

# INFLUENCIA DEL HERBIVORISMO EN EL EFECTO TÓXICO DE LA ATRAZINA SOBRE LAS COMUNIDADES MICROBENTÓNICAS

## 4.1 Introducción

Las concentraciones elevadas de atrazina ( $>100\mu\text{g L}^{-1}$ ) pueden llegar a causar efectos dramáticos sobre la fotosíntesis, crecimiento, concentración de clorofila y biomasa de la mayoría de organismos fotosintéticos acuáticos (Plumley and Davis, 1980, Brockway *et al.*, 1984, Kosinski and Merkle, 1984). El efecto de la atrazina a concentraciones más realistas está menos claro, algunos estudios han detectado efectos a concentraciones bajas ( $1-10\mu\text{g L}^{-1}$ ) sobre fitoplancton, tras una exposición de varias semanas en limnocorales (Lampert *et al.*, 1989). Por otra parte, algunos estudios concluyen que una concentración de  $25\mu\text{g L}^{-1}$  no provoca efectos a corto plazo (Jurgensen and Hoagland, 1990) ni tampoco tras una exposición a largo plazo en canales artificiales (Lynch *et al.*, 1985). La respuesta de las comunidades depende del tiempo de colonización y de las condiciones ambientales que se han dado durante el crecimiento de la comunidad (Guasch *et al.*, 1997). Los efectos de la atrazina, sobre niveles tróficos superiores, también se han descrito (Hoagland *et al.*, 1993, Huber, 1993, Solomon *et al.*, 1996), detectando incrementos en la emergencia de insectos tras la adición de concentraciones realistas de atrazina  $-5\mu\text{g L}^{-1}$  (Gruessner and Watzin, 1996), o cambios en el comportamiento de algunos gasterópodos  $-15\mu\text{g L}^{-1}$  (Roses *et al.*, 1999). Queda claro que todavía y a pesar de toda la bibliografía sobre el tema es necesario profundizar en los efectos de la atrazina sobre otros niveles tróficos (Dewey, 1986).

Si los efectos de la atrazina sobre otros niveles tróficos están todavía por discutir, sucede lo mismo con la interacción de la atrazina y los herbívoros sobre el perifiton. En este estudio se pretende demostrar que el herbivorismo modifica la respuesta del perifiton ante la atrazina a concentraciones que (de modo aislado) no afectan directamente ni al perifiton ni a los herbívoros (Huber, 1993, Solomon *et al.*, 1996, Roses *et al.*, 1999). Nuestra hipótesis es que debido a la actividad de los herbívoros la comunidad expuesta a la atrazina presentará una mayor afectación que si se la expone únicamente a la atrazina o los herbívoros.

Se parte de una situación realista, donde al igual que un ecosistema, diferentes niveles tróficos interaccionan para producir una respuesta ante un tóxico. Se controlaron diversos parámetros del perifiton tras la exposición al herbivorismo (provocado por el gasterópodo *Physella acuta*), a la atrazina y a ambos. Este tipo de aproximación nos da una visión de cómo un sistema fluvial sometido a herbivorismo puede ser afectado por concentraciones realistas de atrazina, contribuyendo a realizar predicciones más robustas sobre el impacto de la atrazina en los sistemas fluviales (Belanger, 1997).

Pigmentos	Atrazina	Atrazina+Herbívoro	Herbívoros	Control
Carotenoides	33.4(2.3)	31.9 (6.6)	32.2 (0.8)	32.8 (0.5)
Chlorofila-a	57.4 (4.8)	50.8 (6.7)	51.8 (6.5)	56.8 (3.4)
Chlorofila-b	0.9 (0.7)	6.3 (5.4)	5.1 (5.1)	0.6 (0.2)
Chlorofila-c	2.3 (0.3)	1.9 (0.7)	2.2 (0.7)	2.7 (0.4)
Chlorofilas degradadas	6 (3.1)	9.3 (5.2)	8.6 (2.5)	10.1 (7.9)

**Tabla 1.** Media de las composiciones pigmentarias del perifiton en porcentajes para los tres tratamientos (medias de tres canales), al final del experimento (día 18). Los valores entre paréntesis son las desviaciones estándar.

## 4.2. Material y métodos

**Diseño experimental** Los experimentos se llevaron a cabo utilizando 12 canales artificiales (descritos con anterioridad), a lo largo de 18 días. Un pozo, situado a 50 m. del laboratorio proporcionó el caudal de agua necesario, para mantener una velocidad de  $1 \text{ cm s}^{-1}$  y una profundidad de entre 1.8 y 2.2 cm. La irradiancia proporcionada por las lámparas halógenas fue de  $140 \mu\text{mol Fot m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , en la superficie del agua. El fotoperiodo se programó en 8 horas de luz y 16 de oscuridad. El fondo de los canales se recubrió con los dos tipos de cristales vistos hasta ahora (de  $20 \times 10 \text{ cm}$  y de  $1.2 \times 1.2 \text{ cm}$ ), precolonizados durante 2 semanas en un río prístino (L'Avencó, (Guasch *et al.*, 1997)). Una vez finalizado el periodo de colonización en el río se dejaron durante 12 días en los canales, hasta que se logró una superficie recubierta homogéneamente por algas. Los cristales de  $1.2 \times 1.2$  se utilizaron como unidades de muestreo para valorar la incorporación de carbono (incorporación de  $\text{H}^{14}\text{CO}_3$ ), concentración de clorofila y composición taxonómica. Se realizaron tablas de coordenadas aleatorias para seleccionar los cristales que se iban a recoger.

La solución de atrazina se realizó a partir de atrazina en polvo, añadiendo 0.5 mL de acetona (para facilitar su disolución) y sonicando en un litro de agua del pozo. La solución concentrada se añadía (inyección de  $4 \text{ mL min}^{-1}$  de concentración  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de atrazina) con una bomba peristáltica en los canales correspondientes. El flujo era de  $80 \text{ L hora}^{-1}$ , lo que da una concentración de atrazina de  $15 \mu\text{g L}^{-1}$ . Los gasterópodos se recolectaron en otro río próximo a L'Avencó (Congost, NE España) y transportados al laboratorio en tanques aireados. Los gasterópodos (*Stagnicola vulnerata*, Küster), de medidas entre 7 y 9 mm, fueron colocados en densidades de 118 individuos  $\text{m}^{-2}$ , 0.9 g de peso seco  $\text{m}^{-2}$  (20 por canal). La densidad óptima se estimó a partir de experimentos previos (Muñoz

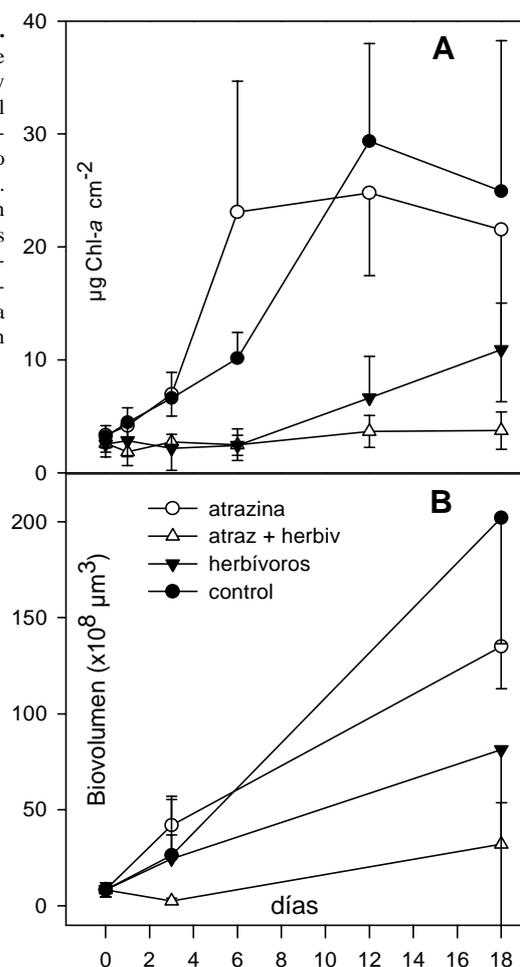
*et al.*, 2000). Esta densidad óptima fue definida como la capaz de mantener un 50% de actividad fotosintética y de biomasa respecto a la situación sin herbívoros. Los gasterópodos disfrutaron de 48 horas de aclimatación en los canales antes de proceder con la adición de atrazina. El diseño final constaba de cuatro tratamientos: 1) tres canales CONTROL, 2) tres canales con ATRAZINA, 3) tres canales con HERBIVOROS y 4) tres canales con ATRAZINA+HERBIVOROS. Los tratamientos fueron distribuidos al azar en los canales.

**Química del agua.** La saturación de oxígeno, temperatura, conductividad y pH fueron controlados diariamente en los canales. El fósforo reactivo soluble (SRP), nitrato ( $\text{N-NO}_3^-$ ), nitrito ( $\text{N-NO}_2^-$ ) y amonio ( $\text{N-NH}_4^+$ ) se midieron tres veces a lo largo del experimento. La concentración de atrazina se controló en cinco ocasiones, tanto en los canales control como en los tratamientos con atrazina. El análisis de atrazina se llevó a cabo mediante el uso de *EnviroGard Triazine QuantiTube Test Kit* (Strategic Diagnostics Inc.®). La concentración media de atrazina fue de  $14.18 \pm 5.93 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $n=22$ ). La concentración de atrazina en los canales control (si la hubo) no llegó nunca a superar el límite de detección del test ( $<0.04 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

Las características fisico-químicas del agua se mantuvieron constantes a lo largo del experimento. La temperatura del agua se situó en  $23 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ , el pH entre 7.4-7.6, y la conductividad constante en  $1900 \mu\text{S/cm}$ . El agua del pozo tenía una concentración relativamente alta de nitrato ( $\text{N-NO}_3^- = 15.5 \pm 0.83 \text{ mg/L}$ ) y baja de fosfatos ( $\text{P-PO}_4^- = 2.4 \pm 1.4 \mu\text{g/L}$ ). La de nitritos ( $\text{N-NO}_2^-$ ) fue de  $0.22 \pm 0.07 \text{ mg L}^{-1}$ , mientras que la de amonio resultó indetectable ( $<0.01 \text{ mg L}^{-1}$ ).

**Valoración de efectos biológicos.** La incorporación de carbono en los diferentes tratamientos se determinó a partir de 9 cristales seleccio-

**Figura 1.** Concentración de clorofila-*a* (A) y biovolumen algal (B) para cada tratamiento a lo largo del experimento. Los puntos son medias de los tres canales de cada tratamiento y las barras representan la desviación estándar.



nados al azar en cada canal. Cinco se utilizaron para la incubación con luz; dos, para la incubación sin luz y dos (adición de 200 µL de formol 40%) controles muertos. El proceso fue el descrito en el capítulo de métodos. Para cuantificar la concentración de clorofila, se recogieron 5 cristales seleccionados al azar. La extracción de los pigmentos y su medida se realizó según lo descrito en el capítulo de métodos.

Al finalizar el experimento, se recogieron tres réplicas por tratamiento para realizar un estudio detallado de la composición pigmentaria, mediante análisis de HPLC, cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (Waters 600E system controller and waters 700 Satellite WISP, Waters, Milford, Massachusetts, USA) equipado con un diodo Array (1000S, Applied Biosystems, Foster City, California, USA), y acoplado a un fluorímetro (SFM 25, Kontron). Se utilizó una columna ODS 5-micron Hypersil. Los procedimientos son los descritos por Mantoura (Mantoura and Llewellyn, 1983) y detallado y modificado por Guasch (Guasch and Sabater, 1998). Los carotenos y clorofilas fueron identificados comparando sus coeficientes

específicos de extinción, tiempos de retención y absorbancias características con referencias estándar conocidas (chl-*a*, chl-*b*, carotenos, obtenidos de SIGMA). Los derivados de clorofilas (feofitinas *a* y *b*, clorofilida *a* y *b*, y feofórbidos) se prepararon según Sartory (Sartory, 1985) y Leavitt (Leavitt *et al.*, 1989). Otros carotenoides, específicos de grupos algales diferentes, se identificaron en base al espectro (380-600 nm) de los picos del cromatógrafo, así como mediante comparaciones con coeficientes de extinción y movilidad publicados (Foppen, 1971, Mantoura and Llewellyn, 1983, Rowan, 1989). Los resultados cromatográficos se usaron para estimar los porcentajes de clorofila *a*, *b*, *c* y sus derivados. Los carotenoides totales se computaron como la suma de todos los picos de carotenoides.

El análisis cuantitativo de la composición de la comunidad algal se llevó a cabo en los días 0, 3 y 18. Se seleccionaron al azar 2 vidrios que se conservaron en formol al 4%. El conteo y clasificación en formas vitales se llevó a cabo según lo descrito con anterioridad. El cálculo del biovolumen se llevó a cabo según lo propuesto por Lowe (Lowe and Laliberte, 1996).

Para el cálculo del peso seco de los gasterópodos (70°C hasta peso constante), se utilizaron 30 individuos del mismo tamaño a los utilizados en los experimentos, como estima de la biomasa inicial. Al final de los experimentos se determinó el peso seco de los individuos de cada canal y se comparó con el inicial. Cada día se contaron los gasterópodos, se reemplazaron los muertos por otros de igual talla, mantenidos en un canal similar a los del experimento y los individuos encontrados en las redes del final de los canales se situaban en el inicio. Al final del experimento, se contaron el número de puestas y de huevos por puesta. No aparecieron fases juveniles durante los 18 días del experimento.

**Análisis estadístico.** La normalidad de la distribución de muestras y la homogeneidad de las varianzas se valoraron para determinar si eran necesarias transformaciones. Los datos algales se analizaron mediante un three-way ANOVA, para detectar las diferencias entre tratamientos a través del tiempo (medidas repetidas). Cuando aparecieron interacciones significativas se analizaron mediante un test TUKEY HSD (Spjotvoll and Stoline, 1973). Las diferencias en la composición de pigmentos del perifiton se

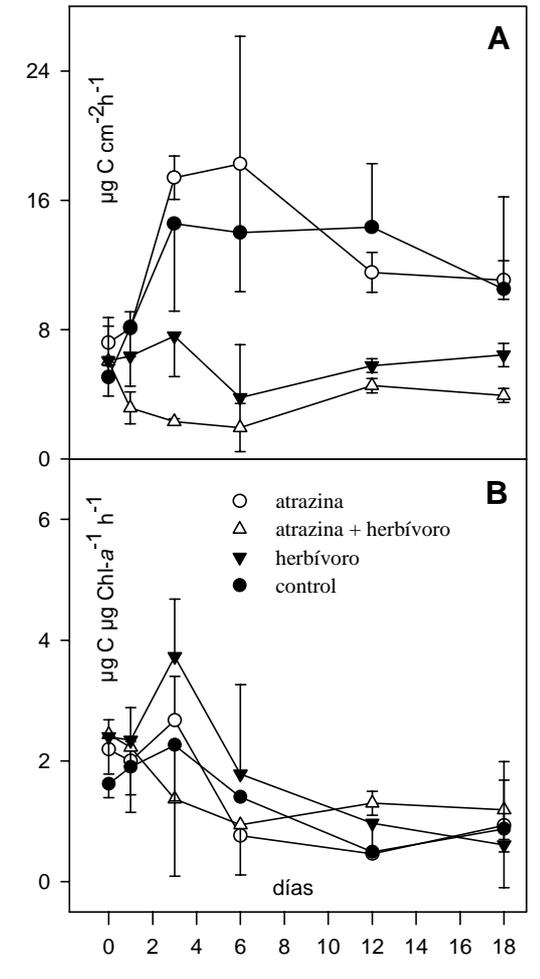
analizó mediante una two-way ANOVA. Las diferencias de peso en los gasterópodos al final del experimento se analizaron mediante una one-way ANOVA.

**4.3. Resultados**

**Composición del perifiton, biovolumen y composición pigmentaria.** La composición de los pigmentos no fue alterada significativamente por la atrazina, herbivorismo o la combinación de ambos (Tabla 1.). La concentración de clorofila-*a* en el tratamiento control incrementó hasta el día 12 y a partir de entonces decreció lentamente hasta el final del experimento hasta concentraciones de  $25 \pm 15.4 \mu\text{g chl-}a \text{ cm}^{-2}$  (Figura 1). En los canales con atrazina se dio un incremento temprano de la concentración de clorofila (día 6) y se mantuvo estable durante el resto del experimento (sobre  $24 \pm 4 \mu\text{g chl-}a \text{ cm}^{-2}$ ). Por otro lado, la atrazina no tuvo efecto significativo sobre la concentración de clorofila.

Los herbívoros provocaron un descenso significativo en la concentración de clorofila a lo largo del tiempo ( $p < 0.0001$ ). Los canales con gasterópodos mostraron una concentración de clorofila inferior a aquellos sin herbívoros desde el día 3 en adelante. La cantidad de clorofila por unidad de superficie fue de 3 a 4 veces menor que en los canales sin herbivorismo. La biomasa creció lentamente desde el día 12 hasta el final del experimento (Fig. 1). Los canales expuestos a la atrazina y al herbivorismo mantuvieron una baja cantidad de clorofila (sobre  $3 \pm 4 \mu\text{g chl-}a \text{ cm}^{-2}$ ) a lo largo del experimento, no observándose ningún tipo de recuperación. La biomasa en estos canales era menor que en los de atrazina ( $p = 0.0012$ ) y en los control ( $p = 0.0026$ ) pero no significativamente diferente a la biomasa en el tratamiento de los herbívoros. El biovolumen incrementó significativamente a lo largo del tiempo en todos los tratamientos ( $p < 0.0001$ ). Este incremento fue significativamente menor en los 2 tratamiento de herbivorismo ( $p = 0.002$ ) (Fig. 1).

**Incorporación de carbono.** La tasa de incorporación de carbono por unidad de área fue mayor en los canales sin herbívoros (Fig. 2). En el tratamiento de herbívoros, los valores de incorporación de carbono fueron sobre  $6 \mu\text{g C cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$  a lo largo del experimento. El tratamiento con herbívoros mostró una clara disminución en los días 1 y 3. El día 12 muestra una ligera recu-



**Figura 2.** Incorporación de carbono por unidad de área (A) y por unidad de clorofila (B) para cada tratamiento a lo largo del experimento. Los puntos son medias de los tres canales de cada tratamiento y la barras representan la desviación estandar.

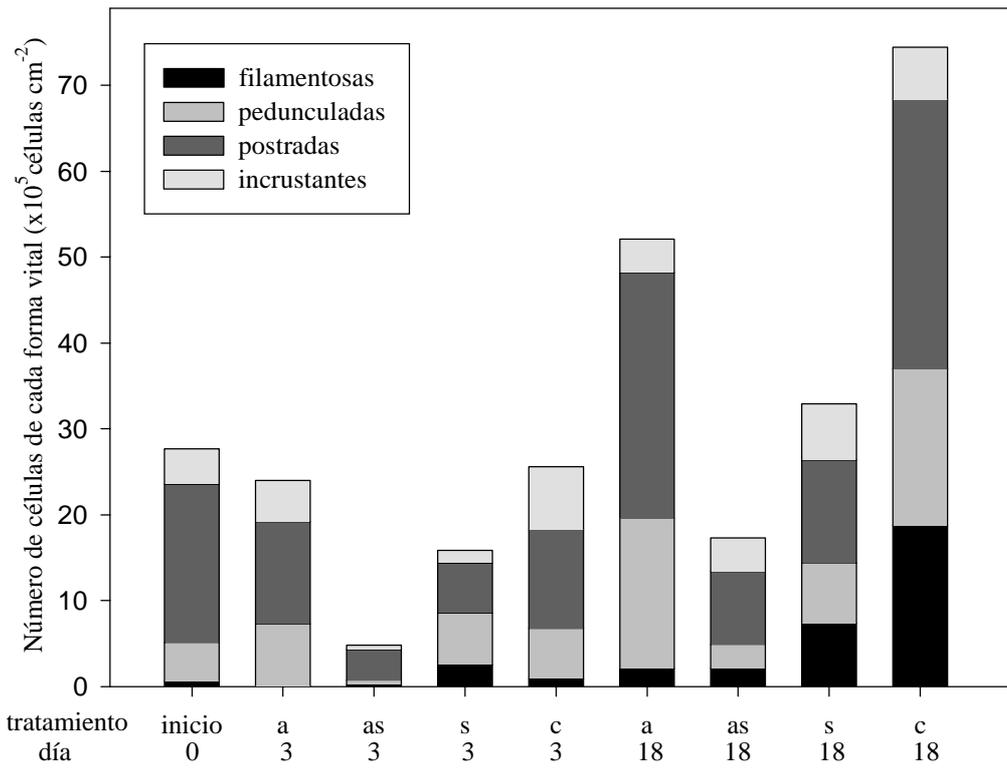
peración, pero los valores ( $4 \mu\text{g C cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) fueron siempre menores que los del inicio.

La evolución en la incorporación de carbono, a través del tiempo, fue significativamente diferente en todos los tratamientos ( $p = 0.003$ ). La atrazina no tuvo un efecto significativo en la incorporación de carbono, pero el herbivorismo si causó un efecto sobre este parámetro ( $p < 0.0001$ ). Este efecto resultó obvio en el día 3 (60-85% respecto al control) y al final (50% respecto al control) (Fig. 2). La interacción de los herbívoros y la atrazina afectó significativamente a las tasas de incorporación de carbono ( $p = 0.02$ ). Los canales expuestos a ambos factores presentaron menores tasas de incorporación que los control ( $p = 0.0031$ ), atrazina ( $p = 0.0003$ ) y herbívoros ( $p = 0.047$ ).

La incorporación de carbono por unidad de clorofila, a través del tiempo, no fue afectada por la atrazina o los gasterópodos. La eficiencia fotosintética incrementó a partir del día 3, para declinar progresivamente hasta el día 12 (aprox.

**Tabla 2.**  
Densidades medias de los taxones algales ( $\times 10^3$  cells  $\text{cm}^{-2}$ ) y abundancia total de los tres tratamientos (tres réplicas por tratamiento) en los días 0, 3 y 18. Los valores entre paréntesis son la desviación estándar.

Taxones algales	Día 0				Día 3				Día 18			
	Atrazina	Atr+Herbi	Herbívoros	Control	Atrazina	Atr+Herbi	Herbívoros	Control	Atrazina	Atr+Herbi	Herbívoros	Control
<i>Achnanthes lanceolata</i> Breb.	469 (321)	127 (63)	152 (92)	316 (390)	647 (230)	427 (450)	578 (196)	584 (318)	647 (230)	427 (450)	578 (196)	584 (318)
<i>Achnanthes minutissima</i> Kütz.	1224 (1034)	196 (103)	364 (470)	646 (858)	203 (806)	385 (345)	598 (750)	2274 (1689)	203 (806)	385 (345)	598 (750)	2274 (1689)
<i>Amphora</i> sp.	68 (52)	16 (28)	28 (18)	142 (152)	117 (47)	12 (21)	5 (9)	158 (151)	117 (47)	12 (21)	5 (9)	158 (151)
<i>Ceratoneis</i> sp.	17 (35)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>Chroococcus</i> sp.	60 (120)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>Cocconeis placentula</i> Ehr.	41 (20)	7 (3)	20 (7)	31 (35)	70 (5)	.	8 (14)	39 (35)	70 (5)	.	8 (14)	39 (35)
<i>Cosmarium</i> sp.	.	.	4 (7)	.	.	.	3 (5)	15 (27)	.	.	3 (5)	15 (27)
<i>Dictyosphaerium</i> sp.	135 (105)	32 (55)	100 (73)	642 (516)	281 (427)	203 (158)	178 (268)	452 (460)	281 (427)	203 (158)	178 (268)	452 (460)
<i>Fragilaria capucina</i> Desmazières	87 (333)	.	84 (75)	16 (16)	39 (36)	8 (14)	23 (40)	8 (13)	39 (36)	8 (14)	23 (40)	8 (13)
<i>Fragilaria construens</i> (Ehr.) Grun.	118 (124)	16 (18)	20 (35)	.	.	3 (5)	12 (20)	8 (15)	.	3 (5)	12 (20)	8 (15)
<i>Melosira varians</i> Agardh	4 (8)	.	.	5 (9)	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>Monoraphidium</i> sp.	.	.	.	3 (5)	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>Navicula cryptocephala</i> Kütz.	8 (16)	12 (6)	24 (2)	33 (16)	39 (67)	12 (12)	.	54 (74)	39 (67)	12 (12)	.	54 (74)
<i>Nitzschia fonticola</i> Grun.	79 (60)	4 (5)	16 (18)	117 (140)	78 (67)	13 (12)	.	70 (46)	78 (67)	13 (12)	.	70 (46)
<i>Nitzschia linearis</i> Smith	153 (81)	25 (20)	360 (427)	304 (350)	764 (772)	40 (38)	81 (141)	240 (336)	764 (772)	40 (38)	81 (141)	240 (336)
<i>Scenedesmus</i> sp.	7 (14)	.	.	.	.	16 (28)	11 (18)	109 (117)	.	16 (28)	11 (18)	109 (117)
<i>Stigeoclonium tenue</i> (Ag.) Kütz. (basal cells)	220 (106)	23 (24)	48 (55)	93 (161)	109 (133)	184 (76)	452 (274)	151 (506)	109 (133)	184 (76)	452 (274)	151 (506)
<i>Stigeoclonium tenue</i> (filaments)	59 (102)	23 (27)	256 (285)	81 (141)	211 (253)	208 (145)	746 (923)	1875 (1269)	211 (253)	208 (145)	746 (923)	1875 (1269)
<i>Synedra ulna</i> (Nitzsch.) Ehr.	21 (6)	12 (6)	108 (32)	125 (135)	835 (49)	221 (155)	571 (711)	1415 (426)	835 (49)	221 (155)	571 (711)	1415 (426)
<b>ABUNDANCIA TOTAL (<math>\times 10^3</math> cells <math>\text{cm}^{-2}</math>)</b>	<b>2771 (1809)</b>	<b>478 (178)</b>	<b>1584 (219)</b>	<b>2555 (2689)</b>	<b>5218 (725)</b>	<b>1732 (929)</b>	<b>3289 (1800)</b>	<b>7451 (3521)</b>	<b>5218 (725)</b>	<b>1732 (929)</b>	<b>3289 (1800)</b>	<b>7451 (3521)</b>



**Figura 3.** Número de células de cada forma vital. Los puntos son medias de los tres canales de cada tratamiento y la barras representan la desviación estandar. Tratamientos: a (atrazina), as (atrazina + herbívoros), s (herbívoros), c (control).

50 % de la eficiencia inicial) en todos los tratamientos, excepto en los canales expuestos a atrazina y herbívoros, donde la eficiencia decreció durante la primera parte del experimento y después, lentamente, se recupera (Fig. 2). Al final del experimento los valores de eficiencia se situaron entre 0.61 y 1.2 ( $\mu\text{g C chl-}a^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Los cambios en la eficiencia fotosintética, a través del tiempo, fueron significativos en todos los tratamientos (0.0001).

**Estructura de la comunidad algal.** La comunidad de los canales estuvo dominada por diatomeas; *Achnanthes lanceolata*, *A. minutissima*, *Nitzschia linearis*, así como células basales de la clorofícea *Stigeoclonium tenue* (Tabla 2). El herbivorismo provocó una caída en la abundancia de *A. minutissima* y *Amphora* sp el día 3 y de *Cocconeis* a lo largo de todo el experimento.

La adición de atrazina provocó la disminución en la densidad de *Cocconeis* sp y *S. tenue* (células basales y filamentos) principalmente el día 3. La interacción entre los dos factores provocó densidades significativamente menores de *A. minutissima*, *A. lanceolata*, *Amphora* sp. y *N. fonticola* en comparación con otros tratamientos (Tabla 3).

Los cambios en densidad algal fueron signifi-

cativos a través del tiempo ( $p=0.0002$ ). Al final del experimento, la densidad algal incrementó en todos los tratamientos, excepto en el de atrazina y herbívoros, que nunca recuperó los valores iniciales (Fig. 3). El efecto de la atrazina fue significativamente mayor en los canales con herbívoros ( $p=0.002$ ).

Las algas postradas fueron las formas vitales dominantes el día 0 (66%), mientras que pedunculadas, incrustantes y filamentosas representaron el 16, 15 y 3%, respectivamente. El herbivorismo causó un descenso significativo de las formas postradas y pedunculadas el día 3. Las formas filamentosas fueron las más sensibles a la atrazina. La interacción entre atrazina y herbivorismo provocó un descenso significativo en las formas postradas (Tabla 3).

**Efectos sobre los herbívoros.** La media del incremento de biomasa de los gasterópodos al final del experimento no fue significativamente diferente entre los canales control y los expuestos a atrazina. La mortalidad fue mínima (sobre el 10%) en todos los tratamientos sin diferencias significativas entre ellos. Tampoco hubo diferencias en el número de individuos escapados, el número de puestas o el número de huevos por puesta.

**Tabla 3.** Valores de p en los F-tests en three-way ANOVA testando la significancia de la atrazina, herbívoros y tiempo y en combinación de diferentes factores para el porcentaje representado por cada una de las especies y para las formas vitales (ns=no significativo).

	A	H	T	A x H	A x T	H x T	A x H x T
<i>A. lanceolata</i>	ns	ns	0.002	0.03	ns	ns	0.01
<i>A. minutissima</i>	ns	0.002	0.008	ns	ns	ns	0.04
<i>Amphora sp.</i>	ns	0.02	ns	ns	ns	ns	0.04
<i>C. placentula</i>	0.04	0.01	ns	0.001	ns	0.04	ns
<i>N. fonticola</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.002
<i>S. tenue</i> (bas.)	0.03	ns	0.003	ns	ns	0.004	ns
<i>S. tenue</i> (filam.)	0.02	ns	0.003	ns	0.03	ns	ns
Filamentosa	0.02	ns	0.003	ns	0.03	ns	ns
Pedunculada	ns	0.01	0.0001	ns	ns	0.002	ns
Postrada	ns	0.008	0.0001	0.0001	ns	0.0022	0.0003
Incrustante	ns	0.02	ns	ns	ns	ns	ns

#### 4.4. Discusión.

Los efectos aislados del herbivorismo y la atrazina sobre el perifiton, observados en nuestros experimentos, han sido descritos en la literatura, no apareciendo nada fuera de lo esperado. En nuestros experimentos, la exposición a la atrazina -concentraciones nominales de  $14 \mu\text{g L}^{-1}$ - no alteró significativamente ni la tasa de incorporación de carbono, ni la concentración de clorofila, ni la composición de la comunidad, ni los cambios de biomasa de los herbívoros. La falta de inhibición de la fotosíntesis por parte de la atrazina ya fue descrita por otros autores en exposiciones a corto plazo ((Jurgensen and Hoagland, 1990) y a largo plazo (Lynch *et al.*, 1985). Huber (1993) concluye que concentraciones menores a  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  puede no afectar a los organismos acuáticos, especialmente ante exposiciones transitorias.

El herbivorismo causó un decremento en las tasas de incorporación de carbono, concentración de clorofila y biovolumen de perifiton (Fig. 1 y 2). La reducción en la biomasa algal debida al herbivorismo (realizado por gasterópodos, larvas de insectos, peces...) ha sido descrito por numerosos autores (Steinman, 1996). El resultado inicial de la reducción de biomasa suele ser una caída en la tasa de incorporación fotosintética y en muchos casos una caída en la producción específica por área (Hill *et al.*, 1992, Steinman, 1992, Rosemond *et al.*, 1993).

Por otra parte, la hipótesis de partida es que trabajando en un escenario de interacción entre los herbívoros y atrazina, los resultados deberán ser diferentes al escenario habitual de cada uno de los factores por separado. De hecho, bajo una fuerte presión de herbivorismo la exposición a  $14 \mu\text{g L}^{-1}$  de atrazina provoca un decremento en

la incorporación de carbono mayor al que se da ante cada uno de los factores por separado. Este efecto, a pesar de ser leve, es bastante precoz. La incorporación de carbono sufre un descenso significativo tras 3 días de exposición a la interacción entre herbívoros y atrazina y ya no recupera las tasas de incorporación inicial. Varios estudios (Hoagland *et al.*, 1996) han demostrado la capacidad de las comunidades algales microbentónicas para recuperara los niveles de biomasa y producción tras exposiciones a concentraciones mayores que las de este estudio. Tras tres días de exposición a los herbívoros la comunidad responde con un incremento de la tasa específica de incorporación ( $\mu\text{g C } \mu\text{g Chl-}a^{-1}\text{h}^{-1}$ ) presentando ese día la mayor (Fig. 2B) de todos los tratamientos, en concordancia con lo descrito por otros autores (Lamberti *et al.*, 1987, Muñoz *et al.*, 2000). Esta respuesta puede atribuirse a que los herbívoros depredan principalmente sobre las células senescentes. La comunidad expuesta a la atrazina se mantiene en los niveles del control, demostrando que esta concentración de atrazina únicamente afecta levemente a algunas especies (Tabla 3) aunque sin alterar la estructura de la comunidad ni su actividad fotosintética. En cambio la comunidad expuesta a atrazina y herbivorismo presenta en ese momento la menor tasa de todos los tratamientos (Fig. 2B). La actividad de los herbívoros podría impedir la adaptación de la comunidad a la atrazina.

Las tasas de absorción efectiva de un tóxico por parte del biofilm depende de propiedades físicas y químicas del contaminante, así como del biofilm (Langston and Spence, 1995). La edad del biofilm también parece tener una especial relevancia en la biodisponibilidad del tóxico (Headley *et al.*, 1998, Admiraal *et al.*, 1999). Los herbívoros eliminan la capa superficial de

células senescentes del biofilm, manteniendo bajos los niveles de biomasa (Steinman, 1996), incrementando la exposición a la atrazina del resto de células e inhibiendo la adaptación de algunas algas al tóxico. Más aun, los herbívoros, con sus sistemas bucales raspadores tienen un gran impacto sobre las comunidades algales, pudiendo dañar las paredes celulares o la estructura de la comunidad (mucílagos) durante su alimentación. Aunque la pared celular proporciona cierta protección ante productos químicos (Genter, 1996), su alteración como consecuencia de la actividad de herbivorismo puede ser suficiente para causar estrés. Torres (Torres and O'Flaherty, 1976) sugiere que los mecanismos implicados en la adaptación a la atrazina pueden provocar cambios en la pared y membrana celular. Los herbívoros pueden interferir en la recuperación de las células de perifiton y potenciar el efecto de la atrazina. Es más, la actividad herbívora puede no dejar el tiempo suficiente para que entre en acción la protección ejercida por el acúmulo (con el paso del tiempo) de sustancias extracelulares. Este mecanismo de protección ya ha sido demostrado para metales (Stadorub *et al.*, 1987, Admiraal *et al.*, 1999). Las dificultades para desarrollar algunos de los mecanismos de tolerancia y detoxificación ante la atrazina pueden estar provocadas por los herbívoros, lo que explicaría el mayor efecto tóxico, observado en nuestro estudio, sobre el perifiton.

Los herbívoros, además, simplifican tanto la composición taxonómica como la estructura de formas vitales. El número de algas incrustantes, pedunculadas y postradas como *Achnanthes* y *Cocconeis* decrecen como consecuencia de la actividad de los herbívoros. Un efecto similar sobre comunidades de perifiton ha sido descrito en numerosos estudios (Steinman, 1996). La atrazina provoca decrementos en la abundancia de *Stigeoclonium tenue* (filamentos) como observó Hamala (Hamala and Kolling, 1985). La densidad algal se redujo acentuadamente en el tratamiento expuesto a atrazina y herbívoros, evidenciando las dificultades, impuestas por los herbívoros, para la adaptación frente a la atrazina. En este tratamiento, las formas vitales y la composición taxonómica fueron significativamente diferentes a los otros tratamientos. Los cambios en las formas vitales del perifiton pueden condicionar la respuesta toxicológica de la comunidad entera, alterando los gradientes de difusión a través del biofilm

(Hoagland *et al.*, 1996). Por otro lado, la atrazina en combinación con los herbívoros no solo afecta al metabolismo de la comunidad si no que también altera la estructura de la comunidad, indicando que se han dado efectos crónicos.

Nuestros resultados han demostrado el impacto que el herbivorismo tiene sobre el efecto tóxico de la atrazina en la comunidad sobre la que se alimenta. Pero además puede tener un importante papel en la movilización de tóxicos que estaban inmovilizados en las comunidades de perifiton y que se liberan de nuevo como consecuencia del tipo de alimentación de este tipo de herbívoros (raspado y desestructuración de los biofilms). Stewart (Stewart and Hill, 1993) sugiere que uno de los resultados de la actividad de los herbívoros es el incremento de la movilización de tóxicos disueltos aguas abajo, a causa de la alteración por parte de los herbívoros de grandes superficies de biofilm donde se había llevado a cabo una incorporación de tóxicos.

Como apunte final, indicar que la presencia de herbívoros puede tener implicaciones cruciales sobre el efecto de los tóxicos. Para evaluar el efecto que los productos tóxicos tendrán en los sistemas acuáticos y realizar predicciones robustas, se hace necesario conocer los mecanismos ecológicos que influyen en la movilidad de los productos tóxicos, siendo uno de ellos el papel jugado por los herbívoros.

# INFLUENCIA DEL HERBIVORISMO EN EL EFECTO TÓXICO DEL COBRE SOBRE LAS COMUNIDADES MICROBENTÓNICAS

## 4.5. Introducción

El cobre está presente en la mayoría de ríos Europeos lo que ha provocado numerosos estudios sobre su efecto en los sistemas acuáticos. Durante el período 1997-1998, la concentración media de cobre en los ríos catalanes osciló entre los 1.3 y 17.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Armengol *et al.*, 1993). En algunos ríos con cuencas con intensa actividad agrícola y/o industrial se llegaron a medir picos superiores a 40  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Incluso se han detectado picos superiores a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  en ríos extremadamente polucionados de la misma área geográfica (Armengol *et al.*, 1993), antes de la implementación de un plan de saneamiento gubernamental a partir de 1992.

Numerosos autores (Foster, 1982a, Leland and Carter, 1984) han descrito los cambios producidos en la estructura de comunidades de perifiton tras largas exposiciones a cobre, en concentraciones que van desde los 2.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Leland and Carter, 1984) hasta los 120  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Kaufman, 1982). Incluso a concentraciones tan bajas como 2.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  se han descrito inhibición de la producción primaria del perifiton entre el 57 y el 87% en ríos oligotróficos (Leland and Carter, 1985). La estructura del perifiton consiste en un conjunto de células imbuidas en una matriz de mucopolisacáridos que ofrece cierta resistencia frente a los metales (Stadorub *et al.*, 1987, Lehman *et al.*, 1997, Admiraal *et al.*, 1999, Barranguet and Kromkamp, 2000). Los biofilms naturales poseen un número significativo de lugares de unión a metales, tanto en la matriz de mucopolisacáridos (incluyendo la materia orgánica atrapada en ella), como en la superficie celular. Conforme envejecen, estos biofilms presentan un mayor número de lugares de enlace para metales, reduciendo la difusión y biodisponibilidad del cobre para las algas (Ivorra *et al.*, 2000). Los herbívoros al depredar sobre el biofilm, mantienen niveles bajos de biomasa algal (Steinman, 1996), alterando al mismo tiempo la estructura tridimensional que proporciona cierta protección ante los tóxicos. Una actividad intensiva de los herbívoros reduce el acúmulo de material extracelular y puede potenciar el efecto tóxico del cobre, como ya se ha demostrado que ocurre con la atrazina (Muñoz *et al.* in press).

En este trabajo se describe el efecto de una exposición a largo plazo de cobre (44  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) en una cadena trófica simple (perifiton y herbívoros). El objetivo fue evaluar los cambios en el metabolismo composición y abundancia del perifiton y en la concentración de clorofila-*a* tras la adición de un gasterópodo (*Stagnicola vulnerata* Küster), utilizando para ello el sistema de canales artificiales descrito en capítulos anteriores. Nuestra hipótesis de partida es que la alteración de la estructura del perifiton provocada por la depredación de los herbívoros provocará una mayor sensibilidad ante el cobre. También se discutirá acerca de las diferentes respuestas en crecimiento y reproducción frente al cobre de *S. vulnerata*, ya que el contacto con el agua (por contacto cutáneo y branquial) y la transferencia a través de la cadena trófica son las rutas primarias de exposición a los metales para los herbívoros. La existencia de esas dos rutas de exposición convierte a los herbívoros en un grupo más sensibles que otros (Clements, 1991) frente a este tipo de alteraciones del medio.

#### 4.6. Materiales y métodos

**Diseño experimental.** Los experimentos fueron llevados a cabo en catorce canales artificiales durante el invierno de 1998. Los canales recibían un flujo continuo de  $1.5 \text{ L min}^{-1}$  de un pozo situado a 50 m. del laboratorio. La conductividad era elevada ( $1900 \mu\text{S cm}^{-1}$ , ligada a altos niveles de sulfatos y cloruros), el rango de pH osciló entre 6.9 y 7.2. La concentración de nutrientes era relativamente alta para nitrato ( $\text{N-NO}_3$   $14.5\text{-}16 \text{ mg L}^{-1}$ ) y baja para los fosfatos ( $\text{P-PO}_4$   $2.5\text{-}5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) mientras que los nitritos y el amonio estaban por debajo del límite de detección ( $0.01 \text{ mg L}^{-1}$ ). La concentración de cobre basal en el agua del pozo era de  $3.7 \mu\text{g L}^{-1}$ , y la alcalinidad osciló entre  $5.8$  y  $6 \text{ mmol L}^{-1}$ . La velocidad del agua era de  $1 \text{ cm s}^{-1}$ , la profundidad de  $2.5 \text{ cm}$  y el flujo de  $1.52 \pm 0.12 \text{ s.d. L s}^{-1}$ . La irradiancia medida a  $16 \text{ cm}$  sobre la superficie del agua era de  $321 \pm 45 \text{ s.d. } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . El fotoperíodo se programó para 9 horas de luz y 15 de oscuridad. La temperatura durante el experimento osciló entre los  $18 \text{ }^\circ\text{C}$  durante el período de oscuridad y los  $23.5 \text{ }^\circ\text{C}$  del período de iluminación. Todas estas mediciones se realizaron según lo descrito en el capítulo de métodos.

La densidad de herbívoros seleccionada, de acuerdo con experimentos previos (Muñoz *et al.*, 2000) para mantener una biomasa adecuada fue de 10 individuos por canal (peso seco  $0.96 \text{ g m}^{-2}$ ). Esta densidad se corresponde con el 75 % de la observada en el lugar de recolección de los herbívoros. Las tallas de los individuos se situaron entre 1.1 y 1.4 cm.

Los cuatro tratamientos siguientes (con tres canales como réplicas), se asignaron aleatoriamente a los canales utilizados en el experimento: (1) control, (2) herbivorismo, (3) cobre, (4) cobre y herbivorismo. Primero las algas fueron expuestas al herbivorismo durante 9 días (tratamientos 2 y 4), y durante los 13 días siguientes se expusieron las comunidades al cobre (tratamientos 3 y 4). La concentración de cobre se preparó a partir de una solución de  $1 \text{ g L}^{-1} \text{ CuCl}$  (Titrisol de Merck®). La adición de la solución de cobre se realizó mediante una bomba peristáltica. Se recogieron muestras de agua para realizar la analítica de cobre, conservándolas en nítrico al 1 % y congeladas hasta el análisis. La analítica de cobre se realizó mediante

ICP-OES (ver capítulos anteriores). Para detectar el efecto del cobre, del herbivorismo y de la interacción entre ambos se controlaron los parámetros especificados en la tabla 1.

**Colonización del perifiton** Se colocaron los sustratos artificiales descritos anteriormente en un río no perturbado (Avencó, NE España, (Guasch *et al.*, 1997) durante 16 días. Se colocaron vidrios de dos tamaños, los de  $1.2 \times 1.2 \text{ cm}$  como unidades de muestreo de los diferentes parámetros, y otros de  $12 \times 9 \text{ cm}$  para sujetar a los pequeños y lograr una superficie homogénea a lo largo de los canales. Los cristales pequeños se colocaron en soportes de metacrilato y los grandes en cestas, en zonas poco profundas de corriente y moderada cobertura arbórea. Tras el período de colonización los cristales se transportaron al laboratorio (1 hora de trayecto) en tanques con agua del propio río. Los sustratos colonizados se colocaron cubriendo por completo el fondo de los canales artificiales. Durante 27 días se permitió que se desarrollaran en las condiciones de laboratorio hasta que las algas cubrieron completamente y de modo homogéneo la superficie de los canales.

**Recolección y cría de *S. vulnerata*.** El gasterópodo *Stagnicola vulnerata* (Küster) fue recolectado en un río con una relativamente alta densidad de estos herbivorismo ( $79$  individuos  $\text{m}^2 \pm 40 \text{ s.d.}$  (Muñoz *et al.*, 2000)). Tras su recolección eran mantenidos en acuarios ( $60 \times 30 \times 30$ ) en una habitación de temperatura controlada ( $18\text{-}20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad. En cada acuario se mantenían un máximo de 250 gasterópodos en condiciones someras ( $12 \text{ cm}$  de agua) y aireación forzada. Los tanques se llenaron con la misma agua del pozo utilizada en los experimentos. La dieta consistió en lechuga lavada y perifiton sobre rocas transportado desde el río de origen de los gasterópodos. Se les proporcionaba lechuga semanalmente, retirando las hojas de la semana anterior. El contenido en cobre de la lechuga era de  $6.7 \pm 0.9 \text{ s.d. } \mu\text{gCu g}^{-1}$  de peso seco.

**Análisis de perifiton.** Se recogieron 5 réplicas (cristales) para la medida de las clorofilas y se congelaron hasta su análisis. Los pigmentos fueron extraídos en acetona al 90%, tras tres períodos de sonicación de 7 minutos en agua a  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Los cristales para el análisis de la comunidad se conservaron en formaldehído al 4 %. Para la

identificación y conteo se siguió el protocolo descrito por Guasch y Sabater (Guasch and Sabater, 1998). El material se contó e identificó utilizando un microscopio de transmisión de luz, para las células de algas que no fueran diatomeas. La composición taxonómica de diatomeas se realizó sobre preparaciones de los frústulos. Para cada preparación se contaron entre 250 y 300 células.

**Metabolismo de la comunidad de algas y herbívoros.** El metabolismo neto de la comunidad se midió mediante una modificación (Guasch, 1995) del método abierto del oxígeno (Odum, 1956). El metabolismo se calculó como la diferencia entre la concentración de oxígeno en el flujo de salida de los canales colonizados y el canal recubierto con sustratos sin colonizar. En los canales colonizados, los cambios en la concentración de oxígeno disuelto fueron el resultado del balance entre la producción primaria y la respiración de algas, bacterias y gasterópodos y las pérdidas por difusión a la atmósfera. Al controlar los cambios de la concentración de oxígeno por difusión en el canal sin colonización, los resultados obtenidos son la estimación del metabolismo neto de la comunidad en todo el canal (1700 cm<sup>2</sup>). Este es un método no destructivo y que permite repetir las medidas.

**Análisis de *S. vulnerata*.** La mortalidad de los caracoles se controló diariamente a lo largo del experimento. Los individuos muertos se retiraron diariamente y se reemplazaron por otros de la misma talla, que se mantenían en un canal bajo las mismas condiciones que los de experimentación. Al final de cada canal una red evitaba que se escaparan. Diariamente se contaba y trasladaba al inicio del canal a los individuos encontrados en la red. La ganancia de peso a lo largo del experimento se determinó sobre peso seco (70 °C hasta peso constante) en el inicio y al final del experimento (con todos los individuos de cada canal). La biomasa inicial se calculó a partir de tres submuestras de 10 individuos cada una, de la misma talla que los utilizados en el experimento. Las puestas de huevos fueron examinados mediante una lupa estereoscópica, contando los huevos presentes en cada muestra. Para detectar el efecto del cobre sobre las puestas, primero se retiraron las puestas de los 9 días de exposición a los herbívoros (sin cobre). Tras los 13 días de exposición a cobre se hizo lo mismo con el resto, y se

colocaron en incubadoras (2 canales bajo las mismas condiciones que los del experimento se destinaron a este fin, colocando 3 incubadoras en cada uno). Las incubadoras eran cestas de malla plástica. Cada dos días los individuos recién eclosionados eran contados y retirados de las incubadoras. La emergencia se expresó como el porcentaje acumulado de recién nacidos en relación al número total de huevos contados en cada puesta. Al final del experimento de eclosión todas las puestas fueron estudiadas para determinar que huevos se mantenían todavía vivos. Los huevos con la yema o un embrión en buen estado se consideraron vivos.

**Contenido en lípidos y proteínas.** Se determinó el porcentaje de proteínas y lípidos contenido en la comunidad algal y en la gasterópodos al final de los experimentos. Las muestras para lípidos fueron extraídas mediante una solución de hexano/isopropanol (2:1) (modificación del método descrito por Folch (Folch *et al.*, 1957)). La extracción de proteínas se llevó a cabo usando una solución de 0.1 N NaOH y analizando un método colorimétrico (Bradford, 1976).

**Análisis estadístico.** Las diferencias entre los contenidos de proteína y lípidos se determinaron mediante una one-way ANOVA (para los caracoles) o two-way ANOVA (para algas). Las diferencias entre tratamientos para la concentración de clorofila y el metabolismo de la comunidad fueron valorados mediante un three-way ANOVA de medidas repetidas (Winer, 1971). La ANOVA entre factores de medidas repetidas valora la dependencia del tiempo de las observaciones que caracterizan una secuencia temporal. La interacción (tiempo x tratamiento) muestra la diferencia a través del tiempo causada por la exposición al cobre. Las comparaciones múltiples entre medias se analizaron en todos los casos mediante un test TUKEY HSD (Honest Significant Difference) (Winer, 1971), excepto en el caso de los taxones algales que se utilizó el LSD (Least Significant Difference). Cuando fue necesario se transformaron los datos para cumplir los requerimientos de la ANOVA; la homogeneidad de varianzas y la normalidad de los errores (valores referidos a algas, transformación logarítmica, valores referidos a conteos de herbívoros se transformaron logarítmicamente, y mediante una transformación arcsine los valores de porcentaje. El incremento de peso, número de huevos, huevos por

puesta, número de individuos escapados, y porcentaje acumulado de eclosión no necesitaron transformación.

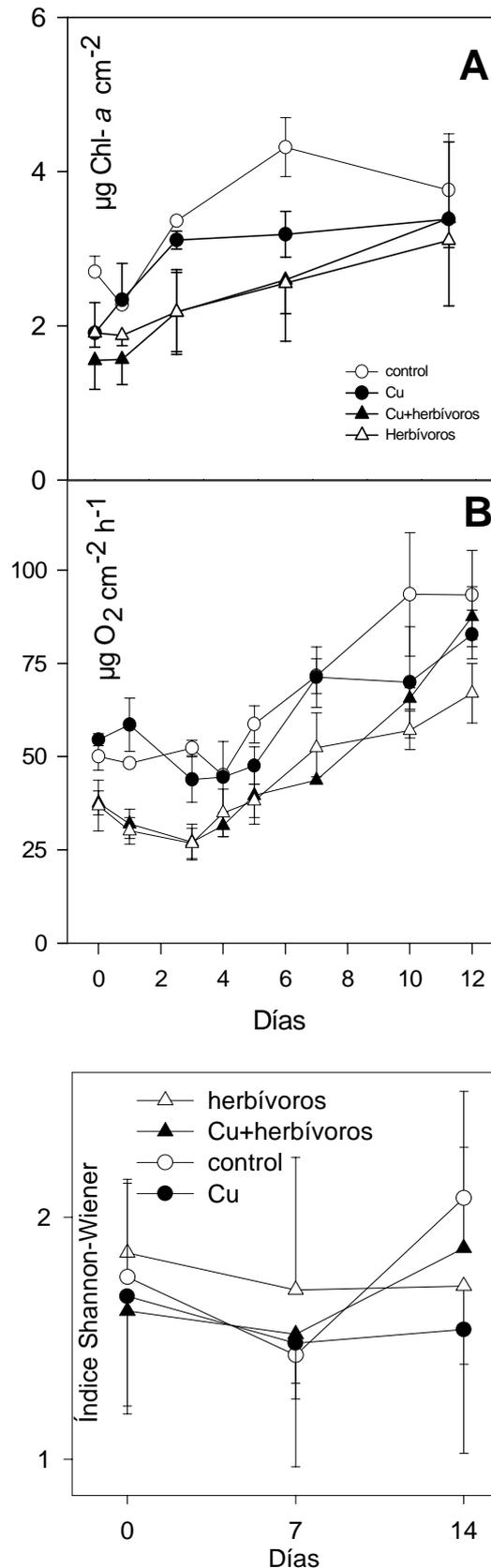
**4.7. Resultados**

La concentración de cobre (medida aleatoriamente durante el experimento en los canales expuestos a cobre) fue de  $44 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $\pm 1.4$  s.e.,  $n=11$ ). Los valores de cobre en el agua de los canales control fue de  $3.7 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $\pm 1.2$  s.e.,  $n=7$ ), que se corresponde con la concentración basal de cobre en el agua del pozo. La proporción de  $\text{Cu}^{2+}$  osciló entre el 1.6 y el 2.1% de esas concentraciones.

**Perifiton.** La concentración en clorofila-*a* (Fig 1A) incrementó significativamente a través del tiempo independientemente del tipo de tratamiento (ANOVA,  $p < 0.0002$ ). Por ejemplo, los canales con herbívoros presentaron mayor concentración de clorofila el día 7 que el día 0 del inicio del experimento (Tukey test,  $p < 0.05$ ). Los herbívoros provocaron un descenso significativo en la concentración de clorofila-*a*. Los canales expuestos a cobre tuvieron una media de clorofila menor que los no expuestos a cobre, pero no la diferencia no fue significativa.

**Algas y macroinvertebrados: metabolismo neto.** También hubo diferencias significativas (ANOVA,  $p < 0.0001$ ), a través del tiempo en el metabolismo neto de la comunidad (MNC). Hubo un descenso significativo en el MNC hasta el día 3 (Fig 1B) y un claro incremento a partir de entonces. Al final del experimento (días 10 y 12) los valores de MNC fueron mayores que al inicio (días 0 y 4) (Tukey test,  $p < 0.05$ ). Los herbívoros redujeron la MNC de modo significativo ( $p < 0.01$ ), principalmente al inicio del experimento. Los canales expuestos a herbivorismo presentaron menores MNC que los control (Tukey test,  $p \leq 0.05$  el día 3) o los expuestos a cobre (Tukey test,  $p \leq 0.05$  el día 1). Los canales expuestos a cobre tienen una media de MNC menor que los controles, aunque esta diferencia no es significativa.

La diversidad (índice de Shannon-Wiener) de todos los tratamientos se redujo hasta el día 7 (Fig. 2). A partir de entonces se mantuvieron los valores de diversidad en los tratamientos de cobre y herbívoros, mientras que en los canales control incrementó. El efecto de la interacción

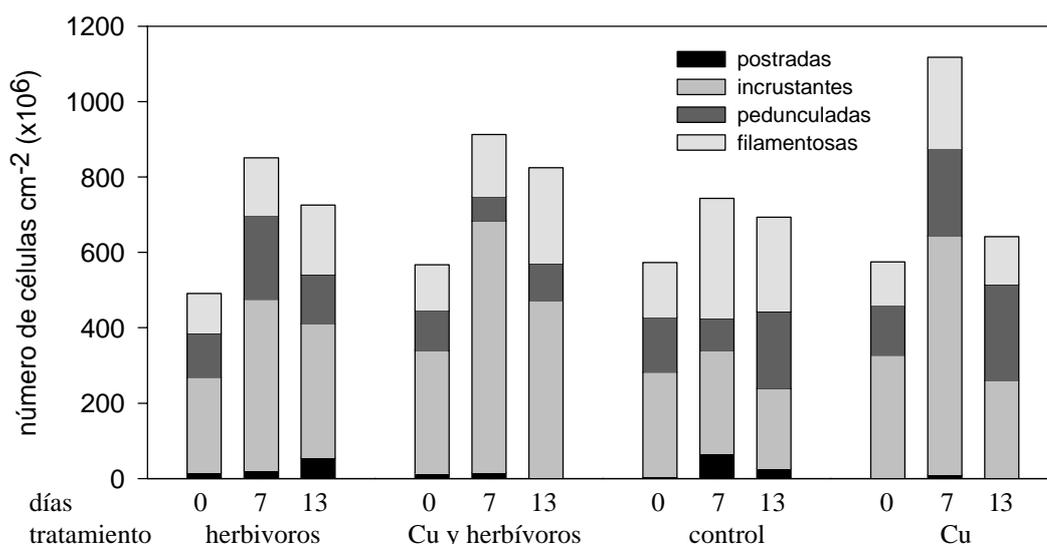


**Figura 1.** Evolución en la concentración de clorofila y en el metabolismo de la comunidad, medido como producción de oxígeno, durante los 12 días de experimento.

**Figura 2.** Evolución en el índice de diversidad de Shannon-Wiener. No aparecen diferencias significativas entre tratamientos.

entre cobre y herbívoros mostró una mayor diversidad que el efecto por separado de los dos factores, pero las diferencias no resultaron significativas.

**Figura 3.** Composición de la comunidad los días 0 7 y 13 del experimento, según los tipos vitales descritos por Gregory (1983), dependiendo del tipo de unión al sustrato.



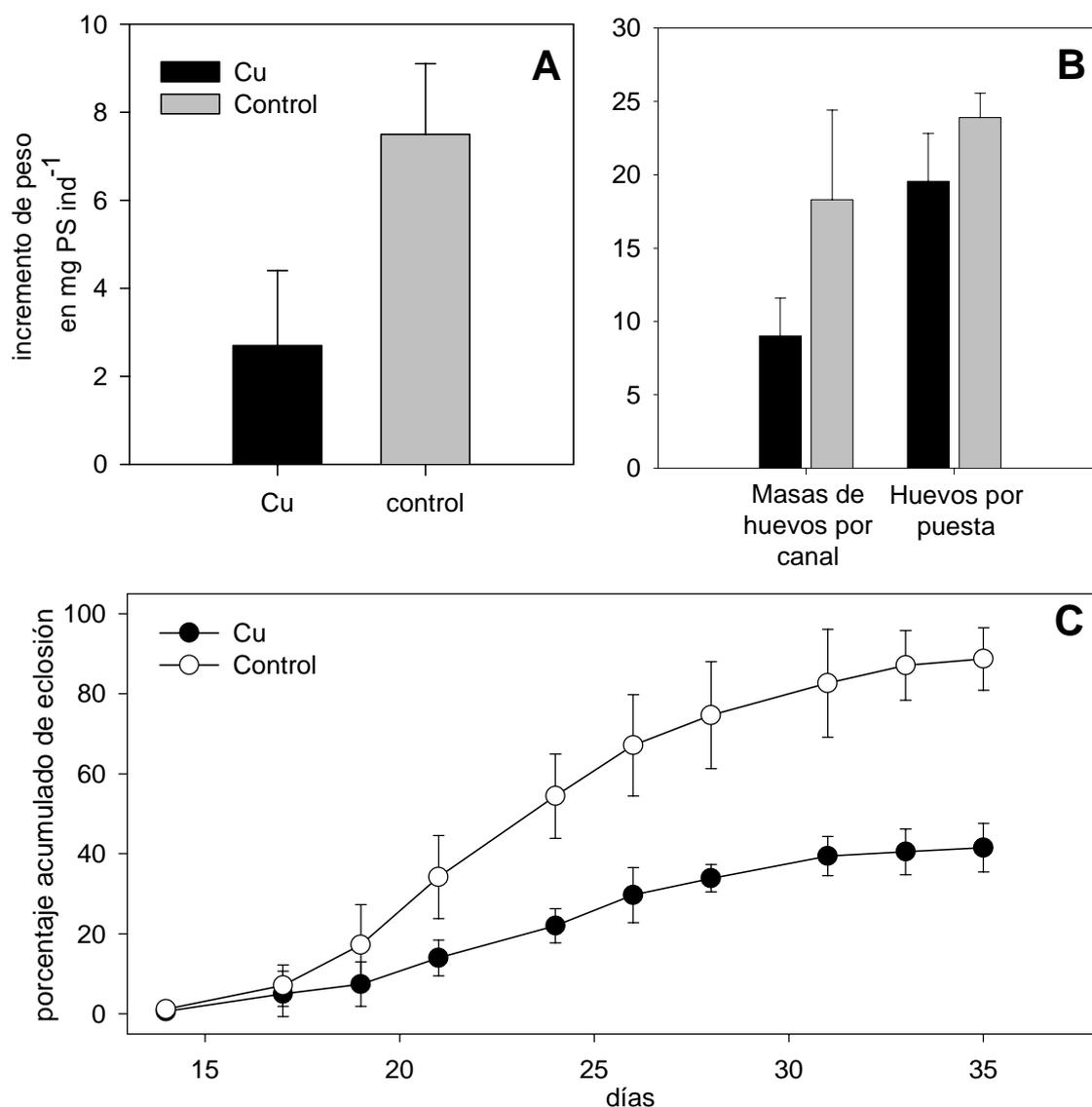
La densidad algal incrementó los primeros 7 días de experimento (Fig. 3) y decreció ligeramente el día 14 en todos los tratamientos menos en el de cobre, donde el descenso fue más evidente (de  $1100 \times 10^6$  a  $600 \times 10^6$  células  $m^2$ ). No hubo diferencias significativas entre tratamientos en la abundancia de las diferentes especies. En los canales control la densidad de algas filamentosas postradas y pedunculadas fue mayor al final que al inicio del experimento, mientras que las incrustantes mantuvieron su densidad a lo largo del tiempo. Los herbívoros controlaron el crecimiento de las formas filamentosas respecto a las condiciones control, favoreciendo el crecimiento de las formas incrustantes y pedunculadas. La densidad de pedunculadas incrementó en el tratamiento con cobre a través del tiempo. Las formas incrustantes y filamentosas incrementaron hasta el día 7 pero disminuyeron de ese día en adelante, hasta el final del experimento. La densidad de postradas en el tratamiento de cobre fue bajo. El efecto combinado del cobre y de los herbívoros sobre las formas algales no fue significativamente diferente al compararlo con el efecto de los dos factores por separado.

La comunidad en el inicio de la exposición al cobre (tras 9 días de exposición a los herbívoros) era la misma en todos los canales (Fig. 3). No aparecieron diferencias significativas en la composición taxonómica entre los los tratamientos. Esta comunidad inicial estaba dominada por *Anabaena* sp, una chlorococcal, *Fragilaria capucina*, *Mougeotia* sp., *Phormidium* sp. y *Tribonema* sp. Las células de estas especies representaban el 98% de la comunidad. Tras 13

días de exposición al cobre y al herbivorismo aparecieron algunas diferencias entre tratamientos, aunque los taxones dominantes fueron los mismos que en el inicio (con una representación del 97%) con la diferencia de que aparecen *Ulothrix zonata* y *Gloeocapsa* sp. sustituyendo a *Tribonema* sp y a la chlorococcal que desaparecen. El porcentaje de células de *Phormidium* sp. cae en todos los tratamientos tras 13 días aunque solo de modo significativo en el caso del cobre ( $p=0.0022$ ). La chlorococcal cae significativamente en todos los tratamientos ( $p<0.001$ ). *Ulothrix zonata* incrementa significativamente su porcentaje tanto en el tratamiento control ( $p=0.040$ ) como en el cobre+herbívoros ( $p=0.041$ ), además ese último día los porcentajes de *Ulothrix zonata* son significativamente mayores en el tratamiento control ( $p=0.040$ ) y cobre+herbívoros ( $0.041$ ) que en el tratamiento de cobre.

Mientras que el cobre y el herbivorismo tienen más efecto al actuar conjuntamente que por separado sobre algunas especies (*A. lanceolata*, *A. minutissima*, *Gloeocapsa* sp. y *Fragilaria capucina*), presentan un menor efecto al actuar conjuntamente ante otras (*Mougeotia* sp., *Phormidium* sp., *Ulothrix zonata*).

**Herbívoros.** Durante el período del experimento la mortalidad de los individuos fue menor al 5%. El número de individuos escapados fue ligeramente mayor antes de la adición de cobre. Durante el período de pre-exposición la media de escapados por canal fue de  $2.8 \pm 0.5$ . Tras la adición del cobre el número de escapados fue de  $1.5 \pm 0.2$  individuos por canal, pero el efecto



del cobre sobre el número de individuos escapados no fue significativa.

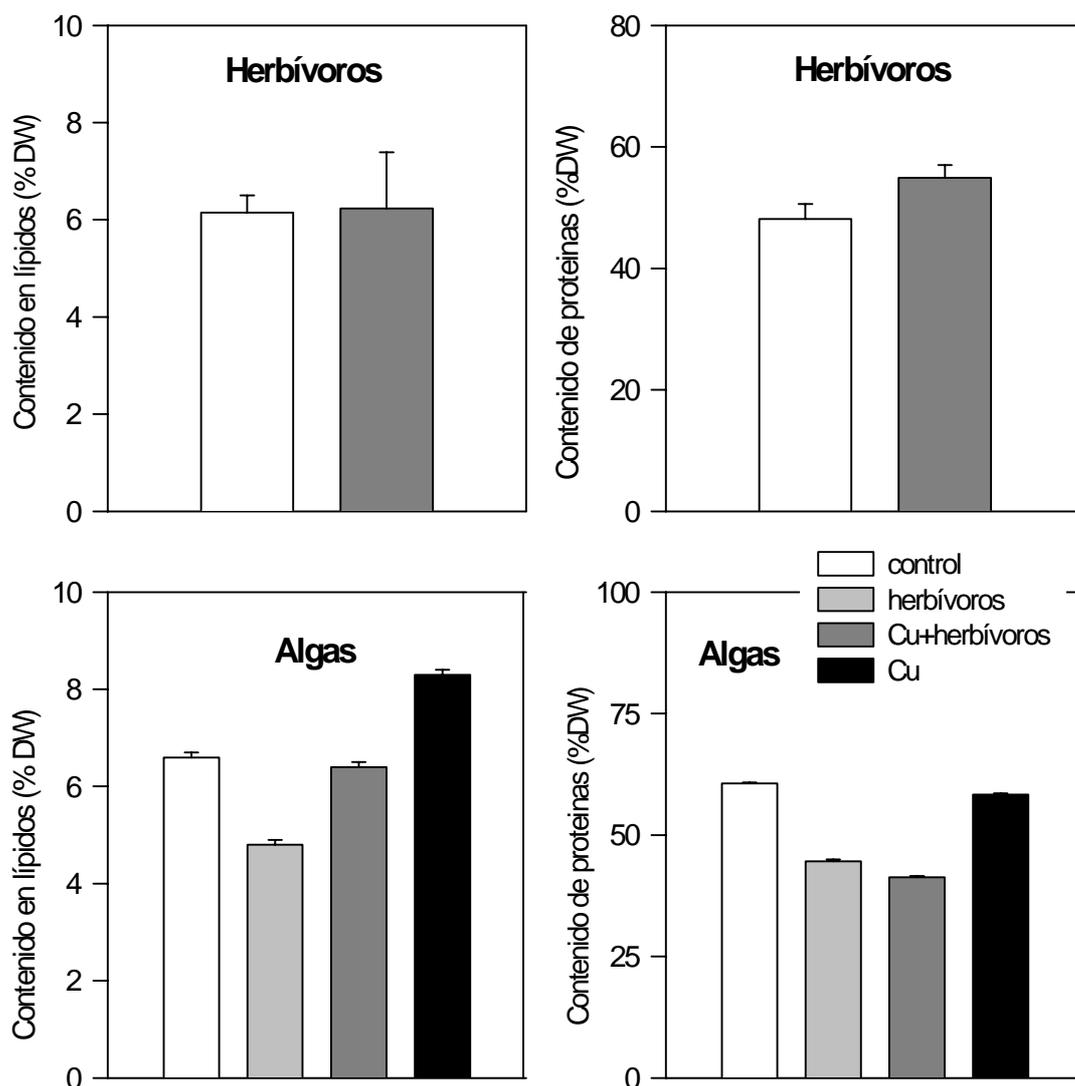
Sin embargo, sí hubo un efecto del cobre sobre la biomasa y sobre la reproducción. Los herbívoros expuestos a cobre ganaron menos peso (Fig. 4A) de un modo significativo que los control ( $p < 0.05$ ). El número de puestas fue significativamente menor en los canales donde los moluscos estuvieron expuestos al cobre ( $p < 0.05$ ).

El número medio de huevos por puesta fue también menor en los canales expuestos al cobre (Fig. 4B), de modo significativo ( $p < 0.05$ ). Hubo un efecto significativo del cobre en la eclosión de los huevos ( $p < 0.01$ ). Desde el día 21 en adelante, la eclosión acumulada de los huevos expuestos al cobre fue significativamente menor que en los huevos control. Tras 36 días, únicamente el 42 % de los huevos expuestos

eclosionaron, frente al 89 % de los control (Fig. 4C). Tras este período, los huevos no eclosionados fueron examinados y sorprendentemente la mayoría de los huevos no eclosionados se mantenían aún vivos, con formas en desarrollo o con la yema en buen estado.

**Contenido en lípidos y proteínas.** Los individuos de los canales expuestos a cobre tenían un mayor contenido proteico que los procedentes de los canales sin cobre ( $p < 0.05$ ). En cambio el cobre no afectaba al contenido de lípidos. El efecto de los herbívoros redujo significativamente el contenido proteico en algas, mientras que el cobre lo incrementó ( $p < 0.0001$ ). El perifiton procedente de los canales expuestos a los dos factores (cobre y herbívoros) mostró contenidos intermedios de lípidos, en comparación con los contenidos del perifiton expuesto a uno solo de los factores. El

**Figura 5.** Concentraciones de lípidos y proteínas en algas y herbívoros al finalizar el experimento.



cobre ( $p < 0.0001$ ) y los herbívoros ( $p < 0.0001$ ) reducen el contenido proteico en las algas, respecto al tratamiento control. La interacción de ambos no produce una diferencia significativa respecto a los factores por separado.

#### 4.8. Discusión

**Perifiton.** La comunidad algal resultó muy sensible los primeros días del experimento. Muchos de los valores más bajos de los parámetros medidos fueron recogidos entre los días 1 y 4 tras la exposición al cobre y al herbivorismo pero la mayoría de parámetros se recuperaron al final del experimento. Los canales expuestos a cobre tuvieron concentraciones de clorofila y MNC menores que los no expuestos, pero las diferencias al final del experimento no fueron significativas. En experimentos previos con exposiciones de 7 días y  $1 \text{ cm s}^{-1}$ , el cobre tenía un efecto significativo sobre la concentración de

clorofila y la incorporación de carbono (ver capítulo de cobre y velocidad (Navarro *et al.*, 2000)). La diferencia en concentración de clorofila sólo aparecen aquí en el día 6, pero ya no en el 12. En este experimento las bajas velocidades junto con la protección que confiere la matriz de polisacáridos del perifiton pueden justificar la baja sensibilidad del perifiton frente al cobre. La matriz acumula productos (de origen endógeno o exógeno, orgánicos e inorgánicos) que pueden reducir la toxicidad del cobre (Stadorub *et al.*, 1987, Admiraal *et al.*, 1999) y los herbicidas (Muñoz *et al.* in press). Este acúmulo es mayor con el paso del tiempo, por lo que la edad juega también un papel importante en la modulación de la respuesta de las algas ante un tóxico (Guasch *et al.*, 1997, Guasch *et al.*, 1998, Guasch and Sabater, 1998, Ivorra *et al.*, 2000).

Por otra parte, los períodos largos de coloniza-

ción favorecen las formas filamentosas, que en las comunidades del experimento representan entre el 20 y el 40% de la abundancia total. Los filamentos pueden contribuir a formar gradientes en el biofilm que limiten la difusión de metales. Los herbívoros tienen un efecto significativo, reduciendo la clorofila y el MNC en los canales donde están presentes, tanto en presencia como en ausencia de cobre. La interacción entre cobre y herbívoros no provoca un mayor efecto que el observado con los factores por separado, aunque en la composición taxómica si se observan ciertos cambios. La explicación podría ser el efecto directo que el cobre tendría sobre los herbívoros, reduciendo su tasa de herbivorismo. La respuesta de algunos taxones (*Mougeotia* sp., *Phormidium* sp. y *Ulothrix* sp.) ante los dos factores combinados parece ser positiva (ver tabla 2), incrementando su porcentaje más en ese caso más que cuando se les expone a uno solo de los factores. Esta respuesta aparece en otra clorofícea (*Stigeoclonium tenue*) ante fuertes presiones de herbivorismo, como respuesta al incremento de luz disponible por el aclarado efectuado por los herbívoros (Steinman *et al.*, 1987). Existen en cambio otros taxones que resultan perjudicados por la interacción de los dos factores, como *Gloeocapsa* sp., la cual incrementa menos su porcentaje al exponerla a ambos factores que ante los factores por separado.

En contraste con lo observado con otros autores (Leland and Carter, 1984), las concentraciones de cobre de este experimento no tienen un efecto significativo sobre la composición taxonómica del perifiton bajo las condiciones de velocidad y tiempo de exposición utilizados. Estos autores observaron un descenso en muchos taxones algales, al exponer el perifiton de ríos oligotróficos a concentraciones de entre 5 y 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cobre. Kaufman (Kaufman, 1982) trabajando en mesocosmos y mayores concentraciones de cobre (30  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) encontró una reducción en el número de especies de diatomeas y en la diversidad global. Las formas incrustantes son las formas predominantes en los tratamientos con cobre. Varios autores (Leland and Carter, 1984, Deniseger *et al.*, 1986, Ivorra *et al.*, 2000) informan acerca de la correlación entre un número alto de especies fuertemente unidas al sustrato (incrustantes) y concentraciones elevadas de metales en los ríos.

**Herbívoros.** Aunque bajo las condiciones del experimento el cobre no tuvo efectos significativos sobre la estructura y función del perifiton, si lo tuvo sobre los herbívoros, reduciendo su ganancia de peso y alterando las puestas. Esto contribuye a pensar en un efecto contrapuesto, y no aditivo, del cobre y de los herbívoros sobre la biomasa algal. Un menor peso implica una menor inversión en reproducción, como consecuencia fisiológica del estrés a que son sometidos en presencia del cobre. Por otra parte, no intentan escapar una vez expuestos al cobre. Los efectos de la dieta y de los metales pesados sobre el crecimiento y la fertilidad se observan a partir de concentraciones bajas de metales; por ejemplo sólo son necesarios 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cobre para inhibir la reproducción de *Potamopyrgus jenkinsi* (Dorgelo *et al.*, 1995).

Por otra parte, el cobre redujo el porcentaje de huevos eclosionados. Se ha descrito un efecto del cadmio a concentraciones subletales sobre la tasa de crecimiento embrionaria (Cheung and Lam, 1998) y tasa de eclosión de *Physa acuta*. Por otra parte en nuestro experimento, tras 36 días de exposición al cobre los huevos no eclosionados se mantenían vivos. Los mismos autores consideran que los huevos que no han eclosionado tras 28 días no son viables.

Estos resultados indican que la reducción de la tasa de crecimiento y de eclosión en *S. vulnerata* pueden resultar buenos indicadores para valorar el efecto tóxico del cobre a concentraciones subletales, demostrando una mayor sensibilidad que la comunidad algal de este experimento.

**Contenido en proteínas y lípidos.** Los lípidos son el factor crítico en el transporte y en el efecto tóxico de numerosos contaminantes lipófilos sobre la biota del medio acuático (Napolitano and Richmond, 1995). En este experimento el perifiton expuesto a cobre incrementó significativamente su contenido proteico, tras 13 días de exposición. Por otra parte, la presión de herbivorismo limita la biomasa del perifiton y la acumulación de lípidos por las algas (Steinman, 1996). La interacción entre los dos factores (cobre y herbivorismo) resultó con valores intermedios de contenido de lípidos, el perifiton acumula lípidos como respuesta ante el tóxico pero no en la misma proporción que en ausencia de herbívoros. No se observaron cambios en el contenido de lípidos de los herbí-

voros en los tratamientos con tóxico, respecto al control, quizás porque este período fue demasiado corto para observar acumulo de lípidos en niveles tróficos superiores.

El contenido proteico del perifiton decreció al exponerlo al cobre. Se describen decrementos similares en la literatura (Pratt *et al.*, 1987, Luederitz and Nicklisch, 1989). Además los herbívoros ejercen una gran presión depredadora controlando la producción de biomasa del biofilm, por lo que resulta un descenso significativo del contenido en proteínas y lípidos. A pesar de este efecto, se dio un incremento significativo en el contenido de proteínas de los herbívoros expuestos a cobre. Quizás se relacione con el incremento, en la producción de proteínas (metalotioneínas) relacionadas con el estrés inducido por el cobre, observado en otros invertebrados (Hebel *et al.*, 1996, Bolognesi *et al.*, 1999)

**Conclusiones.** Los herbívoros se vieron expuestos al cobre por dos vías, el cobre que penetraba en su sistema circulatorio a través de las branquias y el que ingieren junto con las algas. La inmovilización del metal para prevenir los efectos tóxicos solo fue posible mediante la inducción de proteínas específicas, una vez que los mecanismos de activación entran en contacto con el cobre (dentro de las células). En cambio la propia estructura del biofilm (densidad, grosor, cantidad y calidad de mucopolisacáridos, materiales atrapados en la matriz) limitan la difusión del metal atenuando en parte la disponibilidad y por tanto la toxicidad del cobre en las algas. Además las algas tienen sus propios mecanismos de inmovilización y detoxificación del cobre (ver capítulo sobre cobre y velocidad). Todo esto nos indica que ante exposiciones en que la estructura de la comunidad algal microbentónica sea levemente afectada (por la baja concentración de tóxico o el corto período de exposición) podremos encontrar afectaciones mayores y valorables en otros niveles del ecosistema.

Los herbívoros tienen un marcado efecto los primeros días del experimento en parámetros fisiológicos (figura 1A) manteniendo unas menores tasas de MNC y de concentración de clorofila, pero hacia el final del experimento consiguen recuperarse y no se dan diferencias entre los tratamientos en ninguno de estos parámetros.

Independientemente de que actúen en presencia o ausencia de cobre, los herbívoros tienen una mayor importancia durante los primeros días. Podemos concluir que el efecto de una densidad de *S. vulnerata* de 59 individuos m<sup>-2</sup> puede provocar caídas en algunos parámetros fisiológicos en los primeros días (por ejemplo concentración de clorofila); pero, tras 13 días de exposición a ambos factores, no se encuentran diferencias entre este tratamiento y el de cobre. Bajo las condiciones experimentales impuestas, la presión de adaptación ejercida por el herbivorismo resultó mucho más importante que la provocada por el cobre.



# USO DE LAS COMUNIDADES ALGALES MICROBENTÓNICAS EN TESTS ECOTOXICOLÓGICOS PARA LA VALORACIÓN DE LA CALIDAD DEL AGUA. EL CASO DEL RÍO TER.

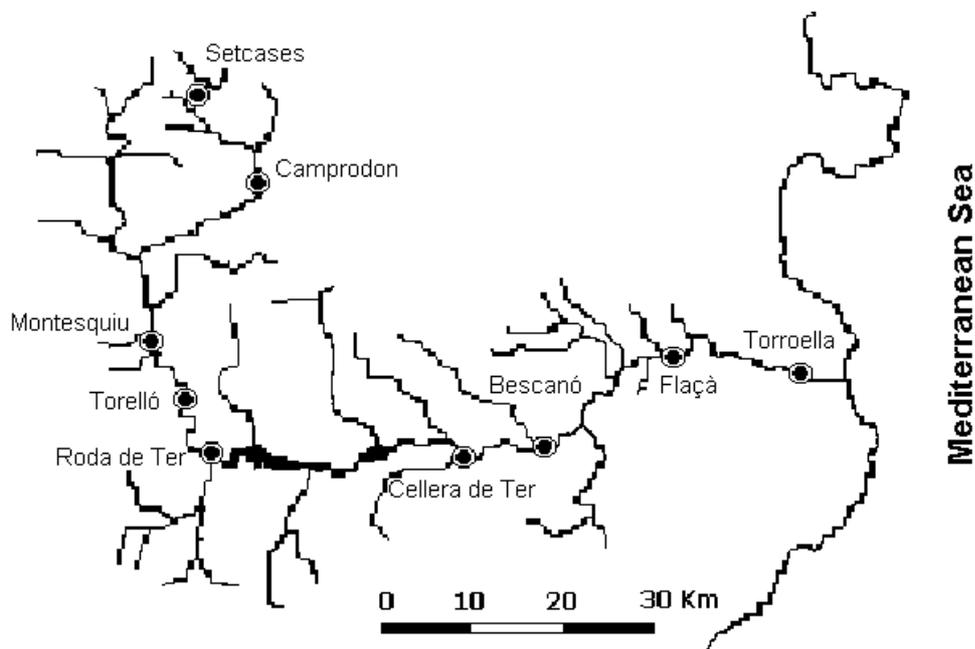
## 5.1. Introducción

La mayor parte de los tests ecotoxicológicos se llevan a cabo en el laboratorio, sobre poblaciones pequeñas y con un número limitado de especies. Los datos obtenidos a partir de estos experimentos aunque nos proporcionan información acerca del efecto de los tóxicos, difícilmente pueden extrapolarse a los sistemas naturales (Cairns and Niederlehner, 1995). Se hace necesario un trabajo complementario con las comunidades naturales (Ivorra *et al.*, 2000). La aparente alta variabilidad encontrada en los tests multiespecíficos puede ser explicada basándonos en el conocimiento de la función ecológica que cumplen los componentes más relevantes de la comunidad (Round, 1991) y de los factores implicados en la variabilidad. Por lo tanto, el usar comunidades naturales de sistemas fluviales ampliamente estudiados no implicará una pérdida de fiabilidad de los tests. La aproximación a escala de comunidad es ecológicamente coherente, ya que integra, además de las tolerancias específicas de todos los taxones presentes en una comunidad (Blanck, 1988), las interacciones entre ellas y sus relaciones con el medio.

Los tests fisiológicos son una herramienta utilizada para valorar la respuesta de comunidades algales frente a tóxicos (Blaylock B.G., 1985). De ese modo este tipo de tests puede complementar la respuesta de las comunidades a largo plazo, cuando la exposición a un tóxico puede producir importantes efectos en la estructura de la comunidad (Paulsson *et al.*, 2000).

Este estudio se ha llevado a cabo en el río Ter, uno de los ríos mediterráneos más humanizados. El Ter es un sistema fluvial bien conocido tanto desde el punto de vista físico-químico como desde el biológico (Caixach *et al.*, 1990, Sabater *et al.*, 1991, Sabater *et al.*, 1995, Espadaler *et al.*, 1997). Se han seleccionado dos tóxicos modelo diferentes, atrazina y cobre, que pueden ser encontrados con facilidad en el río Ter. Estos tóxicos se relacionan con vertidos agrícola-ganaderos e industriales. Las concentraciones basales de atrazina en ríos similares oscilan entre 0.017 y 0.19  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Readman *et al.*, 1993, Solomon *et al.*, 1996). El cobre es un metal pesado que puede llegar a concentraciones de 30-60  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Armengol *et al.*, 1993) en lugares moderadamente contaminados. Las concentraciones de ambos tóxicos pueden llegar a picos varios órdenes de magnitud mayores que los descritos anteriormente (Huber, 1993, van Beelen and Doelman, 1997).

Siendo el Ter un río típico mediterráneo (Sabater *et al.*, 1992), una de sus principales características es la variabilidad temporal. La marcada 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, deberá tener en cuenta esta variabilidad, con muestreos en dos épocas diferentes: la época de caudales mínimos (verano) y la de caudales máximos (primavera). La importancia de la aportación de agua desde la estación anterior es mayor en primavera que en verano. En verano en cambio, la importancia de los aportes de la cuenca propia de cada estación es mayor que la del agua que recibe por la circulación normal desde la estación anterior (Armengol *et al.*, 1990, Armengol *et al.*, 1992). Es de esperar que las mayores diferencias en la calidad del agua en verano provocarán una mayor variabilidad en la respuesta ecotoxicológica de las comunidades.



**Figura 1.** Situación de los puntos del río Ter en que se estudio la respuesta de las comunidades microbentónicas frente al cobre y la atrazina.

El efecto que los embalses del Ter tienen sobre la calidad de las aguas tras su paso por ellos también debería reflejarse en la variabilidad. Los embalses homogeneizan la calidad del agua y laminan sus caudales, haciendo mucho más similares los puntos aguas abajo. Es de esperar una menor variabilidad en la respuesta ecotoxicológica entre puntos tras el paso por los embalses.

Este estudio tiene tres objetivos. Primero; demostrar que una aproximación utilizando tests basados en comunidades, en el marco de un sistema ecológicamente bien descrito y estudiado, es fiable. Segundo; proponer una herramienta que fácil y rápidamente pueda predecir las consecuencias ecológicas de un vertido de tóxico en un punto del sistema fluvial, cuyas características físicas, químicas y biológicas sean conocidas. Tercero; estudiar la variabilidad en la respuesta ecotoxicológica provocada por la marcada estacionalidad del régimen mediterráneo (variación temporal) y el efecto de los embalses (variación espacial).

**Área de estudio.** Diversos puntos a lo largo del río Ter (Fig. 1) fueron analizados en dos períodos diferentes, en verano y en primavera. Los puntos se distribuían entre el nacimiento y la desembocadura, teniendo influencias humanas

muy diferentes (Tabla 1). El Ter tiene una influencia pluvio-nival en su parte alta, pero es marcadamente mediterráneo en su parte baja (Sabater *et al.*, 1995). Una serie de tres embalses, en la parte media del río, constituyen una importante interrupción, afectando tanto a parámetros físico-químicos como a biológicos, aguas abajo (Puig *et al.*, 1987). Los dos períodos muestreados representan las fases de máximo crecimiento algal y revelan marcadas diferencias físico-químicas.

## 5.2. Materiales y métodos

Los sustratos artificiales (cristales matizados de 1.4 cm<sup>2</sup>) se colocaron en soportes de metacrilato y se situaron en los diferentes puntos durante 4 semanas. En cada punto se llevaron a cabo medidas físicas (temperatura, transmitancia de la luz, velocidad del agua) y químicas (pH, oxígeno disuelto) al colocar y retirar los sustratos. Los datos químicos (análisis química del agua, atrazina y cobre) fueron obtenidas de «l'Agencia Catalana de l'Aigua», que rutinariamente analiza el agua en los mismos puntos del estudio.

Los sustratos se situaron evitando aguas estancadas, en zonas donde la velocidad osciló entre 4 cm s<sup>-1</sup> (Roda de Ter, Flaçà) y los 80 cm s<sup>-1</sup> (Setcases, Camprodon). La luz transmitida fue

**Tabla 1.** Características físicas y químicas de los puntos estudiados en la primavera y verano de 1999. Las desviaciones estándar se muestran en cursiva. Algunos de los datos han sido cedidos por la «Agencia Catalana de l'Aigua».

	pH	T <sup>a</sup> °C	Cond (µS cm <sup>-1</sup> )	Sólidos (mg L <sup>-1</sup> )	O <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	DBO <sub>5</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	SRP (mg L <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	TOC (mg L <sup>-1</sup> )
<b>PRIMAVERA</b>										
Setcases	8.14	6.2	78	8	10.3	-	0.102	0.15	0.5	1
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Camprodon	7.98	10	211	13.53	10.42	1.89	0.159	0.483	3.36	1.73
	<i>0.3</i>	<i>1.2</i>	<i>42.43</i>	<i>4808</i>	<i>0.45</i>	<i>0.18</i>	<i>0.065</i>	<i>0.375</i>	<i>1.46</i>	<i>0.17</i>
Montesquiu	8.42	10.3	219.8	7.93	11.18	2.23	0.139	0.138	3.31	1.08
	<i>0.32</i>	<i>0.6</i>	<i>38.42</i>	<i>0.66</i>	<i>0.12</i>	<i>0.14</i>	<i>0.027</i>	<i>0.049</i>	<i>1.7</i>	<i>0.02</i>
Torelló	8.02	12.3	334.7	24.57	10.67	4.44	0.316	0.236	3.22	2.14
	<i>0.25</i>	<i>0.9</i>	<i>15.56</i>	<i>2498</i>	<i>0.33</i>	<i>1.9</i>	<i>0.052</i>	<i>0.122</i>	<i>0.51</i>	<i>0.17</i>
Roda de Ter	7.9	13.2	633.2	24.23	9.58	6.6	0.279	2.626	2.86	4.46
	<i>0.26</i>	<i>0.5</i>	<i>46.9</i>	<i>5987</i>	<i>0.4</i>	<i>2.24</i>	<i>0.08</i>	<i>0.586</i>	<i>2.43</i>	<i>1.25</i>
Cellera de Ter	7.94	8.7	514.8	3.4	9.87	2	0.342	0.57	8.89	2.98
	<i>0.39</i>	<i>0.8</i>	<i>52.56</i>	<i>0.094</i>	<i>0.57</i>	<i>0</i>	<i>0.301</i>	<i>0.66</i>	<i>5.71</i>	<i>0.45</i>
Bescanó	7.58	12.3	535.3	14.8	10.5	2.11	0.15	0.138	7.5	2.31
	<i>0.11</i>	<i>2.5</i>	<i>79.67</i>	<i>11879</i>	<i>0.05</i>	<i>0.7</i>	<i>0.041</i>	<i>0.065</i>	<i>1.76</i>	<i>0.11</i>
Flaçà	7.63	18	729.3	36	38.85	4.42	0.536	0.443	11.43	2.99
	<i>0.55</i>	<i>0.5</i>	<i>116</i>	<i>35261</i>	<i>39.29</i>	<i>0.88</i>	<i>0.181</i>	<i>0.031</i>	<i>2.42</i>	<i>0.48</i>
Torroella	7.76	18.6	737.2	68.63	50.8	3.94	0.422	0.239	11	3.49
	<i>0.86</i>	<i>0.7</i>	<i>134.1</i>	<i>44831</i>	<i>56.33</i>	<i>1.93</i>	<i>0.052</i>	<i>0.043</i>	<i>2.79</i>	<i>0.44</i>
<b>VERANO</b>										
Setcases	8.14	10	80	8	10.3	-	0.11	0.4	0.3	1
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Camprodon	8.13	15.7	273.7	12.13	8.5	2.23	0.782	0.648	2.08	1.34
	<i>0.15</i>	<i>1.4</i>	<i>-</i>	<i>4525</i>	<i>1.46</i>	<i>0.69</i>	<i>1084</i>	<i>0.333</i>	<i>0.45</i>	<i>0.48</i>
Montesquiu	8.43	15.8	264.7	13.07	9.22	2.83	0.181	0.245	1.9	0.92
	<i>0.15</i>	<i>1.1</i>	<i>-</i>	<i>6788</i>	<i>1.25</i>	<i>1.18</i>	<i>0.079</i>	<i>0.167</i>	<i>1.08</i>	<i>0.16</i>
Torelló	8.19	19.7	334.7	59.27	7.93	4.78	0.266	0.223	2.57	1.86
	<i>0.2</i>	<i>1.9</i>	<i>-</i>	<i>2923</i>	<i>2.03</i>	<i>1.84</i>	<i>0.049</i>	<i>0.113</i>	<i>1.56</i>	<i>0.47</i>
Cellera de Ter	7.63	14.6	544.7	3.73	9.25	3	0.39	0.193	11.7	2.33
	<i>0.08</i>	<i>5.6</i>	<i>-</i>	<i>1886</i>	<i>1.77</i>	<i>1.41</i>	<i>0.533</i>	<i>0.132</i>	<i>2.4</i>	<i>0.75</i>
Flaçà	7.74	22.7	796.3	12.33	8.74	3.55	0.392	0.408	9.12	2.62
	<i>0.17</i>	<i>1</i>	<i>-</i>	<i>0.283</i>	<i>0.04</i>	<i>0.47</i>	<i>0.129</i>	<i>0.067</i>	<i>0.16</i>	<i>0.4</i>

estimada con un sensor sumergible, como la diferencia entre la luz en la superficie del agua y los sustratos.

Una vez se hubo completado la colonización, los cristales fueron transportados al laboratorio (el período máximo de transporte fue de 2 horas), separando los cristales necesarios para el análisis de la comunidad (2 vidrios), clorofila (5 vidrios), y tests ecotoxicológicos. El análisis de la comunidad consistió en la identificación de los taxones, enumeración (usando la técnica de Uthermöl's tras sonicar los sustratos (Sabater, 1988)) y estimación del biovolumen (Muñoz *et al.*, 2000). Se calculó el índice de diversidad de Shannon-Wiener (Shannon and Weaver, 1963) utilizando los contajes de células. La clorofila fue estimada mediante extracción con acetona (90%) y medidas espectrofotométricas (Jeffrey and Humphrey, 1975). Para los tests

ecotoxicológicos se siguió un protocolo diferente para cada tóxico. Para el cobre, es necesario un período largo de incubación, y los cristales se colocaron en canales artificiales (Navarro *et al.*, 2000). Se utilizó agua de los mismos puntos del río, y se utilizó un sistema de recirculación durante 4 horas. Los valores de temperatura y pH del agua se mantuvieron en torno a los del río ( $\pm 1$  °C mediante un refrigerador;  $\pm 0.01$  pH mediante adición de HCl al 0.5 %). Mantener el pH constante era especialmente importante, para preservar la especiación del metal en las mismas condiciones que se darían en el río. Se utilizaron ocho canales, uno para el control y 7 con concentraciones crecientes de cobre. Para cada concentración se utilizaron 5 réplicas (cristales). Para la incubación de atrazina (1 hora) se utilizaron 7 recipientes de vidrio para las concentraciones de atrazina y 1 para el control. En ambos tests se utilizaron como fuentes de luz lámparas

	Chl-a	S-W	Densid.	Biovol.	%Fil	%Inc	%Pos	%Pla	%Ped
<b>PRIMAVERA</b>									
Setcases	0.47	3.19	8.51E+05	5.41E+08	6.5	63.9	23.9	0.0	5.8
Camprodon	4.42	1.58	4.84E+06	6.00E+08	65.4	27.4	6.1	0.0	1.0
Montesquiu	14.15	2.99	7.91E+06	1.65E+09	43.3	14.2	27.5	0.0	15.0
Torelló	1.23	2.03	1.76E+06	6.21E+08	63.8	1.3	25.0	0.0	10.0
Roda de Ter	1.06	3.29	4.50E+05	4.66E+08	24.4	9.8	58.5	2.4	4.9
Cellera de Ter	2.82	2.70	2.70E+06	3.01E+09	13.0	0.0	82.9	0.0	4.1
Bescanó	0.64	2.38	2.90E+06	2.18E+10	15.2	0.0	77.3	0.0	7.6
Flaçà	1.84	2.95	5.27E+05	5.70E+09	16.7	0.0	66.7	12.5	4.2
Torroella	1.34	2.68	5.93E+05	8.76E+08	0.0	0.0	77.8	14.8	7.4
<b>VERANO</b>									
Setcases	1.02	3.28	8.79E+05	2.43E+08	15.0	15.0	60.6	0.0	9.4
Camprodon	4.59	3.25	2.29E+06	7.72E+08	31.0	16.9	48.6	0.0	3.5
Montesquiu	7.99	1.55	7.87E+06	6.73E+08	78.4	9.8	10.9	0.0	1.0
Torelló	0.84	3.49	3.41E+06	8.47E+08	30.0	29.2	26.2	7.3	7.3
Cellera de Ter	6.42	3.19	2.34E+06	6.91E+09	12.5	0.0	84.4	0.0	3.1
Flaçà	2.81	2.29	1.03E+06	2.78E+08	3.2	26.6	67.0	3.2	0.0

**Tabla 2.**

Chl-a) Concentración de clorofila-a en  $\mu\text{g cm}^{-2}$ ; S-W) Índice de Shannon-Wiener; Densid.) Densidad de células por  $\text{cm}^2$ ; Biovol.) Biovolumen algal en  $\mu\text{m}^3$ . También se incluyen los porcentajes de las diferentes formas vitales sobre el biovolumen total; filamentosas (Fil), incrustantes (Inc), pos-tradas (Pos), planctónicas (Pla), pedunculadas, (Ped).

halógenas ( $\pm 110 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  en la superficie de los sustratos).

Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo sobre el perifiton vivo. El rendimiento fotónico fue utilizado como descriptor del efecto tóxico, midiéndose una vez finalizadas las incubaciones. El rendimiento fotónico (descrito como el cociente entre  $(F_m' - F)/F_m'$ , (Falkowski and Raven, 1997)) se midió utilizando un fluorímetro de pulsos de amplitud modulada (PAM). Esta es una técnica limpia y no destructiva. El rendimiento fotónico en condiciones de equilibrio de luz y temperatura es proporcional a la tasa fotosintética (Hofstraat *et al.*, 1994). Las medidas se utilizaron para estimar la concentración efectiva que reducía el rendimiento fotónico al 50% ( $EC_{50}$ ) y al 10% ( $EC_{10}$ ). Estos parámetros fueron calculados a partir de una interpolación log-lineal, dando el rendimiento fotónico de las muestras expuestas al tóxico correspondiente como porcentaje de la actividad media de los controles (que correspondía siempre al 100%).

Las relaciones entre los datos ecotoxicológicos, biológicos y ambientales fueron analizadas utilizando Análisis de Correlación de Pearson. Para estudiar la variabilidad espacial y temporal se calculó la varianza de las  $EC_{50}$  normalizadas. La normalización se llevó a cabo del modo propuesto por Sabater y otros (1989):

$$\text{Valor normalizado} = (EC_{50} \text{ punto} - EC_{50} \text{ mínima}) / (EC_{50} \text{ máxima} - EC_{50} \text{ mínima})$$

Los valores de  $EC_{50}$  obtenidos en cada época quedan comprendidos entre 0 y 1, siendo 0 el menor valor y 1 el máximo. De este modo podremos comparar las varianzas entre diferentes épocas y entre diferentes tóxicos.

### 5.3. Resultados

**Características físico-químicas.** El río Ter muestra un ordenamiento longitudinal remarcable en la concentración de sustancias iónicas (Tabla 1). La conductividad incrementa aguas abajo en varios órdenes de magnitud. Los embalses situados en su tramo medio son los responsables de la alteración de este patrón (Tabla 1) que afecta también a los sólidos en suspensión (TSS). Los sólidos presentan una concentración máxima en los puntos anteriores a los embalses y en los localizados cerca de la desembocadura, siendo menores aguas debajo de los embalses. Las concentraciones más elevadas de nutriente se encuentran en la desembocadura y en el punto anterior a los embalses (entre  $422\text{-}540 \mu\text{g L}^{-1}$  de fósforo reactivo soluble -SRP- y entre  $8\text{-}12 \text{ mg L}^{-1}$  de nitratos).

Las medias basales de cobre (cuando son detectables) en el período estudiado oscilan entre  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  (cerca del límite de detección, en Bescanó) y  $4.5 \mu\text{g L}^{-1}$  (Roda de Ter, justo antes

**Tabla 3.** Correlaciones significativas ( $p < 0.05$ ) entre las EC de cobre y atrazina y diversos parámetros físicos, químicos y biológicos.

	EC <sub>50</sub> Cu	EC <sub>10</sub> Cu	EC <sub>50</sub> Atr	EC <sub>10</sub> Atr
Altura sobre el nivel del mar	-	-	0.73	-
Biovol. de postradas	-	0.84	-	-
Biovol. planctónicas	-	0.55	-	-
Biovolumen algal	-	0.95	-	-
<i>Cocconeis placentula</i>	-	-	0.55	-
Chlorofila- <i>a</i>	0.87	-	-	0.95
Densidad algal	-	0.55	0.68	-
Flujo de agua	-	-	-0.68	-
<i>Gomphonema minutum</i>	-	-	0.60	-
<i>Gongrosira</i> sp.	-	-	0.69	-
Máximo rendimiento fotonico	0.93	-	-	-
<i>Navicula radiosa</i>	0.54	-	-	-
Número de cianobacterias	0.93	-	-	-
Número de filamentosas	0.96	-	-	-
Número de pedunculadas	0.91	-	-	-
<i>Oscillatoria limosa</i>	-	-	0.65	-
pH	-	0.71	-	-
Sólidos en suspensión	-0.73	-	-	-
<i>Spirulina</i> sp.	-	-	0.72	-
SRP	-	-	0.61	-

de los embalses). La atrazina oscila entre 0.004  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Montesquiu) a 0.03-0.08 (Roda de Ter y desembocadura).

**Estructura de la comunidad.** La mayor concentración de clorofila-*a* se encontró durante la primavera (Tabla 2). Los valores mínimos durante este período pertenecen a los puntos de cabecera, mientras que los máximos se encontraron antes de los embalses. En verano, las diferencias entre puntos fueron mayores (Tabla 2).

Las diatomeas fueron el grupo algal dominante en todos los puntos. El biovolumen ocupado por este grupo varió entre el 87 y el 95% del total. La forma vital dominante fue diferente, dependiendo del punto y del período (Tabla 2). Las formas incrustantes fueron las dominantes en los puntos de cabecera durante la primavera. Las formas filamentosas representaron la mitad del biovolumen en los tramos medios, por encima de los embalses. Las postradas son las dominantes a partir de los embalses. Esta dominancia es más evidente en verano. Finalmente, las planctónicas aparecen principalmente en los tramos cercanos a la desembocadura.

La media del índice de diversidad de Shannon-Wiener es similar para ambos períodos. Pero la variación entre puntos es mucho mayor en verano. También se observa que la variación entre puntos es mucho mayor antes que después de los embalses (Tabla 2).

**Tests ecotoxicológicos.** La EC<sub>50</sub> para ambos tóxicos está indicada en la Tabla 4. En general

la tolerancia frente al cobre fue menor en primavera que en verano. La EC<sub>50</sub> del cobre en primavera osciló entre 20 y 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ , mientras que en verano los valores más comunes oscilaron entre 100 y 350  $\mu\text{g L}^{-1}$ . En primavera los puntos de cabecera (Camprodon) (16  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) y Montesquiu (115  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), fueron los más sensibles. Este último volvió a ser el más tolerante en verano, con una EC<sub>50</sub> un orden de magnitud mayor que en primavera (1557  $\mu\text{g L}^{-1}$  Cu).

La toxicidad de la atrazina también fue diferente en ambos períodos. Las comunidades presentaron mayores tolerancias en verano que en primavera. En primavera los valores más frecuentes de EC<sub>50</sub> oscilaron entre 6 y 9  $\mu\text{g L}^{-1}$  de atrazina, mientras que en verano el rango corriente de valores se encontraba entre 30 y 70  $\mu\text{g L}^{-1}$  de atrazina. Los valores más altos de tolerancia se encontraron siempre en puntos de cabecera, con valores de entre 47-112  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

**Análisis de correlación.** Las relaciones entre los parámetros ecotoxicológicos y el resto de variables se estudiaron profundamente mediante un análisis de correlación de medias. Entre las variables químicas, el pH estaba relacionado con la EC<sub>10</sub> de cobre, y el SRP con la EC<sub>50</sub> de atrazina (Tabla 3). La EC<sub>50</sub> y la EC<sub>10</sub> se relacionaron principalmente con parámetros vinculados con la biomasa y diferentes formas vitales (Tabla 3). La clorofila-*a* se correlacionó significativamente con la EC<sub>50</sub> de cobre y la EC<sub>10</sub> de atrazina. También se encontraron correlaciones significativas entre el número de células de algas filamentosas y pedunculadas, de

Puntos	EC <sub>50</sub> atr	EC <sub>50</sub> Cu	Vertido atr % efec.	Vertido Cu % efec.
PRIMAVERA				
Setcases	47,446	-	0.6	-
Camprodon	4,4534	16,7	-72.0	-25.3
Montesquiu	9,9974	115,0	-50.0	2.6
Torelló	8,8919	22,4	-55.3	-13.2
Roda de Ter	7,6097	18,3	-59.7	-13.1
Cellera	9,4855	26,2	-52.6	-21.0
Bescanó	7,9782	27,4	-56.5	-0.3
Flaçà	7,7549	29,3	-57.7	-9.1
Torroella	6,5196	53,6	-61.3	22.3
VERANO				
Setcases	55,131	281,32	-25.3	-18.8
Camprodon	112,02	349,75	-15.9	-0.1
Montesquiu	48,94	1558	-28.3	2.4
Torelló	36,2	95,397	-31.5	-19.8
Cellera	76,2	321,89	-16	1.3
Flaçà	32,0	106,62	-34.9	8.2

Tabla 4.

EC<sub>x</sub>) Concentraciones efectivas de cobre y atrazina, en µg L<sup>-1</sup>, que afectan en un 50% al rendimiento fotónico de las comunidades del Ter. También se indica el efecto que un vertido de atrazina o cobre tendrá sobre esas comunidades. Se indica como el porcentaje de descenso (negativo) o incremento (positivo) en la tasa fotosintética tras un vertido que provoque una exposición de 3 horas a 10 µg L<sup>-1</sup> de cobre o 1 h a 10 µg L<sup>-1</sup> de atrazina. Los valores se han calculado a partir de la relación log-linear entre fotosíntesis y concentración de clorofila.

cianobacterias con la EC<sub>50</sub> de cobre (Tabla 3). Algunos taxones de cianobacterias y algas mostraron correlaciones significativas con las EC<sub>50</sub> de cobre y atrazina.

**Variabilidad espacial y temporal.** La varianza obtenida para el conjunto de las EC<sub>50</sub> (incluyendo las de atrazina y cobre) en primavera fue de 0.097, un poco menor que la de verano, 0.131. Para antes de los embalses se calculó una desviación de 0.162, mucho mayor que la calculada para los puntos aguas abajo de los embalses, 0.025. El desglose por períodos y épocas se detalla en la Tabla 5.

#### 5.4. Discusión

El patrón observado en la respuesta ecotoxicológica de las comunidades algales microbentónicas en el río Ter difiere según el período estudiado. Las comunidades desarrolladas en primavera son más sensibles que las desarrolladas en verano (Tabla 4). Estas diferencias son consecuencia de factores ambientales y biológicos que deberán ser tenidos en cuenta a la hora de interpretar los resultados de este

tipo de tests en comunidades naturales.

Entre los factores ambientales, el caudal (alto en primavera, bajo en verano) pudo causar las diferencias observadas en el patrón espacial. Las diferencias entre los dos períodos se relacionan con la dilución: mientras que el mayor flujo de agua en primavera minimiza las diferencias entre puntos (Sabater *et al.*, 1991), el período seco del verano provoca una mayor variabilidad entre ellos. Las diferencias en este período se relacionan con una menor precipitación (especialmente en el tramo bajo), lo que determina que las características del agua dependan en mayor medida de los aportes locales. Así pudimos observar que la varianza de la respuesta ecotoxicológica de las comunidades era mayor en verano (0.131) que en primavera (0.097). Esto confirmó nuestra hipótesis de partida. La importancia de la homogeneización de las características del agua en la respuesta de las comunidades puede observarse también a escala espacial, con el efecto de los embalses. La varianza es mucho mayor antes de los embalses (0.162) que después (0.025).

A causa de la estratégica situación de los embalses, en el tramo medio del río (Sabater *et al.*,

**Tabla 5.**  
Detalle de los cálculos de la varianza calculada con los valores normalizados de las EC<sub>50</sub> de los puntos del río Ter. Se observa un mayor efecto de los embalses que del tiempo.

	Primavera	Verano	Variación espacial
Antes de los embalses	0.175	0.165	<b>0.162</b>
Después de los embalses	0.010	0.066	<b>0.025</b>
<b>Variación temporal</b>	<b>0.097</b>	<b>0.131</b>	

1995) éstos actúan como reguladores de la concentración de nutrientes, de contaminantes, de sólidos en suspensión y del caudal del río sobre los tramos inferiores (Armengol *et al.*, 1990). El cobre, por ejemplo, pasa de una concentración de 0.0045 µg L<sup>-1</sup> a niveles no detectables después de los embalses. Los mecanismos implicados en la desaparición del cobre serían la sedimentación del material en suspensión y la actividad fotosintética.

Los sólidos totales en suspensión afectan a la disponibilidad del cobre a causa de su capacidad de adsorber y complejarse con él (McKnight and Morel, 1979, Stumm and Morgan, 1981). Aunque parezca una contradicción, la correlación negativa entre las EC<sub>50</sub> de cobre y la concentración de material en suspensión puede explicarse en el marco de la discusión anterior. Los sólidos en suspensión serían capaces de proteger a las comunidades, complejando parte del cobre libre y reduciendo la concentración biodisponible en el agua. De este modo, estas comunidades estarían menos expuestas al cobre, siendo pues más sensibles que las otras, más expuestas (PICT concept) (Blanck and Wängberg, 1988).

El otro mecanismo implicado en la reducción de la concentración de cobre estaría ligado a la actividad fotosintética del plancton. En el estudio de Xue y Sigs (Xue and Sigg, 1990) se demuestra que los valores más bajos de concentración de cobre libre, se obtienen coincidiendo con máximos de actividad fotosintética (máximas condiciones alcalinas) en un embalse eutrófico. Este efecto explicaría tanto la correlación obtenida entre la EC<sub>50</sub> de cobre y el valor máximo de rendimiento fotónico obtenido en cada punto (Tabla 3) como la encontrada entre la EC<sub>10</sub> de cobre con el pH; a mayores tasas fotosintéticas mayores condiciones alcalinas y menor toxicidad del cobre. A menores pH la biodisponibilidad y toxicidad del cobre incrementa, ya que crece la proporción de cobre libre -Cu<sup>+2</sup>- (Stadorub *et al.*, 1987), una de las formas más tóxicas del metal (Sunda and

Guillard, 1976, Anderson and Morel, 1978). Existe otro efecto indirecto sobre la respuesta ecotoxicológica de las comunidades algales, provocado por los nutrientes. La concentración de estos difiere de un modo remarcable entre primavera y verano y entre aguas arriba y debajo de los embalses (Tabla 1) (Sabater *et al.*, 1995). Con seguridad podemos decir que la mayor disponibilidad de nutrientes en unos puntos determinó una mayor biomasa, densidad algal y composición de la comunidad (Biggs, 1995, Guasch *et al.*, 1995, Dodds *et al.*, 1997). Éste fue el motivo que provocó que los parámetros relacionados directamente con la biomasa se correlacionaran significativamente con las EC<sub>50</sub> y EC<sub>10</sub> de cobre y atrazina (Tabla 3). Esta relación puede estar vinculada a la influencia que el acúmulo de biomasa tienen sobre la disponibilidad de luz, nutrientes y otras sustancias disueltas (Hill and Knight, 1988, Mulholland *et al.*, 1995, Steinman *et al.*, 1995). Se sabe que la penetración de los metales en los biofilms está limitada por su grosor, que depende del acúmulo de biomasa (Admiraal *et al.*, 1999, Ivorra *et al.*, 2000). También los exudados de polisacáridos son capaces de adsorber eficientemente metales, reduciendo su penetración en la célula (Decho, 1990, Ivorra *et al.*, 2000).

Los factores ambientales, en coincidencia o no con los nutrientes, tienen una gran importancia en la respuesta toxicológica global de las comunidades algales. Un ejemplo: la mínima toxicidad de la atrazina observada en Setcases y otros puntos de cabecera del Ter (Tabla 4) está relacionado, seguramente, con la menor disponibilidad de luz (debido a la sombra producida por unos bosques de ribera más desarrollados y mejor conservados) y a la subsiguiente respuesta fisiológica de la comunidad. Varios trabajos de laboratorio y campo indican que la toxicidad de la atrazina se relaciona con la fotoadaptación a bajas intensidades lumínicas, provocando un descenso en el efecto tóxico en concordancia

con el incremento de carotenoides y otros pigmentos accesorios (Millie *et al.*, 1992, Guasch and Sabater, 1998).

Entre los factores biológicos encontramos la composición de las comunidades. A pesar de que la densidad de cianobacterias se relaciona con la  $EC_{50}$  de cobre (Tabla 3), el único taxón correlacionado positivamente con este parámetro ecotoxicológico fue la diatomea *Navicula radiosa*, una diatomea común en el tramo medio del Ter (Sabater *et al.*, 1991). Se ha descrito una mayor tolerancia de las cianobacterias frente a metales pesados como el zinc (Whitton *et al.*, 1981, Say and Whitton, 1982), pero no son corrientes en ambientes contaminados con cobre (Leland and Carter, 1984). En un experimento a largo plazo (Soldo and Behra, 2000) se determinó que la exposición a altas concentraciones de cobre (5  $\mu\text{M}$ ) causaba un cambio de dominancia en la comunidad en perjuicio de las cianobacterias y a favor de las clorofíceas. En el mismo experimento las diatomeas mantuvieron una proporción similar tanto bajo las concentraciones más elevadas de cobre como en las condiciones control. Takamura (Takamura, 1989), midiendo el efecto del cobre sobre la fotosíntesis, determinó también la alta sensibilidad de las cianobacterias frente al cobre, así como la mayor tolerancia de las clorofíceas y algunos taxones de diatomeas. La toxicidad de la atrazina también se correlaciona con una mayor proporción de cianobacterias, clorofíceas y diatomeas (Tabla 3). Las comunidades de diatomeas son en general más tolerantes que las dominadas por clorofíceas (Goldsborough and Robinson, 1987, Guasch and Sabater, 1998), que son entre 8 y 10 veces más sensibles (Tang *et al.*, 1998). Tres de las comunidades más sensibles a la atrazina estaban dominadas por clorofíceas (Bescanó, Flaçà y Torroella), mientras que el lugar menos sensible tenía una baja proporción de este grupo. Hay algunas especies de diatomeas ligadas a sistemas acuáticos de zonas mineras, ricas en cobre: *Scenedemus sp.*, *Oedogonium sp.*, *Ulothrix sp.*, *Achnanthes minutissima*, *Cymbella minuta*, *Nitzschia palea*, *Synedra ulna* (Douglas, 1998). El punto más sensible de nuestro experimento, Camprodón en primavera, es el que menor número de células pertenecientes a estas especies presenta (3.3%). Otra de las correlaciones positivas halladas ha sido entre las  $EC_{50}$  de cobre y el número de cianofíceas. Esta observación concuerda con las

de otros estudios similares (Fiore and Trevors, 1994), en que se observa una mayor tolerancia de ciertas cianobacterias frente al cobre. Algunos de los mecanismos propuestos pueden ser los sistemas de protección, basados en proteínas queladoras de los que disponen (Fiore and Trevors, 1994).

En cuanto a posibles interacciones entre ambos tóxicos, a las concentraciones encontradas en nuestros sistemas naturales, no parecen presentar ningún tipo de interacción (Roberts, 1990). El cobre actúa a nivel de toda la biota, mientras que la atrazina es altamente específica de las células fotosintéticas. También podemos destacar que mientras que las  $EC_{50}$  de atrazina oscilan entre 6.5 y 112  $\mu\text{g L}^{-1}$  (variación de 17 veces), las de cobre oscilan entre 16.7 y 1558 (variación de 93 veces). La explicación podría estar relacionada tanto con el mecanismo de acción como con el de penetración en las células. Mientras que la atrazina afecta específicamente a la fotosíntesis y tiene pocos problemas para llegar a todas las células de la comunidad, el cobre se encuentra con varios problemas, descritos en párrafos siguientes, además su mecanismo de acción es menos específico, por lo que la cantidad de biomasa influirá notablemente en el efecto que tendrá sobre la comunidad, mientras que la toxicidad de la atrazina no se verá tan afectada por ese factor. Cabe resaltar que mientras que la toxicidad del cobre se ve afectada por las variaciones de pH, éstas no parecen alterar al efecto de la atrazina (Roberts, 1990). La comparación entre las conclusiones derivadas de las comunidades naturales de este estudio y las conclusiones obtenidas bajo condiciones más controladas de laboratorio o mesocosmos (de los trabajos citados) muestra una gran coherencia. Los tests que se basen en el uso de comunidades naturales, de sistemas fluviales bien conocidos, estarán más próximos a la realidad ecológica de los sistemas naturales (Cairns and Niederlehner, 1987). Esta conclusión los convierte en una valiosa herramienta para la valoración de riesgos ambientales. La expresión empírica obtenida al calcular la  $EC_{50}$  o la  $EC_{10}$  puede ser utilizada para estimar el efecto que una concentración de tóxico tendrá sobre un parámetro ecotoxicológicamente relevante.

En el caso del Ter, he descrito dos escenarios que pueden afectar al rendimiento fotónico. El primer escenario es realista considerando el

marco del presente estudio; las concentraciones de cobre y atrazina encontradas en el río Ter. Se describe el efecto que una exposición a  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de cobre durante 3 horas tendría sobre las comunidades algales microbentónicas del río. El segundo explora la respuesta a una exposición a una concentración alta de atrazina ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de atrazina durante 1 hora) (Huber, 1993), que aunque no ha sido nunca registrada en el Ter, es posible encontrarla en otros ríos (Solomon *et al.*, 1996). Por tanto, la adaptación a esta concentración de cobre podrá darse en algunos de los puntos estudiados, pero no ocurrirá así en el caso de la atrazina.

Se dan diversos tipos de respuesta en cada escenario. Mientras que algunas comunidades son afectadas sólo ligeramente por el hipotético vertido, otras muestran importantes caídas en su tasa fotosintética; otras incluso exhiben un moderado incremento de la actividad (Tabla 4). En el caso de la atrazina, el efecto sobre la tasa fotosintética es devastador en la mayor parte de los casos, especialmente en primavera. En el caso del cobre y debido a la baja concentración testada, se provocan ligeros descensos (sobre el 20 % en algunos puntos).

Podemos concluir que el uso de los tests fisiológicos resulta adecuado cuando nuestro objetivo sea el de valorar a priori las consecuencias que el vertido de un producto tóxico tendrá sobre el sistema fluvial, prediciendo la intensidad e irreversibilidad de los efectos. Mas aún, una de las informaciones que proporcionan estos tests (el clasificar las comunidades en función de su tolerancia frente a determinada concentración de tóxico), puede contribuir a planear soluciones ante accidentes y problemáticas medioambientales.



# FOTOGRAFÍAS



**Foto 1.** El primero de los puntos de trabajo se situaba cerca del nacimiento del río Ter en Setcases, en pleno Pirineo. Las características de este tramo son las típicas de los ríos de alta montaña: bajo caudal, velocidades de la corriente elevadas, altos porcentajes de oxígeno, concentraciones bajas de nutrientes y una muy baja o nula influencia humana. En este punto los soportes se colocaron en zonas de corriente cercanas a la orilla y sujetos a piedras en los que se había practicado un taladro y fijado un cáncamo. A pesar de que resultaban prácticamente invisibles, en uno de los muestreos nos resultó imposible realizar la dosis-respuesta debido a la desaparición del soporte, seguramente retirado por algún turista o pescador. Este incidente evidencia el hecho de perder un mes de trabajo, por la simple curiosidad de la gente. Este tipo de accidentes deberían tenerse en cuenta a la hora de planificar y diseñar experimentos de campo.



**Fotos 2 y 3.** El siguiente punto aguas abajo de Setcases era Camprodón (Foto 2). El punto se situaba antes de la entrada del río en la citada ciudad, en una zona de poca profundidad, con fondo de guijarros y velocidad elevada. El soporte se colonizó cerca de la orilla. Las rocas estaban colonizadas principalmente por diatomeas. El punto siguiente era Montesquiu. Se encontraba aguas abajo del pueblo del mismo nombre, en una zona donde el río se extendía por diversos brazos separando una serie de islas, que en temporada de aguas altas quedan cubiertas. El soporte se situaba en uno de los brazos con una corriente moderada.



**Fotos 4 y 5.** El siguiente punto, aguas abajo de Camprodón era Torelló (Foto 4). Se situaba en la entrada del pueblo en una zona de poca profundidad, donde el agua circulaba sobre losas y con baja velocidad. El caudal sigue siendo bajo. El soporte se colonizó cerca de la orilla, en una zona donde el agua discurría con cierta velocidad. En este punto el cauce y orilla comenzaban a acusar las actividades humanas, con presencia de residuos de todo tipo. El punto siguiente era Roda de Ter, a la salida del pueblo y en la última represa antes de entrar en el embalse de Sau. Era la zona más polucionada. El agua era de color gris y la colonización sobre los soportes fue la menor de todos los puntos estudiados. Los soportes se situaron cerca de la orilla y de la superficie, ya que dadas las características del agua, la luz apenas penetraba en la columna de agua.



**Fotos 6 y 7.** Tras el sistema de embalses de Sau, Susqueda y Pasteral, encontramos el siguiente punto, Celler de Ter (Foto 6), situado muy próximo a la salida del último de los embalses. El caudal aquí sufría fuertes oscilaciones dependiendo de las salidas del embalse. El soporte se situó en uno de los brazos con mayor caudal para evitar que se pudiera quedar en seco. Es uno de los puntos del tramo medio del río con una mejor conservación de los márgenes y del cauce del río desde el punto de vista del paisaje. El punto siguiente es Bescanó, antes del paso del río por el pueblo del mismo nombre. Es una zona donde el río se divide en numerosos brazos, de poca profundidad, con lecho de cantos y gravas gruesas. El caudal presenta fuertes oscilaciones, modificando la morfología del cauce. En la foto se muestra uno de estos momentos (en que abren compuertas en los embalses), en que se inundan parte de de las islas delimitadas por los brazos, sumergiendo numerosos macrófitos.



**Fotos 8 y 9.** El penúltimo punto es Flaçà (Foto 8). Aquí el río pasa por debajo de un puente, a través de tuberías. El caudal es ya muy elevado y el soporte se colocó en la salida de una de las tuberías, sobre una losa de roca. El cauce del río en estos puntos finales del recorrido es muy ancho (entre 60 y 80 m). El agua circula a velocidades muy bajas. En el último punto (Foto 9) en Torroella de Montgrí la baja velocidad junto con el elevado caudal permite la acumulación de algas flotantes en grandes cantidades, lo que no impidió el crecimiento de perifiton sobre nuestro soporte. Los márgenes del río en estos dos puntos se encuentran profundamente humanizados, siendo lo más común encontrar campos de cultivo.



# LA RESPUESTA ECOTOXICOLÓGICA EN CONDICIONES EXTREMAS. EL CASO DEL RIO TINTO

## 6.1. Introducción

Sólo una ínfima proporción de los ecosistemas acuáticos continentales son extremadamente ácidos, presentando unos pH por debajo de 3.5. La mayor parte de estos ecosistemas se han originado como consecuencia de los ácidos minerales que se incorporan al agua de modo natural (zonas volcánicas, drenado de cuencas metalíferas) o por acción del hombre mediante explotaciones mineras. Estas explotaciones mineras de metales representan importantes fuentes de contaminación para las aguas continentales. La falta de una legislación proteccionista hasta fechas recientes ha provocado profundas alteraciones en el medio cercano a este tipo de explotaciones (Chapman *et al.*, 1983, Jacobson and Sparksman, 1988, Wood, 1991, Lottermoser *et al.*, 1997, Lottermoser *et al.*, 1999). Este tipo de ambientes se encuentran por todo el planeta y aunque presentan una gran variabilidad química, dependiendo del origen de los ácidos (Gross, 2000), sus comunidades biológicas presentan similitudes (DeNicola, 2000). Estas comunidades biológicas están compuestas por un puñado de invertebrados, briófitos, algas, hongos y bacterias (Schwartz and Schwartz, 1965, Brock, 1978, Albertano, 1995, DeNicola, 2000) que han logrado adaptarse. Algunas de las algas presentes se encuentran en los límites de su rango de tolerancia de pH, siendo habituales en todo tipo de medios, mientras que otras son exclusivas de ambientes ácidos (DeNicola, 2000). Algunos de estos hongos incluso ven inhibido su crecimiento a pH cercanos a la neutralidad (Campbell and Stokes, 1985).

El río Tinto tiene una longitud de 92 Km. y una cuenca de 1.676 Km<sup>2</sup>. Drena en su cabecera (37°43'30" N 6°33'44" W) una cuenca metalífera (Franja Pirítica del Sur-Oeste Ibérico) que lleva siendo explotada por el hombre desde tiempos anteriores a la colonización romana (culturas Tartessa y Fenicia, del 3000 al 1000 A.C.). Hasta los siglos XVIII y XIX hubo una explotación constante pero siempre a pequeña escala. A partir de 1830 se introdujeron nuevos procesos (las teteras) que incrementaron el rendimiento de la extracción de minerales, a costa del medio ambiente. Los vapores sulfurosos producidos por estos métodos contribuyeron a una rápida degradación del entorno. La elección de este río se basa en sus peculiaridades, ya que al drenar una cuenca rica en yacimientos minerales sulfurados y explotados a cielo abierto, presenta un pH marcadamente ácido, y su carga de metales es varios órdenes de magnitud superior al resto de ríos de la península. Sus comunidades bacterianas y algales son muy diferentes de las del Ter (Lopez Archilla and Amils, 1999) y similares a la de otras zonas metalíferas (Lottermoser *et al.*, 1999, DeNicola, 2000, Brake *et al.*, 2001).

Este río fue muestreado durante tres PERÍODOS: en junio y diciembre de 1999 y en junio del 2000, con la intención de caracterizar sus comunidades y su respuesta frente al cobre. Se trabajó en varios puntos, cercanos a la localidad de Minas de Riotinto (Tabla 4), en la parte alta del río. Con el fin de estudiar la respuesta fotosintética con mayor detalle en la última de las campañas se recogieron muestras de la comunidad que se transplantaron a un canal artificial, en los laboratorios de la Universidad de Barcelona, donde por espacio de 3 meses se hicieron crecer las algas, controlando diversos parámetros.

**Tabla 1.** Localización de los puntos de trabajo.

Punto	Distancia al nacimiento (km)	Latitud	Longitud
Peña Hierro	0.5	37° 43' 30.95"	6° 33' 44.09"
La Naya	8.75	37° 40' 25.24"	6° 33' 5.28"
Rio Tinto	22.75	37° 35' 31.52"	6° 32' 58.61"
La Palma	50.25	37° 25' 29.33"	6° 36' 35.57"
Niebla	66.25	37° 20' 49.16"	6° 42' 25.80"

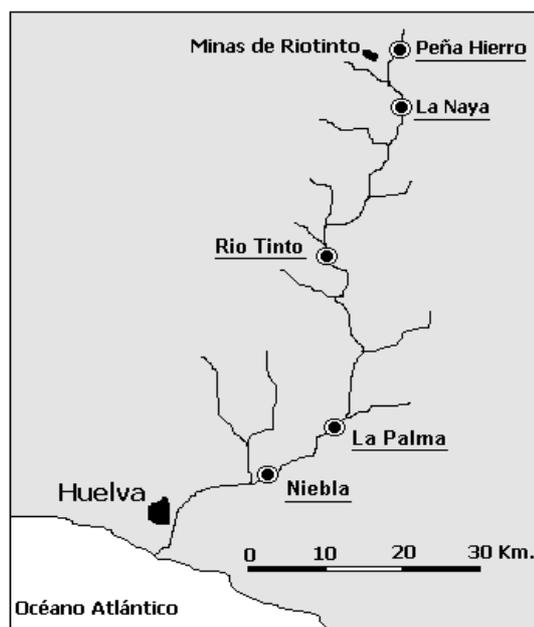
Debido a la presencia desde tiempos históricos de cobre en sus aguas, la tolerancia de las comunidades algales del Tinto, en concordancia con el concepto presentado en el PICT (Blanck, 1988) debe ser mucho mayor que la presentada por las del río Ter. Nuestro objetivo es realizar una descripción de las comunidades del río y valorar la respuesta frente al cobre en contraste con la respuesta observada en las comunidades del río Ter.

### 6.2. Materiales y métodos

Se realizaron tres campañas; julio de 1999, diciembre de 1999, julio 2000. Los resultados de los diferentes muestreos pueden verse en las Tabla 1 (variables físicas y caudales) y Tabla 2 (concentración de metales). La metodología es la vista hasta ahora (capítulo 1.) basada en sondas de campo y análisis de ICP-OES y electroforesis capilar.

Se recogieron muestras de las diferentes comunidades algales para identificar las especies (conservadas en formol al 4%) y para la valoración de clorofilas (congeladas en nitrógeno líquido hasta su procesado). Para la medición de los caudales se realizaron transectos de velocidades en el lugar del cauce más propicio para ello. Se realizaron también varios muestreos cualitativos de los diferentes hábitats para identificar microinvertebrados.

Hasta ahora sólo habíamos valorado la alcalinidad de las muestras de agua, pero en este caso tuvimos que valorar la acidez. Cuando la muestra contiene, como en este caso, iones metálicos hidrolizables o formas reducidas de cationes polivalentes, se deben tratar las muestras con el método del peróxido caliente (APHA, 1999). De este modo, se garantiza la oxidación de cualquier compuesto reducido; al hervir durante 5 minutos se logra una hidrólisis acelerada (200 µL de peróxido de hidrogeno, en 25 g. de muestra. Posteriormente se deja enfriar a tem-



**Mapa.** Situación de los puntos muestreados en el río Tinto. Como característica particular, este río drena una cuenca rica en yacimientos minerales sulfurosos, que provocan un pH extremadamente bajo de modo natural, siendo habituales los valores de pH entre 1.5 y 3.

peratura ambiente. Las muestras se titularon con una solución 0,1 N de NaOH hasta un pH de 3.7 con un titulador Metrohm mod. 720. El resultado obtenido se expresa en mg de CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> a un pH de 3.7.

Para la realización de tests de dosis-respuesta, se seleccionó una masa algal consistente (la comunidad predominante), lo que permitió trocearla con facilidad, sin menoscabo de su estructura. Las porciones (de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup>) se introdujeron en viales de 25 ml. de capacidad, llenos con 10 ml. de agua del río donde se había disuelto el patrón de cobre (1 g/l), hasta lograr las concentraciones deseadas (ver Tabla 3). Las lecturas con el PAM (capítulo 1) se realizaron a la sombra, con luz indirecta (262-274 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-2</sup>), la incubación se realizó con una iluminación de entre 1200-1600 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-2</sup>. El tiempo de incubación fue de 6 horas. La temperatura se mantuvo constante a 27 °C manteniendo los viales en un soporte de metacrilato, sumergido en el mismo río Tinto. Transcurrido ese tiempo, se extrajeron por el mismo orden en que comenzaron su exposición al cobre, hasta cumplir las 5 horas de exposición en todos los ca-

**Tabla 2.**  
Variables físicas y químicas. Los valores de los metales, carbono orgánico disuelto (DOC) y oxígeno están expresados en mg L<sup>-1</sup>, el fósforo reactivo soluble (SRP) en micromolar, la alcalinidad en mg de CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> a pH de 3.7, la conductividad (Cond) en microsiemens, el material en suspensión (MES) en mg L<sup>-1</sup> y el caudal en L s<sup>-1</sup>

Punto	Peña del Hierro	La Naya	Peña del Hierro	La Naya	Peña del Hierro
Fecha	30/6/99	30/6/99	20/12/99	20/12/99	30/06/00
Acidez	4318	4495	-	-	-
Ca	390.5	231	240.1	197.3	295.66
Cd	0.7775	0.7525	0	1	3.44
Cl	3362	1778	-	-	650.5
Cu	43.75	70.375	34.9	112.4	28.92
DOC	8.31	10.4	7.9	13.5	-
Fe	2630	2732.5	3325.8	3068.3	2497.6
K	-	-	7.6	6.7	32.16
Mg	392	484.5	248.8	320.9	301.36
Mn	142.2	49.125	82.1	54.2	122.96
Na	41.05	59.85	32.4	54.5	31.98
NO3	0.54	0.9	5	5	0
Pb	0.7075	0.6225	1.8	1.7	3.68
S	3392.5	3497.5	2859.2	1744.2	3064.8
SO4	9247	23662	16180	22300	14750
SRP	5.8	1.4	105.6	320.8	-
Zn	168.1	359.75	82.1	192.3	129.7
Hora	11	12	12	12 11	-
pH	2.44	2.49	1.54	1.85	2
T °C	22.17	27	15.97	12.90	27.2
Oxígeno	4.8	2.96	6.40	7.30	5.34
Oxig %sat	62.75	37.85	73.00	77.00	70.3
Cond	7.83	10.6	20.50	16.30	11.01
MES	58	44	24	22.7	-
Caudal	1.79	82.3	0.52	119.7	0.399

sos, midiendo el rendimiento fotónico y la fluorescencia basal.

Para el estudio de las comunidades en el laboratorio se construyó un canal con sistema de recirculación del agua, que se mantuvo en funcionamiento durante 81 días. El canal disponía de un sistema de refrigeración, que permitió mantener un ciclo diario de temperaturas similar al que la comunidad experimentaba en su medio natural (entre 20 y 30 °C). La velocidad del agua oscilaba entre 7 y 10 cm s<sup>-1</sup>. La iluminación fue la natural (máximos de 1400 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-2</sup>), ya que se situó en uno de los invernaderos de la facultad de Biología de la U.B. El transporte de la comunidad se realizó en su propia agua refrigerada. La comunidad, filamentosa, fue colocada en el canal y anclada mediante estructuras de plástico, donde los filamentos quedaban retenidos. El agua del canal era la del propio Río Tinto, para lo cual se trajeron 250 L.

conservados en cámaras frigoríficas a 2 °C. El agua en el canal (un volumen de 6 litros) se cambiaba cada 7 días, sin que las variables físico-químicas controladas sufrieran variaciones durante ese tiempo. La comunidad fue muestreada periódicamente para controlar el rendimiento fotónico. Una vez pasado el PERÍODO de colonización de los sustratos artificiales (vidrios de 1.2x1.2 cm) en vez de renovar el agua del canal, se completaba el nivel. De ese modo, a partir del día 50 se reprodujo el efecto observado en numerosas zonas de los márgenes del río, donde no se renovaba el agua, produciéndose una concentración mayor de los solutos por evaporación.

Para la extracción de pigmentos se recogieron muestras de los biofilms y se conservaron en agua filtrada (MilliQ) tamponada con Acetato de Amonio (AA) al 0.3 M y congeladas en nitrógeno líquido. En el laboratorio las muestras

	Junio 1999	Diciembre 1999	Junio 2000
<b>Comunidad tonalidad verde oscuro (A)</b>	<i>Pinnularia acoricola</i> (90%) <i>Euglena mutabilis</i> (5%) <i>Klebsormidium sp</i> (5%) (417)	<i>Pinnularia acoricola</i> (50%) <i>Euglena mutabilis</i> (40%) <i>Chroococcus sp.</i> (5%) <i>Gloeocapsa sp.</i> (4%) Hongos (1%) (592)	<i>Klebsormidium sp.</i> (95%) <i>Euglena mutabilis</i> (5%) (280)
<b>Comunidad tonalidad verde intenso (B)</b>		<i>Euglena mutabilis</i> (60%) <i>Pinnularia acoricola</i> (40%) (586)	
<b>Comunidad tonalidad marrón (C)</b>		<i>Pinnularia acoricola</i> (90%) <i>Euglena mutabilis</i> (10%) (515)	<i>Euglena mutabilis</i> (60%) <i>Pinnularia acoricola</i> (30%) <i>Gloeocapsa sp</i> (3%) <i>Chroococcus sp</i> (3%) <i>Dermocarpa</i> (3%) (240)

**Tabla 3.**

Composición de las distintas comunidades (% del número de células) encontradas en el punto de Peña del Hierro. Los Hongos no se identificaron. Para ver una lista de los géneros presentes habitualmente en este río ver Amils *et al.* (2001). En negrita el valor del rendimiento fotónico de una muestra de cada comunidad.

se sometieron a un proceso de liofilización. Los pigmentos se extrajeron a partir del material desecado con 4 mL de acetona al 90% (tamponada al 0.15M AA). El extracto se filtró a través de un filtro Whatman<sup>®</sup> ANODISC 25 (0.1 µm de diámetro de poro) y analizado inmediatamente mediante HPLC.

La separación de pigmentos se llevó a cabo mediante un Waters<sup>®</sup> 600E Multisolvant Delivery System, un Autosampling Waters<sup>®</sup> 717 con unidad de refrigeración incorporada (4°C) y una columna C-18 (Spherisorb ODS-1, 250 x 4.6 mm, 5 µm particle size). La detección se realizó mediante un Photodiode Array Detector Waters<sup>®</sup> 996. Para la detección de los picos de carotenoides y forbinas se ajustaron las longitudes de onda de lectura a 440 y 660 respectivamente. La separación analítica se consiguió mediante un gradiente lineal (1.2 mL min<sup>-1</sup>) usando una modificación del sistema descrito por Wright *et al.* (Wright *et al.*, 1991). Tras la inyección de una muestra (40 µL de extracto) los pigmentos eran eluidos mediante el gradiente desde el 100% de eluyente A (MeOH/ACN/MilliQ (51:36:13) + 23.124 g AA) hasta el 75% del eluyente A en 5 minutos (y 25% del B). Luego durante 5 minutos se mantenía el gradiente estable y luego durante otros 10 minutos se llegaba hasta el 100% de eluyente B (EtilAcetato/ACN (70:30)). Luego la composición de solvente volvía a las condiciones iniciales durante 5 minutos y se dejaban otros 5 minutos para estabilizar el sistema antes de proceder con una nueva inyección. La correcta identificación de los pigmentos se comprobó mediante una librería de espectros de pigmentos obtenida de extractos de cultivos algales puros

Campaña	Chl- <i>a</i> µg cm <sup>-2</sup>
2/7/99	0.3
20/12/99	0.9
6/6/00	11.3

**Tabla 4.** Concentraciones de clorofila-*a* en Peña del Hierro para la comunidad descrita como A en la tabla 3.

Los valores máximos son similares a los hallados en el canal artificial tras 82 días de crecimiento y similares también a los valores máximos hallados en el río Ter en primavera.

procedentes de la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos (CCAP). Chl-*a*, Chl-*b*, y ???-caroteno se obtuvieron de derivados de forbinas de Sigma<sup>®</sup> preparadas mediante acidificación con HCl 0.1 N (Zapata *et al.*, 1987). Los coeficientes de extinción utilizados son los tabulados por Rowan (Rowan, 1989) y Wright (Wright *et al.*, 1991).

### 6.3. Resultados

**Descriptiva.** El nacimiento del río se encuentra en Peña del Hierro. Es una antigua zona minera, con abundantes restos de escoria mineral (residuos del mineral procesado en hornos para la extracción de metales). El río discurre entre estas escorias, con abundantes precipitados sulfurosos en los márgenes del cauce y en las rocas que sobresalen de él. Las zonas cubiertas de escoria, ocupan una superficie considerable alrededor del cauce, y en éstas no se encuentra ningún tipo de vida vegetal. A unos 20 m. encontramos un bosque de Eucaliptus con algún pino en uno de los márgenes. El lecho es heterogéneo con rocas, guijarros, grava y precipitados sulfurosos. El punto de la Naya se encuentra en medio de una zona de extracción a cielo abierto, carente

**Tabla 5.**  
Listado de los  
macroinvertebrados. Los  
muestreos fueron cuali-  
tativos.

	Peña del Hierro 30/06/99	La Naya 30/06/99	Peña del Hierro 20/12/99	La Naya 20/12/99
F. Chironomidae.	-	-	-	-
SF. Orthoclaadiinae	22	-	4	-
pupas	1	-	-	-
adultos	1	-	1	4
SF. Chironominae	-	2	-	-
F. Psychodidae	-	1	-	-
pupa	-	-	-	1
F. Tipulidae	-	-	1	-
Coleoptero sp.1	1	1	-	-
Coleoptero sp.2	-	1	-	-
-	-	-	-	-
Heterópteros	-	-	-	-
F. Corixidae.	-	-	-	-
Parasigara sp.	Presente	-	-	-
F. Notonectidae	-	-	-	-
Notonecta maculata	Presente	-	-	-
Anisops marazanofi	Presente	-	-	-
Heteròpter juvenil	-	1	-	-
-	-	-	-	-
Hidrácario	-	-	1	-

de vegetación en varios cientos de metros a la redonda. Se amontonan colinas de escoria y de mineral a ambos lados del cauce. La comunidad encontrada en las dos campañas fue la misma; un tapete muy laxo, que se desprende con facilidad al tacto, de color verdoso con filamentos muy cortos.

El paraje de Río Tinto, carece de bosque de ribera, pero aparecen algunas encinas aisladas junto al cauce. Zona de rocas y losas, sin ningún tipo de comunidad apreciable. La ausencia casi total de oxígeno (0.13 mg L<sup>-1</sup>; 3 % de saturación), y la ausencia de respuesta al PAM en el sedimento, indica la ausencia total de algas en este punto.

En la Palma la comunidad era de tipo filamentosos de color verde.

En el punto de Niebla, el cauce era amplio (50 m.), poco profundo y con numerosas zonas estancadas. Comienza a aparecer algo de vegetación de ribera, *Nerium oleander*, *Typha sp.* y eucaliptos.

Para el río Tinto, las concentraciones medias de material en suspensión fueron similares a los máximos encontrados en el río Ter (68 mg L<sup>-1</sup>). La conductividad de los puntos estudiados osciló entre 4.8 y 20.5 mS cm<sup>-1</sup>, estos valores son

mayores en dos órdenes de magnitud al máximo encontrado en el río Ter, 0.860 mS cm<sup>-1</sup>. La acidez (titulación hasta pH 3.7) osciló entre 4318 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> hasta 4496 mg de CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>. El pH osciló entre 1.54 y 2.49, valores muy inferiores al río Ter con valores entre 7.5 y 8.8.

La analítica de nutrientes para Peña Hierro arrojó los siguientes resultados medios: 0.18 mg L<sup>-1</sup> de PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>, 3362 mg L<sup>-1</sup> de Cl<sup>-</sup>, 9247 mg L<sup>-1</sup> de SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, 0.54 mg L<sup>-1</sup> de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y 8.31 mg L<sup>-1</sup> de DOC. Para La Naya, los resultados fueron: 0.041 mg L<sup>-1</sup> de PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>, 1778 mg L<sup>-1</sup> de Cl<sup>-</sup>, 23662 mg L<sup>-1</sup> de SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, 0.90 mg L<sup>-1</sup> de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y 10.43 mg L<sup>-1</sup> de DOC. Los fosfatos y nitratos son un orden de magnitud menor que los encontrados en los lugares más contaminados del Ter. Es interesante resaltar que todo el DOC es autóctono, procedente de la descomposición de la comunidad algal y bacteriana, ya que los márgenes de los puntos estudiados carecen, casi por completo de vegetación. Así mismo las lluvias que pudieran aportar DOC, por escorrentía, o por si mismas, son escasas. La concentración de cobre en Peña Hierro fue de 42.65 mg L<sup>-1</sup>. En la Naya, 86 mg L<sup>-1</sup>. Las concentraciones de otros metales, también presentes en gran abundancia, están en la

Fecha	Punto	Yield del control	Incubación	Pendiente	r <sup>2</sup>
02/07/99	Peña Hierro	417	3	-0.6669	0.252
02/07/99	La Naya	193	3	0.512	0.295
02/07/99	Peña Hierro	448	6	-0.771	0.121
02/07/99	La Naya	193	6	0.065	0.011
03/07/99	Peña Hierro	334	6	0.314	0.052
03/07/99	La Naya	263	6	-1.129	0.68
01/07/00	Peña Hierro	172	6	-0.076	0.134

**Tabla 6.** Valores obtenidos en los tests de dosis-respuesta. No ha sido posible calcular la EC<sub>50</sub> en ningún caso. Únicamente, se muestran los valores obtenidos en las rectas de regresión, y el rendimiento fotónico (Yield) de las comunidades no expuestas a cobre.

**Concentraciones nominales del test dosis-respuesta**

2-3/7/99	0	10	31	100	315	1000	3150	10.000	(µg Cu L <sup>-1</sup> )
1/7/00	0	100	200	500	1000	1500	2000		(mg Cu L <sup>-1</sup> )

tabla 1. Las concentraciones para el cobre son 4 órdenes de magnitud mayores que las máximas encontradas en el Ter (0.0045 mg L<sup>-1</sup>).

**Comunidad algal.** Las concentraciones de clorofila-*a* en el río aparecen referidas en la tabla 4; las del canal artificial en la tabla 7. En las analíticas aparecen además multitud de pigmentos accesorios típicos de diversos grupos taxonómicos, como la clorofila-*b* y *c*. Aparecen también taninos, típicos de las zignematales.

En Peña del Hierro se encontraron dos tipos básicos de comunidad, diferenciables a simple vista. Una de color violáceo y esponjosa que se encontraba en zonas remansadas, con numerosas incrustaciones sulfurosas y un rendimiento fotónico bajo (59). Otra verde, *Klebsormidium sp.* con filamentos muy largos (50 cm.), en lugares con corriente, y rendimiento fotónico mayor (513). La comunidad de zonas remansadas está dominada por *Pinnularia acoricola*. Los filamentos de las zonas de corriente se componen de algunas zignematales, pleurocapsales y *Mougeotia sp.* En La Naya existe una comunidad microbentónica, muy laxa sobre los guijarros del río. En ella aparecen hongos, diatomeas diversas y otra vez *Mougeotia sp.* Esta comunidad presentó un rendimiento fotónico de 652. En cuanto a la concentración de cobre en el biofilm dominante del punto de Peña del Hierro en la campaña de Junio del 2000, se encontró una concentración de 505 ± 39 s.d. (n=5) µg de Cobre por gramo de peso seco (ppm).

**Macroinvertebrados.** Se realizaron en todas las campañas muestreos descriptivos, mediante re-

des de deriva, removiendo el sedimento y raspando rocas. En todas las campañas se constató una presencia escasa de macroinvertebrados, representados únicamente por algún heteróptero y quironómido (Tabla 5).

**Tests dosis-respuesta.** En la campaña de junio de 1999, en el punto Peña Hierro no hubo un descenso significativo de la actividad fotosintética, ni siquiera en las muestras expuestas a la máxima concentración de cobre (20.093 µg L<sup>-1</sup>), un orden de magnitud superior a la concentración máxima usada en el Ter (la máxima usada en el Ter, por ejemplo fue de 2009 µg L<sup>-1</sup>). En ninguno de los tests realizados se logró una reducción de la actividad fotosintética del 50 %, por que lo que no se pudieron siquiera calcular las EC<sub>50</sub>. Realizando las correlaciones correspondientes, únicamente se puede constatar que la comunidad presente en la Naya en julio de 1999, sufrió un descenso significativo de la actividad (pendiente negativa de -1.12 y r<sup>2</sup> de 0.68). Hay incluso comunidades que incrementan su actividad al exponerlas a concentraciones mayores de cobre.

**Canal artificial.** Se midieron la F<sub>0</sub>, el rendimiento fotónico y la concentración de clorofila-*a* a lo largo de 81 días. Durante la fase de colonización, los valores de rendimiento fotónico y fluorescencia basal medidos al azar en los vidrios colonizados oscilan y se estabilizan a partir del día 25, con una tendencia al crecimiento, conforme la biomasa establecida en los sustratos artificiales crecía.

Una vez se logró una colonización homogénea de los sustratos artificiales, se comenzó con la

Tabla 7.

Evolución temporal en la concentración de clorofila en los sustratos artificiales del canal. Se parte de sustratos limpios. El peso seco (DW) nos informa acerca de la proporción de Chl-*a* en la biomasa mientras que la referida a superficie nos informa sobre el crecimiento.

Día	mg Chl- <i>a</i> g <sup>-1</sup> DW	Desviación estanda	µg Chl <sub>a</sub> cm <sup>-2</sup>	Desviación estandar
0	0	-	-	-
37	837.84	74.30	7.36	1
57	389.95	155.23	4.04	0.45
65	260.02	51.52	5.45	0.55
81	833.60	89.76	15.23	4.26

Tabla 8.

Este % de variación se calcula a partir de las medias obtenidas para verano e invierno en los puntos de Peña del Hierro y la Naya. El Na, K, Ca, Mg, Zn, Mn, Cd y S se hallan por tanto en menor concentración en invierno, mientras que el Cu, Pb, Fe, y el nitrato son más abundantes.

#### % de variación de metales entre invierno y verano

Na	-2
K	-351
Ca	-40
Mg	-38
Zn	-60
Mn	-54
Cu	35
Pb	3
Cd	-239
S	-44
Fe	18
NO <sub>3</sub>	86

fase de concentración. Durante la primera semana, en que la conductividad pasa de 9.2 mS a 13.5, hay una caída de los tres parámetros medidos, pero luego la chl-*a* y consecuentemente la  $F_0$  se incrementan. El rendimiento fotosintético se estabiliza en 286, valor similar a los hallados en el río en condiciones naturales,  $288 \pm 46.2$ . Desde el día 26 hasta el final del experimento, el rendimiento fotosintético se mantiene estable, a pesar de que la conductividad casi se duplica, pasando de 7.5 a 14.5 mS. La concentración de solutos no parece afectar a este parámetro de la comunidad.

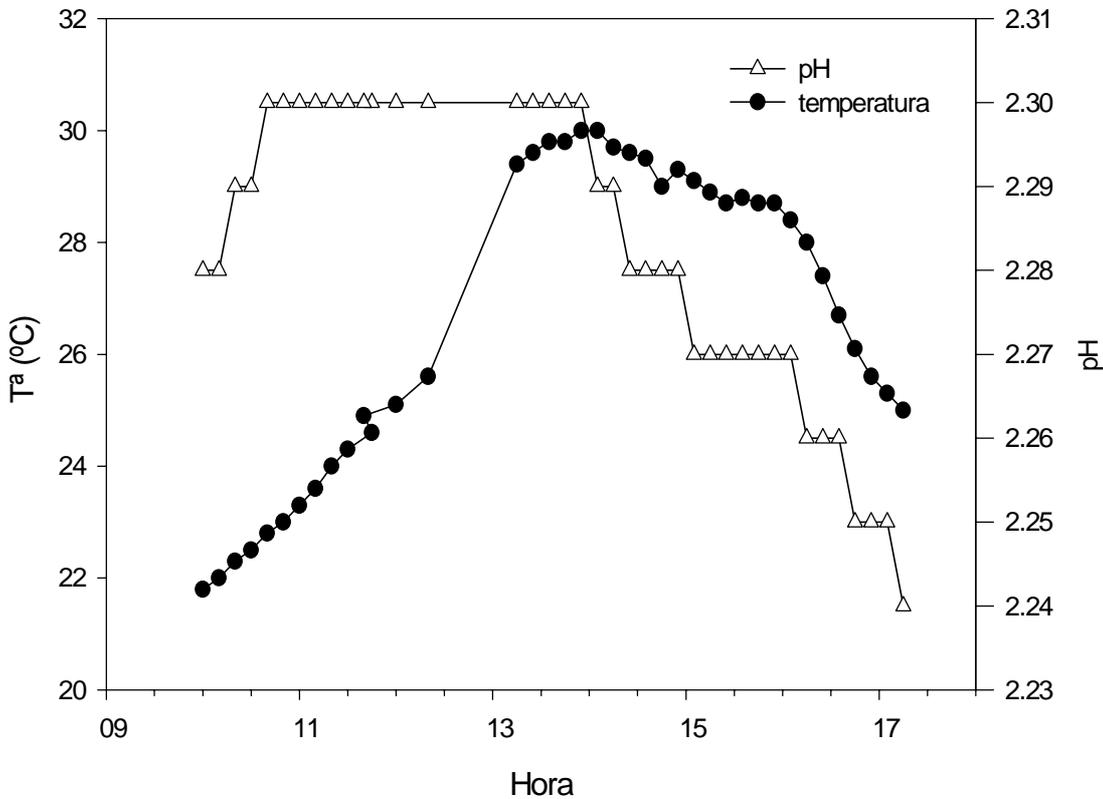
#### 6.4. Discusión

El tipo de sustrato sobre el que circula el río en sus primeros kilómetros son escorias y restos de mineral de las extracciones. Esto junto con su situación hace que además de tener elevadas concentraciones de metales y pH ácidos presente temperaturas elevadas en los meses de verano (Ernst, 1988). Todas estas condiciones hacen del río Tinto un ambiente extremo, en el que –sin embargo– se desarrolla una abundante biomasa algal. Las comunidades están domina-

da por el alga verde *Klebsormidium* –descrita en lugares similares al río Tinto (Lottermoser *et al.*, 1999)– y la diatomea *Pinnularia acoricola*, alga comúnmente asociada a ambientes muy ácidos (pH < 3.5), que soporta pH por debajo de 1 y extendida por todo el planeta: Japón (Negoro, 1985), USA (Whitton and Diaz, 1981), Reino Unido (Hargreaves *et al.*, 1975), Africa y Java (Carter, 1972). También aparece *Euglena mutabilis*, presente en muchos ambientes ácidos (Brake *et al.*, 2001). Los valores máximos de clorofila hallados ( $11.3 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) similares a los máximos hallados en el río Ter (ver capítulo 5). Debén existir mecanismos tanto a nivel taxonómico (DeNicola, 2000) como fisiológico (Gross, 2000), que permitan a las comunidades desarrollarse a pesar de las condiciones extremas presentes en el Tinto.

Los culpables de las condiciones químicas del río Tinto son los metales, así que comenzaremos por intentar explicar sus variaciones e impacto sobre las comunidades. Por norma general son más abundantes en verano que en primavera (tabla 8). Además de una mayor tasa de evaporación, también existen mecanismos relacionados con la biota que expliquen estos datos, como la correlación positiva observada entre abundancia de quimiolitotrofos y la abundancia de metales de este río (Lopez Archilla and Amils, 1999). A lo largo del año el número de bacterias quimiolitotrofas se mantiene estable (Lopez Archilla and Amils, 1999), por lo que el incremento de la concentración de metales será debido al incremento del metabolismo, lo que ocurre cuando sube la temperatura en verano. Todo el proceso se traduciría en una mayor tasa de oxidación de metales que se liberarán al medio en mayor cantidad en verano, poniendo de manifiesto la gran importancia de la comunidad bacteriana en este sistema. Otro dato a favor del razonamiento del incremento del metabolismo es que el nitrato también es menor en verano, debido a una mayor incorpo-

Evolución de temperatura y pH en Peña del Hierro



**Gráfico 1.** La actividad biológica consigue incrementar el pH. La fotosíntesis retira CO<sub>2</sub> del agua.

ración por parte de las algas y microorganismos. Estos organismos quimiolitotrofos, obtienen su energía de la oxidación de compuestos inorgánicos reducidos (sulfuros, y otros elementos metálicos reducidos). De ese modo se producen ácido sulfúrico -el más común en este tipo de aguas- (Kristjansson and Stetter, 1992, López Archilla and Amils, 1999) e iones férricos, que contribuyen, aún más, a reducir el pH y a la solubilización de metales (Ehrlich, 1990, López-Archilla *et al.*, 1993). Este ácido establece un sistema de tamponamiento que mantiene los valores de pH alrededor de 2 (ver tabla 2) (Brock, 1971).

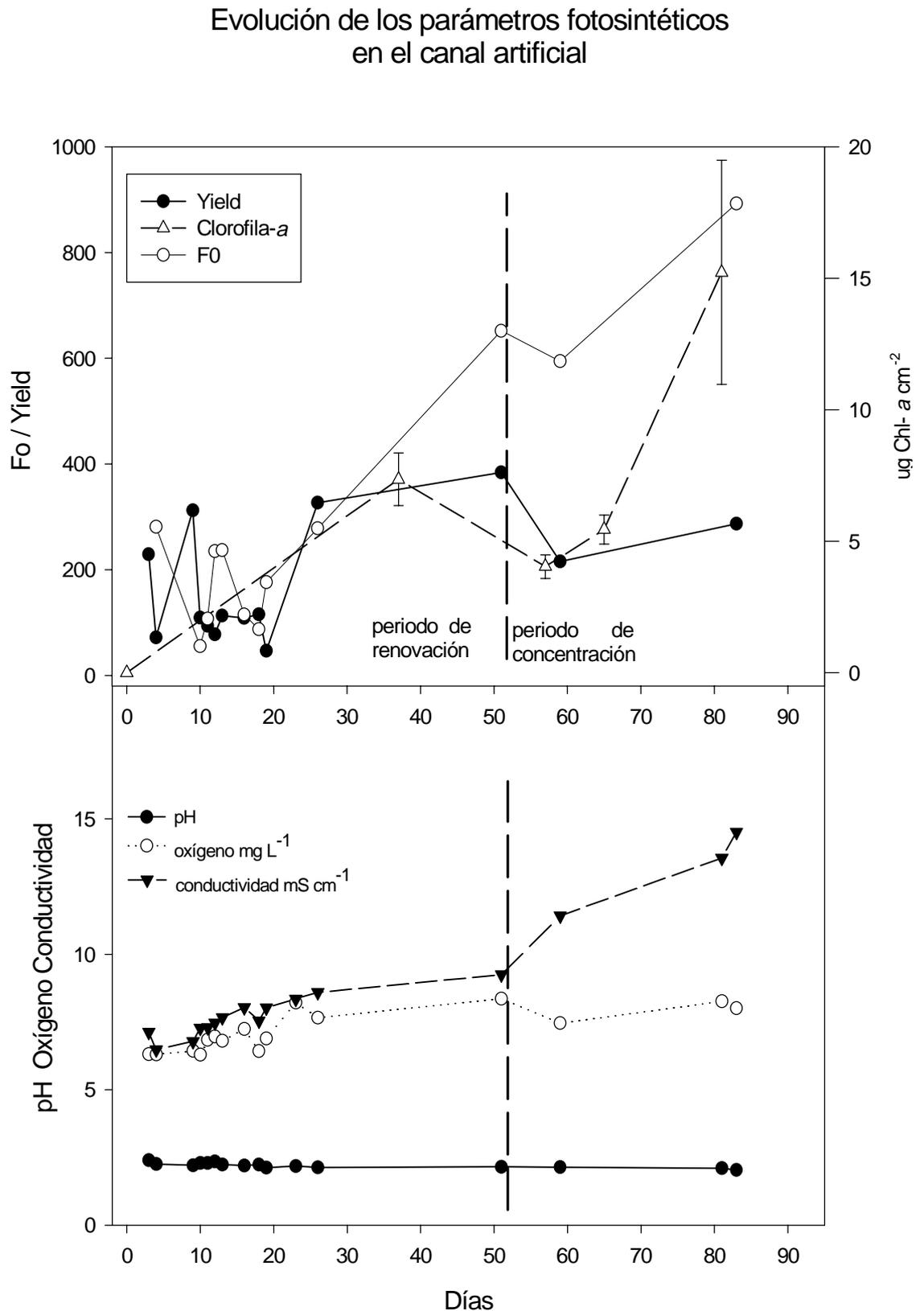
En cuanto a la respuesta ecotoxicológica, únicamente en un caso se pudo calcular una EC<sub>50</sub>: en la Naya, en la campaña de junio del 1999, con un valor de 98.000 µg L<sup>-1</sup>. En contraste, en el río Ter, con valores puntuales de cobre de entre 30 y 60 µg L<sup>-1</sup>, se halló una EC<sub>50</sub> máxima de 1558 µg L<sup>-1</sup>, aunque la media fue de 215±104. En el resto de casos, en el Tinto, no se alcanza una caída significativa de la actividad al incrementar la concentración de cobre a la que se expone la comunidad. En terminos generales, y observando las pendientes de las regresiones efectuadas en los tests de dosis-respuesta, no se puede afirmar que la exposición a una concen-

tración mayor de cobre provoque una inhibición de la actividad fotosintética.

Para comprender cómo es posible que el cobre apenas afecte a estas comunidades es necesario profundizar en cómo éstas incorporan metales. El mecanismo de incorporación de metales en las células comprende dos fases: la unión de los cationes a los grupos cargados negativamente de la superficie celular (fase pasiva) y una segunda fase de incorporación mediada por el metabolismo (la fase activa). La fase pasiva es casi inmediata y ocurre pocos segundos tras la exposición al metal (Khummongkol *et al.*, 1982, Les and Walker, 1984). Es en esta fase donde podemos encontrar los mecanismos que explican el casi nulo efecto del cobre sobre la actividad fotosintética. Es evidente que la química del agua en Riotinto puede tener un efecto protector ante el cobre. Peterson (1984) concluye que manteniendo constantes el resto de parámetros, a una mayor concentración de protones se corresponde una menor toxicidad. Sugiere, además, que algunos metales, entre ellos el cobre, establecen una competencia con los protones por los receptores específicos (Peterson *et al.*, 1984, Campbell and Stokes, 1985). De este modo si la célula dispone de mecanismos para controlar la

Gráfica 2.

La concentración de clorofila-*a* se midió sobre los cristales, por eso el punto de partida es 0. Hasta los 50 días se renovó el agua cada 7. Después se añadía la que se evaporaba. Así se lograron las mayores conductividades. A pesar de ello el pH se mantuvo muy estable ( $2.20 \pm 0.02$ ).



entrada de protones, además dispondrá de un modo de controlar la incorporación de metales. Esta tolerancia al cobre, inducida por los protones, no parece exclusiva de las algas. Para algunos de los géneros de hongos descritos en este río, se ha descrito también una mejor tole-

rancia frente al cobre a pH bajos; en concreto para *Scytalidium* (Starkey, 1973) y *Penicillium* (Singh, 1977).

A pesar de la aparente protección ante metales pesados que proporciona la alta concentración

de  $[H^+]$ , ésta causa ciertos problemas a los seres vivos. Los organismos poseen mecanismos que les permiten mantener en sus medios internos un pH estable y cercano a la neutralidad, evitando la entrada masiva de protones. Se sabe que células algales viviendo en medios con un valor de pH de 1, mantienen sus citosoles cerca de la neutralidad (Enami *et al.*, 1986, Gimmler *et al.*, 1988). Aparentemente, la membrana de las algas acidófilas es impermeable a los protones, requiriendo ,además, poca energía para activar las bombas de protones en contra del gradiente pasivo provocado por los protones. En ausencia de energía (oscuridad prolongada, anaerobiosis) estos mecanismos no pueden mantenerse y provocan la acidificación del citoplasma (Gimmler *et al.*, 1989). Algunos autores proponen que la composición de la membrana, rica en determinado tipo de esteroides, proteínas y ácidos grasos saturados incrementa la impermeabilidad de la membrana frente a los protones (Benz and Cros, 1978, Komatsu and Chong, 1998). Otro de los mecanismos descritos para impedir la entrada de protones, es poseer un potencial de membrana positivo alto y una superficie cargada positivamente (Gimmler *et al.*, 1989). Una consecuencia derivada de este tipo de mecanismos de exclusión de protones es la dificultad que tienen los metales para ser incorporados por las células en este tipo de ambientes. A pesar de la elevada concentración y biodisponibilidad de metales, la tasa de incorporación de metales a las células algales es muy reducido (Peterson *et al.*, 1984), Lo que queda demostrado, en concordancia con otros autores (Whitton, 1970, Wood and Wang, 1983, Peterson *et al.*, 1984, Albertano and Pinto, 1986), es la elevada tolerancia frente a los metales de las algas de este ambiente ácido, posiblemente como beneficio derivado de los mecanismos de exclusión de protones.

Otro de los problemas a los que deben enfrentarse las algas en medios ácidos es la obtención de  $CO_2$ . Un pH ácido tiene una fuerte influencia en la disponibilidad de carbono inorgánico disuelto (DIC) para la fotosíntesis. Todo el  $CO_2$  consumido durante la fotosíntesis en aguas alcalinas es repuesto desde el pool de  $HCO_3^-$ . En contraste en las aguas ácidas el  $CO_2$  se agota con rapidez a pH por debajo de 4, porque todo el DIC se encuentra en forma de  $CO_2$ . Este efecto se ve contrarrestado por la difusión desde la atmósfera, ya que el tiempo necesario para llegar

al 99.9% del equilibrio con el  $CO_2$  atmosférico es de tan solo 0.42 s, a un pH de 2. A un pH de 7 este proceso necesita en cambio 3.5 minutos (Brinkman *et al.*, 1933). A pesar de esta rapidez, la actividad fotosintética es lo suficientemente intensa como para afectar al pH, que sigue una evolución similar a lo observado en ríos alcalinos. En estas condiciones, la anhidrasa carbónica extracelular presente habitualmente en las especies de ambientes alcalinos, no es necesaria. Se ha descrito una muy baja actividad anhidrasa en *Dunaliella acidophila*, típica de ambientes ácidos, al compararla con otras especies de *Dunaliella* de ambientes neutros (Geib *et al.*, 1996). La caída de pH a lo largo de la tarde (gráfica 2) sugiere que los mecanismos de incorporación de  $CO_2$  dependen de la luz, en concordancia con lo descrito para *Dunaliella acidophila* (Gimmler and Weis, 1992). Al decaer la intensidad luminosa, lo haría también la tasa de incorporación de  $CO_2$ , por lo que el pH se reduciría, al ir liberandose el  $CO_2$  producido por la comunidad. Una posible fuente de carbono puede ser la respiración de los componentes heterótrofos, muy abundantes, de la comunidad: *L.ferrooxidans*, *Thiobacillus Ferrooxidans* y *Thiobacillus Thiooxidans*, como bacterias quimiolitotrofas, *Scytalidium*, *Bahusakala*, *Acremonium*, *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Penicillium*, como géneros de hongos (Lopez Archilla and Amils, 1999). Por ello podemos suponer que la morfología de la comunidad en forma de masa densa y continua, con hongos, bacterias y algas en estrecho contacto, sea una solución adaptativa al problema de la obtención de  $CO_2$  por parte de los organismos fotosintéticos. De este modo toda la comunidad se verá favorecida; los autótrofos disponiendo de una mayor cantidad de  $CO_2$  y consecuentemente produciendo mas, y los heterótrofos beneficiandose de esta producción.

Se sabe que la toxicidad del cobre no depende de la concentración total, sino de la cantidad de  $Cu^{2+}$  (Sunda and Guillard, 1976). Con el pH del río Tinto todo el cobre que se encuentra en el agua, se encuentra en forma de  $Cu^{2+}$ , cobre libre disuelto (Stumm and Morgan, 1981). Las concentraciones reales, valoradas en el banco de diluciones, fueron siempre alrededor del 50% de las nominales. Sabiendo que el método utilizado valoró el cobre total existente en el agua de las incubaciones deberían existir mecanismos relacionados con la biomasa que secuestren el

cobre. Se sabe que algunas algas, como *Klebsormidium sp.*, presente en esta comunidad, acumulan selectivamente cobre frente a otros metales (Lottermoser *et al.*, 1999), hasta 2570 ppm sobre peso seco, en aguas con 300 mg L<sup>-1</sup> de cobre. También *Euglena mutabilis* parece secuestrar hierro y otros metales (Brake *et al.*, 2001). Además, un mismo metal puede ser incorporado a diferentes tasas por diferentes taxones (Hamdy, 2000). Cabe preguntarse pues acerca de las tasas de incorporación de metales pesados en nuestro caso: para una concentración en el agua de 28.9 mg/L, encontramos una concentración en el biofilm de 505 ug Cu /gDW, con una tasa de absorción del 1.74 %, casi el doble que lo descrito por Lottermoser (Lottermoser *et al.*, 1999), que describe, en condiciones similares, tasas de entre el 0.85 y el 0.9 %. Aunque es difícil explicar esta diferencia, es posible, entonces, que esté debida a diferencias en la composición taxonómica.. El que algunos metales, como el cobre, hierro y plomo sean más abundantes en invierno, puede hacer pensar en que al igual que *Klebsormidium* y *E. mutabilis* incorporan selectivamente cobre y hierro, otras especies pueden incorporar selectivamente alguno de esos metales. De ese modo y como punto de partida de futuros estudios, se podría atribuir parte de la variación estacional de la concentración de metales en el agua a la variación taxonómica (algal y bacteriana) de las comunidades.

Por otra parte, la evolución que siguen las algas en el canal, demuestra que el rango de conductividad que pueden tolerar es muy amplio. Las especies acidófilas son moderadamente halófitas, debiendo tolerar elevadas presiones osmóticas, provocadas tanto por la concentración de protones como por las sales y metales en disolución (Musacchio *et al.*, 1978, Albertano *et al.*, 1990). Todo lo descrito nos lleva a concluir que las restricciones impuestas por los medios extremadamente ácidos, sobre las comunidades algales microbentónicas, contribuyen a generar mecanismos que protegen a éstas contra las altas concentraciones de metales.



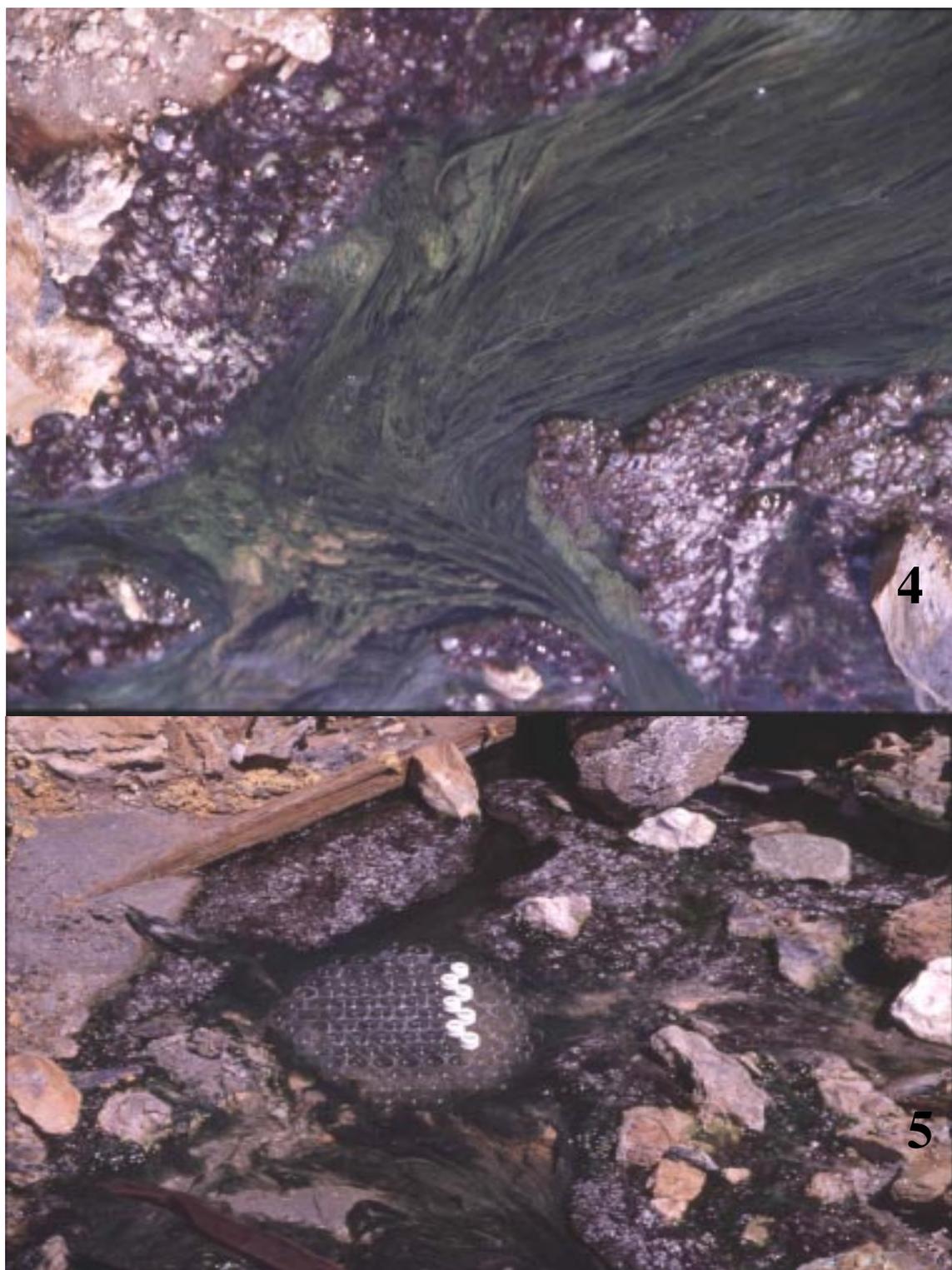
# FOTOGRAFÍAS



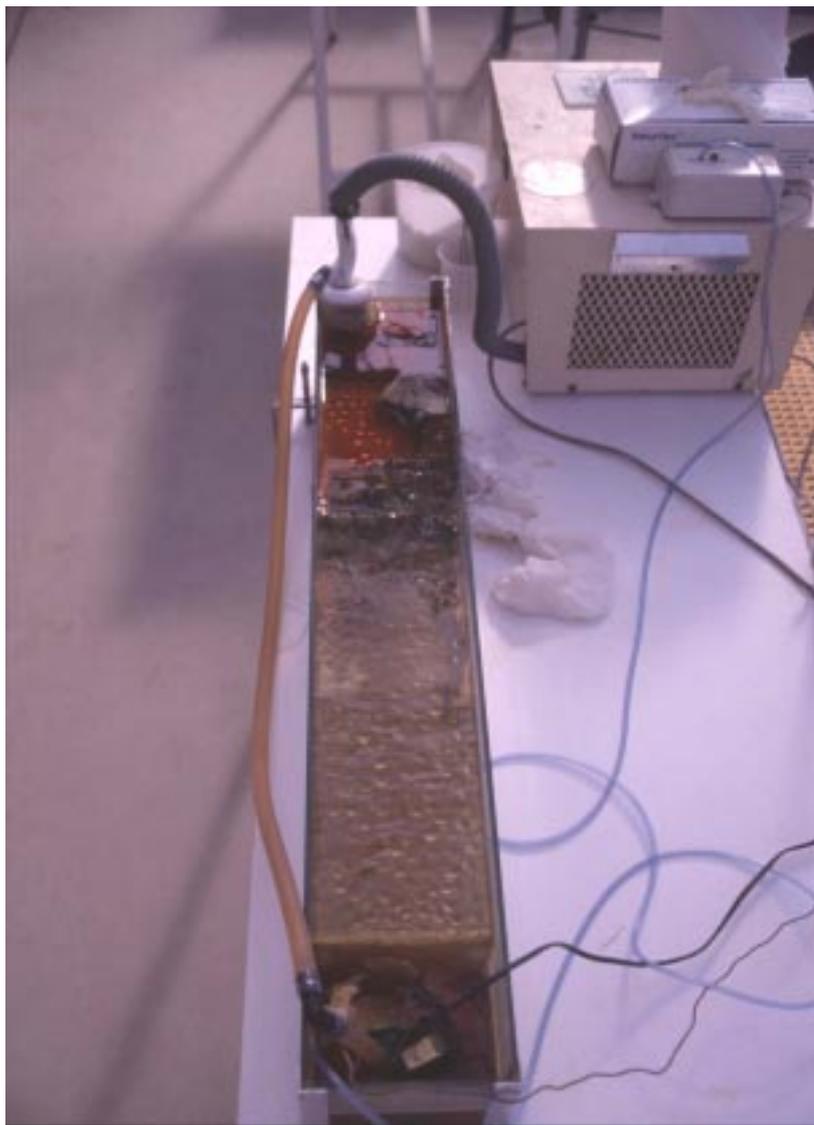
**Foto 1.** Imagen de la zona del nacimiento del Rio Tinto en Peña del Hierro. El paisaje es el resultado de la actividad minera y de transformación de mineral que a finales del siglo XIX se llevó a cabo. Durante el procesado del mineral se producía una cantidad enorme de escorias que unido a la ganga procedente de la extracción del mineral se amontonaba modificando el paisaje y envenando el suelo con multitud de metales pesados. En la actualidad en esta zona (aun activa desde el punto de vista de la extracción de mineral) la única cobertura vegetal son algunos eucaliptus y pinos replantados. El río en su nacimiento discurre entre montañas de escoria, con pH entre 1 y 2 y una carga de metales varios órdenes de magnitud mayor que el resto de ríos de la Península Ibérica. A pesar de ello el cauce se encuentra cubierto en su totalidad por una comunidad de algas, hongos y bacterias muy activa. En este río, llevamos a cabo un trabajo descriptivo de la comunidad y realizamos varios tests de dosis-respuesta. El caudal era muy bajo y la velocidad mínima. Las condiciones de trabajo, entre la escoria y la acidez del medio resultaron especialmente penosas, tanto para los científicos como para el material.



**Fotos 2 y 3.** El nombre del río proviene del color de vino tinto que tienen sus aguas (Foto 2), provocada por las altas concentraciones de metales. En esa misma foto pueden observarse las numerosas incrustaciones salinas en las rocas que delimitan el cauce. En la foto 3 podemos observar tanto las incrustaciones salinas en las partes emergidas del cauce, como las diferentes (por su color y textura) comunidades perifíticas que se podrían encontrar en sus aguas. Una de color violeta en la parte inferior izquierda, de aspecto globular y con numerosas incrustaciones salinas, que aparecen como manchas blancas. Otra verde y filamentosa, creciendo en la parte superior e izquierda de la fotografía 3. Finalmente y entre estas y en la parte central de la fotografía podemos observar otra comunidad de color pardo recubriendo las rocas del fondo.



**Fotos 4 y 5.** En la foto 4 se observa con mayor detalle la comunidad filamentososa verde. En la foto 5 podemos ver la incubación realizada «in situ» exponiendo las algas a diferentes concentraciones de cobre con el objetivo de calcular la  $EC_{50}$ . De este modo, se consiguió mantener la temperatura e insolación naturales. Posteriormente se extrajeron las algas y mediante un PAM se valoraron diversos parámetros relacionados con el funcionamiento del aparato fotosintético de las mismas.



**Foto 6.** Canal artificial colonizado por algas del río Tinto en los invernaderos de la Facultad de Biología de la U.B. Uno de los objetivos de la última campaña realizada fue la de reproducir la comunidad en canales artificiales como los usados en experimentos anteriores y el estudio de la comunidad en el laboratorio. Para tal fin se construyó un canal de vidrio con sistema de recirculación de agua y control de la temperatura. Cada cierto tiempo se renovaba el agua dentro del canal, en el que mediante una bomba se producía una circulación del agua. Ello permitió que el inóculo traído desde río Tinto colonizara los sustratos de vidrio dispuestos para tal fin.

# RESUMEN Y CONCLUSIONES

## 7.1. Resumen

Los resultados de esta tesis doctoral se han descrito a lo largo de 6 capítulos. Cada uno de ellos presenta la estructura de un artículo independiente, con su introducción, material y métodos, resultados y discusión. A pesar de ello los resultados de todos los capítulos son complementarios y ofrecen una visión del efecto que el cobre y la atrazina tienen sobre las comunidades de perifiton.

Resultando bien conocido el efecto que el cobre y la atrazina tienen sobre las algas dulceacuícolas, esta tesis pretende profundizar como esos efectos (estudiados mediante cultivos de laboratorio por numerosos autores) pueden verse modificados al expresarse sobre comunidades en condiciones naturales o artificiales. Una de las características de la exposición en condiciones naturales es la interacción entre el efecto del tóxico y las numerosas variables ambientales (abióticas y bióticas). En esta tesis se muestran algunas de las posibilidades que del estudio de estas interacciones pueden derivarse. Se trabajó con un factor abiótico (velocidad de la corriente) y con otro biótico (hervíboros). Luego se trabajó en un sistema fluvial natural (el río Ter) y se comparó con otro sistema extremo (el río Tinto). De estos trabajos podemos destacar que el estudio de cualquier hecho que afecte a los organismos del sistema fluvial no podrá nunca aislarse de la interacción con las variables ambientales bajo las que se presenta.

Para estudiar el efecto modulador que la velocidad podía tener sobre la toxicidad de la atrazina en una comunidad de perifiton, se expuso la comunidad a  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  de atrazina en condiciones de 1 y  $15 \text{ cm s}^{-1}$  de velocidad del agua. Tras una exposición de 14 días se valoró la tolerancia a la atrazina de ambos tratamientos, mediante un test de dosis-respuesta. Se buscaba comprobar si a una mayor velocidad del agua se correspondería una mayor biodisponibilidad del tóxico y por tanto, dentro del marco del PICT (Pollution Induced Community Tolerance), una mayor tolerancia, tras ese periodo de exposición. Para el tratamiento de  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  y  $15 \text{ cm s}^{-1}$  se calculó una  $EC_{50}$  de  $717 \mu\text{g L}^{-1}$ , frente a los  $507 \mu\text{g L}^{-1}$  del tratamiento de  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  y  $1 \text{ cm s}^{-1}$ , con lo que se confirmaba la hipótesis de partida. A pesar de haber estado expuestas las comunidades a la misma concentración de atrazina la tolerancia de la expuesta a  $15 \text{ cm s}^{-1}$  fue mayor que la expuesta a  $1 \text{ cm s}^{-1}$ . En consonancia con lo propuesto en el PICT la comunidad que dispuso de una mayor biodisponibilidad de atrazina (con el agua circulando a  $15 \text{ cm s}^{-1}$ ) desarrolló una mayor tolerancia que la expuesta a  $1 \text{ cm s}^{-1}$ .

La velocidad del agua acelera la aparición de los efectos del cobre sobre parámetros estructurales y funcionales de las comunidades microbentónicas. En el primero de los experimentos la exposición de las comunidades a  $15 \mu\text{g L}^{-1}$  de cobre provocó un descenso en la incorporación de carbono respecto al control siendo más precoz el descenso a  $15 \text{ cm s}^{-1}$  que a  $1 \text{ cm s}^{-1}$ . Este resultado sugería la siguiente pregunta: ¿se mantenía esta relación a diferentes velocidades?. Para contestarla se diseñó el siguiente experimento. El resultado de este segundo experimento (exponer las comunidades a  $15 \mu\text{g L}^{-1}$  a 1, 20, 30 y  $50 \text{ cm s}^{-1}$ ) fue que a velocidades intermedias (20 y  $30 \text{ cm s}^{-1}$ ) el efecto del cobre es menor que a bajas y altas ( $1$  y  $50 \text{ cm s}^{-1}$ ). En este caso la comunidad menos afectada fue la de  $20 \text{ cm s}^{-1}$ , presentando la mayor incorporación de C de todos los tratamientos. Al doblar la disponibilidad de cobre (como se hizo en el tercer experimento al trabajar con  $30 \text{ cm s}^{-1}$  manteniendo las velocidades de 20 y  $30 \text{ cm s}^{-1}$ ) no aparecía esta diferencia entre 20 y  $30 \text{ cm s}^{-1}$ . Los dos se veían igualmente afectados por el cobre. Parece pues lógico suponer que existe una veloci-

dad “óptima” para cada concentración de cobre, en la cual todos los factores implicados (biodisponibilidad de cobre y nutrientes, fuerzas de arrastre) provocan que el cobre tenga el menor efecto posible sobre la comunidad. Por encima y debajo de esa velocidad (para una concentración dada de cobre) el efecto puede ser mayor.

Con el fin de conocer el efecto de la interacción entre los tóxicos y otros niveles tróficos, se diseñaron una serie de experimentos en los que se exponía a las comunidades de perifiton a la atrazina o al cobre y a los herbívoros (gasterópodos acuáticos). En el caso de la atrazina se trabajó con una concentración de  $15 \mu\text{g L}^{-1}$ . La hipótesis de partida es que el efecto que los herbívoros tienen sobre la comunidad de perifiton, puede impedir la adaptación de esta a la atrazina provocando un efecto tóxico mayor. Tras una exposición de 18 días se comprobó que mientras la comunidad expuesta a atrazina mantenía niveles de actividad fotosintética similares al control, la comunidad que soportaba la depredación de los herbívoros y se expuso a la atrazina presentó los niveles más bajos de actividad y biomasa de todos los tratamientos, pudiendo dar como positiva la hipótesis de partida.

Para estudiar el caso del cobre, se trabajó con una concentración de  $44 \mu\text{g L}^{-1}$ , a una velocidad de  $1 \text{ cm s}^{-1}$  durante 22 días. Los primeros 9 días se expuso la comunidad únicamente al cobre, y pasado este tiempo se expusieron los tratamientos correspondientes al herbivorismo. Se quería determinar si el efecto de los herbívoros incrementaría la toxicidad del cobre. Finalizado el experimento, se pudo comprobar que los herbívoros tuvieron un efecto mayor que el del cobre. El efecto de la interacción entre cobre y herbívoros no fue significativamente diferente del efecto de los herbívoros. El cobre sin embargo sí afectó de modo significativo a los herbívoros, reduciendo su tasa de incremento de peso, el número de puestas, el número de huevos por puesta y el porcentaje de eclosión de estos huevos. A estas concentraciones de cobre y en las condiciones del experimento, los gasterópodos son más sensibles al efecto del cobre y resultan por tanto mejores indicadores de la incidencia de éste en el medio. En definiti-

va, mientras que el herbivorismo incrementa el efecto tóxico de la atrazina, no ocurre lo mismo con el cobre.

Una vez estudiadas estas interacciones y sus consecuencias sobre la biota se diseñó un experimento de campo con el fin de valorar en que modo la variabilidad espacial (desde el nacimiento a la desembocadura) y temporal de un río (primavera *v.s.* verano) afectaba la respuesta de las comunidades microbentónicas frente al cobre y la atrazina. Se suponía que el caudal del río sería un factor clave en la diferenciación de la respuesta de las comunidades, homogeneizando la respuesta a mayor caudal. Para ello se situaron sustratos artificiales en 9 puntos del río Ter durante dos épocas, primavera y verano. Los resultados de los tests de dosis-respuesta indicaron que las diferencias en la tolerancia frente a los tóxicos, obtenidas en verano (menores caudales, mayor importancia de los aportes de la cuenca en cada punto) eran mayores que en primavera (mayores caudales, menor importancia de los aportes locales). Además se encontraron correlaciones positivas entre diversos indicadores relacionados con la biomasa y los nutrientes como factores que incrementan la tolerancia frente a los tóxicos utilizados.

Para finalizar se estudió un ambiente extremo, el río Tinto, que de modo natural presenta en sus aguas concentraciones de metales superiores en varios órdenes de magnitud a las presentes en los ríos estudiados con anterioridad. El pH de este río es extremadamente ácido, con valores por debajo de 2.5. En este ambiente las comunidades microbentónicas deben enfrentarse a serios problemas, como el exceso de protones, la falta de  $\text{CO}_2$  y la gran concentración de metales tóxicos. En concordancia con el PICT y lo visto hasta ahora, cabía esperar que la tolerancia de las algas en este ambiente sería muy superior a la hallada en las comunidades estudiadas con anterioridad. Además, deberían haber desarrollado mecanismos de protección ante los problemas citados. Los resultados de la caracterización de la comunidad y de los tests de dosis-respuesta nos mostraron una comunidad altamente adaptada, con mecanismos de exclusión de protones que a su vez protegen de la exposición a los metales, lo que redundaba en unas  $\text{EC}_{50}$  altísimas, al compararlas con las halladas en los

otros ríos. En este caso, parece que la exposición a ambientes ácidos provoca la aparición de mecanismos que, a su vez, protegen ante las altas concentraciones de metales.

, les permiten eludir los problemas derivados de las altísimas concentraciones de metales de sus aguas. Como consecuencia, presentan unas  $EC_{50}$  muy elevadas en relación a las halladas en ríos como el Ter.

## 7.2. Conclusiones

1-Los canales artificiales han demostrado ser una metodología útil en el estudio del efecto del cobre y la atrazina sobre las comunidades algales microbentónicas puesto que han permitido el control de los factores estudiados y su nivel de realismo ha sido el suficiente para aproximarse a la respuesta de esas comunidades en condiciones naturales.

2-La velocidad del agua resulta un factor clave en el efecto que el cobre tiene sobre las comunidades algales microbentónicas, causando una aparición más precoz e intensa de los efectos tóxicos del cobre. Este efecto además parece modificarse con la velocidad, perdiéndose a velocidades elevadas. En el caso de la atrazina no parece afectar a la comunidad, aunque si se puede demostrar una mayor exposición a velocidades mayores.

3-Los herbívoros perturban de un modo más intenso que los tóxicos a las concentraciones utilizadas. Sin embargo se puede detectar que –de algún modo– interfieren en la capacidad de adaptación a los tóxicos, al impedir tanto el envejecimiento como la estructuración de la comunidad. Este efecto es más marcado en el caso de la atrazina, y únicamente se detecta en los primeros momentos en el caso del cobre.

4-El efecto que tiene la variabilidad espacial y temporal –provocada por la estructura propia del río, los embalses y la marcada estacionalidad en los aportes de agua– del río Ter se ve reflejada en la respuesta ecotoxicológica de sus comunidades algales microbentónicas. Esto demuestra la importancia de ampliar este tipo de estudios tanto en el tiempo como en el espacio dentro de un mismo sistema fluvial.

5-Las comunidades de ambientes extremos, como las del río Tinto, han demostrado poseer mecanismos fisiológicos que, al mismo tiempo que las capacitan para desarrollarse –a niveles similares a las comunidades de ríos “normales”–



# BIBLIOGRAFÍA

- Admiraal, W., H. Blanck, M. Buckert de Jong, H. Guasch, N. Ivorra, V. Lehmann, B. A. H. Nystrom, M. Paulsson, and S. Sabater. 1999. Short-term toxicity of zinc to microbenthic algae and bacteria in a metal polluted stream. *Water Res.* Vol. 33, 9:1989-1996.
- Albertano, P. 1995. Microalgae from sulphuric acid environments. Pages 19-39 in W. Wiessner, E. Schnepf and R. C. Starr, editors. *Algae, Environment and Human Affairs*. Biopress, Bristol.
- Albertano, P., and G. Pinto. 1986. The action of heavy metals on the growth of the acidophilic algae. *Boll. Soc. Natur. Napoli.* 41:319-328.
- Albertano, P., G. Pinto, A. Pollio, and R. Taddei. 1990. Morphology, ultrastructure and ecology of an acidophilic alga, *Pseudococomyxa simplex* (Mainx) Fott (Chlorococcales). *Algol. Stud.* 59:81-95.
- Alegria, H. A., D. Autel JP, and T. J. Shaw. 2000. Offshore transport of pesticides in the South Atlantic Bight: Preliminary estimate of export budgets. *Mar. Pollut. Bull.* Vol. 40, 12:1178-1185.
- Allan, J.D. 1995. *Stream Ecology. Structure and function of running waters*. Chapman & Hall. London.
- Allen, H.E., and D.J. Hansen. 1996. The importance of trace metal speciation to water quality criteria. *Water Environ. Res.* Vol. 68, 1:42-54.
- Anderson, D.M., and F.M.M. Morel. 1978. Copper sensitivity of *Gonyaulax tamarensis*. *Limnol. Oceanogr.* 23:283-295.
- APHA. 1999. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. Edited by A. E. Greenberg, A. D. Eaton and L. S. Cleseri. 20th Edition (January 15, 1999).
- Armengol, J., F. Sabater, J. L. Riera, and J. A. Morgui. 1990. Annual and longitudinal changes in the environmental conditions in three consecutive reservoirs of the Guadiana River (W. Spain). *Proceedings Of The International Conference On Reservoir Limnology And Water Quality*. Vol. 3:679-687.
- Armengol, J., F. Sabater, and S. Sabater. 1993. Variaciones en la carga de nutrientes en la cuenca del rio Ter y su efecto sobre las comunidades de indicadores biológicos: Junta de Sanejament del Departament de Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya.
- Armengol, J., S. Sabater, A. Vidal, and F. Sabater. 1992. Using the rescaled range analysis for the study of hydrological records: The River Ter as an example. *Homage to Ramon Margalef*. 10:21-33.
- Baker, S. E., D. B. Barr, W. J. Driskell, M. D. Beeson, and L. L. Needham. 2000. Quantification of selected pesticide metabolites in human urine using isotope dilution high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Expos. Anal. Environ. Epidemiol.* Vol. 10, 6:789-798.
- Barranguet, C., and J. Kromkamp. 2000. Estimating primary production rates from photosynthetic electron transport in estuarine microphytobenthos. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 204:39-52.
- Barreiro, R., and J. R. Pratt. 1994. Interaction of toxicants and communities: the role of nutrients. *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 13, 3:361-368.
- Belanger, S.E. 1997. Literature review and analysis of biological complexity in model stream ecosystems: Influence of size and experimental design. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* Vol. 36, 1:1-16.
- Belanger, S.E., J.L. Farris, D.S. Cherry, and J. Jr. Cairns. 1990. Validation of *Corbicula fluminea* growth reductions induced by copper in artificial streams and river systems. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47:904-914.
- Bend, J.R., and M.D. James. 1978. Xenobiotic metabolism in marine and freshwater species.

- Pages 125-139 in D. C. Malins and J. R. Sargent, editors. *Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology*. Academic Press, London, UK.
- Benz, R., and D. Cros. 1978. Influence of sterols on ion transport through lipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 506:265-280.
- Biggs, B.J.F. 1995. The contribution of flood disturbance, catchment geology and land use to the habitat template of periphyton in stream ecosystems. *Freshw. Biol.* Vol. 33, 3:419-438.
- Biggs, B.J.F. 1996. Patterns in benthic algae of streams. Pages 31-56 in R. J. Stevenson, M. L. Bothwell and R. L. Lowe, editors. *Algal Ecology*. Academic Press Inc, 525 B Street/Suite 1900/San Diego/CA 92101-4495.
- Biggs, B. J. F., D. G. Goring, and V. I. Nikora. 1998. Subsidy and stress responses of stream periphyton to gradients in water velocity as a function of community growth form. *J. Phycol.* Vol. 34, 4:598-607.
- Blanck, H., Wangberg, S.A. 1988. Induced Community Tolerance in Marine Periphyton established under arsenate stress. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45:1816-1819.
- Blanck, H., and B. Dahl. 1996. Pollution-induced community tolerance (PICT) in marine periphyton in a gradient of tri-n-butyltin (TBT) contamination. *Aquat. Toxicol.* Vol. 35, 1:59-77.
- Blanck, H., and S-A. Wängberg. 1988. Validity of an ecotoxicological test system: short-term and long-term effects of arsenate on marine periphyton communities in laboratory systems. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* Vol. 45:1807-1815.
- Blaylock B.G., Frank M.L., McCarthy J.M. 1985. Comparative toxicity of copper and acridine to fish, *Daphnia*, and algae. *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 4:63-68.
- Bolognesi, C., E. Landini, P. Roggeri, R. Fabbri, and A. Viarengo. 1999. Genotoxicity Biomarkers in the Assessment of Heavy Metal Effects in Mussels: Experimental Studies. *Environ. Mol. Mutag.* Vol. vol. 33, 4:287-292.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of modrogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brake, S.S., H.K. Dannelly, and K.A. Connors. 2001. Controls on the nature and distribution of an alga in coal mine-waste environments and its potential impact on water quality. *Environ. Geol.* 40:458-469.
- Brinkman, R., R. Margaria, and F.J.W. Roughton. 1933. The kinetics of the carbon dioxide carbonic acid reaction. *Phil. Trans. Soc. A:* 232:65-97.
- Brock, T.C.M., R.M.M. Roijackers, R. Rollon, F.Bransen, and L. Vanderheyden. 1995. Effects of nutrient loading and insecticide application on the ecology of Elodea-dominated freshwater microcosms.2. Responses of macrophytes, periphyton and macroinvertebrate grazers. *Arch. Hydrobiol.* Vol. 134, 1:53-74.
- Brock, T.D. 1971. Bimodal distribution of pH values of thermal springs of the world. *Geol. Soc. America. Bull.* 82:1393-1394.
- Brock, T.D. 1978. A sour world: Life and death at low pH. Pages 378-392 in T. D. Brock, editors. *Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures*. Springer-Verlag, New York.
- Brockway, D.L., P.D. Smith, and F.E. Stancil. 1984. Fate and effects of atrazine in small aquatic microcosms. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 32:345-353.
- Burkhard, N., and J.A. Guth. 1976. Photodegradation of atrazine atraton and ametryne in aqueous solution with acetone as photosensitizer. *Pestic. Sci.* 7:65-71.
- Bushway, R.J. 1989. Determination of Atrazine Residues in Food by Enzyme Immunoassay. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42:899-904.
- Butler, G.L., T.R. Deason, and J.C. O'Keally. 1975. The effect of atrazine, 2,4-D, methoxychlor, carbaryl and diazinon on the growth of planktonic algae. *Brit. Phycol. J.* 10:371-376.
- Cairns, J.Jr. 1986. The myth of the most sensitive species. *BioScience.* Vol. 36, 10:670-672.
- Cairns, J.Jr., and B. R. Niederlehner. 1987. Problems associated with selecting the most sensitive species for toxicity testing. *Hydrobiologia.* Vol. 153:87-94.
- Cairns, J.Jr., and B.R. Niederlehner. 1995. Predictive ecotoxicology. Pages 667-680 in D. J. Hoffman, B. A. Rattner, G. Allen Burton and J. Cairns, J., editors. *Handbook of Ecotoxicology*. CRC Press, Boca Raton.
- Cairns, J.Jr. 1983. Are single species toxicity tests alone adequate for estimating environmental hazard? *Hydrobiologia.*

- 100:47-57.
- Cairns, J.Jr. 1988. Should regulatory criteria and standards be based on multispecies evidence? *The Environmental Professional*. Vol. 10:157-165.
- Cairns, J.Jr., and J.R. Pratt. 1989a. *Community Toxicity Testing*. Vol. STP 920. ASTM. Philadelphia, USA.
- Cairns, J.Jr, and J.R. Pratt (Edit). 1989b. *Functional Testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of Chemicals*. Vol. STP 988. ASTM. Philadelphia.
- Caixach, E., I. Espadaler, J. Om, F. Ventura, and J. Rivera. 1990. Fate of organic pollutants in the system of reservoirs of the Ter river supplying water to Barcelona. A study by GC/MS and FAB mass spectrometry. Paper read at Organic micropollutants in the aquatic environment, at Lisbon, Portugal.
- Campbell, P.G.C., and P.M. Stokes. 1985. Acidification and Toxicity of Metals to Aquatic Biota. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42:2034-2049.
- Carlson, A.R., H. Nelson, and D. Hammermeister. 1986. Development and validation of site-specific water quality criteria for copper. *Environ. Toxicol. Chem.* 3:997-1012.
- Carter, J.R. 1972. Some observations on the diatom *Pinnularia acoricola* Hustedt. *Microscopy*. 32:162-165.
- Cid, A., C. Herrero, E. Torres, and J. Abalde. 1995. Copper Toxicity on the Marine Microalga *Phaeodactylum-Tricornutum*: Effects on Photosynthesis and Related Parameters. *Aquat. Toxicol.* Vol. 31, 2:165-174.
- Clarke, S.E., J. Stuart, and J. Sanders-Loehr. 1987. Induction of siderophore activity in *Anabaena spp.* and its moderation of copper toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:917-922.
- Clements, W. H. 1991. Community responses of stream organisms to heavy metals: A review of observational and experimental approaches. Pages 363-391 in M. C. Newman and A. W. McIntosh, editors. *Metal Ecotoxicology. Concepts. Applications.* Lewis Publ.,
- Clements, W.H., D.S. Cherry, and J. Jr. Cairns. 1988. The impact of heavy metals on macroinvertebrate communities: A comparison of observational and experimental results. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49:1686-1694.
- Chapman, B.M., D.R. Jones, and R.F. Jung. 1983. Processes controlling metal ion attenuation in acid mine drainage streams. *Geochim Cosmochim Acta.* 47:1957-1973.
- Chapman, J.L., and M.J. Reiss. 1992. *Ecology. Principles and Applications.* Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Cheung, C. C. C., and P. K. S. Lam. 1998. Effect of cadmium on the embryos and juveniles of a tropical freshwater snail, *Physa acuta* (Draparnaud, 1805). *Water Sci. Technol.* Vol. 38, 7:263-270.
- Decho, A. M. 1990. Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* Vol. 28:73-153.
- DeNicola, D.M. 2000. A review of diatoms found in highly acidic environments. *Hydrobiologia.* Vol. 1-3, 433:111-122.
- Deniseger, J., A. Austin, and W.P. Lucey. 1986. Periphyton communities in a pristine mountain stream above and below heavy metal mining operations. *Freshwater Biol.* 16:209-218.
- Dewey, S.L. 1986. Effects of the herbicide atrazine on aquatic insect community structure and emergence. *Ecology.* Vol. 1, 67:148-162.
- Dodds, W.K., V.H. Smith, and B. Zander. 1997. Developing nutrient targets to control benthic chlorophyll levels in streams: A case study of the Clark Fork River. *Water Res.* Vol. 31, 7:1738-1750.
- Dorgelo, J., H. Meester, and C. van Velzen. 1995. Effects of diet and heavy metals on growth rate and fertility in the deposit feeding snail *Potamopyrgus jenkinsi* (Smith) (Gastropoda: Hydrobiidae). *Hydrobiologia.* 316:199-210.
- Douglas, G. E., John, D.M., Williamson, D.B., and Reid, G. 1998. The aquatic algae associated with mining areas in Peninsula Malaysia and Sarawak: their composition, diversity and distribution. *Nova Hedwigia.* Vol. 67, 1-2:189-211.
- Duran, D., and D. Barceló. 1990. Determination of chlorotriazines and their photolysis products by liquid chromatography with photodiode-array and thermospray mass spectrometric detection. *J. Chromat.* 502:275-286.
- EEA-UNEP. 2000. *Chemicals in the European Union: Low doses high stakes?: EEA and*

- UNEP. The EEA and UNEP Annual Message 2 on the State of Europe's Environment
- EEC. 1976. Council Directive 76/464/EEC of 4 May 1976 on pollution caused by certain dangerous substances discharged into the aquatic environment of the Community. Brussels: European Commission.
- EEC. 1980. Council Directive 80/68/EEC of 17 December 1979 on the protection of groundwater against pollution caused by certain dangerous substances. Brussels: European Commission.
- Ehrlich, H.L. 1990. Geomicrobiology. 2 nd. ed. Marcel Dekker. New York.
- Eichenberger, E., F. Schlatter, H. Weilenmann, and K. Wuhrmann. 1981. Toxic and eutrophication effects of Co, Cu and Zn on algal benthic communities in rivers. Verh. Internat. Verein. Limnol. Vol. 21:1131-1134.
- Enami, I.H., H. Akutsu, and Y. Kyogoku. 1986. Intracellular pH regulation in an acidophilic unicellular alga *Cyanidium caldarium*: <sup>31</sup>P-NMR determination of intracellular pH. Plant Cell Physiol. 27:1351-1359.
- Ernst, W.H.O. 1988. Response to plants and vegetation to mine tailings and dredged materials. Pages in W. Salomons and U. Forstner, editors. Chemistry and biology of solid waste. Springer Verlag, Heidelberg Berlin New York.
- Espadaler, I., J. Caixach, J. Om, F. Ventura, M. Cortina, F. Paune, and J. Rivera. 1997. Identification of organic pollutants in Ter river and its system of reservoirs supplying water to Barcelona/Catalonia, Spain: A study by GC/MS and FAB/MS. Water Res. Vol. 31, 8:1996-2004.
- Falkowski, P.G., and J.A. Raven. 1997. Aquatic photosynthesis. Blackwell. Oxford.
- FAO. 2001. FAOSTAT. <http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture>
- Filbin, G. J., and R. A. Hough. 1983. Extraction of <sup>14</sup>C-labeled photosynthate from aquatic plants with dimethyl sulfoxide (DMSO). Limnol. Oceanogr., Vol. 29, 2:426-428.
- Fiore, M. F., and J. T. Trevors. 1994. Cell composition and metal tolerance in cyanobacteria. BioMetals. Vol. 7:83-103.
- Fogg, G.E., and D.F. Westlake. 1955. The importance of extracellular products of algae in freshwater. Verh. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. 12:219-231.
- Foppen, F.H. 1971. Tables for identification of carotenoid pigments. Chromatogr. Rev. 14:133-198.
- Foster, P. L. 1982a. Metal resistances of Chlorophyta from rivers polluted by heavy metals. Freshw. Biol. Vol. 12:41-61.
- Foster, P.L. 1982b. Species associations and metal contents of algae from rivers polluted by heavy metals. Freshw. Biol. 12:17-39.
- Geankopolis, C.J. 1972. Mass Transport Phenomena. Holt Reinhart and Wilson. New York.
- Geib, K., D. Gollmack, and H. Gimmler. 1996. Is there a requirement for an external carbonic anhydrase in the extremely acid-resistant green algae *Dunaliella acidophila*? Eur. J. Phycol. 31:273-284.
- Genter, R.B. 1996. Ecotoxicology of inorganic chemical stress to algae. Pages 403-468 in R. J. Stevenson, M. L. Bothwell and R. L. Lowe, editors. Algal Ecology. Academic Press Inc, 525 B Street/Suite 1900/San Diego/CA 92101-4495.
- Gently, B., J.M. Briantais, and Baker N.R. 1989. The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochim. Biophys. Acta. 990:87-92.
- Giesy, J.P. Jr. 1985. Multispecies tests: Research needs to assess the effects of chemicals on aquatic life. Paper read at Aquat. Toxicol and Hazard Assessment: Eighth Symposium.
- Giller, K. E., E. Witter, and S. P. McGrath. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. Soil Biology And Biochemistry. Vol. 30, 10-11:1389-1414.
- Gimmler, H., H. Kugel, D. Leibfritz, and A. Mayer. 1988. Cytoplasmic pH of *Dunaliella parva* and *Dunaliella acidophila* as monitored by *in vivo* (<sup>31</sup>P) NMR spectroscopy and the DMO technique. Physiol. Plantarum. 74:521-530.
- Gimmler, H., U. Weiss, and C. Weiss. 1989. pH-Regulation and membrane potential of the extremely acid resistant green alga *Dunaliella acidophila*. Pages 389-390 in J. Dainty, editors. Plant Membrane Transport. Elsevier Science Publ., Venice.
- Gimmler, H.U., and U. Weis. 1992. *Dunaliella acidophila* - life at pH 1.0. Pages 99-133 in M. Avron and B. Ben-Amotz, editors. *Dunaliella* -Physiology, Biochemistry and Biotechnology. CRC Press, Boca Raton.
- Girling, A. E., D. Pascoe, C. Janssen, A. Peither, A. Wenzel, H. Schäfer, B. Neumeier, G. C.

- Mitchell, E. J. Taylor, S. J. Maund, I. Jüttner, J. P. Lay, I. Jüttner, N. O. Crossland, R. R. Stephenson, and G. Persoone. 2000. Development of methods for evaluating toxicity to freshwater ecosystems. *Ecotox. Environ. Safety*. 45:148-176.
- Goldsborough, L.G., and G.G.C. Robinson. 1987. Functional responses of freshwater periphyton to short simazine exposures. *Verh. int. Verein. Limnol.* 21:1586-1593.
- Grady, C.P.L., Jr., and H.C. Lin. 1980. *Biological Wastewater Treatment*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Gregory, S.V. 1983. Plant-herbivore interactions in stream systems. Pages 157-189 in J. R. Barnes and G. W. Minshall, editors. *Stream ecology*. Plenum Press,
- Gross, W. 2000. Ecophysiology of algae living in highly acidic environments. *Hydrobiologia*. Vol. 1-3, 433:31-37.
- Gruessner, B., and M.C. Watzin. 1996. Response of aquatic communities from a Vermont stream to environmentally realistic atrazine exposure in laboratory microcosms. *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 15, 4:410-419.
- Guasch, H. 1995. Primary production of epilithic biofilms in Mediterranean streams. PhD dissertation. University of Barcelona. Barcelona, España.
- Guasch, H., E. Marti, and S. Sabater. 1995. Nutrient enrichment effects on biofilm metabolism in a Mediterranean stream. *Freshw. Biol.* Vol. 33, 3:373-383.
- Guasch, H., I. Munoz, N. Rosés, and S. Sabater. 1997. Changes in atrazine toxicity throughout succession of stream periphyton communities. *J. Appl. Phycol.* Vol. 9, 2:137-146.
- Guasch, H., N. Ivorra, V. Lehmann, M. Paulsson, M. Real, and S. Sabater. 1998. Community composition and sensitivity of periphyton to atrazine in flowing waters: the role of environmental factors. *J. Appl. Phycol.* Vol. 10, 2:203-213.
- Guasch, H., and S. Sabater. 1998. Light history influences the sensitivity to atrazine in periphytic algae. *J. Phycol.* Vol. 34, 2:233-241.
- Guasch, H., and S. Sabater. 1999. Effects of copper on algal communities of a calcareous stream. Paper read at JNABS, at Duluth.
- Guasch, H., W. Admiral, H. Blanck, N. Ivorra, V. Lehman, M. Paulsson, M. Real and S. Sabater. 1999a. Use of lotic periphyton communities as indicators of sensitivity to certain toxicants. In Prygiel, J., Whitton, B.A., Bukowska, J. (eds) *Use of Algae for Monitoring Rivers III*, p. 245-252.
- Gustavson, K., and S.A. Wangberg. 1995. Tolerance induction and succession in microalgae communities exposed to copper and atrazine. *Aquat. Toxicol.* Vol. 32, 4:283-302.
- Hamala, J.A., and H.P. Kolling. 1985. The effects of atrazine on periphyton communities in controlled laboratory ecosystems. *Chemosphere*. 14:1391-1408.
- Hamdy, A.A. 2000. Biosorption of Heavy Metals by Marine Algae. *Curr. Microbiol.* 41:232-238.
- Hamilton, P.B., G.J. Jackson, N.K. Kaushik, and K.R. Solomon. 1987. The impact of atrazine on Lake Periphyton communities including carbon uptake dynamics using track autoradiography. *Environ. Pollut.* 46:83-103.
- Hargreaves, J.W., E.J.H. Lloyd, and B.A. Whitton. 1975. Chemistry and vegetation of highly acidic streames. *Freshw. Biol.* 5:563-576.
- Hashemi, F., G.G. Leppard, and D.J. Kushner. 1994. Copper resistance in *Anabaena variabilis*: effects of phosphate nutrition and polyphosphate bodies. *Microb. Ecol.* Vol. 27:159-176.
- Headley, J.V., J. Gandrass, K.M. Kuballa, and Y. Gong. 1998. Rates of sorption and partitioning of contaminants in river biofilm. *Environ. Sci. Technol.* 32:3968-3972.
- Hebel, D. K., M. B. Jones, and M. H. Depledge. 1996. Responses of crustaceans to contaminant exposure: A holistic approach. Paper read at The Biology of Crustacea, at Plymouth.
- Hill, W. R., and H. L. Boston. 1991. Community development alters photosynthesis-irradiance relations in stream periphyton. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 36, 7:1375-1389.
- Hill, W.R., H.L. Boston, and A.D. Steinman. 1992. Grazers and nutrients simultaneously limit lotic primary productivity. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49:504-512.
- Hill, W. R., and A. W. Knight. 1988. Concurrent grazing effects of two stream insect on periphyton. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 33, 1:15-26.
- Hirshberg, J., and L. McIntosh. 1983. Molecular basis of herbicide resistance in *Amaranthus hybridus*. *Science*. 222:1346-1349.

- Hoagland, K.D., J.P. Carder, and R.L. Spawn. 1996. Effects of organic toxic substances. Pages 469-496 in R. J. Stevenson, M. L. Bothwell and R. L. Lowe, editors. *Algal Ecology*. Academic Press Inc, 525 B Street/ Suite 1900/San Diego/CA 92101-4495.
- Hoagland, K. D., R. W. Drenner, J. D. Smith, and D. R. Cross. 1993. Freshwater community responses to mixtures of agricultural pesticides: Effects of atrazine and bifenthrin. *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 12, 4:627-637.
- Hofstraat, J.W., J.C.H. Peeters, J.F.H. Snel, and C. Geel. 1994. Simple determination of photosynthetic efficiency and photoinhibition of *Dunaliella tertiolecta* by saturating pulse fluorescence measurements. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 103:187-196.
- Hong, S., J.P. Candelone, C.C. Patterson, and C.F. Boutron. 1996. History of ancient copper smelting pollution during Roman and Medieval Times recorded in Greenland ice. *Science*. Vol. 272,5259:246-249.
- Horner, R. R., and E. B. Welch. 1981. Stream periphyton development in relation to current velocity and nutrients. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* Vol. 38:449-457.
- Horner, R.R., E.B. Welch, and R.B. Veenstra. 1983. Development of nuisance periphytic algae in laboratory streams in relation to enrichment and velocity. Pages 121-134 in R. G. Wetzel, editors. *Periphyton of Freshwater Ecosystems*. Dr. W. Junk Publishers, The Hague.
- Howard, P.H. 1991. *Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals*. Lewis. Chelsea, MI, USA.
- Hsieh, K.M., G.A. Murgel, L.W. Lion, and M.L. Shuler. 1994. Interactions of microbial biofilms with toxic trace metals: 1. Observation and modelling of cell growth, attachment, and production of extracellular polymer. *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 44:219-231.
- Huber, W. 1993. Ecotoxicological relevance of atrazine in aquatic systems. *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 12:1865-1881.
- Hull, H.M. 1994. Pages 352 in W. H. Ahrens, editors. *Herbicide Handbook of the Weed Science Society of America*. Humphrey Press, Geneva, NY, USA.
- Hunding, C. and Hargrave, B.T. 1973. A comparison of benthic microalgal production measured by <sup>14</sup>C and Oxygen methods. *J. Fish. Res. Board Can.* 30:309-312.
- Ivorra, N., S. Bremer, H. Guasch, M. H. S. Kraak, and W. Admiraal. 2000. Differences in the sensitivity of benthic microalgae to Zn and Cd regarding biofilm development and exposure history. *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 19, 5:1332-1339.
- Ivorra, N., M.H.S. Kraak, and W. Admiraal. 1995. Use of lake water in testing copper toxicity to desmid species. *Water Res.* Vol. 29, 9:2113-2117.
- Jacobson, G., and G.F. Sparksman. 1988. Acid mine drainage at Captains Flat, New South Wales. *BMR J Austral. Geol. Geophys.* 10:391-393.
- Jeffrey, S., and G.F. Humphrey. 1975a. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 167:191-194.
- Jeffrey, S.W., and G.F. Humphrey. 1975b. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, and c in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* Vol. 167:191-194.
- Jurgensen, T.A., and K.D. Hoagland. 1990. Effects of short-term pulses of atrazine on attached algal communities in a small stream. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* Vol. 19:617-623.
- Karsten. 1996. Fluorimetric method for growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:237-243.
- Kaufman, L.H. 1982. Stream aufwuchs accumulation: disturbance frequency and stress resistance and resilience. *Oecologia.* Vol. 52:57- 63.
- Kelly, M.G., C.J. Penny, and B.A. Whitton. 1995. Comparative Performance of Benthic Diatom Indices Used to Assess River Water Quality. *Hydrobiologia.* Vol. 302, 3:179-188.
- Khummongkol, D., G.A. Canterford, and C. Fryer. 1982. Accumulation of heavy metals in unicellular algae. *Biotechnol. Bioeng.* 24:2643-2660.
- Kiffney, P.M., and W.H. Clements. 1996. Effects of metals on stream macroinvertebrate assemblages from different altitudes. *Ecol. Appl.* Vol. 6, 2:472-481.
- Kimball, K.D., and S. A. Levin. 1985. Limitations of laboratory bioassays: The need for ecosystem-level testing. *Bioscience.* 35:165-171.

- Klaine, S.J. 1987. Biotic and abiotic degradation of atrazine and three of its metabolites in a west Tennessee soil. Memphis, TN, USA: Memphis State University.
- Knuesli, E., D. Berrer, B. Depuis, and H. Esser. 1969. S-Triazines. Pages 51-70 in P. C. Kearney and D. D. Kaufman, editors. Degradation of herbicides. Marcel Dekker, New York, USA.
- Komatsu, H., and P.L. Chong. 1998. Low permeability of liposomal membranes composed of bipolar tetraether lipids from thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. Biochemistry. 37:107-115.
- Kosalwat, P., and A.W. Knight. 1987. Acute toxicity of aqueous and substrate bound copper to the midge, *Chironomus decorus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 16:275-282.
- Kosinski, R.J. 1989. Artificial streams in ecotoxicological studies. Pages in A. B. F. Ribeyre, editors. Aquat. Toxicol: Fundamental concepts and Methodologies. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Kosinski, R., and M.G. Merkle. 1984. The effect of four terrestrial herbicides on the productivity of artificial stream algal communities. J. Environ. Qual. 13:75-82.
- Kramer, J.R. 1982. Alkalinity and acidity. In Water Analysis (1). Academic Press Inc. Chapter 3, p. 131-134.
- Krebs, F. 1985. Ecology. Harper&Row. New York, USA.
- Kristjansson, J.K., and K.O. Stetter. 1992. Thermophilic bacteria. Pages 1-18 in J. K. Kristjansson, editors. Thermophilic bacteria. CRC Press, Boca Raton.
- Lamberti, G. A., L. R. Ashkenas, S. V. Gregory, and A. D. Steinman. 1987. Effects of three herbivores on periphyton communities in laboratory streams. J. N. Am. Benthol. Soc. Vol. 6, 2:92-104.
- Lamberti, G. A., and A.D. Steinman. 1993. Research in artificial streams: applications, uses and abuses. J. N. Am. Benthol. Soc. Vol. 12, 4:313-384.
- Lamoureux, G.L., H.R. Shimabukuro, H.R. Swanson, and D.S. Frear. 1970. Metabolism of 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine (atrazine) in excised sorghum leaf sections. J. Agric. Food. Chem. 18:81-87.
- Lampert, W., W. Fleckner, E. Pott, U. Schober, and K.U. Störkel. 1989. Herbicide effects of planktonic systems of different complexity. Hydrobiologia. 188/189:415-424.
- Langston, W.J., and S.K. Spence. 1995. Biological factors involved in metal concentrations observed in aquatic organisms. Pages in A. Tessier and D. R. Turner, editors. Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. IUPAC. John Wiley and Sons Ltd.,
- Leavitt, P.R., S.R. Carpenter, and J.F. Kitchell. 1989. Whole-lake experiments: the annual record of fossil pigments and zooplankton. Limnol. Oceanogr. 34:700-717.
- Lehman, R. M., F. S. Colwell, and J. L. Garland. 1997. Physiological profiling of indigenous aquatic microbial communities to determine toxic effects of metals. Environ. Toxicol. Chem. Vol. 16, 11:2232-2241.
- Leland, H.V., and J.L. Carter. 1984. Effects of copper on species composition of periphyton in a Sierra Nevada, California, stream. Freshw. Biol. Vol. 14:281-296.
- Leland, H.V., and J.L. Carter. 1985. Effects of copper on production of periphyton, nitrogen fixation and processing of leaf litter in a Sierra Nevada, California, stream. Freshw. Biol. Vol. 15:155-173.
- Les, A., and R.W. Walker. 1984. Toxicity and binding of copper, zinc and cadmium by the blue-green algae, *Chroococcus parisi*. Water Air Soil Pollution. 23:129-139.
- Lewis, M.A. 1995. Use of Freshwater Plants for Phytotoxicity Testing - A Review. Environ. Pollut. Vol. 87, 3:319-336.
- Lichtenthaler, H.K., and Rinderle U. 1988. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. CRC Critical reviews in Analytical Chemistry. Vol. 19 suppl. 1:30-70.
- Loaëc, M., R. Olier, and J. Guezennec. 1997. Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolysaccharide. Water Res. Vol. 31, 5:1171-1179.
- Lock, M. A., and P. H. John. 1979. The effects of flow patterns on uptake of phosphorus by river periphyton. Limnol. Oceanogr. Vol. 24 (2):376-383.
- Loepky, C., and B.G. Tweedy. 1969. Effect of selected herbicides upon growth of soil algae. Weed Sci. 17:110-113.
- Lopez Archilla, A. I., and R. Amils. 1999. A comparative ecological study of two acidic rivers in Southwestern Spain. Microbial

- Ecology. Vol. 38, 2:146-156.
- López-Archilla, A.I., I. Marin, and R. Amils. 1993. Bioleaching and interrelated acidophilic microorganisms from Rio Tinto, Spain. *Geomicrobiol.* 11:223-233.
- Lottermoser, B. G., P. M. Ashley, and D. C. Lawie. 1999. Environmental geochemistry of the Gulf Creek copper mine area, north-eastern New South Wales, Australia. *Environ. Geol.* Vol. 39, 1:61-74.
- Lottermoser, B.G., P.M. Ashley, M. Muller, and B.D. Whistler. 1997. Metal contamination due to mining activities at the Halls Peak massive sulphide deposits, New South Wales. Pages 290-299 in F. P. Ashley PM, editors. *Tectonics and metallogenesis of the New England Orogen.* Geol. Soc. Australia,
- Lowe, R.L., and G.D. Laliberte. 1996. Benthic stream algae: Distribution and structure. Pages 269-293 in F. R. Hauer and G. A. Lamberti, editors. *Methods in Stream Ecology.* Academic Press Inc, 525 B Street/ Suite 1900/San Diego/CA 92101-4495.
- Luederitz, V., and A. Nicklisch. 1989. Response of phytoplankton to copper treatment with reference to species sensitivity. *Int. Rev. Gesamt. Hydrobiol.* Vol. 74, 6:657-668.
- Lynch, T., H.E. Johnson, and W.J. Adams. 1985. Impact of atrazine and hexachlorobiphenyl on the structure and function of model stream ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 4:399-413.
- Lynch, T.R., H.E. Johnson, and W.J. Adams. 1982. The fate of atrazine and a hexachlorobiphenyl isomer in naturally-derived model stream. *Environ. Toxicol. Chem.* 1:179-192.
- Maccrobie, E.A.C. 1974. Ion uptake. Pages 676-713 in W. D. P. Stewart, editors. *Algal physiology and biochemistry.* Blackwell, Oxford.
- Mantoura, R.F.C., and C.A. Llewellyn. 1983. The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta.* 51:297-314.
- Marti, E., and F. Sabater. 1996. High variability in temporal and spatial nutrient retention in Mediterranean streams. *Ecology.* Vol. 77, 3:854-869.
- Mason, A.Z., and K.D. Jenkins. 1995. Metal detoxification in aquatic organisms. Pages 479- 608 in A. Tessier and D. R. Turner, editors. *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems.* John Wiley & Sons, New York.
- Mayasich, J.M., E.P. Karlander, and D.E. Jr. Terlizzi. 1986. Growth responses of *Nannochloris oculata* Droop and *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin to the herbicide atrazine as influenced by light intensity and temperature. *Aquat. Toxicol.* 8:175-184.
- McIntire, C. D. 1964. Some effects of current velocity on periphyton communities in laboratory streams. *Hydrobiologia.* Vol. 27:559-570.
- McIntire, C.D. 1966. Some effects of current velocity on periphyton communities in laboratory streams. *Hydrobiologia.* 45:559-570.
- McIntosh, A. 1974. Notes for the use of copper sulfate in ponds. *Bull. Environ. Contam. Toxicol. Chem.* 1:179-192.
- Medley, C. N., and W. H. Clements. 1998. Responses of diatom communities to heavy metals in streams: The influence of longitudinal variation. *Ecol. Appl.* Vol. 8, 3:631-644.
- Millie, D. F., C.M. Hersh, and C.P. Dionigri. 1992. Simazine-induced inhibition in photoacclimated populations of *Anabaena circinalis* (cyanobacteria). *J. Phycol.* Vol. 28:19-26.
- Morel, J.L., G. Bitton, and B. Koopman. 1988. Use of microtox for assessing copper complexation with organic compounds. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 17:493-496.
- Moreland, D.E. 1980. Mechanisms of action of herbicides. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 31:597-638.
- Mount, D.I., A.E. Steen, and T.J. Norberg-King. 1985. *Validity of Effluent and Ambient Toxicity Testing for Predicting Biological Impact on Five Mile Creek, Birmingham, Alabama.* Springfield, VA; USA: National Technical Information Service.
- Mulholland, P.J., E.R. Marzolf, S.P. Hendricks, R.V. Wilkerson, and A.K. Baybayan. 1995. Longitudinal patterns of nutrient cycling and periphyton characteristics in streams: A test of upstream-downstream linkage. *J. N. Am. Benthol. Soc.* Vol. 14, 3:357-370.
- Muñoz, I., M. Real, H. Guasch, E. Navarro, and S. Sabater. 2000. Resource limitation by

- freshwater snail (*Stagnicola vulnerata*) grazing pressure: an experimental study. *Arch. Hydrobiol.* Vol. 148, 4:517-532.
- Muramoto, S. 1982. Effects of complexants (EDTA and DTPA) on the toxicity of low concentrations of copper to fish. *J. Fish. Sci. Health. A.* 17:313-319.
- Murphy, T.P., D.R.S. Lean, and C. Nalewajko. 1976. Blue-green algae: their excretion of iron selective chelators enables them to dominate other algae. *Science.* 192:900-902.
- Musacchio, A., G. Pinto, S. Sabato, and R. Taddei. 1978. Aioresistenza in diversi ceppi di *Cyanidium caldarium* forma A et forma B. *Delpinoa.* 18/19:37-44.
- Napolitano, G.E., and J.E. Richmond. 1995. Enrichment of Biogenic Lipids, Hydrocarbons and PCBs in Stream-Surface Foams. *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 14, 2:197-201.
- Navarro, E., H. Guasch, I. Muñoz, M. Real, and S. Sabater. 2000. Aplicación de un sistema de canales artificiales en el estudio ecotoxicológico de comunidades microbentónicas. *Limnetica.* 18:1-14.
- Negoro, K. 1985. Diatom flora of the mineralogenous acidotrophic inland waters of Japan. *Diatom.* 1:1-8.
- Niederlehner, B.R., J.R. Pratt, A. L. Jr Buikema, and J. Jr Cairns. 1986. Comparison of estimates of hazard derived at three levels of complexity. Pages 30-48 in J. C. Jr., editors. *Community Toxicity Testing.* ASTM, Philadelphia.
- Nishiushi, Y., and Y. Hashimoto. 1969. Toxicity of pesticides to some fresh water organisms. *Rev. Plant. Prot. Res.* 2:137-139.
- Nordberg, M., and Y. Kojima. 1979. Metallothionein and other low molecular weight metal-binding proteins. Pages in J. H. R. Kagi and M. Nordberg, editors. *Metallothionein.* Birkhauser, Basel.
- Norton, S.B., D.J. Rodier, J.H. Gentile, M.E. Troyer, R.B. Landy, and W. van der Schalie. 1996. The EPA's framework for ecological risk assessment. Pages 703- 716 in D. J. Hoffman, B. A. Rattner, G. A. Burton and J. Cairns Jr, editors. *Handbook of ecotoxicology.* Lewis Publ., Boca Raton.
- Nriagu, J.O. 1996. A History of Global Metal Pollution. *Science.* Vol. 272, 5259:223-224.
- Odum, E.P. 1984. The mesocosm. *BioScience.* 34:558-562.
- Odum, H. T. 1956. Primary production in flowing waters. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 1:102-117.
- OECD. 1984. Guideline for Testing Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems, Procedure 201. Algal Growth Inhibition Test. Paris, Fr.: Organization for Economic Cooperation and Development.
- Olafson, R.W. 1981. Differential pulse polarographic determination of murine metallothionein induction kinetics. *J. Biol. Chem.* 256:1263-1268.
- Olafson, R.W., K. Abel, and R.G. Sim. 1979. Prokaryotic metallothionein: preliminary characterization of a blue-green alga heavy metal-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89:36-43.
- Paulsson, M., B. Nystrom, and H. Blanck. 2000. Long-term toxicity of zinc to bacteria and algae in periphyton communities from the river Göta Älv, based on a microcosm study. *Aquat. Toxicol.* Vol. 47:243-257.
- Peterson, H.G., F.P. Healey, and R. Wagemann. 1984. Metal toxicity to algae: a highly pH dependent phenomenon. *Can. J. Fish. Aquatic. Sci.* 41:974-979.
- Pfeifer, R. F., and McDiffett. 1975. Some factors affecting primary productivity of stream riffle communities. *Archiv für Hydrobiologie.* Vol. 75:306-317.
- Plumley, F., and D.E. Davis. 1980. The effect of a photosynthesis inhibitor, atrazine, o salt marsh edaphic algae, in culture, microecosystems and field. *Estuaries.* 3:217-223.
- Poff, N.L., and K. NelsonBaker. 1997. Habitat heterogeneity and algal-grazer interactions in streams: Explorations with a spatially explicit model. *J. N. Am. Benthol. Soc.* Vol. 16, 1:263-276.
- Pratt, J.R., B.R. Niederlehner, N. Bowers, and J.Jr. Cairns. 1987. Prediction of permissible concentrations of copper from microcosms toxicity test. *Toxicol Assess.* 2:417-436.
- Pratt, J. R., and J. L. Rosenberger. 1993. Community change and ecosystem functional complexity: a microcosm study of copper toxicity. Edited by F. J. D. J.W. Gorsuch, C.G. Ingersoll & T.W. La Point. STP 1216 ed. Vol. 2nd., *Environmental Toxicology and Risk Assessment.* ASTM, Philadelphia.
- Prygiel, J., and M. Coste. 1993. The assessment of water quality in the Artois-Piccardie water basin (France) by the use of diatom indices.

- Hydrobiologia. 302:179-188.
- Prygiel, J., and M. Coste. 1996. Diatoms and diatom indices in the networks for quality measurement of French watercourses: Short history and future. *B. Fr. Pêche. Piscic.* 341-42:65-79.
- Puig, M.A., J. Armengol, G. Gonzalez, J. Peñuelas, S. Sabater, and F. Sabater. 1987. Chemical and biological changes in the river Ter induced by a series of reservoirs. Pages 373-382 in J. F. Craig and J. B. Kemper, editors. *Advances in regulated stream ecology*. Plenum Press, New York.
- Readman, J. W., T. A. Albanis, D. Barcelo, S. Galassi, J. Tronczynski, and G. P. Gabrielides. 1993. Herbicide contamination of Mediterranean estuarine waters: Results from a MED POL pilot survey. *Mar. Pollut. Bull.* Vol. 26:613-619.
- Reed, R.H., and G.M. Gadd. 1990. Metal tolerance in eukaryotic and prokaryotic algae. Pages in J. Shaw, editors. *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary aspects*. CRC Press, Boca Raton, FL; USA.
- Roberts, S., Vasseur, P., and Dive, D. 1990. Combined effects between atrazine, copper and pH, on target and non target species. *Water Res.* Vol. 24, 4:485-491.
- Romani, A.M., and S. Sabater. 1997. Metabolism recovery of a stromatolitic biofilm after drought in a Mediterranean stream. *Arch. Hydrobiol.* Vol. 140, 2:261-271.
- Romano, J., and Knol, J. 1993. Capillary electrophoresis, an environmental method for the determination of anions in waters. *J. Chromat.* 640:403-412.
- Rosemond, A.D., P.J. Mulholland, and J.W. Elwood. 1993. Top-down and bottom-up control of stream periphyton: effects of nutrients and herbivores. *Ecology.* Vol. 74, 4:1264-1280.
- Roses, N., M. Poquet, and I. Muñoz. 1999. Behavioral and Histological Effects of Atrazine on Freshwater Molluscs (*Physa acuta* Drap. and *Ancylus fluviatilis* Müll. Gastropoda). *J. Appl. Toxicol.* 19:351-356.
- Round, F. E. 1991. Diatoms in river water-monitoring studies. *Journal of Applied Ecology.* Vol. 3:129-145.
- Rowan, K.S. 1989. *Photosynthetic Pigments of Algae*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Sabater, F., J. Armengol, and S. Sabater. 1989. Measuring discontinuities in the Ter River (Spain). Fourth International Symposium On Regulated Streams Selected Papers. Petts, G.E. Vol. 3:1-4.
- Sabater, F., H. Guasch, E. Martí, J. Armengol, and S. Sabater. 1995. The Ter: a Mediterranean river case-study in Spain. Pages 419-438 in C. E. Cushing, K. W. Cummins and G. W. Minshall, editors. *River ecosystems of the world*. Elsevier, Amsterdam.
- Sabater, S., J. Armengol, E. Martí, F. Sabater, and H. Guasch. 1991. Benthic diatom communities as descriptors of discontinuities in the river Ter, Spain. Pages 157-163 in B. A. Whitton, E. Rott and G. Friedrich, editors. *Use of algae for monitoring rivers*. Innsbruck, Sabater, S., S. V. Gregory, and J. R. Sedell. 1998. Community dynamics and metabolism of benthic algae colonizing wood and rock substrata in a forest stream. *J. Phycol.* Vol. 34, 4:561-567.
- Sabater, S., H. Guasch, E. Martí, J. Armengol, and F. Sabater. 1992. The Ter, a Mediterranean river system in Spain. *Limnetica.* Vol. 8:141-149.
- Sabater, S., H. Guasch, A. Picon, A. Romani, and I. Muñoz. 1996. Using diatoms communities to monitor water quality in a river after the implementation of a sanitation plan (River Ter, Spain). Pages 97-103 in B. A. Whitton and E. Rott, editors. *Use of Algae for Monitoring Rivers II*. Universität Innsbruck, Innsbruck, Austria.
- Sabater, S., and F. Sabater. 1992. Longitudinal changes of benthic algal biomass in a mediterranean river during two high production periods. *Archiv für Hydrobiologie.* Vol. 124, 4:475-487.
- Sabater, S., F. Sabater, and J. Armengol. 1988. Relationships between diatom assemblages and physico-chemical variables in the river Ter. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* Vol. 73:171-179.
- Samson, G., and R. Popovic. 1988. Use of algal fluorescence for determination of phytotoxicity of heavy metals and pesticides as environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 16:272-278.
- Sand-Jensen, K. 1983. Physical and chemical parameters regulating growth of periphytic communities. Pages 63-71 in R. G. Wetzel, editors. *Periphyton of freshwater ecosystems*. Dr. W. Junk Publ., The Hague.

- Sanusi, A., Millet, M., Mirabel, P. and Wortham, H. Sci. Total Environ. Comparison of atmospheric pesticide concentrations measured at three sampling sites: local, regional and long-range transport. Vol. 263, 1-3: 263-277.
- Sartory, D.P. 1985. The determination of algal chlorophyllous pigments by high performance liquid chromatography and spectrophotometry. Water Res. 19:605-610.
- Say, P. J., and B. A. Whitton. 1982. Chimie et ecologie de la vegetation de cours d'eau en France a fortes teneurs en zinc. 1. Massif Central. Anns. Limnol. Vol. 18, 1:3-18.
- Schiavon, M. 1988 a. Studies of the movement and the formation of bound residues of atrazine, of its chlorinated derivatives, and of hydroxiatrazine in soil using  $^{14}\text{C}$  ring-labelled compounds under outdoor conditions. Ecotoxicol. Environ. Saf. 15:55-61.
- Schiavon, M. 1988 b. Studies of the leaching of atrazine, of its chlorinated derivatives, and of hydroxiatrazine from soil using  $^{14}\text{C}$  ring-labelled compounds under outdoor conditions. Ecotoxicol. Environ. Saf. 15:46-54.
- Schreiber, U., and W. Bilger. 1993. Progress in chlorophyll fluorescence research: major developments during the past ten years in retrospect. Pages 151-173 in U. Lütte and H. Ziegler, editors. Progress in Botany. Springer-Verlag, Berlin.
- Schubnell, D., M. Lehman, W. Baumann, F.G. Rott, B. Wolf, and C.F. Beck. 1999. An ISFET-algal (*Chlamydomonas*) hybrid provides a system for eco-toxicological tests. Biosens Bioelectron. 14:465-472.
- Schwartz, A., and W. Schwartz. 1965. Geomikrobiologische Untersuchungen VII: Über das Vorkommen von Mikroorganismen in Solfataren und heißen Quellen. Z. allg. Mikrobiol. 5:395-405.
- Shannon, C.E., and W. Weaver. 1963. The mathematical theory of communication. University of Illinois Press. Urbana.
- Shimabukuro, R.H. 1967. Atrazine metabolism and herbicidal selectivity. Plant. Physiol. 42:1269-1274.
- Shriner, C. and Gregory, T. 1984. Use of artificial Streams for Toxicological Research. 13:253-281.
- Singh, N. 1977. Effect of pH on the tolerance of *Penicillium nigricans* to copper and other heavy metals. Mycologia. 69:750-755.
- Soldo, D., and R. Behra. 2000. Long-term effects of copper on the structure of freshwater periphyton communities and their tolerance to copper, zinc, nickel and silver. Aquat. Toxicol. Vol. 47, 3-4:181-189.
- Solomon, K.R., D.B. Baker, R.P. Richards, D.R. Dixon, S.J. Klaine, T.W. LaPoint, R.J. Kendall, C.P. Weisskopf, J.M. Giddings, J.P. Giesy, L.W. Hall, and W.M. Williams. 1996. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. Environ. Toxicol. Chem. Vol. 15, 1:31-74.
- Spjøtvoll, E., and M.R. Stoline. 1973. An extension of the T-method of multiple comparison to include the cases with unequal sample size. J. Am. Stat. Assoc. 68:976-978.
- Stadorub, M.E., P.T.S. Wong, C.I. Mayfield, and Y.K. Chau. 1987. Influence of complexation and pH on individual and combined heavy metal toxicity to a freshwater green alga. Can. J. Fish. Aquat. Sci. Vol. 44:1173-1180.
- Starkey, R.C. 1973. Effect of pH on toxicity of copper to *Scytalidium* sp. a copper-tolerant fungus, and some other fungi. J. Gen. Microbiol. 78:217-225.
- Steemann Nielsen, E. 1952. The use of radioactive carbon ( $^{14}\text{C}$ ) for measuring organic production in the sea. J. Cons. Int. Expl. Mer. 18:117-140.
- Steinman, A.D. 1992. Does an increase in irradiance influence periphyton in a heavily-grazed woodland stream? Oecologia. 91:163-170.
- Steinman, A.D. 1996. Effects of grazers on freshwater benthic algae. Pages 341-373 in R. J. Stevenson, M. L. Bothwell and R. L. Lowe, editors. Algal Ecology. Academic Press Inc, 525 B Street/Suite 1900/San Diego/CA 92101-4495.
- Steinman, A.D., C.D. McIntire, and R.R. Lowry. 1987. Effect of herbivore type and density on taxonomic structure and physiognomy of algal assemblages in laboratory streams. J. North. Amer. Benthol. Soc. 6:175-188.
- Steinman, A.D., P.J. Mulholland, and J.J. Beauchamp. 1995. Effects of biomass, light, and grazing on phosphorus cycling in stream periphyton communities. J. N. Am. Benthol. Soc. Vol. 14, 3:371-381.
- Stevenson, R. J. 1983. Effects of current and conditions simulating autogenically changing microhabitats on benthic diatom immigration. Ecology. Vol. 64, 6:1514-1524.

- Stevenson, R.J. 1996. An introduction to algal ecology in freshwater benthic habitats. Pages 3-30 in R. J. Stevenson, M. L. Bothwell and R. L. Lowe, editors. *Algal Ecology*. Academic Press Inc, 525 B Street/Suite 1900/ San Diego/CA 92101-4495.
- Stevenson, R. J., and R. Glover. 1993. Effects of algal density and current on ion transport through periphyton communities. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 38, 6:1276-1281.
- Stewart, A.J., and W.R. Hill. 1993. Grazers, periphyton and toxicant movement in streams. *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 12:955- 957.
- Stratton, G.W. 1984. Effects of the herbicide atrazine and its degradation products, alone and in combination, on phototrophic microorganisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 13:35-42.
- Stumm, W., and J.J. Morgan. 1981. *Aquatic chemistry*. 2nd ed. Wiley. New York.
- Sunda, W., and R.R.L. Guillard. 1976. The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. *J. Mar. Res.* 34:511-528.
- Swallow, K.C., J.C. Westall, D.M. McKnight, N.M. Morel, and F.M.M. Morel. 1978. Potentiometric determination of copper complexation by phytoplankton exudates. *Limnol. Oceanogr.* 23:538-542.
- Swartzman, G.L., F.B. Taub, J. Meador, C. Huang, and A. Kindig. 1990. Modeling the effect of algal biomass on multispecies aquatic microcosms response to copper toxicity. *Aquat. Toxicol.s.* Vol. 2, 17:93-118.
- Takamura, N., Kasai, f., and Watanabe, M.M., 1989. Effects of Cu, Cd and Zn on photosynthesis of freshwater benthic algae. *J. Appl. Phycol.* Vol. 1:39-52.
- Tang, J., K. D. Hoagland, and B. D. Siegfried. 1998a. Uptake and bioconcentration of atrazine by selected freshwater algae. *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 17, 6:1085-1090.
- Tang, J., B. D. Siegfried, and K. D. Hoagland. 1998b. Glutathione-S-Transferase and in Vitro Metabolism of Atrazine in Freshwater Algae. *Pestic. Biochem. Phys.* Vol. 59, 3:155-161.
- Tang, J.X., K.D. Hoagland, and B.D. Siegfried. 1997. Differential toxicity of atrazine to selected freshwater algae. *B. Environ. Contam. Tox.* Vol. 59, 4:631-637.
- Thomas, W.H., O. Holm-Hansen, D.L.R. Seibert, F. Azam, R. Hodson, and M. Takahashi. 1977. Effect copper on phytoplankton standing crop and productivity: controlled ecosystem pollution experiment. *Bull. Mar. Sci.* 27:34-43.
- Thurman, E.M. 1990. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Compared with Gas Chromatography/Mass Spectrometry for the Determination of Triazine Herbicides in Water. *Anal. Chem.* 62:2043-2048.
- Toledo, A.P., J.G. Tundisi, and V.A. D'aquino. 1979. Humic acid influence on the growth and copper tolerance of *Chlorella sp.* *Hidrobiologie.* 71:261-263.
- Torres, A.M., and L.M. O'Flaherty. 1976. Influence of pesticides on *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Stigeoclonium*, *Tribonema*, *Vaucheria* and *Oscillatoria*. *Phycologia.* Vol. 15:25-36.
- Triska, F. J. 1984. Role of woody debris in modifying channel morphology and riparian areas of a large lowland river under pristine conditions: a historical case study. *Ver. Internat. Verein. Limnol.* Vol. 22:1876-1892.
- Triska, F.J., V.C. Kennedy, R.J. Avanzino, G.W. Zwellweger, and K.E. Bencala. 1989. Retention and transport of nutrients in a third-order stream: channel processes. *Ecology.* Vol. 70:1877-1892.
- van Beelen, P., and P. Doelman. 1997. Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. *Chemosphere.* Vol. 34, 3:455-499.
- van Gaans, P. F. M. 1989. WATEQX; a restructured, generalized, and extended Fortran 77 computer code and database format for the WATEQ aqueous chemical model for element speciation and mineral saturation, for use on personal computers or mainframes. *Comput. Geosci.* Vol. 6, 15:843-887.
- Van Kooten, O., and J.F.H. Snel. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth. Res.* 25:147-150.
- Vannote, R.L., G.W. Minshall, K.W. Cummins, J.R. Sedell, and C.E. Cushing. 1980. The river continuum concept. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* Vol. 37, 130-137.
- Veber, K., J. Zahranic, I. Breyl, and F. Kredl. 1981. Toxic effect and accumulation of atrazine in algae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 27:872-876.
- Wang, W.S., and R.G. Tischer. 1973. Studies of

- the extracellular polysaccharides produced by a blue-green alga *Anabaena flos-aquae* A-37. *Arch. Microbiol.* 91:77-81.
- Warren, C.E., and G.E. Davis. 1971. Laboratory stream research: Objectives, possibilities and constraints. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 2:111-142.
- Welch, E.B., J.M. Jacoby, R.R. Horner, and M.R. Seeley. 1988. Nuisance biomass levels of periphytic algae in streams. *Hydrobiologia.* 157:161-168.
- Whitford, L.A., and G.H. Schumacher. 1964. Effect of current velocity on respiration and mineral uptake in *Spirogyra* and *Oedogonium*. *Ecology.* 45:168-170.
- Whitford, L. A., and G. J. Schumacher. 1961. Effects of current on mineral uptake and respiration by a fresh-water alga. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 6:423-425.
- Whitton, B.A. 1970. Toxicity of heavy metals to freshwater algae: a review. *Phykos.* 9:116-125.
- Whitton, B.A., and B.M. Diaz. 1981. Influence of environmental factors on photosynthetic species composition in highly acidic waters. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 21:1459-1465.
- Whitton, B.A., N.L. Gale, and B.G. Wixson. 1981. Chemistry and plants ecology of zinc-rich wastes dominated by blue-green algae. *Hydrobiologia.* Vol. 83:331-341.
- Whitton, B.A., and M.G. Kelly. 1995. Use of algae and other plants for monitoring rivers. *Aust. J. Ecol.* Vol. 20, 1:45-56.
- Whitton, B.A., and E. Rott. 1996. Use of Algae for monitoring rivers II. Proceedings of an International symposium, at Innsbruck, Austria.
- Whitton, B.A., E. Rott, and G. Friedrich. 1991. Use of Algae for monitoring rivers. Proceedings of an International symposium, at Innsbruck, Austria.
- Winer, B.J. 1971. Statistical principles in experimental design. McGraw Hill. New York.
- Wolf, D.C., and J.P. Martin. 1975. Microbial decomposition of ring <sup>14</sup>C-atrazine, cyanuric acid, and 2-chloro-4,6-diamino-s-triazine. *J. Environ. Qual.* 4:134-139.
- Wood, I.B. 1991. The Mount Lyell Mining and Railway Company Limited-an environmental study. Paper read at Proceedings of the Australian Mining Industry Council environmental workshop 1991, at Dickson.
- Wood, J.M., and H.K. Wang. 1983. Microbial resistance to heavy metals. *Environ. Sci. Technol.* 17:582-590.
- Wright, S.W., S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura, C.A. Llewellyn, T. Bjornland, D. Repeta, and N. Welschmeyer. 1991. Improved HPLC methods for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 77:183-196.
- Wurtsbaugh, W.A., and A.J. Horne. 1982. Effects of copper on nitrogen fixation and growth of blue-green algae in natural plankton associations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39:1636-1641.
- Xue, H.B., and L. Sigg. 1990. Binding of Cu (II) to algae in metal buffer. *Water Res.* 24:1129-1136.
- Zapata, M., A.M. Ayala, J.M. Franco, and J.L. Garrido. 1987. Separation of chlorophylls and their degradation products in marine phytoplankton by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Chromatographia.* 23:26-30.

