

Trabajo Fin de Máster

Presencia y acumulación de microorganismos
potencialmente patógenos en el mejillón cebra
de aguas superficiales de Aragón

Autor

Jesús Abadías Ullod

Director/es

Pilar Goñi Cepero
M^a Peña Ormad Melero

Escuela de Ingeniería y Arquitectura
2013

Me gustaría dar las gracias...

A Peña y Pili por su apoyo y consejos en todo momento.

A mis compañeros de laboratorio por su amabilidad en el trabajo diario y en especial a Noelia, Pilar, Isabel y José por toda su ayuda recibida.

A Munia por su disponibilidad y ayuda en mis inicios en este proyecto.

Sobre todo a mi familia, en especial a mis padres y hermanos por creer siempre en mí.

Presencia y acumulación de microorganismos potencialmente patógenos en el mejillón cebra de aguas superficiales de Aragón

Resumen

Los moluscos bivalvos son animales que se alimentan filtrando el agua de su entorno, de donde extraen el alimento, al que se unen diversos contaminantes químicos y biológicos que se encuentran en las aguas. El mejillón cebra es un molusco bivalvo originario de la región Ponto-cáspica, y que actualmente se ha extendido invadiendo diversas zonas del continente europeo y americano, entre las que se encuentra la cuenca hidrográfica del Ebro.

Diversos estudios de investigación muestran como los moluscos acumulan contaminantes presentes en la aguas y como pueden ser utilizados como indicadores de la calidad de dichas aguas. Conscientes del potencial patógeno que en general puede presentar cualquier tipo de molusco por su capacidad para acumular contaminantes peligrosos, se pretende evaluar y definir el riesgo que representan especies invasoras como el mejillón cebra, en aguas de la Comunidad Autónoma de Aragón, al actuar como reservorio de microorganismos patógenos.

Los diferentes ensayos realizados en este proyecto se centran en evaluar la presencia y cantidad de las bacterias indicadoras y patógenas, *Escherichia coli*, *Enterococcus sp.*, *Salmonella sp.* y *Pseudomonas aeruginosa*, y protozoos parásitos como *Cryptosporidium sp.*, *Giardia duodenalis* y amebas de vida libre, tanto en aguas naturales de Aragón como en los mejillones cebra que habitan en ellas. Se ha detectado la presencia *Cryptosporidium sp.* y amebas de vida libre en el interior del mejillón cebra, así como todas las bacterias estudiadas, confirmando la capacidad que tienen estos organismos bivalvos para retener y concentrar microorganismos patógenos.

Los resultados de este proyecto indican sin embargo, que el mejillón cebra es capaz de filtrar y acumular las bacterias presentes en el agua de distinta manera atendiendo al género al que pertenezcan.

Los ensayos realizados para evaluar la capacidad de acumulación bacteriana indican que estos organismos son capaces de acumular prácticamente la totalidad de bacterias de *Escherichia coli* y *Enterococcus sp.* en 24 horas, cuando todo el agua presente en la muestra objeto de estudio es filtrada por los mejillones cebra, siendo la capacidad acumulativa para *E. coli* mayor que para *Enterococcus sp.* Este hecho posiblemente ocurra porque el mayor tamaño de *E. coli* permite una mayor retención en el filtrado respecto a *Enterococcus sp.*. Esta mayor acumulación de *E. coli*, medida a través del agua de estudio, no refleja una mayor concentración interna de dicha bacteria con respecto a *Enterococcus sp.*, debido posiblemente a una distinta metabolización de las bacteria en el interior del mejillón cebra, u otro factor que se desconoce hasta el momento.

La gran capacidad que tiene el mejillón cebra para concentrar microorganismos patógenos supone un gran riesgo ambiental y sanitario, ya que pueden aumentar de una forma elevada la concentración de estos microorganismos en el agua, cuando los mejillones, por ciertas causas ambientales o bióticas, los expulsan al agua.

Índice

MEMORIA

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS | 13 |
| CAPÍTULO 2. EL MEJILLÓN CEBRA COMO ESPECIE | 15 |
| 2.1. Biología y ecología | 15 |
| 2.2. Reproducción y ciclo biológico | 16 |
| 2.3. Origen en la cuenca hidrográfica del Ebro | 17 |
| 2.4. Efectos ecológicos y socioeconómicos | 18 |
| CAPÍTULO 3. DISEÑO Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL | 21 |
| 3.1. Metodología analítica en aguas..... | 21 |
| 3.1.1. Parámetros físico-químicos..... | 21 |
| 3.1.2. Parámetros microbiológicos | 21 |
| 3.2. Metodología analítica microbiológica en <i>Dreissena polymorpha</i> | 23 |
| 3.2.1. Obtención del extracto | 23 |
| 3.2.2. Análisis de bacterias | 23 |
| 3.2.3. Análisis de parásitos | 23 |
| 3.3. Muestras de agua superficial y mejillón cebra..... | 25 |
| 3.4. Mantenimiento y cría en cautividad del mejillón cebra..... | 26 |
| 3.4.1. Monitorización de las condiciones del acuario | 26 |
| 3.4.2. Observación de larvas de <i>Dreissena polymorpha</i> | 27 |
| 3.5. Presencia de patógenos en el mejillón cebra de aguas superficiales de Aragón.. | 28 |
| 3.6. Determinación <i>in vitro</i> de la acumulación e infección de bacterias por <i>Dreissena polymorpha</i> | 28 |
| 3.6.1. Acumulación bacteriana | 28 |
| 3.6.2. Infección bacteriana | 30 |
| CAPÍTULO 4. RESULTADOS | 33 |
| 4.1. Mantenimiento y cría en cautividad del mejillón cebra..... | 33 |
| 4.1.1. Monitorización de las condiciones del acuario | 33 |
| 4.1.2. Observación de larvas de <i>Dreissena polymorpha</i> | 34 |
| 4.2. Detección de patógenos en mejillones cebra de aguas superficiales de Aragón . | 35 |
| 4.2.1. Parámetros físico-químicos..... | 35 |
| 4.2.2. Análisis de bacterias | 35 |
| 4.2.3. Análisis de parásitos | 37 |
| 4.3. Acumulación e infección <i>in vitro</i> de bacterias por <i>Dreissena polymorpha</i> | 39 |
| 4.3.1. Resultados acumulación bacteriana en el mejillón cebra..... | 39 |
| 4.3.2. Resultados infección bacteriana por el mejillón cebra | 48 |
| CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES | 55 |
| CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA | 59 |

ANEXOS

| | |
|---|-----------|
| ANEXO I. Terminología científica de estudio | 65 |
| ANEXO II. Microorganismos patógenos objeto de estudio..... | 67 |
| II.I. <i>Escherichia coli</i> | 67 |
| II.II. <i>Enterococcus</i> sp..... | 67 |
| II.III. <i>Salmonella</i> sp. | 67 |
| II.IV. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 67 |
| II.V. <i>Cryptosporidium</i> sp. | 68 |
| II.VI. <i>Giardia duodenalis</i> | 68 |
| II.VII. Amebas de vida libre | 68 |
| ANEXO III. Metodología analítica físico-química | 69 |
| III.I. Oxígeno disuelto..... | 69 |
| III.II. Temperatura | 69 |
| III.III. pH..... | 69 |
| III.IV. Conductividad..... | 69 |
| III.V. Dureza total | 69 |
| III.VI. Dureza de calcio | 70 |
| ANEXO IV. Metodología analítica microbiológica..... | 71 |
| IV.I. Diluciones seriadas..... | 71 |
| IV.II. Medios de cultivo..... | 71 |
| IV.II.i. Agar McConkey..... | 72 |
| IV.II.ii. Slanetz & Bartley agar | 72 |
| IV.II.iii. <i>Salmonella-Shigella</i> agar | 73 |
| IV.II.iv. Agar Cetrimida..... | 74 |
| IV.III. Métodos de siembra..... | 74 |
| IV.III.i. Método de filtración por membrana | 74 |
| IV.III.ii. Método de siembra en superficie | 75 |
| IV.IV. Incubación | 75 |
| IV.V. Recuento bacteriano..... | 75 |
| IV.VI. Procedimiento experimental de fortificación bacteriana de muestras | 76 |
| ANEXO V. Resultados | 79 |
| V.I. Resultados de parámetros físico-químicos de control en el acuario..... | 79 |
| V.II. Imágenes de los resultados de acumulación bacteriana | 82 |
| V.II.i. <i>Escherichia coli</i> | 82 |
| V.II.ii. <i>Enterococcus</i> sp. | 82 |
| V.II.iii. <i>Salmonella</i> sp..... | 83 |

MEMORIA

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La expansión de especies exóticas invasoras (EEI) se considera la segunda causa de pérdida de biodiversidad a nivel global, sólo por detrás de la destrucción o alteración de los hábitats naturales. La invasión de estas especies a nivel mundial ha aumentado en las últimas décadas y está causada principalmente por el incremento del tráfico internacional de barcos debido a la conexión de ríos mediante canales (Van der Velde y Platvoet, 2007).

Según el Real Decreto 1628/2011, por el que se regula el listado y catálogo español de especies exóticas invasoras, se define especie exótica o alóctona como especie, subespecie o taxón, incluyendo sus partes, gametos, semillas, huevos o propágulos que pudieran sobrevivir o reproducirse, introducidos fuera de su área de distribución natural y de su área potencial de dispersión, la cuál no hubiera podido ocupar sin la introducción directa o indirecta, o sin el cuidado del hombre.

Una de las especies exóticas invasoras introducidas por el hombre en España, que en la última década se ha extendido de forma más rápida y que más alarma está generando, es el mejillón cebrá (*Dreissena polymorpha*), cuya introducción es de origen desconocido, aunque todo parece apuntar a un mal uso de las prácticas recreativas acuáticas. En España y de manera más específica en la cuenca del Ebro, la proliferación del mejillón cebrá constituye un ejemplo claro de invasión biológica. Esta especie de mejillón se ha adaptado rápidamente a los hábitats acuáticos de la cuenca hidrográfica del Ebro, colonizando grandes superficies de la misma, debido principalmente a su alta capacidad reproductora, colonizadora y de filtración.

Con estas características, *Dreissena polymorpha* se convierte en un invasor perfecto, y en un agente de cambio ecológico radical: disminuye drásticamente la concentración de fitoplancton en el agua, aumenta la deposición de materia orgánica en el fondo, y la estructura del bentos queda gobernada por sus densas poblaciones. En términos económicos, representa pérdidas inmensas al taponar cañerías, adherirse al casco de las embarcaciones, y producir enormes cantidades de conchas que modifican la naturaleza del cauce. En términos ecológicos, a pesar de que los efectos varían mucho según la zona concreta, la invasión de este bivalvo ha causado la práctica extinción de diversas especies de moluscos autóctonos, y ha alterado de manera irreversible las condiciones ecológicas de todo tipo de aguas dulces (Durán, 2007; Durán et al., 2009).

Los moluscos como el mejillón cebrá, al alimentarse por filtración, retienen el fitoplancton y otro tipo de materia orgánica del agua, pero también los contaminantes químicos y microbianos que lo acompañan, de forma que actúan concentrándolos. Diversos estudios muestran como *Dreissena polymorpha* acumula contaminantes químicos presentes en el agua, tanto en el río Ebro (Carrasco et al., 2008), como en otros lugares. Además, otros estudios muestran la capacidad acumulativa de diversos protozoos patógenos en el interior del mejillón cebrá (Graczyk et al. 2001; 2003; 2004).

Esto se traduce en una doble lectura, los moluscos se convierten en un reservorio de microorganismos patógenos por lo que constituyen un riesgo para la salud ya que están presentes en todo tipo de aguas, a la vez que se plantea como posible su utilidad para detectar la presencia de estos microorganismos en las aguas naturales, ya que facilitan su concentración.

En la Comunidad Autónoma de Aragón se han realizado diversos estudios sobre el comportamiento del mejillón cebra frente a diferentes contaminantes y sustancias peligrosas, pero no se han realizado todavía, estudios que aborden su papel en la Salud Pública o su utilidad como indicadores de calidad microbiológica de las aguas.

La mayor parte de los estudios realizados a escala mundial y relacionados con el mejillón cebra se centran en la aplicación de técnicas que permitan su control e erradicación, pero, hasta donde se conoce, no se está analizando el peligro potencial que estas especies pueden tener como consecuencia de su poder bioacumulador de microorganismos patógenos y otros contaminantes peligrosos, lo que puede suponer un grave riesgo ambiental y sanitario, como origen de contaminación de las aguas de abastecimiento en las que están presentes.

El objetivo principal de este estudio es detectar la presencia de microorganismos potencialmente patógenos en el interior del mejillón cebra de aguas superficiales de la comunidad autónoma de Aragón, analizando la capacidad del mejillón cebra para acumular una serie de estos patógenos. La consecución de estos objetivos nos ayudará a comprender su posible utilidad y papel como bioindicador de la calidad microbiológica del agua.

A partir de aquí, se plantean los siguientes objetivos:

- Investigar sobre la posible acumulación de bacterias patógenas en mejillones cebra recogidos en aguas superficiales de la Comunidad Autónoma de Aragón. Las bacterias patógenas a estudiar son *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus sp.*
- Investigar sobre la posible acumulación de protozoos patógenos en los mejillones cebra recogidos en aguas superficiales de la Comunidad Autónoma de Aragón. Como protozoos indicadores se determinarán *Giardia*, *Cryptosporidium* y amebas de vida libre.
- Puesta en marcha del mantenimiento y cría en cautividad del mejillón cebra para su posterior utilización en la experimentación *in vitro* en el laboratorio.
- Determinar la capacidad de acumulación e infección bacteriana *in vitro*, utilizando mejillones cebra mantenidos en acuario de laboratorio.

Este proyecto de investigación se ha realizado conjuntamente entre el Grupo de Investigación de “Protozoosis entéricas de interés económico y sanitario” perteneciente al Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Zaragoza y el Grupo de Investigación consolidado de “Calidad y Tratamiento de Aguas” perteneciente al Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza.

CAPÍTULO 2. EL MEJILLÓN CEBRA COMO ESPECIE

2.1. Biología y ecología

El mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*) es una especie de molusco bivalvo descrito por primera vez por Pallas en 1771.

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Clase BIVALVIA, Linnaeus, 1758.

Subclase EULAMELLIBRANCHIA, Pelseneer, 1889.

Orden VENEROIDA, Adams, 1856.

Familia DREISSENIDAE, Gray, 1840.

Género *Dreissena*, van Beneden, 1835.

Especie *Dreissena polymorpha*, Pallas 1771.



Figura 1. Individuos de *Dreissena polymorpha*.

Los individuos de *Dreissena polymorpha* (Figura 1), se caracterizan por tener forma triangular y un tamaño longitudinal de 2 a 3 centímetros en estado adulto, aunque en ocasiones alcanzan tamaños superiores. La coloración de las valvas alterna colores claros y oscuros en bandas laterales en zig-zag. Esta especie tiene una morfología definida, pero existe gran variedad de formas que vienen dadas principalmente por las diferencias en la coloración, de aquí su epíteto *polymorpha*.

Es un mejillón de aguas dulces, que también es capaz de sobrevivir en aguas salobres, como en el Mar Caspio o el Mar Negro, de donde es originario. En su etapa adulta vive fijado a un sustrato gracias a la estructura que segrega el mismo mejillón, denominada biso.

En la mayoría de los hábitats se fija a sustratos duros como rocas, rejas metálicas, cascos de embarcaciones e incluso sobre estructuras duras de otros animales como valvas pertenecientes a otros mejillones cebra. Suele formar grandes colonias, llegando a alcanzar densidades de miles de individuos por metro cuadrado. Es una especie filtradora de seston (partículas en suspensión, inertes o vivas), que se alimenta principalmente de fitoplancton, zooplancton de pequeño tamaño y restos de materia orgánica que obtiene del agua que le rodea. Un individuo adulto es capaz de filtrar hasta 2,5 litros de agua al día (Claudi y Mackie, 1994), pero hay una enorme variabilidad en las tasas de filtración según otros autores (Ackerman, 1999; Baldwin et al., 2002), las cuales pueden derivar de distintos factores abióticos y bióticos. El tamaño de partículas que puede filtrar y retener el mejillón cebra es de hasta 0,7 μm , mostrando preferencia por partículas de mayor tamaño entre 15 y 40 μm (Claudi y Mackie, 1994).

Las características propias de la especie que la definen como una de las invasoras más prolíferas son su elevada capacidad reproductora y su gran plasticidad fisiológica, que le han permitido sobrevivir y reproducirse en un gran abanico de condiciones ambientales y de hábitat. Los factores abióticos más limitantes para el crecimiento de la especie son el pH del agua, la temperatura y la concentración de calcio. En la bibliografía aparecen distintos datos sobre los límites de supervivencia de la especie en distintas masas de agua, aunque estos valores están bastante consensuados. El mejillón cebra en estado adulto requiere de un pH superior a 6,5 - 6,8 (McMahon, 1996; Claudie y Mackie, 1994). En cuanto a la temperatura soporta rangos amplios de temperatura, siempre superiores a 0°C, ya que no soportan la congelación, con límites máximos ente 29-31°C. Su rango óptimo de crecimiento se fija entre los 18°C y 20°C. La concentración de calcio mínima requerida para la supervivencia de los individuos se fija entre 12 y 15 mg Ca/l, debido a que necesitan un continuo aporte de este ion para la formación de su concha de carbonato de calcio.

2.2. Reproducción y ciclo biológico

Dreissena polymorpha es una especie dioica con ratio 1:1, en cuyo ciclo de vida se diferencian dos etapas o fases de vida, una fase larvaria o planctónica que como su nombre indica se desarrolla en la columna de agua y otra fase adulta o bentónica en la que el mejillón vive anclado a un sustrato. En la Figura 2 se observa el ciclo de vida del mejillón cebra con sus distintas etapas de desarrollo. La reproducción se inicia con la suelta de gametos sexuales al agua por parte de los individuos adultos, y es en este medio donde se produce la fecundación, la cual es externa. Una vez desarrollado el embrión comienzan a diferenciarse las distintas etapas larvianas. Al cabo de unas horas de la fecundación, se produce la transformación del embrión a larva trocófora. Esta larva gracias a los nutrientes presentes en el embrión desarrolla una estructura llamada *velum*, que es un órgano ciliado que permite el movimiento, formándose así la larva velígera. A partir de este momento la larva va creciendo y desarrollándose, formando las valvas, el pie, el sistema de sifones a partir de los cuales podrá hacer circular el agua para filtrar los nutrientes y los demás órganos necesarios en el individuo adulto (Claudi y Mackie, 1994). En el momento que la larva, en estado pedivelígero, secreta una estructura filamentososa denominada *biso*, es cuando esta larva se ancla a un sustrato y se fija a él, terminando el desarrollo hacia estado adulto. Al cabo de un mes, se pueden tener individuos que se han adherido al sustrato.

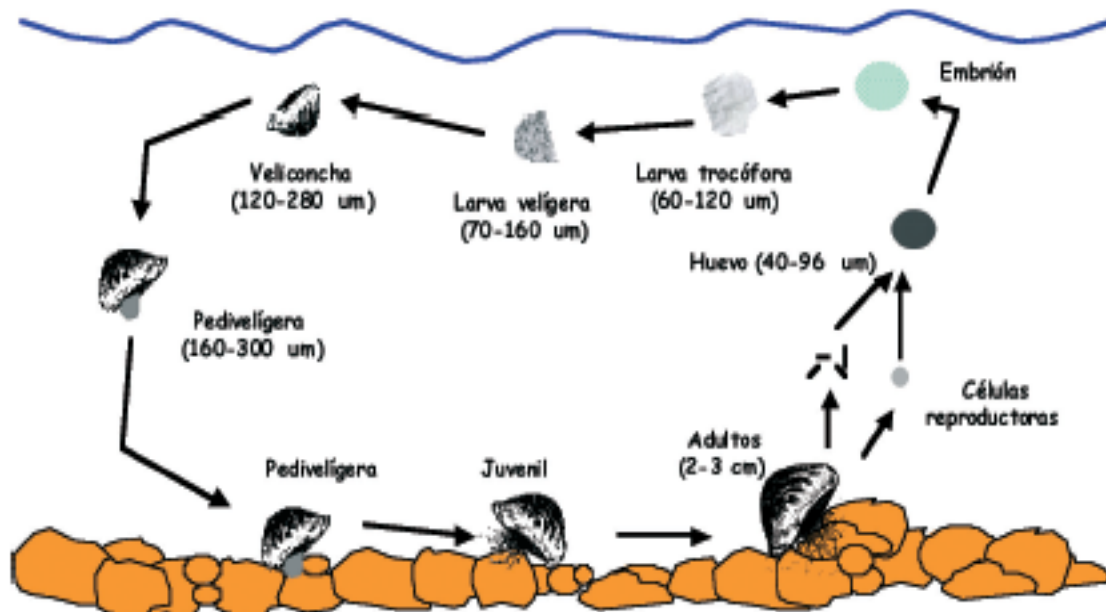


Figura 2. Ciclo reproductivo *Dreissena polymorpha* (Palau et al., 2004).

El factor principal y detonante del comienzo de la época reproductiva es la temperatura. Los individuos de esta especie inician la reproducción cuando llega la época primaveral y el agua alcanza una temperatura entre los 12°C y 15°C (Claudi y Mackie, 1994; Palau et al., 2004). El máximo de esta actividad reproductora, así como los rangos de temperatura de inicio de la reproducción pueden variar según poblaciones. El mejillón cebra realiza la reproducción durante dos o extraordinariamente tres periodos a lo largo del año, liberando los gametos durante un periodo comprendido entre 6 y 8 semanas. La primera suelta de gametos es la de mayor entidad (Borcherding, 1991) y normalmente tiene lugar en primavera (Abril-Mayo) (Claudi y Mackie, 1994). En lugares cálidos esta fase reproductiva puede durar hasta 5 meses.

2.3. Origen en la cuenca hidrográfica del Ebro

Dreissena polymorpha se ha definido como especie exótica invasora y está catalogada dentro de las 100 especies exóticas invasoras más dañinas por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2000). Toda especie invasora tiene alguna característica específica que le permite formar en este grupo (EEI), y por tanto la capacidad de invadir nuevos hábitats y ecosistemas.

Según diversos estudios el mejillón cebra es originario de la región Ponto-cáspica y fue descrito por Pallas en el río Ural en 1771 por primera vez. Pronto se descubrieron ejemplares en el mar Caspio y el mar Negro. La creación de canales y vías de navegación y comunicación fluvial, junto con el tráfico de embarcaciones produjeron su expansión desde dicha zona hacia el resto de Europa. La introducción de la especie en el continente Norteamericano se produjo mucho más tarde, citada alrededor de 1985-1986, seguramente se produjo a través de aguas de lastre de barcos europeos transoceánicos.

En nuestro país se detectó por primera vez el mejillón cebra en el río Llobregat, Barcelona, en 1982. Se trató de una pequeña población que no prosperó debido a las fuertes crecidas que tuvieron lugar en invierno de ese mismo año (Ruiz Altaba, 1992).

A partir del año 2001 se habla de esta especie como especie exótica invasora en el tramo inferior del río Ebro (Ruiz Altaba et al., 2001). Esta tardía invasión en la península Ibérica pudo darse por un aislamiento geográfico ocasionado por los Pirineos (Rajagopal et al., 2009). Se barajan varias hipótesis acerca del vector de entrada del mejillón cebra en el río Ebro, pero casi todos los focos apuntan a un mal uso de las prácticas recreativas acuáticas, siendo las barcas de uso deportivo o los peces utilizados como cebo en la pesca deportiva, introducidos de otros países, como el principal foco de invasión de esta especie de mejillón. Desde ese momento ha ido colonizando gran parte de la cuenca del Ebro y otras cuencas hidrográficas de la península Ibérica.

2.4. Efectos ecológicos y socioeconómicos

El impacto que tienen estas especies invasoras no solo repercute en la biodiversidad, sino también en el campo económico. La intensidad y magnitud de las alteraciones provocadas dependen de la especie invasora, pero en gran medida del ecosistema receptor y de las condiciones ambientales de este. No siempre las modificaciones o alteraciones provocadas por estas especies son negativas, ya que alguna de ellas puede tener efectos neutros o benignos.

Los principales efectos ecológicos y socioeconómicos ocasionados por *Dreissena polymorpha* son:

- Disminución de la disponibilidad de alimento y oxígeno para otras especies autóctonas, que puede ocasionar la disminución de sus poblaciones o incluso su desaparición.
- Competencia por el sustrato con otras especies autóctonas e incluso utilización de ciertas especies acuáticas, como cangrejos o grandes bivalvos, como base de anclaje para sus conchas.
- Aumento espectacular de macrófitos en las masas de agua, debido que la alta capacidad de filtración de fitoplancton por parte de *Dreissena polymorpha* provoca una clarificación del agua y un aumento de la luz y los nutrientes disponibles para los macrófitos (Palau et al., 2004). Estos cambios en la columna de agua también pueden afectar a comunidades como el zooplancton y los peces.
- Afectación de numerosas infraestructuras como tuberías y zonas de captación de agua para actividades urbanas y agrícolas debido a su capacidad para formar agregados de cientos o miles de individuos.
- Daños en embarcaciones y sistemas de navegación.
- Disminución de las actividades recreativas acuáticas, debido a un mayor control para la prevención de nuevas invasiones.
- Gastos derivados de la prevención y erradicación de afectaciones producidas por la invasión de esta especie.

-Capacidad de retener compuestos contaminantes para las aguas y metales pesados (Carrasco et al., 2008), que luego pueden introducir en la cadena trófica.

- Capacidad de introducir en la invasión de una nueva masa de agua, distintas especies que le acompañan, siendo parásitas o simbioses habituales de su lugar de origen. Un claro ejemplo es el caso de *Phyllodistomum folium* (Peribáñez et al., 2006) un helminto trematodo que se desarrolla en el mejillón cebra y en fase adulta causa una enfermedad urinaria a algunos peces.

-Posible utilización en la industria de tratamiento de aguas como bioacumulador de contaminantes y agente clarificador de aguas (Elliott et al., 2008).

- **Transmisión de enfermedades** (objeto de estudio de este Trabajo Fin de Máster), ya que tienen una alta capacidad de filtración y retención de partículas extremadamente pequeñas (de hasta 0,7 μm) en aguas naturales (Claudi y Mackie, 1994) y son capaces de acumular y concentrar microorganismos patógenos humanos, tanto protozoos y hongos patógenos (Graczyk et al. 2001; 2003; 2004) y bacterias como *Escherichia coli* (Selegean et al., 2001). Esto le convierte en un posible transmisor de enfermedades, ya que son capaces de acumular microorganismos patógenos, pudiéndolos expulsar más tarde a otro hábitat diferente.

CAPÍTULO 3. DISEÑO Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1. Metodología analítica en aguas

3.1.1. Parámetros físico-químicos

La Tabla 1 muestra los parámetros físico-químicos analizados en las muestras de agua de este trabajo de investigación, así como la instrumentación y la metodología utilizada para ello.

Tabla 1. Métodos e instrumentos utilizados en la experimentación para la caracterización físico-química de las muestras de agua.

| Parámetro | Método normalizado | Metodología Instrumental | Marca y Modelo | Rango de medida | Error |
|------------------|------------------------------------|--|-------------------------------|-----------------------|-----------------|
| Oxígeno disuelto | 5814:1990 (UNE - EN ISO) | Medida de oxígeno disuelto y temperatura | HANNA Instruments HI 9146N | 0,00-45,00 ppm | 1,5% |
| Temperatura | | | | 0-50°C | ± 0'2 °C |
| pH | SM 4500-HB (Standard Methods) | pH-metría | CRISON GLP 21 | 1-14 | ± 0'02 |
| Conductividad | 27888:1994 (UNE - EN ISO) | Conductimetría | CRISON Basic 30 | 0,01 – 19999 µS/cm | ± 0'02 µS/cm |
| Dureza total | 77040:2002 (UNE - EN ISO) | Valoración | - | - | - |
| Dureza de Calcio | SM 3500-Ca B (Standard Methods) | Valoración | - | - | - |

Los parámetros analizados y la metodología analítica están descritos de forma detallada en el ANEXO III.

3.1.2. Parámetros microbiológicos

Los parámetros microbiológicos objeto de estudio en las aguas analizadas son la identificación y cuantificación de distintas bacterias indicadoras de contaminación fecal y ambiental, en concreto: *Escherichia coli*, *Enterococcus sp.*, *Salmonella sp.* y *Pseudomonas aeruginosa*. La descripción detallada de dichas bacterias aparece en el ANEXO II.

Los equipos de laboratorio utilizados en el análisis microbiológico de las aguas, son los mostrados en la Tabla 2. Todo el material de vidrio utilizado se esteriliza en autoclave a 121°C y 1 bar de presión durante 15 minutos.

Tabla 2. Equipos de laboratorio utilizados en los análisis microbiológicos.

| Instrumento | Marca | Modelo | Función |
|---------------------|------------------|------------------|--|
| Estufas de cultivo | J.P. Selecta | INCUDIGIT 36 L | Cultivo bacteriológico |
| Baño termostático | J.P. Selecta | PRECISTEM 20 L | Mantenimiento del agar en estado líquido |
| Autoclave | J.P. Selecta | 437-P | Esterilización del material |
| Rampa de filtración | Millipore | Sistema Microfil | Análisis microbiológico |
| Mechero bunsen | | | Crear condiciones estériles |
| Agitador Vortex | Velp Scientifica | ZX3 | Mezcla de soluciones en tubos |

En la Tabla 3 se muestran los procedimientos analíticos, los medios de cultivo, los métodos de siembra y el tiempo y la temperatura de incubación de los distintos indicadores bacterianos de contaminación utilizados en las aguas analizadas durante este proyecto.

Tabla 3. Indicadores bacterianos de contaminación en las aguas.

| Indicador bacteriano | Procedimientos analíticos | Medio de cultivo | Métodos de siembra | Tiempo y temperatura de incubación |
|-------------------------------|---|-------------------------------------|---|---|
| <i>Escherichia coli</i> | UNE-EN ISO 9308-1:2000 y 9215.C [Clesceri <i>et al.</i> , 2005] | McConkey Agar (Scharlau) | Filtración por membrana y siembra en superficie | 24 horas a 42°C |
| <i>Enterococcus sp.</i> | UNE-EN ISO 7899-2:2001 y 9215.C [Clesceri <i>et al.</i> , 2005] | Slanetz & Bartley Agar (Scharlau) | Filtración por membrana y siembra en superficie | 48 horas a 37°C |
| <i>Salmonella sp.</i> | 9215.C [Clesceri <i>et al.</i> , 2005] | Salmonella-Shigella Agar (Scharlau) | Filtración por membrana y siembra en superficie | 48 horas a 37°C |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | UNE-EN ISO 16266:2006 y 9215.C [Clesceri <i>et al.</i> , 2005] | Cetrimide Agar (Scharlau) | Filtración por membrana y siembra en superficie | 48 horas a 37°C |

Los resultados obtenidos se expresan en UFC/100 mL ó UFC/mL. La descripción de las diluciones seriadas pertinentes, los medios de cultivo, los métodos de siembra, la incubación y el recuento de bacterias se encuentra de forma detallada en el ANEXO IV.

3.2. Metodología analítica microbiológica en *Dreissena polymorpha*

3.2.1. Obtención del extracto

El análisis de la contaminación microbiológica en el mejillón cebra se realiza a partir de del extracto homogeneizado del tejido interno del mismo. El procedimiento consiste en la extracción del tejido del molusco, junto con el agua retenida en su interior, con la ayuda de unas pinzas metálicas y un bisturí. Se anota el peso del tejido junto con el peso del medio acuoso interno de los mejillones y se homogeneiza mecánicamente en un recipiente de porcelana. Al homogeneizado se le añade una cantidad determinada de PBS (Phosphate buffered saline) ó tampón fosfato salino, el cual viene esterilizado (Scharlau). Se anota la cantidad de PBS añadida. De esta manera se obtiene el extracto deseado, el cual se divide en alícuotas para el análisis de los distintos patógenos. Las valvas y el biso del mejillón se desechan y no se analizan debido a que su dureza imposibilita su homogeneización como extracto.

3.2.2. Análisis de bacterias

A partir del extracto de mejillón obtenido se analiza la cantidad de bacterias presentes en el interior de este molusco. Las bacterias estudiadas en el tejido interior del mejillón cebra son *Escherichia coli*, *Enterococcus sp.*, *Salmonella sp.* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se trabaja utilizando el extracto como si fuese agua, es decir, utilizando el mismo material y toda la metodología de cultivo utilizada en el apartado 3.1.2. y descrita detalladamente en el ANEXO IV.

Los resultados se obtienen en UFC/mL de extracto, pero se expresan en UFC/gramo de mejillón cebra, en los que el peso de mejillón cebra es la suma del tejido y el agua retenida en su interior. Para ello se calculan los gramos de mejillón cebra (tejido + agua intersticial) presentes en cada mililitro de extracto. La densidad del tejido interior del mejillón se considera 1 gramo/mL, debido al gran porcentaje de agua presente en el tejido de los moluscos.

Los equipos de laboratorio utilizados en los análisis microbiológicos en *Dreissena polymorpha* son los mostrados en la Tabla 2 del apartado 3.1.2. Todo el material de vidrio y metálico utilizado se esteriliza en autoclave a 121°C y 1 bar de presión durante 15 minutos.

3.2.3. Análisis de parásitos

La analítica llevada a cabo permite evaluar la presencia o ausencia de ciertos parásitos en el interior del mejillón cebra. El estudio se realiza, igual que el análisis bacteriológico, a partir del extracto de mejillón cebra. Los parásitos a evaluar son *Giardia*, *Cryptosporidium* y amebas de vida libre (la descripción de dichos protozoos parásitos aparece de forma detallada en el ANEXO II). A diferencia del análisis de bacterias que evalúan la presencia y el número de las mismas, los análisis parasitológicos de este proyecto se realizan solamente para detectar la presencia de dichos organismos.

Toda la analítica se realiza en condiciones estériles y de seguridad para evitar una posible contaminación. El microscopio óptico utilizado para evaluar la presencia de estos parásitos es un Zeiss Axiostar Plus.

Giardia duodenalis:

El análisis de detección este protozoo parásito consiste en la visualización del extracto de mejillón cebra con el microscopio óptico. Se toman 20 µL de la muestra del extracto preparado y se ponen en un portaobjetos. En cada portaobjetos se pueden poner dos réplicas, a las cuales se depositará encima un cubreobjetos.

Cryptosporidium sp.:

El estudio de la presencia de este organismo parásito se realiza mediante la detección de sus ooquistes con la tinción de Ziehl-Neelsen modificada (Henriksen y Pohlenz, 1981). Este método de tinción consiste en depositar sobre un portaobjetos 20 µL del extracto obtenido y dejarlo secar al aire. Se fija la preparación con metanol durante 10 minutos. Seguidamente se cubren las preparaciones con papel de filtro y se añade fucsina básica fenicada por encima. Se deja actuar la fucsina durante 20 minutos y se realiza un lavado con agua destilada. Se decolora con H₂SO₄ al 7% durante 1 o 2 minutos y se vuelve a lavar con agua destilada. Por último se cubren las preparaciones con una solución contracolorante (azul de metileno), y después de un minuto se lava con agua destilada y se deja secar el portaobjetos en disposición vertical. Una vez listas las preparaciones con la tinción de Zielh-Neelsen modificada, estas se observan con el microscopio óptico.

Amebas de vida libre (AVL):

Para detectar la presencia de amebas de vida libre (AVL) en el extracto de mejillón se prepara un medio adecuado para el crecimiento y desarrollo de estas amebas. El medio escogido es un medio sólido de consistencia, agar no nutritivo, Scharlau (12-15 g/L de agua destilada). Una vez depositado este medio de consistencia en una placa de petri, se añaden 150 µL de una suspensión concentrada de *Escherichia coli*, la cual se extiende uniformemente por la superficie del agar con la ayuda del asa de Digralsky, y que sirve de nutriente para el crecimiento de las amebas. Esta suspensión concentrada se prepara en un tubo con agua destilada al 0,9 % NaCl, en el cual se inocula *Escherichia coli* con una turbidez aproximadamente 1 en la escala de MacFarland. En la Figura 3 se observa la preparación del medio nutritivo para las amebas. Seguidamente se añaden 20 µL del extracto de mejillón cebra en el centro de la placa de petri con el medio de cultivo preparado. Se preparan varias placas inoculadas con el extracto de mejillón cebra. Estas placas se sellan con una película de plástico autosellante y moldeable (Parafilm) y se incuban a 30°C durante un periodo de 48 horas a 15 días.

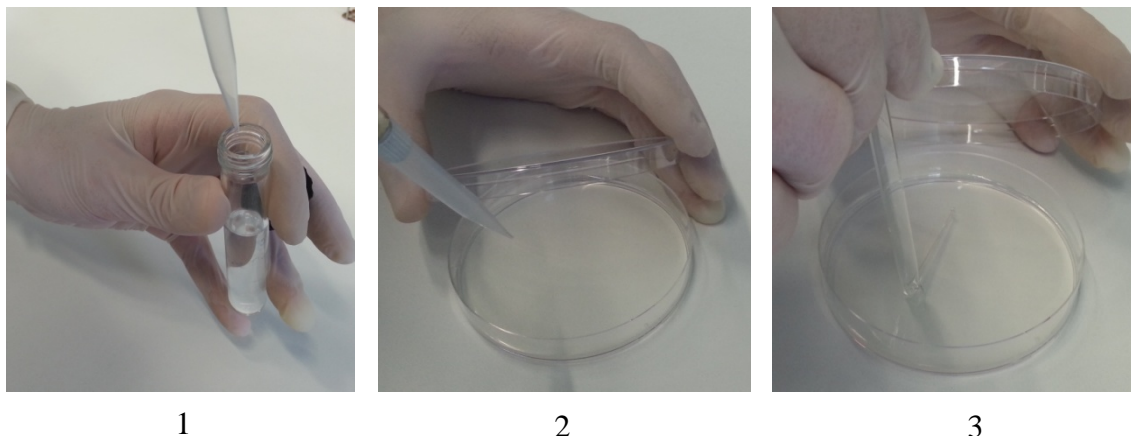


Figura 3. 1, suspensión concentrada de *E.coli*. 2, inóculo de 150 μ L de la suspensión bacteriana concentrada. 3, extensión uniforme del concentrado bacteriano sobre la superficie del agar.

Una vez pasado el tiempo de incubación, se prepara el montaje para el visualizado de las amebas al microscopio. Para ello se añade 1 mL de PBS (Scharlau) a cada placa de petri mediante una pipeta automática y con el asa de Digralesky se sueltan las amebas de la superficie del agar. Una vez realizado este paso, se capta el líquido que queda sobre la base del agar, y se centrifuga (centrifugadora Hettich Universal II) a 6000 rpm durante 10 minutos. Se recogen 20 μ L de la base del sobrenadante (varias réplicas), se disponen en un portaobjetos y se cubren con el cubreobjetos pertinente. Por último se visualizan las preparaciones con el microscopio óptico.

3.3. Muestras de agua superficial y mejillón cebra

Las muestras de agua, así como los ejemplares de *Dreissena polymorpha* fueron tomados de la Acequia Rimer (Caspé), adyacente al río Guadalope junto a su desembocadura en río Ebro. La toma de muestras se realizó en 2 épocas diferentes del año, otoño (27 de Noviembre) y primavera (24 de Abril). El grupo de Calidad y Tratamiento de Aguas, perteneciente al departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza tiene autorización del INAGA para la recogida y tenencia de ejemplares vivos y muertos de mejillón cebra para investigación.

Se recogió un gran número de ejemplares de *Dreissena polymorpha* y gran cantidad de agua circundante de la acequia Rimer. Esto se debe a que se necesita gran cantidad de muestra para llevar a cabo toda la experimentación del presente proyecto.

Durante la duración de todo el procedimiento experimental se desinfectó rigurosamente con hipoclorito de sodio (NaClO) todos los equipos, muestras y material utilizados y que estuvieron en contacto con el agua (natural y utilizada en laboratorio) y con individuos de *Dreissena polymorpha*, para evitar un desarrollo mayor de la invasión de esta especie en cualquier zona.

3.4. Mantenimiento y cría en cautividad del mejillón cebra

3.4.1. Monitorización de las condiciones del acuario

La puesta en marcha del mantenimiento y cría del mejillón cebra en acuario de laboratorio sirve para disponer de ejemplares de este molusco para la experimentación llevada a cabo en el mismo laboratorio. Dicho acuario (Figura 4) se encuentra situado en el laboratorio del grupo de investigación de “Calidad y Tratamiento de Aguas”, perteneciente al departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza.

El acuario está dispuesto de forma que le llegue luz natural para que los individuos de mejillón cebra tengan un seguimiento normal de su ciclo biológico y circadiano, aunque no interesa que los rayos solares ataquen directamente al entorno, ya que esto puede producir un aumento excesivo de la temperatura del agua y una desmesurada proliferación de algas. El acuario dispone de una serie de bombas de agua para la correcta circulación del agua, así como bombas de aire para suplementar en el agua una cantidad de oxígeno disuelto idónea para el desarrollo de la vida de estos moluscos filtradores. La presencia de filtros naturales de arena y piedras en el fondo del acuario permite la depuración del agua, y gracias a una bomba se succiona el agua en el fondo y se envía por un tubo ascendente a la superficie de la columna del agua.



Figura 4. Acuario para el mantenimiento y cría del mejillón cebra.

Tanto el agua recogida en Caspe como los individuos de *Dresissena polymorpha* (a excepción de los utilizados para evaluar la presencia de contaminantes en mejillones cebra de aguas superficiales, apartado 3.5 del presente proyecto) son introducidos en el acuario instalado en el laboratorio. Se introduce el agua superficial natural recogida en Caspe en el acuario para que las condiciones de aclimatación y de supervivencia sean mucho más favorables para el mejillón cebra. El procedimiento de este experimento se basa en el control de las condiciones físico-químicas del agua, para impedir variaciones drásticas en los parámetros ambientales principales que influyen en la cría y desarrollo de estos organismos. Los parámetros físico-químicos que se analizan son los descritos en el apartado 3.1.1 de este proyecto. En la Tabla 4 se muestran los rangos de preferencia orientativos del mejillón cebra

para distintos parámetros y variables según O'Neil (1996) y complementado con datos de Claudi y Mackie (1994).

Tabla 4. Rangos de preferencia orientativos del mejillón cebra para distintos parámetros y variables según O'Neil (1996) y complementado con datos de Claudi and Mackie (1994).

| Variable | Condiciones de colonización y crecimiento potenciales | | | | | |
|--|---|------------|------------------|------------------------|---------|------------------|
| | Nulas | Muy bajas | Bajas | Medias | Altas | Óptimas |
| Calcio (mg/l) | 5-6 | <9 | 9-20 | 20-25 | 25-125 | >125 |
| Dureza Total (mg CaCO ₃ /l) | 0-22 | <25 | 25-45 | 45-90 | 90-125 | >125 |
| pH | 0-6,0 | <6,5 >9 | 6,5 - 7,2 9,0 | 7,2 - 7,5 8,7 - 9,0 | 7,5-8,7 | 8,0-8,5 |
| Temperatura (°C) | <2 >40 | <8 >30 | 9-15 28-30 | 16-18 25-28 | 18-25 | 18-20 |
| Oxígeno disuelto (mg/l) | Anoxia | <4 | 4-6 | 6-8 | 8-10 | ±100% saturación |
| Conductividad (µS/cm) | 0-21 | <22 | 22-36 | 37-82 | 83-110 | >110 |

El acuario se suplementa continuamente con un extracto de alga, en concreto *Chlorella* deshidratada. Según Nichols (1993), la *Chlorella* deshidratada en la alimentación del mejillón cebra en condiciones de laboratorio muestra unos valores de supervivencia y crecimiento elevados en los individuos de dicha especie.

3.4.2. Observación de larvas de *Dreissena polymorpha*

Se realiza una observación continua de larvas de mejillón cebra en el acuario instalado en el laboratorio, para asegurarse del inicio de la cría de esta especie bajo las condiciones ambientales marcadas. La metodología a seguir es la descrita por la Confederación Hidrográfica del Ebro, "Muestreo y determinación de larvas de mejillón cebra", aunque se ha variado la toma de muestras ya que en este proyecto se realiza visualización de larvas de un acuario y no de aguas naturales. Se toman 10 mL de agua del acuario y se centrifugan (centrifugadora Hettich Universal II) a 3500 revoluciones durante 5 minutos. Se retira el sobrenadante y se vuelven a verter 10 mL de agua del acuario y a realizar el mismo paso de centrifugación. Se repiten estos pasos hasta haber centrifugado un total de 50 mL. Se retira todo el sobrenadante y se coloca el sedimento sobre un portaobjetos para ser observado al microscopio óptico (Zeiss Axiostar Plus), al cual se le aplica una lente para observar las muestras con luz polarizada. La microscopía con luz polariza permite una visualización rápida de las larvas de mejillón cebra, gracias a un efecto óptico asociado a este tipo de iluminación. Los cristales de calcita que forman las conchas hacen que sean birrefringentes y aparezcan de color blanco. La particular distribución de estos cristales en la concha, hacen que parte de la concha no refleje la luz y se observa una cruz de color oscuro en el centro de la larva, a la que se denomina *cruz de malta*. Las larvas de todos los ostrácodos reflejan la *cruz de malta* con la microscopía de luz polarizada, pero la morfología oval o circular típica de la larva de los bivalvos es la que permite diferenciar las larvas de mejillón cebra (Ladd E. Johnson, 1995) debido a que en la zona de recogida de muestras es el único bivalvo presente.

3.5. Presencia de patógenos en el mejillón cebra de aguas superficiales de Aragón

Esta parte de la experimentación se centra en detectar la presencia de contaminantes bacterianos y parasitológicos en el mejillón cebra de aguas superficiales de Aragón. También se realiza una analítica bacteriana de las mismas aguas, para comparar y relacionar la contaminación presente en las aguas y en el interior del mejillón cebra. Los ensayos se realizaron en dos fechas determinadas de épocas diferentes del año, otoño (27 de Noviembre) y primavera (24 de Abril), sobre las muestras recogidas en la acequia Rimer de Caspe.

Los parámetros físico-químicos analizados en las aguas superficiales y su metodología de análisis aparecen en el apartado 3.1.1 de este proyecto. Los indicadores microbiológicos de contaminación bacteriana (*Escherichia coli*, *Enterococcus sp.*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*) estudiados en las mismas aguas superficiales siguieron la metodología detallada que aparece en el punto 3.1.2 de este proyecto.

En cuanto a la evaluación de la presencia de contaminantes microbiológicos bacterianos (*Escherichia coli*, *Enterococcus sp.*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*) y parasitológicos (*Giardia*, *Cryptosporidium* y amebas de vida libre) en el interior del mejillón cebra, se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2 del presente proyecto. Se utilizan 5 mejillones cebra y 10 mL de PBS en la preparación del extracto para realizar toda la analítica de bacterias y parásitos en cada fecha de análisis.

3.6. Determinación *in vitro* de la acumulación e infección de bacterias por *Dreissena polymorpha*

El objetivo es evaluar la capacidad de acumulación de bacterias en el mejillón cebra y también estudiar la capacidad que tiene este organismo para contaminar nuevas aguas. El volumen de agua utilizada en cada experimento es de 1 litro para asegurar que los mejillones cebra filtran todo el agua al cabo de 24 horas, ya que un individuo adulto de mejillón cebra es capaz de filtrar hasta 2,5 litros de agua al día (Claudi y Mackie, 1994). Todo el material de vidrio utilizado se esteriliza en autoclave a 121°C y 1 bar de presión durante 15 minutos.

3.6.1. Acumulación bacteriana

Se estudia la capacidad de acumulación que tiene el mejillón cebra para diferentes bacterias por separado (*Escherichia coli*, *Enterococcus sp.* y *Salmonella sp.*) y utilizando aguas con distinta concentración de las mismas, para evaluar como varía la capacidad de acumular estos microorganismos en distintas condiciones de concentración de los mismos. En primer lugar se realiza un análisis de la bacteria a estudiar en los mejillones del acuario, usando la metodología del apartado 3.2 (se utilizan 2 mejillones cebra y 5 ml de PBS para el análisis).

Las muestras de agua para la experimentación se toman del agua del acuario ya que sus condiciones son idóneas para el desarrollo de la vida, para la filtración y para la alimentación del mejillón cebra. Se depositan 4 litros de agua del acuario en cuatro botellas de un litro cada una y se esterilizan en autoclave a 121°C y 1 bar de presión durante 15 minutos. El agua esterilizada de dos botellas de vidrio se fortifica con una concentración de la bacteria a estudiar de 10^5 - 10^6 UFC/ml, y el agua de las otras dos botellas se fortifica con una concentración de la bacteria a estudiar de 10^3 - 10^4 UFC/ml (el procedimiento experimental de fortificación de muestras esta explicado en el ANEXO IV). El estudio consta de dos ensayos con

distinta contaminación bacteriana. Cada ensayo se divide en un experimento control (1L), en el que no se añaden mejillones cebra y en el experimento estudio (1L), en el que se añaden 4 mejillones cebra. Los mejillones cebra seleccionados son individuos adultos de distintos tamaños procedentes del acuario. Los bivalvos antes de ser introducidos en los experimentos estudio, los cuales se realizan en vasos de precipitados de 1 litro, se desinfectan externamente con un paño con hipoclorito de sodio (NaClO) y luego se lavan con abundante agua destilada. En la Figura 5 se observa un esquema del diseño del experimento de acumulación bacteriana en el mejillón cebra.

Una vez introducidos los mejillones cebra en los experimentos estudio, se realiza una analítica de la bacteria a estudiar en el agua (según el apartado 3.1.2) a distintos tiempos del inicio de la experimentación (0 horas, 2 horas, 5 horas, 10 horas y 24 horas), tanto en los experimentos control como en los experimentos estudio. El agua utilizada para el análisis de bacterias a los distintos tiempos se considera despreciable, considerando constante el volumen de agua en cada experimento. Una vez transcurridas las 24 horas de duración del estudio, se realiza un análisis de la bacteria a estudiar en los mejillones cebra de cada experimento estudio (según el punto 3.2 de este proyecto). Para cada uno de los análisis se tomaran 2 mejillones, quedando otros dos mejillones cebra listos para su utilización en el experimento de evaluación de la capacidad de infección de estos organismos.

Se obtienen resultados de acumulación de bacterias medidas a través del extracto del mejillón cebra, restando de la cantidad de bacterias/gramo de mejillón presentes en los mejillones cebra a las 24 horas de experimentación, la cantidad de bacterias/gramo de mejillón presentes en los mejillones cebra al inicio de la experimentación (mejillones cebra del acuario).

Además se obtienen resultados de variación del número de bacterias medidas a través del agua de experimentación (experimento estudio), los cuáles permiten obtener la cantidad de bacterias acumuladas por los mejillones cebra, restando la cantidad de bacterias inicial en el agua (0 horas) y la cantidad de bacterias finales en el agua (24 horas). Obtenida esta cantidad de bacterias, dicho valor se divide por los gramos de mejillón cebra (tejido + agua intersticial) utilizados en el experimento.

Todo el proceso de experimentación descrito se realiza por duplicado y los resultados obtenidos se expresaran como la media aritmética de los mismos, tanto del agua a los distintos tiempos, como del extracto de mejillón cebra obtenido a las 24 horas.

Para evaluar la capacidad de acumulación de la bacteria a estudiar se aplican las ecuaciones 1 y 2. La ecuación 1 muestra el tanto por ciento de acumulación por 4 mejillones de la bacteria de estudio en 1 litro de agua, dividiendo las UFC acumuladas (medidas a través del agua de experimentación) por las UFC inicial de la bacteria estudio (medidas a través del agua de experimentación, 0 horas). La ecuación 2 expresa el tanto por ciento de acumulación de la bacteria a estudiar por gramo de mejillón cebra en 1 litro de agua, donde los gramos de mejillón son el tejido de los 4 mejillones cebra más el agua intersticial de los mismos.

$$\% \text{ Acumulación} = \frac{\text{UFC acumuladas (datos de aguas)}}{\text{UFC iniciales agua experimentación (datos de aguas)}} \quad [1]$$

$$\% \text{ Acumulación / g mejillón} = \frac{\text{UFC acumuladas (datos de aguas)/gramo mejillón}}{\text{UFC iniciales agua experimentación (datos de aguas)}} \quad [2]$$

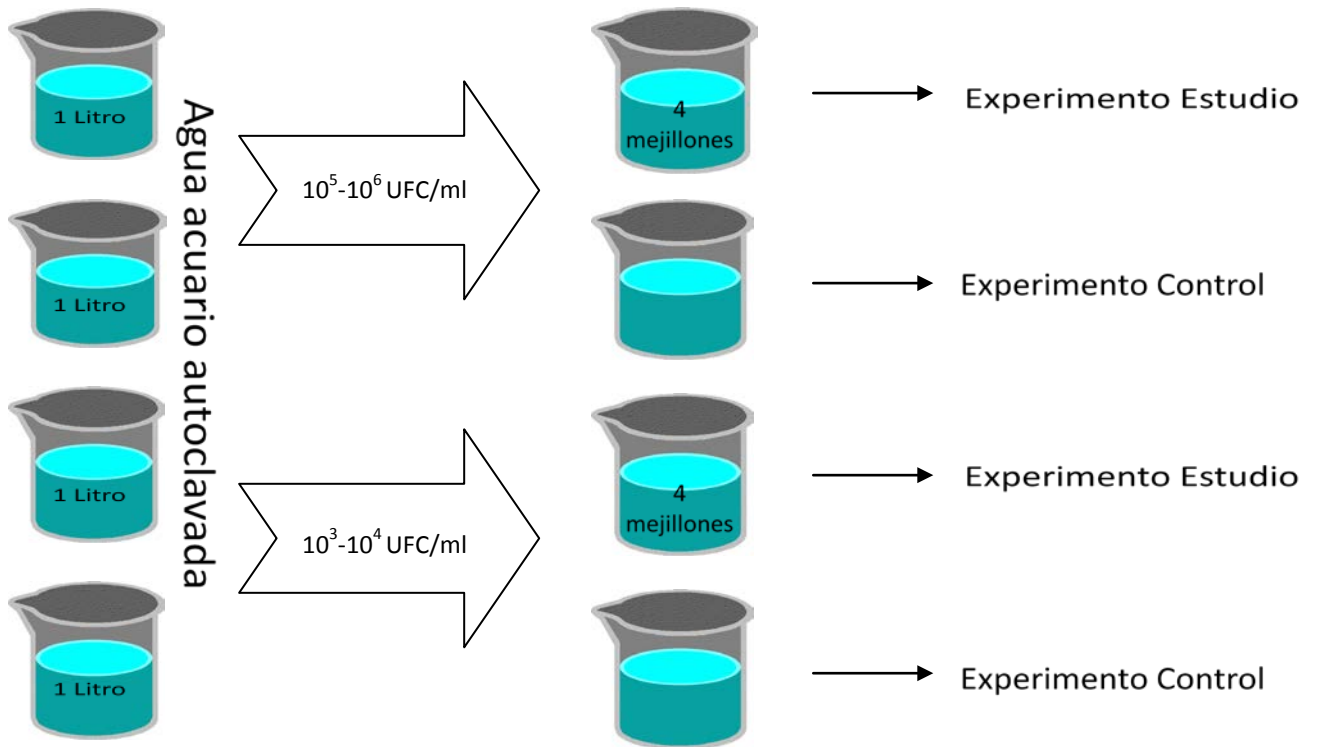


Figura 5. Esquema del diseño para evaluar la capacidad de acumulación bacteriana en el mejillón cebra.

Toda la experimentación se realiza en condiciones de esterilidad proporcionadas por el mechero bunsen.

3.6.2. Infección bacteriana

Se estudia la capacidad de infección de bacterias en un agua estéril por parte del mejillón cebra. Las muestras de agua para la experimentación se toman del agua del acuario, igual que en el experimento de acumulación bacteriana, ya que sus condiciones son idóneas para el desarrollo de la vida, para la filtración y para la alimentación del mejillón cebra. Se depositan 2 litros de agua del acuario en dos botellas de un litro cada una, y se esterilizan en el autoclave a 121°C y 1 bar de presión durante 15 minutos. El agua una vez esterilizada, para asegurar que está totalmente libre de bacterias patógenas, se dispone en 2 vasos de precipitados de 1 litro cada uno. Los dos mejillones que se han guardado de cada experimento de acumulación bacteriana a distinta concentración, se introducen en el agua estéril. Los bivalvos antes de ser introducidos en los experimentos se desinfectan externamente con hipoclorito de sodio (NaClO) y luego se lavan con abundante agua destilada. En la Figura 6 se observa un esquema del diseño del experimento de infección bacteriana por el mejillón cebra en un agua esterilizada.

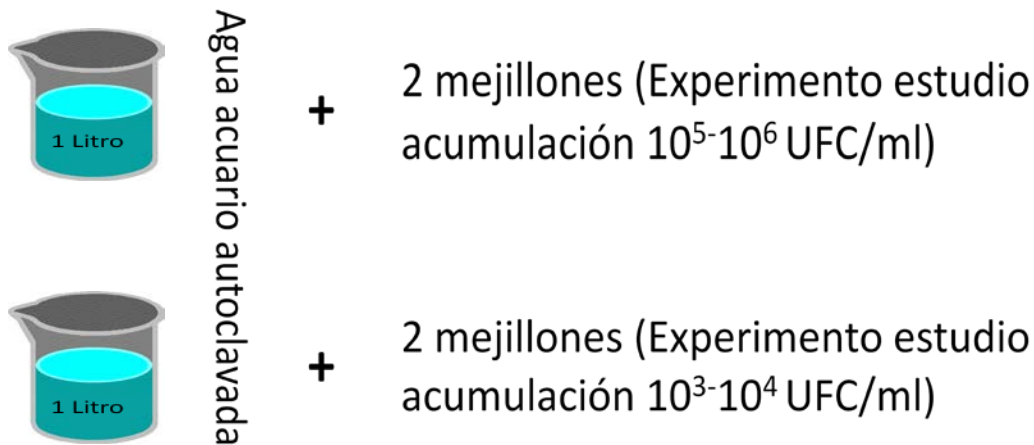


Figura 6. Esquema del diseño para evaluar la capacidad de infección bacteriana por el mejillón cebra en un agua esterilizada.

Una vez introducidos los mejillones cebra en los experimentos correspondientes, se realiza una analítica de la bacteria a estudiar en el agua (según el apartado 3.1.2) a distintos tiempos del inicio de la experimentación (2 horas, 5 horas, 10 horas y 24 horas). Transcurridas las 24 horas de duración del estudio, se realiza un análisis de la bacteria a estudiar en el mejillón cebra (según el punto 3.2 de este proyecto).

Se obtienen resultados de análisis de bacterias medidas a través del agua de experimentación, los cuáles permiten obtener la cantidad de bacterias que son capaces de expulsar al agua los mejillones cebra, restando la cantidad de bacterias finales en el agua (24 horas) y la cantidad de bacterias inicial en el agua (0 horas), que es nula porque partimos de un agua esterilizada. Obtenida esta cantidad de bacterias, dicho valor se divide por los gramos de mejillón cebra (tejido + agua intersticial) utilizados en el experimento.

Cada experimento se realiza por duplicado, y los resultados obtenidos se expresan como la media aritmética de los mismos. Toda la experimentación se realiza en condiciones de esterilidad proporcionadas por el mechero bunsen.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.1. Mantenimiento y cría en cautividad del mejillón cebra

4.1.1. Monitorización de las condiciones del acuario

En el periodo de duración de la experimentación de este proyecto se han mantenido en el acuario instalado en el laboratorio, las condiciones físico-químicas principales para el crecimiento y reproducción del mejillón cebra en unos rangos óptimos. En la Tabla 5 se muestran los valores mínimos y máximos, a lo largo de la duración experimental de esta parte del proyecto (27 Noviembre 2012 - 30 Mayo 2013), de los distintos parámetros físico-químicos controlados en el agua del acuario.

Tabla 5. Valores mínimos y máximos de los parámetros físico-químicos controlados en el agua del acuario.

| | [O ₂] (mg O ₂ /l) | T ^a (°C) | pH | Conductividad (μS/cm) | Dureza (mg CaCO ₃ /l) | Calcio (mg Ca/l) |
|---------------------|--|---------------------|------|-----------------------|----------------------------------|------------------|
| Valor mínimo | 7,21 | 18,5 | 7,4 | 1715 | 760 | 208,5 |
| Valor máximo | 8,26 | 23,8 | 8,41 | 2380 | 1010 | 332,6 |

Las gráficas con los valores de cada uno de los parámetros físico-químicos de control a lo largo del periodo de experimentación se encuentran en el ANEXO V de este mismo proyecto.

Los valores de oxígeno disuelto en el agua del acuario tienen un mínimo en 7,21 mg O₂/l y un máximo en 8,26 mg O₂/l, lo que indica según la Tabla 4, presente en el capítulo 3.4 de este proyecto sobre rangos de preferencia orientativos del mejillón cebra, un crecimiento medio-alto de los individuos de este bivalvo. Las bombas de aire permiten introducir oxígeno continuo necesario para la vida en el agua.

En los valores de la temperatura en el agua del acuario, se observa un mantenimiento en la temperatura entre los 18,5°C y los 23,8°C, lo que indica según la Tabla 4 un potencial de crecimiento alto del mejillón cebra en el agua.

El rango de valores de pH en el agua del acuario, para el crecimiento y cría del mejillón cebra en cautividad, se mantiene entre los valores 7,4 y 8,41. Tomando como referencia la Tabla 4, los valores medidos se mantienen en el rango de crecimiento alto para este parámetro del mejillón cebra, a excepción de dos valores (7,4 y 7,49) que se desvían ligeramente y producirían un crecimiento medio en estos individuos. Cuando el valor de pH tiende a disminuir por debajo de 7,5, se adiciona Ca(OH)₂ en el acuario, para el aumento del pH del agua, además de producir un aumento de Calcio en el mismo medio, que es importante para el desarrollo de los individuos de *Dreissena polymorpha*.

Los resultados de conductividad en el agua del acuario para la cría y mantenimiento del mejillón cebra varían en un rango amplio, entre 1715 y 2380 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Según la referencia de los rangos óptimos de crecimiento y colonización del mejillón cebra expuestos en la Tabla 4, los valores obtenidos en el agua del acuario son óptimos para el crecimiento de estos moluscos bivalvos. Los valores altos de conductividad se deben principalmente a que se introducen aguas naturales en el acuario, y estas tienen gran concentración de iones disueltos, lo que provoca una alta conductividad de la misma.

La Dureza del agua y la concentración de calcio en la misma, es suficientemente elevada para un desarrollo y crecimiento óptimo de los individuos de esta especie, según los valores de referencia de la Tabla 4. Los resultados de la concentración de calcio en el acuario que se muestran en la Tabla 5 no disminuyen de 208,5 mg Ca/l, un valor suficiente para el desarrollo óptimo y crecimiento del mejillón cebra.

4.1.2. Observación de larvas de *Dreissena polymorpha*

Se han observado larvas de mejillón cebra en el agua del acuario. En la Figura 7 se observa una fotografía tomada a través del microscopio, en la que se pueden ver larvas de *Dreissena polymorpha* con la típica *cruz de malta* que les caracteriza.

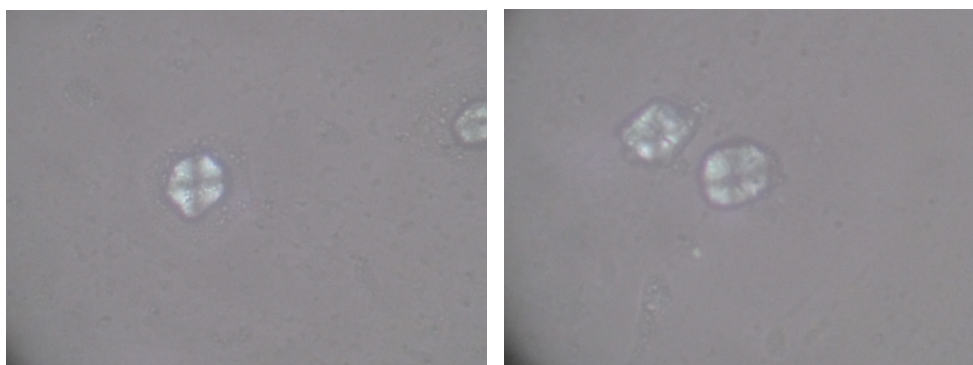


Figura 7. Larvas de *Dreissena polymorpha* (400x) presentes en el agua del acuario.

El mantenimiento de los individuos de mejillón cebra en el acuario ha sido correcto. Se han mantenido correctamente los factores principales que controlan su crecimiento y colonización dentro de unos rangos alto-óptimos. Esto ha permitido escasas muertes de individuos de mejillón.

Aunque se ha conseguido un correcto mantenimiento para el crecimiento de los individuos, no se ha conseguido la cría en cautividad de los mismos. Se han observado larvas de los mismos, pero estas quizás no sean lo suficientemente numerosas para que siga proliferando la población, ya que el porcentaje de mortalidad acumulada de las mismas desde la eclosión hasta la colonización del sustrato es muy elevada, 98 % (O'Neill, 1996). Además las épocas de reproducción y de suelta de gametos están marcadas al principio de la primavera y final de verano principalmente, lo que indica hasta la finalización de este trabajo ausencia de visualización de individuos adultos. Las condiciones ambientales favorables proporcionadas en el acuario, pueden adelantar sobre la época primaveral la suelta de gametos y eclosión de huevos, aunque los ritmos circadianos instalados en el mejillón (ya que se han recogido de aguas naturales) provoquen el efecto contrario, y se produzca poca reproducción hasta la

fecha, que junto con una alta mortalidad larvaria, impida la visualización de nuevos individuos adultos de mejillón cebrá.

4.2. Detección de patógenos en mejillones cebrá de aguas superficiales de Aragón

4.2.1. Parámetros físico-químicos

En la Tabla 6 se muestran los resultados de los parámetros físico-químicos analizados en las aguas superficiales de la acequia Rimer de Caspe. Los resultados corresponden a los dos días de muestreo realizado en épocas del año diferente.

Tabla 6. Resultados de parámetros físico-químicos del agua de la acequia Rimer (Caspe), en dos épocas distintas del año.

| Parámetro | Valor (27/11/2012) | Valor (24/4/2013) |
|---------------------|------------------------------|-----------------------------|
| [O ₂] | 7,71 mg O ₂ /L | 9,13 mg O ₂ /L |
| T ^a agua | 11,2 °C | 16,2 °C |
| T ^a aire | 10,0 °C | 14 °C |
| pH | 7,85 | 7,99 |
| Conductividad | 1852 µS/cm | 2420 µS/cm |
| Dureza total | 1230 mg CaCO ₃ /L | 1320mg CaCO ₃ /L |
| Dureza de calcio | 710 mg CaCO ₃ /L | 790 mg CaCO ₃ /L |
| Calcio | 284,57 mg Ca/L | 316,63mg Ca/L |

Los resultados obtenidos de la medición de los parámetros físico-químicos de las aguas de la acequia Rimer de Caspe indican, según la Tabla 4 de rangos de preferencia orientativos del mejillón cebrá a distintos parámetros, unos valores altos-óptimos de estas aguas para el crecimiento y colonización del mejillón cebrá. La única excepción es la temperatura, la cual no es la idónea para el crecimiento y colonización de estos individuos, ya que las épocas del año en las que se ha hecho los análisis, no son las de reproducción óptima y mayor crecimiento, pero en las que el mejillón cebrá sobrevive sin ningún problema.

4.2.2. Análisis de bacterias

En la Tabla 7 y en la Tabla 8 se muestran los valores de los análisis de bacterias realizados en las aguas superficiales de la acequia Rimer de Caspe y en los mejillones presentes en las mismas.

Tabla 7. Resultados analítica bacteriana. 27 Noviembre 2012.

| Parámetro | Valor (aguas) | Valor (<i>Dreissena polymorpha</i>) |
|-------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | $2,61 \cdot 10^4$ UFC/100ml | $7,13 \cdot 10^4$ UFC/g mejillón |
| <i>Enterococcus sp.</i> | $9,1 \cdot 10^1$ UFC/100mL | $3,42 \cdot 10^2$ UFC/g mejillón |
| <i>Salmonella sp.</i> | $8 \cdot 10^1$ UFC/100mL | $2,85 \cdot 10^2$ UFC/g mejillón |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | $5,8 \cdot 10^4$ UFC/100mL | $6,02 \cdot 10^4$ UFC/g mejillón |

Tabla 8. Resultados analítica bacteriana. 24 Abril 2013.

| Parámetro | Valor (aguas) | Valor (<i>Dreissena polymorpha</i>) |
|-------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | $2,37 \cdot 10^3$ UFC/100mL | $6,9 \cdot 10^3$ UFC/g mejillón |
| <i>Enterococcus sp.</i> | $9,3 \cdot 10^1$ UFC/100mL | $9,3 \cdot 10^1$ UFC/g mejillón |
| <i>Salmonella sp.</i> | $9,1 \cdot 10^1$ UFC/100mL | $1,55 \cdot 10^2$ UFC/g mejillón |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | $2,14 \cdot 10^4$ UFC/100mL | $8,98 \cdot 10^3$ UFC/g mejillón |

Se observa que las bacterias presentes en el agua en una concentración elevada, como son *E.coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, también están presentes en gran concentración en el interior del mejillón cebra. Los resultados también muestran que las bacterias presentes en las aguas naturales en una menor concentración, como son *Enterococcus sp.* y *Salmonella sp.*, están en una concentración baja en el interior del mejillón cebra. Esto indica una cierta correlación entre los valores de contaminación bacteriana en aguas superficiales y el tejido interno del mejillón cebra, lo que puede suponer un indicio para la utilización de estos moluscos bivalvos como indicadores de la calidad microbiológica de las aguas naturales en la cuenca del Ebro.

En la Figura 8 se muestra un gráfico estadístico de correlación lineal con origen en (0,0) de los valores de contaminación bacteriana en aguas y contaminación bacteriana en el interior del mejillón cebra (sin hacer diferenciación en el tipo de bacteria).

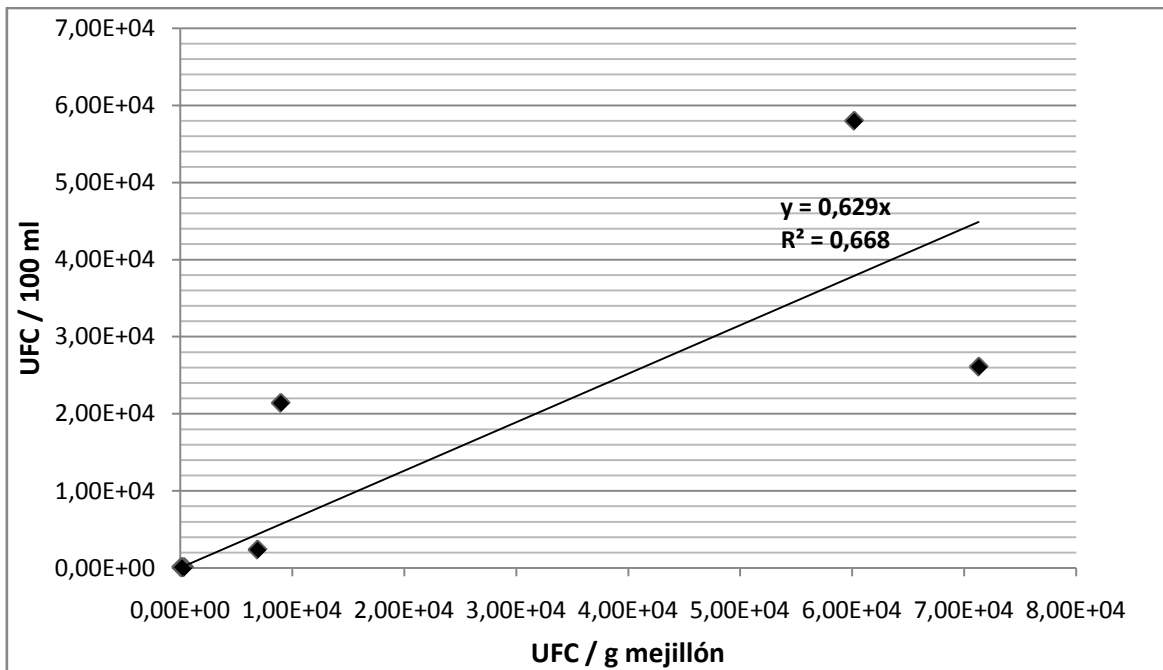


Figura 8. Correlación lineal entre la concentración de bacterias presentes en el agua de la acequia Rimer de Caspe y en los mejillones cebra que habitan en ella.

Se observa una $R^2 = 0,668$ para los datos analíticos obtenidos en las dos fechas de muestreo. Esto indica ausencia de correlación lineal entre la concentración de bacterias en el agua y la concentración de bacterias en el interior del mejillón cebra. Esta mala correlación puede deberse a que la acumulación de las distintas bacterias no se realice de la misma forma. Según bibliografía, los distintos tamaños y forma de las bacterias pueden afectar al hecho de que el mejillón cebra acumule más bacterias de una especie que de otra. Las bacterias de más tamaño se acumularían mejor que las de menor tamaño, (Frischer et al., 1996).

Lo que se puede observar en los datos analizados es, que no hay una correlación perfecta que pueda garantizar que el mejillón cebra es un buen indicador de la calidad bacteriana del agua en cuanto a la concentración conjunta de las bacterias. Para obtener unos resultados más exactos de correlación entre la concentración bacteriana en las aguas naturales y en el interior del mejillón cebra harán falta estudios posteriores. Además, esto permitiría correlacionar la concentración de una bacteria determinada en el agua y en el mejillón, y quizás, obtener resultados para utilizar el mejillón cebra como indicador bacteriano del agua.

4.2.3. Análisis de parásitos

Las observaciones realizadas al microscopio de las distintas preparaciones revelan la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* sp. y amebas de vida libre en el tejido de los individuos de *Dreissena polymorpha* recogidos en las aguas superficiales de la acequia Rimer de Caspe. En la Figura 9 se observan ooquistes de *Cryptosporidium* sp. teñidos mediante la tinción de Ziehl-Neelsen modificada.

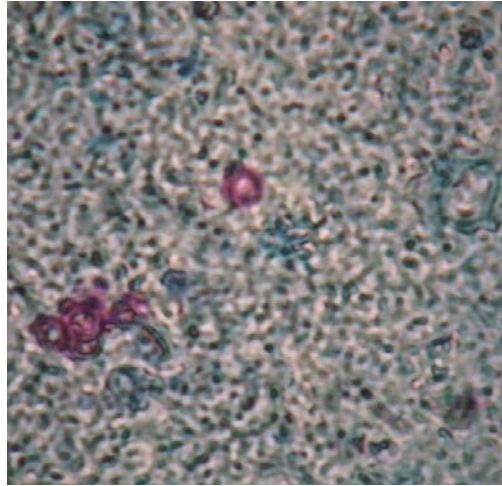


Figura 9. Ooquistes de *Cryptosporidium* sp. a 1000x después de la tinción de Ziehl-Neelsen modificada.

En la Figura 10 se observan dos fotos distintas de amebas de vida libre captadas con el microscopio óptico. En las imágenes se puede observar bien definida la célula y la vacuola pulsátil de la ameba.

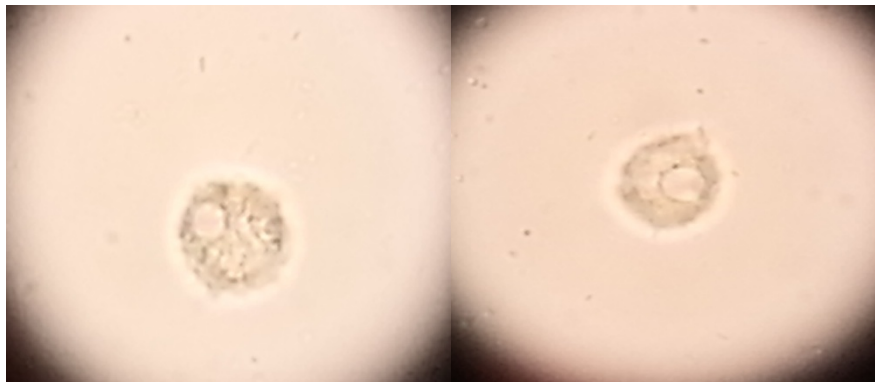


Figura 10. Amebas de vida libre a 1000

En las preparaciones microscópicas de extracto de mejillón cebra no se ha observado ninguna forma de vida, trofozoíto o quiste, del parásito *Giardia* sp.

Estos resultados indican la peligrosidad del mejillón cebra como reservorio de distintos protozoos parásitos en aguas superficiales de la Comunidad Autónoma de Aragón.

4.3. Acumulación e infección *in vitro* de bacterias por *Dreissena polymorpha*

4.3.1. Resultados acumulación bacteriana en el mejillón cebra

Escherichia coli (10^5 UFC/ml):

La contaminación por *Escherichia coli* presente en los mejillones cebra del acuario se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. UFC de *E.coli* en los mejillones cebra tomados del acuario para la experimentación.

| Parámetro | Valor (<i>Dreissena polymorpha</i>) |
|-------------------------|---------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | $6,13 \cdot 10^2$ UFC/g mejillón |

En la Figura 11 se muestran los datos de *Escherichia coli* (UFC/ml) en el agua de experimentación a distintos tiempos, en el experimento estudio (realizado con mejillones cebra) y el experimento control (realizado sin mejillones cebra), con una concentración inicial de 10^5 UFC/ml. Se puede observar como los mejillones cebra expuestos a una gran concentración de bacterias en agua (experimento estudio), son capaces de retener en 24 horas la mayoría de las bacterias (*E.coli*) que contaminan el agua. En el experimento control se mantiene prácticamente constante la concentración de *E.coli* a lo largo de las 24 horas, sin grandes cambios, lo que indica que no hay ningún otro factor diferente a la presencia de mejillones cebra que provoque la disminución de bacterias en el agua.

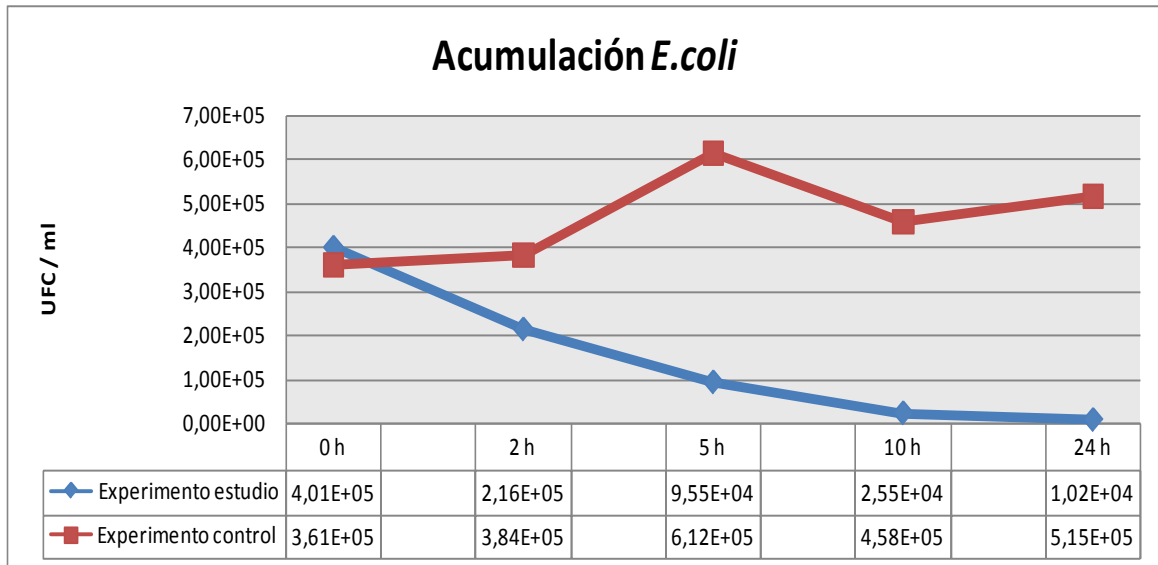


Figura 11. Gráfico de acumulación de *E.coli* en mejillones cebra, en un agua con concentración inicial 10^5 UFC *E.coli* /ml.

En la Tabla 10 se detallan los resultados de acumulación de bacterias a las 24 horas de experimento estudio. Por un lado se observa el valor de contaminación bacteriana en el mejillón cebra a partir del extracto del mismo. Por otro lado se calcula la cantidad de bacterias que tendría que haber en el tejido de mejillón cebra en relación a la disminución de las mismas en el agua, es decir se divide las UFC acumuladas (en 1 litro de experimentación) por los gramos de tejido de mejillón y luego se añaden las bacterias que había inicialmente en los mejillones de la pecera, que como son mínimas no modifican los resultados.

Tabla 10. Datos de valores acumulativos de *E.coli*, medidos a través del agua de experimentación con una concentración inicial 10^5 /ml y a través del extracto de mejillón cebra.

| Parámetro | Valor (según datos del agua) a las 24 horas experimentación | Valor (extracto mejillón cebra) a las 24 horas experimentación |
|---|---|--|
| UFC acumuladas/ml | $3,91 \cdot 10^5$ UFC/ml | |
| UFC acumuladas | $3,91 \cdot 10^8$ UFC | |
| Masa tejido mejillón | 3,71 g | 3,71 g |
| UFC acumuladas/g mejillón | $1,05 \cdot 10^8$ UFC/g mejillón | $2,08 \cdot 10^5$ UFC/g mejillón |
| UFC/g mejillón (acumuladas + iniciales) | $1,05 \cdot 10^8$ UFC/g mejillón | $2,09 \cdot 10^5$ UFC/g mejillón |

Aplicando las ecuaciones [1] y [2], se obtienen los porcentajes de acumulación bacteriana, gracias los datos obtenidos en la Tabla 10.

$$\frac{3,91 \cdot 10^8 \text{ UFC}}{4,01 \cdot 10^8 \text{ UFC}} = 97,5 \% \text{ Acumulación } E.coli \quad [1]$$

$$\frac{1,05 \cdot 10^8 \text{ UFC/g mejillón}}{4,01 \cdot 10^8 \text{ UFC}} = 26,2 \% \text{ Acumulación } E.coli / \text{g mejillón} \quad [2]$$

Se alcanza un gran porcentaje de acumulación de *Escherichia coli* a las 24 horas por parte de los 4 mejillones utilizados en el experimento.

En Tabla 10 se observa una diferencia alta de valores de UFC de *E.coli* acumuladas en el mejillón cebra, medidos a través del agua del ensayo y medidos a través del extracto de mejillón cebra a las 24 horas de experimentación. El análisis del extracto de mejillón cebra muestra un valor de contaminación menor al que realmente se ha acumulado (calculado con la cantidad de bacterias desaparecidas del agua). Esta diferencia se puede generar por distintas causas. En primer lugar, la eliminación del biso y de las valvas del mejillón en la preparación del extracto de mejillón cebra, puede haberse llevado consigo gran cantidad de bacterias retenidas en estas estructuras. Según un estudio de análisis bacteriano en el mejillón cebra, los extractos obtenidos homogeneizando el mejillón cebra con concha dan valores superiores a los extractos en los que solo se homogeniza tejido blando (Selegan et al., 2001). Otro factor que puede producir la disminución de las bacterias es la metabolización de las mismas por el mejillón cebra, ya que pueden servir de alimento directo para estos organismos (Frischer et al., 1996). Pueden existir otros factores no conocidos que influyan en el hecho de que el extracto de mejillón no nos proporciona un dato exacto de las bacterias de *E.coli* acumuladas.

Escherichia coli (10³ UFC/ml):

En la Figura 12 se muestra los datos de *Escherichia coli* (UFC/ml) en el agua de experimentación a distintos tiempos, en el experimento estudio y el experimento control, con una concentración inicial de 10³ UFC/ml. En el experimento control se mantiene prácticamente constante la concentración de *E.coli* a lo largo de las 24 horas, sin grandes cambios, lo que indica que no hay ningún otro factor diferente a la presencia de mejillones cebra que provoque la disminución de bacterias en el agua.

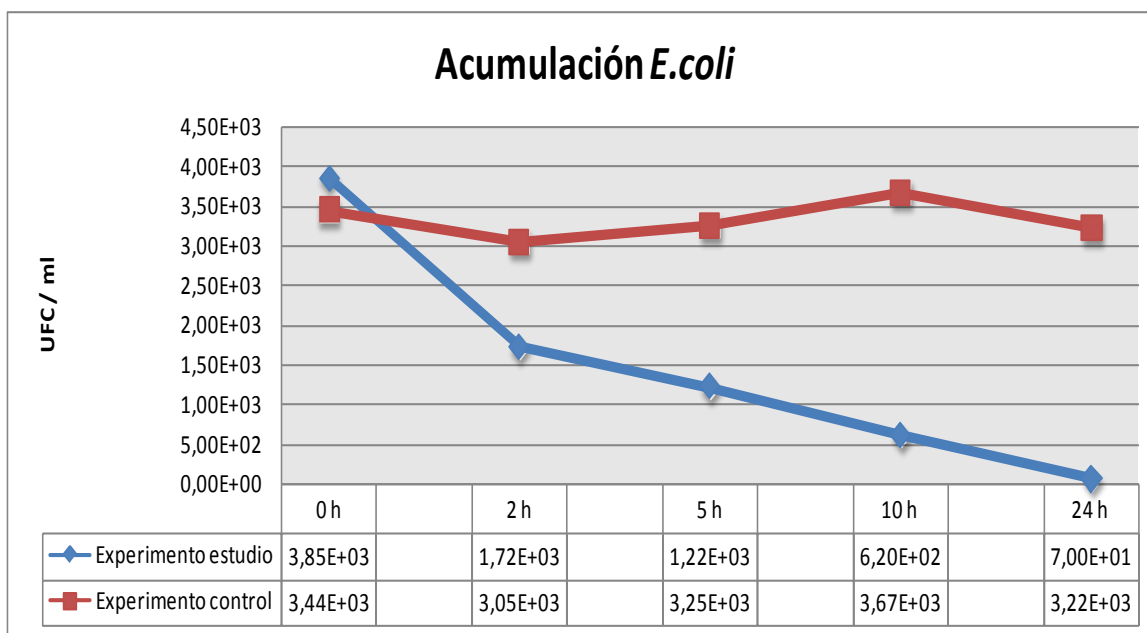


Figura 12. Gráfico de acumulación de *E.coli* en mejillones cebra, en un agua con concentración inicial 10³ UFC *E.coli* /ml.

En la Tabla 11 se dan los resultados de acumulación de bacterias a las 24 horas de experimento, mostrando los datos obtenidos del agua y los datos obtenidos del extracto de mejillón.

Tabla 11. Datos de valores acumulativos de *E.coli*, medidos a través del agua de experimentación con una concentración inicial 10³/ml y a través del extracto de mejillón cebra.

| Parámetro | Valor (según datos del agua) a las 24 horas experimentación | Valor (extracto mejillón cebra) a las 24 horas experimentación |
|--|---|--|
| UFC acumuladas/ml | 3,78·10 ³ UFC/ml | |
| UFC acumuladas | 3,78·10 ⁶ UFC | |
| Masa tejido mejillón | 4,236 g | 4,236 g |
| UFC acumuladas/g mejillón | 8,92·10 ⁵ UFC/g mejillón | 2,33·10 ⁴ UFC/g mejillón |
| UFC/g mejillón (acumuladas +iniciales) | 8,93·10 ⁵ UFC/g mejillón | 2,39·10 ⁴ UFC/g mejillón |

Aplicando las ecuaciones [1] y [2], se obtienen los porcentajes de acumulación bacteriana, gracias los datos obtenidos en la Tabla 11.

$$\frac{3,78 \cdot 10^6 \text{ UFC}}{3,85 \cdot 10^6 \text{ UFC}} = 98,2 \% \text{ Acumulación } E.coli \quad [1]$$

$$\frac{8,92 \cdot 10^5 \text{ UFC/g mejillón}}{3,85 \cdot 10^6 \text{ UFC}} = 23,2 \% \text{ Acumulación } E.coli / \text{g mejillón} \quad [2]$$

Los datos muestran una acumulación de *E.coli* total, por los cuatros mejillones, prácticamente igual al experimento anterior, en el que la concentración inicial de *E.coli* es de 10^5 UFC/ml. Pero la acumulación de *E.coli*/gramo de mejillón cebra es un 3 % menor que la obtenida con una concentración inicial de la bacteria mayor.

Según los valores de la Tabla 11, la diferencia entre el valor de acumulación de *E.coli* medido a través del agua del experimento y del extracto de mejillón es menor, en este caso solamente un orden de magnitud logarítmica, mientras que en el experimento con una concentración inicial de 10^5 UFC/ml la diferencia es de 3 ordenes de magnitud logarítmica. Esta menor diferencia puede tener su raíz en el hecho de que al acumularse menor cantidad de bacterias, haya una menor metabolización de las mismas y por eso las bacterias no disminuyen tanto en tejido del mejillón. Otra causa puede ser que en la concha no queden retenidas tantas bacterias y por tanto al retirarla para homogeneizar el tejido, se elimina mucha menos cantidad de las mismas.

***Enterococcus sp.* (10^5 UFC/ml):**

La contaminación por *Enterococcus sp.* presente en los mejillones cebra del acuario se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. UFC de *Enterococcus sp.* en los mejillones cebra tomados del acuario para la experimentación.

| Parámetro | Valor (<i>Dreissena polymorpha</i>) |
|-------------------------|---------------------------------------|
| <i>Enterococcus sp.</i> | 0 UFC/g mejillón |

La concentración de *Enterococcus sp.* en el agua del experimento de acumulación bacteriana a distintos tiempos, con una concentración inicial de 10^5 UFC/ml, se muestra en la Figura 13. El experimento control muestra unos valores sin grandes cambios que hagan pensar que haya otro factor diferente a la presencia de mejillón cebra en el experimento, que disminuya la concentración de las bacterias en el agua. Al igual que en el experimento de acumulación de *E.coli*, los mejillones cebra expuestos a una gran concentración de bacterias en agua (Experimento estudio), son capaces de retener la mayoría de *Enterococcus sp.* en 24 horas.

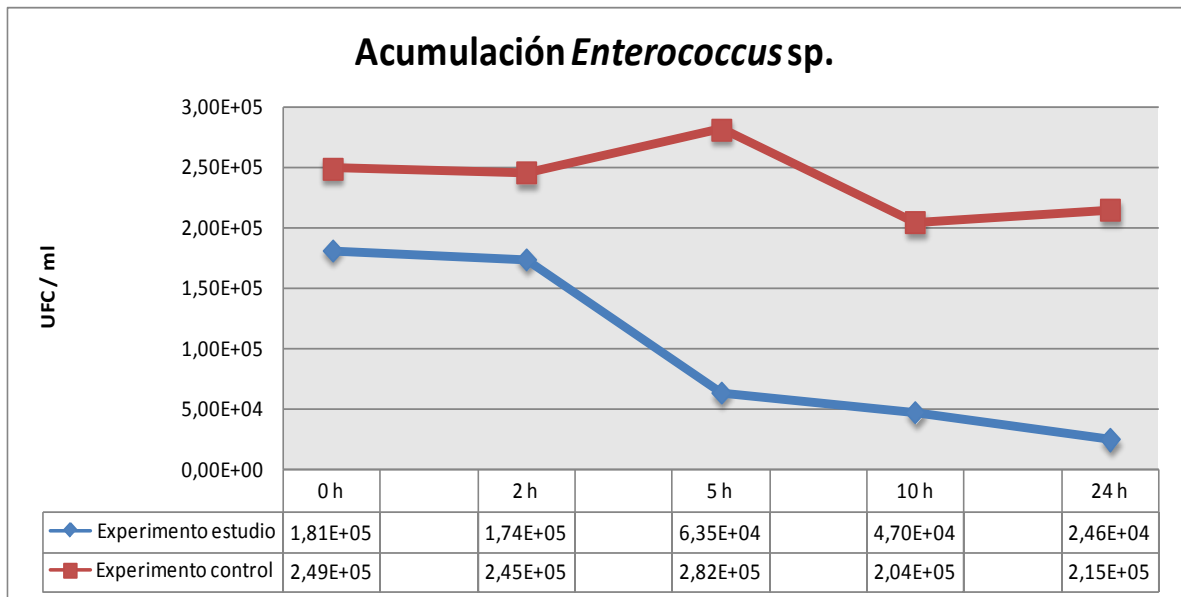


Figura 13. Gráfico de acumulación de *Enterococcus* sp. en mejillones cebra, en un agua con una concentración inicial 10^5 UFC *Enterococcus* sp /ml.

Los resultados de acumulación de *Enterococcus* sp. en el mejillón cebra, obtenidos a partir del extracto de mejillón cebra y a partir de la disminución de estas bacterias en el agua, se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13. Datos de valores acumulativos de *Enterococcus* sp., medidos a través del agua de experimentación con una concentración inicial 10^5 /ml y a través del extracto de mejillón cebra.

| Parámetro | Valor (según datos del agua) a las 24 horas experimentación | Valor (extracto mejillón cebra) a las 24 horas experimentación |
|--|---|--|
| UFC acumuladas/ml | $1,56 \cdot 10^5$ UFC/ml | |
| UFC acumuladas | $1,56 \cdot 10^8$ UFC | |
| Masa tejido mejillón | 3,723 g | 3,723 g |
| UFC acumuladas/g mejillón | $4,2 \cdot 10^7$ UFC/g mejillón | $7,46 \cdot 10^5$ UFC/g mejillón |
| UFC/g mejillón (acumuladas +iniciales) | $4,2 \cdot 10^7$ UFC/g mejillón | $7,46 \cdot 10^5$ UFC/g mejillón |

Aplicando las ecuaciones [1] y [2], se obtienen los porcentajes de acumulación bacteriana, gracias los datos obtenidos en la Tabla 13.

$$\frac{1,56 \cdot 10^8 \text{ UFC}}{1,81 \cdot 10^8 \text{ UFC}} = 86,2 \% \text{ Acumulación } \textit{Enterococcus} \textit{ sp.} \quad [1]$$

$$\frac{4,2 \cdot 10^7 \text{ UFC/g mejillón}}{1,81 \cdot 10^8 \text{ UFC}} = 23,2 \% \text{ Acumulación } \textit{Enterococcus} \textit{ sp. / g mejillón} \quad [2]$$

Los resultados muestran una menor acumulación de *Enterococcus* sp. que de *E.coli* (partiendo de una misma concentración inicial bacteriana en el agua), tanto en los resultados

de acumulación total por los 4 mejillones en el experimento, como en los resultados de acumulación por cada gramo de mejillón. Esto puede tener su origen en el hecho que el mayor tamaño de las bacterias de *E.coli* respecto a los enterococos, provoque una mayor retención de los mismos en el agua (Frischer et al., 1996). Por otro lado, aunque se acumulen menos enterococos, en el mejillón cebra a las 24 horas de experimento (medido a través del extracto de mejillón, Tabla 13) aparece más concentración bacteriana que en los mejillones del experimento de *E.coli* (Tabla 10). Esto puede ocasionarse por el hecho de que *E.coli* al acumularse más por su tamaño, también pueda metabolizarse mejor, ya que se ha acumulado en mayor concentración, lo que provoca una disminución del número de *E.coli* mayor respecto a enterococos en el interior del mejillón cebra (Frischer et al., 1996).

En los resultados de la Tabla 13, al igual que en el experimento realizado con *E.coli* a una misma concentración inicial de bacteria, el análisis del extracto de mejillón cebra muestra un valor de contaminación menor al que realmente se ha acumulado (calculado con la cantidad de bacterias desaparecidas del agua). La eliminación del biso y la concha del mejillón cebra influyen en este aspecto. Pero esta diferencia es de dos órdenes de magnitud, mientras que en el experimento con *E.coli* era de 3 órdenes de magnitud. La diferencia en los ensayos con diferente bacteria puede tener su origen en el hecho de que el tamaño de *E.coli* es mayor, lo que facilitará su acumulación en relación a *Enterococcus sp.*, y por tanto esto llevará a una mayor metabolización de las mismas. Esto provoca una disminución de bacterias en el interior del mejillón cebra y por tanto una mayor diferencia entre los valores de *E.coli* acumulados, medidos a través del extracto de mejillón y medidos a través del agua del experimento.

***Enterococcus sp.* (10^3 UFC/ml):**

En la Figura 14 se muestran los datos de *Enterococcus sp.* (UFC/ml) en el agua de experimentación a distintos tiempos, en el experimento estudio y el experimento control, con una concentración inicial de 10^3 UFC/ml. Como en el ensayo anterior, los resultados obtenidos con la experimentación control indican que no hay factor ninguno, a excepción de los mejillones cebra, que disminuya la concentración de *Enterococcus sp* en el agua.

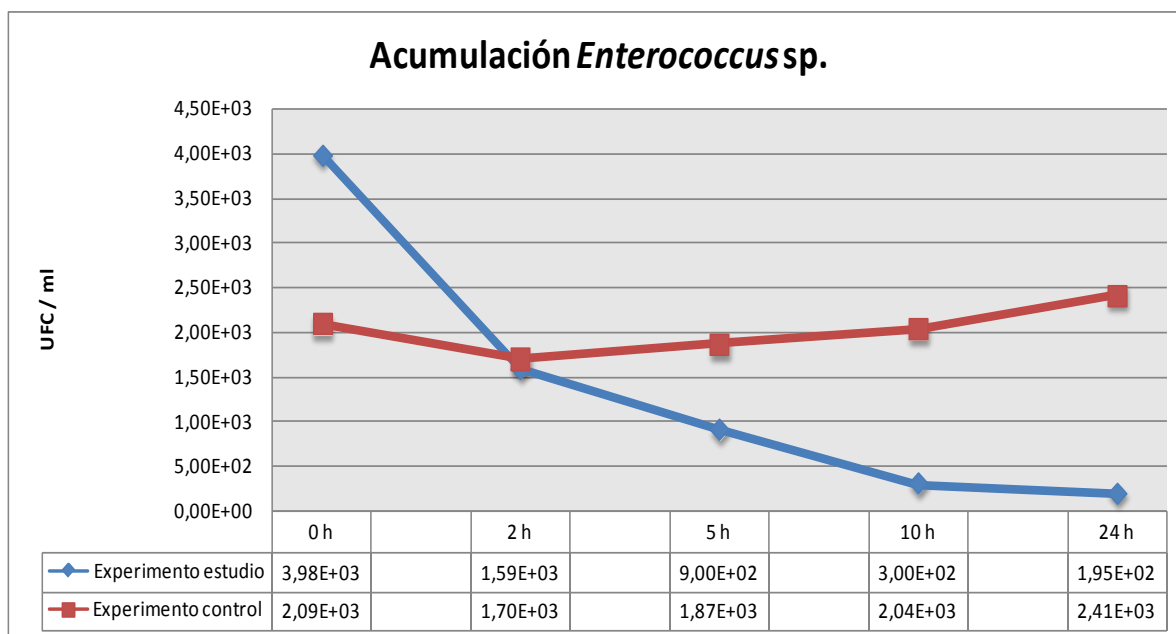


Figura 14. Gráfico de acumulación de *Enterococcus sp.* en un agua con concentración 10^3 /ml por mejillones cebra.

Los resultados de acumulación de *Enterococcus* sp. en el mejillón cebra, obtenidos a partir del extracto de mejillón cebra y a partir de la disminución de estas bacterias en el agua, se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14. Datos de valores acumulativos de *Enterococcus* sp., medidos a través del agua de experimentación con una concentración inicial 10^3 /ml y a través del extracto de mejillón cebra.

| Parámetro | Valor (según datos del agua) a las 24 horas experimentación | Valor (extracto mejillón cebra) a las 24 horas experimentación |
|--|---|--|
| UFC acumuladas/ml | $3,79 \cdot 10^3$ UFC/ml | |
| UFC acumuladas | $3,79 \cdot 10^6$ UFC | |
| Masa tejido mejillón | 4,6405 g | 4,6405 g |
| UFC acumuladas/g mejillón | $8,16 \cdot 10^5$ UFC/g mejillón | $9,67 \cdot 10^4$ UFC/g mejillón |
| UFC/g mejillón (acumuladas +iniciales) | $8,16 \cdot 10^5$ UFC/g mejillón | $9,67 \cdot 10^4$ UFC/g mejillón |

Aplicando las ecuaciones [1] y [2], se obtienen los porcentajes de acumulación bacteriana a las 24 horas de experimentación, gracias los datos obtenidos en la Tabla 14.

$$\frac{3,79 \cdot 10^6 \text{ UFC}}{3,98 \cdot 10^6 \text{ UFC}} = 95,2 \% \text{ Acumulación } \textit{Enterococcus sp.} \quad [1]$$

$$\frac{8,16 \cdot 10^5 \text{ UFC/g mejillón}}{3,98 \cdot 10^6 \text{ UFC}} = 20,5 \% \text{ Acumulación } \textit{Enterococcus sp. / g mejillón} \quad [2]$$

Los resultados muestran una menor acumulación total y acumulación bacteriana por gramo de mejillón en relación al experimento *E.coli* en el que la concentración inicial de bacterias era de 10^3 /ml. Esto muestra que la disminución de *Enterococcus* sp. en el agua de experimentación ha sido significativamente menor que *E.coli*, lo que muestra que el mejillón cebra tiene un mayor potencial de acumulación de *Escherichia coli*.

Además la diferencia de cantidad de enterococos acumulados/g mejillón medidos a través del agua de experimentación y a partir del extracto del mejillón cebra (Tabla 14), es menor que la obtenida con *E.coli* a la misma concentración de bacteria inicial (10^3 /ml). Estos resultados son similares a los obtenidos con una concentración inicial mayor (10^5 /ml), y como se ha citado anteriormente puede tener su origen en el hecho de que el mayor tamaño de la bacteria de *E.coli* provoque una mayor acumulación y digestión de la misma y por tanto una mayor diferencia entre los valores que estamos comparando.

***Salmonella sp.* (10^6 UFC/ml):**

La contaminación por *Salmonella sp.* presente en los mejillones cebra del acuario se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. UFC de *Salmonella sp.* en los mejillones cebra tomados del acuario para la experimentación.

| Parámetro | Valor (<i>Dreissena polymorpha</i>) |
|-----------------------|---------------------------------------|
| <i>Salmonella sp.</i> | 0 UFC/g mejillón |

La concentración de *Salmonella sp.* en el agua del experimento de acumulación bacteriana a distintos tiempos, con una concentración inicial de 10^6 UFC/ml, se muestra en la Figura 15.

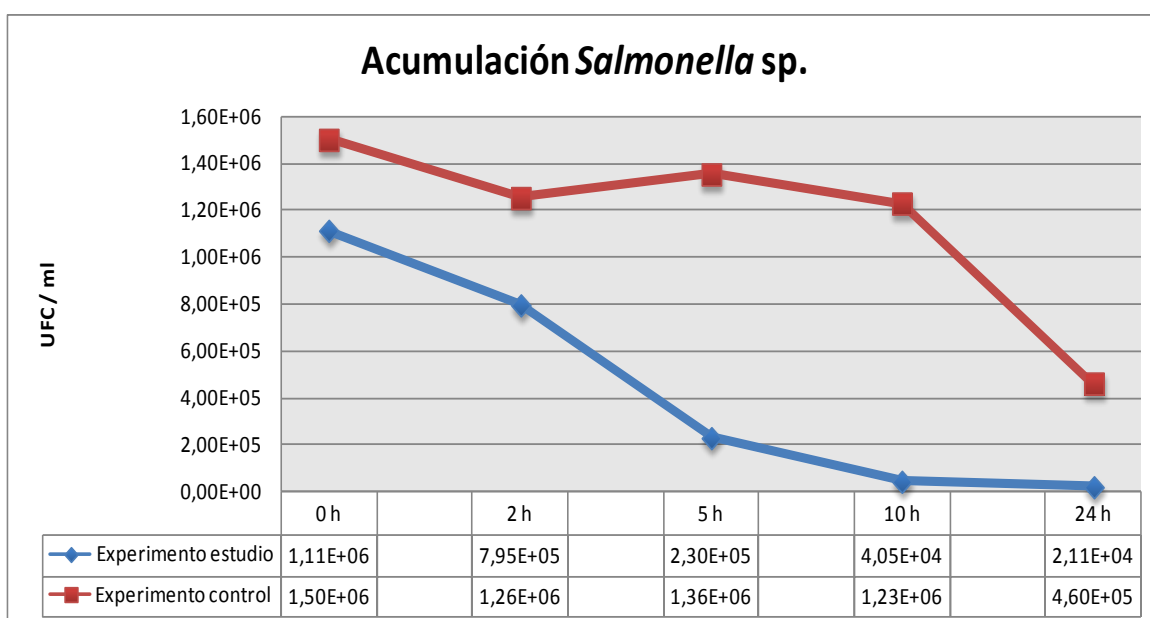


Figura 15. Gráfico de acumulación de *Salmonella sp.* en un agua con concentración 10^6 /ml por mejillones cebra.

El agua del experimento control sufre una caída aproximada de la concentración de *Salmonella sp.* de un orden de magnitud logarítmica. Esta disminución del número de *Salmonella sp.*, que principalmente tiene lugar de las 10 a las 24 horas, viene dada por una mortalidad de las mismas debido a la gran sensibilidad de la mayoría de cepas de *Salmonella* a las condiciones ambientales (*Salmonella* es una bacteria que habita principalmente en el tracto digestivo de humanos y animales superiores, aunque se han descritos brotes originados por el consumo de aguas contaminadas). La cepa seleccionada para este ensayo, como se observa en el gráfico, es sensible a este ambiente acuático. En el experimento estudio, antes de que se produzca la muerte de *Salmonella*, es decir, desde el inicio hasta las 10 horas de experimento, se ve una clara disminución del número de bacterias. Esto lleva a afirmar que el mejillón cebra también puede actuar acumulando dicha bacteria, aunque no se puede obtener la capacidad de acumulación de dicha bacteria en el mejillón porque no se conoce exactamente en qué momento y qué cantidad de bacterias están desapareciendo en el experimento estudio.

El análisis bacteriano de *Salmonella* del mejillón cebra a través del extracto obtenido del mismo muestra un valor de contaminación a las 24 horas de $7,37 \cdot 10^4$ UFC *Salmonella*/g mejillón cebra. Este valor en el mejillón es inferior a los obtenidos en el mejillón cebra (a través del extracto de mejillón) en los experimento con *E.coli* y *Enterococcus* sp. (Tabla 10 y Tabla 13), a una misma concentración alta de patógeno. Esto posiblemente no suceda porque se produce una menor acumulación de bacterias de este tipo, sino por la gran cantidad de salmonelas que van muriendo.

***Salmonella* sp. (10^4 UFC/ml):**

La concentración de *Salmonella* sp. en el agua del experimento de acumulación bacteriana a distintos tiempos, con una concentración inicial de 10^4 UFC/ml, se muestra en la Figura 16.

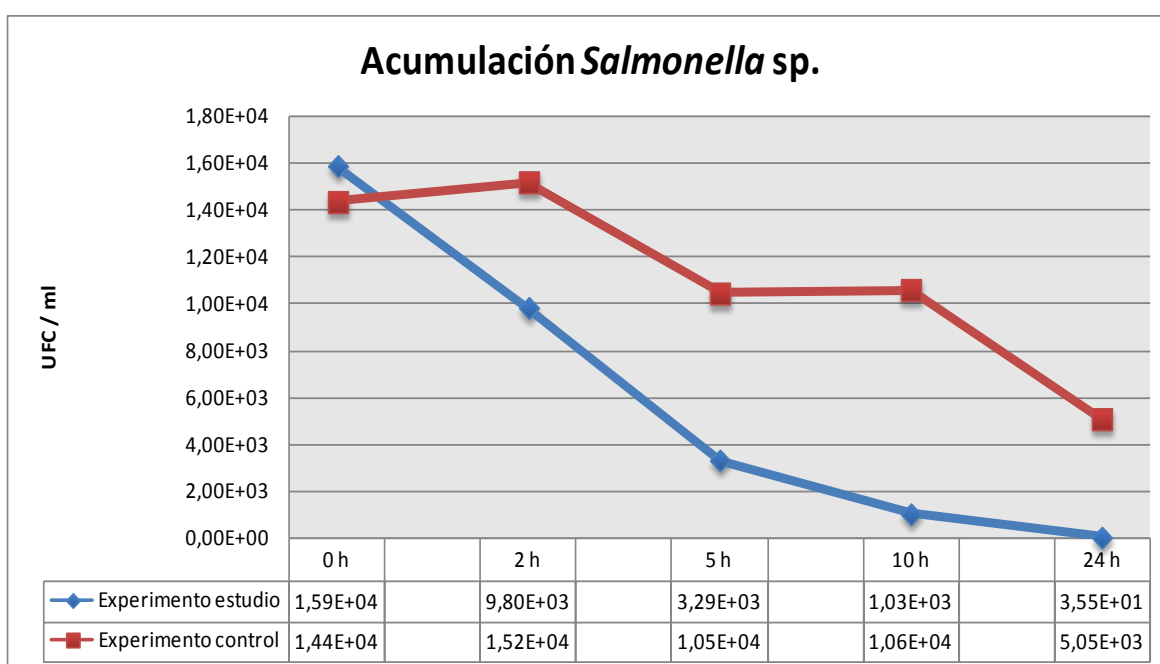


Figura 16. Gráfico de acumulación de *Salmonella* sp. en un agua con concentración 10^4 /ml por mejillones cebra.

Al igual que en el experimento estudio anterior se observa una rápida disminución de la concentración de *Salmonella* a causa principalmente, de la acumulación de las mismas por el mejillón cebra. En el experimento control también se produce una disminución de la concentración, aunque en este caso no tiene el origen en la acumulación por parte del bivalvo filtrador, sino por la sensibilidad en este ambiente de la cepa de bacterias estudio, que provoca la muerte de las mismas. Al igual que en el experimento anterior, no se puede obtener la capacidad de acumulación de *Salmonella* en *Dreissena polymorpha*.

El análisis del contenido en *Salmonella* del mejillón cebra a través del extracto obtenido del mismo muestra un valor de contaminación a las 24 horas de $2,18 \cdot 10^2$ UFC *Salmonella*/g mejillón cebra. Este valor en el mejillón es muy inferior a los obtenidos en el mejillón cebra (a través del extracto de mejillón) en los experimento con *E.coli* y *Enterococcus* sp. (Tabla 11 y Tabla 14), a una misma concentración alta de patógeno. Se observa que se ha acumulado *Salmonella* sp. en el mejillón, pero seguramente parte de las bacterias han ido muriendo a lo largo del experimento.

4.3.2. Resultados infección bacteriana por el mejillón cebra

Escherichia coli (10⁵ UFC/ml):

La gráfica de infección bacteriana, a lo largo de 24 horas, de un agua estéril por 2 mejillones cebra que previamente han sido expuestos a una concentración de *E.coli* de 10⁵/ml, se muestra en la Figura 17.

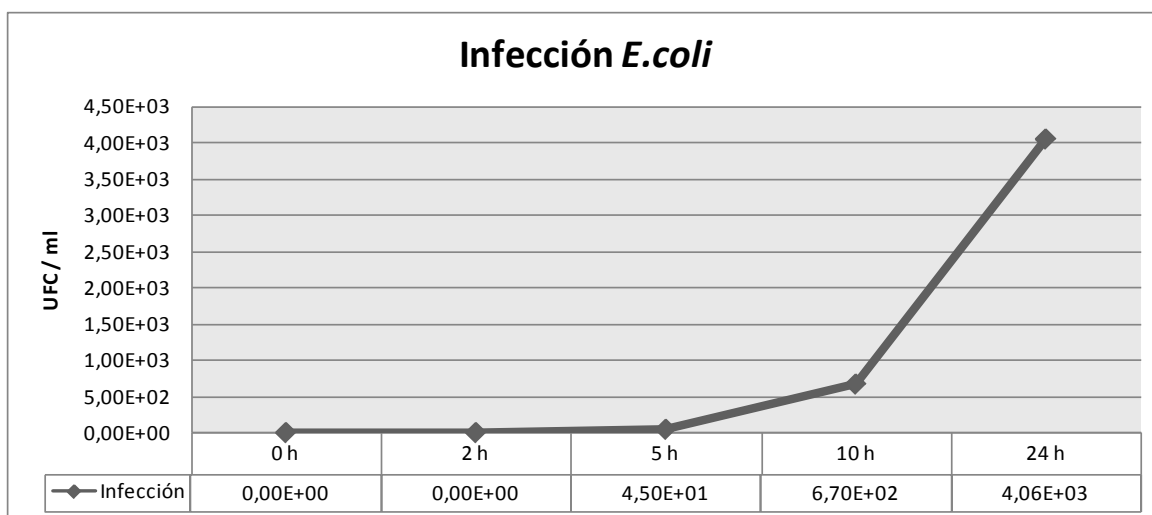


Figura 17. Gráfico de infección de *E.coli* en un agua estéril por mejillones cebra previamente expuestos a una concentración de *E.coli* de 10⁵/ml.

Se observa un aumento pequeño de la concentración de *Escherichia coli* en el agua a partir de las 5 horas de depuración en un agua estéril. El aumento más pronunciado de infección bacteriana del agua se alcanza de las 10 a las 24 horas.

En la Tabla 16 se muestran los resultados de infección de *E.coli* medidos a través del agua de experimentación a las 24 horas.

Tabla 16. Resultados de infección de *E.coli* por mejillones cebra expuestos a una concentración inicial 10⁵ UFC *E.coli*/ml, medidos a través del agua de experimentación.

| Parámetro | Valor (según datos del agua) a las 24 horas de experimentación |
|---------------------------|--|
| UFC infección/ml | 4,06·10 ³ UFC/ml |
| UFC infección | 4,06·10 ⁶ UFC |
| Masa tejido mejillón | 1,691 g |
| UFC infectadas/g mejillón | 2,4·10 ⁶ UFC/g mejillón |

Según los datos de contaminación en el agua, los mejillones cebra son capaces de infectar 2,4·10⁶UFC de *E.coli*/g mejillón en 1 litro de agua en 24 horas, los cuales son unos valores altos de contaminación, pero muy inferiores a los 1,05·10⁸UFC de *E.coli*/g mejillón (Tabla 10) en 1 litro de agua acumulados a las 24 horas de ensayo en el experimento de acumulación bacteriana del que proceden estos mejillones cebra.

El dato de contaminación por *Escherichia coli* a las 24 horas de infección en el mejillón cebra es de $7,7 \cdot 10^4$ UFC/g mejillón cebra. Comparando este valor, con el obtenido a partir del extracto de mejillón cebra al final del experimento de acumulación bacteriana (Tabla 10), se observa una disminución de la cantidad de *E.coli*, lo que muestra una pérdida de bacterias en su interior, relacionada posiblemente con esta infección en el agua estéril.

Los resultados muestran que la capacidad de acumulación de *E.coli* en el mejillón cebra es mucho mayor que su capacidad de liberar dichos contaminantes a un medio acuático estéril.

***Escherichia coli* (10^3 UFC/ml):**

En la Figura 18 se muestra la gráfica de infección bacteriana a lo largo de 24 horas de un agua estéril, por mejillones cebra que previamente han sido expuestos a una concentración de *E.coli* de 10^3 /ml.

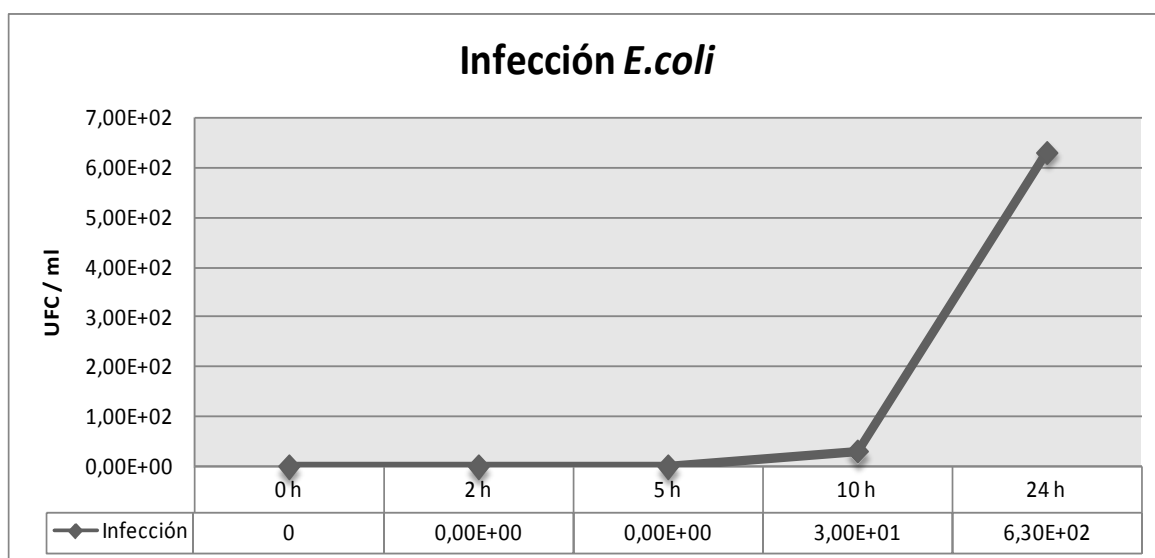


Figura 18. Gráfico de infección de *E.coli* en un agua estéril por mejillones cebra previamente expuestos a una concentración de *E.coli* de 10^3 /ml.

Se observa un aumento pequeño de la concentración de *Escherichia coli* en el agua a partir de las 10 horas de depuración en un agua estéril. El aumento más pronunciado de infección bacteriana del agua se alcanza de las 10 a las 24 horas. La capacidad de infección es más lenta y se tarda más tiempo en infectar el nuevo agua que en el experimento anterior de infección bacteriana (*Escherichia coli*, 10^5 UFC/ml), posiblemente porque la concentración de *E.coli* retenida en el mejillón cebra es mucho menor. En la Tabla 17 se muestran los resultados de infección de *E.coli* medidos a través del agua de experimentación a las 24 horas.

Tabla 17. Resultados de infección de *E.coli* por mejillones cebra expuestos a una concentración inicial 10^3 UFC *E.coli*/ml, medidos a través del agua de experimentación.

| Parámetro | Valor (según datos del agua) |
|---------------------------|---------------------------------|
| UFC infección/ml | $6,3 \cdot 10^2$ UFC/ml |
| UFC infección | $6,3 \cdot 10^5$ UFC |
| Masa tejido mejillón | 2,171 g |
| UFC infectadas/g mejillón | $2,9 \cdot 10^5$ UFC/g mejillón |

Los mejillones cebra son capaces de infectar $2,9 \cdot 10^5$ UFC de *E.coli*/g mejillón en 1 litro de agua en 24 horas (Tabla 17). Estos resultados muestran una alta capacidad de contaminar un nuevo hábitat acuático estéril de dicho contaminante. Aunque esta cantidad de *E.coli* de infección por gramo de mejillón cebra es menor a la cantidad de dicha bacteria acumulada, $8,93 \cdot 10^5$ UFC/g mejillón (Tabla 11), por los mismos mejillones utilizados en el experimento de acumulación bacteriana.

El dato de contaminación por *Escherichia coli* medido en el extracto de mejillón, a las 24 horas de infección es de $1,88 \cdot 10^4$ UFC/g mejillón cebra, lo que indica una pérdida de bacterias de *E.coli* en relación a la cantidad de bacterias presentes en el mejillón cebra al final del experimento de acumulación del que proceden (Tabla 11).

Al igual que en el ensayo en el que se partía de mejillones que habían sido expuestos a una concentración mayor de *E.coli*, se observa que la infección de esta bacteria por el mejillón cebra es menor que su capacidad de acumularla. La diferencia entre la cantidad retención de bacterias y la infección de las mismas en este ensayo es mucho menor que en el realizado con una concentración mayor inicial de *E.coli* (10^5 /ml).

***Enterococcus sp.* (10^5 UFC/ml):**

En la Figura 19 se muestra la gráfica de infección bacteriana, a lo largo de 24 horas, de un agua estéril por 2 mejillones cebra que previamente han sido expuestos a una concentración de *Enterococcus sp.* de 10^5 /ml.

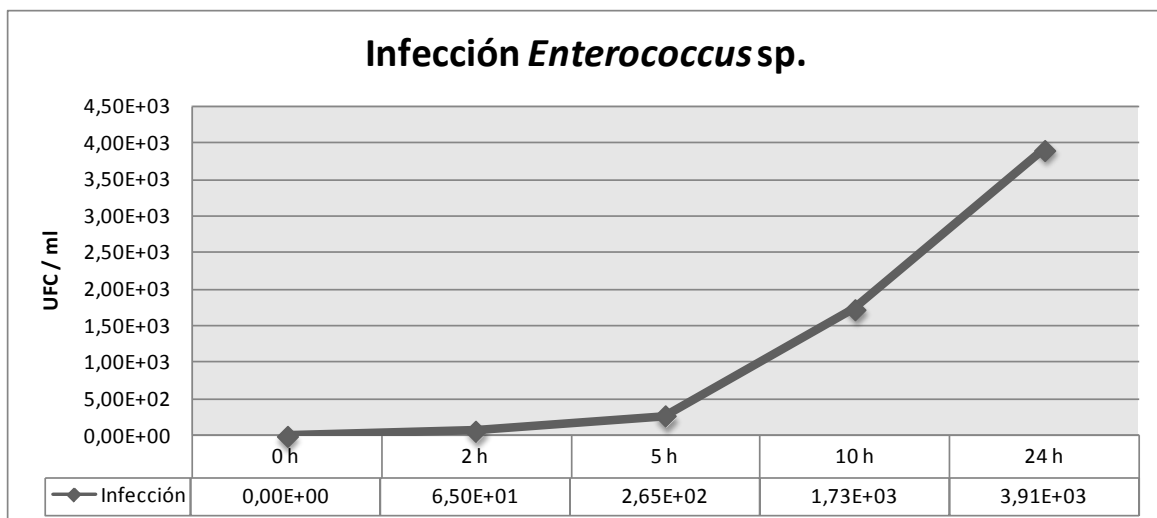


Figura 19. Gráfico de infección de *Enterococcus sp.* en un agua estéril por mejillones cebra previamente expuestos a una concentración de *Enterococcus sp.* de 10^5 /ml.

En el gráfico de la Figura 19 se observa un aumento pequeño de la concentración de *Enterococcus* sp. hasta las 5 horas de depuración en un agua estéril. El aumento más pronunciado tiene lugar a partir de las 5 horas de experimento.

Tabla 18. Resultados de infección de *Enterococcus* sp. por mejillones cebra expuestos a una concentración inicial 10^5 UFC *Enterococcus* sp./ml, medidos a través del agua de experimentación.

| Parámetro | Valor (según datos del agua) |
|---------------------------|----------------------------------|
| UFC infección/ml | $3,91 \cdot 10^3$ UFC/ml |
| UFC infección | $3,91 \cdot 10^6$ UFC |
| Masa tejido mejillón | 1,5665 g |
| UFC infectadas/g mejillón | $2,49 \cdot 10^6$ UFC/g mejillón |

En la Tabla 18 se muestran los resultados de infección de *Enterococcus* sp. medidos a través del agua de experimentación a las 24 horas. Si comparamos estos resultados con la infección por *E.coli* de mejillones expuestos a una misma concentración inicial de bacteria (Tabla 16), prácticamente tienen la misma capacidad de infección, aunque según las gráficas de la Figura 17 y la Figura 19, los enterococos se sueltan antes al agua que *E.coli* por el mejillón cebra. Esto quizás se produzca porque el menor tamaño de los enterococos, como se ha citado anteriormente, provoque una menor retención interna en el mejillón y por tanto una suelta más rápida de los mismos al agua.

El dato de contaminación por *Enterococcus* sp. medido a través del extracto de mejillón a las 24 horas de infección, es de $1,88 \cdot 10^5$ UFC/g mejillón cebra, lo que indica una pérdida de bacterias de enterococos en relación a la cantidad de bacterias presentes en el mejillón cebra al final del experimento de acumulación del que proceden (Tabla 13).

Al igual que en el experimento de *Escherichia coli*, la capacidad de acumular bacterias de *Enterococcus* sp. es mucho mayor que la de infección de los mismos.

***Enterococcus* sp. (10^3 UFC/ml):**

La Figura 20 muestra la gráfica de infección bacteriana, a lo largo de 24 horas, de un agua estéril por 2 mejillones cebra que previamente han sido expuestos a una concentración de *Enterococcus* sp. de 10^3 /ml.

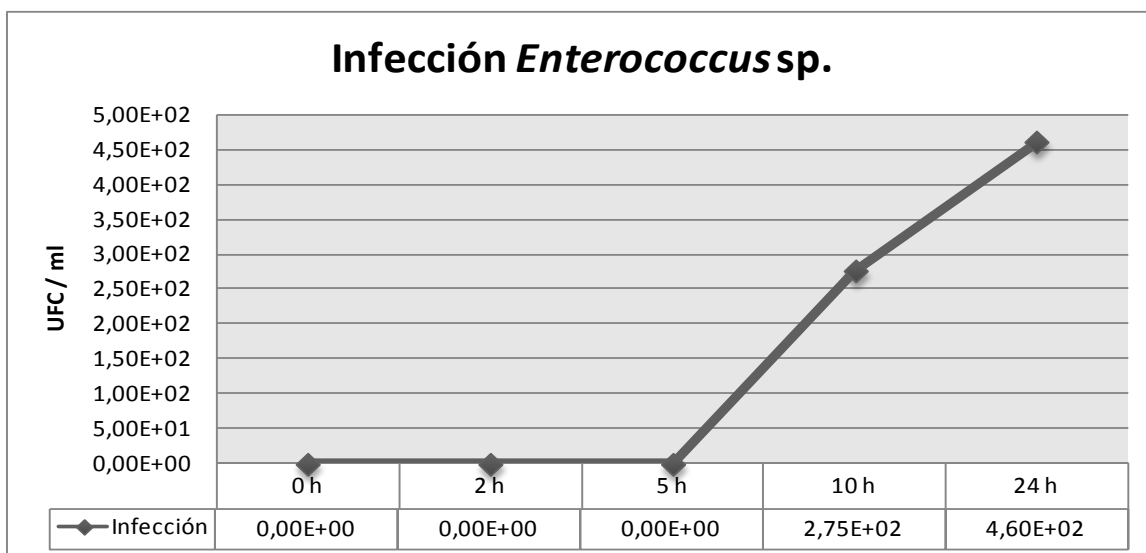


Figura 20. Gráfico de infección de *Enterococcus* sp. en un agua estéril por mejillones cebra previamente expuestos a una concentración de *Enterococcus* sp. de 10^3 /ml.

El gráfico de la Figura 20 muestra un inicio de la capacidad de infección de enterococos a partir de las 5-10 horas. En este ensayo se observa que a las 10 horas se produce una infección mayor que a las 10 horas en el experimento realizado con *E.coli* en las mismas condiciones. Esto significa, al igual que en el ensayo anterior, que los enterococos son expulsados más rápidamente al agua por parte del mejillón cebra que *E.coli*. En la Tabla 19 se muestran los resultados de infección de *Enterococcus* sp. medidos a través del agua de experimentación a las 24 horas.

Tabla 19. Resultados de infección de *Enterococcus* sp. por mejillones cebra expuestos a una concentración inicial 10^3 UFC *Enterococcus* sp./ml, medidos a través del agua de experimentación.

| Parámetro | Valor (según datos del agua) |
|---------------------------|----------------------------------|
| UFC infección/ml | $4,6 \cdot 10^2$ UFC/ml |
| UFC infección | $4,6 \cdot 10^5$ UFC |
| Masa tejido mejillón | 1,8335 g |
| UFC infectadas/g mejillón | $2,51 \cdot 10^5$ UFC/g mejillón |

El dato de contaminación por *Enterococcus* sp. medido a través del extracto de mejillón a las 24 horas de infección, es de $2,85 \cdot 10^4$ UFC/g mejillón cebra, lo que indica una pérdida de bacterias de enterococos en relación a la cantidad de bacterias presentes en el mejillón cebra al final del experimento de acumulación del que proceden (Tabla 14).

La capacidad de acumular bacterias de *Enterococcus* sp. ha sido mayor que la de infección de los mismos, aunque realmente en la experimentación donde ha habido una diferencia realmente alta entre la capacidad de acumular bacterias y de infectar posteriormente ha sido la llevada a cabo con *Escherichia coli*.

***Salmonella sp.* (10^6 UFC/ml):**

En la Figura 21 se muestra la gráfica de infección bacteriana, a lo largo de 24 horas, de un agua estéril por 2 mejillones cebra que previamente han sido expuestos a una concentración de *Salmonella sp.* de 10^6 /ml.

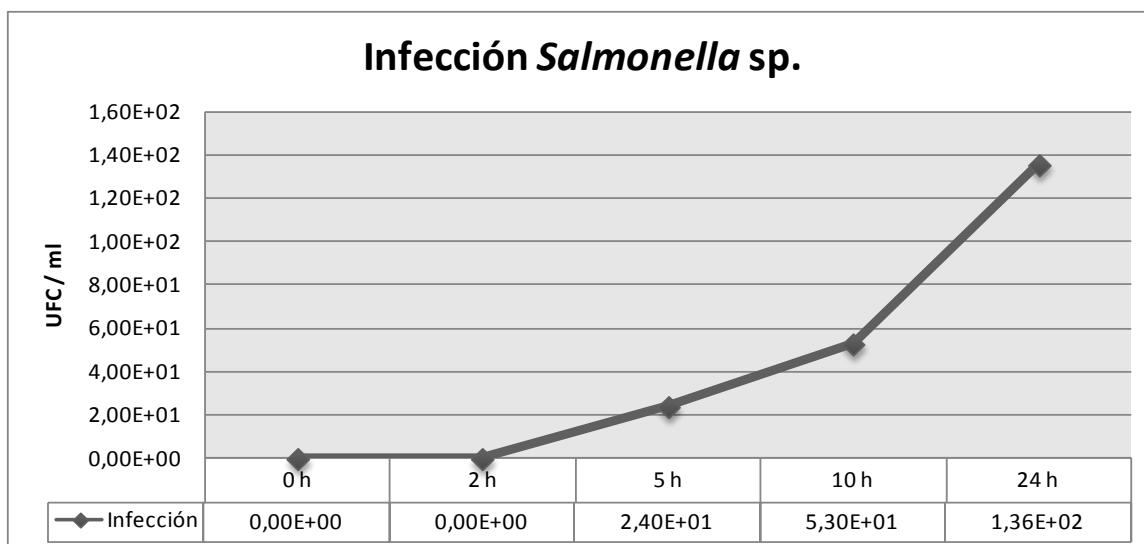


Figura 21. Gráfico de infección de *Salmonella sp.* en un agua estéril por mejillones cebra previamente expuestos a una concentración de *Salmonella sp.* de 10^6 /ml.

La capacidad de infección de *Salmonella* se puede observar en el gráfico de la Figura 21. La forma de infección se produce similar a la de enterococos, con una suelta de bacterias al agua un poco más temprana que la que se produce con *E.coli*. En la Tabla 20 se muestran los resultados de infección de *Salmonella sp.* medidos a través del agua de experimentación a las 24 horas. El número de bacterias de *Salmonella* de infección en el agua es mucho menor si lo comparamos con los experimentos a unas mismas condiciones de *E.coli* y *Enterococcus sp* (Tabla 16 y Tabla 18), debido a la sensibilidad de la mayoría de las cepas de *Salmonella* fuera de su hábitat, lo que provoca la muerte de las bacterias.

Tabla 20. Resultados de infección de *Salmonella sp.* por mejillones cebra expuestos a una concentración inicial 10^6 UFC *Salmonella sp.*/ml, medidos a través del agua de experimentación

| Parámetro | Valor (según datos del agua) |
|---------------------------|----------------------------------|
| UFC infección/ml | $1,36 \cdot 10^2$ UFC/ml |
| UFC infección | $1,36 \cdot 10^5$ UFC |
| Masa tejido mejillón | 1,98 g |
| UFC infectadas/g mejillón | $6,87 \cdot 10^4$ UFC/g mejillón |

Salmonella sp. (10^4 UFC/ml):

En la Figura 22 se muestra la gráfica de infección bacteriana, a lo largo de 24 horas, de un agua estéril por 2 mejillones cebra que previamente han sido expuestos a una concentración de *Salmonella sp.* de 10^4 /ml.

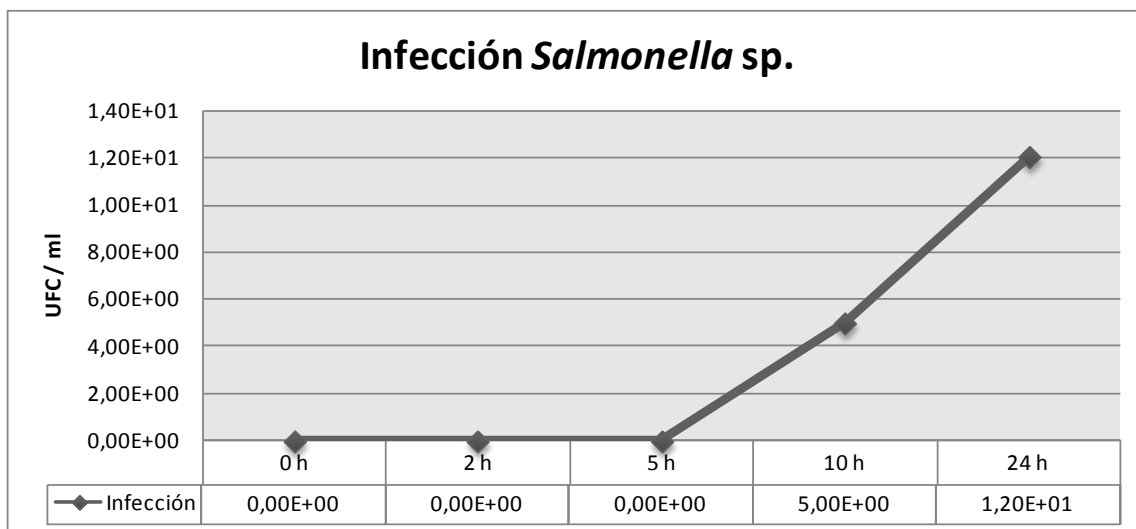


Figura 22. Gráfico de infección de *Salmonella sp.* en un agua estéril por mejillones cebra previamente expuestos a una concentración de *Salmonella sp.* de 10^4 /ml.

En la Tabla 21 se muestran los resultados de infección de *Salmonella sp.* medidos a través del agua de experimentación a las 24 horas. Al igual que en el experimento anterior no se puede evaluar correctamente la capacidad de infección por estas bacterias, ya que como se observa en el gráfico de la Figura 22 y en los resultados obtenidos en la Tabla 21 prácticamente no infectan el agua, y esto se produce por la muerte de *Salmonella sp.*

Tabla 21. Resultados de infección de *Salmonella sp.* por mejillones cebra expuestos a una concentración inicial 10^4 UFC *Salmonella sp.*/ml, medidos a través del agua de experimentación.

| Parámetro | Valor (según datos del agua) |
|---------------------------|----------------------------------|
| UFC infección/ml | $1,2 \cdot 10^1$ UFC/ml |
| UFC infección | $1,2 \cdot 10^4$ UFC |
| Masa tejido mejillón | 2,186 g |
| UFC infectadas/g mejillón | $5,49 \cdot 10^3$ UFC/g mejillón |

En el ANEXO V aparecen imágenes de las colonias bacterianas y su disminución por el proceso de acumulación en los distintos experimentos de este apartado del proyecto.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en el experimento de mantenimiento y cría en cautividad del mejillón cebra, se concluye que:

- Es posible un correcto mantenimiento del mejillón cebra bajo condiciones de laboratorio, controlando los principales factores que influyen en su crecimiento.
- Se debería alargar la experimentación de la cría de mejillón cebra en meses propicios para su reproducción y observar si este hecho influye en el aumento del número de larvas en el acuario y la observación de nuevo individuos adultos de *Dreissena polymorpha*.

De la experimentación realizada sobre los mejillones cebra y el agua superficial de la acequia Rimer de Caspe se puede concluir que:

- La presencia de protozoos parásitos, como *Cryptosporidium* y amebas de vida libre, y diversas bacterias patógenas retenidas en el interior de los mejillones cebra que habitan en aguas naturales puede suponer un riesgo sanitario importante para la comunidad autónoma de Aragón. Estos organismos bivalvos pueden ir concentrando dichos patógenos y expulsarlos en un momento concreto cuando este organismo muera o por causas ambientales que favorezcan este proceso, ocasionando un aumento brusco de patógenos en el agua, sobre todo en épocas de sequía donde el caudal del agua disminuye considerablemente.
- El movimiento de estos bivalvos, como especie invasora que son, gracias a su adhesión a embarcaciones o arrastrados en aguas de lastre de distintos barcos, puede ocasionar la introducción de los patógenos acumulados en aguas donde no existían dichos microorganismos, provocando así una nueva contaminación y posibles efectos ecológicos y económicos en el nuevo hábitat.
- La cantidad de bacterias presentes en los mejillones cebra y en las aguas naturales circundantes muestran una cierta correlación, que puede suponer la base para un estudio sobre de la utilización de estos moluscos bivalvos como indicadores de la calidad microbiológica de las aguas naturales en la cuenca del Ebro, pero es insuficiente para verificarlo estadísticamente. Los resultados obtenidos según el estadístico realizado muestran que el mejillón cebra no es un buen indicador de la contaminación de bacterias en el agua, porque no hay una buena correlación entre la concentración bacteriana en el agua natural y en el tejido interno del mejillón. Como se ha observado la diferencia en la capacidad de acumulación por parte del mejillón cebra para diferentes bacterias, puede influir en la mala correlación del estadístico. Sería idóneo realizar más experimentos para determinar de manera exacta la posible utilización de estos organismos filtradores como bioindicadores de la calidad bacteriana del agua.

Del estudio de evaluación de la capacidad de acumulación e infección bacteriana por mejillones cebra (*Dreissena polymorpha*) se concluye que:

- Los mejillones cebra son capaces de acumular la casi totalidad de bacterias de *Escherichia coli* y *Enterococcus* sp. en 24 horas, en un agua que tiene similares condiciones a las aguas naturales contaminadas de la Comunidad Autónoma de Aragón donde habita el mejillón cebra. Esta acumulación es casi total cuando todo el agua presente en la muestra objeto de estudio es filtrada por los mejillones cebra del estudio.
- La capacidad de acumulación de *Escherichia coli* por el mejillón cebra ha sido mayor que la de *Enterococcus* sp. en todos los experimentos realizados. Este hecho se debe al mayor tamaño que presentan las bacterias de *E.coli*, lo que permite una mayor retención de las mismas en el agua, respecto a los enterococos.
- Aunque se produzca una mayor acumulación de *E.coli* en los mejillones respecto a los enterococos, en el mejillón cebra al cabo de 24 de experimentación no se refleja lo mismo, ya que presentan una menor concentración de *Escherichia coli* en sus tejidos, que como se ha explicado, posiblemente ocurra por una mayor metabolización de dicha bacteria, u otro factor que no se tenga controlado.
- La variación de la concentración bacteriana de *E.coli* en el agua de experimentación no produce prácticamente variación en el porcentaje de acumulación de dicha bacteria por el mejillón cebra. Por otro lado, a una mayor concentración de *Enterococcus* sp. en el agua, los mejillones son capaces de acumular un menor porcentaje total de dicha bacteria que cuando la concentración es menor en el agua (diferencia del 9%), pero acumulan un porcentaje similar por cada gramo de mejillón (diferencia del 2,7 %). Esto quizás indique que si aumenta mucho la concentración de enterococos en el agua, puede producirse una saturación en la acumulación y no se retengan de manera tan eficiente las mismas, provocando una disminución en el porcentaje de acumulación.
- La capacidad de acumulación e infección de *Salmonella* sp. en el agua por parte del mejillón cebra, no se pudo evaluar debido a la gran sensibilidad de la cepa utilizada que muere fuera de su hábitat común (tracto digestivo de humano o animales superiores).
- La capacidad de infección de *E.coli* y *Enterococcus* sp. en un agua estéril por parte del mejillón cebra es similar al cabo de 24 horas, aunque no así la forma de realizarlo. Mientras que el inicio de infección elevada por *E.coli* sucede de las 10 a las 24 horas de experimento, con enterococos tiene lugar a partir de las 5 ó 10 horas de experimento. Esta diferencia posiblemente se produzca porque el menor tamaño de los enterococos, como se ha citado anteriormente, provoquen una menor retención interna en el mejillón y por tanto una suelta más rápida de los mismos al agua.
- En todos los experimentos realizados la capacidad de acumular bacterias en aguas contaminadas por parte del mejillón cebra ha sido superior a su capacidad de infección en aguas estériles, lo que indica la buena funcionalidad de dicho organismo filtrador, que es la de retener partículas para su alimentación.

Como conclusión final, citar la peligrosidad que supone la presencia del mejillón cebra en aguas contaminadas con diversos patógenos, y en concreto las aguas naturales estudiadas, ya que el mejillón cebra es capaz de concentrar gran cantidad de patógenos humanos.

Por último, citar que la gran capacidad que tienen estos organismos para acumular patógenos en aguas contaminadas, junto con la gran función de los mismos para clarificarlas, podría ser el inicio de estudios para la utilización de estos bivalvos filtradores en la industria de tratamiento de aguas urbanas, donde la concentración de microorganismos patógenos es elevada, o como filtros verdes en aguas naturales contaminadas. Este posible uso sería quizás solamente adecuado para aquellos hábitats colonizados en gran medida por el mejillón cebra, para que este bivalvo, gracias a la movilidad de sus larvas, no provocara una nueva invasión biológica.

CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA

- 📖 Ackerman J.D. "Effect of velocity on the filter feeding of dreissenid mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): implications for trophic dynamics". Can. J. Fish. Aquat. Sci. 56, 1551–1561, 1999.
- 📖 Baldwin B.S., Mayer M.S., Dayton J., Pau N., Mendilla J., Sullivan M., Moore A., Ma A., Mills E.L. "Comparative growth and feeding in zebra and quagga mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): implications for North American lakes". Can. J. Fish. Aquat. Sci. 59, 680–694, 2002.
- 📖 Borcherdin J. "The annual reproductive cycle of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* in lakes". Oecologia 87, 208-218, 1991.
- 📖 Carrasco L., Díez S., Soto D., Catalan J., Bayona J.M. "Assessment of mercury and methylmercury pollution with zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in the Ebro River (NE Spain) impacted by industrial hazardous dumps". Science of the total environment 407, 178-184, 2008.
- 📖 Cia I. "Ecología del mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*) en el tramo inferior del río Ebro. Problemática y posibilidades de control". Tesis Doctoral. Universidad de Lleida, 2008.
- 📖 Claudi R., Mackie G.L. "Practical Manual for Zebra Mussel Monitoring and Control". Lewis, Boca Raton, FL. 1994.
- 📖 Clesceri L.S., Eaton A.D., Rice E.W., Greenberg A.E. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 21ª edición. APHA, AWWA, WEF, 2005.
- 📖 Cohen A.N. "A review of zebra mussels' environmental requirements". San Francisco Estuary Institute. 2005.
- 📖 Durán C. "El mejillón cebra en la cuenca del Ebro". Ed. Confederación Hidrográfica del Ebro. 2007.
- 📖 Durán C., Touya V., Anadón A., Lanao M. "Afección y control del mejillón cebra en la cuenca del Ebro". Tecnología del Agua 307, 20-28, 2009.
- 📖 Elliott P., Aldridge D.C., Moggridge G.D. "Zebra mussel filtration and its potential uses in industrial water treatment". Water Research 42, 1664-1674, 2008.
- 📖 Frischer M.E., Parsons R.H., Waitkus K., Vathanodorn K., Nierzwicki-Bauer S.A. "Bacteria as a direct food source for zebra mussels (*D. polymorpha*)". Final Reports of the Tibor, T. Polgar Fellowship Program. Hudson River Foundation, New York. 1996.
- 📖 Gamazo C., López-Goñi I., Díaz R. "Manual práctico de microbiología". Ed. Masson. Barcelona, 2005.

- 📖 Graczyk T.K., Conn D.B., Lucy F., Minchin D., Tamang L., Moura L.N.S., Da Silva A.J. "Human waterborne parasites in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from the Shannon River drainage area, Ireland". *Parasitology Research* 93, 385-391, 2004.
- 📖 Graczyk T.K., Conn D.B., Marcogliese D.J., Graczyk H., de Lafontaine Y. "Accumulation of human waterborne parasites by zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*)". *Parasitology Research* 89, 107-112, 2003.
- 📖 Graczyk T.K., Marcogliese D.J., de Lafontaine Y., Da Silva A.J., Mhangami-Ruwende B., Pieniazek N.J. "*Cryptosporidium parvum* oocysts in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): evidence from the St. Lawrence River". *Parasitology Research* 87, 231-234, 2001.
- 📖 Henriksen S.A., Pohlenz J.F. "Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl–Neelsen technique". *Acta Veterinaria Scandinavica* 22, 594–596, 1981.
- 📖 Johnson L.E. "Enhanced early detection and enumeration of zebra mussel (*Dreissena* spp.) veligers using cross-polarized light microscopy". *Hydrobiologia* 312, 139-146, 1995.
- 📖 Kar S., Gawlowska S., Dauschiesb A., Bangourab B. "Quantitative comparison of different purification and detection methods for *Cryptosporidium parvum* oocysts". *Veterinary Parasitology* 177, 366-370, 2011.
- 📖 Lanao M. "Investigación de la inactivación de *Clostridium perfringens* y *Enterococcus* sp. en aguas mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación". Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, 2012
- 📖 McMahon R. "The physiological ecology of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, in North America and Europe". *American Zoologist* 36, 339-363, 1996.
- 📖 Muñoz G. "La colonización del mejillón cebrá, *Dreissena polymorpha* (Bivalvia: Dreissenidae) en el tramo final del río Ebro: factores que controlan su distribución y abundancia". Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, 2013.
- 📖 Nichols S.J. "Maintenance of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) under laboratory conditions". *Zebra mussels, biology, impacts & control*. 733-748, 1993.
- 📖 Norma UNE-EN ISO 7899-2:2001. Calidad del agua. Detección y recuento de enterococos intestinales. Parte 2: método de filtración de membrana.
- 📖 Norma UNE-EN ISO 9308-1:2000. Calidad del agua. Detección y recuento de *Escherichia coli* y de bacterias coliformes. Parte 1: método de filtración en membrana.
- 📖 Norma UNE-EN ISO 16266:2006. Calidad del agua. Detección y recuento de *Pseudomonas aeruginosa*. Método por filtración en membrana.

- 📖 O'Neill C.R. Jr. "The Zebra Mussel. Impacts and control". Cornell Cooperative Extension, Information Bulletin, 238. New York Sea Grant. Cornell University. State University of New York. 1996.
- 📖 Palau A., Cia I., Fargas D., Bardina M., Massuti S. "Resultados preliminares sobre ecología básica y distribución del mejillón ceбра en el embalse de Riba-roja (Río Ebro)". Endesa. Madrid, 2004.
- 📖 Peribáñez M.A., Elrío M.L., Gracia M.J., Fernández de Luco D., Castillo J.A., Lucientes J., Cia I. "*Phyllodistomum folium* (Trematoda: Gorgoderidae) infecting zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in the Ebro River, Spain". Parasitology International 55, 143–145, 2006.
- 📖 Rajagopal S., Pollux B.J.A., Peters J.L., Cremers G., Moon-van der Staay S.Y., van Alen T., Eygensteyn J., van Hoek A., Palau A., de Vaate A., van der Velde G. "Origin of Spanish invasion by the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting". Biological Invasions 11, 2147-2159, 2009.
- 📖 Ruiz Altaba C. "La distribució geogràfica i ecològica dels bivalves d'aigua dolça recents dels Països Catalans". Butlletí de la Institució Catalana d'Història Natural 60, 77-103, 1992.
- 📖 Ruiz Altaba C., Jiménez P.J., López M.A. "El temido mejillón ceбра empieza a invadir los ríos españoles desde el curso bajo del río Ebro". *Quercus* 188, 50-51, 2001.
- 📖 Selegan J.P.W., Kusserow R., Patel R., Heidtke T.M., Ram J.L. "Using zebra mussels to monitor *Escherichia coli* in environmental waters". Journal of Environmental Quality 30, 171-179, 2001.
- 📖 Van der Velde G., Platvoet D. "Quagga mussels *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov, 1897) in the Main River (Germany)". Aquatic Invasions 2, 261-264, 2007.
- 📖 Willey J.M., Serwood L.M., Woolverton C.J. "Microbiología de Prescott, Harley y Klein" McGraw-Hill, Madrid, 2009.

ANEXOS

ANEXO I. Terminología científica de estudio

Bacteria: Es uno de los tres dominios de clasificación taxonómica en los que se dividen los seres vivos y está formado por microorganismos unicelulares sin núcleo. Tienen forma en coco, bacilo o en espiral, variando su tamaño de 5-10 μm de largo por 0,1-0,2 μm de ancho, aunque hay bacterias que pueden alcanzar mayores tamaños. Son sus formas principalmente las que permiten su diferenciación y clasificación. La mayoría de las bacterias se dividen en dos grandes grupos de clasificación basados en la respuesta de tinción de su pared bacteriana. Las gram-positivas tienen una gruesa capa homogénea de peptidoglicano que envuelve externamente a la membrana plasmática. Las gram-negativas tienen una pared de peptidoglicano fina envuelta por dos membranas lipídicas.

Grupo parafilético: Conjunto de especies que comparten un antepasado común, aunque no a todos los descendientes de este.

Grupo polifilético: Conjunto de especies que no comparten un antepasado común de manera reciente.

Microorganismo: Agentes y organismos de diámetro menor de un milímetro que no pueden ser vistos claramente al ojo humano y deben ser examinados con un microscopio.

Parásito: Organismo que entrelaza una relación simbiótica con su hospedador (otro organismo), del cual obtiene algún beneficio, principalmente depende metabólicamente de él. El parásito no provoca necesariamente una variación del estado saludable del hospedador.

Patógeno: Cualquier organismo o agente que causa enfermedad en un hospedador.

Protista: Grupo polifilético de organismos eucariontes, que actualmente forman uno de los reinos de clasificación de los seres vivos. La mayoría son unicelulares y carecen de nivel de organización de tejido, y esto es principalmente lo que los diferencia de hongos, plantas y animales.

Protozoo: Organismo eucariota unicelular o acelular, que en conjunto forman un grupo parafilético dentro del reino protista. En realidad son los protistas quimiorganotróficos. Presentan orgánulos que tienen un papel funcional de órganos. Los protozoos varían mucho en tamaño, desde pocas micras hasta un tamaño cercano al milímetro. También presentan gran variedad de formas, tipos de nutrición y ciclos vitales.

ANEXO II. Microorganismos patógenos objeto de estudio.

II.I. *Escherichia coli*

Bacteria aerobia gram-negativa, de la familia de las enterobacterias. Tiene forma de bacilo con un tamaño de 1,1 a 6 μm . Son bacterias capaces de fermentar azúcares, mediante una fermentación ácido mixta. Residen en el colon de los seres humanos y de otros animales de sangre caliente, así como en aguas contaminadas y en cualquier otro medio que favorezca su aparición. Suele utilizarse en el análisis de aguas para determinar si existe contaminación fecal y ambiental. Si la bacteria no adquiere elementos genéticos virulentos, actúa de forma natural en el tracto digestivo de distintos animales formando parte de la flora intestinal. Algunas cepas virulentas producen gastroenteritis, infecciones de las vías urinarias y otras afecciones en seres humanos y distintos mamíferos.

II.II. *Enterococcus sp.*

Género de microorganismos bacterianos que engloba a bacterias aerobias facultativas. Se trata de bacterias gran-positivas, que tienen un tamaño entre 0,6 y 2,5 μm . Su forma es esférica dando lugar a los denominados cocos formando parejas o cadenas cortas de ellos. Ciertas especies de este género son comensales del tracto digestivo de los seres humanos. *Enterococcus sp.* puede producir diferentes infecciones en seres humanos, que van desde la meningitis, hasta infecciones urinarias o en la sangre.

II.III. *Salmonella sp.*

Genero de bacterias aerobias facultativas, gram-negativas, de la familia de las enterobacterias. Tienen forma de bacilo con un tamaño de 0,5 a 3 μm y son capaces de producir SH_2 . El hábitat natural de estas bacterias es el tracto digestivo terminal de distintos animales y de los seres humanos. Cuando aparecen en el medio ambiente su origen ha sido fecal. Existen especies y cepas de este género de bacterias que no son virulentas. Las especies virulentas de este género producen distintas infecciones como la salmonelosis o las fiebres tifoideas.

II.IV. *Pseudomonas aeruginosa*

Bacteria con forma de bacilos rectos o ligeramente curvados, con medidas de 0'5 a 5 μm , que se desplazan mediante uno o varios flagelos polares. Son bacterias aerobias y gram-negativas. Su metabolismo se basa en una respiración aerobia, utilizando O_2 como aceptor final de electrones. Son patógenos oportunistas muy importantes de animales y plantas, infectando a personas bajas de defensas, invadiendo zonas de quemaduras, produciendo infecciones de las vías urinarias y respiratorias. El genoma de *Pseudomonas aeruginosa* tiene un número inusualmente alto de genes para el catabolismo, el transporte de nutrientes y

regulación del metabolismo, lo que explica su habilidad para crecer en infinidad de ambientes y su gran resistencia a antibióticos.

II.V. *Cryptosporidium* sp.

Grupo de protozoos parásitos que forman un género dentro del filo *Amphicomplexa* (Protistas). Este género comprende varias especies que pueden provocar infecciones en distintos mamíferos y en humanos. La enfermedad infecciosa que generan en el huésped es la cryptosporidiosis, la cual provoca una diarrea aguda normalmente autolimitada y efectos más severos en personas inmunodeprimidas y en niños. Su ciclo vital consta de una fase de ooquistes, que suelen encontrarse en el medio ambiente, principalmente en aguas. Los ooquistes tienen forma esférica u ovoide con un tamaño de 3 a 6 μm . El contacto con agua contaminada o por alimentos contaminados (vía fecal-oral) produce la transmisión de la enfermedad. La desenquistación de los ooquistes en el intestino provoca la formación de células infectivas del epitelio gastrointestinal y el comienzo de un ciclo complejo que puede llevar a la infección de otros sistemas como el respiratorio.

II.VI. *Giardia duodenalis*

Género de protozoos flagelados del filo *Sarcomastigophora* (Protistas). Formado por distintas especies parásitas humanas y de otros mamíferos. Una característica que define a estos organismos es la carencia de mitocondrias. Provocan una enfermedad llamada giardiasis, infección ocasionada sobre las microvellosidades del intestino delgado. Provoca distintas reacciones gastrointestinales, como diarrea e incluso en afecciones graves puede destruir células epiteliales que conllevan a una mala absorción de nutrientes. La transmisión de la enfermedad es provocada por la ingestión de alimentos o agua contaminada con quistes de *Giardia*. Dichos quistes tienen un tamaño aproximado de 15 μm . Una vez los quistes llegan al intestino, se produce el desenquistamiento y desarrollan la forma de vida flagelada e infectiva, los trofozoitos, que tienen un tamaño aproximado de 20 μm .

II.VII. Amebas de vida libre

Conjunto de protozoos que viven en el ambiente, principalmente en aguas estancadas o con poca movilidad. Las principales características que definen a este grupo son su movimiento mediante pseudópodos, su reproducción por fisión binaria y la presencia de una gran vacuola pulsátil. Como su nombre indica, son organismos de vida libre, capaces de vivir en diferentes ambientes, aunque muchas de ellas generan enfermedades en seres humanos actuando como parásitos oportunistas. Pueden ocasionar enfermedades muy distintas, dependiendo de la especie que se trate. *Naegleria* sp., *Acanthamoeba* sp. y *Hartmannella* sp., son distintos géneros de amebas de vida libre que se han encontrado en aguas y causan infección en humanos.

ANEXO III. Metodología analítica físico-química

III.I. Oxígeno disuelto

El Oxígeno Disuelto (O.D.) se define como la cantidad de oxígeno que está disuelta en el agua. Nos informa de la calidad del agua en cuanto a dar soporte a la vida acuática. Para medir el O.D. se utiliza un medidor de oxígeno disuelto y temperatura. El método utilizado es el 5814:1990 (UNE - EN ISO). Los niveles de oxígeno disuelto se expresan en partes por millón (ppm o mg/l).

III.II. Temperatura

La temperatura es una magnitud física que nos informa de la cantidad de calor que contiene, en este caso, una masa de agua. Para conocer la temperatura se utiliza igualmente el medidor de oxígeno disuelto y temperatura. Los datos obtenidos se expresan en grados centígrados (°C).

III.III. pH

El pH es una medida del grado de acidez o alcalinidad de una disolución. El pH se determina con el logaritmo negativo en base diez de la concentración de iones H^+ . Para cuantificar el pH del agua se utiliza un pH-metro marca CRISON modelo GLP 21. El método utilizado es el 4500-HB del Standard Methods [Clesceri *et al.*, 2005].

III.IV. Conductividad

La conductividad es la medida de la capacidad que tiene un agua para transportar la corriente eléctrica. Está relacionada con la presencia de sales en el agua, e indica la concentración de iones en la misma. Para determinar este parámetro se utiliza un conductímetro CRISON modelo *Basic 30*. El método utilizado es el 27888:1994 (UNE - EN ISO). Los datos obtenidos se expresan en mS/cm o en $\mu S/cm$, según la concentración o el rango en el que se trabaja.

III.V. Dureza total

La dureza total es la medida de cuantificación de la cantidad de iones de Ca^{2+} y Mg^{2+} presentes en un agua. Este parámetro se determina mediante valoraciones. El método utilizado es el 77040:2002 (UNE - EN ISO). La dureza total se expresa como el número equivalente de miligramos de carbonato de calcio por litro.

III.VI. Dureza de calcio

La dureza de calcio es la medida de la cantidad de iones Ca^{2+} presente en un agua. Este parámetro se determina mediante valoraciones. El método utilizado es el SM 3500-Ca B (Standard Methods) [Clesceri *et al.*, 2005]. La dureza de calcio se expresa como el número equivalente de miligramos de carbonato de calcio por litro.

ANEXO IV. Metodología analítica microbiológica

IV.I. Diluciones seriadas

El volumen de muestra de agua para analizar recomendado por el RD 140/2003 es de 100 ml, aunque en muchas ocasiones debido al alto número de bacterias presentes en las aguas, sería imposible hacer el recuento. Además en la gran mayoría de casos no se conoce el número de bacterias presentes en el agua, motivo por el cual se realizan diluciones de la muestra inicial. Estas diluciones se realizan de la misma manera para los extractos de mejillón cebra obtenidos en los distintos experimentos de este proyecto.

A partir del agua natural, agua experimental de laboratorio o extracto de mejillón cebra (dilución 0), se toma 1 ml de la muestra con micropipeta y se transfiere a un tubo con 9 mL de suero fisiológico estéril (0,9 % NaCl). A continuación, se homogeneiza en un vortex, obteniéndose de esta forma la dilución 1:10 (o dilución -1). Para hacer las diluciones sucesivas, se toma 1 mL de la dilución precedente bien homogeneizada y se lleva a un tubo con 9 mL de suero fisiológico estéril (0,9 % NaCl), todo ello en ambiente de trabajo estéril, proporcionado con un mechero Bunsen. La Figura I refleja de manera gráfica el procedimiento de diluciones decimales seriadas.

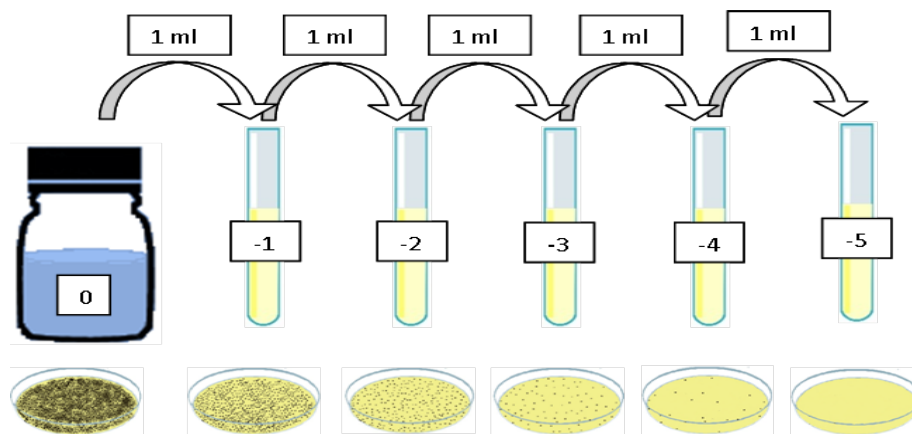


Figura I. Método de diluciones seriadas.

IV.II. Medios de cultivo

Los medios de cultivo bacteriano son ambientes artificiales, generalmente formados por un gel o solución que contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano. El material de vidrio, antes de su uso, se esteriliza en autoclave mediante calor húmedo durante 15 minutos a una temperatura de 121 °C para eliminar cualquier microorganismo o forma esporulada de resistencia y trabajar en condiciones estériles.

IV.II.i. Agar McConkey

El agar McConkey (Scharlau) es el medio elegido para el análisis de *Escherichia coli*, cuya composición se muestra en la Tabla I. Este agar se presenta en forma de polvo, y para su preparación se ha de suspender una cantidad precisa del polvo en agua destilada y seguidamente llevar a ebullición. La solución obtenida se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a una temperatura de 121°C. Tras finalizar el proceso de esterilización, los botes que contienen el agar líquido se colocan en el baño termostático a 50°C y se mantienen hasta su utilización. El rojo neutro es el que marca las colonias fermentadoras de lactosa de color rosado-rojizo, mientras que las no fermentadoras crecen de color blanco.

Tabla I. Composición agar McConkey.

| Ingredientes | Concentración (g/l) |
|------------------|---------------------|
| Peptonas | 20,0 |
| Lactosa | 10,0 |
| Sales biliares | 1,5 |
| Cloruro de sodio | 5,0 |
| Rojo neutro | 0,03 |
| Cristal violeta | 0,001 |
| Agar | 15,0 |

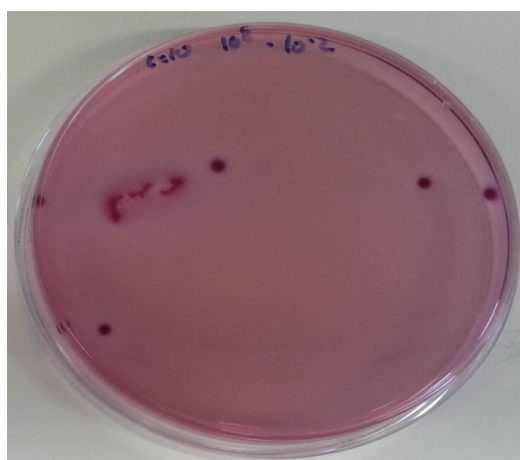


Figura II. Aspecto colonias *E.coli* en agar McConkey.

IV.II.ii. Slanetz & Bartley agar

Para analizar las bacterias del género *Enterococcus* durante este proyecto se utiliza el agar selectivo Slanetz & Bartley (Scharlau), cuya composición se muestra en la Tabla II. El agar en forma de polvo o granulado y en la cantidad exacta se disuelve en agua destilada y se lleva a ebullición. Después se esteriliza la solución obtenida en autoclave durante 15 minutos a una temperatura de 121°C. Una vez terminado el proceso de enfriamiento a 50°C en el baño termostático, se añade cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) al 1% (Scharlau) en una proporción de 10 mL por cada litro de medio base. La solución TTC se utiliza como indicador de color, ya que el TTC que es incoloro se reduce por acción del metabolismo de estas bacterias a trifenilformazán (rojo), de forma que los enterococos quedan coloreados con un color rojo-granate.

Tabla II . Composición agar Slanetz & Bartley.

| Ingredientes | Concentración (g/l) |
|------------------------------------|---------------------|
| Triptosa | 20,0 |
| Extracto de levadura | 5,0 |
| Dextrosa | 2,0 |
| Hidrogenofosfato de potasio | 4,0 |
| Azida de sodio (NaN ₃) | 0,4 |
| Agar | 12,0 |

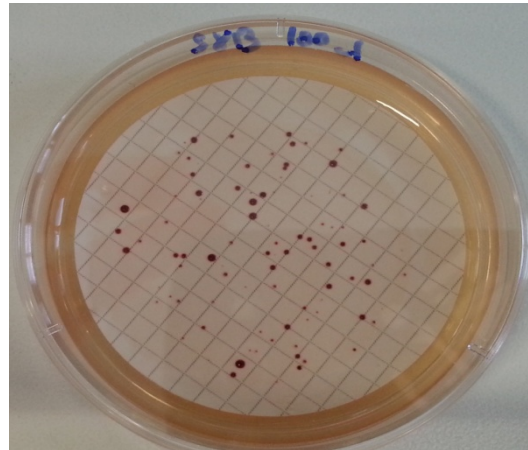


Figura III. Aspecto colonias *Enterococcus sp.* en agar Slanetz & Bartley.

IV.II.iii. *Salmonella-Shigella* agar

Las bacterias del género *Salmonella sp.* se analizaron utilizando el medio de cultivo *Salmonella-Shigella* agar (Scharlau) (SS agar). La composición se muestra en la Tabla III. Dicho agar en su cantidad medida se disuelve en agua destilada, la cual ha sido previamente esterilizada en autoclave durante 15 minutos a una temperatura de 121°C. La solución se lleva a ebullición, y seguidamente se deja enfriar a 50°C en el baño termostático hasta su utilización. Las especies de *Salmonella* que son productoras de sulfuro de hidrógeno desarrollan colonias con centro oscuro.

Tabla III . Composición SS agar

| Ingredientes | Concentración (g/l) |
|---------------------|---------------------|
| Extracto de carne | 5,0 |
| Peptona | 5,0 |
| Lactosa | 10,0 |
| Sales biliares | 5,6 |
| Citrato de sodio | 10,0 |
| Tiosulfato de sodio | 8,5 |
| Citrato férrico | 1,0 |
| Verde brillante | 0,00033 |
| Rojo neutro | 0,025 |
| Agar | 15,0 |

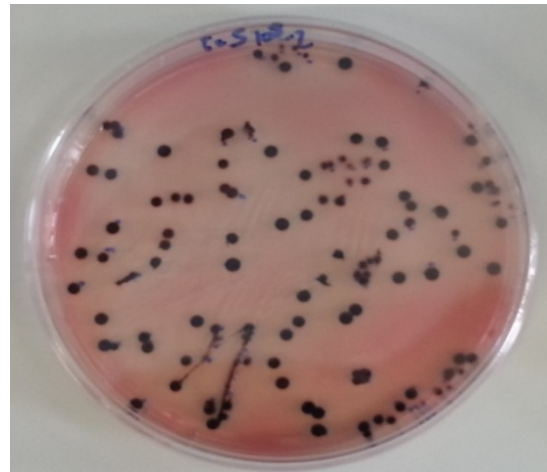


Figura IV. Aspecto colonias *Salmonella sp.* en SS agar.

IV.II.iv. Agar Cetrimida

Para el análisis y crecimiento de las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* se utiliza el medio de cultivo agar Cetrimida, cuya composición se muestra en la Tabla IV. Una vez medida la cantidad de agar necesario, este se disuelve en agua destilada, la cual contenga 10 ml de glicerina por cada litro de agua destilada, y se lleva a ebullición. La solución resultante se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a una temperatura de 121°C y seguidamente se deja enfriar a 50°C en el baño termostático hasta su utilización.

Tabla IV. Composición agar Cetrimida.

| Ingredientes | Concentración (g/l) |
|---------------------|---------------------|
| Gelatina de peptona | 20,0 |
| Cloruro de magnesio | 1,4 |
| Sulfato de potasio | 10,0 |
| Cetrimida | 0,3 |
| Agar | 13,6 |

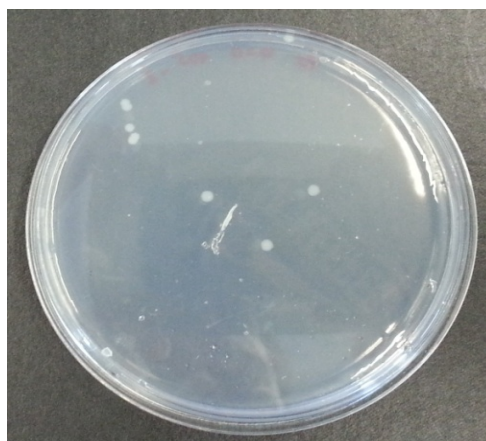


Figura V. Aspecto colonias *Pseudomonas aeruginosa* en agar Cetrimida.

IV.III. Métodos de siembra

IV.III.i. Método de filtración por membrana

La rampa de filtración es el instrumento básico para llevar a cabo este método de siembra.

En presencia de una atmósfera estéril proporcionada por un mechero Bunsen, mediante pinzas previamente flameadas, se coloca un filtro de membrana estéril (Millipore) de 0,45 μm de poro sobre el soporte de filtración. Tras adaptar el embudo, se humedece el filtro con una pequeña cantidad de suero fisiológico estéril, y se vierte la muestra previamente homogeneizada. Las muestras comprendidas entre 30 y 100 mL se añaden directamente al embudo de filtración, pero para las muestras entre 1 y 30 mL, se añade primero al embudo entre 20-30 mL de agua destilada y a continuación, la muestra a filtrar. La Figura VI muestra de forma esquemática dicho proceso de siembra por filtración.

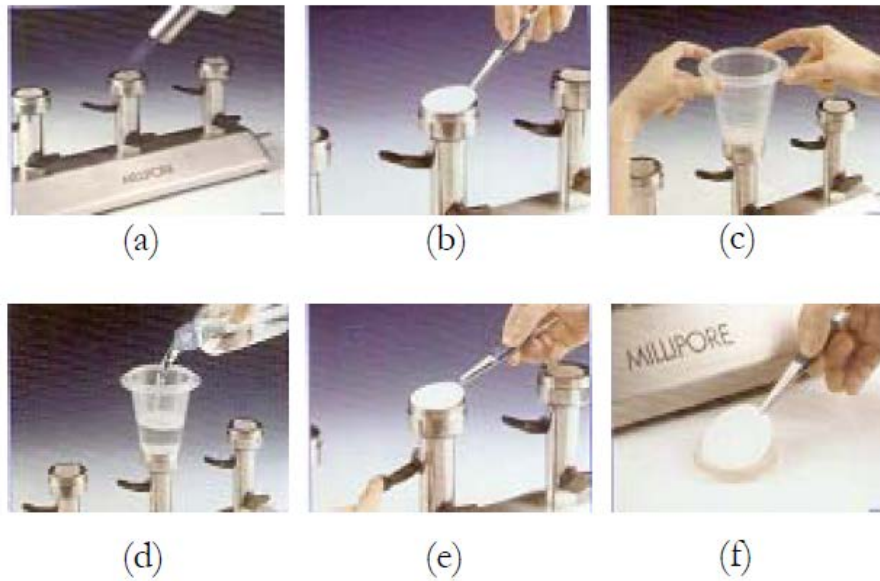


Figura VI. Método de filtración por membrana por pasos (*Millipore*).

IV.III.ii. Método de siembra en superficie

Este método se utiliza cuando la concentración bacteriana es elevada en el agua o cuando realizamos un cultivo a partir de extracto de mejillón cebra. Mediante una pipeta automática se coloca un pequeño volumen conocido de muestra (100 μL) en el centro de una placa de medio sólido. Con ayuda del asa de Digralesky se extiende la muestra uniformemente por la superficie del agar.

IV.IV. Incubación

Las placas una vez sembradas se invierten e introducen en las estufas de cultivo durante el tiempo y a la temperatura adecuada para cada tipo de análisis microbiológico.

IV.V. Recuento bacteriano

El recuento bacteriano parte de la suposición de que cada bacteria crece y se divide para producir una sola colonia, pero esto no es siempre cierto ya que una colonia puede ser el resultado de un agregado de colonias. Entonces en el recuento bacteriano es más correcto hablar de uniones formadoras de colonias (UFC) [Gamazo et al., 2005], ya que a menudo una colonia no se produce como resultado de una única bacteria.

Es importante que el número de colonias que aparecen en las placas no sea demasiado grande, pues algunas colonias se pueden fusionar dando estimaciones erróneas. También se debe evitar que el número de colonias sea demasiado bajo para que el cálculo sea estadísticamente significativo. En el método de filtración de membrana se cuentan las placas cuyo número de colonias se encuentra entre 20 y 200. En el método de siembra en superficie se cuentan las placas con un número de colonias entre 30 y 300 [Clesceri et al., 2005].

Tras seleccionar las placas con crecimiento adecuado, el recuento bacteriano se obtiene aplicando la ecuación I o II, donde F_d es el factor de dilución utilizado en las diluciones seriadas.

$$UFC/100 \text{ mL} = UFC/\text{mL muestra analizados} \cdot F_d \cdot 100 \text{ mL} \quad \text{[I]}$$

$$UFC/\text{mL} = UFC/\text{mL muestra analizados} \cdot F_d \quad \text{[II]}$$

Los resultados obtenidos se expresan en UFC/100 mL ó UFC/mL.

IV.VI. Procedimiento experimental de fortificación bacteriana de muestras

Las cepas de *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp. y *Salmonella* sp., provienen del stock del grupo de investigación de Calidad y Tratamiento de Aguas. La fortificación bacteriana de las muestras de agua del acuario para su utilización en el estudio de la capacidad de acumulación bacteriana en *Dreissena polymorpha*, se realiza sobre las muestras una vez autoclavadas. Las cepas se conservan a -20°C [Gamazo et al., 2005]. Una vez descongeladas, se toma un inóculo de la cepa bacteriana que se quiere estudiar con el asa de siembra y se realiza un aislamiento en superficie por agotamiento (Figura VII) en agar nutritivo (Scharlau), cuya composición se muestra en la Tabla V. Las placas se incuban a 37°C durante 48 horas en aerobiosis con el fin de disponer de un cultivo bacteriano joven y abundante.

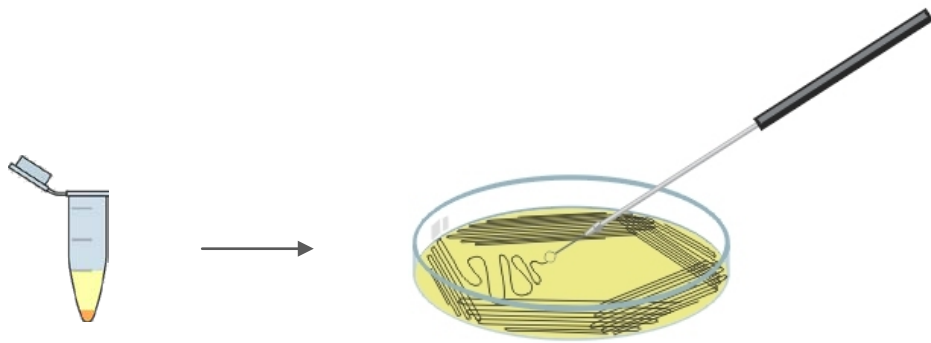


Figura VII. Técnica de aislamiento en superficie por agotamiento.

El agar nutritivo no es un tipo de agar selectivo, por lo que en él puede crecer cualquier tipo de bacterias. Es importante observar las colonias tras la incubación para ver si el cultivo de la bacteria es homogéneo y no se ha producido ninguna contaminación externa.

Tabla V. Composición agar nutritivo.

| Ingredientes | Concentración (g/l) |
|----------------------|----------------------------|
| Extracto de carne | 1,0 |
| Extracto de levadura | 2,0 |
| Peptona | 5,0 |
| Cloruro de sodio | 5,0 |
| Agar | 15,0 |

Una vez finalizado el periodo de incubación se prepara una suspensión bacteriana transfiriendo las colonias a un tubo con suero fisiológico esterilizado (NaCl 0'9%). La cantidad de bacterias presentes en el suero se calcula en relación a la turbidez que presenta esta suspensión. Una vez alcanzada la turbidez deseada, se adiciona la suspensión de bacterias a la muestra de agua del acuario, ya esterilizada. Se preparan dos tubos con diferente turbidez para alcanzar diferentes concentraciones bacterianas en las muestras de agua del acuario. Se consigue obtener una muestra con una concentración de 10^5 - 10^6 UFC/mL y otra muestra con una concentración de 10^3 - 10^4 UFC/mL.

ANEXO V. Resultados

V.I. Resultados de parámetros físico-químicos de control en el acuario

Las Figuras VIII-XIII muestran los resultados de control y mantenimiento de los distintos parámetros físico-químicos del agua del acuario, para un correcto crecimiento de los mejillones cebra mantenidos en el mismo.

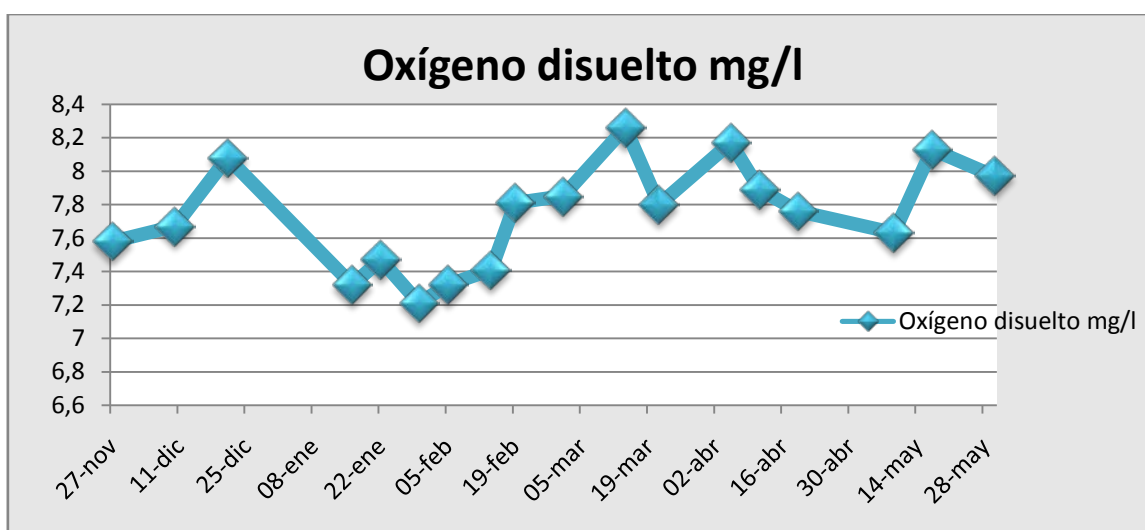


Figura VIII. Valores de oxígeno disuelto (mg O₂/l) en el agua del acuario a lo largo de la duración experimental del proyecto.

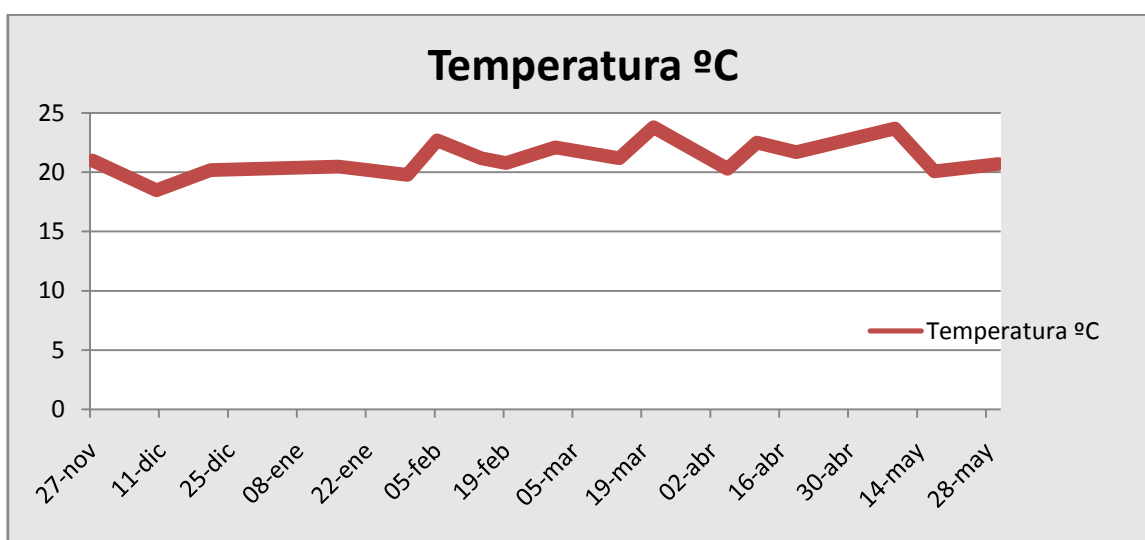


Figura IV. Valores de temperatura (°C) en el agua del acuario a lo largo de la duración experimental del proyecto.

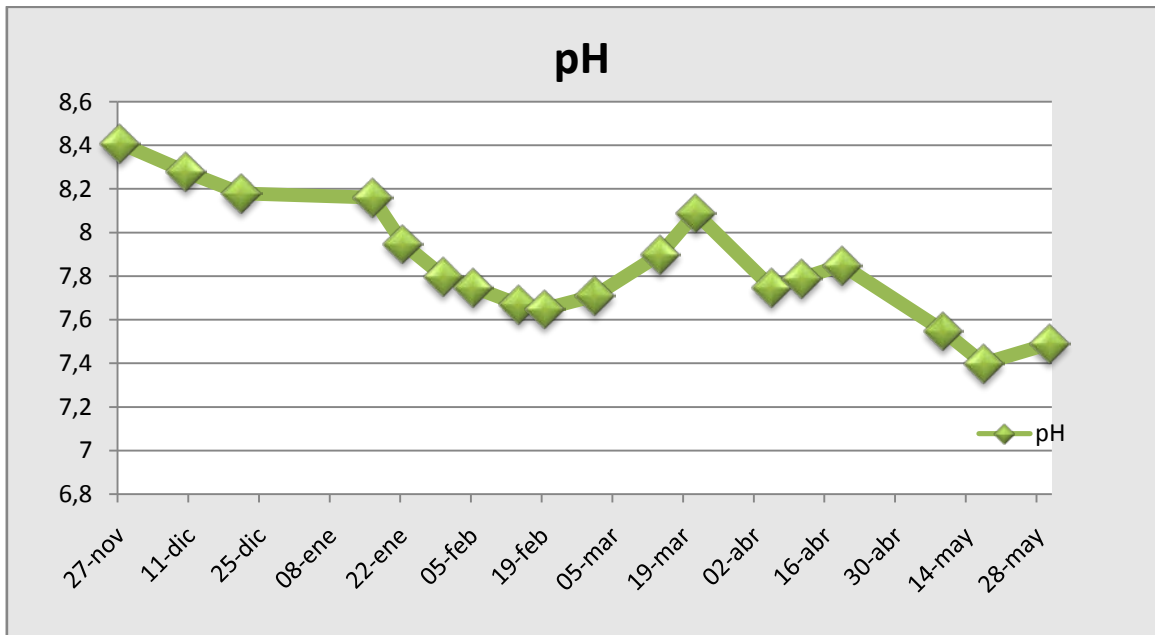


Figura X. Valores de pH en el agua del acuario a lo largo de la duración experimental del proyecto.

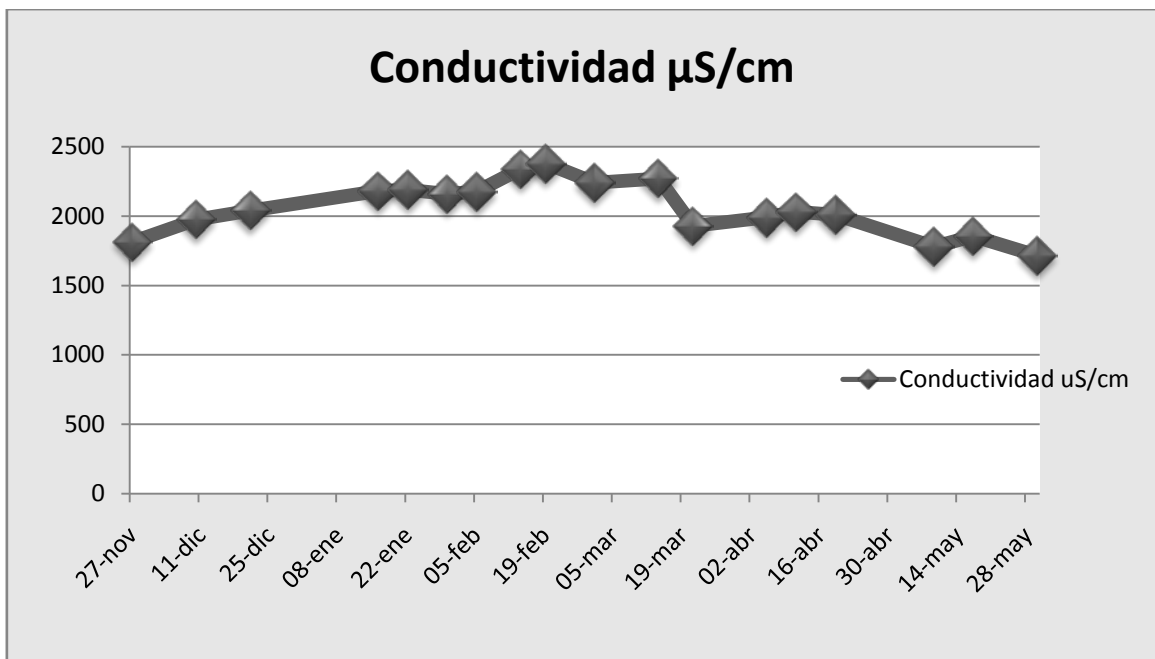


Figura XI. Conductividad (μS/cm) en el agua del acuario a lo largo de la duración experimental del proyecto.

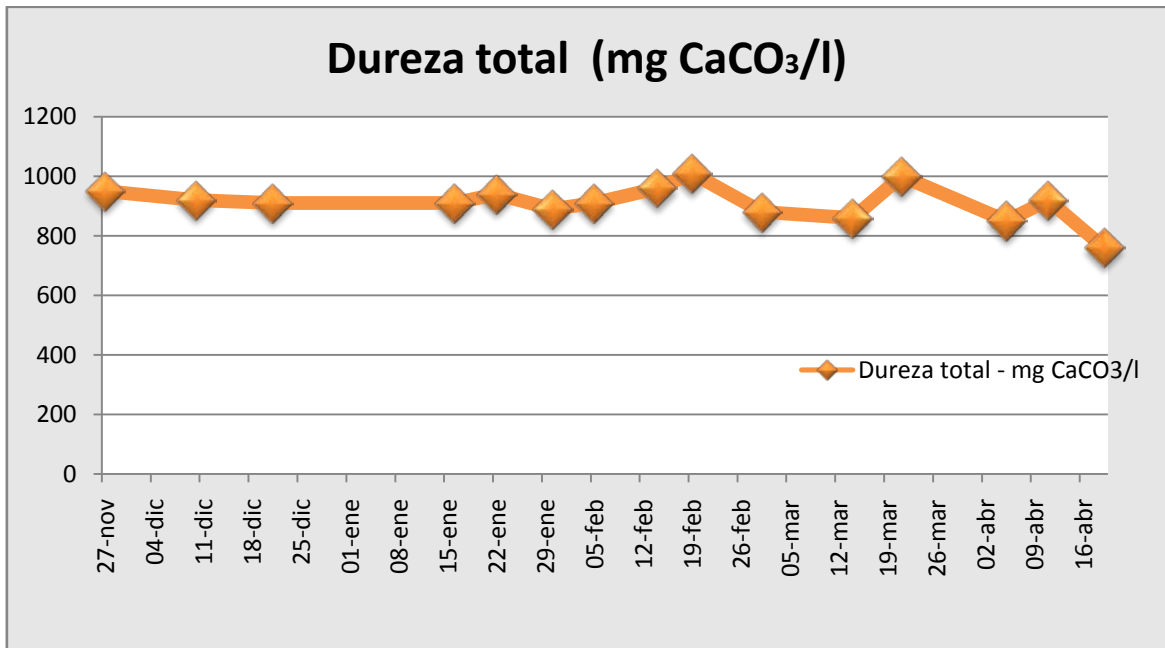


Figura XII. Dureza total (mg CaCO₃/l) en el agua del acuario a lo largo de la duración experimental del proyecto.

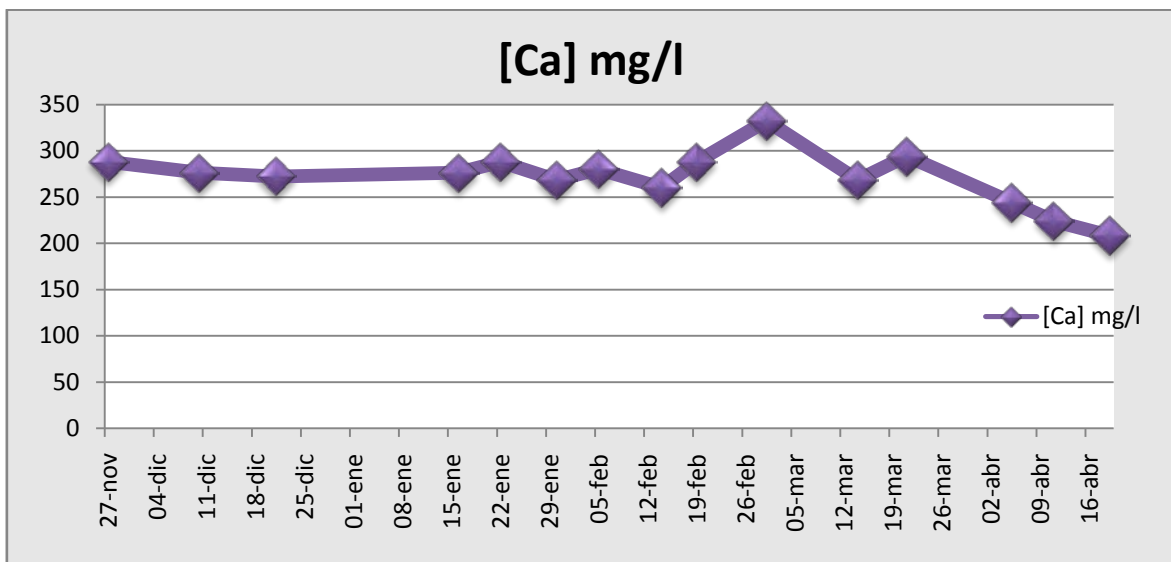


Figura XIII. Concentración de calcio (mg Ca/l) en el agua del acuario a lo largo de la duración experimental del proyecto.

V.II. Imágenes de los resultados de acumulación bacteriana

V.II.i. *Escherichia coli*

La Figura XIV muestra la imagen de reducción de bacterias de *E.coli* en el agua de un experimento estudio de acumulación bacteriana por mejillones cebra. Las placas están cultivadas con una misma dilución en tiempos de experimentación distintos. Se puede ver claramente una disminución considerable en el número de UFC de la bacteria a estudiar a las 10 horas de experimento estudio.

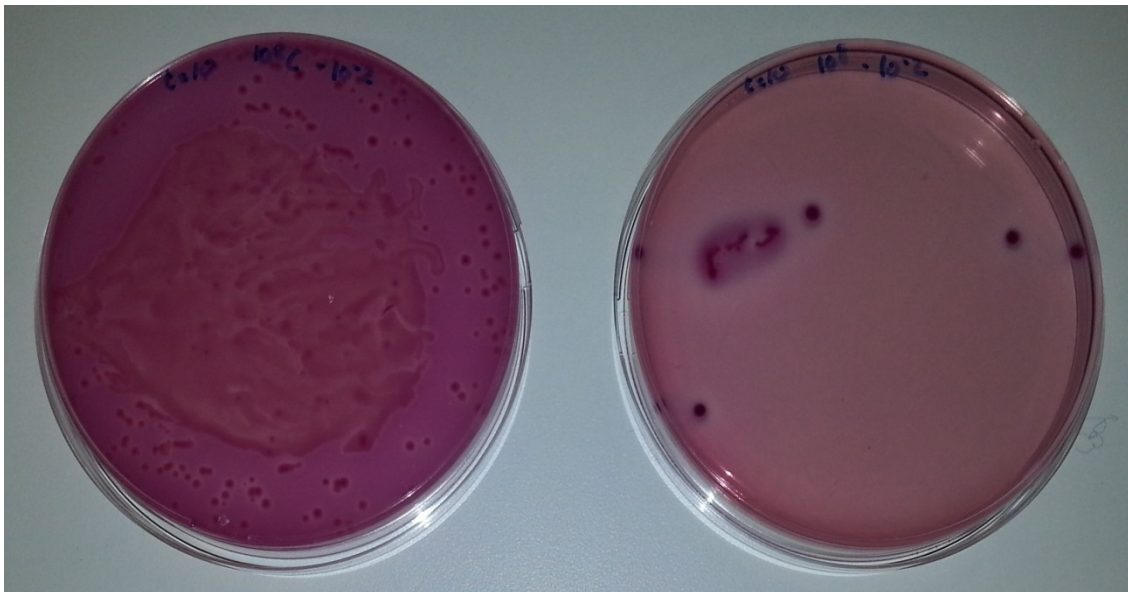


Figura XIV. Disminución de la cantidad de bacterias de *E.coli* en el agua de experimentación, entre las 0 horas y las 10 horas, provocado por la capacidad de acumulación bacteriana de los mejillones cebra.

V.II.ii. *Enterococcus* sp.

En la Figura XV se visualiza la reducción de enterococos en el agua de un experimento estudio de acumulación bacteriana por mejillones cebra, donde las placas de Petri están inoculadas con la misma dilución experimental y a tiempos distintos.

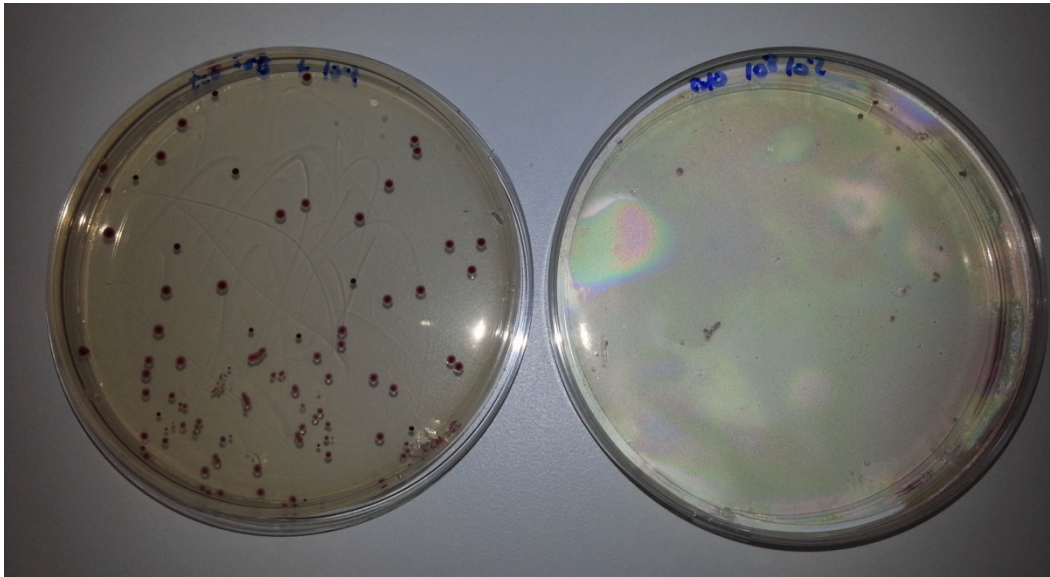


Figura XV. Disminución de la cantidad de bacterias de *Enterococcus sp.* en el agua de experimentación, entre las 0 horas y las 10 horas, provocado por la capacidad de acumulación bacteriana de los mejillones cebra.

V.II.iii. *Salmonella sp.*

En la Figura XVI se observa la reducción de *Salmonella sp.* en el agua de un experimento estudio de acumulación bacteriana por mejillones cebra, donde las placas de Petri están inoculadas con la misma dilución experimental y a tiempos distintos. Se observa una tremenda reducción de bacterias ocasionada por la acumulación de los mejillones cebra y por la muerte de dichas bacterias que son muy sensibles al ambiente acuático en el que se ha desarrollado el experimento.



Figura XVI. Disminución de la cantidad de bacterias de *Salmonella sp.* en el agua de experimentación, entre las 0 horas, las 5 horas y las 24 horas, provocado por la capacidad de acumulación bacteriana de los mejillones cebra y la muerte natural de las bacterias en el medio de experimentación.

