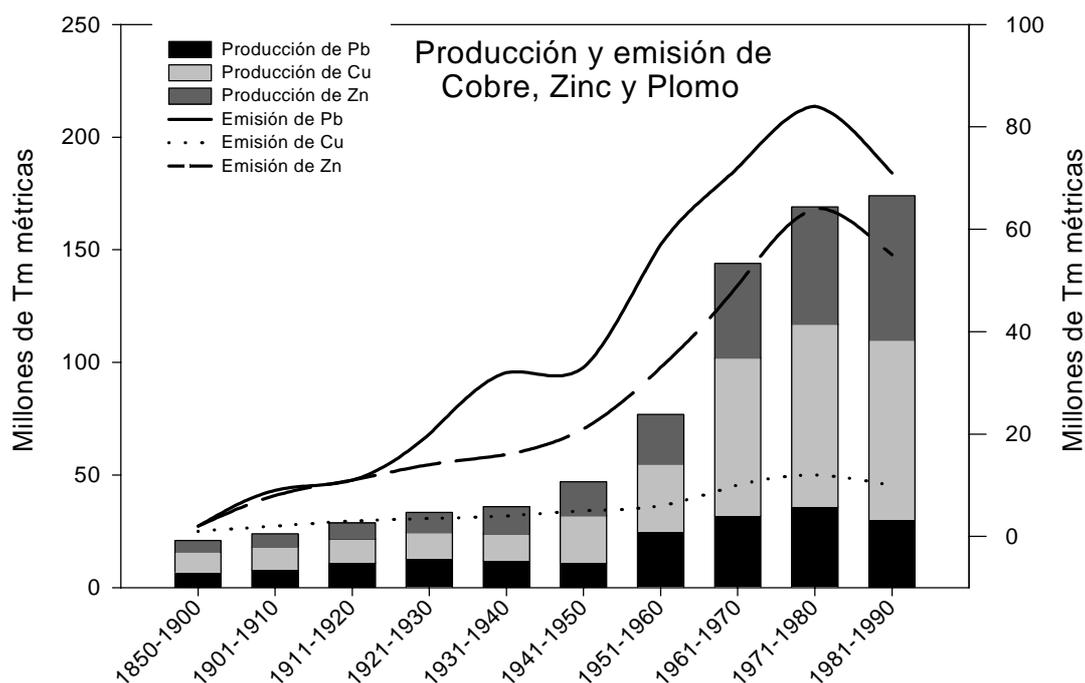
ecosistema, también se ha demostrado ineficaz (Cairns, 1986; Niederlehner *et al.*, 1986), ya que resulta difícil conocer a priori cual será la especie clave, y si su comportamiento será el mismo en un test mono-específico que en una situación real, interaccionando con el resto de especies del ecosistema. Por esta razón, se ha sugerido que es preferible trabajar con las especies más abundantes (Kimball and Levin, 1985; Mount *et al.*, 1985) a hacerlo con las más sensibles. Siguiendo este tipo de métodos, generalmente, se llega a sobreestimaciones de la toxicidad medioambiental de los compuestos (Carlson *et al.*, 1986). Además hay que tener en cuenta que la tolerancia al tóxico se puede ver modificada por las relaciones interespecíficas y en tests mono-específicos este efecto no se verá reflejado (Giesy, 1985; Niederlehner *et al.*, 1986; Cairns and Pratt, 1989b).

Esta tendencia perdió fuerza al sugerirse que la protección de los niveles superiores del ecosistema no podía basarse en los resultados obtenidos a partir de tests mono-específicos (Cairns, 1988; Cairns and Pratt, 1989a). Se hacía obvia la necesidad de desarrollar métodos y herramientas que permitiesen exponer a comunidades complejas a concentraciones realistas de tóxicos, contrastando así los resultados de los tests mono-específicos (Cairns, 1983; Odum, 1984; Kimball and Levin, 1985; Clements *et al.*, 1988). Se precisaba tender puente entre los ensayos de laboratorio y los sistemas naturales. Una de las posibles aproximaciones metodológicas era el uso de ríos artificiales.

1.3. Uso de ríos artificiales

Una solución realista a los problemas expuestos anteriormente es la de comprobar el efecto del tóxico en un sistema ecológico complejo. De ese modo, diversos tipos de organismos, con mecanismos diferentes de incorporación y sus

Grafica 2.
Evolución en los últimos 150 años de la producción y emisión de los metales pesados más explotados por el hombre. Elaborada a partir de datos de "A History of Global Metal Pollution" de J.O. Nriagu.



respectivas relaciones interespecíficas podrán ser afectadas por el tóxico y consecuentemente, valorar el efecto del tóxico en el ámbito del ecosistema. Dado que no siempre es posible (ni éticamente apropiado) liberar un tóxico en el medio, o controlar todos los parámetros que nos interesan, una de las posibles soluciones pasa por desarrollar réplicas simplificadas de los sistemas naturales. En nuestro caso, esas réplicas fueron los ríos o canales artificiales. Los ríos artificiales se definen como cualquier tipo de canal, con flujo de agua controlable, usado para estudiar las propiedades físicas, químicas, o biológicas de los sistemas naturales (Warren and Davis, 1971). Los usos posibles de los canales artificiales en ecotoxicología van desde validar los resultados obtenidos en el laboratorio o microcosmos (Belanger *et al.*, 1990) a valorar la influencia de factores ambientales sobre el efecto de los tóxicos (Clements, 1991), hasta la investigación de la influencia de otros niveles tróficos sobre la respuesta ecotoxicológica (Clements, 1991; Stewart and Hill, 1993; Brock *et al.*, 1995; Kiffney and Clements, 1996).

Otro de los aspectos a tener en cuenta a la hora de valorar el efecto de tóxicos es el tiempo de exposición. Los canales artificiales al poseer sistemas de renovación de agua y de control de la temperatura permitirán obtener unos tiempos de exposición mayores que en cultivos *in vitro*, manteniendo unas condiciones similares a las

naturales. Si lo que se pretende es ver cambios en la composición de las comunidades, o inducción de tolerancia, deberá pensarse siempre en tiempos de exposición de días. Otro motivo para alargar la duración de las exposiciones puede ser el de trabajar a concentraciones muy bajas, mucho menores de las necesarias para obtener un efecto en los tests dosis-respuesta o monoespecíficos. De ese modo, si se inducen cambios en la comunidad, que no se reflejan en los parámetros fisiológicos, podrán ser valorados. Si solo buscamos medir el efecto sobre alguna variable metabólica, pueden bastar horas.

1.4. Efecto de los herbicidas sobre las comunidades de algas microbentónicas. El caso de la atrazina.

Los fertilizantes sintéticos y los pesticidas han desempeñado durante décadas un papel dominante en la intensificación agrícola tanto en los países industrializados como en los países en desarrollo. El consumo mundial de pesticidas en 1995 alcanzó los 2,6 millones de toneladas de los denominados ingredientes activos, es decir, de los productos químicos biológicamente activos que se encuentran en las fórmulas de los pesticidas comerciales, con un valor de mercado de 38.000 millones de dólares USA. Aproximadamente el 85 por ciento de este consumo se destinó a la agricultura (FAO, 2001). Unas tres

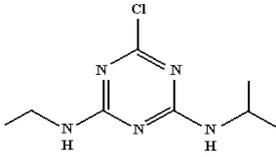
Nombre:	Atrazina
Nomenclatura:	2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina
Estructura:	
Peso molecular:	215.68 g mol ⁻¹
Presión de vapor:	2.89x10 ⁻⁷ mm Hg (20°C)
Solubilidad en agua:	70 mg L ⁻¹ (25°C)
Log K _{ow} :	2.68 (25°C)
Hidrólisis:	estable 30 días a pH 5-9 y 25°C
Fotólisis acuosa:	(luz natural) t _{1/2} 335 días a pH 7
Fotólisis en suelo:	(luz natural) t _{1/2} 12 días

TABLA 1.
Algunas de las características químicas de la atrazina.

cuartas partes del total de los agroquímicos se utilizan en los países desarrollados, sobre todo en Norteamérica, Europa Occidental y Japón, donde los elevados índices de aplicación de plaguicidas son muy corrientes.

Los factores que influyen en el impacto que un pesticida puede ocasionar, dependerán de su toxicidad, de su persistencia en el medio y de la cantidad de éste que se libere. Los herbicidas por el modo de uso acaban contaminando con frecuencia las aguas continentales. Una vez liberados en el medio, el agua de riego y de lluvia (Huber, 1993) se encargan de arrastrar lo que no ha sido incorporado por las plantas. Este lavado superficial y sub-superficial acaba siempre en algún curso de agua y finalmente llega a las costas. De ese modo se han calculado aportes anuales de hasta 6600 Kg de sustancia activa (atrazina) para una zona costera atlántica de los Estados Unidos (Alegria *et al.*, 2000). La atrazina es, precisamente, uno de los herbicidas más ampliamente usados (Grafica 1). Sus trazas se encuentran en el agua, aire (en zonas del centro Europeo se han medido concentraciones de entre 1400 y 51260 pg m⁻³, dependiendo de la proximidad a áreas agrícolas (Sanusi, 2000) e incluso en la orina de personas no expuestas (Baker *et al.*, 2000).

La atrazina fue desarrollada a partir de 1952, en los laboratorios de *Geigy Chemical Company of Basel* (Suiza). Fue registrada en Suiza en el año 1958, y desde entonces ha sido uno de los pesticidas más utilizados. El efecto que tiene es el de inhibir de un modo reversible la fotosíntesis, actuando únicamente en condiciones de luz.

La atrazina es un herbicida usado en el control de las malas hierbas anuales en cultivos, especialmente en los de maíz. Es un compuesto polar, no iónico, con una moderada solubilidad en agua (Tabla 1) (Lynch *et al.*, 1982). La atrazina penetra en las plantas superiores a través del follaje y de la raíz y a través de la superficie celular en los organismos fotosintéticos unicelulares (Hull, 1994). Aunque las triazinas, grupo de moléculas al cual pertenece la Atrazina, son productos con una baja toxicidad, son empleados en cantidades muy elevadas en los países industrializados. Este hecho conjuntamente con su persistencia y su alta solubilidad, hace que sean consideradas como productos que se deben controlar desde el punto de vista ecotoxicológico.

La atrazina se encuentra en la “lista negra” de productos tóxicos editada por CE (EEC, 1976). También se encuentra en la lista de pesticidas a tener en cuenta en la prevención de la contaminación de aguas subterráneas y potables de Europa (EEC, 1980). La atrazina fue prohibida en Suecia en 1989, pero es usada habitualmente en el resto de países industrializados. En USA se aplican anualmente 35 millones de kilogramos (Hoagland *et al.*, 1996), en Holanda 192.000 Kg (1992), y en España 250.000 Kg (1990). Dado el elevado riesgo de contaminación ambiental se han generado un gran número de estudios sobre el efecto de la atrazina y otras triazinas, con la finalidad de estudiar su movilidad y el efecto sobre la biota (Huber, 1993; Solomon *et al.*, 1996).

La atrazina es altamente selectiva, ya que las plantas objetivo no poseen la misma capacidad de metabolizar el compuesto que los cultivos sobre los que es aplicada (Huber, 1993; Tang *et al.*, 1997). La atrazina se liga específicamente con la proteína D1 en el fotosistema II (PSII), inhibiendo el transporte de electrones (Moreland, 1980). Debido a esta especificidad por el ligando, es especialmente tóxica para las algas, y mucho menos para el resto de organismos. Su moderada solubilidad en agua, su baja presión de vapor y el resto de características químicas, facilitan el lavado de los suelos tratados durante los riegos o lluvias (Huber, 1993). Dada su baja tasa de fotólisis acuosa (Tabla 1), es de esperar una gran persistencia una vez llega al agua. La vida media en sistemas acuáticos, dependiendo de las condiciones ambientales, oscila entre 3 y 300 días (Huber, 1993). Pero se han encontrado valores de 5 horas cuando se ha expuesto la atrazina a medios ácidos y a emisiones de luz de baja longitud de onda, 290 nm (Burkhard and Guth, 1976).

Otro hecho que motiva la gran persistencia de la atrazina en las aguas continentales es la presencia en su estructura del anillo de s-triazina, lo que la hace difícilmente atacable por las bacterias (Howard, 1991). Todas estas características hacen que la degradación química en el medio sea mucho más importante que la biológica (Bend and James, 1978; Huber, 1993b). La degradación química se da por tres vías: por hidrólisis del carbono 2, por N-dealkilación del carbono 4, o por rotura del anillo de s-triazina (Knuesli *et al.*, 1969; Wolf and Martin, 1975; Klaine, 1987).

En las comunidades puede aparecer una resistencia ligada a un cambio en la comunidad, creciendo en proporción los taxones más resistentes (Hamilton *et al.*, 1987; Hoagland *et al.*, 1993). También pueden aparecer respuestas al nivel de la especie por mutación en la proteína D1. La mutación aparece en el gen *psbA*, provocando en la proteína el cambio de una serina por una glicina. La D1 mutante es mucho menos afín de la Atrazina, siendo 1000 veces más resistente frente a ella que la D1 normal. Los mecanismos usados por las plantas que son tolerantes se basan en la 2-hidroxilación, la N-desalquilación (Stratton, 1984; Schiavon, 1988 a; Schiavon, 1988 b) y la conjugación con glutatión (Shimabukuro, 1967; Lamoureux *et*

al., 1970; Tang *et al.*, 1998).

La concentración de atrazina en el agua, dependerá por tanto de muchos factores. Primero deberán tenerse en cuenta las características químicas del compuesto, el periodo de aplicación en los campos, la degradación, la retención en el suelo, las condiciones climáticas y la hidrología de la cuenca. Luego, una vez que el herbicida haya llegado al medio acuático, entrarán en juego los factores ambientales y biológicos propios de las comunidades. La sensibilidad frente a la atrazina de los diferentes grupos de organismos presentes en los ríos sería: fitoplancton > macrófitos acuáticos > bentos > zooplancton > peces (Solomon *et al.*, 1996). Se han descrito efectos a partir de concentraciones de tan solo 1 mg L⁻¹ para algunas especies de fitoplancton (Loepky and Tweedy, 1969; Butler *et al.*, 1975; Veber *et al.*, 1981; Stratton, 1984) mientras que hay autores que han encontrado NOEC superiores a 10.000 mg L⁻¹ para ciertos peces de agua dulce (Nishiushi and Hashimoto, 1969). Numerosos autores han sugerido que la concentración de 20 mg L⁻¹ es una NOEC bastante general para los ecosistemas acuáticos (Huber, 1993b; Solomon *et al.*, 1996). Las algas microbentónicas de ríos europeos estudiados por Guasch *et al.* (1999a) presentan EC₅₀ de entre 0.189 y 0.560 mg L⁻¹.

1.5. Efecto de los metales pesados sobre las comunidades de algas microbentónicas. El caso del cobre.

Desde la Revolución Industrial la producción de metales pesados tales como el plomo, el cobre y el zinc ha ascendido vertiginosamente. Entre 1850 y 1990 la producción de estos tres metales se multiplicó por diez, con el correspondiente incremento de sus emisiones (Nriagu, 1996) (Grafica 2).

Los metales pesados se han usado de diversas formas, al menos, durante los últimos dos mil años. Por ejemplo, el plomo se ha utilizado en las tuberías y el arseniato de plomo se ha usado para combatir los insectos de las manzanas. Los romanos añadían plomo al vino para mejorar el sabor, y el mercurio se utilizaba como bálsamo para aliviar el dolor de muelas en los niños pequeños.

La toxicidad de estos metales ha quedado docu-

mentada a lo largo de la historia: los médicos, tanto griegos como romanos, diagnosticaron síntomas de envenenamientos agudos por plomo mucho antes de que la toxicología se convirtiera en ciencia. Hoy día se conoce mucho más sobre los efectos de los metales pesados, cuya exposición está relacionada con retrasos en el desarrollo, varios tipos de cáncer, daños en el riñón, e incluso con casos de muerte cuando la exposición ha sido excesiva.

Los metales, una vez emitidos, pueden permanecer en el ambiente durante cientos de años o más. Muestras de explotaciones de metales pesados por parte de los seres humanos han sido halladas en el interior de los hielos de Groenlandia y en el agua de mar de la Antártida. El contenido de cobre de las capas de hielo depositadas anualmente en Groenlandia (desde 1770 hasta la fecha) evidencia un aumento continuado que corre parejo con el renacer (tras su esplendor y caída durante el imperio Romano, entre el 500 a.c. y el 300 d.c.) de la minería en Europa, alcanzando valores muy superiores al nivel natural (Hong *et al.*, 1996).

La mayor parte del cobre que usaron los romanos vino de la isla de Chipre, que ellos llamaron “Cyprium” y de la cual derivó la palabra “Cuprum” dando origen a “Cu” como símbolo químico del cobre. El cobre, sus compuestos y aleaciones son usados ampliamente en muchas actividades humanas. La capacidad del cobre para resistir la corrosión y otras propiedades (Tabla 3) hizo que este metal se utilizara tanto de modo ornamental como funcional, durante la Edad Media y los sucesivos siglos de la revolución industrial, hasta nuestros días. El cobre alcanzó su real dimensión de metal imprescindible para el desarrollo industrial del mundo en 1831, cuando Faraday descubrió el generador eléctrico, y desde entonces su demanda ha crecido de forma notable.

En estado casi nativo, se usa en cables eléctricos, tuberías, herramientas, partes de motores y generadores, soldadura, pinturas, conservantes, catalizadores, monedas, arte (estatuas, pinturas), biocidas, medicinas, aleación de metales, fabricación de equipamiento eléctrico (Kosalwat and Knight, 1987). Toda esta actividad provoca que cada año se liberen al medio más de 300.000 toneladas de cobre. El cobre, otras veces, en forma de óxidos o sulfatos se utiliza en la for-

Nombre:	Cobre
Peso molecular medio:	63.54
Densidad:	8.96 g cm ⁻¹
Isótopos:	Cu-63 (69.17%) Cu-65 (31.83%)
Punto de fusión:	1083 °C
Punto de ebullición:	2595 °C
Estado de oxidación:	+2

Tabla 3.
Algunas de las características físicas y químicas del cobre.

mulación de pesticidas (McIntosh, 1974).

La cantidad de un metal que hay en el agua, muchas veces no se corresponde con la cantidad disponible para los organismos o biológicamente activa. Uno de los problemas de determinar la toxicidad del cobre, reside en la complejidad de su química en el agua (Morel *et al.*, 1988). Hay muchas formas diferentes de cobre coexistiendo en el medio acuático. Hay desde cobre libre o complejo con hidróxidos, carbonatos y gran cantidad de compuestos orgánicos, con los que el cobre puede formar complejos estables. La proporción de cada forma está controlada por el pH, alcalinidad (Allen and Hansen, 1996) y los ligandos orgánicos e inorgánicos disponibles como sedimentos y material particulado (Stumm and Morgan, 1981; Carlson *et al.*, 1986). Se muestra un cálculo de las diversas formas en la tabla 4. Diversos estudios demuestran además que la presencia de materia orgánica reduce la toxicidad del cobre (Swallow *et al.*, 1978). Se ha demostrado que la toxicidad del cobre no depende de la cantidad total de cobre, sino de la cantidad de cobre libre, Cu²⁺ (Sunda and Guillard, 1976; Anderson and Morel, 1978). Del cobre total, únicamente una pequeña fracción se encuentra en esta forma. Este ión es particularmente tóxico para una gran variedad de organismos acuáticos (Anderson and Morel, 1978; Toledo *et al.*, 1979; Muramoto, 1982; Swartzman *et al.*, 1990; Xue and Sigg, 1990). La tolerancia entre las especies de algas varía enormemente (Thomas *et al.*, 1977); siendo, en general los más sensibles los dinoflagelados y cianófitos y más resistentes los flagelados fotosintéticos.

Esta complejidad en la respuesta química hace especialmente difícil el uso de medios de cultivo. Se ha podido constatar que, en el caso de desmidiáceas, si se usa un medio artificial, se sobreestima la toxicidad y si se usa uno artifi-

Tabla 4.
Proporción de las diferentes formas de cobre en las aguas de nuestros experimentos calculadas a partir de las constantes de equilibrio de Stumm y Morgan (1981).

	Max	Min
pH	7.6	7.38
alk	6.52	5.31
%Cu ²⁺	1.31	2.66
%CuOH	1.65	2.02
%CuOH ₂	0.13	0.1
%CuCO ₃	92.18	91.93
%Cu(CO ₃) ₂	4.08	2
%CuSO ₄	0.6	1.22
%CuCl	0.04	0.07

cial con queladores, se infravalora (Ivorra *et al.*, 1995). La respuesta obtenida con el medio natural era intermedia. Por tanto, a la hora de plantearse la valoración de la toxicidad del cobre en comunidades acuáticas, una buena aproximación será trabajar con sistemas lo más similares posibles a los naturales. Una de esas posibles aproximaciones es el uso de canales artificiales.

La incorporación de metales pesados por los microorganismos presentes en el perifiton puede dividirse en dos fases con distinta cinética: unión de los cationes a los grupos electronegativos de la superficie celular -fase pasiva- y la fase de incorporación intracelular -fase activa- que es dependiente del metabolismo celular. La primera parte del proceso ocurre rápidamente. La segunda parte tiene una cinética mucho más lenta (Khummongkol *et al.*, 1982; Les and Walker, 1984). Además, muchos de los metales pesados (Cu, Zn, Fe, Ni, Co) no son tóxicos en pequeñas concentraciones, sino micronutrientes (Fiore and Trevors, 1994).

La sensibilidad al cobre varía enormemente entre especies y grupos de organismos. El rango de concentración de cobre capaz de inhibir el crecimiento va desde 30 mg L⁻¹ en cianobacterias (Wurtsbaugh and Horne, 1982) hasta EC₅₀ de 18.000 mg L⁻¹ en euglenófitos (Girling *et al.*, 2000).

El cobre en los organismos está ligado al transporte de oxígeno y de electrones y a la oxidación de amidas y aldehídos, entre otros procesos. La concentración intracelular se regula mediante la excreción de exudados de compuestos orgánicos que ligan metales. La toxicidad del cobre sobre los organismos fotosintéticos parece basarse en la actividad que tiene sobre la parte oxidativa del PSII, reduciendo el con-

tenido de ATP a concentraciones menores que las necesarias para afectar a la fotosíntesis (Cid *et al.*, 1995). También se han descrito cambios en la composición pigmentaria (incremento de un alómero de la clorofila-a), atribuibles a cambios del pH en el estroma.

La exposición al cobre provoca el desarrollo de mecanismos de tolerancia. La formación de trampas intracelulares, como los cuerpos de polifosfatos, es una de las estrategias más frecuentes (Cid *et al.*, 1995). Ciertas cepas de algas resistentes producen exudados que complejan al cobre (Fogg and Westlake, 1955; Wang and Tischer, 1973; Murphy *et al.*, 1976; Clarke *et al.*, 1987) reduciendo su toxicidad. Algunas levaduras utilizan mecanismos metabólicos (ligados a plásmidos, algunos) que excluyen metales de la célula. Algunos cianófitos, además de los métodos descritos, poseen mecanismos internos de detoxificación y transformación de metales (Reed and Gadd, 1990). Se han descrito también sistemas ligados a metalotioneínas, que secuestran diversos metales del medio interno celular (Nordberg and Kojima, 1979; Olafson *et al.*, 1979; Olafson, 1981).

Tras la exposición a cobre los cambios de tolerancia de la comunidad pueden deberse tanto a la inducción de mecanismos de tolerancia en las especies presentes, como a cambios de composición taxonómica, con incremento de las especies más resistentes (Foster, 1982a; Foster, 1982b; Leland and Carter, 1984; Clements, 1991). De todos modos, hay especies que son tolerantes al cobre aún antes de haber sido expuestas (Foster, 1982a), pudiendo relacionar esta tolerancia con los mecanismos de protección frente a condiciones ambientales extremas, como por ejemplo pH bajos (Peterson *et al.*, 1984; Campbell and Stokes, 1985; Gross, 2000).

A pesar de las abundantes pruebas de estos efectos nocivos para la salud, la exposición a los metales pesados continúa y puede incrementarse a falta de una política consensuada y concreta.

1.6. Objetivos generales de la investigación

El objetivo general de esta tesis es el estudio de la importancia que los factores ambientales tienen sobre la respuesta de las comunidades microfitorbentónicas frente a un pesticida de uso

muy extendido y frente a un metal pesado de gran importancia económica (la atrazina y el cobre). Estos estudios se llevarán a cabo en el campo y en el laboratorio mediante el uso de canales artificiales.

1.7. Objetivos específicos de la investigación

Las hipótesis a testar en esta tesis son las siguientes:

1-Los resultados obtenidos en el laboratorio mediante el uso de sistemas artificiales, que permitan mantener comunidades naturales simplificadas, serán extrapolables a los sistemas naturales.

2-La velocidad del agua modificará el efecto tóxico que el cobre y la atrazina tienen sobre las comunidades microbentónicas. Los cambios en la velocidad afectarán a esta relación.

3-El efecto de los herbívoros modificará la toxicidad del cobre y de la atrazina, ya que los cambios provocados por los herbívoros no permitirán el desarrollo de mecanismos de tolerancia o adaptación a los tóxicos.

4-La variabilidad en la respuesta ecotoxicológica de las comunidades de un río reflejará la variabilidad biológica, espacial y estacional del sistema fluvial.

5-Las comunidades expuestas de un modo crónico a concentraciones de tóxico son más tolerantes que las no expuestas (PICT concept).

Lo que sigue a continuación es un detalle del desarrollo de la tesis:

-Primera parte (capítulo 2): dedicada al desarrollo de un sistema de canales que permita mantener comunidades translocadas desde los sistemas naturales durante al menos 3 semanas. En ese periodo se deben poder controlar los parámetros propios de un sistema fluvial, como pendiente, caudal, temperatura e irradiancia. También debe permitir el muestreo de la comunidad perifítica y de herbívoros. Debe permitir la dosificación de los tóxicos estudiados, en nuestro caso atrazina y Cobre. Deberá poseer la capacidad de trabajar con réplicas. Simultáneamente deberá desarrollarse un sistema de sustratos que puedan colocarse en los ríos y translocarse, una vez colonizados, a los canales

artificiales. Además deberán ser adecuados para trabajos de toxicología.

-Segunda parte (capítulos 3 y 4): dedicada a la experimentación en laboratorio. Los experimentos se basarán en dos métodos, el exponencial y el factorial. En los experimentos del primer tipo estudiaremos la relación entre un factor y el efecto sobre los parámetros medidos, exponiendo a las comunidades a diferentes cantidades del factor. En el segundo tipo se estudiará la interacción entre 2 factores, con los cuatro tratamientos posibles: control, Factor1, Factor2, Factores1+2. Mediante estos diseños se estudiará la interacción de los tóxicos con la velocidad del agua y con los herbívoros, en experimentos que durarán entre 1 y 3 semanas. Además se realizarán como complemento experimentos dosi-respuesta para cálculo de las EC_{50} .

-Tercera parte (capítulo 5): se basa en la aplicación en el medio natural de los métodos desarrollados en el laboratorio. En nuestro caso se realizará la estimación del riesgo ecológico que tendrían los vertidos de atrazina y cobre a lo largo del río Ter, centrándonos en el efecto sobre las comunidades microbentónicas. Estos riesgos deberán relacionarse con parámetros físico-químicos propios del río y de las comunidades, para poder convertirse en herramientas de gestión eficaces. Se estudiará también la variabilidad en la respuesta de las comunidades.

-Cuarta parte (capítulo 6): Las comunidades del río Tinto están expuestas a bajos pH y concentraciones muy elevadas de metales, lo que nos permitirá establecer una comparativa entre sus comunidades y las comunidades con las que trabajamos normalmente. El objetivo de esta comparación será el de complementar el estudio de los mecanismos que regulan la respuesta de las comunidades microbentónicas frente al cobre.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Experimentación con canales artificiales

Mediante los diseños de tipo factorial y exponencial, se han obtenido resultados complementarios sobre distintos aspectos del efecto de un tóxico. El diseño tipo regresión, proporciona una red de seguridad al investigador, en comparación con el diseño factorial, donde el número de tratamientos es menor. En los diseños factoriales, al tener pocos tratamientos, se limita la interpretación de los efectos que puedan ocurrir, como gradientes a lo largo del rango de exposición al tóxico empleado (Belanger, 1997). En los diseños de tipo factorial, al tener que reducirse el número de tratamientos, será imprescindible elegir correctamente las concentraciones de tóxico que se emplearán. Este es un problema que en un diseño tipo regresión no suele darse.

Un diseño tipo factorial permite distinguir el efecto de los factores aislados y combinados. Si se desea maximizar el número de tratamientos, debe tenerse en cuenta que ello acarreará una pérdida en la replicidad. Con el fin de evitar la “pseudoreplicidad” (Kosinski, 1989) el número de tratamientos no puede crecer a expensas de las réplicas. Se debe asegurar que la utilización de la inferencia estadística sea la correcta; en nuestro caso hemos buscado la interacción de los tóxicos con alguno de los factores naturales, de modo que la potenciación o inhibición del efecto se pueda atribuir a ese factor.

En los diseños exponenciales, si se elige un rango lo suficientemente amplio de concentraciones se encontrará un efecto relacionado con una concentración; el efecto observado será el provocado por una cierta concentración de tóxico. Es por lo que este tipo de diseños resultan idóneos en el contexto de la valoración de riesgos. En los experimentos bien diseñados, la presión selectiva de las diferentes concentraciones de tóxico es substancialmente más importante que la variabilidad dentro de cada canal; logrando de este modo resultados concluyentes en un alto porcentaje de casos (Belanger, 1997).

Conociendo las ventajas de un tipo de diseño y de otro, es posible complementar la aproximación ecotoxicológica, usando ambos. Para un tóxico cuyo efecto a diferentes concentraciones es desconocido, puede resultar una buena aproximación el diseño tipo regresión. Con este tipo de aproximación se obtendrán aquellas concentraciones del tóxico que posteriormente se podrán relacionar con unos efectos valorables. Cuando se conoce la concentración de tóxico a partir de la cual se observan ciertos efectos sobre las comunidades, el experimentador se podrá basar en diseños factoriales para estudiar el efecto que tendrá otro factor cualquiera sobre la acción del tóxico. A posteriori, podrá exponer esas mismas comunidades a diseños tipo regresión, para conocer como ha evolucionado la tolerancia frente al tóxico bajo el efecto del factor estudiado.

El uso de canales artificiales en ecotoxicología ha demostrado ser apropiado ya sea en diseños de tipo exponencial o factorial. Su uso resultó ser especialmente útil en aquellos experimentos a largo plazo, donde fue necesario el control de determinados factores, a lo largo de varias semanas. Su polivalencia permite estudiar la interacción de tóxicos con otros factores. Los diseños utilizados nos permitieron controlar el factor estudiado y la detección de sus efectos sobre la comunidad algal. Han demostrado así mismo ser un buen soporte para el desarrollo de comunidades algales y de macroinvertebrados herbívoros (Lamberti and Steinman, 1993), lo suficientemente complejas como para obtener resultados extrapolables a los sistemas naturales.

En el uso de canales artificiales se deben considerar distintos factores. El tamaño de los canales será uno de los elementos primordiales. Los canales deben tener el tamaño suficiente para permitir el desarrollo y supervivencia de la biota que se estudia. También para permitir la expresión de los

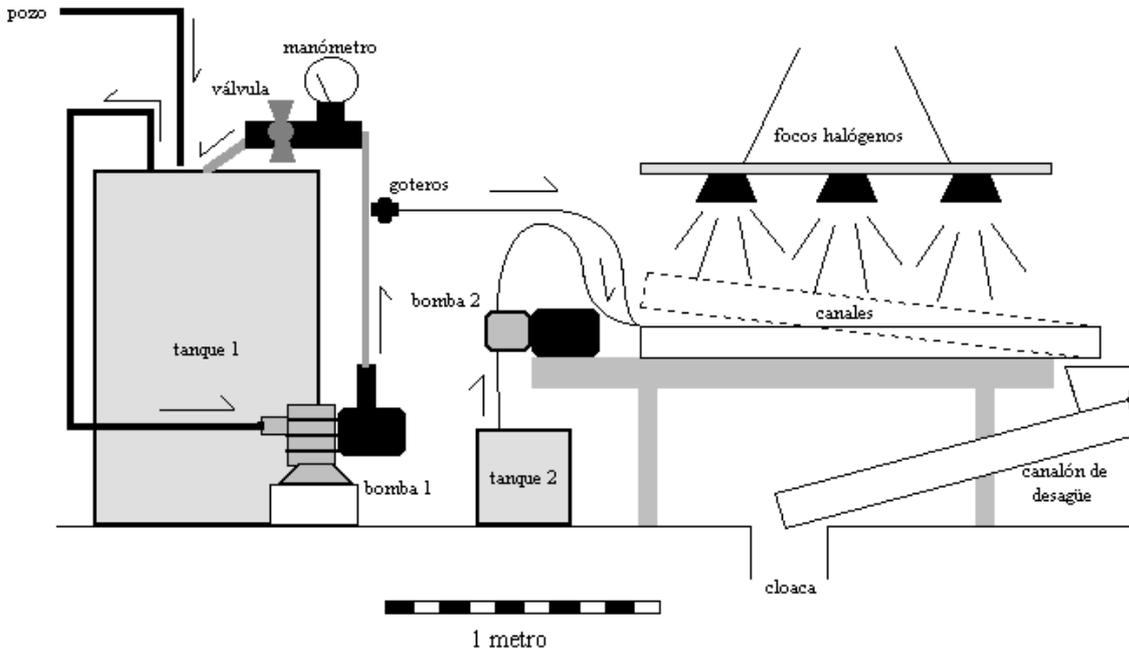


Figura 1.

Diagrama del sistema de canales utilizados en los campos experimentales. En estos campos se disponía de un local habilitado para servir de laboratorio, con todo lo necesario para el funcionamiento de los canales artificiales.

factores que se pretenden controlar y que servirán para testar nuestra hipótesis.

Los muestreos (extracción de biota) no deben constituir un impacto excesivo sobre la comunidad de los canales. Por otra parte, la complejidad de la comunidad estará influida, en parte, por el tamaño de los canales, por el tipo de inóculo que se aporte, por el acceso que tengan los organismos libres a ellos (en el caso de canales artificiales, situados en la naturaleza) y por su configuración. Canales pequeños (de menos de 5 metros) pueden poseer una comunidad lo suficientemente compleja, para obtener resultados extrapolables a las comunidades naturales (Belanger, 1997). Es cierto sin embargo, que canales que simulen la heterogeneidad propia de los sistemas fluviales (p. e., zonas de rápidos y zonas de remansos), son imprescindibles al trabajar con niveles tróficos superiores, como filtradores o depredadores (Lamberti and Steinman, 1993).

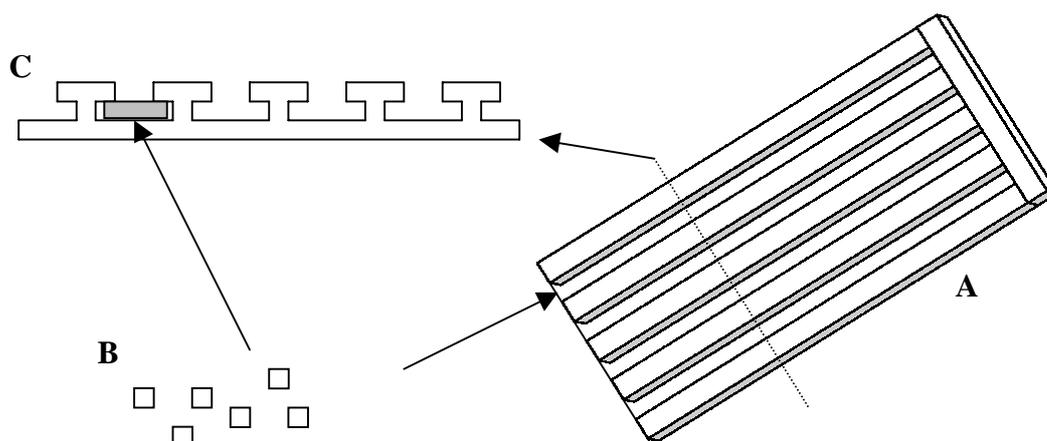
Las condiciones impuestas artificialmente en los canales, podrán provocar cambios en las características del agua, que deberán ser controlados. Entre estos cambios cabe considerar la sedimentación (si disminuimos la velocidad del agua respecto al punto de suministro, el material en suspensión puede sedimentar...), o la precipitación de solutos (si existen cambios de temperatura, pH o estado redox). Esto es particularmente importante en lo que se refiere a la recirculación del agua. La recirculación puede

provocar que los productos residuales del metabolismo, generados por las comunidades, se acumulen, afectando así a las características originales del agua. En nuestro caso se ha evitado la recirculación, contando siempre con un suministro continuo de agua.

El sistema de ríos artificiales usados en esta memoria constaba de 14 canales de metacrilato de 5 mm de grosor (Figura 1). Los canales tenían una longitud, dependiendo del experimento de entre 0.85 y 1.7 m, y una anchura y altura de 0.1 m. La alimentación de los canales se realizaba por goteros. Esto resulta una novedad, respecto a los sistemas descritos en otros trabajos. Los goteros (NETAFIM®, con un caudal de 24 l/hora), usados habitualmente en riego por goteo, proveen un caudal constante de agua dentro de unos márgenes de presión. De este modo una sola bomba y una sola canalización (donde se disponían los goteros), era suficiente para alimentar todos los canales. Los goteros proporcionaban un flujo de 1.5 l/min a cada canal. Los canales se iluminaban con focos halógenos (OSRAM HALOLINE® R7s 230v-500w) que proporcionaban una irradiancia de entre 110-130 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, de radiación fotosintéticamente activa (400 a 1000 nm). El fotoperíodo se sincronizó con el natural, dependiendo de la época, entre 8-12 horas de luz y 16-12 horas de oscuridad. Con el fin de evitar un calentamiento excesivo del agua, la instalación disponía de 6 ventiladores y un extractor. La inyección del tóxico se realizaba con una bomba peristáltica (COLE-

Figura 2.

Los soportes (A) están hechos con metacrilato, con cuatro canales (señalados por la flecha) donde caben unos 25 cristales (B) de 1.2x1.2 cm. En el perfil (C) puede observarse como los cristales quedan encajados. Los soportes eran colocados en zonas de corriente, orientados de modo que los cristales se situaran hacia la luz.



PARMER® 7521-10, tubos Masterflex-Norprene 6404-14), a partir de un depósito (250 litros) donde se dispuso el tóxico objeto de estudio (Figura 1).

La elección del tipo de sustrato, que se usa en los canales, es siempre complicada, ya que el material seleccionado afectará al comportamiento y efectos que manifiesten las comunidades y el tóxico respectivamente. Los sustratos susceptibles de ser usados son naturales: rocas, guijarros, gravas, sedimentos, materia orgánica... o artificiales: cerámica, vidrio, metacrilato, plásticos diversos. El vidrio esmerilado o granulado es especialmente indicado en estudios ecotoxicológicos, pues es inerte, y permite la colonización de las algas; además, proporciona espacios a las algas, fuera del alcance de la rádula de los herbívoros, evitando una limpieza total del sustrato, y facilitando el mantenimiento de una cierta biomasa algal, que permitirá una recuperación de la comunidad.

La superficie de cada canal se recubrió con cristales esmerilados de 12x9 cm que proporcionaron soporte a los organismos colonizadores, así como una superficie homogénea a lo largo del canal. Entre ellos se situaron los cristales de 1.2x1.2 cm que serían las unidades de muestreo. Todos los cristales se expusieron a un periodo de colonización, de entre 2 y 4 semanas, en soportes de metacrilato diseñados específicamente para la sujeción de los cristales (ver Figura 2), en diferentes ríos (Avencó, Brugent, Francolí y Fuirosos, NE de España). Los cristales colonizados se transportaban en un tiempo corto (1 h.), desde el río hasta el laboratorio. Una vez situados en los canales correspondientes, los cristales colonizados se aclimataron durante una

semana a las condiciones definidas en el experimento.

2.2. Análisis físicos y químicos

2.2.1 Analítica del agua y cálculo de la velocidad en los canales

La medición de las velocidades del agua en los canales se llevó a cabo mediante la adición de NaCl, y siguiendo la evolución de la conductividad (Triska, 1984). En otras ocasiones se utilizaron sondas anemométricas (tabla 1). El resto de parámetros físicos y químicos fueron medidos mediante los métodos descritos en la tabla 1. Las medidas de campo se realizaron siempre con sondas multiparamétricas. Las muestras para el análisis de nutrientes y alcalinidad se recogían y se conservaban congeladas, hasta el momento del análisis.

Para nitratos y fosfatos se usó un sistema de electroforesis capilar de MILLIPORE®, (mod. Waters CIA Quanta 5000) según el procedimiento descrito por Romano (1993). La alcalinidad total se midió mediante el método descrito por Kramer (1982); la titulación se realizó utilizando H₂SO₄ 0.02 N, realizando lecturas en continua con un TITROPROCESSOR de METROHM®. Los valores de alcalinidad así obtenidos, junto con los de conductividad, temperatura, pH eran utilizados en el programa CARBOCAR desarrollado a partir del WATEQ (van Gaans, 1989), para calcular el carbono total disuelto. El DOC se analizaba filtrando el agua en filtros GF/F (previamente se habían calentado a 450 °C durante 4 horas) mediante oxidación catalítica a alta temperatura, en un Shimadzu® TOC Analyzer.

Medidas en campo y canales

pH
 Oxígeno disuelto
 Conductividad
 Temperatura
 Luz incidente
 Luz subacuática
 Velocidad del agua

Técnica

Elect. pH (WTW [®] multiline P4)
 Elect. de oxígeno (WTW [®] multiline P4)
 Elect. de conductividad (WTW [®] multiline P4)
 Sonda de temperatura (WTW [®] multiline P4)
 LiCor [®] Quantum sensor (Li-192SB)
 LiCor [®] Quantum sensor (Li-192SB)
 MiniAir2, SCHILTKNECHT [®]

Análisis de laboratorio

Amonio
 Fosforo reactivo soluble (SRP)
 Nitrato
 Carbono total disuelto

Técnica

Kit colorimétrico (Merck [®])
 Electroforesis capilar/ Kit colorimétrico
 Electroforesis capilar/ Kit colorimétrico
 Valoración con H₂SO₄ de la alcalinidad

Tabla 1.

Métodos empleados tanto en el campo como en el laboratorio, para la medición de los parámetros físicos y químicos del agua de los ríos y de los canales, a lo largo de los experimentos.

2.2.2 Analítica de tóxicos

Las muestras de agua para análisis de cobre se conservaron congeladas con ácido nítrico al 1% para su posterior análisis. La concentración de cobre se analizó con ICP-OES (Plasma de inducción acoplado a emisión espectroscópica). La concentración de atrazina fue medida inicialmente mediante HPLC (reversed-phase high-performance liquid chromatography) en un sistema de la casa WATERS[®], mod. 600E System Controller and Waters 700 Satellite WISP, equipada con un diodo array (mod. 1000S Applied Biosystems) según el método descrito por Guasch (1998). Este método se basa en el de Duran y Barceló (1990).

En una etapa posterior, la analítica de la atrazina mediante HPLC se complementó mediante kits de inmunoensayo enzimático. Los análisis se realizaron con el test “EnviroGard Triazine QuantiTube Test Kit” (ENVR T00 01, MILLIPORE[®]) mucho más rápido, igualmente fiable y barato (Bushway, 1989; Thurman, 1990). Este test, se basa en la metodología ELISA “enzyme-linked inmuno-sorbent assays”. Una cantidad conocida de enzima conjugado compite con la atrazina por un número limitado de anticuerpos que forran el interior de tubos preparados. Posteriormente se añade un cromógeno que dará color en función de la cantidad de enzima conjugado que haya quedado unido a los anticuerpos. Habrá más enzima y más color cuanto menor sea la concentración de atrazina en la muestra. Para valorar los resultados se realiza una recta de regresión con concentraciones conocidas de atrazina.

2.3. Análisis biológicos

2.3.1. Clorofilas

La concentración de clorofila-*a* se determinó a partir de cinco cristales de cada canal. Para la extracción de clorofila-*a* se usó acetona al 90%. Los cristales fueron sonicados para acelerar la extracción, durante tres periodos de 7 minutos (Sabater *et al.*, 1996). La suspensión se filtraba a través de filtros GF/F. En el extracto se midió la absorción a 665 y 430 nm. con un espectrofotómetro de PERKIN ELMER[®] mod. Lambda2 UV/VIS. La concentración de clorofila-*a* fue calculada a partir de las ecuaciones de Jeffrey y Humphrey (Jeffrey and Humphrey, 1975).

2.3.2. Valoración de la actividad fotosintética mediante incorporación de carbono-14

Uno de los métodos usados para valorar la producción primaria fue la incorporación de H¹⁴CO₃. Este método fue introducido por Steemann-Nielsen (Stemann Nielsen, 1952) para trabajar con fitoplancton, pero con las debidas modificaciones, es usado con las comunidades bentónicas (Hill and Boston, 1991). Como ventaja respecto a otros métodos tradicionales (como cambios en el oxígeno disuelto), nos ofrece una mayor sensibilidad a menores tasas de producción (Hunding, 1973; Stevenson, 1996). Este método también puede aplicarse al estudio de las algas microbentónicas (Blanck, 1988). El método aquí descrito es, salvo por algunas modificaciones, el descrito por Romaní (Romani and Sabater, 1997).

La incorporación de $H^{14}CO_3$, se determinó sobre cinco cristales, procedentes de cada canal. Los cristales eran incubados con la misma irradiancia ($110 \mu E m^{-2}s^{-1}$) y temperatura ($17-19 \text{ }^\circ C$) que en el canal, durante una hora. La incubación se realizaba en viales, con 4 ml de agua del canal correspondiente al vidrio muestreado, en un baño con temperatura controlada y agitación. El “quenching” (producción de fluorescencia que no se deba a la radioactividad de la muestra) y la incorporación no fotosintética de carbono, eran determinados con controles sin luz, tapando los viales con papel de aluminio. De modo rutinario, se realizaban controles muertos, añadiendo 200 μL de formaldehído al 40% a un par de viales, para conocer si el protocolo era llevado a cabo correctamente.

Las incubaciones se comenzaban a la misma hora en que se iniciaba el ciclo de luz en el sistema de ríos artificiales. Después de una preincubación de 30 minutos, se adicionaba 1 μCi de $NaH^{14}CO_3$ (solución madre de 1 $mCi mL^{-1}$ de NEN Research Products[®]) a cada vial. También se añadía la misma cantidad en viales 4 viales sin muestra; se les añadía el líquido de centelleo y eran llevados a contar, para disponer de las DPM iniciales.

La incorporación se detenía al cabo de una hora, adicionando 0.3 ml de formaldehído al 40%. El carbono radioactivo no fijado era eliminado mediante evaporación en medio ácido (adicionando 150 μL de HCl al 40%), durante 8 horas en una placa calefactora a $85 \text{ }^\circ C$. Para incrementar la extracción del material fotosintetizado se añadía 1 ml de DMSO (Filbin and Hough, 1983). Para finalizar se añadían 8 ml. de líquido de centelleo (Cocktail Biogreen, de Scharlau[®]). La radioactividad de la muestra era medida con un contador de centelleo sólido (Packard[®] Tri-carb liquid scintillation analyser).

Los cálculos del carbono orgánico incorporado están basados en la relación directa entre el ^{12}C total disponible y el incorporado y el ^{14}C total y el incorporado, pudiendo expresarse del modo siguiente:

$$\frac{^{12}C - incorporado}{^{12}C - disponible} = \frac{^{14}C - incorporado}{^{14}C - disponible}$$

Para el cálculo de la incorporación de carbono, se debe conocer la cantidad total de carbono disponible. La fórmula usada para transformar las cuentas obtenidas en el contador, en microgramos de carbono fijados, por hora y centímetro cuadrado, es:

$$= \frac{1.06^a (DPM^b_{muestra} - DPM^c_{controloscuro}) TIC^d}{DPM^e_{iniciales}}$$

a= factor corrector para las algas, por la preferencia a incorporar ^{12}C frente al ^{14}C

b= desintegraciones por minuto de la muestra

c= desintegraciones por minuto del control incubado sin luz

d= carbono inorgánico total, disponibles en el agua de incubación en $\mu g C mL^{-1}$

e= desintegraciones por minuto del carbono añadida por muestra inicialmente

2.3.3. Valoración de la actividad fotosintética mediante fluorimetría

Un Fluorímetro de Amplitud Modulada (Photosynthesis yield analyzer MINI-PAM, WALZ, Effeltrich, Alemania), se utilizó de modo alternativo al ^{14}C para valorar la respuesta de la fluorescencia durante la fotosíntesis (Samson and Popovic, 1988; Schreiber and Bilger, 1993; Hofstraat *et al.*, 1994; Karsten, 1996). Éste método, al no ser destructivo, permitía realizar medidas repetidas sobre la misma muestra. Los parámetros F_0 (una medida de la fluorescencia basal, que se relaciona con la cantidad total de clorofila, y por extensión a la biomasa) y el rendimiento de fotones o “Yield” (se relaciona con el rendimiento fotosintético), se midieron sobre cinco cristales de cada canal (12 en total). Los cristales se muestrearon al azar, y las medidas de fluorescencia se realizaron en una placa de Petri, con la misma agua en que se encontraban y bajo la misma luz.

El fundamento en que se basan las medidas de fluorescencia es el relatado a continuación: durante la fotosíntesis la luz es absorbida por los pigmentos de la antena y la energía de excitación es transferida a los dos fotosistemas (PSI y PSII). Los pigmentos de la antena, mediante excitaciones y desexcitaciones transfieren la energía de los fotones captados hacia los centros de reacción (CR). Los electrones de los pigmentos que componen los centros de reacción, se encuentran en orbitales deslocalizados (p). Este hecho les confiere una gran eficiencia para la captura de la energía transferida desde

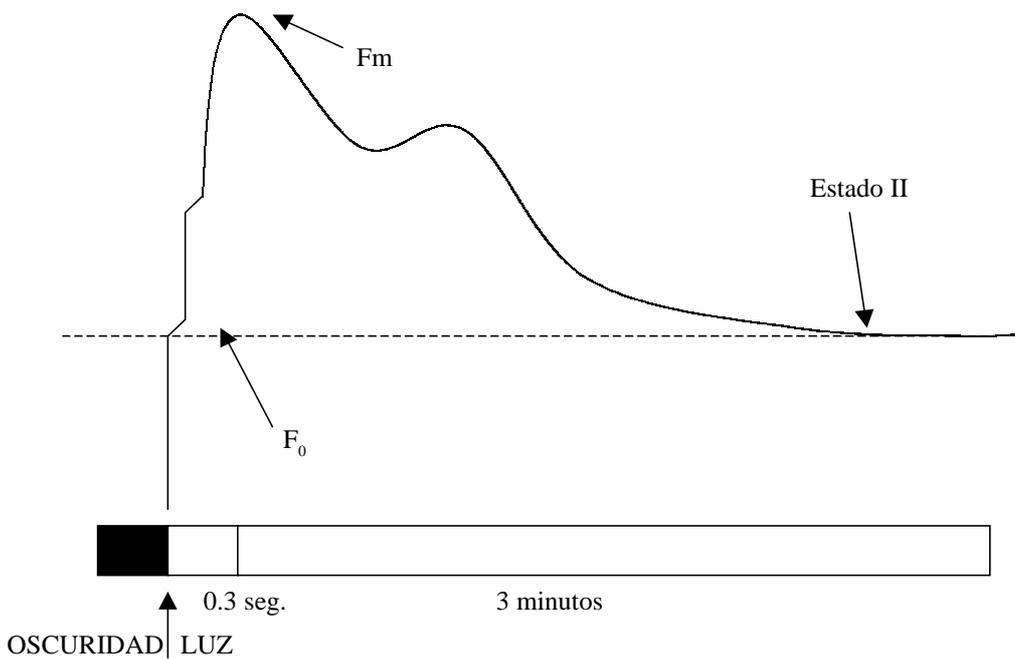


Figura 3. Cinética de la emisión de fluorescencia de la clorofila (efecto Kautsky), después de iluminar una hoja expuesta anteriormente a oscuridad (Lichtenthaler and Rinderle 1988).

los pigmentos de la antena. Los electrones de estos orbitales pueden experimentar una excitación, alcanzando los correspondientes orbitales (p^*) más energéticos, cuando son iluminados con luz del espectro visible. Los electrones permanecen en el estadio excitado durante el periodo de vida (el tiempo necesario para que el 63% de los electrones vuelvan al orbital de menor energía). Este retorno a sus orbitales originales conlleva una emisión de energía que si no es transferida a otras moléculas, o usada en reacciones, es emitida en forma de fluorescencia. Ésta, será siempre de menor energía que la luz de excitación.

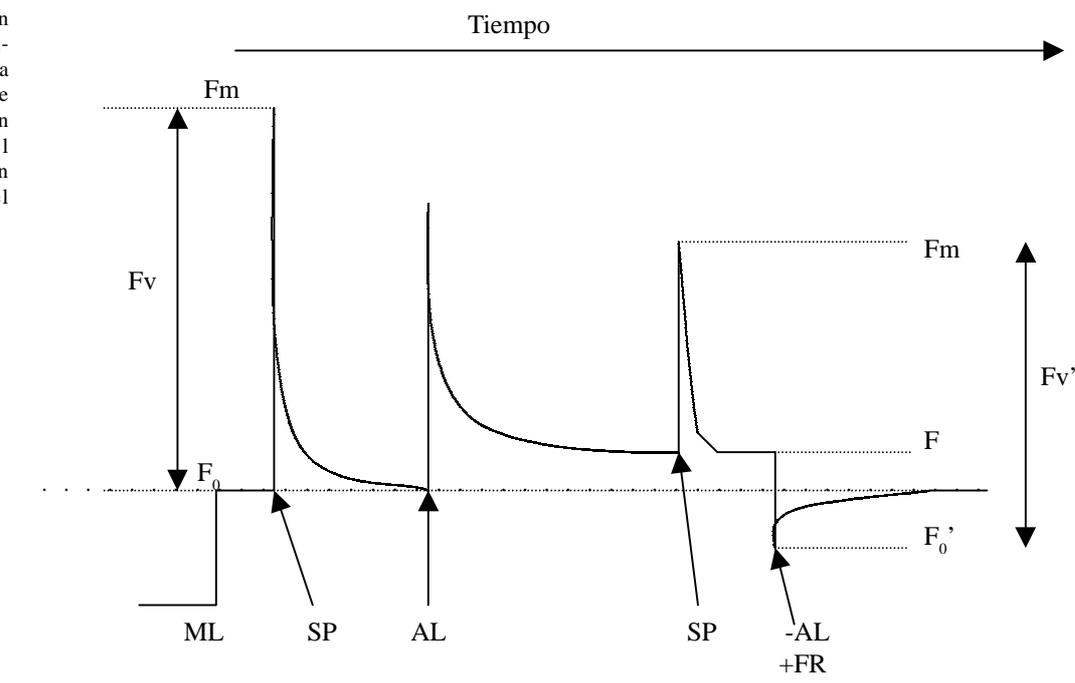
Cuando un sistema fotosintético es expuesto a la oscuridad, la cooperación entre los dos fotosistemas se pierde. El sistema fotosintético se encontrará en el “estado I”, con todos los centros de reacción abiertos (esperando la llegada de fotones). Al volver a iluminar, la emisión de fluorescencia seguirá una cinética llamada “efecto Kautsky” (Figura 3). Se pueden distinguir dos fases: una fase de emisión rápida de fluorescencia (F_m), que se completa en un tiempo de 100 a 500 milisegundos, y una segunda fase en que la fluorescencia decrece lentamente (F_d), hasta un estadio estacionario (Figura 3). En células totalmente funcionales, esta fase lenta se lleva a cabo en un tiempo de 3 a 5 minutos. Una vez alcanzado el estadio estacionario, todos los centros de reacción se encontrarán cerrados “esta-

do II” (todos habrán recibido fotones). En ese momento la actividad fotosintética habrá alcanzado el máximo rendimiento.

La fluorescencia en el nivel basal se denomina “fluorescencia constante” y proviene de las migraciones energéticas que se dan espontáneamente (sin necesidad de luz), en los pigmentos de la antena. Este valor se puede relacionar con la biomasa o con la concentración de pigmento. En cambio la “fluorescencia variable” F_v , la que se mide entre F_0 y F_m , solo es detectable cuando las células realizan la fotosíntesis. En el punto de máxima fluorescencia, todo el pool de moléculas transportadoras de electrones, se encuentran reducidas (cargadas con electrones), los centros de reacción del PSII, se encuentran cerrados.

La técnica que basándose en estos procesos mide los parámetros citados anteriormente se denomina “Pulse Amplified Modulation Chlorophyll Fluorometry”; (PAM). Los fluorómetros son capaces de registrar la dinámica de la emisión de fluorescencia, pero para poder medir la F_0 ha sido necesario combinar el método del pulso de saturación con las técnicas de modulación de fluorescencia (Schreiber and Bilger, 1993). En esta técnica la luz para la medición de la fluorescencia es aplicada separadamente de la luz actínica (la usada para realizar la fotosíntesis). De este modo, se puede trabajar con luz natural, sin que sea necesario un periodo previo de oscuridad.

Figura 4. Cinética de la emisión de fluorescencia durante el desarrollo de la técnica de "Pulse Amplified Modulation Chlorophyll Fluorometry" (Van Kooten and Snel 1990).



La emisión de fluorescencia es provocada mediante pulsos de luz cortos de baja intensidad. Gracias a un sistema de amplificación selectiva, solo la fluorescencia provocada por estos pulsos es registrada, obteniendo la F_0 (ver figura 4). Cuando se aplica la luz actínica, se obtiene entonces la cinética del efecto Kautsky (Gently *et al.*, 1989).

En el método del PAM pueden distinguirse diferentes fases (ver figura 4). Al inicio del método, los parámetros F_0 y F_m son definidos usando luz modulada (ML) y un solo pulso saturante (SP) respectivamente. Luego, la muestra es iluminada con luz actínica (AL) obteniendo el "efecto Kautsky". En el estadio estacionario (F), F_m' es calculada emitiendo otro pulso saturante (SP) que se añade a la luz actínica. Finalmente la fuente de luz actínica es apagada, y se ilumina la muestra con infrarrojo, hasta alcanzar F_0' .

La eficiencia fotosintética del PSII, por fotón absorbido, se calcula a partir de la siguiente expresión (Gently *et al.* 1989):

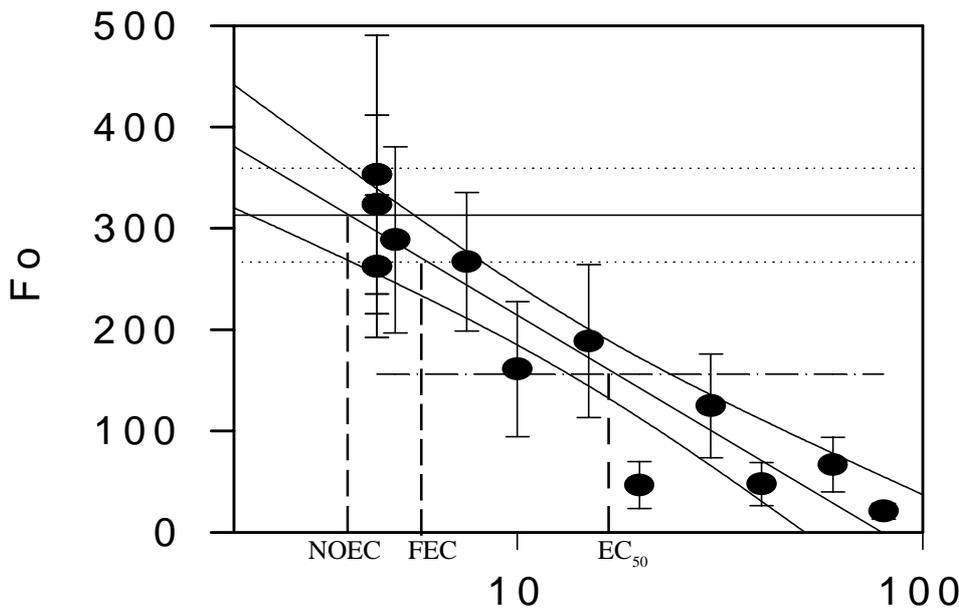
$$\Phi_{PSII} = \frac{F'_m - F'_0}{F'_m} \times \frac{F'_m - F}{F'_m - F'_0} = \frac{F'_m - F}{F'_m}$$

Considerando que el flujo de electrones del PSI y el PSII, una vez alcanzado el estadio estacionario, es igual, y que no hay deficiencias, ni daños estructurales en el resto del sistema

fotosintético, se puede asumir que el valor de f_{PSII} es un buen estimador de la eficiencia del flujo del transporte de electrones en el aparato fotosintético.

El rendimiento fotoquímico del centro de reacción del PSII abierto, resulta del cálculo $f_{Po} = F_v/F_m$. Es equivalente al producto de la probabilidad de transferencia de la excitación entre la antena y el centro de reacción del PSII, y viceversa. El valor obtenido de f_{Po} nos proporciona una idea de la función fotosintética potencial. Aporta información sobre el inicio de las reacciones fotoquímicas, pero no ofrece información sobre el proceso completo.

Las aplicaciones de la fluorimetría de amplitud modulada en estudios ecotoxicológicos son numerosas. Los organismos fotosintéticos, por su fijación al sustrato (dependiendo de los taxones), por su facilidad de recolección y por ser la base de las cadenas tróficas de los ríos se convierten en "registros" de los eventos ocurridos en un tramo cualquiera. Además, el PAM realiza una integración del estado de todos los organismos fotosintéticos cuya fluorescencia es capaz de captar. Gracias a este método, cualquier producto cuyo efecto tóxico sobre los organismos fotosintéticos sea el de alterar la fotosíntesis podrá ser estudiado. Este método nos permitirá valorar el estado fisiológico instantáneamente, valorando tanto la respuesta frente a exposicio-



Gráfica 1.

Valor de la F_0 versus concentración de tóxico (eje Y). La NOEC se determinó mediante interpolación lineal de la recta de regresión, con la media de los valores en los canales control. La FEC, mediante la interpolación de la recta de regresión con el límite inferior de confianza de los canales control. La EC_{50} se determinó mediante interpolación lineal con el punto en el que el parámetro utilizado presentaba la mitad del valor medio de los canales control.

nes breves al tóxico, como frente a exposiciones crónicas.

Es importante tener en cuenta que necesitaremos siempre la referencia del estado fisiológico de la comunidad, anterior a la exposición, para poder establecer comparaciones. Otro tipo de comparaciones serán las que se podrán establecer entre diferentes comunidades.

2.3.4. Composición y estructura de las comunidades microfitorbentónicas

Para el estudio de la comunidad se conservaron 2 cristales de cada canal, en 2 ml de formol al 4%, tomados a lo largo del experimento. La composición de la comunidad y su estructura fue caracterizada después de sonicar los sustratos de vidrio, durante 2 periodos de 2 minutos (Sabater *et al.*, 1998).

Un mínimo de 400 células fue contado e identificado en cada muestra, usando la técnica de Utermöhl. Los diferentes taxones se clasificaron, además, en diferentes clases, atendiendo a su morfología y fijación al sustrato (Gregory, 1983).

2.3.5. Observaciones con Microscopio Electrónico de Scanning

En algunos de los experimentos se realizaron observaciones con un microscopio de Scanning, HITACHI® S-2300. Para este propósito se fija-

ron las muestras seleccionadas (cristales con la comunidad adherida) con glutaraldehído al 2.5%, en tampón fosfato de pH 7.5 y conservadas en oscuridad. Posteriormente las muestras se liofilizaron y fueron recubiertas mediante un electrodo de sublimación de carbono y oro.

2.4. confección de curvas dosis-respuesta, y cálculos de EC_{50} , N.O.E.C. y F.E.C.

Para los distintos experimentos, se aplicó un modelo de regresión entre la concentración del tóxico empleado (en escala logarítmica) y la biomasa (representada por la concentración de clorofila-*a*) o actividad algal (representada por la incorporación de carbono o el rendimiento de fotones, dependiendo del método empleado), para calcular la NOEC (“Non Observed Effect Concentration”) y la EC_{50} (“Effective Concentration” que provoca una reducción del 50% del parámetro estudiado). La NOEC se determinó mediante interpolación lineal de la recta de regresión, con la media de los canales control. La FEC (“First Effect Concentration”), mediante interpolación lineal de la recta de regresión y el límite inferior de confianza de los canales control. La EC_{50} se determinó mediante interpolación lineal de la recta de regresión, con el punto en el que el parámetro utilizado presentaba la mitad del valor medio medido respecto a los canales control (ver gráfica 1). Dada la importancia de todos estos parámetros en la gestión y estudio de los sistemas naturales han

sido definidos por la "Organization for Economic Co-operation and Development" (OECD, 1984) e incorporados por numerosas agencias gubernamentales.

Estas son las herramientas que permiten comparar la respuesta de las diferentes comunidades, o valorar la evolución de una comunidad a lo largo del tiempo. La NOEC es la concentración que no provoca efectos mensurables sobre el parámetro estudiado y el FEC, es la concentración en la que comienzan a ser mensurables los efectos sobre el parámetro estudiado. Estos dos parámetros son los que podrían servir como referencia para administraciones públicas y gestores a la hora de establecer los límites de los diversos productos en el medio natural. Los valores de EC_x en cambio, serán valores de utilidad a la hora de conocer la respuesta de los diferentes taxones o comunidades ante un tóxico, lo que permitirá establecer prioridades de protección.

2.5. Herramientas estadísticas

Las diferencias de los parámetros estudiados en los diferentes tratamientos, se valoraron usando un análisis de la varianza (ANOVA), de medidas repetidas (Winer, 1971). El fin de los experimentos era siempre el de detectar diferencias entre los diferentes tratamientos, entre el expuesto al tóxico y el control, para poder atribuir al tóxico el efecto observado. En los experimentos de interacción el fin era detectar diferencias entre el control, el expuesto al tóxico y el expuesto al tóxico y al factor estudiado. De ese modo podríamos demostrar una modulación por parte del factor sobre el efecto que tiene el tóxico. Cuando las diferencias eran significativas, la comparativa múltiple se llevaba a cabo con un test TUKEY HSD o LSD (Winer, 1971). Todos los cálculos se llevaron a cabo con el programa STATISTICA (versión 4.B de Statsoft Inc., 1993). Los parámetros estudiados fueron la incorporación de carbono, el rendimiento de fotones, la concentración de clorofila, la eficiencia fotosintética (expresada como el cociente entre $\mu\text{g C incorporado}/\mu\text{g de Chl-}a$) y los biovolúmenes de los taxones.

FOTOGRAFÍAS

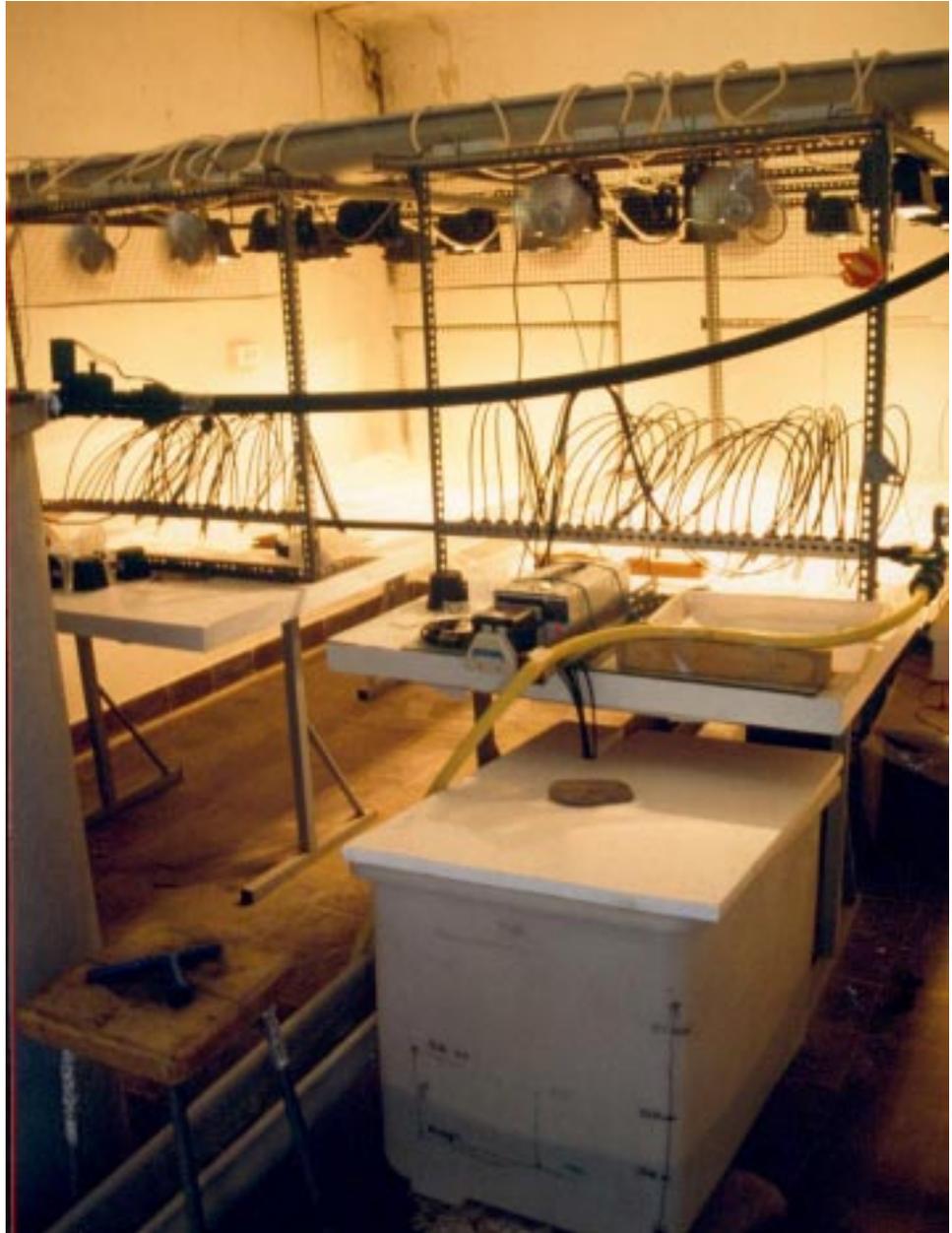
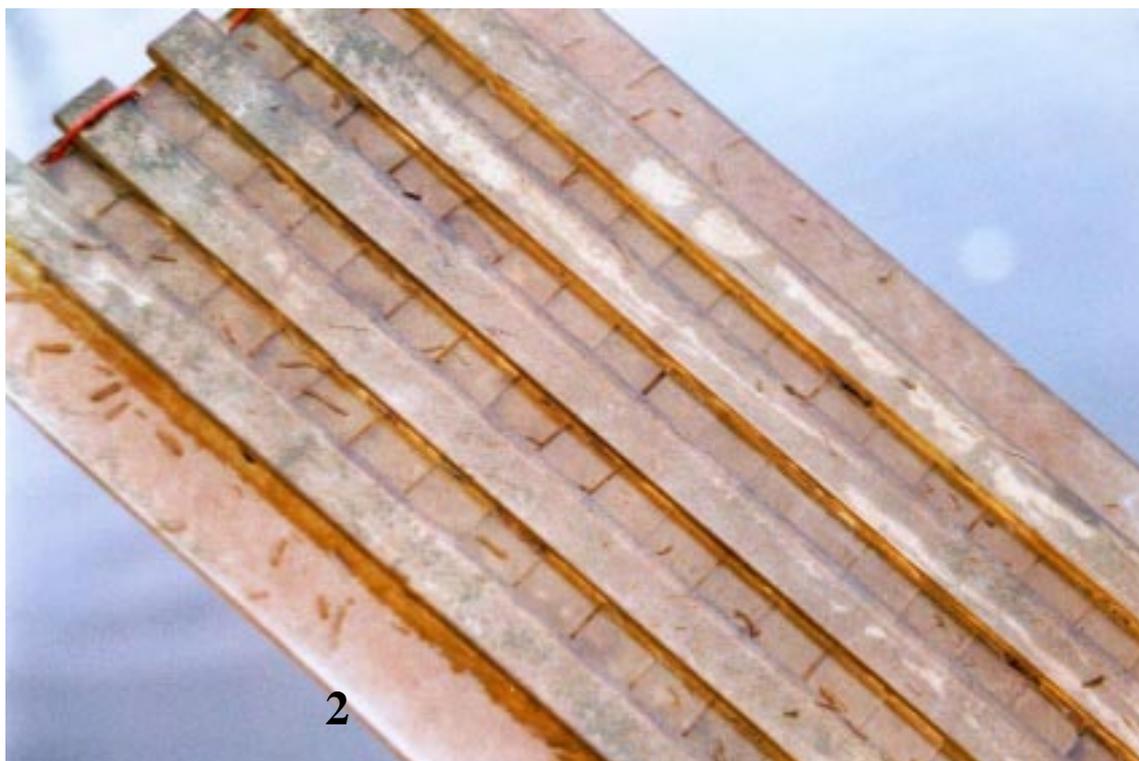
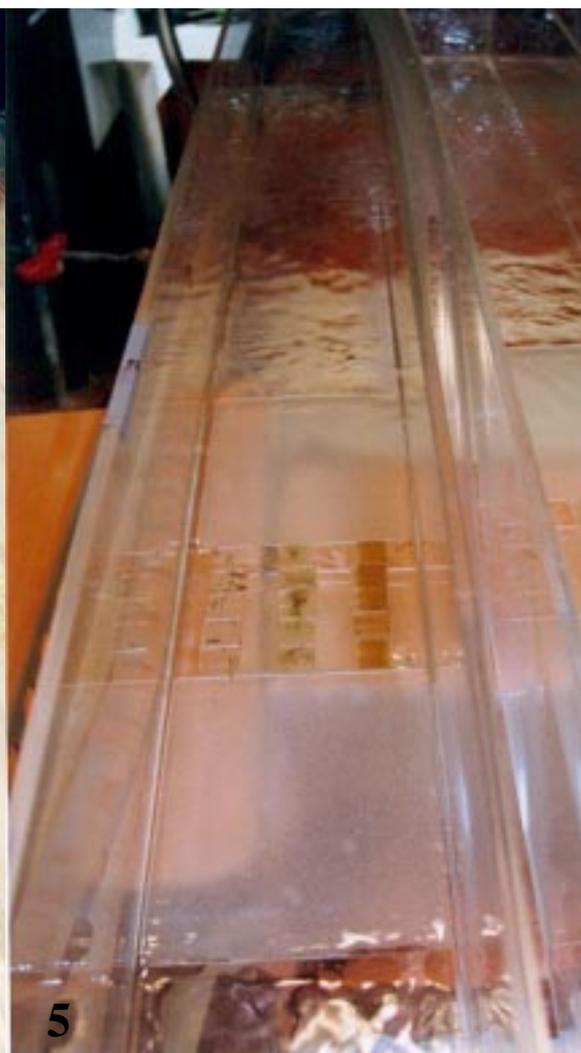


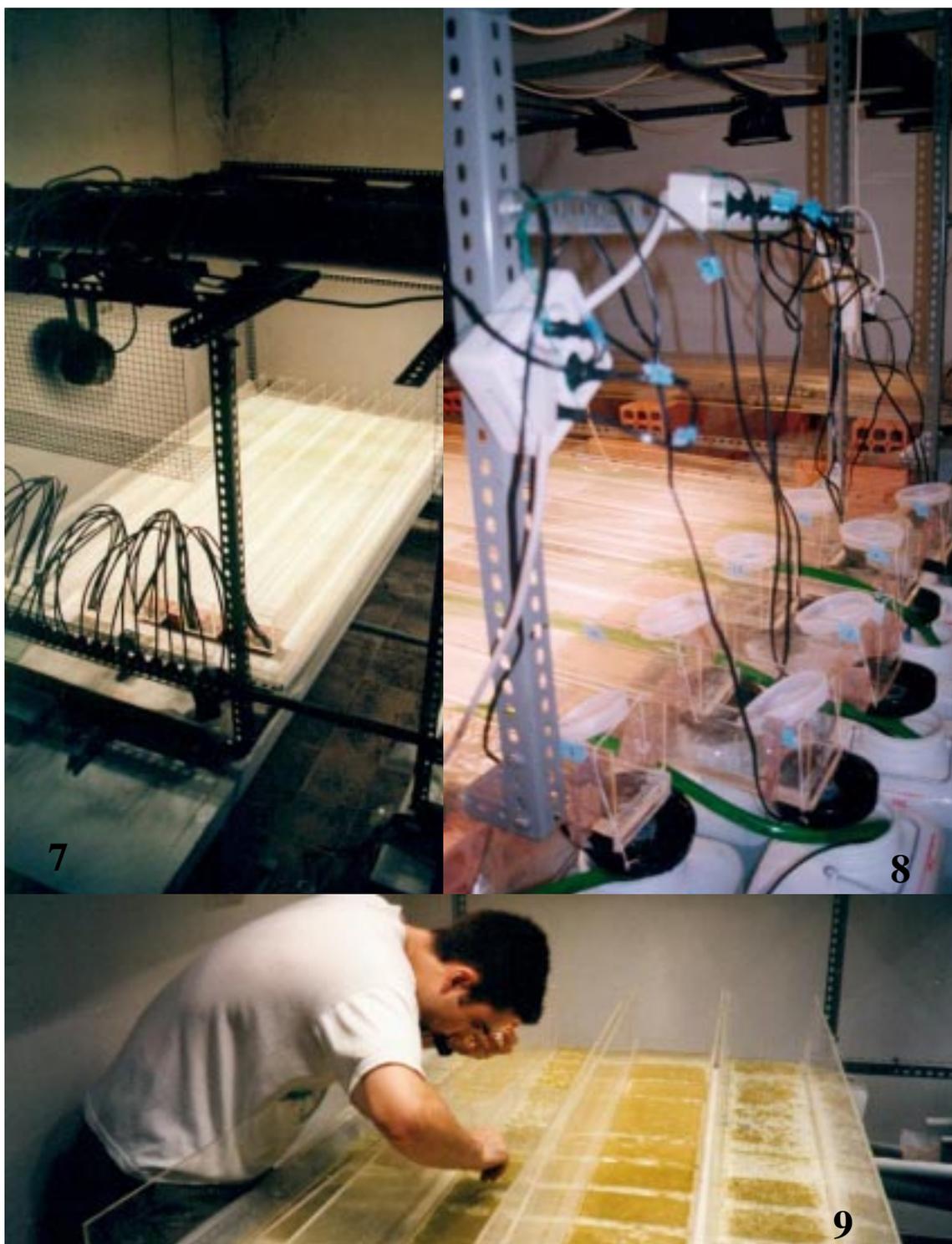
Foto 1. Sistema de canales artificiales. Las fotos mostradas permiten que de una ojeada puedan conocerse los métodos de trabajo (canales artificiales y soportes de colonización) descritos en este capítulo. El orden en que se muestran guarda relación con la secuencia temporal de trabajo. La primera tarea fue siempre la preparación y puesta a punto del sistema de canales de acuerdo con el diseño del experimento diseñado. Sobre las dos mesas se encuentran dispuestos 12 canales de metacrilato, alimentados mediante 4 goteros (los tubos delgados que parten de la tubería negra que cruza ambas mesas). A la izquierda se observa el tanque de recepción del agua que provenía de un pozo cercano. En el suelo y debajo de la mesa, encontramos el tanque de solución de tóxico (agua con cobre o atrazina) y el canal de desagüe de los canales. Sobre la mesa de la derecha se sitúa la bomba peristáltica que inyecta el tóxico en los canales correspondientes a los tratamientos con tóxico. La iluminación corre a cargo de 16 focos halógenos de 500 W.



Fotos 2 y 3. Soportes de metacrilato con los sustratos artificiales de vidrio. El siguiente paso en la experimentación consistía en depositar los soportes en lugares apropiados del río estudiado. Tras un periodo de colonización variable, dependiendo de la época del año, se recogían y se transportaban en recipientes con agua del propio río hasta el laboratorio. El tono pardo de la foto superior se debe a la colonización de las diatomeas. En la foto inferior se puede observar en cambio una colonización dominada por las clorofíceas, de ahí el tono verdoso del soporte. En ambas fotografías, pueden observarse además invertebrados y restos de la actividad de estos.



Fotos 4, 5 y 6. Una vez en el laboratorio los cristales colonizados eran extraídos de los soportes y se colocaban en los canales. En los experimentos a largo plazo, el reparto de los cristales por los canales se realizaba al azar (Foto 4), disponiéndolos en grupos de 54 (Foto 6) y colocando cristales grandes entre estas agrupaciones para mantenerlos en su sitio y proporcionar una superficie homogénea. Estos cristales grandes también se colonizaban en el mismo punto que los pequeños. El tipo de colocación dependía del experimento. Si el tipo de experimento era de dosis-respuesta, en cada canal se exponían cristales colonizados en diversos puntos a concentraciones diferentes de tóxico. Por ello se colocaban únicamente 5 cristales por punto y claramente separados (Foto 5).



Fotos 7, 8 y 9. Una vez que los cristales se habían colocado en los canales había un periodo de aclimatación. Durante este tiempo crecía la comunidad, homogeneizándose la superficie por la que discurría el agua y logrando de ese modo reducir la varianza entre réplicas. El tipo de circulación del agua dependía del tipo de experimento. Se utilizaba un circuito abierto (Foto 7) en los experimentos a largo plazo, pero en los de dosis respuesta se utilizaba un circuito cerrado (Foto 8), que reutilizaba el agua con el tóxico empleado para asegurar la exposición a una concentración constante de tóxico. En la foto 7 se observa como el agua de los canales se desagua al final, en cambio en la 8 el agua se recoge en una garrafa donde una bomba impulsa de nuevo el agua hasta el inicio del canal. Estas garrafas se mantenían a temperatura constante mediante un baño termostático, y el pH se controlaba mediante adición de ácido clorhídrico diluido. Una vez transcurrido el periodo de aclimatación se comenzaba con el experimento, exponiendo a la comunidad a los factores a estudiar y recogiendo muestras (Foto 9) para trabajar con ellas. La selección de los cristales a muestrear se realizaba aleatoriamente.



Fotos 10 y 11. Para la valoración de la fotosíntesis se utilizaron dos metodologías, la primera basada en la utilización de carbono 14 (Foto 10), donde era necesario incubar las algas en presencia de este isótopo del carbono. Para ello se disponía de un baño termostático y un agitador que evitaba la formación de gradientes sobre las algas. Cada muestra (soporte de cristal) se introducía en un bote de vidrio donde se añadía una cantidad conocida del isótopo. La otra metodología empleaba un fluorímetro (Foto 11) que, basándose en la emisión de pulsos de luz, era capaz de medir ciertos parámetros relacionados con el funcionamiento del aparato fotosintético de las algas.

11

INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DEL AGUA EN EL EFECTO TÓXICO DE LA ATRAZINA SOBRE LAS COMUNIDADES MICROBENTÓNICAS

3.1. Introducción

La atrazina es uno de los pesticidas cuyos efectos sobre los ecosistemas acuáticos continentales están más estudiados. La mayoría de los estudios se centran en cómo afecta a la estructura y composición de las comunidades algales a corto (agudo) o largo plazo (crónico), y en la modulación del efecto de la atrazina por parte de algunos factores ambientales y químicos, incluyendo otros tóxicos (Huber, 1993, Solomon *et al.*, 1996). Se desconoce cómo la velocidad del agua puede alterar la respuesta ecotoxicológica de las comunidades. En este capítulo se propone determinar si la velocidad incrementa el efecto tóxico de la atrazina o si contrariamente, no influye en el funcionamiento de las comunidades algales microbentónicas.

Desde hace tiempo se conoce que (dentro de un rango de 0 a 50 cm s⁻¹ y en aguas oligo y mesotróficas) a mayores velocidades del agua corresponden mayores crecimientos algales (Whitford and Schumacher, 1964, McIntire, 1966, Horner *et al.*, 1983, Welch *et al.*, 1988). Para explicar estos resultados, Horner y Welch (Horner and Welch, 1981) proponen algunos mecanismos dependientes de la velocidad, para explicar el desarrollo algal. A mayor velocidad el grosor de la capa límite disminuye (Geankopolis, 1972, Grady and Lin, 1980, Sand-Jensen, 1983, Stevenson, 1983). Como resultado de esto, disminuye el gradiente de difusión a través de la capa límite, facilitando la difusión de nutrientes desde las capas de agua más alejadas de la superficie celular, hasta las capas que están en contacto con la célula y de donde son incorporados por las células en crecimiento. Este efecto parece ser significativo a partir de 15 cm s⁻¹ (Whitford and Schumacher, 1964). Si esto ocurre con los nutrientes, es lógico pensar que también ocurrirá con los tóxicos. A mayor velocidad, mayor disponibilidad de tóxico. Si una comunidad se expone a una concentración de 20 µg L⁻¹ de atrazina, a velocidades de 1 cm s⁻¹, y 15 cm s⁻¹ la biodisponibilidad del tóxico habrá sido mayor en el caso de 15 cm s⁻¹. Según Huber (1993), la concentración de 20 µg L⁻¹ de atrazina es el umbral en el que numerosos autores sitúan la transición entre el NOEC y los primeros efectos sobre determinados taxones. Por ese motivo utilizaremos esta concentración en este experimento.

Al utilizar una combinación de las velocidades 1 y 15 cm s⁻¹ y las concentraciones 0 y 20 µg L⁻¹ de atrazina estamos combinando los dos umbrales de aparición de efectos para ambos factores: el de la velocidad, ya que incrementa la biodisponibilidad de solutos y el de la atrazina, ya que a partir de esta concentración empiezan a observarse los primeros efectos sobre los organismos. De este modo si aparece realmente una mayor tolerancia a una mayor velocidad se demostrará lo importante que es la interacción de estos dos factores, ya que no será necesario encontrarse grandes concentraciones de atrazina o velocidades para que este efecto comience a resultar un agente modificador en el desarrollo de las comunidades algales.

¿Cómo comprobar nuestra hipótesis? Blank *et al.* (Blank and Wängberg, 1988) propusieron un marco teórico denominado PICT (Pollution Induced Community Tolerance) que predice el efecto de sustancias tóxicas en comunidades de perifiton. El PICT se basa en tres principios:

- 1) La sensibilidad de los individuos y especies que componen una comunidad, frente a una sustancia tóxica es diferente.

Tratamiento	Día 0 Incorporación ¹⁴ C [mg C cm ⁻² h ⁻¹]	Día 14 ¹⁴ C [mg C cm ⁻² h ⁻¹]	EC ₅₀ [mg L ⁻¹ de atrazina]	R ² de EC ₅₀
Control	0.72 ± 0.3	4.82 ± 0.81	656	0.82
Atrazina	4.01 ± 3.1	8.67 ± 0.81	507	0.98
Velocidad	3.56 ± 1.3	10.17 ± 1.6	382	0.91
Velocidad y atrazina	0.39 ± 0.5	8.87 ± 0.53	717	0.88

Tabla 1. Resultados del experimento, tras 14 días de exposición

- 2) Cuando la concentración de la sustancia tóxica excede el nivel necesario para afectar a alguno de los individuos, el tóxico comienza a comportarse como un agente estructurador de la comunidad. Los individuos más sensibles de la comunidad desaparecen, incrementando de este modo la tolerancia global de la comunidad frente al tóxico.
- 3) Este incremento en la tolerancia de la comunidad podrá ser valorado mediante tests fisiológicos.

Basándonos en el concepto propuesto por el PICT, la tolerancia tras la exposición a la atrazina debería incrementarse, y más aun en el caso del tratamiento con velocidad. Lo que se propone por tanto, es la valoración del incremento de tolerancia que esta exposición diferencial a la atrazina debería producir en las comunidades, con la salvedad de que esta exposición diferencial no será debida a diferentes concentraciones de atrazina, sino a la interacción de una misma concentración de atrazina con dos velocidades del agua diferentes.

3.2. Material y métodos

Los sustratos fueron precolonizados en la riera de L'Avencó, durante 15 días. Tras este periodo, se dejó un tiempo de aclimatación de 7 días en los canales artificiales bajo las dos diferentes velocidades pero sin añadir la atrazina. Después y durante los 14 días restantes se mantuvieron 8 canales con los siguientes tratamientos: 2 con una velocidad de 1 cm s⁻¹ y 0 µg L⁻¹ de atrazina [C]; 2 con una velocidad de 1 cm s⁻¹ y 20 µg L⁻¹ de atrazina [Atr]; 2 con una velocidad de 15 cm s⁻¹ y 0 µg L⁻¹ de atrazina [V]; velocidad de 15 cm s⁻¹ y 20 µg L⁻¹ de atrazina [V+Atr]. La velocidad en los canales se valoró mediante adición de cloruro sódico (Marti and Sabater, 1996). El agua que alimentaba los canales procedía de un pozo. La conductividad era elevada, 1900 µS cm⁻¹ ligado a una alta concentración de sulfatos y cloruros, los nutrientes también 65-70 mg L⁻¹ de nitratos, 2.5-5 µg L⁻¹ de fosfatos, y el nitrito y el amonio por debajo del límite de detección

[<0.01 mg L⁻¹]. La iluminación se realizó mediante lámparas halógenas de 500 W, que proporcionaban una irradiancia a nivel del agua superior siempre a 100 mE m² s⁻¹. El fotoperiodo se ajustó a 8 horas de luz y 16 de oscuridad. La temperatura del agua se mantuvo constante [20 ± 0.7 °C].

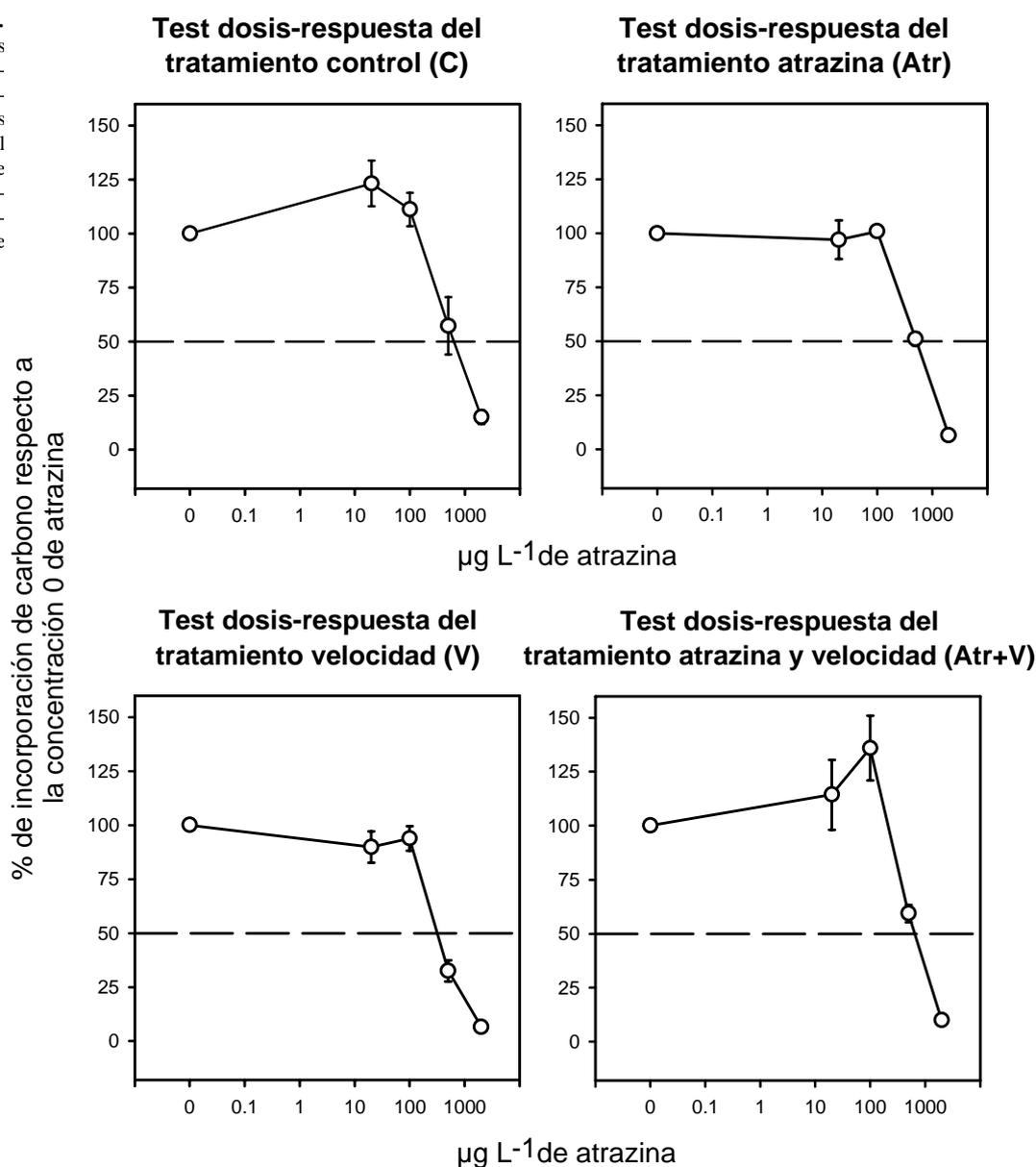
Se pretendía observar como la interacción del tóxico y la velocidad afectaban a la sensibilidad de las comunidades microbentónicas. Se valoró la incorporación de de ¹⁴C en forma de NaH¹⁴CO₃ [ver capítulo 1] al inicio y al final del periodo de exposición. Se realizó un test de dosis-respuesta frente a la atrazina, valorándose la incorporación de ¹⁴C en forma de NaH¹⁴CO₃. Se preparó un banco de diluciones de atrazina (Gustavson and Wangberg, 1995) de 0, 40, 200, 1000 y 4000 µg L⁻¹, a las que se expusieron 10 sustratos [de 1 cm² cada uno] de cada tratamiento.

Se seleccionaron al azar los sustratos de cada tratamiento, y se preincubaron durante una hora en viales con 30 ml. de agua de su propio canal. Después se añadieron 30 ml. de las soluciones de atrazina, logrando así unas concentraciones de 0, 20, 100, 500 y 2000 µg L⁻¹ de atrazina y 1 µCi de ¹⁴C en forma de solución acuosa de NaH¹⁴CO₃. Pasada una hora se interrumpió la incorporación de carbono matando a las algas con 300 µL de Formol 40%. El cálculo de las EC₅₀ se detalla en el capítulo 1.

3.3. Resultados

Tras una exposición de 14 días a 20 µg L⁻¹ de atrazina, la incorporaciones de carbono y las EC₅₀ obtenidas fueron las indicados en la tabla 1. La mayor EC₅₀ es la presentada por el tratamiento expuesto a atrazina y a una mayor velocidad del agua. Es además el que presenta un incremento proporcional mayor (más de 22 veces el valor inicial) de la incorporación de carbono mayor los 14 días de exposición. El resto de tratamientos incrementan su incorporación entre 2.1 y 6.7 veces. La respuesta

Figura 1. Detalle de los tests de dosis-respuesta. En algunos casos cabe destacar el incremento que se observa a bajas concentraciones de atrazina.



ecotoxicológica de las comunidades frente a un banco de concentraciones crecientes de atrazina, se puede observar en la figura 1. Es el test de dosis-respuesta. La menor EC_{50} es la presentada por el tratamiento de velocidad de 15 cm s^{-1} y no expuesto a atrazina.

3.4. Discusión

Los resultados confirman la hipótesis inicial. Es decir, al comparar entre los tratamientos expuestos a la atrazina, el que presenta una mayor tolerancia es el expuesto también a una mayor velocidad. A pesar de haber estado expuesto a la misma concentración de atrazina, la tolerancia del tratamiento con 15 cm s^{-1} es un 41% superior al tratamiento expuesto a una velocidad de 1 cm s^{-1} [717 frente a $507 \mu\text{g L}^{-1}$ de atrazina].

Si comparamos entre los tratamientos de 1 cm s^{-1} , según el PICT-CONCEPT, el tratamiento expuesto a atrazina debería presentar una mayor tolerancia, pero no es así. Se ha descrito que los nutrientes son un factor que protege ante la atrazina (Barreiro and Pratt, 1994) y dada la alta concentración de nitratos y la moderadamente alta de fosfatos en el agua utilizada, podemos pensar que ha sido un factor importante en la mayor tolerancia que presenta el tratamiento no expuesto a atrazina. Otro aspecto a tener en cuenta, a la hora de explicar la mayor tolerancia, sería la de la selección positiva que ejerce la exposición a la atrazina sobre los individuos que presenten mutaciones favorables. Una de estas posibles mutaciones en el gen *psbA* es la que reduce enormemente la afinidad de la proteína D1 [parte de la $Q_{[b]}$] por la atrazina (Hirshberg

and McIntosh, 1983). Esta mutación proporcionaría a sus poseedores una ventaja ante el resto de individuos, facilitando su crecimiento.

Numerosos factores relacionados con la eutrofización y polución [$\text{PO}_4\text{-P}$, $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, atrazina], han demostrado estar relacionados con la sensibilidad de las comunidades frente a la atrazina (Guasch and Sabater, 1998). También, factores propios de la dinámica del biofilm, como la sucesión de especies y la edad de la comunidad pueden modificar la tolerancia frente a la atrazina (Guasch *et al.*, 1997). Un factor clave como la irradiancia, ha demostrado también ser un factor importante en el incremento de la tolerancia frente a la atrazina (Mayasich *et al.*, 1986, Millie *et al.*, 1992, Guasch *et al.*, 1997). Todos estos resultados indican que todas las variables que intervienen en el desarrollo de las comunidades algales son susceptibles de alterar de algún modo la sensibilidad de las comunidades frente a los tóxicos.

Generalmente en estos estudios la velocidad ha sido utilizada más como un descriptor de los puntos de muestreo que como una variable de estudio. Shriner y Gregory (1984) no recomiendan un especial cuidado en la elección de la velocidad del agua. Nuestros resultados demuestran que la velocidad debe ser tomada en cuenta como una variable clave más de los estudios, por las repercusiones que tiene tanto en el desarrollo de las comunidades como en la modificación (a través de cambios en la biodisponibilidad) del efecto de los tóxicos.

Un aspecto a destacar en las gráficas de los tests de dosis respuesta, es el incremento -a bajas concentraciones de atrazina- en la incorporación de carbono que experimentan los tratamientos control y atrazina-velocidad. Hay varias hipótesis para explicar este fenómeno que se basan en la competencia. La atrazina detiene el flujo de electrones entre el PSI y el PSII, inhibiendo la regeneración de NADPH desde NADP^+ . Sin NADPH la fijación de carbono en el ciclo de Calvin es impedida. La fotosíntesis en las especies o individuos más sensibles se interrumpe. A corto plazo en estas células dejan de funcionar los mecanismos que requieren energía, como la incorporación de CO_2 y nutrientes (Schubnell *et al.*, 1999); lo que puede beneficiar a otras algas con las que competían, las cuales de repente tienen a su disposición muchos más recursos.

Los estudios de la sensibilidad de las comunidades algales frente a los tóxicos y el papel que juegan los factores ambientales, son una buena manera de complementar los índices basados en la taxonomía. Estos índices han sido adoptados por numerosos gobiernos como método de control y gestión de la calidad del agua (Whitton *et al.*, 1991, Prygiel and Coste, 1993, Whitton and Rott, 1996). Esta metodología se basa en la respuesta diferencial de las especies frente a un tóxico, siendo unas más tolerantes que otras. Esto nos permite inferir la calidad del agua a partir del conocimiento de las especies que se encuentran en ella. Pero numerosos factores pueden modificar al efecto que el tóxico tenga sobre las especies, modificando por tanto el resultado de nuestros índices. Gracias a resultados como los que aquí se presentan, los usuarios y creadores de esos índices podrán disponer de una base de conocimientos más amplia para su aplicación e interpretación.

INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DEL AGUA EN EL EFECTO TÓXICO DEL COBRE SOBRE LAS COMUNIDADES MICROBENTÓNICAS

3.5. Introducción

La velocidad del agua es un factor determinante en la distribución de los organismos en los ecosistemas lóticos (Stevenson, 1996). Este factor está relacionado, además, con el acúmulo de biomasa (Biggs, 1996), con el tipo de forma vital del perifiton (Biggs *et al.*, 1998) y con las interacciones entre algas y herbívoros (Poff and NelsonBaker, 1997). Las respuestas a corto plazo del perifiton ante un incremento de la velocidad son principalmente fisiológicas. Existen abundantes trabajos que evidencian que un incremento del flujo de agua se traduce en una estimulación de la fotosíntesis (Pfeifer and McDiffett, 1975), incorporación de nutrientes (Whitford and Schumacher, 1961, Lock and John, 1979) y respiración de las algas bentónicas (Whitford and Schumacher, 1961). El incremento en la velocidad del flujo provoca una disminución en el grosor de la capa límite alrededor de las células que se traduce en una mayor tasa de renovación de los gases disueltos y del suministro de nutrientes (Stevenson and Glover, 1993).

El flujo de iones está relacionado también con los procesos de difusión (Maccrobie, 1974) y la incorporación o adsorción de otros elementos disueltos. De entre estos elementos disueltos, los metales adquieren una especial relevancia a causa de su toxicidad potencial para las comunidades de perifiton. La incorporación de metales se lleva a cabo mediante un mecanismo bifase (Genter, 1996), la primera es principalmente física (bioadsorción) mientras que la segunda depende del metabolismo. Durante la segunda fase la incorporación de metal está gobernada tanto por el coeficiente de difusión como por el área y grosor de la pared celular implicada, de acuerdo a la primera ley de Fick (Mason and Jenkins, 1995). La incorporación se relaciona por tanto con el grosor de la capa límite y esta con la velocidad del agua. Estas consideraciones nos llevan a sospechar que la incorporación de metales pesados por parte de las algas estará relacionada con la velocidad del agua y que este factor puede modular el efecto de una cierta concentración de metal sobre la comunidad algal. Aunque las bases físicas para el efecto de la difusión en la incorporación de metales están bien establecidas (Mason and Jenkins, 1995), las implicaciones ecológicas para las comunidades algales no han sido exploradas. El establecer y demostrar la relación entre la velocidad del agua y el efecto tóxico del cobre, comportará grandes implicaciones en la predicción de la toxicidad de los metales pesados sobre los ecosistemas acuáticos continentales.

En nuestro estudio se usó el sistema de canales artificiales, descritos anteriormente, para determinar como la variación de la velocidad del agua modifica el efecto del cobre sobre la estructura de la comunidad, sobre la biomasa y sobre la actividad fotosintética de una comunidad dominada por diatomeas. Los canales proporcionan la oportunidad de aislar el efecto de las variables ambientales sobre las comunidades algales (McIntire, 1964, Lamberti and Steinman, 1993). Este trabajo se centró particularmente en el efecto, a corto y medio plazo, de concentraciones de cobre halladas en ríos moderadamente contaminados. Aunque existen numerosos trabajos acerca del marcado efecto que el cobre tiene sobre la estructura de la comunidad algal y su metabolismo (Eichenberger *et al.*, 1981, Leland and Carter, 1984, Leland and Carter, 1985, Pratt and Rosenberger, 1993), se ha

Experimentos	Tratamientos	Velocidad	Cobre	Controles	Número réplicas	Tipo diseño	Tabla 1.
Experimento 1	2	1-15	15	Si	3	factorial	Descripción de los experimentos; la velocidad se da en cm s ⁻¹ y el cobre en µg L ⁻¹ .
Experimento 2	4	1-20-30-50	15	-	3	exponencial	
Experimento 2	2	20-30	30	Si	3	factorial	

escrito muy poco acerca de los factores que pueden modificar este efecto. Se llevaron a cabo tres experimentos para demostrar cómo diferentes velocidades del agua (seleccionadas dentro del rango de condiciones naturales), tienen un efecto diferencial en la respuesta de la comunidad algal frente al cobre. Se estudió, además, qué parámetros de la comunidad (funcionales y estructurales) fueron los más sensibles a esta variación de velocidades.

3.6. Material y métodos

Los experimentos fueron llevados a cabo durante la primavera y verano de 1997 en los canales artificiales. Se usaron 12 canales con caudales de 1.5 L min⁻¹. La profundidad del agua variaba entre 0.1 y 1.4 cm. Al inicio del canal se colocó una pequeña cámara de mezcla para homogeneizar el flujo y la mezcla con la solución de cobre. El agua de pozo utilizada tenía una conductividad elevada 1900 mS cm⁻¹, relacionada con altos niveles de sulfatos y cloruros), una baja concentración de fosfatos (2 mg P-PO₄) y un nivel relativamente elevado de nitrato (13 mg N-NO₃). La temperatura en los canales osciló entre los 15 °C del primer experimento y los 21 °C del último.

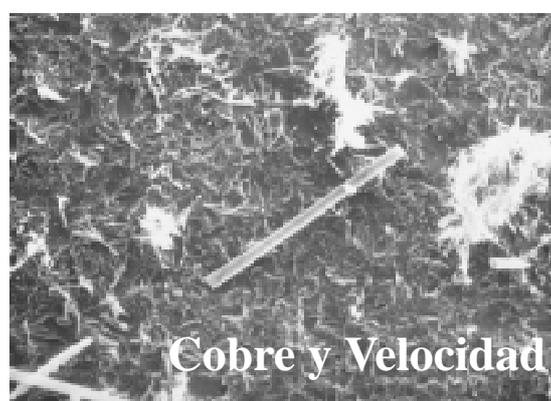
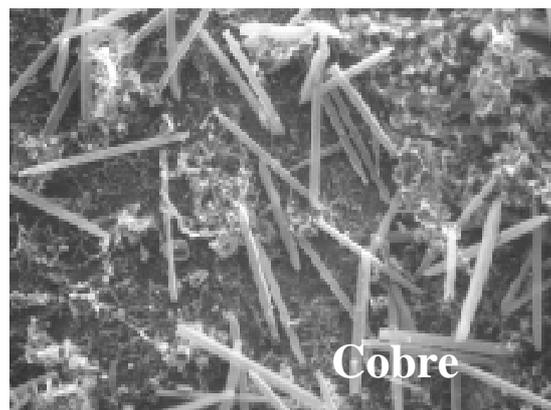
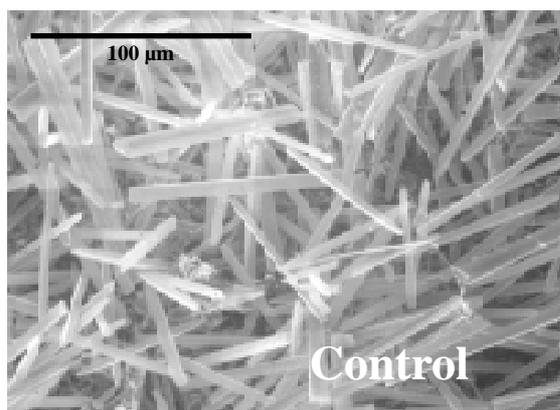
Variando la pendiente en los canales fue posible regular la velocidad del agua. Las velocidades en el primer experimento fueron de 1 y 15 cm s⁻¹; de 1, 20, 30 y 50 cm s⁻¹, en el segundo y de 20 y 30 cm s⁻¹, en el último. La velocidad media en los canales se calculó mediante adición de cloruro sódico (Triska *et al.*, 1989), usando el cambio en la conductividad a lo largo del tiempo. La estimación del número de Reynolds para determinar el tipo de flujo (Allan, 1995), mostró que el flujo en todos los casos fue laminar (Re = 306-391). Los canales fueron iluminados mediante lámparas halógenas (OSRAM® Haloline R7 s 230v-500W) que producían radiación activa fotosintéticamente (en el rango de 400 a 1000 nm). La irradiancia a nivel de la superficie del agua era de 110 mmol m⁻² s⁻¹. El fotoperiodo fue ajustado a 8 horas de luz y 16 de oscuridad.

El fondo de los canales fue completamente cubierto con vidrios matizados, que fueron previamente colonizados en ríos prístinos (Fuirosos y Avencó, NE España (descritos en Guasch *et al.*, 1997), situados cerca del laboratorio (1 hora en coche). Los cristales se colocaron en racks de metacrilato y fueron situados en zonas de corriente de ambos ríos durante 2 semanas. Tras este período se transportaban al laboratorio y se situaban en los canales. Los cristales colonizados se dejaron durante una semana de aclimatación a las diferentes velocidades. Se usaron dos tipos de sustratos; unos pequeños que servían como unidades de muestreo (1.2x1.2 cm) para la incorporación de ¹⁴CO₃ H, concentración de clorofila-*a* y composición taxonómica. Otros mayores (12x9 cm) se situaron entre los grupos de pequeños para asegurar la homogeneidad del fondo y mantener un mismo régimen de flujo. El diseño de los tres experimentos está detallado en la tabla 1.

La solución de cobre se preparó a partir de cloruro de cobre concentrado, Titrisol 1 g L⁻¹ de Merck®. Esta solución de cobre concentrado se añadió mediante una bomba peristáltica durante 7 días. Las concentraciones de trabajo (15-30 mg L⁻¹ Cu son usuales en ríos moderadamente polucionados del NE de España; valores de 120 mg L⁻¹ Cu han sido medidos en ríos muy contaminados de la misma área geográfica (Armengol *et al.*, 1993). La duración de la exposición al cobre (7 días en todos los casos) nos permitió valorar los cambios a corto y medio plazo en parámetros estructurales y funcionales. Se recogieron muestras de agua para análisis de cobre a las que se añadió 1% de ácido nítrico antes de congelarlas. El análisis de cobre (ICP-OES) confirmó la coincidencia entre las concentraciones de cobre medidas en los canales y el cobre añadido nominal.

Los cambios en clorofila-*a* e incorporación de carbono fueron valorados en todos los canales los días 0, 1, 3 y 7 del experimento. La estructura y composición de la comunidad se estudió los días 0 y 7. Se recogieron 15 cristales aleatoriamente, de cada canal. Ocho, para la in-

Fotografías.
Corresponden a los 4 tratamientos el último día de experimentos.



corporación de carbono (tres usados como control incubados en oscuridad), cinco, para clorofila y dos para conocer la estructura de la comunidad. Se calculó el índice de Shannon-Wiener (Shannon and Weaver, 1963). Los biovolúmenes se calcularon a partir de las estimas de 10 células de cada taxon y usando las fórmulas geométricas aproximadas de su forma (Lowe and Laliberte, 1996). Los taxones fueron agrupados en función de su tipo de crecimiento, de acuerdo con su morfología y tipo de unión al sustrato (Gregory, 1983). Los métodos se describen en el capítulo 1.

La tolerancia de las comunidades al cobre (Blanck, 1988) fue valorada al final del primer experimento, sobre una selección de sustratos seleccionados de los diferentes tratamientos. Los sustratos fueron expuestos a diferentes concentraciones de cobre (30, 60 y 300 mg L⁻¹ Cu) con cinco réplicas por cada concentración, incluida la control (0 mg L⁻¹ Cu). Se calcularon los valores de la EC₁₀ (Concentración Efectiva de cobre que reduce en un 10% el parámetro valorado) para la actividad fotosintética, mediante interpolación log-lineal (ver capítulo de métodos).

Las diferencias entre tratamientos se valoraron

examinando las diferencias en incorporación de carbono, (en relación al área y a la cantidad de clorofila), y la concentración de clorofila usando una ANOVA de medidas repetidas (Winer, 1971). Este tipo de ANOVA valora la dependencia del tiempo en las observaciones que caracterizan la secuencia temporal. La interacción (tiempo x tratamiento) muestra la diferencia a través del tiempo causada por la adición de cobre. Las diferencias significativas entre tratamientos para la densidad algal, diversidad y biovolumen de los taxones analizados fueron valoradas en el día 7 mediante una one-way-ANOVA. Los valores de densidad algal, y biovolumen fueron log-transformados para el análisis. Las comparaciones múltiples entre medias fueron analizadas en todos los casos mediante una test TUKEY HSD (Honest Significant Difference). Este tipo de test es aplicable a un número relativamente amplio de situaciones (Winer, 1971).

El diseño de los experimentos quería responder a varias preguntas:

- 1) ¿Modifica la velocidad el efecto tóxico del cobre sobre las comunidades de perifiton?
- 2) ¿Cómo se ve afectada la interacción observada a diferentes velocidades del agua?

3) ¿Cómo se ve afectada la interacción observada a diferentes concentraciones de tóxico?

El diseño de los experimentos se muestra en la tabla 1. La elección de los parámetros de los experimentos 2 y 3 se basó en los resultados del 1 y del 2 respectivamente. La concentración de cobre del primer experimento se basa en las características de los ríos de la zona (Armengol *et al.*, 1993).

3.7. Resultados

Clorofila-a. Experimento 1. Los canales control con una velocidad de 15 cm s⁻¹ mostraron el mayor incremento de clorofila-a tras los 7 días del experimento (Figura 1A).

Experimento 2. El único tratamiento que tras siete días de exposición incrementa significativamente su concentración de clorofila es el de 20 cm s⁻¹ (p=0.035). El resto se mantiene como el primer día. La grafica (Figura 1B) muestra una tendencia a incrementar la concentración de clorofila en los tratamientos de velocidades medias (20-30 cm s⁻¹) y a la pérdida de clorofila en los tratamientos de velocidades bajas y altas (1-50 cm s⁻¹).

Experimento 3. En el tercer experimento no hubo diferencias significativas entre los tratamientos de 20 y 30 cm s⁻¹ (Figura 1C).

El cobre causó un descenso significativo en la cantidad de chl-a a través del tiempo en los experimentos 1 y 3 (ANOVA de medidas repetidas, p = 0.0001). Este efecto causó una reducción en la concentración de clorofila de entre un 50% (exposición a 15 mg L⁻¹ Cu) hasta un 600% (exposición a 30mg L⁻¹ Cu) en comparación con los controles (Figura 1). El efecto difiere entre las dos velocidades, tanto en el momento en que aparece como en la magnitud. En la exposición a 15 mg L⁻¹ Cu (Experimento 1), la clorofila sufre un descenso significativo después de 7 días a 1 cm s⁻¹ (p=0.00015), pero solo después de tres días a 15 cm s⁻¹ (p=0.00015) (Figura 1A). La exposición a 30 mg L⁻¹ Cu provocó el descenso en la concentración de clorofila después del tercer día, tanto a 20 como a 30 cm s⁻¹, en comparación con los controles (p=0.0354 y p=0.0188 respectivamente) (Figura 1C). Por otra parte, no hay diferencia significativa en el descenso provocado por la exposición a 30 mg L⁻¹ Cu, entre el tratamiento a 20 o

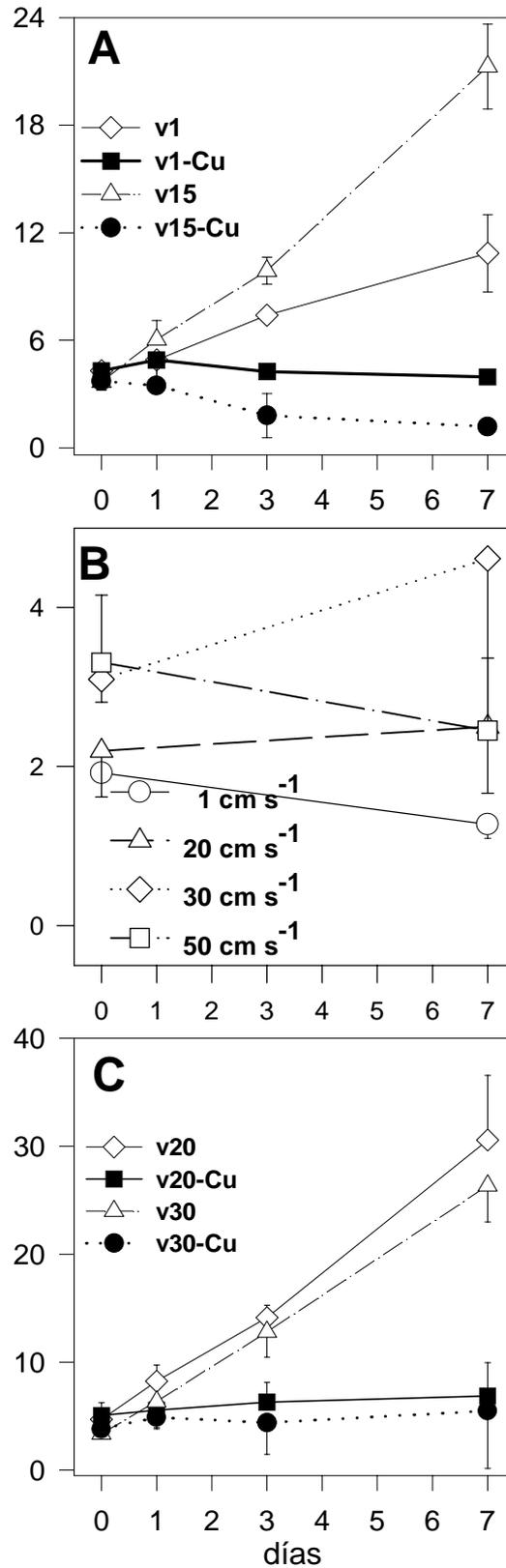
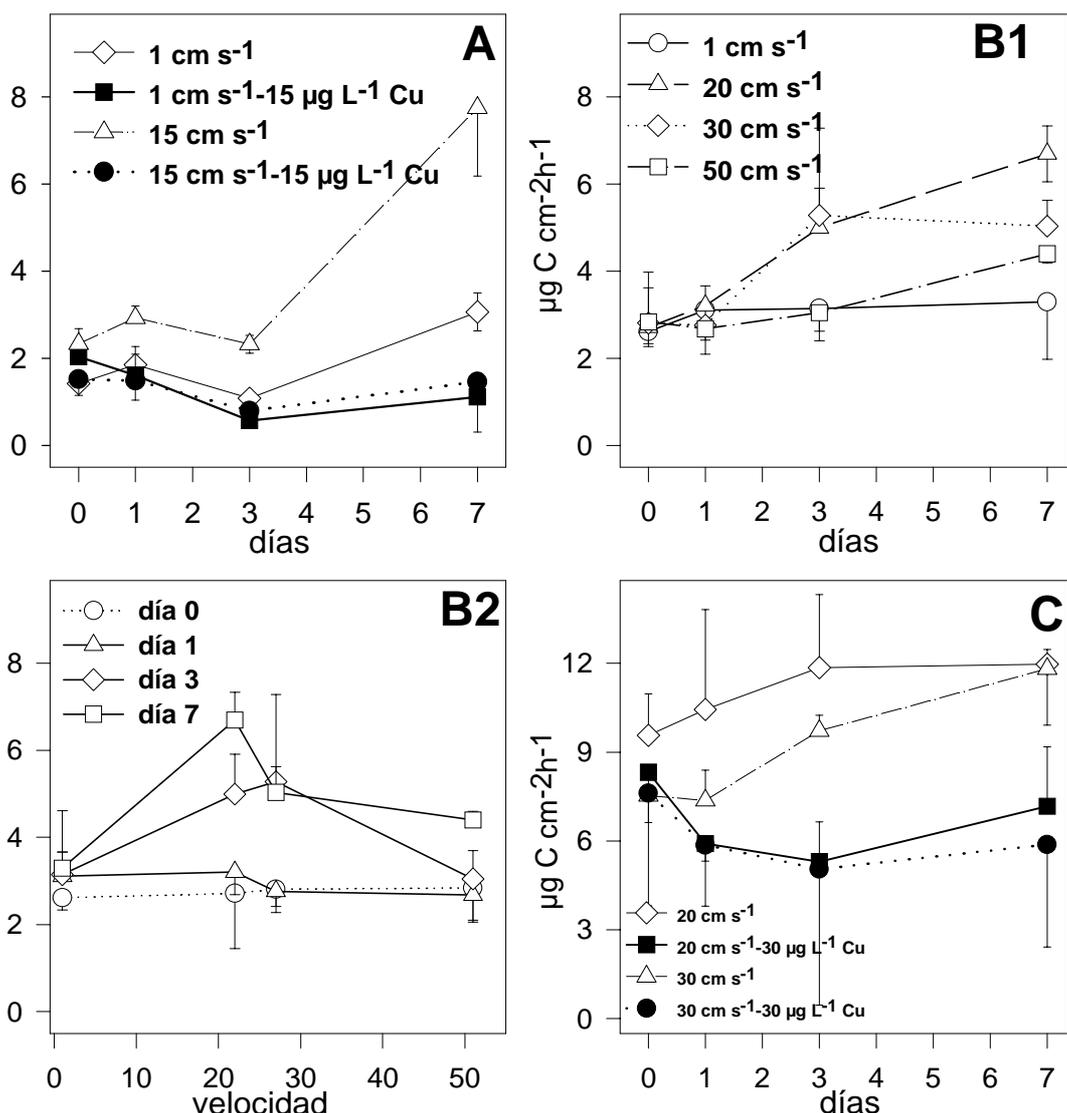


Figura 1. Concentración de clorofila-a a lo largo de los tres experimentos, los valores (eje Y) se dan en microgramos de clorofila-a por centímetro cuadrado.

a 30 cm s⁻¹.

Incorporación de carbono cm⁻². Experimento 1. La incorporación de carbono se incrementa un 300% al variar la velocidad de 1 a 15 cm s⁻¹ tras siete días de experimento (Figura 2A). Experimento 2. Tras siete días de exposición los

Figura 2. Incorporación de carbono a lo largo de los tres experimentos. La gráfica B2 presenta la incorporación de carbono en función de la velocidad del tratamiento, para cada día muestreado.



tratamientos expuestos a 15 µg L⁻¹ de cobre (Figura 2B1) bajo velocidades medias (20 y 30 cm s⁻¹) han incrementado significativamente su incorporación de carbono ($p=0.000174$ y $p=0.000177$ respectivamente). El día 7 el tratamiento de 20 cm s⁻¹ incorpora significativamente más carbono que los de 1 cm s⁻¹ y 30 cm s⁻¹ ($p=0.0002$ y $p=0.0178$ -test LSD- respectivamente). Tras siete días los tratamientos de 1 y 50 cm s⁻¹ no han variado su incorporación de carbono respecto al día 0.

Experimento 3. Tras siete días la incorporación de carbono no es diferente entre 20 y 30 cm s⁻¹ (Figura 2C). Tampoco es diferente la incorporación en los tratamientos expuestos a 30 µg L⁻¹ de cobre.

El cobre causó un descenso significativo de la incorporación a través del tiempo en los experimentos 1 y 3 (ANOVA de medidas repetidas

$p=0.0001$, 15 mg L⁻¹ Cu; $p=0.009$, 30 mg L⁻¹ Cu). La exposición a 15 mg L⁻¹ Cu causó una reducción del 47% en la incorporación en el día 3 ($p=0.02$) a 15 cm s⁻¹, pero la reducción no fue relevante a 1 cm s⁻¹ ($p=0.167$). La incorporación de carbono a 1 cm s⁻¹ solo fue afectada por el cobre tras siete días ($p=0.0235$). La exposición a 30 mg L⁻¹ Cu tiene un mayor efecto sobre la incorporación (día 1 a 20 cm s⁻¹, 30% de reducción, $p=0.032$; día 3 a 30 cm s⁻¹, 47% de reducción, $p=0.0273$). Las diferencias entre los dos tratamientos y los controles en el segundo experimento se mantienen desde el día 3 en adelante. No hay diferencias significativas entre los tratamientos expuestos a cobre a 20 y 30 cm s⁻¹ (Figura 2C).

Incorporación de carbono (por unidad de clorofila-*a*). La incorporación por unidad de clorofila-*a* no fue afectada por el cobre (Figura 3) ni en el experimento 1 ni en el 3 (ANOVA de

medidas repetidas, $p=0.142$ y $p=0.261$ respectivamente). Sólo puede destacarse un ligero descenso al final de los experimentos, más marcado al final del experimento 3. Las diferencias solo fueron significativas después de 7 días, entre los tratamientos a 20 y 30 cm s^{-1} ($p=0.0115$). En cambio en el experimento 2, tras siete días de exposición, la velocidad de 1 cm s^{-1} incrementó significativamente la incorporación de carbono por unidad de clorofila ($p=0.000257$).

Estructura de la comunidad algal. Las diatomeas (Tabla 2) dominan la comunidad algal siendo las especies colonizadoras mayoritarias en todos los experimentos. Las variaciones significativas del porcentaje del número de células de cada taxon se muestran en la tabla 4.

En el primer experimento, *Achnanthes minutissima*, *Achnanthes lanceolata*, *Fragilaria capucina*, *Synedra ulna* y *Stigeoclonium tenue* fueron los taxones dominantes. El incremento de la velocidad del agua de 1 a 15 provocó un incremento en el porcentaje de *Synedra ulna*, así como de las células basales de *Stigeoclonium tenue* (Tabla 3). La exposición a $15 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cu}$, causó una variación en la densidad de células de determinados taxones. *Synedra ulna* sufrió un descenso significativo a 15 cm s^{-1} , mientras que las células basales de *Stigeoclonium tenue* y *Cocconeis pediculus* experimentaron un incremento significativo, bajo la misma velocidad, que se vio reflejado en el porcentaje (tablas 2 y 3). La exposición a cobre a 1 cm s^{-1} causó el incremento significativo del porcentaje de *Achnanthes minutissima*.

En el segundo experimento la comunidad estuvo dominada por *Achnanthes minutissima*, *Achnanthes lanceolata*, una Chlorococcal y una Cianofícea. Mientras que algunas especies ven incrementada su proporción en la comunidad conforme incrementa la velocidad a que son expuestas al cobre (Chlorococcal, *Melosira varians*) otras sufren descensos (*Achnanthes minutissima* y *Achnanthes lanceolata*, esta de modo significativo).

La composición de la comunidad algal en el tercer experimento fue similar al primero. Las algas dominantes fueron *Achnanthes minutissima*, *A. lanceolata* y *Stigeoclonium tenue* (células basales). *Fragilaria capucina* fue solo dominan-

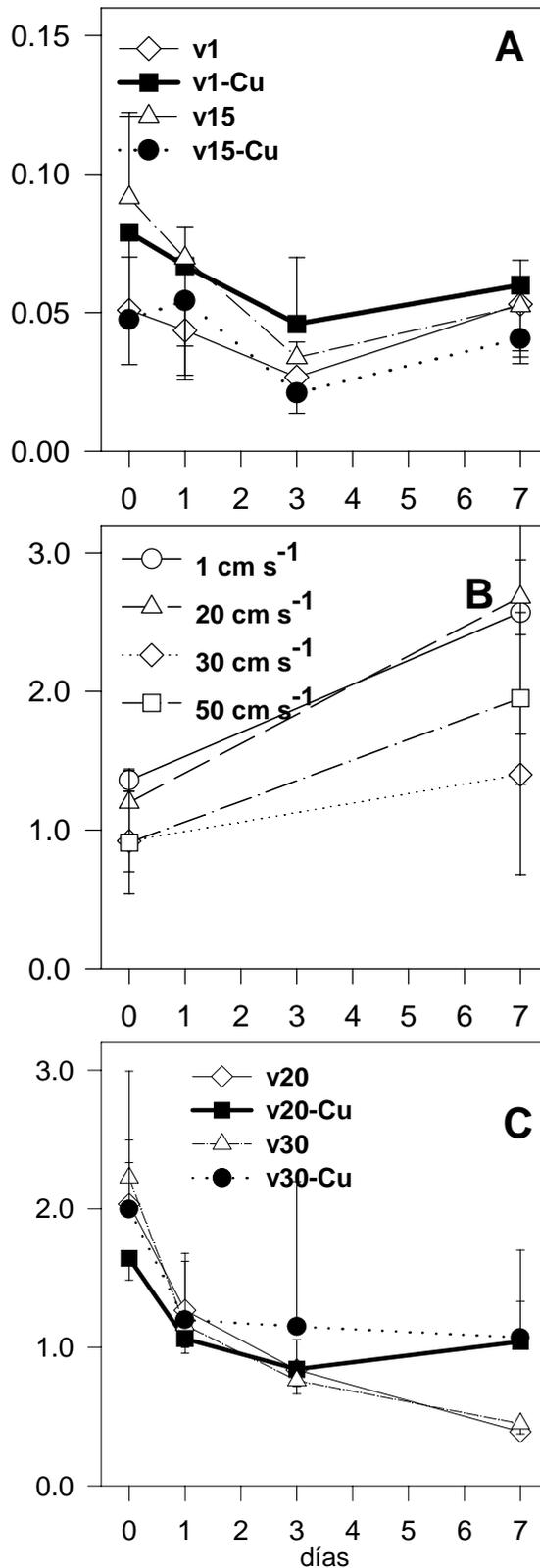
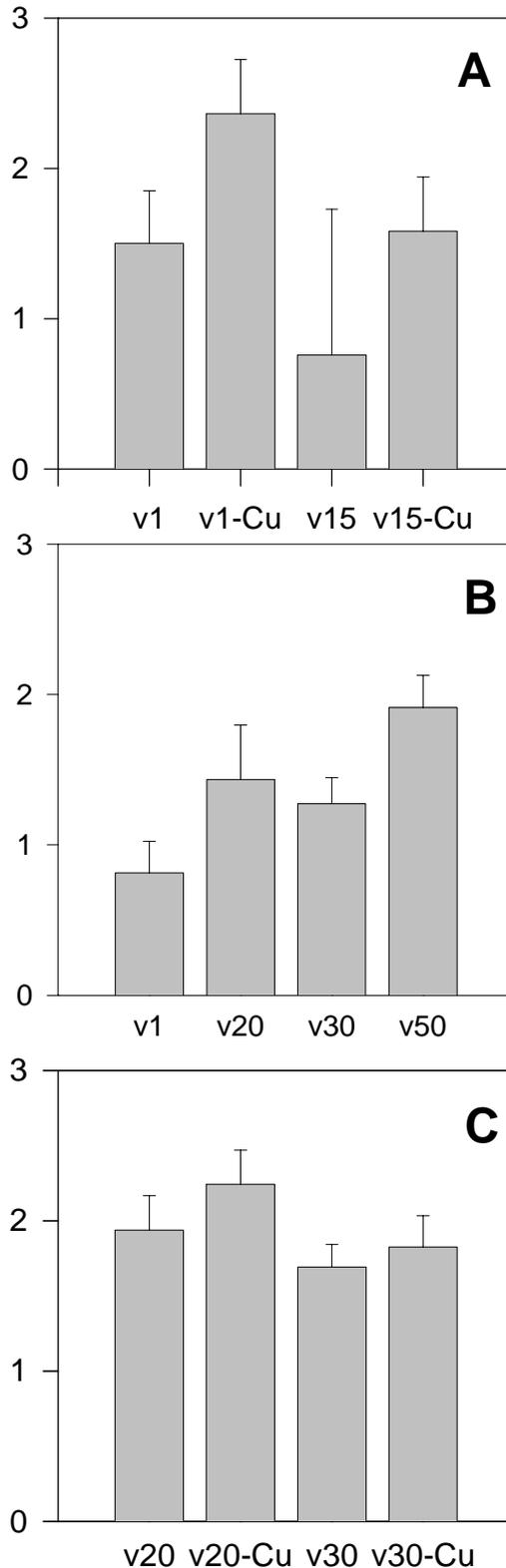


Figura 3. Incorporación de carbono en relación a la cantidad de clorofila-a a lo largo de los tres experimentos. El eje Y representa el cociente entre microgramos de carbono incorporados por hora y centímetro cuadrado por cada microgramo de clorofila-a.

te a 20 cm s^{-1} (Tabla 2). La exposición a $30 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cu}$ causó un descenso en el porcentaje de *A. minutissima*, *A. lanceolata* y *Synedra ulna*. *Fragilaria capucina* incrementó en un 40% a 20 cm s^{-1} (pero más del 1000% a 30 cm s^{-1}) tras la exposición al cobre. Otros taxones mostraron

Figura 4. Valores del índice de Shannon-Wiener al final de los experimentos.



ligeras variaciones en su porcentaje, tras la exposición al cobre (Tabla 3). Considerando la densidad de células, se encontró que los filamentos de *Stigeoclonium tenue* eran menos abundantes ($p=0.049$) a 30 cm s^{-1} tras la exposición al cobre.

Diversidad. Hay también ligeros cambios en la diversidad de las comunidades tras la exposición al cobre. Se detectó un moderado incremento –aunque no significativo– del índice de Shannon-Wiener, tras la exposición al cobre en los experimentos 1 y 3 (Figura 4A y 4C). En cambio, en el experimento 2 todos los tratamientos causaron un descenso de la diversidad (67% a 1 cm s^{-1} , 16% a 20 cm s^{-1} , 41% a 30 cm s^{-1} y del 18% a 50 cm s^{-1}), siendo significativos los descensos a 1 y a 30 cm s^{-1} ($p=0.0000$ y $p=0.0031$ respectivamente).

Biovolumen algal. En el experimento 1 el cobre causó un descenso significativo del biovolumen algal a 15 mg L^{-1} , que fue más intenso a 15 que a 1 cm s^{-1} ($p=0.0047$ y 0.00024 respectivamente). El cobre provocó una caída del 80% a 1 cm s^{-1} y de más del 90% a 15 cm s^{-1} (Figura 5A). Por otra parte, el descenso no fue tan marcado en el tercer experimento (entre el 60 y el 85%) (Figura 5C). La variación de biovolumen no fue significativa en los tratamientos expuestos a 30 mg L^{-1} a 20 y 30 cm s^{-1} respecto a los controles ($p=0.61$ y 0.41 respectivamente). Las diferentes velocidades tampoco afectaron significativamente al biovolumen total en el experimento 3. La proporción de formas vitales no presenta grandes diferencias entre ninguno de los experimentos. Las formas pedunculadas fueron las dominantes en el experimento 1, en el 2 fueron las postradas y pedunculadas, y en el 3, de nuevo, las pedunculadas. La proporción de las diferentes formas vitales no fue afectada por la exposición a cobre o velocidad+cobre en ninguno de los experimentos (Figura 5).

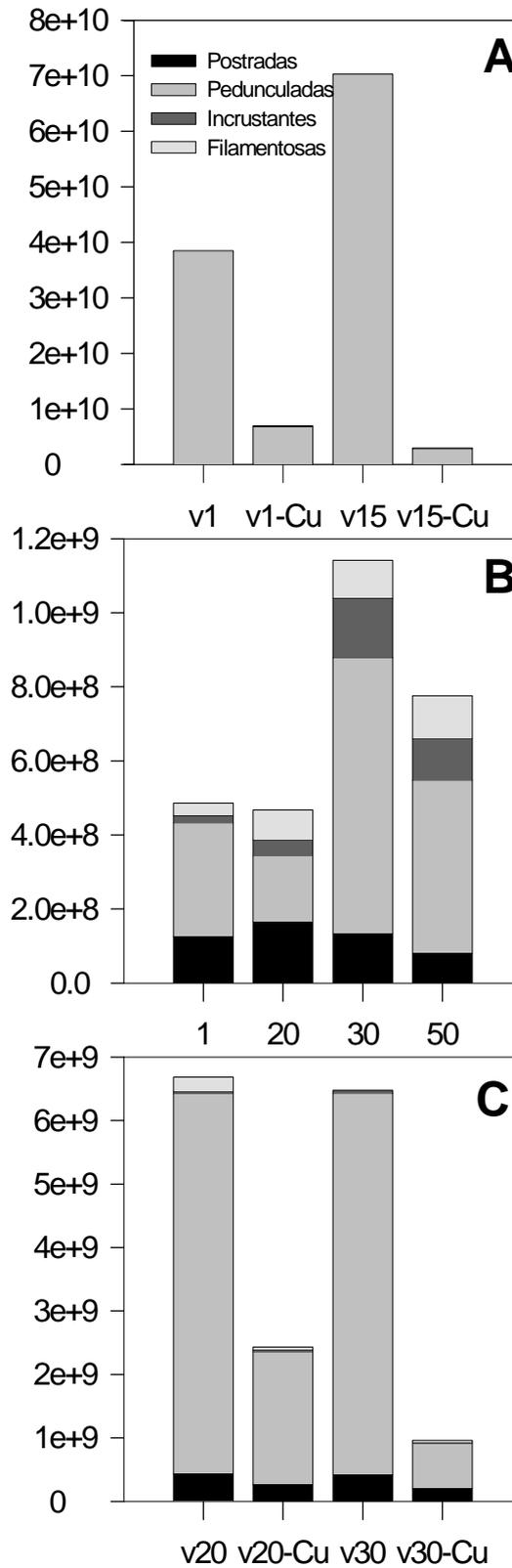
Test de dosis-respuesta. La tolerancia al cobre de las comunidades algales desarrolladas a 1 y a 15 cm s^{-1} , el primer experimento con $15 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cu}$, se valoró mediante un rango de concentraciones de cobre (ver capítulo de métodos). No hay diferencias en la EC_{10} a 1 cm s^{-1} entre la comunidad expuesta al cobre ($EC_{10}=134 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cu}$) y la control ($EC_{10}=135 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cu}$). Pero las diferencias fueron mucho mayores entre las comunidades desarrolladas a 15 cm s^{-1} . Para la comunidad expuesta a cobre se calculó una EC_{10} de $268 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cu}$, mientras que para la no expuesta, fue de $126 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cu}$.

3.8. Discusión

Las concentraciones moderadas de cobre ($15\text{--}30\text{ mg L}^{-1}\text{ Cu}$) tienen un efecto tóxico sobre las comunidades de perifiton que se manifiesta en parámetros estructurales y funcionales. Estas concentraciones reducen la concentración de clorofila-*a* (Kaufman, 1982, Pratt and Rosenberger, 1993), afectan a la productividad primaria (Leland and Carter, 1985) y alteran la composición de la comunidad (Foster, 1982a, Foster, 1982b, Leland and Carter, 1985, Clements, 1991). Estos experimentos confirman esos efectos y muestran que son aparentes tras periodos de exposición relativamente cortos, entre 1 y 7 días, dependiendo del parámetro.

Existen varios mecanismos involucrados en la atenuación o amplificación del efecto tóxico de los metales pesados sobre el perifiton. Uno de los mecanismos de atenuación es la formación de trampas intracelulares como son los cuerpos de polifosfatos que reducen, aunque a veces de un modo transitorio, la toxicidad de ciertos metales (Hashemi *et al.*, 1994). Como el metal debe ser transportado a través de la membrana, el grosor de ésta adquiere una importancia considerable (Admiraal *et al.*, 1999). Relacionado con las membranas, los exopolímeros pueden actuar como protectores de las células (Hsieh *et al.*, 1994, Loaëc *et al.*, 1997). Finalmente, la incorporación de metales puede ser afectada por la biodisponibilidad. Ésta dependerá de la especiación del metal concreto en el medio, y de su complejación sobre la superficie de los organismos o material particulado (Mason and Jenkins, 1995). Además, y de modo puntual, otros factores pueden alterar la toxicidad de los metales sobre los tapetes algales.

En el presente estudio se encontró que la velocidad del agua ejerce un efecto amplificador del efecto tóxico del cobre. Esta amplificación afecta tanto a parámetros estructurales (clorofila-*a*, composición taxonómica y biovolumen) como a funcionales (incorporación de carbono). En el primero de los experimentos se demuestra que la exposición a $15\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre provoca un descenso en la incorporación de carbono respecto al control, siendo más precoz este descenso a 15 cm s^{-1} (en el día 3) que a 1 cm s^{-1} (en el día 7). A pesar de estar expuestos a la misma concentración, el efecto tóxico ha sido magnificado por la velocidad. Este resultado sugiere la pre-



gunta de si ocurre lo mismo a todas las velocidades. Dado que al incrementar la velocidad se incrementa la disponibilidad, tanto de nutrientes como de tóxicos, era interesante comprobar qué tipo de dinámica seguiría esta interacción. Por eso se planteó el segundo experimento en que se expusieron las comunidades a $15\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ de

Tabla 2.
Porcentaje del número de células de las diferentes especies al finalizar cada experimento.

velocidad cm s ⁻¹ cobre ug L	Experimento 1				Experimento 2				Experimento 3			
	1 0	1 15	15 0	15 15	1 15	20 15	30 15	50 15	20 0	20 30	30 0	30 30
Achnanthes lanceolata	3	10.2	0	10.2	0.5	9.3	4.2	2.3	19	7.5	17.8	7.6
Achnanthes minutissima	1.6	17.7	1	5.6	89.0	71.2	73.5	57.4	43.7	36.6	60.4	45.5
Amphipleura pellucida					0.1	0.0	0.1	0.2	0	0.1	0	0
Amphora sp.												
Aphanothece sp.	0	0	1.3	0								
Ceratoneis sp.												
Characium sp.	0	2.5	0	0								
Chloroccal indet.					0.7	3.7	11.3	16.7	0.3	0.5	1.1	0.3
Chroococcal indet.	6.3	0.5	5.3	5.1					1.3	0	0	1.5
Cianoficea					2.9	7.8	1.7	9.1				
Cocconeis pediculus	0.3	1.7	0	2.9	0.1	0.1	0.1	0.2	0.6	0.5	0.4	0.5
Cocconeis placentula	0.9	3.4	0	2.1								
Cymbella caespitosa					2.1	1.3	2.3	2.8				
Cymbella sinuata					0.3	0.0	0.1	0.0				
Cymbella minuta									0.1	0.2	0.3	0.6
Fragilaria capucina	7.7	7.8	0	1.8	1.3	0.9	2.0	2.2	17.6	27.4	2.9	31.7
Fragilaria construens					0.5	0.1	0.0	0.6	0	0.2	0	1.1
Gongrosira inc												
Gomphonema acuminatum					0.1	0.1	0.1	0.2				
Gomphonema constrictum					0.5	0.1	0.2	0.8	0.2	0	0.1	0.1
Melosira varians					0.1	0.5	0.3	0.9	0	0.4	0	0.2
Nitzschia sp					0.2	0.1	0.2	0.1				
Navicula cryptocephala								0.0	0.1	0.6	0.5	0.2
Oedogonium sp								5.5	0.1	1.9	0	0
Phormidium sp.	0	0	0	0				0.1				
Scenedesmus sp	0	0	0.8	0	0.2	0.0	0.0	1.0	1.1	3.1	0	1.1
Stauroneis phoenicenteron									0	0	0.2	0
Stigeoclonium tenue (c.basal)	0.5	29.7	8.6	66.5	1.2	4.8	2.7		7.5	11.2	11.1	9.4
Stigeoclonium tenue (filame.)	16.2	0	0.7	0	0.3	0.0	0.1		1.7	8.7	1.5	0.1
Synedra ulna	60.6	19.6	82.4	5.9	0.0	0.2	1.1		4.1	1	3.7	0.1
Ulothrix zonata	3	7	0	0					2.5	0	0	0

cobre a diferentes velocidades (1, 20, 30 y 50 cm s⁻¹). El resultado fue que el efecto del tóxico es mayor a velocidades altas y bajas (50 y 1 cm s⁻¹) que a intermedias (20 y 30 cm s⁻¹). Se puede observar una mayor incorporación de C a velocidades medias al observar la figura 2B2. A medida que pasan los días los tratamientos de 20 y 30 cm s⁻¹ incorporan más carbono que el resto.

Para una velocidad de 20 cm s⁻¹, el efecto tóxico de la exposición a 15 µg L⁻¹ de cobre es menor que para 1, 30 y 50 cm s⁻¹. Uno de los motivos que se pueden aducir es que al incrementar la velocidad se incrementa tanto la biodisponibilidad de tóxico como de nutrientes, y parece que en 20 cm s⁻¹ podría hallarse la combinación óptima entre la incorporación de nutrientes y la de tóxico. En cambio al duplicar la concentración de cobre (30 µg L⁻¹) ya no encontramos diferencias entre los tratamientos. El incremento de velocidad de 20 a 30 cm s⁻¹, no tiene un efecto sobre la incorporación de carbono (los controles muestran la misma incorporación tras siete días) y la exposición a 30 µg L⁻¹

de cobre afecta por igual tanto a 20 como a 30 cm s⁻¹. Parece que se ha superado un umbral entre estos dos experimentos. Si a 20 cm s⁻¹ se encuentra el óptimo para 15 µg L⁻¹ de cobre, ya no lo es para 30 µg L⁻¹, porque no se diferencia de 30 cm s⁻¹.

La exposición al cobre causó una reducción de la incorporación de carbono en todos los casos, encontrándose una mayor reducción a velocidades de agua mayores, tras 7 días de exposición (Figura 2). La clorofila-*a* experimentó un descenso mayor y más precoz a mayores velocidades (Figura 1). El cobre afectó también al biovolumen de la comunidad algal a 1 y a 15 cm s⁻¹, pero este efecto no fue significativo a mayores velocidades. El hecho de que la interacción entre cobre y el incremento de velocidad es positivo para parámetros estructurales, implica que el efecto sobre la comunidad algal no fue transitorio, sino permanente. Por otra parte, la diversidad y la proporción de formas vitales no reflejan el efecto de la interacción entre cobre y velocidad. Se ha observado que las pequeñas especies adnatas eran más toleran-

velocidad cm s-1 cobre ug L	Experimento 1				Experimento 2				Experimento 3			
	1	1	15	15	1	20	30	50	20	20	30	30
	0	15	0	15	15	15	15	15	0	30	0	30
Achnanthes lanceolata	5.3	9.2	-5.5	1.7	-4.14	3.32	-0.12	-3.93	13.24	12.38	4.54	-0.66
Achnanthes minutissima	16.2	0.6	-2.9	-16.7	57.99	53.88	41.81	14.91	-19.4	-3.92	-36.8	-6.91
Amphipleura pellucida					-0.04	0	-0.2	-0.01	0	-0.06	-0.14	-0.07
Amphora sp.					-0.14	-0.18	-0.42	-0.3				
Aphanothece sp.	0	0	1.7	0								
Ceratoneis sp.									-0.48	-0.06	-0.55	-0.24
Characium sp.	2.5	0	0	0								
Chloroccal indet.					-3.33	3.04	10.73	15.98				
Chroococcal indet.	-1.7	5	6	4					-1.97	0.42	-0.06	-1.04
Cianoficea					-3.09	-7.84	-19.6	-14.5				
Cocconeis pediculus	0.7	3.4	-0.1	-0.5	-0.49	-0.99	-1.46	-0.97	-0.52	-0.19	0.03	-1.81
Cocconeis placentula	2.3	-0.3	-0.5	-2.1								
Cymbella caespitosa					1.57	0.66	1.91	2.5	0.06	-0.56	-0.2	0.54
Cymbella sinuata					0.31	-0.17	-0.29	-0.42				
Cymbella minuta												
Fragilaria capucina	-8.7	-40.6	-18.2	-32.6	-7.62	-49.7	-0.53	-0.15	0	-9.93	0	0
Fragilaria construens					0.33	-0.25	-0.54	-0.24	14.23	1.45	24.63	15.06
Gongrosira inc	0	-0.9	-1.1	0	-0.16	0.03	0.07	0.06				
Gomphonema acuminatum					-1.29	-0.46	-0.05	-0.36				
Gomphonema constrictum					-0.2	0.23	-0.38	0.16	0.02	0	0.24	0.76
Melosira varians					0.16	-0.03	0.14	-0.46	0.16	-0.49	0	-0.03
Nitzschia sp									-0.19	0.34	0.23	-0.04
Navicula cryptocephala									-0.1	-1.48	0.27	0.2
Oedogonium sp									-0.23	0	-0.12	0
Phormidium sp.	0	0	-1.3	0								
Scenedesmus sp	-0.2	0	1	0	-2.63	-0.43	0	0	0.11	0	1.94	0
Stauroneis phoenicenteron									1.13	0	3.11	1.52
Stigeoclonium tenue (c.basal)	9.2	60.3	-37.3	-8	-31.5	2.19	-21.7	-4.06	-2.8	-0.03	0	-0.07
Stigeoclonium tenue (filame.)	-16	-10.5	0.9	29.8	0.13	-1.76	-1.63	-0.02	-9.73	1.89	-0.69	-7.6
Synedra ulna	-7.2	-23.8	58.9	27.6	-5.9	-1.56	-7.72	-8.14	1.42	0.42	8.49	-0.6
Ulothrix zonata	-2.4	-2.5	-1.5	-3.2					1.89	2.49	-2.49	-0.17

Tabla 3. Diferencia entre el porcentaje del número de células de cada especie entre el día 0 y el 7 en cada experimento.

tes que las pedunculadas y las filamentosas, a una mezcla de metales pesados (Medley and Clements, 1998). Este hecho sugiere la existencia de una cierta relación entre el tipo de crecimiento y la tolerancia específica al tóxico, que puede considerarse en función de la proximidad relativa de cada forma vital a la capa límite. Nuestros resultados, aunque no contradicen esta predicción, indican que el inverso no es correcto. Esto es, los tóxicos no favorecen la dominancia de ciertas formas de crecimiento, al menos a corto plazo.

Las diferencias entre la mayor parte de parámetros valorados son mayores entre velocidades mínimas y medias (1 y 15 cm s⁻¹ respectivamente) que entre medias y altas (20 y 30 cm s⁻¹). A pesar de que las diferencias entre los controles no fueron significativas a estas velocidades, la similitud del efecto del cobre entre 20 y 30 cm s⁻¹, sugiere la existencia de un umbral a velocidades intermedias para la interacción entre velocidad y la toxicidad del cobre. Es posible que de 15 cm s⁻¹ en adelante, los incrementos sucesivos de velocidad no se traduzcan en un incremento similar de la toxicidad, hasta

Tabla 4. Resultados de las ANOVAS realizadas con los porcentajes del número de células de cada especie. Se indican las especies cuyos contajes fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) entre tratamientos. Acrónimos utilizados: Acla (*Achnanthes lanceolata*); Acmi (*Achnanthes minutissima*); Am (*Amphipleura* sp.); Cia (cianofícea); Coc (*Cocconeis placentula*); Cymb (*Cymbella* sp.); Frac (*Fragilaria capucina*); Fran (*Fragilaria construens*); Gom (*Gomphonema constrictum*); Nit (*Nitzschia* sp.); Scen (*Scenedesmus* sp.); Stig (*Stigeoclonium tenue*); Syn (*Synedra ulna*).

Exp1		dia	0	0	0	0	7	7	7	
		cu	0	15	0	15	0	15	0	
	dia	cu	vel	1	1	15	15	1	1	15
0	0	1								
0	15	1	Coc Frac							
0	0	15								
0	15	15			Stig Syn					
7	0	1	Coc Frac Syn		Stig	Frac				
7	15	1	Acla Frac	Acmi	Stig	Frac	Acmi Syn			
7	0	15	Acmi Coc Frac Syn	Syn	Stig Syn	Frac Syn	Syn	Acla		
7	15	15	Acla Frac Stig	Stig	Coc Stig	Coc Frac Stig	Stig Syn	Stig	Acla Coc Stig Syn	

Exp2		dia	0	0	0	0	7	7	7	
		cu	15	15	15	15	15	15	15	
	Dia	cu	vel	1	20	30	50	1	20	30
0	15	1								
0	15	20	Scen Gom Frac Stig							
0	15	30	Scen Gom	Frac						
0	15	50	ScenCia Nit	Acmi Frac Nit	Nit					
7	15	1	Scen Gom Stig Acmi	Frac Acmi	Cia Coc Acmi	Cia Coc Acmi				
7	15	20	Scen Gom Stig Acmi	Frac Acmi	Coc Acmi	Gom Acmi Nit Fran Coc	Acla			
7	15	30	Scen Gom Stig Acmi	Frac Acmi	Cia Coc Acmi	Cia Acmi Fran Coc				
7	15	50	Scen Gom Stig Acmi	Frac Acmi	Coc Acmi	Nit				

Exp3		dia	0	0	0	0	7	7	7	
		cu	0	30	0	30	0	30	0	
	dia	cu	vel	20	20	30	30	20	20	30
0	0	20								
0	30	20	Am							
0	0	30	Cymb Gom	Gom						
0	30	30	Coc	Coc	Gom Coc					
7	0	20		Acla Acmi Am	Acla Cymb	Coc				
7	30	20	Acmi Frac	Acmi Frac	Gom Acmi Frac	Coc				
7	0	30		Am Acla	Gom	Coc		Frac		
7	30	30	Frac Fran	Am Frac Fran	Gom Frac Fran	Coc	Fran	Fran	Frac Fran	

llegar a ser indetectable.

El efecto que el incremento de la velocidad tiene sobre la toxicidad de los metales puede basarse en la progresiva reducción en el grosor de la subcapa viscosa de la capa límite (Stevenson, 1996) y el incremento del flujo de solutos (metales) asociado. Este mecanismo puede ser similar al descrito para la disponibilidad de nutrientes, así como para el flujo de sustancias de desecho de los organismos (Biggs *et al.*, 1998), donde el incremento de la velocidad del agua tiene un efecto positivo sobre el metabolismo de los organismos. Cuando la sustancia que vea amplificada su difusión por un incremento de la velocidad del agua sea tóxica para el organismo, tendrá consecuencias negativas, incrementando su toxicidad. Los gradientes de oxígeno disuelto y pH, dentro del biofilm y re-

lacionados con la actividad fotosintética, pueden ser mayores a bajas velocidades. El pH en aguas alcalinas puede incrementarse como consecuencia de la fotosíntesis. A un pH menor de 6, las concentraciones de las especies más tóxicas de cobre (cobre libre, Cu^{2+} e hidróxido de cobre, CuOH^+) incrementan en un orden de magnitud por cada 0.5 unidades de pH que se baje (Stumm and Morgan, 1981). La mayor biodisponibilidad de estas formas puede ser el resultado de la interacción entre procesos biológicos (actividad fotosintética) y la velocidad del agua.

Será necesario estudiar si este tipo de efecto puede extenderse también a otros de metales pesados y al resto de tóxicos. Experimentos similares, realizados con la atrazina (en este mis-

mo capítulo), han demostrado que la velocidad no tiene el mismo efecto que sobre el cobre. La atrazina provocó un descenso similar en la concentración de clorofila-*a* y en la incorporación de carbono, tanto a velocidades bajas como a medias. Aunque estos resultados no sean generalizables a otros tóxicos, nuestros resultados con el cobre sugieren que los estudios ecotoxicológicos a nivel de comunidad deben considerar la influencia de factores físicos como la velocidad del agua, con el objetivo de mejorar su realismo y fiabilidad.

Finalmente, parece que las interacciones entre factores físicos, como la velocidad del agua y los tóxicos pueden ser moduladas por la respuesta específica de los organismos. Las especies difieren en su sensibilidad frente al cobre. Medley y Clements (1988) observaron cómo las comunidades algales obtenidas a lo largo de un gradiente respondieron de un modo diferente al exponerlas a una mezcla de metales pesados. Por otra parte, los organismos son capaces de adaptarse y convertirse en tolerantes a las nuevas condiciones. Blanck y Dahl suponen que la respuesta de la comunidad frente a un tóxico será la exclusión de los individuos y especies más sensibles (Blanck and Dahl, 1996), favoreciendo de este modo el incremento de la tolerancia de la comunidad. Nosotros observamos esta tendencia en la comunidad, que tras siete días de exposición a 15 mg L^{-1} de cobre, presenta una EC_{10} mayor tras la exposición, siendo mayor la tolerancia a 15 cm s^{-1} que a 1 cm s^{-1} .

En consecuencia, la modificación del efecto tóxico de los metales pesados provocada por el incremento de la velocidad, implica que este factor debe ser parte de las hipótesis de trabajo a la hora de valorar el efecto de la entrada de tóxicos en los sistemas fluviales. Los resultados aquí expuestos sugieren que el impacto de estos tóxicos puede ser mayor en ríos de aguas rápidas que en los de aguas lentas. Por otra parte, la variación estacional del caudal de un punto concreto del río, puede tener consecuencias en la velocidad del agua que se traduzcan en una modificación de la respuesta de las algas ante exposiciones a tóxicos. En los ríos de zonas bajas, varios mecanismos contribuyen a minimizar el efecto de los metales pesados, particularmente cuando aparecen en bajas concentraciones. Las partes bajas de los ríos reciben generalmente mayores cargas de nutrientes que

las partes bajas, que generan una mayor biomasa (Sabater and Sabater, 1992), la biomasa tiene un aparente efecto protector de los organismos ante los tóxicos (Admiraal *et al.*, 1999). En ríos de media montaña, la combinación de velocidades altas y bajas biomasa puede incrementar el efecto tóxico de los metales pesados sobre las comunidades algales de perifiton. Para mejorar la fiabilidad de los futuros estudios ecotoxicológicos de los metales pesados, en ríos, deberán tenerse en cuenta no sólo la composición de la comunidad (Foster, 1982b), la caracterización de la exposición (Norton *et al.*, 1996) y la tolerancia al tóxico (Blanck and Dahl, 1996), sino también el papel modulador de los factores ambientales, como la velocidad del agua o la luz (Guasch and Sabater, 1998).

Como colofón, podríamos sugerir una línea de trabajo para próximos experimentos, basándonos en la siguiente hipótesis: si la incorporación de nutrientes puede compensar el efecto de una concentración de cobre determinada, en una velocidad determinada, podríamos pensar, a priori que para cada concentración de cobre y comunidad habrá una velocidad óptima, en que la disponibilidad de nutrientes compense la toxicidad del cobre. Por encima y por debajo de esa velocidad el crecimiento de la comunidad sería menor. Se podrían diseñar, por tanto, experimentos en los cuales el objetivo sea encontrar que velocidad resulta la óptima para el crecimiento de la comunidad, en presencia de una concentración de cobre determinada, y luego, podrían estudiarse qué factores son los que hacen de esa velocidad la óptima.