

# Valoración del efecto de biofiltración de un humedal artificial sobre la calidad del agua afectada por actividades agrícolas.



**Autor:** Iván Monge Adán

**Director:** Enrique Navarro Rodríguez

**Ponente:** José Manuel Nicolau Ibarra



**Escuela Politécnica  
Superior - Huesca**  
**Universidad Zaragoza**





## Resumen

En este trabajo se analizó la capacidad de biofiltración de un humedal artificial sobre los contaminantes derivados de las actividades agrícolas (nutrientes, materia orgánica, pesticidas...). Concretamente se evaluó la capacidad del humedal para reducir la carga de Terbutilazina en las aguas de escorrentía y de excedentes de riego.

Para ello se realizaron muestreos de agua y de comunidades de perifiton a lo largo del humedal. Por una parte se analizó la calidad del agua (incluyendo la presencia de determinados pesticidas, como la Terbutilazina) y por otra se utilizaron las comunidades algales del perifiton como bioindicadores de la presencia y exposición de los organismos acuáticos a la Terbutilazina. Para esta última parte, se recogieron comunidades de perifiton que crecieron en diferentes puntos del humedal (punto de entrada, punto intermedio y punto de salida) y se midió cuan sensible era la fotosíntesis de estas comunidades a la Terbutilazina. El uso de experimentos de dosis respuesta permitió estimar la concentración de herbicida necesaria para reducir al 50% la eficiencia fotosintética de las comunidades de perifiton ( $EC_{50}$ ). La hipótesis de trabajo es que la exposición continuada de una comunidad biológica a un agente contaminante, modifica la composición de dicha comunidad, eliminando o reduciendo la presencia de las especies más sensibles y favoreciendo el desarrollo y dominancia de las más tolerantes. Ello lógicamente, debería verse reflejado en un incremento de la  $EC_{50}$ .

Los resultados mostraron que los cambios en la calidad de agua provocados por la biofiltración, incrementaron la diversidad de especies algales a lo largo del humedal. Estos cambios no fueron provocados tanto por la disminución de la concentración de Terbutilazina como por la disminución de la de la materia orgánica, sólidos sedimentables y nitratos. Sin embargo, el incremento en la tolerancia (reflejo de una mayor exposición al herbicida o lo que es lo mismo de su biodisponibilidad) a la Terbutilazina en el tramo intermedio y en la salida, se relacionó con potenciales aportes laterales de excedentes de regadío de zonas donde se utiliza dicho herbicida.



<b>ÍNDICE</b>	<b>Pág.</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 Situación actual de la agricultura	7
1.2 Efectos de la agricultura en los ecosistemas acuáticos	7
1.3 Utilización de humedales artificiales	7
1.4 Terbutilazina	8
1.5 Muestreo y experimentación con perifiton	9
1.6 Fotosíntesis	10
1.7 Fluorescencia de la clorofila para estimar la actividad fotosintética	12
1.8 Objetivos	12
<b>2 MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
2.1 Descripción de la zona	13
2.2 Trabajo in situ	14
2.2.1 Cronograma de visitas	
2.2.2 Instalación de sustratos artificiales para el perifiton	
2.2.3 Medición de parámetros fisicoquímicos del agua	
2.2.4 Toma de muestras para analizar en el laboratorio	
2.3 Trabajo de laboratorio	15
2.3.1 Determinación de parámetros fisicoquímicos	
2.3.2 Determinación de la concentración de herbicidas	
2.3.3 Análisis del perifiton	
2.3.4 Experimento dosis respuesta en canales de recirculación	
<b>3 RESULTADOS</b>	
3.1 ANÁLISIS FISICOQUÍMICO DEL AGUA	20
3.2 CONCENTRACIÓN DE HERBICIDAS EN EL AGUA	23
3.3 EXPERIMENTO DOSIS-RESPUESTA	25
3.3.1 Pre-experimento	
3.3.2 Resultados del experimento	
3.4 ANÁLISIS DEL PERIFITON	28
<b>4 DISCUSIÓN</b>	
4.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS	31
4.2 CONCENTRACIÓN DE NUTRIENTES	31
4.3 CONCENTRACIÓN DE HERBICIDAS	32
4.4 ECOTOXICOLOGÍA	33
4.5 PERIFITON	34
<b>5 CONCLUSIONES</b>	36
<b>6 REFERENCIAS</b>	37
<b>7 ANEXOS</b>	40
<b>8 AGRADECIMIENTOS</b>	53



# 1-INTRODUCCIÓN

---

## ***1.1-SITUACIÓN ACTUAL DE LA AGRICULTURA***

La agricultura engloba al conjunto de intervenciones humanas que modifican los ecosistemas para maximizar la producción de vegetales y minimiza las pérdidas de energía a lo largo de las cadenas tróficas (Ewert et al., 2002). De las 270.000 especies de plantas que se conocen, solo se cultivan unas 200 especies, y de ellas tan solo 24 son básicas en la alimentación y tienen por tanto una gran importancia económica. La base de la alimentación humana la constituyen las semillas ricas en hidratos de carbono de algunas gramíneas: trigo, arroz, maíz, centeno, cebada y avena (Reichholf, 2009).

La agricultura moderna, capaz de satisfacer las necesidades de una humanidad en constante crecimiento, se basa en el uso de agroquímicos, equipos mecánicos y el uso de variedades mejoradas genéticamente de plantas. Esto aunque redundante en un notable incremento de la producción, conlleva graves impactos ambientales sobre los ecosistemas circundantes, como la contaminación y la destrucción o agotamiento de los recursos naturales. La contaminación se debería debido principalmente a los nitratos y otros nutrientes, residuos de plaguicidas, la salinización por regadíos y las emisiones y deposiciones de amoníaco y metano, mientras que la destrucción de los recursos naturales se debería al uso inadecuado y excesivo del agua y del suelo, con la consiguiente destrucción de la cobertura natural del suelo y de su biodiversidad (Reichholf, 2009).

## ***1.2-EFECTOS DE LA AGRICULTURA EN LOS ECOSISTEMAS ACUÁTICOS***

La agricultura afecta particularmente a los ecosistemas fluviales cercanos. Esto se debe, entre otros, a la erosión de los suelos y al transporte de sedimentos, nutrientes y pesticidas desde los suelos agrícolas hasta los cursos de agua cercanos (Kroeze & Seitzinger, 1998). Dichos compuestos afectan a los organismos acuáticos, entre ellos a los productores primarios (algas y macrófitos), que son la base de las cadenas tróficas (Fairchild, Ruessler, & Carlson, 1998). Estos organismos son especialmente sensibles a la llegada de herbicidas que se han diseñado para tratar las “malas hierbas”.

Estos últimos años, se han mejorado muchas de las prácticas agrarias con el fin de minimizar su impacto en el medio ambiente. Por ejemplo, se han implementado manuales de buenas prácticas, que reducen y maximizan el uso y aplicación de agroquímicos. Otra de las posibilidades es el uso de sistemas que traten el agua que escapa de los cultivos, cargada de abonos y pesticidas, antes de que llegue a los ríos cercanos. Una de esos sistemas es la construcción de humedales artificiales, que mediante la biofiltración y otros fenómenos, logran reducir la carga contaminante de esas aguas antes de su llegada a los sistemas naturales.

## ***1.3-UTILIZACIÓN DE HUMEDALES ARTIFICIALES***

A nivel europeo la directiva Marco del Agua (WFD, 2000/60/CE), establece que todos los estados miembros de la Unión Europea deben garantizar que la calidad de las aguas superficiales y subterráneas alcancen un buen estado ecológico para el año 2015. Uno de los métodos utilizados para alcanzar este objetivo es la utilización de filtros verdes, como puede ser un humedal artificial (zonas donde el agua circula a muy baja velocidad, con numerosas plantas acuáticas, elevadas tasas de sedimentación y de actividad biológica y microbiana). Se denomina filtro verde a una tecnología

de bajo coste que aprovecha la capacidad física, química y biológica del suelo para depurar las aguas contaminadas. (Martin, 1998). Esta tecnología es la que se aplica actualmente en el término municipal de Lalueza, como parte de un proyecto LIFE de la Unión Europea, titulado CREACIÓN Y RESTAURACIÓN DE ECOSISTEMAS ACUÁTICOS PARA LA MEJORA DE LA CALIDAD DEL AGUA Y LA BIODIVERSIDAD EN LAS CUENCAS AGRÍCOLAS (ver más detalles en su web <http://www.creamagua.com>).

Con una planificación adecuada, la restauración de humedales y su creación pueden ser herramientas útiles para la mejora de la calidad del agua de los ecosistemas naturales en los territorios agrícolas (Comin, 2013). Las ventajas que posee la utilización de un filtro verde son: un bajo coste de mantenimiento y construcción, facilita la repoblación forestal, pudiendo producir rentabilidad maderera, reduce el impacto ambiental de aguas contaminadas y puede ser utilizado como hábitat para numerosas especies. Por otro lado, estos sistemas también tienen sus limitaciones: riesgo de contaminación de acuíferos (por lo que no pueden construirse en presencia de pozos ni tomas de agua potable), molestias como mal olor e insectos y en periodos extremos de frío o muy lluviosos pueden tener una funcionalidad limitada (Martin, 1998).

La utilización de filtros verdes se ha utilizado con éxito para el tratamiento de aguas residuales (alcantarillado municipal, lixiviados de vertederos, aguas residuales, aguas industriales,...). Sin embargo el tratamiento para aguas de escorrentía todavía está en desarrollo (Sundaravadivel & Vigneswaran, 2001).

#### **1.4- TERBUTILAZINA**

El herbicida objeto de este estudio es la Terbutilazina, perteneciente a la familia de las triazinas. Éstos son herbicidas inhibidores de la fotosíntesis (Markwell, 2005); su efecto se debe a que bloquean el transporte de electrones en la membrana del tilacoide en PS II (M. LeBaron, 2008). Este método de acción afecta a todo tipo de organismos fotosintéticos incluyendo microalgas (Blanck, Wallin, & Wangberg, 1984; Dorigo, Bourrain, Berard, & Leboulanger, 2004; Larras, Montuelle, & Bouchez, 2013).

La Terbutilazina se utiliza en el tratamiento de preemergencia y poseemergencia de una gran variedad de cultivos agrícolas, así como en la silvicultura, su degradación en aguas naturales depende de la presencia de sedimentos y de la actividad biológica, con una vida media de 50 días, que en presencia de radiación solar puede llegar a disminuir hasta los 30 días. (OMS, 2003). Otros estudios aseguran que la radiación solar no es capaz de fotodegradar este compuesto, ya que el rango de absorción de la radiación de la Terbutilazina está por debajo de 300 nm y la radiación solar tiene su rango de emisión alrededor de los 300 nm, aunque sí que es verdad que se podría llegar a obtener reacciones fotosensibilizadoras en aguas natural en presencia de sustancias húmicas con unas concentraciones elevadas (Klementova, 2012), también es reconocido este efecto en presencia de nitratos (Cartagena, 2013; Hansen, 2013).

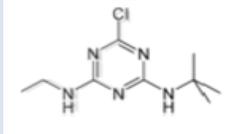
Nombre Común (ISO)	Terbutilazina
Formulación (IUPAC)	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>5</sub>
Nombre CAS	5915-41-3
Masa molecular (g/mol)	3,4
Coefficiente de partición octanol-agua (log Kow)	3,4
Hidrólisis acuosa DT50 (días) a 20 ° C y pH 7	>365 Muy persistente
Solubilidad en agua (mg/L)	6
Vida media en el suelo (promedio días)	30
Vida media de hidrólisis (Promedio días)	75
Aplicación	En uso desde 2002
Límites de la UE para el agua potable y el medio ambiente (mg/L)	0,1
Estructura molecular	

Tabla 1. Características de la Terbutilazina.

Para cuantificar el herbicida en los ecosistemas acuáticos se lleva a cabo mediante la toma de muestras de agua en momentos específicos (Alvarez et al., 2005). El análisis de estas muestras proporciona un valor de concentración en µg/L. Nuestro muestreo se realizó mediante la toma de muestras en 3 puntos del humedal, (punto de entrada, punto intermedio y punto de salida, ver imagen 1), estas se enviaron a analizar al Instituto Geológico y Minero de España (I.G.M.E.).

### 1.5-MUESTREO Y EXPERIMENTACIÓN CON PERIFITON

El perifiton es una comunidad formada por diversos grupos de microorganismos como virus, bacterias, hongos, algas, protozoos y microinvertebrados (Costerton et al., 1994). Las comunidades perifíticas desempeñan papeles fundamentales tanto en la red trófica como en los ciclos biogeoquímicos (Battin, Kaplan, Newbold, & Hansen, 2003). Su alto número de especies y su facilidad de muestreo permite realizar estudios comparativos. Por esta razón, varios estudios han demostrado que el perifiton es un bioindicador fiable para el estado ecológico de los ecosistemas de agua dulce (Rimet & Bouchez, 2012) y juegan un papel importante en la absorción y retención de nutrientes (Guasch H, 1997).

En este trabajo se desarrollaron comunidades de perifiton sobre sustratos artificiales (biofilms) colocados en el curso de agua en la entrada del humedal, en un punto intermedio y al final del humedal. **La hipótesis de trabajo es que los cambios en la calidad del agua provocados por la biofiltración, provocaran condiciones ambientales diferentes en las aguas de la entrada, en las aguas del punto intermedio y en las aguas de la salida del humedal. Estas condiciones (nos centraremos en los cambios en la concentración de herbicida) se reflejarán en las comunidades de perifiton, haciendo que difieran en su estructura (especies) y en su fisiología (tolerancia diferente a los herbicidas).** Este último punto se basa en el Pollution Induced Community Tolerance concept (PICT).

El PICT se define como una medida de la capacidad de una comunidad biótica para resistir el impacto de un agente tóxico (Blanck, Wänberg, & Molander, 1988), este tóxico eliminará o reducirá la presencia de las especies sensibles, favoreciendo el desarrollo y dominancia de las más tolerantes. El efecto se puede cuantificar mediante una gran variedad de métodos, en nuestro caso se utilizó

curvas de dosis respuesta, midiendo la tolerancia de la fotosíntesis del perifiton frente al herbicida (utilizando técnicas de fluorimetría que valoran la eficiencia de fotosintética: i.e. la capacidad de transformar energía lumínica en química). El parámetro que se utilizó para determinar la tolerancia al herbicida fue la  $EC_{50}$  (concentración efectiva necesaria para reducir al 50% la eficiencia fotosintética de las comunidades de perifiton).

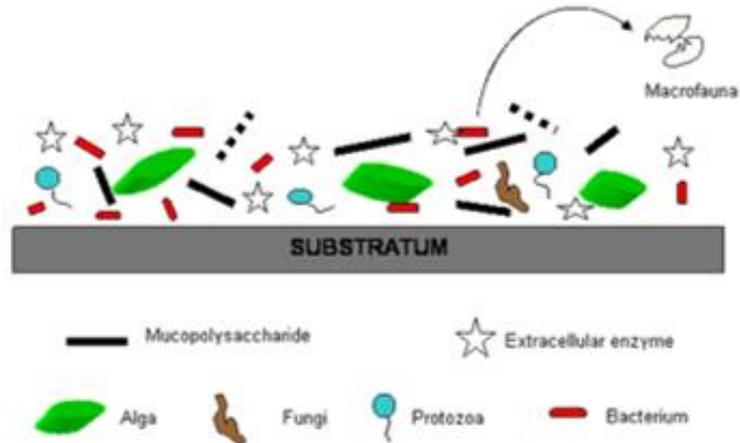


Figura 3. Representación de la composición del perifiton.

En los biofilms se midió la clorofila *a* (Ritchie, 2006) y su fluorescencia basal, lo que permitió valorar la biomasa en cada caso. El espesor del perifiton aumenta en las zonas con mayor nutrientes, y esto puede influir en las mediciones del rendimiento fotosintético de las células expuestas a los herbicidas (Crossey et al., 1988). De modo similar la penetración de los metales a través del biofilm, puede verse afectada, ya que los exudados polisacáridos pueden adsorber eficientemente los metales, y por lo tanto reducir su penetración y su toxicidad (Navarro, Guasch, & Sabater, 2002). Por ello, y para evitar estos efectos, se realizaron siempre los test en biofilms que presentaban biomasa similares.

### 1.6-FOTOSÍNTESIS

Es el proceso fisicoquímico por el cual plantas, algas, bacterias fotosintéticas y algunos protoctistas utilizan la energía de la luz solar para sintetizar compuestos orgánicos. Este proceso, en los organismos eucariotas (célula con núcleo diferenciado), se realiza en los cloroplastos.

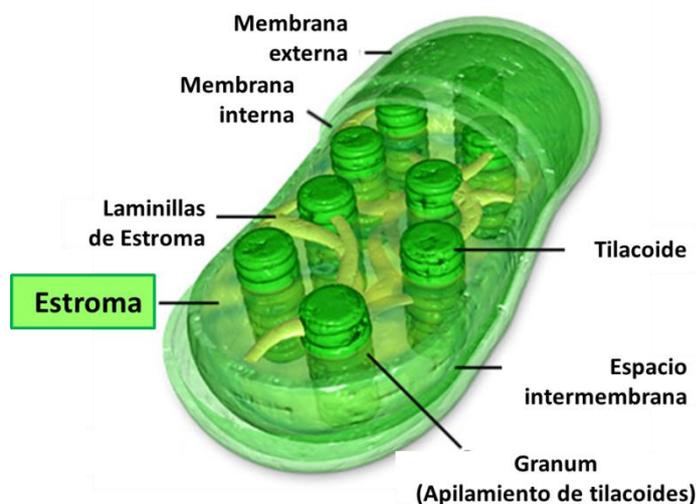
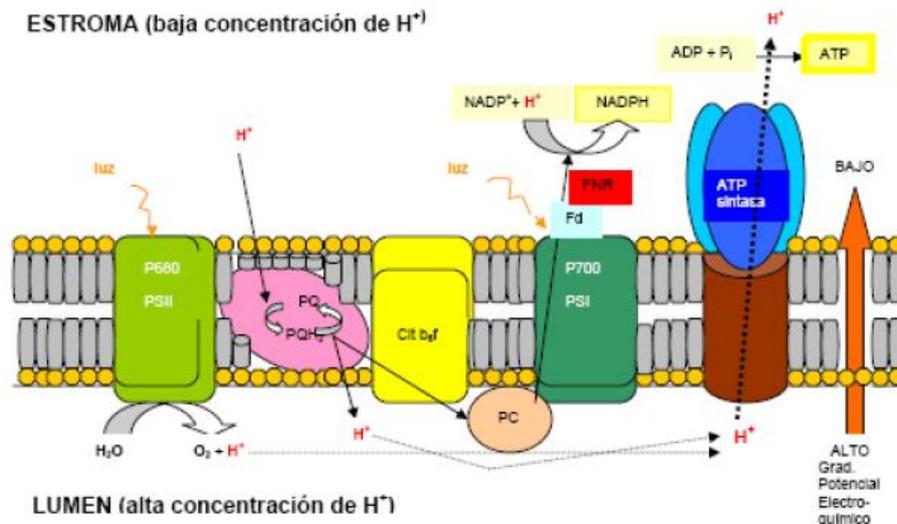


Figura 1. Representación de un cloroplasto. Fuente: <http://www.artinaid.com>

Los organismos fotosintéticos contienen uno o más pigmentos capaces de absorber radiación luminosa en el rango de las longitudes de ondas visibles para el ojo humano (400-700 nm), y que son las responsables de desencadenar las reacciones fotoquímicas de la fotosíntesis. Parte de la energía luminosa absorbida por clorofilas y carotenoides se almacena al final del proceso fotosintético como energía química. La mayoría de los pigmentos actúan como una antena captando la luz y transfiriendo la energía (proceso físico) al centro de reacción al que están asociados y donde se transfieren electrones desde la clorofila a una molécula aceptora de electrones (Pérez, 2009).

La transferencia de los electrones entre las diferentes moléculas implicadas en la fotosíntesis, se produce en el tilacoide (estructura de la membrana interna del cloroplasto). En él encontramos dos complejos fotoquímicos denominados fotosistema I (PSI) y fotosistema II (PSII) en los que tienen lugar las reacciones iniciales de transferencia de energía desde un fotón a moléculas orgánicas.



**Figura 2. Transferencia de protones y electrones entre fotosistema II, complejo citocromo b6/f, fotosistema I y ATP sintasa. Fuente: Reduza (Biología). Serie Fisiología Vegetal.**

Cuando dos electrones del PSII absorben 2 fotones de luz, estos aumentan su nivel de energía para dar un salto hacia el aceptor de electrones del fotosistema, en este proceso de entrelazado, los fotones interactúan con dos moléculas de agua presentes en el interior del tilacoide, oxidando el agua y produciendo  $O_2$ , liberando así protones al lumen, que se encuentra en el interior del tilacoide.

Los dos electrones energizados se liberan hacia moléculasceptoras denominada plastoquinona (PQ) que residen en la membrana del tilacoide, simultáneamente bombea iones de  $H^+$  del estroma hacia dentro de los tilacoides usando la energía de los fotones de luz liberados durante el transporte a medida que los electrones intercambian energía hacia el aceptor final, que es el citocromo b6/f, el cual recibe los electrones y los cede al PSI.

El PSI reduce el nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ( $NADP^+$ ) a nicotinamida adenín dinucleótido fosforilado reducido (NADPH) en el estroma, gracias a la acción de una ferredoxina (fd) y una flavoproteína ferredoxina-NADP reductasa (FNR).

Dentro de los tilacoides, los protones de  $H^+$  se concentran y se difunden de las partes con más alta concentración a las de más baja concentración. Al mismo tiempo protones de  $H^+$  se disipan hacia el estroma, generando energía que permite que la enzima ATP-sintasa (situada en la membrana de los tilacoides) sintetice adenosin difosfato (ADP) y fosfato para formar adenosin trifosfato (ATP), liberando las moléculas de ATP hacia el estroma.

Una vez que se han generado las moléculas de ATP y NADPH<sub>2</sub>, la siguiente fase ocurre en el estroma de los cloroplastos, donde finalmente se obtiene energía para formar varios compuestos orgánicos, como pueden ser celulosa, lípidos y aminoácidos (Estefani; Pérez, 2009).

### ***1.7-LA FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA COMO MÉTODO PARA ESTIMAR LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA***

La energía luminosa absorbida por las moléculas de clorofila en la vegetación es utilizada para: la actividad fotosintética, el exceso de energía que puede disiparse en forma de calor o se puede remitir como luz, conocido como fluorescencia de la clorofila (Maxwell & Johnson, 2000). Estos tres procesos se producen de modo que cualquier aumento en la eficiencia de uno resultara una disminución en el rendimiento de los otros dos. Por lo tanto, mediante la medición de la variación de la fluorescencia de la clorofila (yield), se obtiene información sobre los cambios en la actividad en la eficiencia fotosintética (Lorente et al., 2014).

La amplitud del pulso de la fluorescencia modulada (PAM) fue la técnica elegida para estudiar la actividad fotosintética de los biofilms, es muy utilizada en ecotoxicología para la detección de los impactos tóxicos en este tipo de comunidades (Brack & Frank, 1998). Esta técnica mide la fluorescencia variable a partir de Chl *a*, asociada con el PS II, objetivo de inhibición de la Terbutilazina. El dispositivo fluorimétrico emite un pulso de luz de alta frecuencia que satura todo PS II en la cadena fotosintética, midiendo la fluorescencia del PSII antes y después del pulso de la saturación y calcula el rendimiento. Esta técnica permite realizar mediciones de la misma muestra varias veces ya que es una técnica no destructiva (Lorente et al., 2014).

### ***1.8-OBJETIVOS***

El presente Trabajo de Fin de Grado tuvo como objetivo principal el estudio de la capacidad de biofiltración de un humedal artificial, valorando la calidad del agua a través de la respuesta de los productores primarios (biofilms algales), que crecen en el agua antes y tras su paso por el humedal en la primavera de 2014. Para ello se plantearon tres objetivos específicos:

- Análisis de las propiedades físico-químicas del agua antes y tras su paso por el humedal.
- Caracterización de las comunidades de productores primarios (biofilms algales) que crecen antes, en un punto intermedio y después del humedal.
- Valoración de la respuesta ecotoxicológica de los biofilms algales a la presencia de la Terbutilazina, como compuesto tóxico representativo de las actividades humanas en la cuenca.

# 2-MATERIAL Y METODOS

## 2.1-DESCRIPCIÓN DE LA ZONA

El estudio se llevó a cabo en la primavera del 2014 en Lalueza (Aragón), en un humedal artificial restaurado perteneciente a la cuenca del río Ebro. Este humedal forma parte del proyecto CREAMAGUA, fue elegido para el proyecto debido a su elevada carga de nitratos producida por la intensidad de usos agrícolas aguas arriba.

En la siguiente tabla se muestra las actuaciones llevadas a cabo por el proyecto CREAMAGUA. Los humedales *in stream*, son los que se encuentran en un cauce de drenaje natural, de escorrentía superficial, a la cual llegan los excedentes del riego agrícola por sus propios drenajes o azarbes(CREAMAGUA, 2012).

Municipio	Zona	Tipo de actuación		S.I. (ha)	S.A. (ha)	S.INF. (ha)
Lalueza	Lalueza-05	Restauración	In stream	7,43	11,54	54,35

**Tabla2. Resumen de extensión y actuación en el humedal de Lalueza. Fuente: CREAMAGUA**

**S.I.:** Superficie de inundación (lámina de agua permanente); **S.A.:** Superficie de actuación; y **S.INF.:** Superficie de influencia.

La vegetación utilizada en la restauración del humedal fue típica de zonas inundadas, encharcadas y húmedas: *Scirpus holoschoenus* (zonas semisecas), *Juncus acutus* (zonas húmedas), *Iris pseudoacorus* (zonas inundadas) y *Lythrum salicaria* (zonas encharcadas) (Monegros, 2012).

En la siguiente imagen se muestra la zona de estudio, marcando los 3 puntos de muestreo, punto de entrada (latitud: 41°49'53.80"N y longitud: 0°16'46.00"O), punto intermedio (latitud: 41°50'6.98"N y longitud: 0°15'20.40"O) y punto de salida (latitud: 41°50'7.00"N y longitud: 0°15'13.63"O)



**Imagen1. Zona de estudio. Fuente: Google Earth**

## 2.2-TRABAJO IN SITU

### 2.2.1-Cronograma de visitas

La instalación de los biofilms se realizó el 13/05/2014 y su recogida fue el 12/06/2014, durante este periodo se realizaron 7 salidas a la zona de estudio.

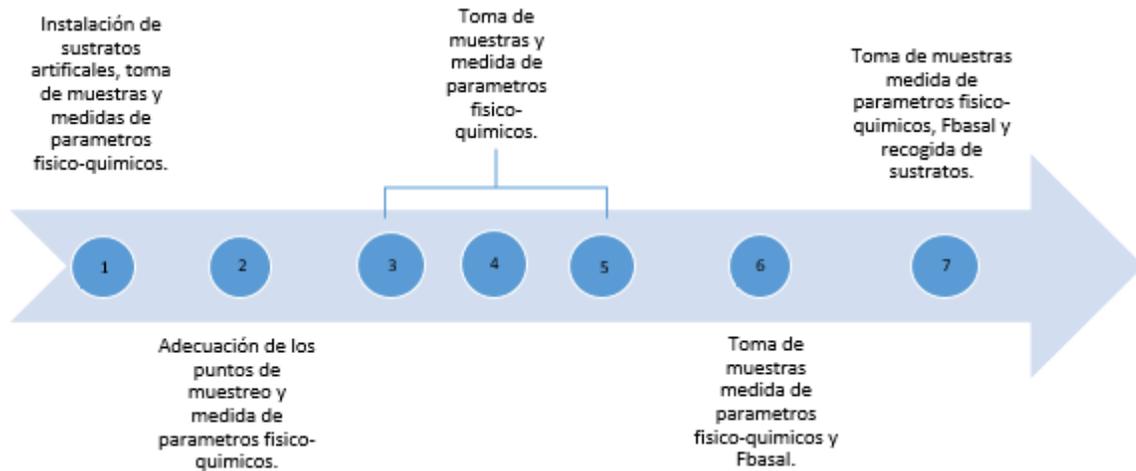


Figura 4. Cronograma de instalación de sustratos y toma de muestras, representado por número de muestreos.

### 2.2.2-Instalación de sustratos artificiales para el perifiton

El perifiton se cultivó en sustratos artificiales, los cuales disponían de 24 portaobjetos (7,55 x 2 x 0,15 cm), estos sustratos se situaron en los 3 puntos de la zona de estudio (2 en cada punto), anclados en posición horizontal sobre el agua. Los sustratos artificiales se recogieron cuando alcanzaron un espesor  $\approx 0,75$  mm y un contenido de clorofila en torno a  $12-13 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , valores los cuales son aceptables para mostrar unos resultados satisfactorios en los experimentos (Lorente et al., 2014).

Para el correcto crecimiento del perifiton en los sustratos artificiales fue necesario la adecuación de los puntos de muestreo, para ello se cortaron los carrizos que hacían sombra a los sustratos artificiales, con esta intervención se favoreció el aumento de radiación solar y el mejor crecimiento del perifiton.



Imagen 2. Adecuación del punto de muestreo de entrada.

### **2.3-Medición de parámetros fisicoquímicos del agua**

La temperatura (°C), Ph, conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), conductividad específica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), oxígeno disuelto (% y mg/L) y el potencial de óxido reducción (mv), se midieron in situ con una sonda (model Pro-Plus de YSI, EE.UU.).

#### **2.2.4-Toma de muestras para analizar en el laboratorio**

La recogida de muestras consistió en tomar 1,5L de agua para la determinación de parámetros fisicoquímicos y 0,5L de agua para la determinación de concentración de herbicidas, este proceso se realizó en cada uno de los puntos de muestreo.

Para la determinación de parámetros fisicoquímicos se recogieron un total de 15 muestras (5 por punto de muestreo), para la determinación de la concentración de herbicidas se recogieron un total de 12 muestras (4 por punto de muestreo).

## **2.3-TRABAJO DE LABORATORIO**

### **2.3.1-Determinación de parámetros fisicoquímicos del agua**

Una vez la muestra de agua en el laboratorio, se tomó un litro de la muestra y se hizo pasar mediante una bomba de vacío a través de un filtro GF/C de  $1,2\mu$  (previamente pesado).

#### **Sólidos**

Se determinaron los sólidos en suspensión totales, materia orgánica y los sólidos disueltos totales siguiendo el protocolo que aparece en (Orozco, 2002).

#### ***Sólidos en suspensión totales (S.S.T.)***

Se determinó la cantidad de materia retenida por el filtro mediante diferencia de pesada al introducir los filtros en una estufa a  $105^{\circ}\text{C}$ , y se expresó en mg/l (ppm).

#### ***Materia orgánica (M.O.)***

El filtro utilizado en la determinación anterior, se introdujo en una mufla a  $550^{\circ}\text{C}$  (temperatura a la que se considera que se volatiliza toda la materia orgánica), obteniendo los sólidos en suspensión fijos. La diferencia entre los sólidos en suspensión totales y los sólidos en suspensión fijos representa la cantidad de materia orgánica expresada en mg/L.

#### ***Sólidos disueltos (S.D.)***

Se añadieron 25 ml del agua filtrada en un tubo de cristal (previamente pesado) y se introdujo en estufa a  $105^{\circ}\text{C}$  durante 4 h, por pesada se determinó el residuo que permaneció en la cápsula empleada y se expresa en mg/l (ppm).

#### **Alcalinidad**

Se tomaron 100 ml de la muestra filtrada y mediante el principio de neutralización, utilizando ácido sulfúrico e indicadores colorimétricos, se obtiene el valor de la alcalinidad, expresado en mg/L.

## Nutrientes

Se tomaron 300 ml de cada muestra filtrada, donde se midieron las concentraciones de potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), azufre (S), fosfato ( $\text{PO}_4^-$ ) y tres formas de nitrógeno: nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), Nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), analizados por un cromatógrafo, 861 Advanced compact IC (Metrohm, Switzerland).



Figura 5. Resumen de la determinación de parámetros fisicoquímicos.

### **2.3.2-Determinación de la concentración de herbicidas**

Las concentraciones de herbicidas se analizaron en los laboratorios del I.G.M.E. Una vez obtenidos los resultados, se pudo calcular la disminución de concentración de herbicidas que produce la instalación del sistema mediante la siguiente ecuación (Stehle et al., 2011) :

$$\text{Disminución del herbicida (\%)} = \frac{\text{Concentración inicial} - \text{Concentración final}}{C.inicial} * 100$$

### **2.3.3- Análisis del perifiton**

El análisis del perifiton consistió en la determinación de la concentración de la clorofila  $\alpha$  y la diversidad de especies algales presentes en cada uno de los puntos de muestreo.

#### Clorofila

Para realizar el análisis de la clorofila, se raspo el perifiton del uno de los porta objetos de los sustratos artificiales y se introdujo en un tubo falcon (envuelto en papel de aluminio para evitar el mínimo contacto con la luz), al cual se vertieron 8 ml de acetona al 90%, este tubo falcon se sónico durante 1 minuto, pasado este minuto, se metió en la nevera hasta el día siguiente. A las 24h, se volvió a sonicar 1 minuto y se introdujo en una centrifugadora durante 10 minutos a 2500 revoluciones, una vez terminado este proceso se midió con un espectrofotómetro (Jeffrey & Humphrey, 1975). Finalmente las concentraciones de clorofila se obtuvieron con la fórmula que se muestra a continuación (Ritchie, 2006).

$$\text{Chl } \alpha \text{ (\mu g/ml)} = - 1.7858 * \lambda 647 + 11.8668 * \lambda 664 \text{ (error } < 0.01 \text{ \mu g/ml)}$$

El valor obtenido se multiplico por el volumen de muestra añadido en el espectrofotómetro y dividido por el área de superficie del sustrato del perifiton, obteniendo como unidades finales  $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ . Este proceso se realizó en los 3 puntos de muestreo.

### Análisis taxonómico e índices de diversidad

Para realizar el análisis taxonómico se introdujeron una muestra de perifiton de cada punto en botes de 100ml, con una concentración del 8% de lugol para su conservación. Estas muestras se mandaron a la Universidad de Copérnicus (Polonia) para que la Dra. M. Luscinska, especialista en algas de agua dulce realizara la identificación taxonómica.

Se identificaron las especies de algas utilizando un microscopio de luz y se contaron las células de acuerdo con la técnica de Utermöhl. Con el fin de identificar las diatomeas, las muestras fueron digeridas y montadas en portaobjetos permanentes con una resina (Naprhrax).

Para conocer la diversidad biológica en cada uno de los puntos de muestreo se utilizó el índice de Shannon and Weaver. Este índice es uno de los más utilizados para cuantificar la biodiversidad específica. Este, refleja la heterogeneidad de una comunidad sobre la base de dos factores: el número de especies presentes y su abundancia relativa. Conceptualmente es una medida del grado de incertidumbre asociada a la selección aleatoria de un individuo en la comunidad (Pla, 2006).

$$H' = - \sum_{i=1}^R p_i * \ln * p_i$$

Donde:

R= número de especies (riqueza de especies).

$p_i$ = proporción de individuos de la especie  $i$  respecto al total de individuos.

### **2.3.4-Experimento dosis respuesta en canales de recirculación**

El experimento toxicológico se realizó en unos canales artificiales instalados en el laboratorio del Instituto Pirenaico de Ecología en Zaragoza (I.P.E.), estos canales de metacrilato tienen 90 cm de largo y 10 cm de ancho, los cuales se conecta a los depósitos de agua.

#### Montaje experimental

El montaje consistió en 6 canales de flujo en paralelo con diferentes concentraciones de Terbutilazina (0 nM, 100 nM, 500 nM, 2000 nM, 4000 nM y 12000 nM), los canales se llenaron con un mismo volumen de una solución tampón libre de nutrientes de ácido 3 morfolinopropano -1-sulfónico, (MOPS 0,01 nM), con el fin de mantener el pH estable durante todo el experimento. Cada canal poseía un sistema de recirculación propio, donde una bomba de acuario recirculaba el MOPS a través del canal a 1,3 cm/s.

La luz fue proporcionada por lámparas halógenas (80  $\mu$ mol de fotones/  $m^2 * s$  en el rango de 400-700nm en la superficie del canal).

La temperatura del agua se ajustó a la media de la temperatura in situ durante el período de crecimiento perifiton en el humedal (19 °C), mediante “un baño María”, en el recipiente donde se encontraban los sistemas de recirculación.

Para el periodo de adaptación de los biofilms al laboratorio se montaron 3 canales más de recirculación (1 por cada punto de muestreo), donde se depositaron los biofilms un día antes del experimento (Lorente et al., 2014). Cada canal recirculaba agua de los diferentes puntos de muestreo (recogida el mismo día en el que se recogieron los biofilms).

### Preparación de las dosis de herbicida

La Terbutilazina en polvo fue proporcionada por Sigma-Aldrich. Para la realización del experimento se preparó 5ml de una disolución madre de 32 mM, utilizando la acetona como disolvente. Esta disolución se preparó dos días antes del comienzo del experimento.

Las dosis de herbicida aplicada en los canales de flujo se prepararon de acuerdo a las recomendaciones de la OCDE para el flujo acuático toxicología través de la prueba (OCDE, prueba de toxicología acuática, n º 23). Los diferentes volúmenes de la misma solución madre se inocularon directamente en cada uno de los canales de flujo. Para evitar el posible efecto del disolvente sobre la respuesta del perifiton, se añadió 1 ml de acetona a cada uno de los canales.

Una vez finalizado el experimento se tomaron muestras de agua de 3 canales (100 nM, 2000 nM y 12000 nM) y se enviaron al I.G.M.E. para su análisis.

### Procedimiento experimental

Antes de comenzar el experimento se realizó un pre-experimento para conocer la respuesta de los biofilms a la Terbutilazina y el tiempo de exposición que sería necesario para obtener resultados fiables, consistió en exponer un biofilm del punto de la entrada y otro del punto de la salida a una concentración de 8000nM Terbutilazina.

El montaje experimental tuvo 6 canales de flujo, incluyendo un control, sin herbicida y 5 dosis de herbicidas diferentes. Después de un período de aclimatación (24h), dos biofilm se expusieron en cada canal de flujo.

La respuesta fotosintética de los biofilms a la exposición a los herbicidas fue estimado con el Pulso de Amplitud Modulada (mini -PAM, Heinz Walzt) en presencia de la luz actínica.

El funcionamiento del mini- PAM es el siguiente: En primer lugar, el instrumento emite una luz de medición débil ( $0,15 \text{ mol fotones/ m}^2 \cdot \text{s}$ ) que induce la emisión de fluorescencia a partir de los centros cerrados PS II, Fluorescencia en estado estacionario ( $F_s$ ) (Vankooten & Snel, 1990). En segundo lugar, un pulso de saturación de luz, cierra todos los centros de reacción PS II, esto se conoce como la fluorescencia máxima ( $F_m'$ ). Ambas mediciones se utilizan para calcular el rendimiento cuántico en PS II (es decir, la fluorescencia variable sobre PS II) ( $\Phi_{PSII}$ ):

$$\Phi_{PS II} = (F_m' - F_s) / F_m'$$

La diferencia en el rendimiento de fluorescencia obtenido antes y después de un flash de saturación nos informa sobre el transporte de electrones entre PSII y PSI, dando una medida de la tasa de transporte de electrones que representa la producción fotosintética bruta en las algas.

Los ajustes del fluorímetro se realizaron siguiendo el mismo procedimiento para todos los experimentos : Autocero ( 22-30 ) , Gain ( 2 ) , intensidad de saturación ( 8 ) y damp ( 2). El yield se midió mediante la colocación del Mini- PAM por debajo de los sustratos del perifiton desde la parte inferior del canal de flujo.

La primera medición se realizó antes de inocular el herbicida (medición 0h), después de 1 hora (1h) y a 2 horas (2h) de exposición al herbicida. Las mediciones se realizaron en las mismas posiciones de los biofilms tres veces con el fin de registrar la respuesta de las algas de una forma más precisa. Las posiciones seleccionadas para la medición se procuró que fuesen con una cantidad similar de

biomasa, ni puntos muy gruesas (> 1 mm) ni puntos muy finas (<0,5 mm), con una Fs entre 700-1100.

### Análisis de los datos

Los datos obtenidos en el experimento se representaron mediante una curva de dosis - respuesta ajustada con el software RStudio utilizando un paquete de curva de respuesta a la dosis específica desarrollada (drc). Este paquete se ajusta a los datos a un modelo de regresión log-logística de dos parámetros:

$$f(x) = \frac{1}{1 + \exp(b)(\log)(x) - \log(e))}$$

El límite superior de la curva se normalizó a 100, y el límite inferior a 0. Los valores de EC<sub>50</sub> se compararon mediante la función CompParm, incluida en el paquete de R "drc". Esta función realiza la prueba t entre los valores de EC<sub>50</sub>. Ratios (caso EC<sub>50</sub> A / EC<sub>50</sub> caso B) se comparan con 1 (es decir, que es el caso de las diferencias entre los parámetros). Esas proporciones significativamente diferentes de 1, con p-valor por debajo de 0,05, se ajustan con corrección de Bonferroni para múltiples pruebas, se consideraron significativamente diferentes.

# 3-RESULTADOS

## 3.1-ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL AGUA

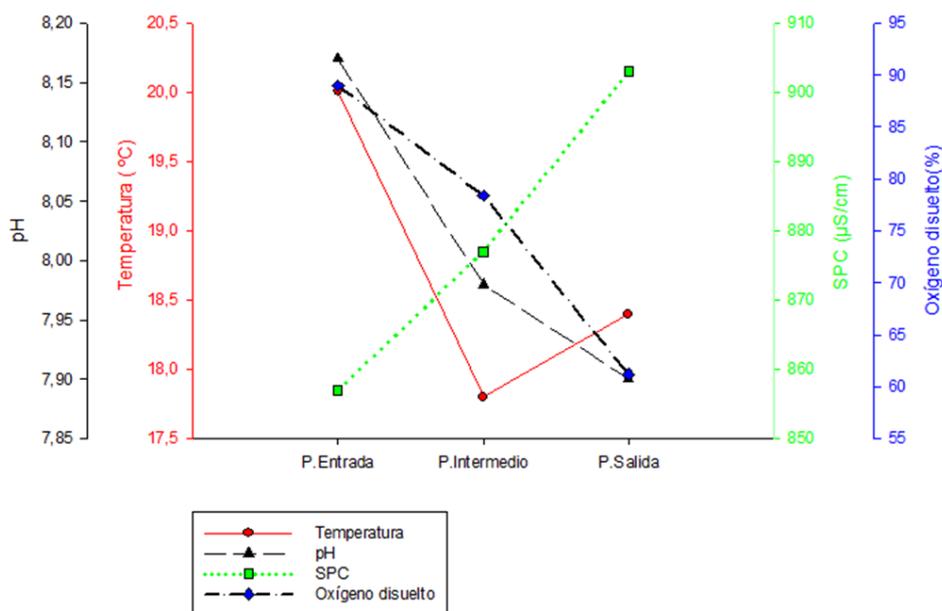
Los parámetros físico-químicos del agua variaron de un punto de muestreo a otro. (Véase anexo I, tabla 1).

El ph disminuyo conforme el agua circulaba por el humedal, en el punto de muestreo de entrada se dieron valores que fueron desde 8,4 a 7,4, en el punto de muestreo intermedio de 8,2 a 7,2 y en el punto de muestreo de salida entre 7,9 a 7,1.

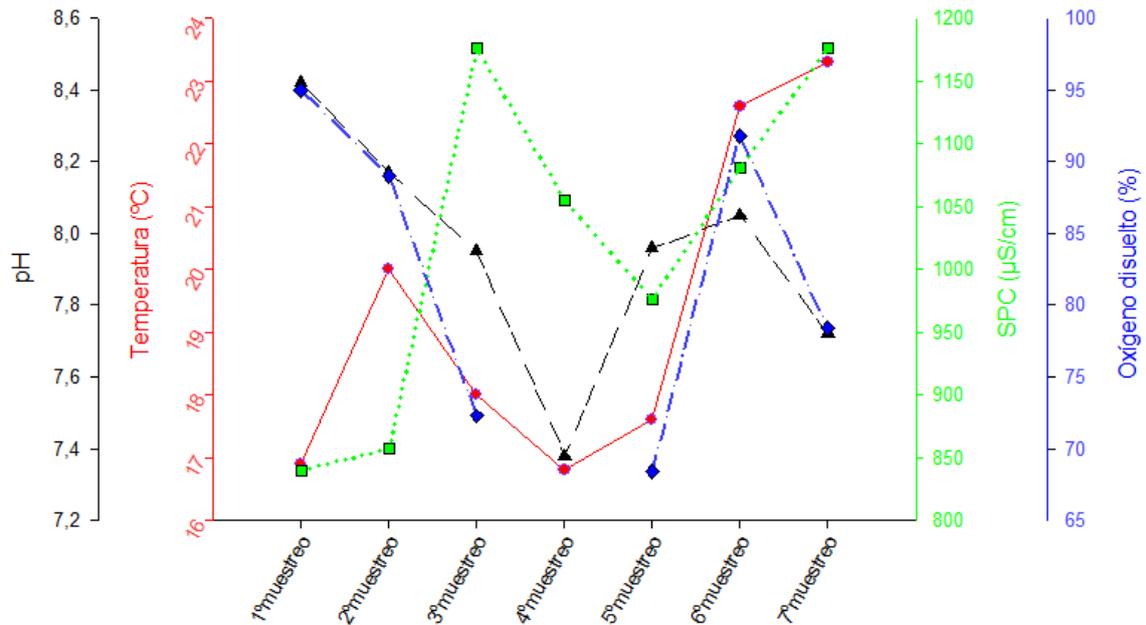
El oxígeno disuelto presente en el agua también disminuyo conforme el agua circulaba por el humedal, en el punto de muestreo de entrada se obtuvieron rangos entre 95% y el 68% de oxígeno disuelto, en el punto de muestreo intermedio del 80% al 49% de oxígeno disuelto y en el punto de muestreo de salida del 63% al 30% de oxígeno disuelto.

La conductividad específica (SPC) aumento conforme el agua circulaba por el humedal, en el punto de muestreo de entrada se obtuvieron valores entre 840  $\mu\text{S}/\text{cm}$  a 1176  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , en el punto de muestreo intermedio de 877  $\mu\text{S}/\text{cm}$  a 1485  $\mu\text{S}/\text{cm}$  y en el punto de muestreo de salida entre 903  $\mu\text{S}/\text{cm}$  y 1443  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

Los registros de temperatura variaron dependiendo del día del muestreo y la hora, sin seguir ninguna tendencia clara, la temperatura del humedal durante el periodo de muestreo estuvo entre los 16,9°C y 24,4°C.



Gráfica 1. Representación de temperatura, pH y SPC en el 2º muestreo.



Gráfica 2. Parámetros fisicoquímicos del punto de la entrada a lo largo de todos muestreos realizados.

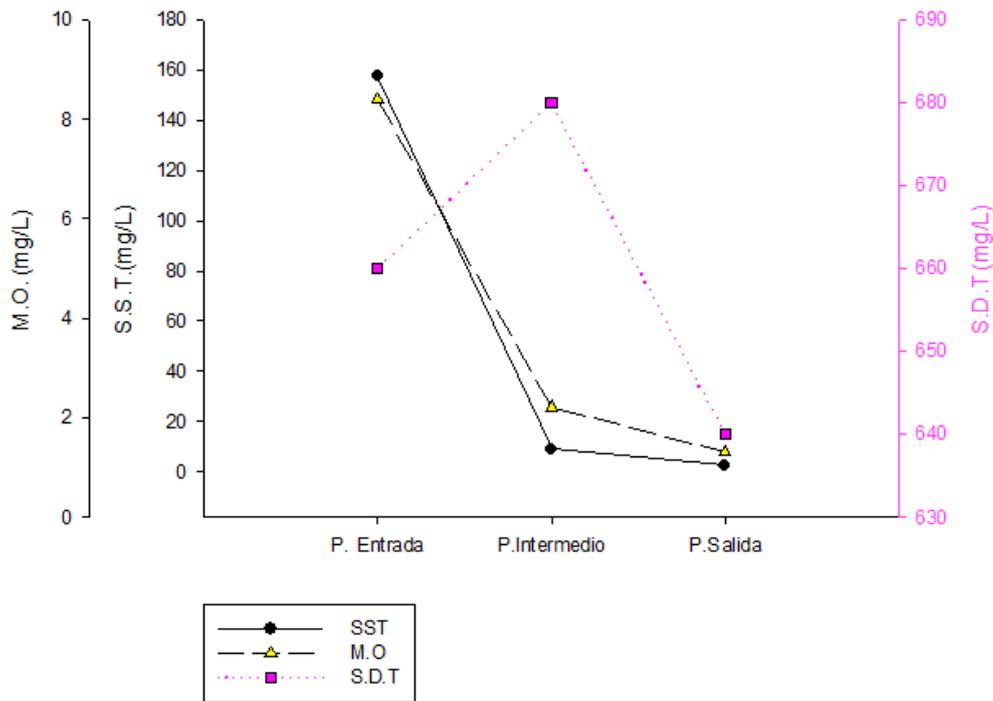
### Sólidos

Los niveles de sólidos sedimentables totales (S.S.T.) más bajos se registraron en el punto de muestreo de salida, mientras que los máximos variaban entre los puntos de muestreo de entrada e intermedio. Las concentraciones que se obtuvieron en el punto de muestreo de entrada fueron de 157,6 mg/L a 4,4 mg/L, en el punto de muestreo intermedio de 21,6 mg/L a 9 mg/L y en el punto de muestreo de salida entre 7 mg/L y 1,5 mg/L.

En los valores de la materia orgánica (M.O.), se produce la misma tendencia que en los S.S.T., con unas concentraciones registradas en el punto de muestreo de entrada entre 8,4 mg/L y 1,3 mg/L, en el punto de muestreo intermedio entre 2,8 mg/L y 2,2 mg/L y en el punto de muestreo de salida entre 1,3 mg/L y 1 mg/L.

Los sólidos disueltos totales (S.D.T.), suelen tener una tendencia ascendente a medida que el agua fluye por el humedal, aunque no se dio en todos los muestreos, con unas concentraciones registradas en el punto de muestreo de entrada entre 820 mg/L y 660 mg/L, en el punto de muestreo intermedio entre 680 mg/L y 992 mg/L y en el punto de muestreo de salida entre 640 mg/L y 940 mg/L.

Los registros de alcalinidad, en la mayoría de los muestreos se obtuvieron los datos más altos en el punto de muestreo intermedio, pero sin ninguna tendencia clara. Con unas concentraciones registradas en el punto de muestreo de entrada entre 239 mg/L y 265 mg/L, en el punto de muestreo intermedio entre 277 mg/L y 248 mg/L y en el punto de muestreo de salida entre 233 mg/L y 265 mg/L.



Gráfica 3. Representación de S.S.T., M.O. y S.D.T. en el 1º muestreo.

### Nutrientes

Las concentraciones de cationes y aniones analizadas variaba entre cada muestreo, aunque en algunos nutrientes analizados se observó una tendencia clara, como es el caso de los cloruros, nitratos sulfatos sodio y fosfatos. (Véase anexo I, tabla 2).

Las concentraciones de cloruros fueron más altas en el punto de muestreo de salida y en el intermedio que en el punto de muestreo de entrada, siendo en la mayoría de los muestreos más altas en el punto de la salida. Con unas concentraciones en el punto de muestreo de entrada entre 54 mg/L y 136 mg/L, en el punto intermedio entre 70 mg/L y 225 mg/L y en el punto de la salida entre 66 mg/L y 212 mg/L.

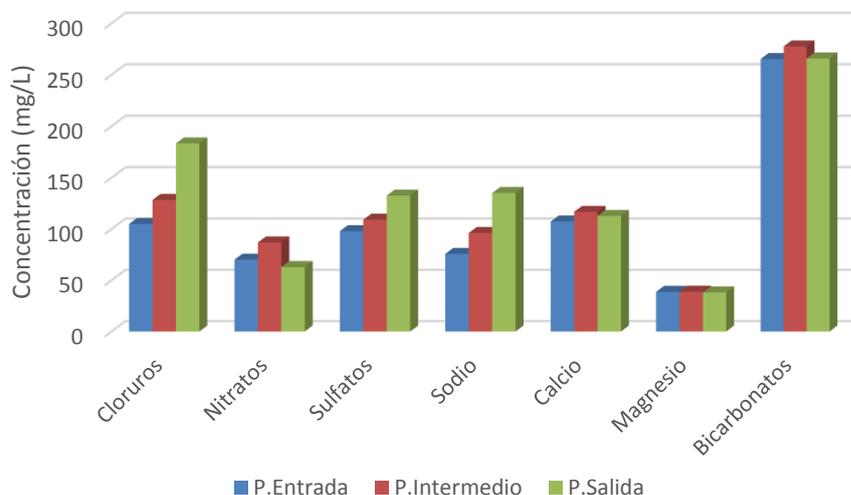
Las concentraciones de nitratos fueron más altas en el punto de muestreo de entrada y en el punto intermedio que en el punto de muestreo de salida. Con unas concentraciones en el punto de muestreo de entrada entre 61 mg/L y 81 mg/L, en el punto de muestreo intermedio entre 62 mg/L y 86 mg/L y en el punto de muestreo de salida entre 50 mg/L y 64 mg/L.

Las concentraciones de sulfatos más elevadas se dieron por lo general en el punto de muestreo de la salida de 70 mg/L a 136 mg/L, en el punto de muestreo intermedio entre 78 mg/L y 150 mg/L (nivel más alto registrado) y en el punto de muestreo de la entrada entre 72 mg/L y 96 mg/L.

Las concentraciones de sodio fueron más altas en el punto de muestreo intermedio y en el punto de salida que en el punto de muestreo de entrada. Con unas concentraciones en el punto de muestreo de entrada entre 40 mg/L y 96 mg/L, en el punto de muestreo intermedio entre 54 mg/L y 161 mg/L y en el punto de muestreo de salida entre 51 mg/L y 149 mg/L.

Las concentraciones de bicarbonatos fueron similares entre los tres puntos de muestreo, estas concentraciones se encontraban entre los 239,7 mg/L y los 277,5 mg/L.

Las concentraciones de fosfatos destacaron porque no se dio en ningún muestreo realizado en el punto de la entrada, pero si en dos ocasiones en el punto de la salida y una en el punto intermedio. Con unas concentraciones en el punto de la salida de 0,45 mg/L y 0,05 mg/L y en el punto intermedio de 0,15 mg/L.



**Gráfica 4. Concentración de nutrientes registrados en el 4º muestreo.**

### **3.2-CONCENTRACIÓN DE HERBICIDAS EN EL AGUA**

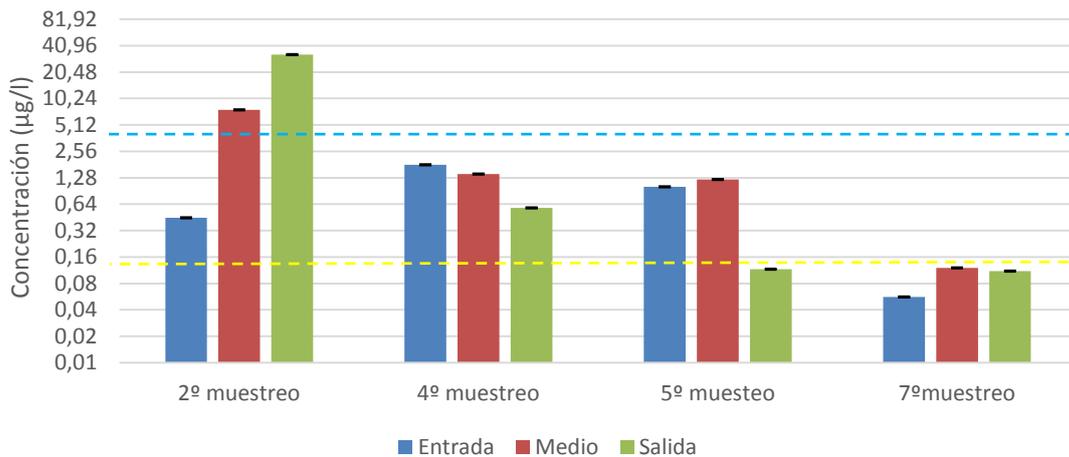
Para determinar la concentración de herbicidas se llevaron a cabo 4 muestras puntuales a lo largo de las 7 salidas al campo que se realizaron a la zona de estudio. Aunque este trabajo se basa en los impactos de la Terbutilazina, también se determinaron las concentraciones de otros compuestos: 4,4' DDT, acetoclor, clorpirifos, cipermetrina, diflufenican, metolachlor+ s-met y pendimetalina. (Véase anexo I, tabla 3).

Las concentraciones más altas de Terbutilazina se registraron en el 3º muestreo, donde se obtuvieron las primeras muestras puntuales para analizar los herbicidas, con un valor de 32, 4032 µg/L de Terbutilazina en el punto de muestreo de la salida, 7,6335 µg/L en el punto intermedio de muestreo y 0,4488 µg/L en el punto de muestreo de la entrada al sistema.

En el 4º muestreo (segundo muestreo puntual de herbicidas), se registró unas concentraciones de Terbutilazina que disminuían conforme el agua circulaba por el humedal. Pasando de 1,8069 µg/L en el punto de muestreo de entrada a 0,5807 en el punto de muestreo de salida µg/L.

En el 5º muestreo (tercer muestreo puntual de herbicidas), el nivel más alto de concentración de Terbutilazina se obtuvo en el punto intermedio con 1,2270 µg/L, seguido del punto de la entrada con 1,0110 µg/L y la más baja en el punto de la salida con 0,1165 µg/L.

En el 7º muestreo y ultimo (4º muestreo puntual de herbicidas) se obtuvieron los niveles más bajos de Terbutilazina, 0,1204 µg/L en el punto intermedio, 0,1108 µg/L en el punto de la salida y 0,056 µg/L en el punto de la entrada.



**Gráfica 5. Concentración de Terbutilazina en los distintos puntos de muestreo. Con un % de desviación estándar del 7,10.**

La línea horizontal amarilla en el gráfico 5 representa la concentración máxima permitida por la Unión Europea para el agua potable y la línea horizontal azul representa la  $CL_{50}$  (concentración letal para un 50% de los individuos) de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

En la siguiente tabla se representa como vario el porcentaje de Terbutilazina desde el punto de muestreo de entrada hasta el punto de muestreo salida. Para esta representación no se tuvo en cuenta los valores del punto de muestreo intermedio.

Muestreos	Disminución de Terbutilazina (%)
3º	-7565,5
4º	67,8
5º	88,47
7º	-97,8

**Tabla 3. Disminución de la concentración del herbicida a lo largo del sistema.  
(-) Aumento de la concentración del herbicida.**

Cabe destacar que en el 5º muestreo, en el punto de muestreo de entrada se observó una gran cantidad de cangrejos americanos (*Procambarus clarkii*) muertos.



**Imagen 3. Cangrejos muertos en el 5º muestreo, punto de muestreo de entrada.**

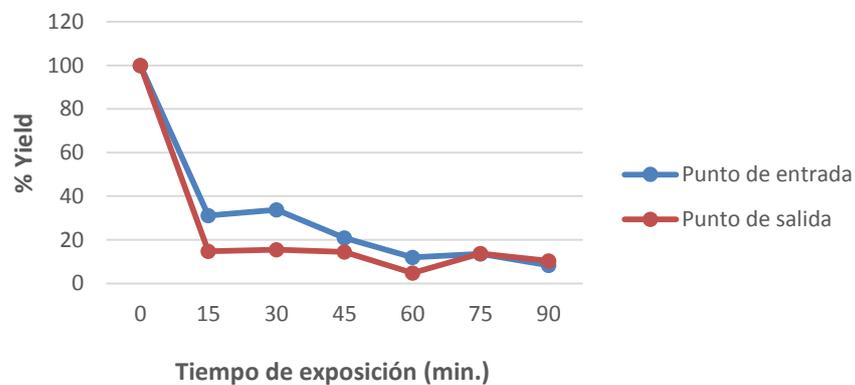
### 3.3-EXPERIMENTO DOSIS-RESPUESTA

#### 3.3.1-Pre-experimento

Antes de realizar los experimentos dosis-respuesta se llevó a cabo un pre-experimento para conocer la respuesta de los biofilms a la Terbutilazina y el tiempo de exposición que sería necesario para obtener resultados fiables, otros factores como la influencia la biomasa del biofilm y el periodo de aclimatación a los canales de dosis-respuesta, no fue necesario realizar pre-experimentos ya que se utilizaron los resultados obtenidos en trabajos anteriores (Lorente et al., 2014).

Las biofilms con un espesor de  $\approx 0,75\text{mm}$ , que generalmente tenían Fs alrededor de 1000 unidades, mostraron una respuesta rápida y estable al herbicida (Lorente et al., 2014), por lo que fueron estos tipos de biofilms los que se utilizaron en el experimento de dosis-respuesta.

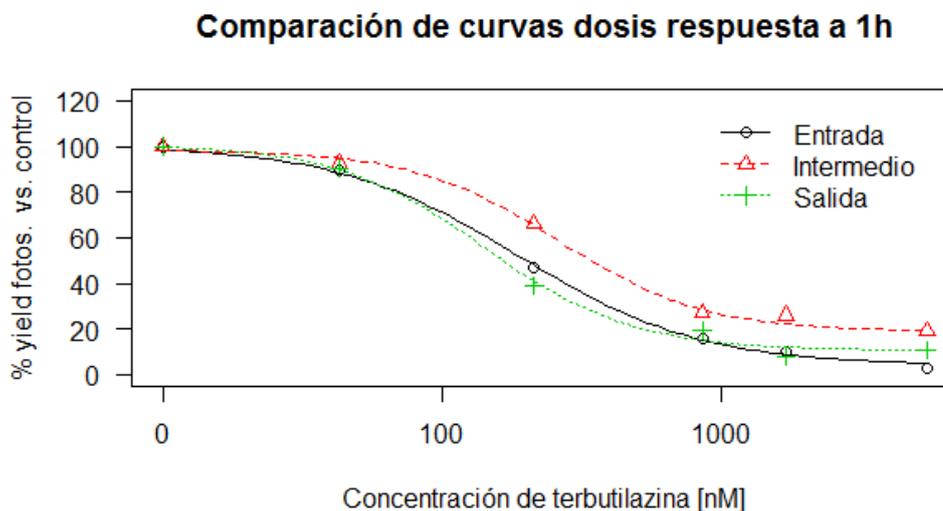
El pre-experimento para conocer la respuesta de los biofilms a la Terbutilazina y el tiempo necesario de exposición que sería necesario para obtener buenos resultados, consistió en exponer un biofilm del punto de muestreo de la entrada y otro del punto de la salida a una concentración de 8000nM Terbutilazina. (Véase anexo II, tabla 4).



Gráfica 6. Pre-experimento dosis respuesta.

#### 3.3.2-Resultados del experimento

Para determinar la toxicidad producida por la Terbutilazina en la fotosíntesis de la comunidad algal del biofilm, se realizaron medidas con el mini-pam a 1h de exposición y a 2h obteniendo los siguientes resultados: (Véase anexo II, tabla 5, 6 y 7).



Gráfica 7. Comparación de curvas dosis respuesta a 1h.

La  $EC_{50}$  obtenida después de una hora de exposición a la Terbutilazina para la comunidad algal del biofilm del punto de la entrada fue de 187,39 nM (error de 22,022 nM), en el punto intermedio fue de 262,90 nM (error de 27,500 nM) y en el punto de la salida fue de 142,56 nM (error de 12,919 nM).

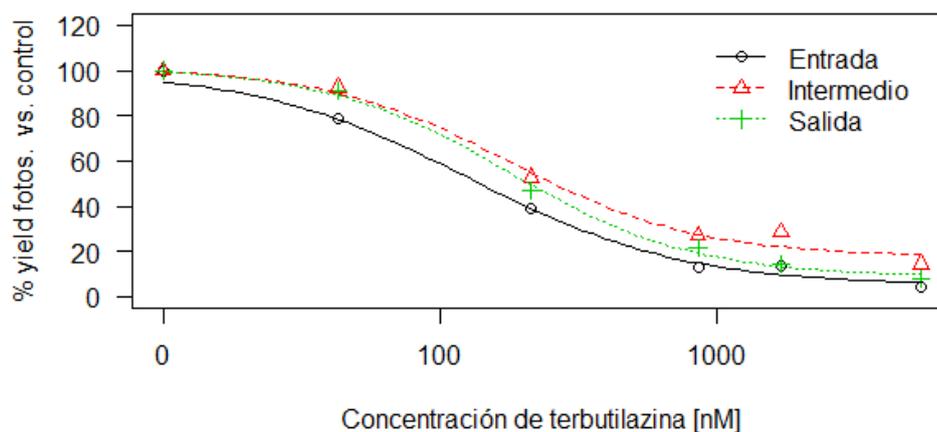
La comparación estadística mediante el p-valor de los 3 puntos de muestreo a 1h de exposición es la siguiente: (Véase anexo II, resultados estadísticos del experimento dosis respuesta a 1h).

Puntos de muestreo	p-valor
Entrada/ Intermedio	0,0118
Entrada/Salida	0,1099
Intermedio/Salida	0,0013

Tabla 4. Comparación estadística mediante el p-valor.

Atendiendo a la tabla 4, al comparar los resultados de las  $EC_{50}$  entre el punto de entrada y el punto intermedio se obtiene un p-valor inferior a 0,05 al igual que en la comparación del punto intermedio y el punto de salida, lo que indica una diferencia significativa entre ambos, en la comparación del punto de la entrada con el de la salida el p-valor es superior a 0,05, por lo tanto no hay una diferencia significativa entre estos puntos en 1h de exposición al herbicida.

### Comparación de curvas dosis respuesta a 2h



Gráfica 8. Comparación de curvas dosis respuesta a 2h.

La  $EC_{50}$  obtenida después de 2 horas de exposición a la Terbutilazina para la comunidad algal del biofilm del punto de la entrada fue de 127,23 nM (error de 19,360 nM), en el punto intermedio fue de 179,39 nM (error de 26,398 nM) y en el punto de la salida fue de 178,14 nM (error de 19,833 nM).

La comparación estadística mediante el p-valor de los 3 puntos de muestreo a 2h de exposición es la siguiente: (Véase anexo II, resultados estadísticos del experimento dosis respuesta a 2h).

Puntos de muestreo	p-valor
Entrada/Intermedio	0,0551
Entrada/Salida	0,0359
Intermedio/Salida	0,9700

Tabla 5. Comparación estadística mediante el p-valor.

Atendiendo a la tabla 5, al comparar los resultados de las  $Ec_{50}$  se obtienen diferencias significativas en la comparación del punto de entrada con el punto intermedio (se considera el resultado del p-valor una diferencia significativa por encontrarse casi por debajo de 0,05) y al comparar el punto de entrada con el de salida. En cambio no se obtiene una diferencia significativa al comparar el punto intermedio con el punto de la salida.

Se realizaron comparaciones estadísticas mediante el p-valor para conocer si había diferencias en las  $Ec_{50}$  en el mismo punto a diferentes periodos de exposición al herbicida (1h y 2h), los resultados se muestran a continuación:

Punto de muestreo	P-valor (1h/2h)
<b>Entrada</b>	0,0717
<b>Intermedio</b>	0,1236
<b>Salida</b>	0,0732

**Tabla 6. Comparación de diferentes periodos de exposición de Terbutilazina en el mismo punto.**

Como se observa en la tabla 6 ningún p-valor es inferior a 0,05, por lo tanto no hay una diferencia significativa en ninguno de los tres puntos entre 1h y 2h de exposición al herbicida. (Véase anexo II, resultados estadísticos del experimento dosis respuesta del punto de muestro de la entrada, intermedio y salida).

Una vez realizados los experimentos dosis respuesta, se tomaron muestras de agua del 2º canal (concentración de Terbutilazina 100 nM), del 4º canal (concentración de Terbutilazina de 2000 nM) y del 6º canal (concentración de Terbutilazina de 12000 nM) y se mandaron a analizar al laboratorio del I.G.M.E, obteniendo los siguientes resultados:

Canal	Concentración teórica(nM)	Concentración real(nM)
<b>2º</b>	100	43
<b>4º</b>	2000	859
<b>6º</b>	12000	5479

**Tabla 7. Comparación de concentraciones reales y teóricas de Terbutilazina en los canales de dosis respuesta.**

### 3.4- ANÁLISIS DEL PERIFITON

El biofilm analizado en cada uno de los tres puntos tenía una fluorescencia basal entre 700-1100, la clorofila *a* obtenida en cada uno de los puntos de muestreo es la siguiente:

Punto de muestreo	Clorofila <i>a</i> (µg/cm <sup>2</sup> )
Entrada	3,105712515
Intermedio	3,460940172
Salida	1,76182732

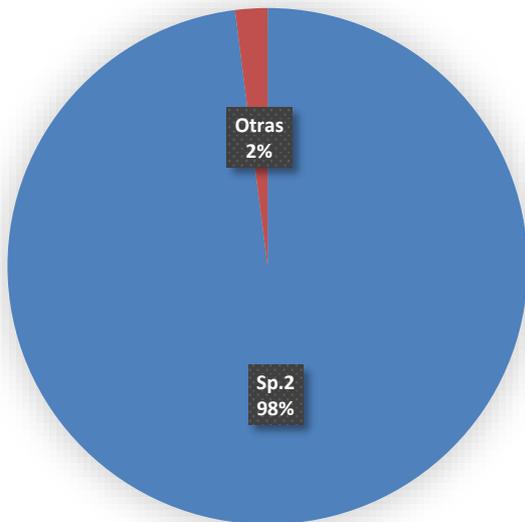
Tabla 8. Comparación de concentración de clorofila *a*.

El análisis taxonómico realizado por la doctora M. Luscinska obtuvo los siguientes resultados:

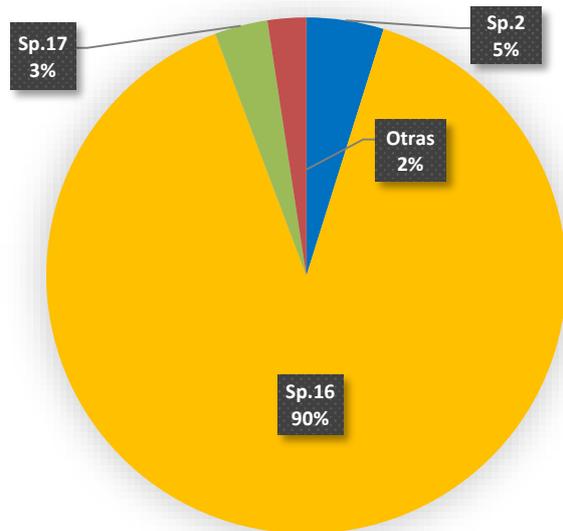
Cyanobacteria		Sp.13	<i>Fragilaria ulna</i> v. <i>acus</i> (Kütz.)Lange-Bertalot
Sp.1	<i>Phormidium amoenum</i> Kütz.ex Anagn. et Kom. <sup>1</sup>	Sp.14	<i>Gomphonema clavatum</i> Ehr.
Bacillariophyceae		Sp.15	<i>G. clevei</i> Fricke
Sp.2	<i>Achnanthes minutissima</i> (Sippenkomplex)	Sp.16	<i>G. olivaceum</i> (Horn.) Bréb.
Sp.3	<i>Amphora</i> sp. cf. <i>A. fagediana</i> Krammer	Sp.17	<i>G. parvulum</i> (Kütz.)Kütz.
Sp.4	<i>Aulacoseira ambigua</i> (Grun.)Simonsen	Sp.18	<i>G. truncatum</i> Ehr.
Sp.5	<i>Cocconeis pediculus</i> Ehr.	Sp.19	<i>Nitzschia amphibia</i> Grun.
Sp.6	<i>Cymbella affinis</i> Kütz.	Sp.20	<i>Nitzschia linearis</i> (Ag.)Smith
Sp.7	<i>C. proxima</i> Reimer	Sp.21	<i>N. palea</i> (Kütz.)W.Smith
Sp.8	<i>C. turgidula</i> Grunow	Sp.22	<i>N. sigmoidea</i> (Nitzsch)W.Smith
Sp.9	<i>Diatoma vulgare</i> Bory	Sp.23	<i>Surirella brebissonii</i> Krammer & Lange-Bertalot v. <i>kuetzingii</i> Krammer & Lange-Bertalot
Sp.10	<i>Denticula elegans</i> Kütz.	Chlorophyta	
Sp.11	<i>Fragilaria capucina</i> Desm.	Sp.24	<i>Oedogonium</i> sp. div. <sup>1</sup>
Sp.12	<i>Fragilaria ulna</i> (Nitzsch)Lange-Bertalot	Sp.25	<i>Mougeotia</i> sp. <sup>1</sup>

Tabla 9. Especies de algas en los biofilms muestreados en los distintos puntos de estudio. 1-1=100µm

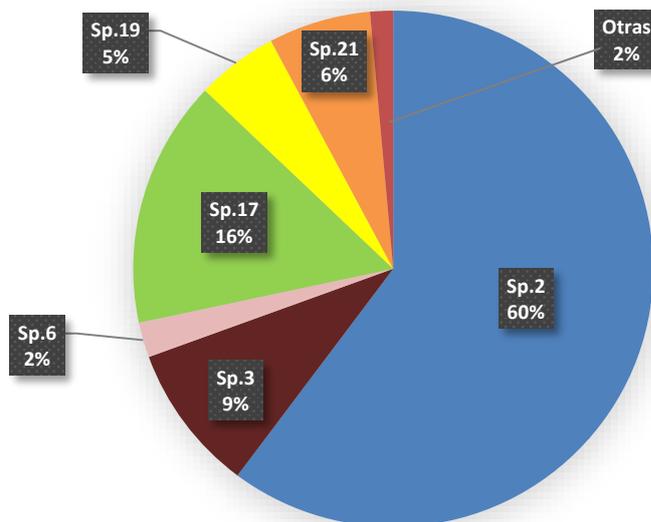
A continuación se muestran los porcentajes de las especies que se encontraron en cada uno de los puntos del área de estudio:



Gráfica 9. % de especies de algas en el punto de entrada.



Gráfica 10. % de especies de algas en el punto intermedio.



Gráfica 11. % de especies de algas en el punto de salida.

En el biofilm del punto de muestreo de entrada se registró el mayor número de individuos algales 38.927.822, de los cuales el 98% pertenecían a la especie *Achnanthes minutissima* (*Sippenkomplex*). En el biofilm del punto de muestreo intermedio se registraron 12.142.211 de individuos algales, de los cuales el 90% pertenecían a la especie *G. olivaceum* (*Horn.*) *Bréb.*, un 5% a la especie *Achnanthes minutissima* (*Sippenkomplex*) y un 3% a la especie *G. parvulum* (*Kütz.*)*Kütz.* Por último el biofilm del punto de muestreo de la salida, se registró el menor número de individuos algales 5.527.411, de los cuales el 60% pertenece a la especie *Achnanthes minutissima* (*Sippenkomplex*), un 16% a la especie *G. parvulum* (*Kütz.*)*Kütz.*, un 10% a la especie *Amphora sp. cf. A. fagediana* *Krammer*, un 6% a la especie *N. palea* (*Kütz.*)*W.Smith*, un 5% a la especie *Nitzschia amphibia* *Grun.* Y un 2% a la especie *Cymbella affinis* *Kütz.* (Véase anexo III, tabla 8).

La composición algal de los biofilms estuvo formado esencialmente por *Bacillariophyceae* (también conocidas como diatomeas), es por ello que se utilizó este grupo para calcular los índices de Shannon-Wiener.

Punto de muestreo	Índice de Shannon- Wiener (H)
<b>Entrada</b>	0,137351622
<b>Intermedio</b>	0,482672831
<b>Salida</b>	1,290655378

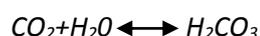
**Tabla 10. Comparación de los índices de diversidad.**

# 4- DISCUSIÓN

---

## 4.1-PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

Los niveles de pH y oxígeno disuelto disminuyeron conforme el agua discurría por el sistema, al igual que las concentraciones de materia orgánica, esta disminución de porcentaje de oxígeno fue debida a la descomposición de la materia orgánica por microorganismos los cuales están adheridos a la plantas, en particular a las raíces y a la superficie de los sedimentos (Kadleck, 2000). Aunque en algunos casos se registraron los niveles más altos de materia orgánica en el punto intermedio de muestreo, este aumento se debió a aportaciones laterales al humedal. La disminución del pH puede estar ligada a la disminución de la actividad fotosintética (menos biomasa algal o menos actividad o una combinación de ambas). La fotosíntesis absorbe  $\text{CO}_2$  retirándolo del medio; este compuesto junto al agua, forma  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , que produce la disminución del pH a la salida del humedal (J. López, Fornés J., 2009).



Las concentraciones de sólidos en suspensión totales disminuyeron del punto de muestreo de la salida a la entrada, pero hay que recordar que en algunos muestreos se detecta la mayor concentración de sólidos sedimentables en el punto de muestreo intermedio, debido a los aportes laterales. Esta disminución es producida por las raíces de los macrofitos y el sustrato que reducen la velocidad del agua, favoreciendo los procesos de filtración y sedimentación. Es importante que el diseño del humedal se haya realizado correctamente, ya que de lo contrario este proceso podría producir obstrucciones y la rápida colmatación del humedal (Delgadillo, 2010).

En cuanto a los registros de temperatura, los datos tomados en el 4º muestreo en el punto de la entrada (ver gráfica 2), reflejan una bajada de las temperaturas, esta bajada de las temperaturas indica la entrada de agua al sistema, debido a las precipitaciones registradas el día 24 y 28 de Mayo. Al tratarse de un zona formada por lutitas (notable contenido en carbonatos) y areniscas (Gavín, 2005), las precipitaciones arrastraron estos compuestos hacia el humedal, provocando las mayores concentraciones de bicarbonatos y calcio registradas. La disminución del pH pudo ser debida a la caída de la actividad fotosintética provocada por la disminución de radiación solar. Este caso demuestra algunos de los factores que pueden limitar la eficacia de los humedales artificiales.

## 4.2-CONCENTRACIÓN DE NUTRIENTES

Conforme el agua discurre por el humedal la concentración de cloruros, sulfatos, sodio y potasio aumento, produciendo un aumento conductividad específica del agua. Este aumento de sólidos disueltos se debió al área superficial del agua y su poca profundidad, lo que produce que estos tipos de sistemas interactúen fuertemente con la atmosfera, provocando la perdida de agua mediante evapotranspiración (la pérdida combinada de agua por evaporación del suelo y transpiración de las plantas) (Delgadillo, 2010). Aunque se puede dar el caso que se produzca una disminución de sólidos disueltos totales del punto intermedio al de la salida como ocurre en el muestreo 1 (véase grafica 3), debido al aporte lateral en el punto intermedio de agua procedente del regadío con bajos niveles de sólidos disueltos, lo que provocaría un efecto de dilución con el consiguiente descenso de la conductividad.

La concentración de nitratos disminuyo del punto de muestreo de la entrada al de la salida, esta disminución se debe a que este tipo de sistemas han demostrado ser eficientes con la eliminación de cargas excesivas de nutrientes (Vera, 2011). Los mecanismos de remoción de nitrógeno incluyen: la desnitrificación, la volatilización de amonio, la Incorporación a tejidos vegetales (nitrato y amonio), la

adsorción de amonio y la mineralización de nitrógeno orgánico (Lee, Fletcher, & Sun, 2009). La desnitrificación está considerada como el principal proceso de eliminación de  $\text{NO}_3^-$ , ya que el  $\text{NO}_3^-$  se convierte en N vía intermediario del nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ). En este tipo de sistemas, la desnitrificación ocurre en las zonas anóxicas de sedimentos, bajo una capa aerobia superficial de agua, en microzonas anóxicas o en biofilms adheridos al tejido de planta o substratos (Shipin et al., 2007). Debido a que el nitrito se halla en un estado de oxidación intermedio entre el amoniaco y el nitrato, las concentraciones de este, aumentan conforme el agua discurre por el humedal. Las pérdidas de amonio en el agua se deben a la volatilización a la atmosfera o por adsorción, en los muestreos realizados en el área de estudio, los resultados no siguieron una tendencia clara a lo largo del recorrido del agua por el sistema, estas variaciones pueden deberse a que estos procesos están estrechamente ligados a los valores de pH y temperatura (Iovanna, Hyberg, & Crumpton, 2008). Los niveles de las diferentes formas químicas del nitrógeno que se encontraron en los diferentes muestreos provienen de las actividades agrícolas de la zona, por ello, una de las variables que se debe tener en cuenta es la forma química en la que se presenta el nitrógeno en el abono, en aquellos fertilizantes que se presentan en forma de nitratos, son fácilmente arrastrados por el agua procedente de la lluvia o del riego, en cambio los amoniacaes presentan una baja movilidad (Ramos, 1996). El paso de la urea y de los compuestos amoniacaes a la forma más estable del nitrógeno (los nitratos), se realiza con rapidez, aumentando el riesgo de contaminación (Fernandez, 2002).

La concentración de sulfatos aumento del punto de muestreo de la entrada al punto de la salida. Teóricamente se esperaba que fuera al contrario, debido a que este tipo de sistemas pueden reducir la concentración de sulfatos, mediante la absorción por las raíces de los macrofitos o mediante reacciones que se dan en la parte anaeróbica de los sedimentos del humedal (especialmente si su contenido en materia orgánica es alto o si presenta un gran espesor). Es en estas condiciones, donde tiene lugar la reacción de reducción de sulfato a sulfuro de hidrogeno mediante las bacterias sulforeductoras. Sin embargo, el proceso puede verse limitado por la baja velocidad del agua y el gran espesor de sedimentos, lo que limitaría la difusión de los compuestos hasta las capas anaeróbicas más profundas (E. A. López, O.;Barettino, D., 2002).

Se detectaron fosfatos en el punto de la salida en el 1º y 3º muestreos y en el punto intermedio en el 1º muestreo. Ello pudo deberse a las condiciones anóxicas puntuales en esos puntos, lo que pudo provocar la liberación de fosfatos procedentes de fosfato cálcico sedimentado.

### **4.3-CONCENTRACIÓN DE HERBICIDAS**

Las concentraciones de herbicidas registradas en los muestreos deben de ser interpretadas con cuidado, ya que son registros puntuales que representan las concentraciones en ese instante, esto no quiere decir que sean las condiciones reales que se dan en el humedal.

La disminución gradual que se esperaba obtener de la concentración de la Terbutilazina en el sistema no se dio en todos los muestreos, es más, solo se dio en el 4º muestreo. En el resto se obtuvieron condiciones diferentes. En el 3º muestreo se obtuvo el registro más alto y fue en el punto de la salida, con una concentración de 32,4032  $\mu\text{g/L}$ , lo que equivale a 1000 nM, superior al rango de  $\text{EC}_{50}$  que se encontró entre 187 nM y 262 nM, este nivel tan alto se debió algún tipo de aporte lateral justo en el momento de muestreo. Por otra parte, en el muestreo 5º hay una disminución de concentración del punto de la entrada al punto de la salida, pero en el punto de muestreo intermedio aumenta, esto es debido a que en este punto hubo aportaciones laterales, proceso que también se reflejó en algunos de los parámetros fisicoquímicos del agua. Por último mencionar el último muestreo (7º), donde se registraron las concentraciones más bajas de Terbutilazina, lo que produce que la diferencia entre los puntos de muestreo sea mínima.

El tiempo de residencia del agua en el humedal se encuentra entre 12 y 11 días aguas en la parte baja del humedal y entre 67 y 30 días en la parte alta. Ello depende en gran medida de los aportes por regadío. La degradación de la Terbutilazina en agua natural depende de la presencia de sedimentos y actividades biológicas con una vida media de 50 días, que en presencia de radiación solar disminuye hasta los 30 días (OMS, 2003). Así, el mayor tiempo de retención del agua, en su paso por el humedal, favorece la degradación del herbicida y que las aguas lleguen al río Flumen lo hagan con una concentración mucho menor del herbicida, que sin la presencia del humedal.

Otro factor que puede estar colaborando en la reducción de la terbutilazina, sería la fotodegradación de la Terbutilazina. En nuestros experimentos de laboratorio, aproximadamente un 60% del herbicida se degradaba en 2 horas expuesta a la luz del laboratorio (aunque parte de esa degradación pudo deberse al efecto fotocatalizador de la acetona).

La presencia de cangrejos americanos muertos (*Procambarus clarkii*) en el 5º muestreo, en el punto de entrada fue probablemente debido –información oral transmitida por personal de la CHE- al uso de un veneno específico contra cangrejos, ya que estos realizan excavaciones en los cavallillos, provocando el drenaje y derrumbes que perjudican el normal desarrollo del cultivo de arrozales (Cano, 2003).

#### 4.4-ECOTOXICOGÍA

Los cambios en la calidad del agua y la concentración de Terbutilazina, provocados por la biofiltración, deberían haber resultado en una tolerancia diferente en los biofilms. Teóricamente según el *PICT Concept* (ver apartado 1.5) y en un humedal capaz de ir reduciendo el contenido de herbicida a lo largo del mismo, el perifiton más tolerante debería hallarse en el punto de muestreo de la entrada (mayor concentración del herbicida en el agua), seguido del perifiton del punto intermedio y el más sensible a la presencia del herbicida el perifiton del punto de salida (donde menor concentración era de esperar). Sin embargo, los resultados, aun mostrando diferencias significativas en la tolerancia de los biofilms, mostraron que el humedal, para el caso de la Terbutilazina, no funcionaba tal y como era de esperar.

De entrada, y a pesar de las limitaciones que comportan un análisis puntual de herbicidas de 4 muestreos repartidos a lo largo de 30 días, los resultados muestran que la concentración total de Terbutilazina suele ser mayor en la zona intermedia del humedal y menor en la entrada. Ello indica la importancia que aportes laterales de agua pueden estar teniendo en la dinámica de este compuesto a lo largo del humedal. Pero no solo los valores analíticos indican eso; la respuesta de las comunidades algales, que crecieron durante todo ese tiempo, integrando pues en su historia vital, la exposición a todos los compuestos del agua, demostraron que la zona intermedia está, efectivamente expuesta a una mayor biodisponibilidad del herbicida y la entrada a una menor. Ello se ve reflejado en los valores de  $EC_{50}$ . En una exposición de una hora el biofilm más tolerante a la Terbutilazina fue el del punto intermedio (262,90 nM), seguido del biofilm de la entrada (187,39 nM) y del de la salida (142,56 nM). Los tests, demostraron diferencias significativas entre la  $EC_{50}$  del biofilm del punto intermedio y los biofilms de los otros dos puntos. No existían diferencias entre los biofilms del punto de la entrada y los biofilms del punto de la salida. Estos resultados, indican la más que probable aportación de herbicidas en algún punto intermedio del humedal.

En cuanto a los resultados de  $EC_{50}$  obtenidos a las 2h, sigue siendo el punto intermedio (179,39 nM) el que mejor tolera la Terbutilazina, seguido del punto de la salida (178,14 nM) y luego del de la entrada (127,23 nM). Al compararlos, aparecen diferencias significativas entre el punto de muestreo de la entrada y los otros dos puntos, pero no entre el punto de muestreo intermedio y el punto de muestreo de la entrada (Tab. 5).

Obviamente, además de la exposición a la Terbutilazina durante el desarrollo de los biofilms, existen otros factores para interpretar las diferencias entre las EC<sub>50</sub>. Por ejemplo, tenemos las diferencias en el grosor del biofilm debidas a una mayor disponibilidad de nutrientes (Navarro et al., 2002), que de modo inespecífico protege de la acción de cualquier compuesto tóxico que tenga que difundir desde el agua. A mayor grosor de biofilm, más dificultad encuentra el tóxico en alcanzar a todas las algas presentes en el biofilm. Esto explicaría por qué las diferencias entre las EC<sub>50</sub> a una hora, son mucho mayores que a dos. También explicaría las diferencias entre puntos como el intermedio y el final (Tab. 8).

Los resultados a 2h confirmaron que el biofilm más sensible a la Terbutilazina se encontró en el punto de muestreo de la entrada y el más tolerante en el punto intermedio (aunque sin diferencias con el de la salida). Otro factor sería la biodisponibilidad real del herbicida para las algas, que se vería modificada por la presencia de otras sustancias o materiales disueltos o en suspensión que podrían reducir la cantidad “efectiva” que es absorbida por los organismos. Precisamente estas sustancias, como sales y sólidos en suspensión, son capaces de adsorber compuestos como los herbicidas, reduciendo la exposición (que no la concentración medida en el agua) de los organismos.

#### 4.5- PERIFITON

Para el análisis del perifiton se calculó el contenido de clorofila *a* ya que es un buen indicador de biomasa (Ritchie, 2006). Los niveles de clorofila *a* fueron más altos en los puntos donde se registró un mayor número de células algales; el nivel más alto de clorofila *a* fue hallado en el perifiton del punto de muestreo de entrada, seguido por el perifiton del punto de muestreo intermedio, la concentración más baja de clorofila *a* se registró en el perifiton del punto de muestreo de salida. Otros parámetros que se relacionan con mayor biomasa son las concentraciones altas de nitratos y fosfatos (Giorgi, 2010), en nuestra zona de muestreo estos niveles más altos se dan en el punto de muestreo de la entrada y en el punto de muestreo intermedio.

En el punto de muestreo de entrada la especie dominante fue *Achnanthes minutissima* (Sippenkomplex) que represento un 98% de la población de individuos algales, esta especie se relaciona con una buena calidad del agua, ya que es típica de zonas de cabecera de los ríos (Martín, 2004). Este porcentaje tan elevado se reflejó en el índice de Shannon con un valor de 0,137, el más bajo de los 3 puntos de muestreo, cuanto menor es el valor del índice de Shannon menor es la heterogeneidad de la población. (Pla, 2006).

En el punto de muestreo intermedio la especie dominante fue *G. olivaceum* (Horn.) *Bréb.*, la cual representa un 89,5% de la población de individuos algales, se caracteriza por crecer exclusivamente en aguas con un pH superior a 7, con nivel bastante alto de oxígeno y tolerar concentraciones elevadas de nitratos (Wojtal, 2003). La siguiente especie más abundante fue *Achnanthes minutissima* (Sippenkomplex) con un 4,8%. En este punto el índice de Shannon muestra mayor biodiversidad, con un valor de 0,483.

En punto de salida mostró la mayor biodiversidad, con un índice de Shannon de 1,291. La especie con mayor presencia fue *Achnanthes minutissima* (Sippenkomplex) con un 60,2%, seguida de las especies: *G. parvulum* (Kütz.)Kütz. con un 15,5%, *Amphora sp. cf. A. fagediana* Krammer con un 9,2%, y *N. palea* (Kütz.)W.Smith con un 6,3%. Las especies *G. parvulum* Kütz. y *N. palea* (Kütz.) W.Smith se caracteriza por formarse sobre algas y plantas sumergidas (Seckt, 1931).

Estas diferencias de las poblaciones en los puntos de muestreo se deben a un exceso de nutrientes en el agua (Tien, Wu, Chuang, & Chen, 2009) que favorece la eutrofización, este proceso provoca en el agua una disminución de diversidad de especies, un aumento de la biomasa, el aumento de la

materia orgánica, además olor y sabor desagradable, limitándola a ciertos usos (Lopez, 2010). La disminución de las altas concentraciones de materia orgánica, sólidos en suspensión totales y nutrientes conforme el agua circula por el sistema, mejora la calidad del agua, reflejándose en una mayor diversidad de especies. La disminución de sólidos en suspensión y materia orgánica a lo largo del sistema produce que la Terbutilazina este más biodisponible en el punto de muestreo intermedio y en el de la salida. Ello haría que las poblaciones estén más expuestas y tengan por tanto que adaptarse a dicho herbicida.

# 5-CONCLUSIONES

---

- 1) La circulación del agua por el humedal resulto en una disminución materia orgánica, sólidos en suspensión totales, concentración de nitratos, oxígeno disuelto y pH. Por otra parte produjo un aumento de cloruros, sulfatos, sodio y potasio, produciendo un aumento de la conductividad.
- 2) Los aportes laterales de aguas en el humedal, limitan la eficiencia de biofiltración del mismo, especialmente en lo referente a herbicidas.
- 3) El humedal, en la mejor de las situaciones estudiadas, tuvo la capacidad de disminuir las concentraciones de Terbutilazina entre un 67% y un 88%.
- 4) El aumento de la biodiversidad de las poblaciones algales a lo largo del humedal, es un buen indicador de la mejora de la calidad global del agua.
- 5) La presencia del humedal mejora la calidad del agua afectada por las actividades agrícolas que llega al rio Flumen.

## 6-REFERENCIAS

---

- Alvarez, D. A., Stackelberg, P. E., Petty, J. D., Huckins, J. N., Furlong, E. T., Zaugg, S. D., & Meyer, M. T. (2005). Comparison of a novel passive sampler to standard water-column sampling for organic contaminants associated with wastewater effluents entering a New Jersey stream. *Chemosphere*, 61(5), 610-622. doi: DOI 10.1016/j.chemosphere.2005.03.023
- Battin, T. J., Kaplan, L. A., Newbold, J. D., & Hansen, C. M. E. (2003). Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. *Nature*, 426(6965), 439-442. doi: Doi 10.1038/Nature02152
- Blanck, H., Wallin, G., & Wangberg, S. A. (1984). Species-Dependent Variation in Algal Sensitivity to Chemical-Compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 8(4), 339-351.
- Blanck, H., Wänberg, S., & Molander, S. (1988). Pollution-Induced Community Tolerance-A new Ecotoxicological Tool. *Functional Testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of Chemicals*, 219-230.
- Brack, W., & Frank, H. (1998). Chlorophyll a fluorescence: A tool for the investigation of toxic effects in the photosynthetic apparatus. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 40(1-2), 34-41. doi: DOI 10.1006/eesa.1997.1639
- Cano, E. J., A. (2003). Efectos de *Procambiarus clarkii*, sobre las plántulas de arroz y su control usando un surfactante no iónico, en marismas del Bajo Guadalquivir. *Bol. San. Veg. Plagas*, 29, 641-648.
- Cartagena, C. G., A. ; Esteban, D.; Peñuela, A. (2013). Degradación fotolítica del carbofurano en aguas del río Ríonegro y en agua ultrapura bajo diferentes condiciones de pH\*. *Scielo*. doi: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1909-04552013000200005&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1909-04552013000200005&script=sci_arttext)
- Comin, F., Sorando, R., Darwiche, N., Garcia, M., Massip, A. . (2013). A protocol to prioritize wetland restoration and creation for water quality improvement in agricultural watersheds. *Ecological Engineering*
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Debeer, D., Caldwell, D., Korber, D., & James, G. (1994). Biofilms, the Customized Microniche. *Journal of Bacteriology*, 176(8), 2137-2142.
- CREMAGUA. (2012). Ejecución de obras de construcción/restauración de humedales y bosques de ribera.
- Delgadillo, O., Camacho, A., Perez, L., Andrade, M. (2010). *Depuración de aguas residuales por medio de humedales artificiales* (Nelson Antequera Durán ed.). Universidad Mayor de San Simón, Bolivia.
- Dorigo, U., Bourrain, X., Berard, A., & Leboulanger, C. (2004). Seasonal changes in the sensitivity of river microalgae to atrazine and isoproturon along a contamination gradient. *Science of the Total Environment*, 318(1-3), 101-114. doi: Doi 10.1016/S0048-9697(03)00398-X
- Estefani, G. ¿Cómo funciona la fotosíntesis? , from <http://www.artinaid.com/2013/04/como-funciona-la-fotosintesis/>
- Ewert, F., Rodriguez, D., Jamieson, P., Semenov, M. A., Mitchell, R. A. C., Goudriaan, J., . . . Villalobos, F. (2002). Effects of elevated CO2 and drought on wheat: testing crop simulation models for different experimental and climatic conditions. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 93(1-3), 249-266. doi: Pii S0167-8809(01)00352-8
- Doi 10.1016/S0167-8809(01)00352-8
- Fairchild, J. F., Ruessler, D. S., & Carlson, A. R. (1998). Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor, and metolachlor. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(9), 1830-1834. doi: Doi 10.1897/1551-5028(1998)017<1830:Csofso>2.3.Co;2

- Fernandez, L. (2002). Contaminación del origen agrario. El problema de los nitratos. In I. G. y. M. d. España (Ed.), *Presente y futuro de las aguas subterráneas en la provincia de Jaén* (pp. 157-166).
- Gavín, G. (2005). *Comarca de los Monegros*: ARPIrelieve, S. A.
- Giorgi, A., Feijoó, C. (2010). Variación temporal de la biomasa del perifiton de *Egeria densa* Planch. en un arroyo pampeano. *Limnetica*, 29(2), 270-277.
- Guasch H, M. I., Roses N, Sabater S. (1997). Changes in atrazine toxicity throughout succession of stream periphyton communities. *J Appl Phycol*, 137–146.
- Hansen, M. T., L.; Márquez, H.; Villada, M.; Gonzalez, L.; Guillen, R.; Hernández, A. (2013). Atrazina: Un herbicida polémico. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 65-84.
- Iovanna, R., Hyberg, S., & Crumpton, W. (2008). Treatment wetlands: Cost-effective practice for intercepting nitrate before it reaches and adversely impacts surface waters. *Journal of Soil and Water Conservation*, 63(1), 14a-15a. doi: Doi 10.2489/63.1.14a
- Jeffrey, S. W., & Humphrey, G. F. (1975). New Spectrophotometric Equations for Determining Chlorophylls a, B, C1 and C2 in Higher-Plants, Algae and Natural Phytoplankton. *Biochemie Und Physiologie Der Pflanzen*, 167(2), 191-194.
- Kadleck, R., Knight, R., Vymazal, J., Brix H., Cooper, P., Haberl, R. (2000). Constructed wetlands for pollution control: Processes, performance, design and operation. *IWA*.
- Klementova, S. (2012). *Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds* (Vol. 16): InTech.
- Kroeze, C., & Seitzinger, S. P. (1998). Nitrogen inputs to rivers, estuaries and continental shelves and related nitrous oxide emissions in 1990 and 2050: a global model. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 52(2-3), 195-212. doi: Doi 10.1023/A:1009780608708
- Larras, F., Montuelle, B., & Bouchez, A. (2013). Assessment of toxicity thresholds in aquatic environments: Does benthic growth of diatoms affect their exposure and sensitivity to herbicides? *Science of the Total Environment*, 463, 469-477. doi: DOI 10.1016/j.scitotenv.2013.06.063
- Lee, C. G., Fletcher, T. D., & Sun, G. Z. (2009). Nitrogen removal in constructed wetland systems. *Engineering in Life Sciences*, 9(1), 11-22. doi: DOI 10.1002/elsc.200800049
- López, E. A., O.;Barettino, D. (2002). Tramientos pasivos de drenajes ácidos de mina: estado actual prespectivas de futuro. *Boletín Geológico y Minero*, 113, 3-21.
- López, J., Fornés J. (2009). *La Geología e Hidrogeología en la Investigación de Humedales*. Instituto Geológico y Minero de España: Tiasa.
- Lopez, M., Guadalupe, M., Torres, M., Flores, A., Lind, O. (2010). Efecto de agua tratada sobre la biomasa del perifiton de dos sitios del área lacustre de Xochimilco utilizando un microcosmos artificial. *Sociedades rurales, producción y medio ambiente*, 10(19).
- Lorente, C., Muñoz, S., Val, J., Merchan, D., Causape, J., Glud, N., . . . Navarro, E. (2014). Impacts of agricultural irrigation on nearby freshwater ecosystems: the impacts of triazine herbicides in algal biofilms during an agricultural year. *Science of the Total Environment*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.108>
- M. LeBaron, E. M., C. Burnside. (2008). The Triazine Herbicides. 50 Years Revolutionizing Agriculture. *8 The Mode of Action of Triazine herbicides in Plants*, 101-110.
- Markwell, J., D. Namuth, e I. Hernández-Ríos. (2005). Introducción a los herbicidas que actúan a través de la fotosíntesis. *Library of Crop Technology Lessons Modules. University of Nebraska*.
- Martin, C., German, C., Francisco, A., Herce, C. (1998). Filtros verdes: Una alternativa real en el tratamiento de aguas residuales en pequeños municipios. *Congreso del Agua. Zaragoza*.
- Martín, G., Alcalá, E., Sola, C., Plazuelo, A., Burgos M. (2004). Efecto de la contaminación minera sobre el perifiton del río Guadiamar. *Limnetica* 23(3-4), 315-329.
- Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 659-668. doi: DOI 10.1093/jexbot/51.345.659
- Monegros, C. d. L. (2012). *Restauración de Humedales para la mejora de la Biodiversidad*.

- Navarro, E., Guasch, H., & Sabater, S. (2002). Use of microbenthic algal communities in ecotoxicological tests for the assessment of water quality: the Ter river case study. *Journal of Applied Phycology*, 14(1), 41-48.
- OMS. (2003). Terbutylazine in drinking water. *Documento de referencia para la elaboración de las Guías de la OMS para la calidad del agua potable, WHO/SDE/WSH/03.04/63.*
- Orozco, C. P., A.; González, M<sup>a</sup>N.; Rodríguez, F.J. ;Alfayate, J.M. (2002). Contaminación ambiental. Una visión desde la química.
- Pérez, E. (2009). Fotosíntesis: Aspectos básicos. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2, 1-47.
- Pla, L. (2006). Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *SciELO*.
- Reichholf, J. (2009). *La invención de la agricultura: por qué el hombre se hizo sedentario.*
- Rimet, F., & Bouchez, A. (2012). Life-forms, cell-sizes and ecological guilds of diatoms in European rivers. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*(406). doi: Artn 01
- Doi 10.1051/Kmae/2012018
- Ritchie, R. J. (2006). Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynthesis Research*, 89(1), 27-41. doi: DOI 10.1007/s11120-006-9065-9
- Sekkt, H. (1931). Fenómenos de epifitismo en algas del agua dulce. *Revistas de la Universidad Nacional de Córdoba*, 18(9-10), 86-133.
- Shipin, O. V., Lee, S. H., Chiemchaisri, C., Wiwattanakom, W., Ghosh, G. C., Anceno, A. J., & Stevens, W. F. (2007). Piggery wastewater treatment in a tropical climate: Biological and chemical treatment options. *Environmental Technology*, 28(3), 329-337. doi: Doi 10.1080/09593332808618793
- Stehle, S., Elsaesser, D., Gregoire, C., Imfeld, G., Niehaus, E., Passeport, E., . . . Schulz, R. (2011). Pesticide Risk Mitigation by Vegetated Treatment Systems: A Meta-Analysis. *Journal of Environmental Quality*, 40(4), 1068-1080. doi: Doi 10.2134/Jeq2010.0510
- Sundaravadivel, M., & Vigneswaran, S. (2001). Constructed wetlands for wastewater treatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 31(4), 351-409. doi: Doi 10.1080/20016491089253
- Tien, C. J., Wu, W. H., Chuang, T. L., & Chen, C. S. (2009). Development of river biofilms on artificial substrates and their potential for biomonitoring water quality. *Chemosphere*, 76(9), 1288-1295. doi: DOI 10.1016/j.chemosphere.2009.06.013
- Vankooten, O., & Snel, J. F. H. (1990). The Use of Chlorophyll Fluorescence Nomenclature in Plant Stress Physiology. *Photosynthesis Research*, 25(3), 147-150.
- Vera, C., Salvato, M., Borin, M., Vidal, G. (2011). Consideraciones para la eliminación del nitrógeno en humedales artificiales. *Tecnología del agua*.
- Wojtal, A. (2003). Diatoms of the genus Gomphonema Ehr. (Bacillariophyceae) from a karstic stream in the Krakowsko-Czestochowska Upland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 72(3), 213-220.

# 7-ANEXOS

## ANEXO I PROPIEDADES DE LAS AGUAS MUESTREADAS.

Fecha	Muestreo	Punto de muestreo	Tª (°C)	pH	Cond. (µS/cm)	SPC (µS/cm)	O <sub>2</sub> (mg/L)	O.D. (%)	ORP (mv)	S.S.T. (mg/L)	M.O. (mg/L)	S.D.T. (mg/L)	Alcalinidad total (mg/L)
13/05/2014	1º	Entrada	16,9	8,42	749	840	9,7	95	215	157,6	8,4	660	259,8
		Intermedio	17,7	8,17	801	931	7,4	80,2	197,5	9	2,2	680	260,8
		Salida	17,4	7,52	771	903	6,06	63,4	198,5	2,4	1,3	640	255,2
16/05/2014	2º	Entrada	20,01	8,17	777	857	7,7	89	89,4	-	-	-	-
		Intermedio	17,8	7,98	763	877	7,47	78,4	134,5	-	-	-	-
		Salida	18,4	7,9	799	903	5,4	61,2	109,2	-	-	-	-
21/05/2014	3º	Entrada	18	7,95	1023	1176	6,7	72,3	180,6	21,4	3,2	820	245,7
		Intermedio	16,7	8	1255	1485	6,2	65,2	176,4	21,6	2,8	992	253,3
		Salida	17,4	7,53	1234	1443	2,9	30,7	192,4	7	1,2	928	233
29/05/2014	4º	Entrada	16,8	7,38	889	1055	-	-	176,1	12,2	2,8	768	265,3
		Intermedio	15,9	7,22	976	1181	-	-	109,7	14,6	2,8	832	277,5
		Salida	16,7	7,17	1114	1324	-	-	116,7	5,6	2,2	940	265,8
05/06/2014	5º	Entrada	17,6	7,96	839	976	6,4	68,4	85,6	4,4	1,3	696	239,7
		Intermedio	19,3	7,92	954	1070	5,34	58,5	120,3	12,2	2,2	772	251,2
		Salida	20,6	7,52	1025	1117	3,16	36,4	138,4	2,2	1	776	247,7
09/06/2014	6º	Entrada	22,6	8,05	1034	1081	7,63	91,8	153,9	-	-	-	-
		Intermedio	22,4	7,86	1181	1241	4,17	49,5	143,4	-	-	-	-
		Salida	22,8	7,64	1334	1389	3,16	37,9	146,9	-	-	-	-
12/06/2014	7º	Entrada	23,3	7,72	1149	1176	6,45	78,4	164,2	5,6	2,6	736	260,4
		Intermedio	24,4	7,75	1170	1183	4,49	59,3	164,6	9,8	2,6	756	248,8
		Salida	22	7,43	1181	1246	3,35	39,6	128,3	1,5	1,2	776	244,4

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del agua en los diferentes muestreos de agua.

Muestreo	Punto de muestreo	Fluoruros (mg/L)	Cloruros (mg/L)	Nitritos (mg/L)	Bromuros (mg/L)	Nitratos (mg/L)	Fosfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)	Sodio (mg/L)	Amonio (mg/L)	Potasio (mg/L)	Calcio (mg/L)	Magnesio (mg/L)	Bicarbonatos (mg/L)
1 <sup>e</sup>	Entrada	0,3520	54,115	0,1300	0,0840	81,6550	0,0000	72,9700	40,3000	0,0720	2,0670	104,2620	35,6120	259,8
	Intermedio	0,3320	70,741	0,0480	0,0930	77,8230	0,1570	78,2560	54,2010	0,0790	2,9730	103,5670	35,0110	260,8
	Salida	0,3400	66,81	0,1620	0,0540	63,6270	0,4500	70,1170	51,9870	0,0880	8,0710	96,3220	35,7880	255,2
3 <sup>e</sup>	Entrada	0,3820	136,514	0,3410	0,1580	62,9090	0,0000	125,3560	96,4130	0,1420	5,1870	110,1730	38,0190	245,7
	Intermedio	0,3900	225,437	0,0980	0,1520	62,2430	0,0000	150,7540	161,5900	0,1200	5,9170	113,5030	39,7010	253,3
	Salida	0,3510	212,883	0,6050	0,1470	64,2600	0,0560	136,0040	149,2490	1,0340	8,3300	105,4770	34,8500	233
4 <sup>e</sup>	Entrada	0,4090	104,9	0,1900	0,1660	70,0610	0,0000	97,8890	75,7160	0,1110	3,0040	107,2860	38,7580	265,3
	Intermedio	0,3770	128,358	0,0780	0,1620	86,8920	0,0000	109,0800	96,1540	0,0810	4,9070	116,6870	38,8250	277,5
	Salida	0,3720	183,288	0,1210	0,1380	62,8150	0,0000	132,5200	135,1010	0,1050	7,7010	112,7560	38,1610	265,8
5 <sup>e</sup>	Entrada	0,3750	95,259	0,1180	0,1510	63,0020	0,0000	96,2010	70,2500	0,0860	3,6940	101,0420	37,3790	239,7
	Intermedio	0,3850	124,981	0,0860	0,1710	63,0220	0,0000	116,0380	94,2240	0,0790	4,0670	103,2010	39,7530	251,2
	Salida	0,3830	135,542	0,1510	0,1490	50,6670	0,0000	116,7710	102,2900	0,0830	3,7730	101,2090	39,5700	247,7
7 <sup>e</sup>	Entrada	0,4200	120,855	0,3380	0,1760	61,2790	0,0000	101,3380	87,707	0,224	3,319	100,326	40,069	260,4
	Intermedio	0,3710	118,538	0,1010	0,1570	70,7670	0,0000	104,2990	87,669	0,066	3,525	102,074	38,697	248,8
	Salida	0,3780	139,029	0,2240	0,1690	51,6070	0,0000	117,2390	102,473	0,074	3,547	100,415	39,693	244,4

Tabla 2. Concentración de aniones y cationes en los diferentes muestreos de agua.

Muestreo	Punto de muestreo	4,4´ DDT (µg/l)	Acetoclor (µg/l)	Clorpirifos (µg/l)	Cipermetrina (µg/l)	Diflifenican (µg/l)	Metolachlor+S-MET (µg/l)	Pendimetalina (µg/l)	Dimetoato (µg/l)	Terbutilazina (µg/l)
3º	Entrada	n.d.	0,0188	n.d.	n.d.	0,0083	0,4109	n.d.	N/A	0,4488
	Intermedio	N/A	0,0578	0,4803	0,9152	0,1669	1,7318	0,2526	N/A	7,6335
	Salida	n.d.	0,7759	0,1775	n.d.	0,0785	7,0401	0,0443	N/A	32,4032
4º	Entrada	N/A	0,0693	0,0260	n.d.	0,0539	0,6009	0,0252	N/A	1,8069
	Intermedio	N/A	0,0147	0,1097	n.d.	0,3690	0,8251	0,0889	N/A	1,4151
	Salida	n.d.	0,0137	0,0272	n.d.	0,0129	0,3785	0,0408	N/A	0,5807
5º	Entrada	0,0472	0,0129	0,0337	N/A	0,0136	0,2894	0,0201	N/A	1,0110
	Intermedio	0,04033	0,0309	0,0278	n.d.	0,0599	0,9372	0,0467	N/A	1,2270
	Salida	n.d.	0,0044	0,0254	n.d.	0,0173	0,1283	N/A	N/A	0,1165
7º	Entrada	0,0224	0,0053	0,0109	n.d.	0,0278	0,0288	0,0114	N/A	0,056
	Intermedio	n.d.	0,0050	N/A	n.d.	N/A	0,2312	N/A	0,414	0,1204
	Salida	0,0112	0,0143	0,0164	n.d.	0,0469	0,1011	0,0117	N/A	0,1108

**Tabla 3. Concentración de pesticidas en los diferentes muestreos de agua. N/A = detectable pero no cuantificable, n.d. = no detectable.**

## ANEXO II EXPERIMENTO DOSIS RESPUESTA

Exposición (min.)	%Yield Punto de entrada	%Yield Punto de salida
0	100	100
15	31,1097411	14,7540984
30	33,7546239	15,4098361
45	20,9001233	14,5081967
60	11,9297164	4,75409836
75	13,5018496	13,7704918
90	8,23057953	10,3278689

Tabla 4. Datos pre-experimento, punto de entrada, concentración de Terbutilazina 8000 nM.

Concentración (nM)	%Yield a 0h	Concentración (nM)	%Yield a 1h	Concentración (nM)	% Yield a 2h
0	100	0	103,491872	0	102,882353
0	101,8	0	97,1703793	0	101,823529
0	96,8	0	95,5448525	0	94,4117647
0	107,8	0	105,478627	0	100,058824
0	101	0	99,6989765	0	99,3529412
0	96,8	0	98,615292	0	101,470588
0	105	43	94,0999398	43	87,5294118
0	100,6	43	89,0427453	43	88,2352941
0	100	43	86,5141481	43	90,5294118
43	106,6	215	48,9464178	43	86,4705882
43	106,4	215	47,5015051	43	60
43	110	215	50,2107164	43	58,4117647
43	105,4	215	47,1402769	215	54,5294118
43	110,2	215	42,0830825	215	50,4705882
43	107,8	215	47,1402769	215	42,8823529
43	107,6	859	14,6297411	215	39,5294118
43	107,8	859	21,4930765	215	26,4705882
43	103	859	20,9512342	215	29,6470588
215	109,2	859	11,5593016	215	27,8823529
215	104,4	859	11,3786875	859	16,2352941
215	105,8	1720	14,8103552	859	17,4705882
215	82,2	1720	5,05719446	859	4,76470588
215	65,6	1720	10,8368453	859	12,8823529
215	99,2	1720	10,295003	859	13,4117647
215	93,2	5479	3,97350993	1720	13,0588235
215	81,4	5479	2,88982541	1720	12,1764706
215	93,6	5479	1,98675497	1720	15
215	98			1720	13,0588235
859	90			1720	15,7058824
859	80,4			5479	10,2352941

859	60,8			5479	3,17647059
859	76,6			5479	1,94117647
859	98,6			5479	4,94117647
1720	116,2			5479	0
1720	110				
1720	97,4				
5479	85,2				
5479	75,4				
5479	64,6				
5479	88				
5479	80,8				
5479	99,2				

Tabla 5. Datos del experimento dosis- respuesta de los biofilms del punto de muestreo de la entrada.

Concentración (nM)	%Yield a 0h	Concentración (nM)	%Yield a 1h	Concentración (nM)	%Yield a 2h
0	90,5395279	0	97,0491803	0	97,8723404
0	95,0917947	0	93,442623	0	101,276596
0	95,5976021	0	94,2622951	0	98,0425532
0	102,678906	0	106,393443	0	105,531915
0	102,847508	0	105,573771	0	100,085106
0	103,859123	0	103,278689	0	97,1914894
0	106,893968	43	91,9672131	43	92,9361702
0	104,364931	43	93,2786885	43	89,0212766
0	98,1266392	43	93,9344262	43	94,4680851
43	97,4522293	43	95,5737705	43	97,7021277
43	98,4638441	43	91,9672131	43	90,5531915
43	101,330086	43	88,852459	43	90,212766
43	104,364931	215	81,6393443	215	53,787234
43	97,7894343	215	76,3934426	215	49,7021277
43	101,498689	215	71,9672131	215	44,9361702
43	102,847508	215	47,5409836	215	60,9361702
43	105,039341	215	54,9180328	215	53,787234
43	102,173099	215	64,9180328	215	48,1702128
215	95,934807	859	42,6229508	215	58,0425532
215	95,934807	859	31,3114754	859	23,6595745
215	103,353316	859	26,2295082	859	29,9574468
215	101,498689	859	25,2459016	859	31,6595745
215	93,5743724	859	22,9508197	859	34,5531915
215	107,06257	859	23,2786885	859	20,7659575
215	102,004496	859	25,9016393	859	28,5957447
215	101,835894	859	19,1803279	859	22,1276596
215	105,039341	1720	15,7377049	1720	56,3404255
859	89,5279131	1720	27,704918	1720	22,1276596

859	85,8186587	1720	34,9180328	1720	20,2553192
859	81,6035969	5479	13,7704918	1720	18,0425532
859	97,9580367	5479	14,9180328	1720	24
859	99,475459	5479	30,1639344	1720	27,0638298
859	62,382915	5479	10,4918033	1720	31,1489362
859	63,7317347	5479	20,9836066	5479	17,3617021
859	102,678906	5479	23,9344262	5479	13,4468085
859	85,8186587			5479	17,8723404
859	51,4237542			5479	6,9787234
859	91,8883477			5479	41,8723404
859	88,1790933			5479	11,7446809
1720	99,138254			5479	0
1720	95,934807			5479	5,44680851
1720	95,2603972				
5479	44,0052454				
5479	47,3772949				
5479	26,1333833				
5479	33,2146872				
5479	55,4702136				
5479	55,8074185				

**Tabla 6. Datos del experimento dosis- respuesta de los biofilms del punto de muestreo intermedio.**

Concentración (nM)	% Yield a 0h	Concentración (nM)	% Yield a 1h	Concentración (nM)	% Yield a 2h
0	90,28265287	0	93,38692	0	93,8610662
0	98,59597266	0	101,772013	0	94,9919225
0	99,42730464	0	99,3058093	0	98,0613893
0	104,5815629	0	99,1413957	0	99,3537965
0	102,087567	0	102,429668	0	101,77706
0	103,7502309	0	102,758495	0	101,938611
0	100,424903	0	97,6616734	0	100,484653
0	100,424903	0	97,826087	0	105,49273
0	100,424903	0	105,717939	0	104,038772
43	100,2586366	43	86,3171356	43	83,3602585
43	105,2466285	43	83,6865181	43	93,5379645
43	101,0899686	43	99,4702229	43	85,7835218
43	107,2418252	43	88,6189258	43	96,1227787
43	104,0827637	43	97,1684326	43	97,2536349
43	105,0803621	43	102,265254	43	89,6607431
43	99,92610382	43	95,1954695	43	89,3376414
43	104,2490301	43	96,5107782	43	90,1453958
43	100,2586366	43	70,862258	43	94,6688207
215	97,0995751	43	85,6594812	215	48,1421648
215	107,4080916	43	90,5918889	215	47,819063

215	100,0923702	215	34,6912678	215	63,1663974
215	106,0779605	215	44,7204969	215	52,0193861
215	105,4128949	215	42,7475338	215	43,1340872
215	105,7454277	215	35,3489222	215	50,5654281
215	95,60317754	215	39,6236756	215	47,6575121
215	92,27784962	215	37,3218853	215	33,279483
215	101,256235	859	40,7745707	215	38,2875606
859	102,4200998	859	11,1801242	859	17,447496
859	104,2490301	859	10,0292291	859	17,1243942
859	103,7502309	859	21,5381805	859	5,16962843
859	92,9429152	859	19,5652174	859	18,7399031
859	96,43450951	859	14,3039825	859	24,717286
859	93,60798079	859	16,4413592	859	16,9628433
859	93,60798079	859	19,729631	859	27,7867528
859	93,1091816	859	16,9345999	859	30,8562197
859	99,92610382	859	24,9908659	859	32,6332795
1720	97,0995751	1720	12,9886737	859	24,3941842
1720	95,43691114	1720	9,7004019	1720	11,7932149
1720	101,4225014	1720	10,6868835	1720	25,6865913
1720	83,96452984	1720	7,7274388	1720	24,3941842
1720	94,60557916	1720	0,49324078	1720	14,7011309
1720	99,26103824	1720	5,26123493	1720	12,1163166
1720	91,77905043	1720	10,851297	1720	17,7705977
1720	98,76223905	1720	6,90537084	1720	0,80775444
1720	94,43931277	1720	8,05626599	1720	21,3247173
5479	73,48974691	5479	4,11033979	1720	3,06946688
5479	68,83428783	5479	9,20716113	5479	0
5479	48,54978755	5479	11,8377786	5479	0,32310178
5479	39,23886939	5479	19,8940446	5479	7,1082391
5479	47,55218917	5479	0	5479	5,49273021
		5479	9,04274753	5479	11,631664
		5479	23,6755572	5479	15,3473344
		5479	21,7025941	5479	22,2940226
		5479	4,27475338	5479	13,8933764
		5479	11,0157106	5479	3,71567044
		5479	3,9459262	5479	5,00807754
				5479	0

**Tabla 7. Datos del experimento dosis- respuesta de los biofilms del punto de muestreo de salida.**

## Resultados estadísticos del experimento dosis-respuesta a 1h.

Parameter estimates:

	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
b:Entrada	1.32367	0.23005	5.75392	0.0000
b:Intermedio	1.66540	0.32485	5.12669	0.0000
b:Salida	1.64363	0.18985	8.65764	0.0000
c:Entrada	4.01266	3.84954	1.04237	0.2996
c:Intermedio	18.91278	2.96535	6.37793	0.0000
c:Salida	10.60851	1.65143	6.42384	0.0000
d:Entrada	100.43470	2.73407	36.73446	0.0000
d:Intermedio	98.40341	2.49460	39.44655	0.0000
d:Salida	100.70819	2.21912	45.38209	0.0000
e:Entrada	187.39264	22.02165	8.50947	0.0000
e:Intermedio	262.89619	27.49953	9.56003	0.0000
e:Salida	142.56456	12.91907	11.03520	0.0000

Residual standard error:

6.924258 (106 degrees of freedom)

```
> ED(model1,  
c(50))
```

Estimated effective doses

	Estimate	Std. Error
Entrada:50	187.39	22.022
Intermedio:50	262.90	27.500
Salida:50	142.56	12.919

```
> mi <- compParm (model1, "e")
```

Comparison of parameter 'e'

	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
Entrada/Intermedio	0.71280	0.11214	-2.56102	0.0118
Entrada/Salida	1.31444	0.19506	1.61202	0.1099
Intermedio/Salida	1.84405	0.25521	3.30729	0.0013

## Resultados estadísticos del experimento dosis-respuesta a 2h.

Parameter estimates:

	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
b:Entrada	1.12276	0.17201	6.52736	0.0000
b:Intermedio	1.28403	0.24490	5.24308	0.0000
b:Salida	1.31706	0.17825	7.38876	0.0000
c:Entrada	4.87403	3.59739	1.35488	0.1780
c:Intermedio	17.70339	3.36999	5.25324	0.0000
c:Salida	8.84735	2.65795	3.32863	0.0012
d:Entrada	100.08603	3.35063	29.87079	0.0000
d:Intermedio	101.46478	3.15811	32.12837	0.0000
d:Salida	101.23928	2.58343	39.18795	0.0000
e:Entrada	127.22876	19.36044	6.57158	0.0000
e:Intermedio	179.38969	26.39777	6.79564	0.0000
e:Salida	178.14413	19.83273	8.98233	0.0000

Residual standard error:

8.258135 (120 degrees of freedom)

```
> ED(model1,  
c(50))
```

Estimated effective doses

	Estimate	Std. Error
Entrada:50	127.23	19.360
Intermedio:50	179.39	26.398
Salida:50	178.14	19.833

```
> mi <- compParm (model1, "e")
```

Comparison of parameter 'e'

	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
Entrada/Intermedio	0.709231	0.150133	-1.936748	0.0551
Entrada/Salida	0.714190	0.134659	-2.122478	0.0359
Intermedio/Salida	1.006992	0.185812	0.037629	0.9700

Resultados estadísticos del experimento dosis-respuesta del punto de muestreo de la entrada.

Parameter estimates:

	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
b:1	1.32375	0.23022	5.74980	0.0000
b:2	1.11925	0.14445	7.74845	0.0000
c:1	4.01808	3.85217	1.04307	0.3017
c:2	4.76679	3.04055	1.56774	0.1229
d:1	100.43433	2.73705	36.69441	0.0000
d:2	100.10214	2.81206	35.59740	0.0000
e:1	187.37811	22.04293	8.50060	0.0000
e:2	127.51728	16.32468	7.81132	0.0000

Residual standard error:

6.932056 (53 degrees of freedom)

```
> ED(model1,  
c(50))
```

Estimated effective doses

	Estimate	Std. Error
1:50	187.38	22.043
2:50	127.52	16.325

```
> mi <- compParm (model1, "e")
```

Comparison of parameter 'e'

	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
1/2	1.46943	0.25548	1.83747	0.0717

Resultados estadísticos del experimento dosis-respuesta del punto de muestreo intermedio.

Parameter estimates:

	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
b:1	1.66485	0.40563	4.10436	1e-04
b:2	1.27859	0.25572	4.99993	0e+00
c:1	18.90805	3.70605	5.10195	0e+00
c:2	17.60416	3.56101	4.94359	0e+00
d:1	98.40521	3.11770	31.56340	0e+00
d:2	101.48542	3.30893	30.67016	0e+00
e:1	262.91308	34.37635	7.64808	0e+00
e:2	179.81243	27.86211	6.45365	0e+00

Residual standard error:

8.653358 (68 degrees of freedom)

```
> ED(model1,  
c(50))
```

Estimated effective doses

	Estimate	Std. Error
1:50	262.91	34.376
2:50	179.81	27.862

```
> mi <- compParm (model1, "e")
```

Comparison of parameter 'e'

	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
1/2	1.46215	0.29645	1.55898	
0.1236				

Resultados estadísticos del experimento dosis-respuesta del punto de muestreo de la salida.

Parameter estimates:

	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
b:1	1.60685	0.19747	8.13712	0.0000
b:2	1.28658	0.15500	8.30038	0.0000
c:1	10.02427	1.80600	5.55052	0.0000
c:2	8.19611	2.46393	3.32644	0.0012
d:1	100.85361	2.34289	43.04674	0.0000
d:2	101.36121	2.29166	44.23050	0.0000
e:1	144.23429	13.90205	10.37504	0.0000
e:2	180.69039	18.25773	9.89665	0.0000

Residual standard error:

7.327922 (105 degrees of freedom)

```
> ED(model1,  
c(50))
```

Estimated effective doses

	Estimate	Std. Error
1:50	144.23	13.902
2:50	180.69	18.258

```
> mi <- compParm (model1, "e")
```

Comparison of parameter 'e'

	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
1/2	0.79824	0.11147	-1.81002	0.0732

### ANEXO III ANÁLISIS DEL PERIFITON

Nº especie	Especie	P.Entrada (%)	P. Intermedio (%)	P. Salida (%)
<b>Cyanobacteria</b>				
Sp.1	<i>Phormidium amoenum</i> Kütz.ex Anagn. et Kom. <sup>1</sup>	0,00554873	0,0129301	0,01772982
<b>Bacillariophyceae</b>				
Sp.2	<i>Achnanthes minutissima</i> (Sippenkomplex)	98,0044555	4,83264539	60,2162568
Sp.3	<i>Amphora</i> sp. cf. <i>A. fagediana</i> Krammer	0	0	9,23126578
Sp.4	<i>Aulacoseira ambigua</i> (Grun.)Simonsen	0,00845154	0,02100112	0
Sp.5	<i>Cocconeis pediculus</i> Ehr.	0,01512286	0	0,07100974
Sp.6	<i>Cymbella affinis</i> Kütz.	0,30248289	0,95361545	2,20130184
Sp.7	<i>C. proxima</i> Reimer	0,1915725	0	0
Sp.8	<i>C. turgidula</i> Grunow	0	0,50106196	0
Sp.9	<i>Diatoma vulgare</i> Bory	0	0,09602864	0,07155249
Sp.10	<i>Denticula elegans</i> Kütz.	0,30248289	0	0
Sp.11	<i>Fragilaria capucina</i> Desm.	0,46582365	0,0368549	1,27108333
Sp.12	<i>Fragilaria ulna</i> (Nitzsch)Lange-Bertalot	0,28338087	0,00266838	0
Sp.13	<i>Fragilaria ulna</i> v. <i>acus</i> (Kütz.)Lange-Bertalot	0,01808732	0,00844986	0
Sp.14	<i>Gomphonema clavatum</i> Ehr.	0,02520049	0	0
Sp.15	<i>G. clevei</i> Fricke	0,00655315	0	0
Sp.16	<i>G. olivaceum</i> (Horn.) Bréb.	0,00655315	89,5163657	0
Sp.17	<i>G. parvulum</i> (Kütz.)Kütz.	0	3,31269157	15,4801226
Sp.18	<i>G. truncatum</i> Ehr.	0,05242523	0	0
Sp.19	<i>Nitzschia amphibia</i> Grun.	0	0,42991346	5,08429715
Sp.20	<i>Nitzschia linearis</i> (Ag.)Smith	0,3105491	0	0
Sp.21	<i>N. palea</i> (Kütz.)W.Smith	0	0,22726503	6,35538048
Sp.22	<i>N. sigmoidea</i> (Nitzsch)W.Smith	0,00010275	0	0
Sp.23	<i>Surirella brebissonii</i> Krammer & Lange-Bertalot v. <i>kuetzingii</i> Krammer & Lange-Bertalot	0	0,04850846	0
<b>Chlorophyta</b>				
Sp.24	<i>Oedogonium</i> sp. div. <sup>1</sup>	0,00087341	0	0
Sp.25	<i>Mougeotia</i> sp. <sup>1</sup>	0,00033395	0	0

Tabla 8. % De especies algales en cada uno de los puntos de muestreo.

## 8-AGRADECIMIENTOS

---

Quiero dar las gracias a varias personas que sin ellas no hubiera sido posible el desarrollo de este trabajo de fin de grado:

A Enrique Navarro, por introducirme en el mundo de la investigación científica y en la ecotoxicología, además de guiarme a lo largo del desarrollo de este trabajo.

A los técnicos del laboratorio del I.P.E., M<sup>o</sup> Carmen, Alberto y Mercedes por explicarme el funcionamiento y la forma de trabajar en el laboratorio.

A todos los miembros del I.P.E., por hacerme el día a día más fácil, en especial a Paco, Selene, Carmen, Nadia y David por su colaboración en el desarrollo de este trabajo.

A Jesús Causapé del Instituto Geológico y Minero de España, por su colaboración con las muestras de herbicidas.

A los profesores de la Escuela Politécnica Superior de Huesca, Rocio López por ponerme en contacto con Enrique y a José Manuel Nicolau por ofrecerse como ponente.

A mi familia, por su apoyo y ayuda en alguna salida al campo, pero sobre todo por estar en el día a día.

Gracias.