



Proyecto Fin de Carrera

Papel de *Dreissena polymorpha* (mejillón cebra) como reservorio de microorganismos potencialmente patógenos y metales en el ecosistema de la cuenca hidrográfica del Ebro y su riesgo para la salud y el medio ambiente

Autora

María Benito Fernández

Directora y ponente

Pilar Goñi Cepero

M^a Peña Ormad Melero

Escuela de Ingeniería y Arquitectura

2015

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero dar las gracias a los pilares fundamentales de este proyecto sin los que este trabajo no se podría haber llevado a cabo. Gracias a la Dra. Peña Ormad por su atención y consejos pero sobre todo por confiar en mí al brindarme la oportunidad de realizar este proyecto. A la Dra. Pilar Goñi por todo lo que he aprendido de ella, por su apoyo y ayuda dentro y fuera de este proyecto; gracias por todo el ánimo y cariño que he recibido estos meses sin los que el trabajo diario hubiese resultado mucho más duro. Agradecer también la colaboración de la Dra. Rosa Mosteo.

Agradecer también a la Universidad de Zaragoza por la financiación de este trabajo a través del Proyecto de Investigación “Evaluación del estado ecológico de las masas de agua mediante el uso del mejillón cebrado como indicador biológico (JIUZ2013-TEC-14)”

A Tragsa y concretamente a Munia Lanao y todas las personas que han colaborado en la toma de muestras por su disponibilidad siempre que las he necesitado.

A Jesús Abadías por sus consejos en mis inicios en este proyecto.

A Dra. Elena Sánchez Yangüela del Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Lozano Blesa por su colaboración en la identificación de bacterias.

Al Dr. Gómez-Lus y al Dr. Antonio Clavel por sus instructivas y siempre bienvenidas charlas científicas. A todos los compañeros y técnicos de laboratorio del Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, de los que he aprendido mucho, en especial a Maite y Joanna, por la ayuda recibida siempre que la he necesitado.

A mis compañeros del laboratorio de Calidad y Tratamiento de Aguas por hacer que el tiempo en el laboratorio fuera tan agradable, especialmente a Silvia, Pilar y Noelia por su apoyo y dedicación.

A mis compañeros de carrera por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos, y a mis amigas por estar siempre ahí y hacerme desconectar en los momentos más oportunos.

Sobre todo gracias a mi familia, en especial a mis padres y mi hermana por apoyarme, sin juzgarme, como siempre lo han hecho y darme ánimos para no rendirme y seguir adelante. Sencillamente, gracias por todo, sin vosotros probablemente hubiese tirado la toalla hace tiempo. Gracias a mi tía Paci por sus consejos y por todo lo que me ha ayudado estos años, y a Pablo por conseguir sacarme siempre una sonrisa y comprenderme ni cuando yo misma lo hago.

Papel de *Dreissena polymorpha* (mejillón cebra) como reservorio de microorganismos potencialmente patógenos y metales en el ecosistema de la cuenca hidrográfica del Ebro y su riesgo para la salud y el medio ambiente

RESUMEN

Dreissena polymorpha es actualmente una Especie Exótica Invasora en plena expansión. También denominado mejillón cebra, es un molusco bivalvo de agua dulce que se alimenta por filtración del agua natural donde habita, incorporando así en su interior diversos contaminantes químicos y biológicos presentes en el medio. Es originario de la región Ponto-cáspica, pero gracias a su capacidad de dispersión y colonización, favorecida también por la acción humana, se ha extendido a diversas zonas de América del Norte y Europa, entre ellas, la cuenca hidrográfica del Ebro, causando importantes desequilibrios medioambientales allí donde se instala.

Numerosos estudios muestran que *D. polymorpha* retiene y concentra en su interior contaminantes químicos y microbianos presentes en el agua, lo que permite su utilización como bioindicador. Sin embargo, esta capacidad también supone un riesgo ambiental y sanitario al actuar como reservorio de microorganismos patógenos y contaminantes. El presente proyecto pretende evaluar estos efectos; de esta manera, el principal objetivo consiste en avanzar en el conocimiento sobre la integración del mejillón cebra en los ecosistemas donde se fija y analizar también, su papel como indicadores de presencia de metales tóxicos y microorganismos potencialmente patógenos en las aguas.

Para analizar el efecto de la contaminación microbiana, se examina la posible acumulación en *D. polymorpha* de bacterias indicadoras de contaminación fecal (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp. y *Clostridium perfringens*). Los resultados demuestran que sí existe acumulación en el interior del bivalvo, y que ésta depende de factores como el tamaño o facilidad de metabolización. Se observa relación entre la concentración bacteriana en el tejido de molusco y la del agua, aunque esta no es directa e igual en todas las bacterias, observándose las mayores diferencias en *E. coli*.

Con esta misma finalidad, se identifican, mediante técnicas de biología molecular, las Amebas de Vida Libre (AVL) y otros protozoos presentes en las aguas superficiales y acumuladas en el mejillón cebra, así como de las bacterias patógenas endosimbiontes de estas AVL. En relación a estos análisis, no se detecta ni *Cryptosporidium* spp. ni *Giardia duodenalis* en ninguna de las muestras, pero sí AVL, sin que exista correspondencia entre los géneros encontrados en el agua y los del mejillón. En los análisis de bacterias endosimbiontes se encuentra que el 50% de las AVL aisladas presentan en su interior *Legionella* spp. y el 40% *Pseudomonas* spp. a las que protege de los desinfectantes más utilizados, permitiendo incluso que se reproduzcan en su interior.

Para análisis de su papel como indicadores de presencia de metales tóxicos, se estudia su acumulación en *D. polymorpha*, observándose que existe correspondencia entre los metales más presentes en cada zona por la actividad que allí desarrollada y la obtenida en el interior del mejillón. Al no existir prácticamente eliminación de metales tóxicos en el mejillón cebra, se pueden conocer las sustancias que se vierten o se han vertido con anterioridad quedando retenidas en su interior y presentando concentraciones mucho más elevadas en su tejido que las encontradas en el agua tras realizar un estudio de calidad de la misma en cada punto de muestreo de acuerdo a la a La Orden del 11 Mayo de 1988 relativa a las aguas prepotables.

Este proyecto de investigación se ha realizado conjuntamente entre el Grupo de Investigación de "Protozoosis entéricas de interés económico y sanitario" perteneciente al Dpto. 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 Dpto. de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza. El trabajo forma parte del Proyecto de Investigación "Evaluación del estado ecológico de las masas de agua mediante el uso del mejillón cebra como indicador biológico (JIUZ2013-TEC-14)" financiado por la Universidad de Zaragoza.

Índice

1.	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
2.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	5
2.1.	Muestras de agua superficial y mejillón cebra.....	5
2.2.	Mantenimiento y cría en cautividad de <i>Dreissena polymorpha</i>	5
2.3.	Análisis de bacterias indicadoras de contaminación fecal en el agua	7
2.4.	Análisis de bacterias indicadoras de contaminación fecal en <i>Dreissena polymorpha</i> ..	9
2.4.1.	Obtención del extracto.....	9
2.4.2.	Análisis de bacterias	9
2.5.	Aislamiento y cultivo de AVL presentes en <i>Dreissena polymorpha</i> y agua natural. Identificación morfológica	10
2.6.	Identificación de microorganismos potencialmente patógenos mediante técnicas de Biología Molecular	11
2.6.1.	Extracción de ADN.....	11
2.6.2.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	11
2.6.3.	Electroforesis en gel de agarosa y visualización.....	11
2.6.4.	Purificación del producto de PCR y visualización	12
2.6.5.	Secuenciación	12
2.7.	Identificación y genotipificación de microorganismos potencialmente patógenos en <i>Dreissena polymorpha</i> y agua natural	13
2.7.1.	Identificación de protozoos en <i>Dreissena polymorpha</i>	13
2.7.2.	Identificación de bacterias endosimbiontes en el interior de AVL	14
2.8.	Estudio de la calidad del agua en los puntos de muestreo	15
2.9.	Metodología analítica de metales en <i>Dreissena polymorpha</i>	16
3.	RESULTADOS	17
3.1.	Mantenimiento y cría en cautividad de <i>Dreissena polymorpha</i>	17
3.2.	Cuantificación e identificación de bacterias indicadoras de contaminación fecal en <i>Dreissena polymorpha</i> y aguas naturales	18
3.3.	Identificación de Amebas de Vida Libre	20
3.3.1.	Identificación morfológica.....	20
3.3.2.	Identificación genética	23
3.4.	Identificación de bacterias endosimbiontes en el interior de AVL	24
3.5.	Identificación de <i>Giardia duodenalis</i> y <i>Cryptosporidium</i> spp.....	26
3.6.	Estudio de la calidad del agua en los puntos de muestreo	26
3.7.	Acumulación de metales en <i>Dreissena polymorpha</i>	27
3.8.	Relación entre todos los parámetros estudiados	30
4.	DISCUSIÓN.....	33

5. CONCLUSIONES	45
6. BIBLIOGRAFÍA.....	47
ANEXO A. <i>DREISSENA POLYMORPHA</i>	55
ANEXO B. MICROORGANISMOS POTENCIALMENTE PATÓGENOS OBJETO DE ESTUDIO.....	59
ANEXO C. CARACTERÍSTICAS DE LOS PUNTOS DE MUESTREO.....	63
ANEXO D. METODOLOGÍA ANALÍTICA FÍSICO-QUÍMICA DE MANTENIMIENTO Y CRÍA EN CAUTIVIDAD DE <i>D. POLYMORPHA</i>	67
ANEXO E. DETECCIÓN Y RECUENTO DE BACTERIAS INDICADORAS DE CONTAMINACIÓN FECAL	69
E.1. Procedimientos normalizados	69
E.2. Diluciones seriadas.....	69
E.3. Medios de cultivo.....	70
E.3.1. Medio <i>Clostridium perfringens</i>	70
E.3.2. Medio <i>Enterococcus sp</i>	71
E.3.3 Medio <i>Escherichia coli</i>	72
E.3.4. Medio <i>Salmonella</i>	72
E.4. Métodos de siembra	73
E.4.1. Método de filtración por membrana para <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus spp.</i> y <i>Salmonella spp.</i>	73
E.4.2. Método de filtración por membrana para <i>Clostridium perfringens</i>	74
E.4.3. Método de siembra en superficie	74
E.5. Incubación.....	75
E.5.1. Incubación <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus spp.</i> y <i>Salmonella spp.</i>	75
E.5.2. Incubación <i>Clostridium perfringens</i>	75
E.6. Recuento de bacterias	75
ANEXO F. IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS POTENCIALMENTE PATÓGENOS MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	77
F.1. Extracción de ADN.....	77
F.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	78
F.3. Electroforesis en gel de agarosa	79
F.3.1. Preparación del gel de agarosa.....	79
F.3.2. Electroforesis	80
F.4. Purificación de ADN	81
F.5. Condiciones de la PCR para la identificación y genotipificación de <i>Acanthamoeba spp.</i>	81
F.6. Condiciones de la PCR para la identificación de AVL	82
F.7. Condiciones de la PCR para la identificación y genotipificación de <i>Naegleria spp.</i>	82
F.8. Condiciones de la PCR para <i>EUKARIOTAS</i>	83

F.9. Condiciones de la PCR para la identificación de <i>Cryptosporidium</i> spp.	84
F.10. Condiciones de la PCR para la identificación de <i>Giardia duodenalis</i>	85
F.11. Condiciones de la PCR para la identificación de microorganismos patógenos albergados en el interior de las AVL	86
ANEXO G. ESTUDIO DE LA CALIDAD DEL AGUA.....	89
ANEXO H. RESULTADOS.....	95
H.1. Mantenimiento y cría en cautividad de <i>Dreissena polymorpha</i>	95
H.2. Estudio de la calidad del agua en los puntos de muestreo	97
H.2.1. Embalse de La Sotonera	98
H.2.2. Embalse de Flix.....	101
H.2.3. Embalse de Sobrón	104
H.2.4. Acequia de Rimer (Caspé)	108
H.3. Acumulación de metales en <i>Dreissena polymorpha</i>	111

MEMORIA

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La expansión de las especies exóticas invasoras (EEI) se considera un grave problema ecológico, ya que su proliferación constituye una de las principales causas de pérdida de biodiversidad en el mundo (Ferrerías et al., 2008). Además, ocasiona graves perjuicios a la economía, afectando especialmente a la producción agrícola, ganadera y forestal, e incluso a la salud pública (RD 630/2013). Esta expansión se ha visto favorecida debido al aumento del tráfico intra e intercontinental de barcos.

El RD 630/2013, por el que se regula el Catálogo español de EEI, define especie exótica invasora como aquella especie exótica que se introduce o establece en un ecosistema o hábitat natural o seminatural, y que es un agente de cambio y amenaza para la diversidad biológica nativa, ya sea por su comportamiento invasor, o por el riesgo de contaminación genética.

Con el fin de prevenir, minimizar y mitigar los impactos de las EEI, la UE publica el 22 de octubre de 2014 el Reglamento 1143/2014 sobre la prevención y la gestión de la introducción y propagación de especies exóticas invasoras, donde se define por primera vez el término “especie exótica invasora preocupante para la Unión” como una especie exótica invasora cuyos efectos adversos sean tales que requieren una acción concertada a escala de la Unión; la lista que recoge estas especies ha de ser actualizada periódicamente y adoptada a más tardar el 2 de enero de 2016.

Entre los 100 invasores más peligrosos, según la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza), se encuentra el mejillón cebra, científicamente llamado *Dreissena polymorpha* (Durán et al., 2007). La introducción de esta EEI en España es de origen desconocido, aunque todo parece apuntar a un mal uso de las prácticas recreativas en el agua; desde entonces, se ha producido una rápida expansión del bivalvo que resulta alarmante. Gracias a su alta capacidad reproductora, colonizadora y de filtración se ha adaptado rápidamente a los hábitats acuáticos de la cuenca del Ebro, invadiendo gran parte de la misma.

La rápida explosión demográfica que experimenta *D. polymorpha* supone una amenaza a los ecosistemas fluviales, ya que es un agente de cambio ecológico radical, modificando los hábitats donde se instala y provocando también graves problemas socioeconómicos a corto y medio plazo, pues produce graves problemas como el taponado de tuberías de abastecimiento. En el Anexo A, se describe de forma más detallada la introducción y presencia de este molusco en España, su ciclo de vida y los daños que produce en los lugares que invade.



Figura 1-1 Fijación adultos de *D. polymorpha* en la zona dorsal de una larva de libélula (Durán et al., 2009)

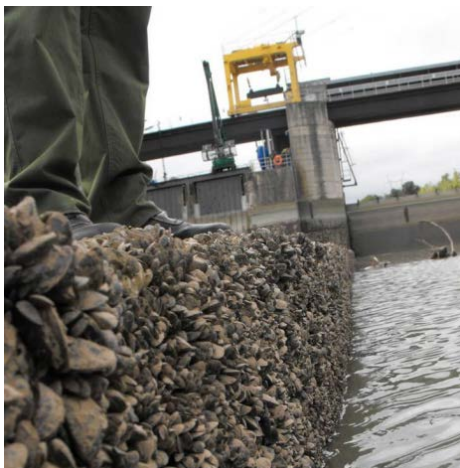


Figura 1-2 Fijación *D. Polymorpha* en instalaciones Archivo fotográfico CHE).

En la Figura 1-1 y Figura 1-2, se muestran algunos de los problemas ocasionados por el anclaje de estos moluscos.

En los ecosistemas de agua dulce, *Dreissena polymorpha* se ha convertido, debido a su elevada actividad filtradora, en un organismo interesante para evaluar la contaminación del medio ambiente. Debido a factores como su relativa larga vida útil, la abundancia de la especie y facilidad de recolección, su capacidad de bioacumulación productos químicos y su resistencia a una amplia gama de tipos de contaminación, se ha impulsado en los últimos años la utilización del mejillón para este fin (por ejemplo, Voets et al., 2009; Camusso et al. 2000); más aún si se tiene en cuenta que se trata de organismos sedentarios que proporcionan, por tanto, información de la contaminación de un sitio específico.

Pero esta elevada concentración de metales pesados y otros contaminantes químicos encontrada en ocasiones en el mejillón cebra, suponen también un grave problema, ya que el bivalvo forma parte de la dieta de varios cangrejos, aves acuáticas y peces, de manera que contribuyen a la biodisponibilidad, transferencia trófica y por lo tanto, la redistribución de contaminantes debido a que la capacidad de desplazamiento de los niveles tróficos superiores (Alcaraz et al., 2010).

Actualmente, las normas de calidad ambiental en el ámbito de política de aguas está regulada en España por el RD 60/2011, cuya finalidad es trasponer todos los aspectos contenidos en la Directiva 2008/105/CE e incorporar los requisitos técnicos sobre análisis químicos en esta materia establecidos en la Directiva 2009/90/CE. Este RD recoge una lista de Sustancias Prioritarias (Anexo I) y otra de Preferentes (Anexo II) y las normas de calidad ambiental (NCA) de cada una de ellas en el agua, pero no en biota; ofreciendo la posibilidad de aplicar las NCA a biota (peces, moluscos, crustáceos y otra biota) siempre que se ofrezca el mismo grado de protección que en las NCA referidas al agua.

La publicación de la Directiva 2013/39/UE por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE, amplía la lista de sustancias prioritarias y establece por primera vez NCA de la biota, ya que algunas sustancias muy hidrófobas se acumulan en biota y son difícilmente detectables en agua. Para estas sustancias, entre las que se encuentra el mercurio y sus compuestos, deben establecerse NCA en biota, referidas en general a peces aunque se pueden proponer taxones de biota como el subfilum Crustacea, parafilum “peces”, clase Cephalopoda o clase Bivalvia (mejillones y almejas) si ofrecen un nivel de protección equivalente y cumplen lo establecido en la Directiva 2009/90/CE; en alguna de las sustancias

prioritarias (fluotareno, HAP, dioxinas y compuestos similares) las NCA se refieren a crustáceos y moluscos.

Su próxima adaptación a la legislación española y del resto de Estados miembros, incrementa el interés por el conocimiento de estas especies y su comportamiento ante dichas sustancias, para su utilización con este fin.

En contraposición, el estudio del mejillón cebra como indicadores de calidad microbiológica del agua no está tan extendida, a pesar de que en los últimos años, se ha hecho evidente que muchas especies de bivalvos filtradores, entre los que se incluye *D. polymorpha*, pueden albergar parásitos protozoarios derivados del medio ambiente como resultado de concentrarlos de la columna de agua (McLaughlan et al., 2013; Graczyk et al., 2001, 2003).

Este hecho ha promovido la realización de un reciente estudio (Palos Ladeiro et al., 2014) en el que se prueba que *D. polymorpha* es una nueva herramienta para la detección de la contaminación del agua por protozoos, ya que los resultados obtenidos de sus análisis de acumulación de *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis* y *Toxoplasma gondii*, ponen de manifiesto la capacidad de los mejillones cebra para revelar la contaminación biológica ambiental, y por tanto para ser utilizado como una nueva herramienta eficaz en la vigilancia biológica sanitaria de las masas de agua.

También se han llevado a cabo varios trabajos acerca de la acumulación de algunas bacterias indicadoras de contaminación fecal en el mejillón cebra, Vathanodorn et al. analizan en 1997 la acumulación de *E. coli*, *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. en el bivalvo; en 1995 Silverman et al., analizan el comportamiento del bivalvo frente a varias bacterias, entre las que se encuentra *E. coli*; además los grupos de investigación “Protozosis entéricas de interés económico y sanitario” y “Calidad y Tratamiento de Aguas” han realizado otros estudios que examinan a lo largo de 24 horas la acumulación de *Pseudomonas* spp., *Enterococcus* spp., *Salmonella* spp. y *E. coli* en *D. polymorpha* en función de la concentración bacteriana (Abadías et al., 2013; Ugarteburu et al., 2013). Sin embargo, no se ha investigado, hasta donde se conoce, la acumulación de otra importante bacteria indicadora de contaminación fecal como es *Clostridium perfringens*.

Tampoco se ha encontrado ningún trabajo sobre detección e identificación de Amebas de Vida Libre (AVL) en bivalvos, a pesar de la elevada presencia de estos protozoos en el agua. Las AVL han sido descritas como parásitos oportunistas, alcanzando en las últimas décadas gran importancia por su capacidad para producir enfermedades en el hombre, sobre todo en aquellos con inmunodeficiencia. Entre las más de 15.000 especies descritas en el grupo protista ameboide, únicamente algunos pocos de estos géneros y especies han sido descritos hasta la fecha como causantes de enfermedades en el hombre, entre ellos *Acanthamoeba*, *Naegleria fowleri*, *Hartmanella*, *Paravahlkampfia*, *Balamuthia* y *Sappinia* (Fernández et al., 2014). A pesar de este bajo número de géneros y especies patógenas, no hay que olvidar que el hecho de que las AVL tengan a las bacterias como base nutricional, en ocasiones puede suponer un riesgo para el medio ambiente y la salud pública, ya que existen bacterias, como *Legionella* spp. o *Mycobacterium* spp., denominadas como “Bacterias Resistentes a la Depredación de las Amebas (ARB)”; sobre las que las AVL realizan una función protectora frente a cambios ambientales, desinfectantes, etc. actuando como vectores de transmisión de las mismas y dando lugar a lo que algunos autores han denominado como “Trojan horse” (caballo de Troya).

Los trabajos de investigación hasta la fecha realizados sobre el poder bioacumulador de *Dreissena polymorpha*, se centran generalmente en el análisis de su comportamiento frente a diferentes contaminantes y sustancias peligrosas. En los últimos años, también se han llevado a cabo estudios sobre la acumulación microbiológica en el interior del mejillón cebrado, pero estos análisis son, por ahora, mucho menos numerosos y aún queda mucho por investigar. Sin embargo, no se han realizado análisis conjuntos de contaminación de metales y microbiológica, que permita conocer de forma global el comportamiento del mejillón, su papel en la Salud Pública y su utilidad como bioindicadores. y compararlo con la calidad del agua del lugar donde se localizan

El objetivo principal de este proyecto plantea dos vertientes: por un lado avanzar en el conocimiento acerca de cómo se integra el mejillón cebrado en los ecosistemas en los que se asienta, en relación con los microorganismos que allí se encuentran y por otra parte su posible papel como indicadores de presencia de metales tóxicos y microorganismos potencialmente patógenos en las aguas. A partir de aquí, se plantean los siguientes objetivos concretos:

- Investigar la posible acumulación de bacterias indicadoras de contaminación fecal en mejillones cebrados. Las bacterias a estudiar son *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp. y *Clostridium perfringens*.
- Identificar las AVL y otros protozoos presentes en las aguas superficiales y acumuladas en el mejillón cebrado, así como de las bacterias patógenas endosimbiontes de estas AVL, mediante técnicas de Biología Molecular (PCR, secuenciación y análisis de secuencias), estableciendo las posibles asociaciones entre ellas y el riesgo para la salud.
- Estudiar la posible acumulación de metales en *Dreissena polymorpha*.
- Estudio de la calidad del agua en los puntos de muestreo de acuerdo a la Orden del 11 Mayo de 1988 relativa a las aguas prepotables y su relación con los contaminantes potencialmente peligrosos detectados en el mejillón

En el Anexo B. se describen brevemente todos los microorganismos objeto de estudio en este proyecto.

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. El trabajo forma parte del Proyecto de Investigación "Evaluación del estado ecológico de las masas de agua mediante el uso del mejillón cebrado como indicador biológico (JIUZ2013-TEC-14)" financiado por la Universidad de Zaragoza.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1. Muestras de agua superficial y mejillón cebra

Las muestras de ejemplares de mejillón cebra y de agua superficial, proceden de distintos puntos de la cuenca hidrográfica del Ebro y fueron tomadas en primavera, 20 de marzo-3 de junio. Tres de ellas fueron proporcionadas por Tragsa (Empresa de Transformación Agraria, S.A.), y proceden del embalse de La Sotonera (Alcalá de Gurrea), muestra que se recibe congelada; el embalse de Sobrón (Burgos y Álava) y el embalse de Flix (Flix) que en este caso, la muestra llega sin agua. Una cuarta muestra se recogió en la acequia de Rimer (Caspe) por el grupo de Calidad y Tratamiento de Aguas, perteneciente al Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza. Dicho grupo dispone de autorización del INAGA para la recogida y tenencia de ejemplares vivos y muertos de mejillón cebra para la investigación. Las muestras se toman a mano y se introducen en un bote estéril de boca ancha, conservándolos en refrigeración hasta su introducción en el acuario.

Todos los equipos y materiales utilizados que estuvieron en contacto directa o indirectamente con el agua natural o ejemplares de *Dreissena polymorpha* durante recogida de muestras, han sido rigurosamente destruidos o desinfectados con hipoclorito de sodio (NaClO), con el fin de evitar contaminaciones o la proliferación de la especie.

Se recogieron alrededor de 50 ejemplares en cada toma de muestra. El número de mejillones procesados para el desarrollo experimental del presente proyecto está condicionado por el tamaño de los bivalvos en cada punto de muestreo, aunque en general se utilizan 5 ejemplares para análisis de bacterias indicadoras de contaminación fecal, 5 para la identificación de AVL y otros protozoos presentes en las aguas superficiales y acumuladas en el mejillón y 10 individuos para estudio de acumulación de metales.

En el Anexo C se indican más detalladamente las características de los cuatro puntos de muestreo así como las fechas de recogida de cada una de ellas.

2.2. Mantenimiento y cría en cautividad de *Dreissena polymorpha*

Con el fin de disponer de ejemplares de mejillón durante toda la experimentación llevada a cabo, se cuenta con un acuario situado en el laboratorio del grupo de investigación de "Calidad y tratamiento de aguas", perteneciente al Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías de Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza.

El acuario se coloca de manera que la iluminación sea natural, sin que lo alcancen directamente los rayos solares, de forma que los ejemplares de molusco tengan un desarrollo normal de su ciclo biológico, y evitar el aumento de temperatura y la eutrofización en su interior. El acuario consta de varias bombas de agua para la correcta circulación de esta en su interior, así como de dos bombas de aire que permiten que la cantidad de oxígeno disuelto sea la adecuada para el mantenimiento del mejillón cebra. Además, la presencia de filtros naturales de arena y piedras en el fondo permiten la depuración del agua. Otra bomba recoge el agua depurada del fondo y la envía a través de un tubo ascendente a la zona superficial del agua.



Figura 2-1 Acuario para el mantenimiento en cautividad de *Dreissena polymorpha*.

Los individuos de *Dreissena polymorpha* recogidos son introducidos en el interior del acuario, siendo los destinados al estudio de la presencia de microorganismos potencialmente patógenos utilizados inmediatamente. Con objeto de evitar una importante modificación de su nicho ecológico por la cloración del agua, el acuario se llena con agua superficial natural recogida en el Canal Imperial de Zaragoza, previamente esterilizada para eliminar aporte de microorganismos.

El procedimiento de este experimento, se basa en el control de los parámetros físico-químicos del agua en el interior del acuario, con el fin de asegurar que no se produzcan variaciones drásticas en los parámetros ambientales que principalmente influyen en el ciclo de vida del mejillón cebra y que éstos se mantengan dentro de unos rangos adecuados. En la Tabla 2-1 se recogen los parámetros físico-químicos que se analizan semanalmente, así como la metodología e instrumentación utilizada para ello.

Tabla 2-1 Métodos e instrumentos utilizados en el control de parámetros físico-químicos del agua en el interior del acuario.

Parámetro	Método normalizado	Metodología instrumental	Marca y modelo	Rango de media	Error
Oxígeno disuelto	5814:1990 (UNE - EN ISO)	Medida de oxígeno disuelto y temperatura	<i>HANNA Instruments</i> HI9146N	0,00-45,00 ppm	1,50%
Temperatura				0-50°C	± 0,2 °C
pH	SM 4500-HB (Standard Methos)	pH-metría	<i>CRISON</i> GLP 21	1-14	± 0,02
Conductividad	27888:1994 (UNE - EN ISO)	Conductimetría	<i>CRISON</i> Basic 21	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 se encuentran descritos de forma detallada en el Anexo D.

La Tabla 2-2 resume los valores de referencia de distintas variables de calidad del agua y de tipo hidráulico (O’Neill, 1996), necesarios para la vida de *Dreissena polymorpha* y que son muy similares a las recogidas por otros autores de referencia (Claudi and Mackie, 1994).

Tabla 2-2 Rangos de preferencia orientativos de *Dreissena* para distintos parámetros y variables según O’Neill (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)	0-22	<25	25-45	45-90	90-125	>125
pH	0-6,0	<6,5 >9,0	6,5-7,2 9,0	7,2-7,5 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	>100

El acuario se suplementa tres veces por semana con extracto del alga *Chlorella* deshidratada que sirve de alimento al mejillón cebra (1993).

2.3. Análisis de bacterias indicadoras de contaminación fecal en el agua

Los parámetros microbiológicos objeto de estudio son la identificación y cuantificación de las siguientes bacterias indicadoras de contaminación fecal y ambiental: *Clostridium perfringens*, *Enterococcus* spp., *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.

La descripción detallada de cada una de ellas se recoge en el Anexo E.

Los equipos utilizados en el laboratorio para la realización de dichos análisis, se recogen en la Tabla 2-3. Para su esterilización el material se se somete a 121°C y 1 bar de presión en autoclave, durante 15 minutos, lo que elimina cualquier microorganismo o forma esporulada de resistencia, permitiendo trabajar en condiciones estériles.

Tabla 2-3 Equipos utilizados durante la realización de análisis bacteriológicos.

Instrumento	Marca	Modelo	Función
Autoclave	J.P. Selecta	437-P	Esterilización del material
Baño termostático	J.P. Selecta	PRECISTEM 20 L	Mantenimiento del medio de cultivo a la temperatura adecuada
Estufas de cultivo	J.P. Selecta	INCUDIGIT 36 L	Cultivo bacteriológico
Rampa de filtración	Millipore	Sistema Microfil	Análisis microbiológico por filtración
Mechero bunsen			Crear atmósfera estéril
Jarra de anaerobiosis	Oxoid	AG25	Cultivo de bacterias anaerobias
Agitador Vortex	Velp Científica	ZX3	Mezcla de soluciones en tubos

Los distintos indicadores bacterianos de contaminación fecal y ambiental analizados en el agua de cada una de las muestras requieren unos procedimientos analíticos, medios de cultivo, métodos de siembra, tiempos y temperaturas de incubación adecuados al crecimiento cada bacteria, todos ellos se recogen en la Tabla 2-4.

Tabla 2-4 Análisis de indicadores bacterianos de contaminación fecal y ambiental.

Indicador bacteriano	Procedimiento analítico	Medio de cultivo	Método de siembra	Tiempo y temperatura de incubación
<i>Clostridium perfringens</i>	UNE-EN ISO 26461-2:1986	Agar SPS	Filtración por membrana	24 horas a 37°C
<i>Enterococcus spp.</i>	UNE-EN ISO 7899-2:2001	Slanetz & Bartley Agar (Scharlau)	Filtración por membrana y siembra en superficie	48 horas a 37°C
<i>Escherichia coli</i>	UNE-EN ISO 9308-1:2000	McConckey Agar (Scharlau)	Filtración por membrana y siembra en superficie	24 horas a 42°C
<i>Salmonella spp.</i>	UNE-EN ISO 19250	Salonella-Shigella Agar (Scharlau)	Filtración por membrana y siembra en superficie	48 horas a 37°C

La descripción detallada de los distintos procesos normalizados, medios de cultivo, diluciones decimales seriadas, métodos de siembra, incubación y recuento de bacterias se encuentra en el Anexo E.

2.4. Análisis de bacterias indicadoras de contaminación fecal en *Dreissena polymorpha*

Antes de realizar el análisis de bacterias, es necesario preparar un extracto homogéneo con los ejemplares de *Dreissena polymorpha*.

2.4.1. Obtención del extracto

El análisis de la contaminación bacteriológica en el mejillón cebra se realiza mediante la homogenización del tejido blando del mismo. El procedimiento consiste en la extracción del tejido interno del molusco junto con el agua intersticial, para ello se emplean pinzas y bisturí, de manera que se corta el biso y se desecha junto con las valvas. Estas partes se eliminan ya que debido a su dureza imposibilitarían la obtención de un extracto homogéneo. Una vez repetido el proceso con varios ejemplares, dependiendo su número del tamaño del bivalvo que es muy variable, se anota el peso de tejido junto con el medio acuoso interno de los mejillones y se homogeneiza mecánicamente en un recipiente de porcelana. Al producto homogeneizado, se le añade cierta cantidad, generalmente 10 mL, de PBS (Phosphate buffered saline) o tampón fosfato salino estéril (Scharlau).

El extracto obtenido se transfiere a un tubo para la realización de los distintos análisis.

La operación se realiza bajo atmósfera estéril, proporcionada por un mechero bunsen; además los materiales (pinzas, bisturí y recipiente de porcelana) se esterilizan previamente sometiéndolos a radiación con luz ultravioleta

2.4.2. Análisis de bacterias

A partir del extracto obtenido se realiza un recuento de bacterias en el interior del molusco. Las bacterias estudiadas en el tejido interno del mejillón cebra son: *Clostridium perfringens*, *Enterococcus* spp., *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.

Para la cuantificación de las bacterias contenidas en el interior del mejillón cebra se analiza el extracto obtenido de la misma forma que si fuere agua, es decir con los equipos y la metodología descritos en el apartado 2.3 y el Anexo E.

Los resultados se expresan en UFC/g de extracto de tejido de mejillón. Para ello, se calculan los gramos de mejillón y agua intersticial presentes en un mililitro de extracto. Debido al elevado porcentaje de agua en el tejido del bivalvo, se considera que la densidad en el interior del mejillón cebra es 1 g/mL.

Las posibles asociaciones entre bacterias presentes en el agua y en el mejillón se han determinado mediante un análisis de correlación, para ello se realizan dos cálculos distintos:

- Índice resultante de dividir las UFC contenidas por g de mejillón entre las contenidas en 1g de agua ($\text{UFC} \cdot \text{g. mejillón}^{-1} / \text{UFC} \cdot \text{g. agua}^{-1}$), si se supone densidad del agua 1g/mL. Este cálculo no es del todo correcto, ya que la densidad del agua natural no es la misma que la del agua destilada (1g/mL), pero esta sencilla aproximación permite comparar la preferencia de acumulación entre las cuatro bacterias objeto de estudio

- Factor de correlación R^2 obtenido a partir de la representación gráfica del $\log_{10}(\text{UFC}/100\text{mL agua})$ frente al $\log_{10}(\text{UFC}/\text{g mejillón})$; muestra la relación entre la concentración bacteriana del agua y la del mejillón.

2.5. Aislamiento y cultivo de AVL presentes en *Dreissena polymorpha* y agua natural. Identificación morfológica

Las amebas de vida libre se cultivan en placas petri en agar no nutritivo (NNA), sobre el que se extienden con asa de Digralsky 100 μL de una suspensión bacteriana de *Escherichia coli* inactivada por calor, que sirve como nutriente a las AVL.

La suspensión concentrada de *Escherichia coli* se prepara en un tubo con suero fisiológico (0,9% NaCl) en el que se inocula la bacteria con una turbidez 2 en la escala de McFarland. Por último se inactiva por calor calentando la mezcla a 65°C durante al menos 10 minutos.

En el centro de la placa Petri y en presencia de un mechero bunsen, se añade una gota de muestra, manteniéndola abierta hasta que se seca. Las placas se inoculan con:

- Extracto de mejillón cebra de cada uno de los puntos de muestro, preparado como se indica en el apartado 2.4.1.
- Sedimento de agua natural del embalse de La Sotonera, embalse de Sobrón y acequia de Rimer.
- Ejemplares de las muestras de mejillón cebra del embalse de Sobrón, que murieron masivamente en el acuario durante los días siguientes a su recogida. Con el fin de estudiar este suceso, se extrajeron ejemplares muertos de sus valvas y se recogieron enteros en un tubo sobre el que se añade agua esterilizada. Tras 24 horas de incubación a 30°C, se siembra una gota de ese agua.

Una vez que la gota de muestra se seca, se cierran las placas y se sellan con Parafilm y se incuban a 30 °C, observándolas al microscopio a diario y considerándose positivas aquellas en las que se observa crecimiento de amebas y negativas si no se observa ningún crecimiento en 15 días.

El control diario de las placas se realiza por visión directa con ayuda de un microscopio Zeiss a 10X. Para la identificación morfológica de los trofozoítos y quistes, se utilizaron los criterios morfológicos documentados por Smirnov and Goodkov (1999) y fueron complementados con las claves de identificación de Page (1988).

Al tratarse de muestras ambientales es muy corriente encontrarse con el crecimiento de hongos en las placas, lo cual arruina el aislamiento de las AVL. Con el fin de evitarlo, se realizan varias resiembras de las placas en las que se observa crecimiento de AVL procurando eliminar esta contaminación, y en caso de que no fuera posible, la muestra se considera como positiva por morfología, pero se desecha y no se continúa con su procesamiento.

Para aislar una especie y evitar muestras mixtas (y la contaminación anteriormente mencionada), se seleccionan por visión directa en microscopio a 10X aumentos los quistes y trofozoítos similares entre sí y se recorta del medio, con ayuda de un asa de siembra previamente flameada, esta zona de aproximadamente 3x3 mm. Posteriormente el fragmento recortado se resiembró colocando la superficie que contiene las amebas en contacto con el

agar de una nueva placa que se observa también a diario. El proceso se repite al menos 3 veces (adaptable a las necesarias para asegurar el correcto aislamiento), lo que nos asegura la obtención de una sola cepa y la sustitución de posibles bacterias adheridas por *E. coli* (Page, 1988)

Si en una placa se observan trofozoítos o quistes con morfología diferente, se seleccionan e inoculan en placas distintas.

2.6. Identificación de microorganismos potencialmente patógenos mediante técnicas de Biología Molecular

Para la identificación y genotipificación de Amebas de Vida Libre, *Cryptosporidium* spp, *Giardia duodenalis* y bacterias endosimbiontes contenidas en las AVL se realiza la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) consistente en una amplificación específica de ácidos nucleicos.

La técnica consta de varios pasos que se describen a continuación:

2.6.1. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el kit comercial Ron's Tissue DNA Mini Kit que consiste en un método basado en la unión de ADN a membranas de gel sílice, siguiendo un procedimiento que se describe paso a paso en el Anexo F.1.

2.6.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, descrita por K. Mullis en 1985, es una técnica *in vitro* que se utiliza para amplificar enzimáticamente una región determinada de la cadena de ADN situada entre dos regiones de ADN cuya secuencia se conoce. La replicación de ADN es de carácter exponencial y se desarrolla realizando el número de ciclos a la temperatura y durante el tiempo adecuado a cada amplificación, en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable.

El requisito fundamental para poder realizar la PCR es disponer de fragmentos cortos de ADN de cadena sencilla y complementarios a los extremos del fragmento que se desea amplificar. Estos fragmentos servirán como cebadores, también llamados primers, para que la enzima de polimerización (Taq ADN polimerasa) incorpore los nucleótidos complementarios a la cadena de ADN que previamente ha sido desnaturalizada. En el Anexo F.2. se describe el proceso de manera más detallada.

2.6.3. Electroforesis en gel de agarosa y visualización

La electroforesis es un proceso en el que un gradiente de potencial produce el transporte de partículas cargadas, permitiendo así la separación de moléculas a través de una matriz tamponada; en este proyecto se separa ADN en una matriz de gel agarosa.

La movilidad electroforética de una molécula depende directamente de su carga (migrando hacia el cátodo o el ánodo) e inversamente del tamaño y la forma de la molécula. La migración de las partículas está afectada por el pH del medio en que se encuentran, ya que su carga neta depende de este pH (José Manuel González, 2010). En el caso de ADN, el grupo

fosfato proporciona carga negativa en condiciones de pH neutro, haciendo que los fragmentos migren del polo negativo (cátodo) al polo positivo (ánodo) durante la electroforesis (Figura 2-2)

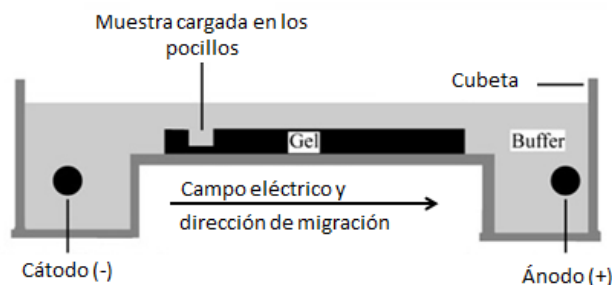


Figura 2-2 Vista lateral de la cubeta de electroforesis.

En el Anexo F.3, se describe detalladamente el procedimiento seguido en el laboratorio tanto en la preparación del gel agarosa como en la electroforesis.

El ADN separado en gel de agarosa puede visualizarse mediante tinción con colorantes fluorescentes que se intercalan entre los pares de bases que conforman el ácido nucleico (Posso y Ghneim, 2008), el colorante utilizado es el bromuro de etidio. Este aditivo revela la presencia de una banda de ADN al ser iluminado con luz ultravioleta. (Transluminador de Vilbert Lourmat) (6x8W-312 nm; power 55W).

2.6.4. Purificación del producto de PCR y visualización

Los productos de PCR que dan resultados positivos en la electroforesis son seleccionados y se repite la PCR hasta obtener suficiente cantidad de ADN. El volumen total de producto obtenido (75-100µL) se somete de nuevo a electroforesis, tras lo cual, se visualiza el gel con luz ultravioleta y se cortan, con ayuda de bisturí, las bandas del peso molecular que corresponda y que contienen la molécula de ADN deseada.

Estas bandas de ADN se purifican utilizando el Kit comercial GFX™ PCR ADN and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) siguiendo los pasos y en base a los principios que se recogen en el Anexo F.4. El producto purificado se somete de nuevo a electroforesis utilizando el marcador de peso molecular EasyLadder I (Bioline, S.A) con un rango de 100 a 2000 pb, como referencia para la cuantificación de ADN.

2.6.5. Secuenciación

El ADN purificado se sometió a secuenciación directa en ambas direcciones en el centro de secuenciación y análisis genéticos de Zaragoza (C.A.G.T).

Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa BioEdit® y la herramienta informática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool del National Center for Biotechnology Information, NCBI) para el alineamiento de las secuencia obtenidas con las recogidas en la base de datos GenBank.

2.7. Identificación y genotipificación de microorganismos potencialmente patógenos en *Dreissena polymorpha* y agua natural

2.7.1. Identificación de protozoos en *Dreissena polymorpha*

Con el fin de identificar los distintos microorganismos albergados en el interior del mejillón cebrá y presentes en el agua se efectuaron las PCR que se recogen en la Tabla 2-5 y la Tabla 2-6. Todas ellas se llevaron a cabo en una habitación independiente y con agua bidestilada estéril para evitar contaminaciones.

Las reacciones de amplificación se realizaron en termocicladores de ADN Perkin-Elmer Cetus (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn.) y Bio-RAD Gene Cycler™ (Bio-RAD, La Coquette, Francia). Los reactivos de PCR fueron suministrados por Promega (Madison, WI, USA) y por Isogen Bioscience (de Meer, The Netherlands).

Tabla 2-5 Relación de genes diana, y secuencias utilizadas en las Reacciones en Cadena de la Polimerasa para AVL.

Especie amplificada	Región diana	Cebadores	Secuencia 5'→3'	Tamaño (pb)	Referencia
<i>Acanthamoeba</i>	ASA.S1	JDP 1 JDP 2	GCCCAGATCGTTTACCGTGAA TCTCACAAGCTCTAGGGAGTCA	500	Schroeder et al., 2001
<i>Hartmannella v</i> <i>Naegleria fowleri</i> <i>Vanella spp.</i> <i>Vahlkampfia ovis</i> <i>A. castellanii</i> <i>A. poluphaga</i> <i>A. lenticulaa</i> <i>A. hatchetti</i> <i>A. comandonni</i> <i>A. astronyxis</i>	18S rADN región conservada	FLA F FLA R	CGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGC CAGGTTAAGGTCTCGTTCGTTAAC	800-1500	Tsvekova et al. 2004
<i>Naegleria spp</i>	ITS/5.8S gen ribosomal	ITS 1 ITS 2	GAACCTGCGTAGGGATCATT TTTCTTTTCCTCCCCTTATTA	400-453	Pelandakis et al. 2002
<i>Naegleria fowleri</i>		Fw 1 Fw 2	GTGAAAACCTTTTTCCATTTACA AAATAAAAGATTGACCATTGAAA		
<i>Eukariota</i>	18S rADN región conservada	EUK F EUK R	AACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCAT GCTTGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC	Variable	Robert P. Hirt et al., 1997

Las PCRs para Amebas de Vida Libre recogidas en Tabla 2-5, se realizaron a:

- Cultivos de AVL.
- Extracto de mejillón de cada punto de muestreo.
- Sedimento de agua natural de La Sotonera, Sobrón y acequia de Rimer.

Tabla 2-6 Relación de genes diana, cebadores y secuencias utilizadas en las Reacciones en Cadena de la Polimerasa *Cryptosporidium spp* y *Giardia duodenalis*.

Especie amplificada	Región diana	Cebadores	Secuencia 5'→3'	Tamaño (pb)	Referencia
<i>Cryptosporidium spp.</i>	SSU rARN	SSU 1	TTCTAGAGTAATACATGCG	1325	Xiao et al., 1999
		SSU 2	CCCTAATCCTTCGAAACAGGA		
		SSU 3	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG	826-864	
		SSU 4	AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA		
<i>Giardia duodenalis</i>	tpi	AL3543	AAATTATGCCTGCTCGTCG	605	Sulaiman et al., 2003
		AL3546	CAAACCTTTCCGCAAACC		
		AL3544	CCCTTCATCGGTGGTAACTT	530	
		AL3545	GTGGCCACCACTCCCGTGCC		

Las PCRs para *Cryptosporidium spp* y *Giardia duodenalis* recogidas en Tabla 2-6, se realizaron a:

- Extracto de mejillón de cada punto de muestreo.
- Sedimento de agua natural de La Sotonera, Sobrón y acequia de Rimer.

En el caso de *Cryptosporidium spp.*, se realiza también una identificación morfológica por microscopía óptica mediante una tinción Ziehl-Neelsen modificada para detectar la presencia de ooquistes mediante visión directa al microscopio óptico con aumento 40X y 100X.

2.7.2. Identificación de bacterias endosimbiontes en el interior de AVL

Se realiza también un análisis, mediante PCR, con el fin detectar la presencia de bacterias tanto albergadas en el interior de las AVL, como en el mejillón y agua natural; las bacterias que se van a estudiar son: *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium spp*, *Pseudomonas spp* y *Cianobacterias tóxicas* (Esta PCR también ofrece la posibilidad de incluir en el estudio *Vibrio cholerae*, pero no se utiliza ya que esta bacteria habitualmente no se encuentra en las aguas de nuestro entorno).

Para esta detección de patógenos resistente a las AVL se realiza una pentaplex-nested PCR detallada en la Tabla 2-7, a:

- Cultivos de AVL.
- Extracto de mejillón de cada punto de muestreo.
- Sedimento de agua natural de La Sotonera, Sobrón y acequia de Rimer.

Tabla 2-7 Relación cebadores y secuencias utilizados en pentaplex-nested PCR para la detección de bacterias.

Especie amplificada	Cebadores	Secuencia 5'→3'	Tamaño (pb)	Referencia
<i>Legionella pneumophila</i>	Mip-Leg-F 186	GCATTGGTGCCGATTTGG	186	(Roch and Maurin, 2005)
	Mip-Leg-R 186	GTTTTGCATCAAATCTTTCTG		
	N-Mip-Leg-F 186	GAAGCAATGGCTAAAGGCATGCAA	112	(Calvo L. et al., 2013)
	SN-Mip-Leg-R186	GCTTTGCCATCAAATCTTCTGAAACTTG		
Cianobacterias tóxicas	McyD-dir	GAGCATTAAGGGCTAAATCG	282	(Calvo L. et al., 2013)
	McyD-rev	CTTGGTGCTTCATCAACTC		
	N-McyD-dir	TCATAGCCCCATATCCTTTAGCGGC	194	
	N-McyD-rev	CTGCTGTATCTTTAATTGGCTCGGC		
<i>Mycobacterium spp</i>	Hsp65-dir	CCCGTACGAGAAGATCGG	354	(Calvo L. et al., 2013)
	Hsp65-rev	GACTCCTCGACGGTGATG		
	N-Hsp65-dir	GAGCTGGTCAAGGAAGTCGCC	300	
	N-Hsp65-rev	GTTGCCGACCTGTCCATCGA		
<i>Pseudomonas spp</i>	R16S-dir	GGTCTGAGAGGATGATCAGT	962	(Calvo L. et al., 2013)
	R16S-rev	TCTGTACCGACCATTGTAGC		
	N-R16S-dir	GACGTTACCGACAGAATAAGCACCG	476	
	N-R16S-rev	ACCCACATGCTCCACCGCTTGTG		

En los Anexos F.5. a F.11 se detallan todas las Reacciones en Cadena de la Polimerasa realizadas.

2.8. Estudio de la calidad del agua en los puntos de muestreo

Se realiza un estudio de calidad del agua de acuerdo a la Orden del 11 Mayo de 1988 relativa a las aguas prepotables, de los cuatro puntos de muestreo. Para ello, se obtiene de la web de la Confederación Hidrográfica del Ebro (www.chebro.es) la información necesaria de la red de Control del Estado de las Masas de Agua Superficiales en la cuenca del Ebro; esta información se corresponde con los parámetros imperativos que marca la dicha Orden. Posteriormente, se comparan los datos físico-químicos y microbiológicos extraídos de las estaciones de control escogidas para cada punto de muestreo con los rangos de calidad que aparecen en el Anexo H y se clasifica cada parámetro como categoría A1, A2 o A3 de acuerdo a estos rangos. Los criterios de elección de estos puntos de control son:

- Se toma en primer lugar los puntos en que se ha recogido muestra si disponen de todos los datos.
- Si no se tienen datos o estos no son suficiente suficientes, se buscan puntos de control que:
 - Sean lo más cercanos posibles al lugar donde se toma la muestra.
 - Pertenezcan a la misma masa de aguas y tengan características similares.
- Si no se obtienen datos de lugares razonablemente próximos (menos de 30 km de distancia) se realiza el análisis de calidad sin los datos de los parámetros de los que no se encuentra información.

En el Anexo G se detalla y justifica la elección de los puntos de muestreo y los parámetros que se toman de cada uno de ellos.

Para realizar el análisis se toman los datos de los años 2012, 2013 y 2014, con el fin de conocer la calidad en los últimos años ya que la vida de *Dreissena polymorpha* es de unos 3 años y por lo tanto se supone que incluyen todas las situaciones vividas por el ejemplar adulto más antiguo (Durán et al., 2007)

2.9. Metodología analítica de metales en *Dreissena polymorpha*

Para analizar los metales presentes en el interior de *Dreissena polymorpha*, se separan los ejemplares de mejillón de sus valvas y se aclaran con el fin de eliminar arena o partículas que puedan contener en su interior, después se conservan a -20°C hasta que se realiza el análisis de todas las muestras a la vez.

Una vez recopiladas todas las muestras, se liofiliza el tejido de mejillón una temperatura de -40°C y manteniendo una presión de vacío de 10^{-1} bar (Jović et al., 2014) en un liofilizador Lioalfa 6-50. El proceso se para a las 24 horas ya que se observa que el tejido ya está totalmente liofilizado.

Finalizado este proceso, se retiraran las muestras del aparato y se homogeneiza el producto obtenido para posteriormente recogerlo en tubos eppendorf de 1 y 5 mL que se envían a analizar, por Ionización en Plasma de Acoplamiento Inductivo- Espectrometría de Masas al Servicio Central de Análisis de la Universidad de Zaragoza.

Las muestras se pesan antes y después de ser liofilizadas para determinar el contenido de agua de estos bivalvos.

3. RESULTADOS

3.1. Mantenimiento y cría en cautividad de *Dreissena polymorpha*

Las principales condiciones físico-químicas para el mantenimiento en cautividad del mejillón cebrá se controlan con el fin de corregir, de acuerdo a las indicaciones descritas en el Anexo D, las posibles desviaciones de los rangos óptimos que aparecen en la Tabla 2-2. Los ejemplares permanecieron en el acuario instalado en el laboratorio desde su recogida (la primera el 20 de marzo) hasta finales del mes de julio, permitiendo la conservación de dichos ejemplares durante toda la fase de experimentación en que se precisaron vivos. En la Tabla 3-1 se muestran los valores máximos y mínimos de cada parámetro durante ese periodo.

Tabla 3-1 Valores máximos y mínimos de los parámetros de control medidos en el acuario.

	Temperatura (°C)	pH	Calcio (mg Ca/l)	Dureza total (mg CaCO ₃ /l)	Conductividad (μS/cm 20°C)	Oxígeno disuelto (mg O ₂ /l)
Valor mínimo	18	7,31	71,34	462	1195	5,94
Valor máximo	26,5	8,25	211,6224	710	1626	7,5

En el Anexo H.1. se recogen las gráficas que muestran los valores de los parámetros en cada medida realizada.

La temperatura oscila entre 18°C y 26,5°C, aunque las medidas en las que se superan los 25°C fueron puntuales y rápidamente mejoradas.

El pH presenta un máximo en 8,25 y mínimo en 7,31, por lo que a excepción de las medidas de 7,31 y 7,44, las medidas se encuentran dentro del rango de crecimiento alto, además estas bajadas de pH son rápidamente corregidas con la adición de Ca(OH)₂.

En el caso de la dureza cálcica y la dureza total se trata de parámetros relacionados, ya que el primero refleja la concentración de iones calcio y la segunda de iones calcio y magnesio; la dureza cálcica se encuentra en rangos de crecimientos altos y la total en el rango óptimo.

De acuerdo a los valores del parámetro de conductividad, se tienen también condiciones de crecimiento óptimas.

Por último, los valores de oxígeno disuelto en agua (mínimo en 5,94 mg O₂/L y máximo en 7,5 mg O₂/L) se encuentran en un rango de crecimiento medio de los ejemplares de *Dreissena polymorpha*.

Durante todo el periodo de mantenimiento, se ha conseguido la supervivencia del 98% de los ejemplares recogidos, aunque no se ha conseguido la cría en cautividad.

3.2. Cuantificación e identificación de bacterias indicadoras de contaminación fecal en *Dreissena polymorpha* y aguas naturales

En la Tabla 3-2, Tabla 3-3 y Tabla 3-4, se recogen los resultados obtenidos en el recuento de UFC de cada bacteria indicadora de contaminación fecal analizada en los distintos puntos de muestreo.

- Embalse de Flix:

Tabla 3-2 Resultados obtenidos en el análisis de bacterias del embalse de Flix.

	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Salmonella spp.</i>
Agua natural (UFC/100mL)	-	-	-	-
<i>Dreissena polymorpha</i> (UFC/g mejillón)	1,45E+02	5,22E+03	2,23E+01	4,47E+02

No se puede realizar una comparación entre las bacterias retenidas en el mejillón y las presentes en el agua, ya que la muestra se recibió sin agua. Sí se puede observar que la acumulación de *Enterococcus spp.* en el bivalvo es menor que para el resto de bacterias.

- Embalse de Sobrón:

Tabla 3-3 Resultados obtenidos en el análisis de bacterias del embalse de Sobrón.

	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Salmonella spp.</i>
Agua natural (UFC/100mL)	1,96E+04	2,31E+04	9,00E+02	2,98E+04
<i>Dreissena polymorpha</i> (UFC/g mejillón)	2,58E+04	8,36E+02	2,27E+02	5,11E+04
UFC/g. mejillón/ UFC/g agua/	131,6	3,6	25,2	171,5

Según estos resultados, *Dreissena polymorpha* acumula en su interior una mayor concentración de *Clostridium perfringens* y *Salmonella spp.* que de las otras dos bacterias.

La presencia en el agua de *Enterococcus spp.* es menor que del resto de bacterias, siendo menos acusada la diferencia en el caso de la acumulación en el interior del mejillón.

Para poder comparar los datos obtenidos para cada bacteria y los obtenidos para el agua y el mejillón, se crea un índice: $\text{UFC} \cdot \text{g. mejillón}^{-1} / \text{UFC} \cdot \text{g. agua}^{-1}$. El análisis de este índice muestra una menor capacidad de acumulación de *E. coli* respecto a las contenidas en el agua que para las otras bacterias.

Para determinar la existencia de una posible asociación entre la cantidad de bacterias contenida en el agua y la contenida en los mejillones cebra se ha llevado a cabo un estudio de correlación en el que se ha obtenido un factor de $R^2=0,5509$ que indica que a priori parece no existir relación alguna entre la concentración bacteriana del agua y la del mejillón. Eliminando los resultados de *Escherichia coli* y realizando de nuevo el estudio de correlación con las otras tres bacterias, se obtiene un factor $R^2=0,9999$ es decir, que para estas tres bacterias (*Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp. y *Enterococcus* spp.) sí que existe una buena correlación entre ambas concentraciones.

Debido a la muerte masiva de ejemplares de mejillón cebra procedentes del embalse de Sobrón que se produjo en el acuario, se realizó una siembra por agotamiento, con ayuda de un hisopo, de la suspensión de agua esterilizada y mejillón sobre una placa de agar Mueller-Hinton suplementado con 5% de sangre de carnero, y se incubó a 37°C durante 24 horas. Tras este periodo de incubación, se observó crecimiento de tres colonias morfológicamente distintas, que fueron resemebradas hasta obtener un cultivo puro. Dichas bacterias fueron amablemente identificadas por la Dra. Elena Sanchez Yangüela del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, mediante sistema API. Las bacterias identificadas son:

- *Citrobacter braakii*.
- *Stenotrophomonas maltophilia*.
- *Pseudomonas* spp.

- Acequia de Rimer (Caspe)

Tabla 3-4 Resultados obtenidos en el análisis de bacterias de la acequia de Rimer (Caspe).

	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.
Agua natural (UFC/100mL)	4,72E+02	5,90E+03	3,40E+01	8,85E+01
<i>Dreissena polymorpha</i> (UFC/g mejillón)	5,73E+02	2,34E+02	7,02E+01	4,01E+02
UFC/g. mejillón/ UFC/g agua/	121,4	4,0	206,5	453,1

En este caso, se acumula en el interior de *Dreissena polymorpha* una mayor concentración de *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.. Nótese una menor presencia en el agua de *Enterococcus* spp. y *Salmonella* spp. que de *Clostridium* y *E. coli*. El índice (UFC·g. mejillón⁻¹/ UFC·g agua⁻¹) muestra de nuevo la menor acumulación de *E. coli* respecto a las contenidas en el agua.

Al realizar el estudio de correlación entre la concentración bacteriana del agua y la del mejillón se obtiene un factor de $R^2=0,1441$, de nuevo si se eliminan de la correlación los resultados de *Escherichia coli*, se obtiene una $R^2=0,7541$.

Cabe resaltar, que comparando los resultados obtenidos en los tres puntos, la concentración bacteriana es considerablemente mayor en el embalse de Sobrón.

- Embalse de La Sotonera:

Como se indica en el apartado 2.1, esta muestra llega congelada, pero igualmente se procesa. La ausencia de crecimiento bacteriano en las placas sugiere dos posibilidades, que se trate de un punto en el que no hay presencia de las bacterias estudiadas o que la causa de estos resultados negativos sea debida a la congelación de la muestra.

Para elucidar cuál de las dos posibilidades es la correcta, se consultan los datos de *Escherichia coli*, *Estreptococos fecales* y *Salmonella* que ofrece la web de la CHE, en la estación de control elegida para el estudio de calidad de este embalse en el año 2014, Tabla 3-5.

Tabla 3-5 Resultados proporcionados por la CHE de *E. coli*, *Estreptococos fecales* y salmonelas en la estación de control (0421 Canal de Monegros/ Almudévar)

Parámetro	Unidades	21/01/2014	08/04/2014	17/09/2014
<i>Escherichia coli</i>	UFC/100 mL	>4/<10	<500	>20/<100
<i>Estreptococos fecales</i>	UFC/100 mL	-	33	-
<i>Salmonella</i>	/1000 mL	-	PRESENCIA	-

Estos resultados corresponden a un punto situado aproximadamente 17 km aguas abajo del lugar de recogida de ejemplares. La muestra se toma el 20 de marzo, por lo que es unos días anterior al análisis realizado por la CHE el mes de abril.

3.3. Identificación de Amebas de Vida Libre

La identificación de AVL se realiza morfológicamente por microscopía óptica y también génicamente mediante técnicas de biología molecular.

3.3.1. Identificación morfológica

Al tratarse de muestras ambientales, el cultivo de estos protozoos se ve dificultado por la frecuente aparición de hongos y algas en las placas.

No obstante, se ha conseguido el crecimiento de AVL, en ocasiones con distintas características morfológicas, de las muestras que se mencionan a continuación:

- Embalse de La Sotonera:
 - Agua natural.
- Embalse de Flix:
 - Extracto de *Dreissena polymorpha*.
- Embalse de Sobrón:
 - Extracto de *Dreissena polymorpha*.
 - Ejemplar muerto de *Dreissena polymorpha*. (2 morfológicamente distintas.)
 - Agua natural.

- Acequia de Rimer (Caspé):
 - Extracto de *Dreissena polymorpha*. (2 morfológicamente distintas)
 - Agua natural. (2 morfológicamente distintas)

No se determinó en el agua de Flix, dado que los mejillones llegaron sin agua, con lo que de las 8 muestras iniciales, el 87,5% son muestras positivas. De ellas, todas las muestras de agua son positivas y de los 5 extractos de mejillón solamente el procedente de la Sotonera resultó negativo (80%).

En el ejemplar muerto de Sobrón, se detectó por microscopia un flajelado que se recogió con ayuda de una pipeta Pasteur y se le realizan las distintas PCRs necesarias para su identificación.

La Figura 3-2 muestra ocho imágenes de AVL aisladas y la identificación morfológica de cada una de ellas. Estas fotos se realizan durante la visualización al microscopio de una gota del agua esterilizada sobre la que se suspende e incuba, durante 24 horas a 30 °C, el ejemplar muerto de *Dreissena polymorpha* procedente del embalse de Sobrón.

Para la identificación morfológica de los trofozoítos y/o quistes, se toman en cuenta inicialmente los criterios morfológicos documentados por Smirnov y Goodkov (1999) y se complementa utilizando las claves de identificación de Page (Page, 1988).



Figura 3-1 Imágenes de AVL presentes en el ejemplar muerto de *D. polymorpha* procedente de Sobrón. Figs. 1-5 Trofozoítos de *Cercomonadida*. Fig. 6- Trofozito *Cercomonadida* y forma flagelar de *Naegleria* spp. Fig. 7- Quiste de *Naegleria* spp. Fig. 8- Trofozito de *Naegleria* spp.

3.3.2. Identificación genética

De las 20 muestras analizadas (todos los cultivos morfológicamente diferentes de AVL, agua natural y extracto de mejillón) con las distintas PCRs descritas en el apartado 2.7.1 para la identificación de AVL obteniendo 13 (65%) resultados positivos de las cuáles se pudieron identificar 11 (55%). En la Tabla 3-6 se recogen las amebas identificadas en cada muestra que se analiza.

El proceso de genotipificación se ve dificultado ya que al tratarse de muestras ambientales, contienen numerosos microorganismos que pueden dar amplificaciones inespecíficas.

Tabla 3-6 Amebas de Vida Libre identificadas en los cuatro puntos de muestreo.

Punto de muestreo	Muestra	Análisis cultivo AVL	Análisis directo
Embalse de La Sotonera	Agua	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-
	Mejillón	(No hay cultivo)	-
Embalse de Flix	Mejillón	<i>Naegleria clarki</i>	-
Embalse de Sobrón	Agua	<i>Acanthamoeba pustulosa</i>	Ameba no identificada
	Mejillón	<i>Naegleria clarki</i>	-
	Mejillón muerto	<i>Naegleria clarki.</i>	-
		<i>Vexillifera bacillipedes</i>	
Flagelado	(No se cultiva)	<i>Cercomonadida</i>	
Acequia de Rimer (Caspé)	Agua	<i>Naegleria spp.</i>	-
		Ameba no identificada	
	Mejillón	<i>Vexillifera bacillipedes</i>	
		<i>Protacanthamoeba bohemica</i>	

En el caso de mejillón de La Sotonera, tampoco se consiguen identificar Amebas de Vida Libre por PCR directa del extracto preparado.

Como se observa en la Tabla 3-6, hay dos amebas que no se han podido identificar genéticamente; la perteneciente al Embalse de Sobrón corresponde con un resultado positivo por PCR del análisis directo de agua, cuya secuenciación no ha sido posible; la que corresponde a la acequia de Rimer es un cultivo de AVL que por morfología presenta similitud con *Hartmannella vermiformis* y que da resultado negativo por PCR.

Si se realiza una comparativa de los géneros identificados (Figura 3-2), se puede concluir que *Naegleria* es el género que aparece con mayor frecuencia en las muestras que se analizan, habiendo sido identificado en 4/9 muestras (extracto de mejillón de los 4 puntos; agua natural de todos los puntos menos Flix; mejillón muerto y flagelado del embalse de Sobrón), a la vez que supone el 40% (4/10) de las amebas identificadas.

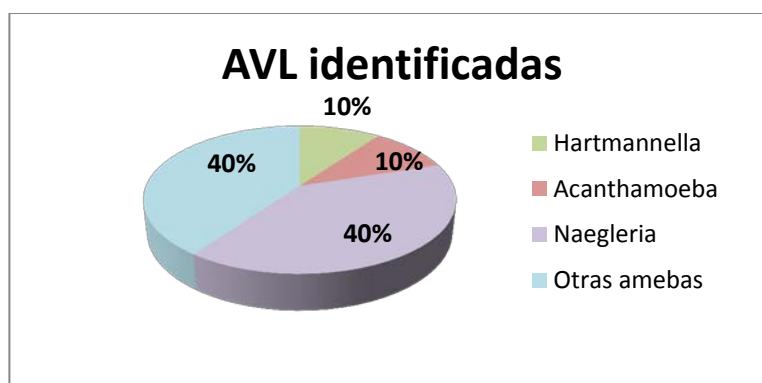


Figura 3-2 Géneros de AVL identificados mediante PCR.

3.4. Identificación de bacterias endosimbiontes en el interior de AVL

Este análisis se realiza a las AVL cultivadas con el fin de detectar la presencia de bacterias patógenas en su interior, pero también se lleva a cabo un análisis directo tanto sobre el extracto de mejillón como al agua natural para estudiar su posible presencia en el medio.

La técnica pentaplex-nested PCR (Calvo, et al. 2012) proporciona los resultados que se muestran en la Tabla 3-7.

Tabla 3-7 Resultados de la pentaplex-nested PCR: bacterias identificadas en todas las muestras estudiadas.

Punto de muestreo	ARB cultivo AVL		Análisis directo	
	Mejillón	Agua	Mejillón	Agua
Embalse de La Sotonera	(No hay cultivo)	<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Legionella</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Legionella</i> spp.	-
Embalse de Flix	-	(Muestra sin agua)	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> <i>Mycobacterium</i> spp. <i>Legionella</i> spp.	(Muestra sin agua)
Embalse de Sobrón	(*) <i>Pseudomonas</i> spp. (2) (*) <i>Legionella</i> spp. (2)	<i>Legionella</i> spp.	-	<i>Mycobacterium</i> spp.
Acequia de Rimer (Caspe)	<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Legionella</i> spp.	-	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> <i>Legionella</i> spp.	-

(*) Suspensión de H₂O esterilizada y mejillón muerto del embalse de Sobrón

De las 20 muestras analizadas, se obtienen 17 resultados positivos y de estos, 2 se pudieron identificar genéticamente.

- *Pseudomonas plecoglossicida*.
- *Mycobacterium nonchromogenicum*

En el embalse de La Sotonera se encuentran las mismas bacterias tanto en el análisis directo de mejillón como en el interior del cultivo de AVL del agua.

En el caso de Flix, no se obtiene ningún resultado positivo en el interior del cultivo de AVL de extracto de mejillón para las bacterias estudiadas; pero sí que se detectan *Pseudomonas plecoglossicida*, *Mycobacterium* spp. y *Legionella* spp. por análisis directo del extracto.

En el embalse de Sobrón, se detecta *Legionella* spp. en el cultivo de AVL del agua y en los cultivos de AVL de mejillón muerto se obtienen positivos en *Legionella* spp. y *Pseudomonas* spp. en dos especies distintas de AVL. Por análisis directo de las muestras, se identifica *Mycobacterium* spp. en el agua y no se obtiene ningún resultado positivo en el extracto. Es decir; en este punto se detecta *Mycobacterium* spp. en el agua pero no en el mejillón ni en el interior de las AVL; *Legionella* spp. tanto en las AVL del agua como del mejillón muerto, pero no se detecta por análisis directo ni en el mejillón ni en el agua; y *Pseudomonas* spp. únicamente en el interior de las AVL correspondientes al cultivo del mejillón muerto.

Por último, en la acequia de Rimer no se obtienen resultados positivos en el agua ni por análisis directo ni en el interior de las AVL. En *Dreissena polymorpha* se identifica *Legionella* spp. tanto en el interior de las AVL cultivadas como en el análisis directo de la muestra; *Mycobacterium nonchromogenicum* únicamente en el análisis directo y *Pseudomonas* spp. en el cultivo de AVL y no en el análisis directo del extracto.

En el interior de las AVL se detectan *Pseudomonas* spp. y *Legionella* spp. En la Tabla 3-8 se muestran las bacterias endosimbiontes identificadas y la especie de AVL en la que se encuentran, también se refleja la muestra a la que pertenece cada una de estas amebas.

Tabla 3-8 Relación de bacterias endosimbiontes identificadas y especie de AVL donde se encuentran.

Punto de muestreo	Muestra	Especie AVL	Amoeba Resistant Bacteria (ARB)
Embalse de La Sotonera	Agua natural	<i>Hartmannella vermiformis</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.
			<i>Legionella</i> spp.
Embalse de Sobrón	Agua natural	<i>Acanthamoeba pustulosa</i>	<i>Legionella</i> spp.
			Mejillón muerto
	<i>Naegleria clarki</i> .	<i>Legionella</i> spp.	
		<i>Vexillifera bacillipedes</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.
Acequia de Rimer (Caspé)	Extracto de mejillón	<i>Protacanthamoeba bohemica</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.
			<i>Legionella</i> spp.

En los análisis directos de agua y extracto de mejillón se identifican: *Pseudomonas* spp., *Mycobacterium* spp. y *Legionella* spp.

En la Figura 3-3 se puede observar la electroforesis en esta PCR en la que se aprecian las bandas de ADN amplificadas para las diferentes bacterias

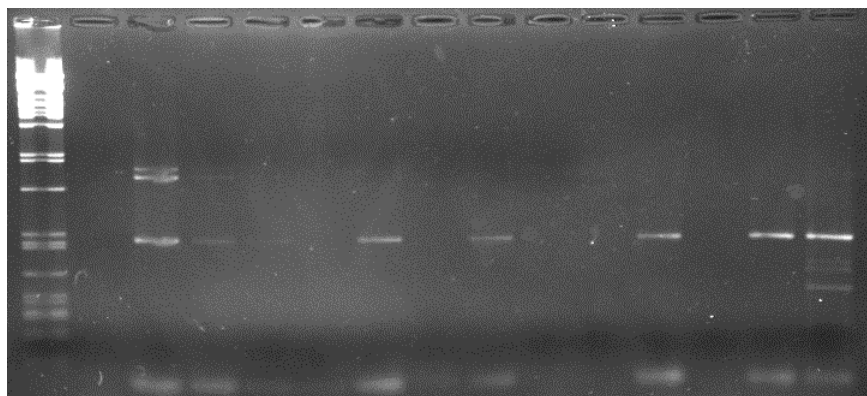


Figura 3-3 Resultado de la electroforesis del producto la pentaplex-nested PCR (14 muestras). Calle 1: Marcador de pesos moleculares (fago λ /PstI), calles:3, 7, 9, 12 y 14: *Pseudomonas* spp. y *Legionella* spp. Calle 4: *Legionella* spp. Calle 15: *Mycobacterium* spp. *Pseudomonas* spp. y *Legionella* spp.

3.5. Identificación de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* spp.

En la identificación de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. mediante PCR se obtienen resultados negativos para ambos protozoos en todas las muestras analizadas.

En la identificación morfológica por microscopía óptica mediante tinción Ziehl-Neelsen modificada tampoco se detecta presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

3.6. Estudio de la calidad del agua en los puntos de muestreo

Los resultados obtenidos en el estudio de calidad de las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable según la Orden 11/05/1988, se recogen de manera detallada en el ANEXO H.2. La Tabla 3-9, presenta un cuadro resumen de los resultados de la clasificación de las aguas prepotables de los cuatro puntos de muestreo en los tres años a los que se realiza el análisis. En el embalse de Flix y la acequia de Rimer, la estación de control muestra, para los tres años que se estudian, ausencia de salmonelas en 1L, por lo que el agua se clasifica como A2 ya que es el parámetro imperativo de peor calidad en todas las ocasiones. En cambio, en el punto de control escogido para el estudio del embalse de La Sotonera sí que hay presencia de salmonelas en 1L en los años 2013 y 2014, por lo que la calidad será A3 esos años y A2 en 2012..

Los resultados del embalse de Sobrón, quedan muy condicionados por la falta de datos ya que no hay información de siete parámetros, uno de ellos salmonelas que como se observa en los resultados de los otros tres puntos de muestreo, generalmente marca la calidad de aguas prepotables. Por este motivo, la calidad de 2012 y 2013 es A1 y en cambio en el año 2014, que se toman los resultados de salmonelas de este estudio, la calidad empeora a A3.

Tabla 3-9 Resultados de la clasificación de las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable según la Orden 11/05/1988

Punto de muestreo	Calidad aguas superficiales prepotables		
	2012	2013	2014
La Sotonera	A2	A3	A3
Flix	A2	A2	A2
Sobrón	A1	A1	A3
Caspe	A2	A2	A2

3.7. Acumulación de metales en *Dreissena polymorpha*

La determinación semicuantitativa de metales de las cuatro muestras liofilizadas de mejillón cebra procedente de los embalses de La Sotonera, Flix y Sobrón y de la acequia de Rimer se lleva a cabo por Ionización en Plasma de Acoplamiento Inductivo-Espectrometría de Masas.

Los errores cometidos en una determinación semicuantitativa mediante este método pueden llegar a ser del 30%.

La mínima concentración determinable (MCD) se calcula como diez veces la desviación estándar de tres lecturas del blanco de medida.

Se calcula también el porcentaje en agua de *Dreissena polymorpha* mediante pesada anterior y posterior a la liofilización de cada muestra, y se obtiene que su contenido en agua es del 90%.

En la Tabla 3-10 se muestran las concentraciones de los metales que aparecen en las listas de Sustancias Prioritarias y Sustancias Preferentes del RD 60-2011 sobre las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas; además se recogen también los resultados que se consideran más significativos en análisis de metales expresados en μg metal /g mejillón seco. En el Anexo H.3.-Tabla H-13 se muestran los resultados obtenidos para todos los metales analizados, un total de 66.

Tabla 3-10 Determinación de metales en los puntos de muestreo y MCD de cada uno en μg metal/g mejillón seco.

Metal	La Sotonera	Flix	Sobrón	Caspe	MCD $\mu\text{g/g}$
	Conc. $\mu\text{g/g}$	Conc. $\mu\text{g/g}$	Conc. $\mu\text{g/g}$	Conc. $\mu\text{g/g}$	Conc. $\mu\text{g/g}$
RD 60-2011 Sustancias Prioritarias y Preferentes					
Cr	67,26	4,65	3,38	2,68	0,07
Se	<MCD	<MCD	<MCD	<MCD	3,25
Ni	18,64	8,70	5,85	7,16	0,48
Cu	13,37	13,06	8,09	7,17	0,37
Zn	97,49	110,50	98,38	117,73	1,04
As	3,91	4,13	6,59	7,50	1,21
Cd	0,62	0,64	2,51	1,28	0,03
Hg	<MCD	0,10	0,15	<MCD	0,08
Pb	0,58	1,78	0,19	0,45	0,06
Otros resultados significativos					
Al	833,07	1447,86	100,19	151,98	8,76
Mn	40,19	72,89	16,43	41,39	0,09
Fe	952,19	1287,81	353,08	461,34	34,24
Sb	<MCD	0,17	0,03	0,04	0,01
Cs	0,24	0,35	0,05	0,06	0,01
Th	0,21	0,35	0,04	0,06	0,01

En Flix donde aparecen, generalmente, los valores de concentración más elevados; en el embalse de la Sotonera también se obtienen concentraciones más altas que en el embalse

de Sobrón y la acequia de Rimer, encontrando en este punto resultados en ocasiones cercanos a los de Flix o incluso superiores.

Llama especialmente la atención la concentración de cromo detectada en La Sotonera, muy superior al resto de los puntos (27 veces superior al resultado obtenido en Caspe); así como las concentraciones obtenidas en Flix para aluminio (14 veces superior que en Sobrón), y antimonio (17 veces superior a la acequia de Rimer), y en menor medida para hierro y plomo. También en estos puntos los valores de cesio y torio son considerablemente más elevados que en Caspe y Sobrón.

En el Anexo H.3 se observan concentraciones de sodio, magnesio, fósforo, potasio y calcio que aunque, a priori, pueden resultar elevadas, se trata de elementos que intervienen en la biología del mejillón.

No existen valores de referencia en *Dreissena polymorpha* que permitan la comparación de resultados, por lo que se ha tomado como resultado discordante aquél supera notablemente al más bajo encontrado.

En la Tabla 3-11 se compara también con los resultados de concentración de metales en aguas que aparecen en la web de la CHE en cada punto de muestreo. Se muestra la concentración mínima y máxima de cada metal en el periodo de tiempo 2012-2014, ya que la vida de *Dreissena polymorpha* es de unos 3 años (Durán et al., 2007).

Tabla 3-11 Comparación de los datos de metales en aguas (www.chebro.es) y resultados metales en *Dreissena polymorpha*.

Metal	La Sotonera	Flix	Sobrón	Caspe
	Agua (mg/L)	Agua (mg/L)	Agua (mg/L)	Agua (mg/L)
	Mejillón (µg/g)	Mejillón (µg/g)	Mejillón (µg/g)	Mejillón (µg/g)
RD 60-2011 Sustancias Prioritarias y Preferentes				
Pb	<0,0005 - 0,005	<0,0005	<0,0005 - 0,0018	<0,0005
	0,58	1,78	0,19	0,45
Hg	<0,000012	<0,000012	<0,000012	<0,000012
	<MCD	0,10	0,15	<MCD
Ni	<0,0020 - 0,0019	<0,00200,0048	<0,0020 - 0,0039	<0,0020 - 0,0038
	18,64	8,70	5,85	7,16
Cd	<0,000020 - 0,00003	<0,000020 - 0,00007	<0,000020 - 0,00009	<0,000020
	0,62	0,64	2,51	1,28
As	0,00051- 0,00137	0,00125 - 0,00211	0,00027 - 0,00112	0,00056-0,00220
	3,91	4,13	6,59	7,50
Cu	<0,0020 - 0,0021	<0,0020 - 0,027	<0,0020 - 0,0072	<0,0020-0,0052
	13,37	13,06	8,09	7,17
Cr	<0,0020	<0,0020	<0,0020	<0,0020
	67,26	4,65	3,38	2,68
Se	<0,00020 - 0,00020	0,00047 0,00060	<0,00020 - 0,00025	0,00047 - 0,00067
	<MCD	<MCD	<MCD	<MCD
Zn	<0,010	<0,010	<0,010 - 0,017	<0,010
	97,49	110,50	98,38	117,73
Otros resultados significativos				
Mn	0,0026 - 0,039	0,0032 - 0,0344	-	0,0014 - 0,0082
	40,19	72,89	16,43	41,39
Fe	0,021 - 0,19	0,009 - 0,069	-	0,010 - 0,072
	952,19	1287,81	353,08	461,34
Sb	<0,0005	<0,0005	-	<0,0005
	<MCD	0,17	0,03	0,04

No aparecen los resultados de aluminio, ya que no se dispone de datos en los puntos de control de la CHE, mientras que en el caso de cesio y torio no son parámetros que se analicen en los puntos de control de aguas.

3.8. Relación entre todos los parámetros estudiados

En la Tabla 3-12 se recogen en un cuadro resumen, los resultados obtenidos durante la experimentación del presente proyecto.

Destacan los resultados obtenidos en el recuento de bacterias del embalse de Sobrón, considerablemente más elevados que en el resto de puntos, y los de metales en Flix y La Sotonera.

También hay que tener en cuenta las bacterias identificadas en el ejemplar de mejillón muerto de Sobrón, y que no se recogen en la tabla:

- *Stenotrophomonas maltophilia*.
- *Citrobacter braakii*.
- *Pseudomonas* spp.

Tabla 3-12 Cuadro resumen de los resultados obtenidos en todos los estudios realizados (Recuento de bacterias indicadoras de contaminación fecal, AVL, ARB, bacterias y metales)

Punto de muestreo	Muestra	Análisis cultivo AVL	ARB cultivo AVL	Análisis directo AVL	Bacterias mediante análisis directo de las muestras	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	Al	Cr	Fe	Cd	Hg	Pb	Th	
La Sotonera	Agua	<i>Hartmannella vermiformis</i>	<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Legionella</i> spp.	-	<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Legionella</i> spp.	-	-	-	-	833,07	67,26	952,19	0,62	<MCD	0,58	0,21	
	Mejillón	(No hay cultivo)		-	-	-	-	-	-								
Flix	Mejillón	<i>Naegleria clarki</i>	-	-	<i>Pseudomonas plecoglossida</i> <i>Mycobacterium</i> spp. <i>Legionella</i> spp.	1,45E+02	5,22E+03	2,23E+01	4,47E+02	1447,9	4,65	1287,81	0,64	0,10	1,78	0,35	
Sobrón	Agua	<i>Acanthamoeba pustulosa</i>	<i>Legionella</i> spp.	Ameba no identificada	<i>Mycobacterium</i> spp.	1,96E+04	2,31E+04	9,00E+02	2,98E+04	100,19	3,38	353,08	2,51	0,15	0,19	0,04	
	Mejillón	<i>Naegleria clarki</i>	-	-	-	2,58E+04	8,36E+02	2,27E+02	5,11E+04								
	Mejillón muerto	<i>Naegleria clarki</i>	<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Legionella</i> spp.	-	-	-											
		<i>Vexillifera bacillipedes</i>	<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Legionella</i> spp.														
Flagelado	(No se cultiva)			<i>Cercomonadida</i>	-												
Caspe	Agua	<i>Naegleria</i> spp.	-		-	4,72E+02	5,90E+03	3,40E+01	8,85E+01	151,98	2,68	461,34	1,28	0,08	0,45	0,06	
		Ameba no identificada	-														
	Mejillón	<i>Vexillifera bacillipedes</i>	-	-	-	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	5,73E+02	2,34E+02	7,02E+01								4,01E+02
		<i>P. bohémica</i>	<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Legionella</i> spp.														

4. DISCUSIÓN

Las condiciones físico-químicas de mantenimiento y cría de *Dreissena polymorpha* en cautividad se encuentran, en su mayoría, dentro de los rangos de preferencia de condiciones de crecimiento y colonización altos-óptimos (Claudi and Mackie, 1996; O'Neill, 1996), el oxígeno disuelto se sitúa en un rango de crecimiento medio, ya que resulta el parámetro más difícil mantener dentro del rango de valores. A pesar de ello, se puede concluir que el mantenimiento de los individuos de mejillón cebra dentro del acuario ha sido el correcto, de manera que se producen escasas muertes, a excepción del suceso observado con los ejemplares de Sobrón.

Aunque se consigue un mantenimiento correcto para el crecimiento de los individuos recopilados para la experimentación, no se logra la cría en cautividad de nuevos ejemplares, demostrando que una introducción puntual de unos pocos ejemplares, no es fácil que determine un éxito invasor (Claudi and Mackie, 1994). Esto no significa que no existan larvas de *Dreissena polymorpha* en el interior del acuario, ya que en este proyecto no se realiza una monitorización de larvas que permita llegar a esa conclusión, pues no es uno de los objetivos principales del estudio. Es muy probable que las larvas existieran pero no hayan conseguido alcanzar el estado adulto, puesto que la mortalidad acumulada desde la eclosión hasta que aparecen las larvas pedivelígeras que secretan el bisco puede ser del orden del 98% (O'Neill, 1996). Además, la viabilidad de los gametos parece ser inversamente proporcional a la temperatura del agua: a 12°C los óvulos son viables aproximadamente 5 horas y el esperma 22 horas, mientras que a 24 °C óvulos y esperma no duran más de 2 horas (Palau et al. 2004); como se observa en el Anexo G.1. las medidas de temperatura generalmente son superiores a 20°C.

Otra posibilidad que se debe tener en cuenta es que la profundidad del acuario ha podido no ser suficiente, ya que debido a la elevada sensibilidad de las larvas velígeras de mejillón cebra a la radiación UV su asentamiento se realiza normalmente a profundidades mayores de 30 cm (McLaughlan et al., 2013), pudiendo ser menos profunda en zonas sombreadas. A pesar de que el acuario está dispuesto de manera que se minimice la llegada de rayos solares, no se asegura que estos lo alcancen en ningún momento del día.

La ausencia de crecimiento bacteriano en las muestras La Sotonera, está muy probablemente relacionada con el hecho de recibir la muestra congelada, ya que como se muestra en la Tabla 3-5 un recuento realizado 19 días después por la CHE en un punto situado 17 km aguas abajo cuantifica colonias de *E. coli* (<500 UFC/100mL) y *Estreptococos fecales* (33 UFC/100mL) y detecta presencia de *Salmonella*, por lo que si además se tiene en cuenta que la presencia de estas bacterias en agua, y por tanto en *D. polymorpha*, es muy habitual; se puede concluir que lo más probable es que estas bacterias no hayan sobrevivido a la congelación.

La cuantificación de bacterias indicadoras de contaminación fecal, muestran unos resultados de correlación que sugieren una preferencia del mejillón por unas bacterias frente a otras, bien para su metabolización o para su acumulación, con ligeras variaciones. Así, mientras en el agua, en el embalse de Sobrón, la abundancia de bacterias sigue el orden: *Salmonella* spp.> *E. coli* > *C. perfringens*> *Enterococcus* spp. y en la acequia de Rimer: *E. coli*> *C. perfringens*> *Salmonella* spp.> *Enterococcus* spp., la abundancia en el mejillón respecto a la encontrada en agua (UFC·g. mejillón⁻¹/ UFC·g agua⁻¹) se puede ordenar como sigue: *Salmonella* spp.> *C. perfringens*> *Enterococcus* spp.> *E. coli* en el embalse de Sobrón y *Salmonella* spp.> *Enterococcus* spp.> *C. perfringens*> *E. coli* en la acequia de Rimer (Caspe).

Llama la atención la elevada presencia de *Salmonella* spp. en el embalse de Sobrón, ya que el principal reservorio de esta bacteria es el tracto digestivo terminal de animales y seres humanos. Por lo que esta gran diferencia de UFC de *Salmonella* spp. entre Sobrón y Caspe suponen un indicio de que existe una elevada contaminación fecal en este punto. Se ha comprobado con ayuda del listado de EDARs en la cuenca hidrográfica del Ebro proporcionado en la web de la CHE, que las depuradoras más cercanas a este embalse se encuentran en Medina de Pomar, pueblo que no está situado en el cauce del río Ebro sino de un afluente (Río Trueba que une sus aguas con el río Nela para desembocar en el Ebro aproximadamente 25-30 km aguas arriba del embalse de Sobrón), y en Miranda de Ebro, situado aguas debajo de Sobrón. Este hecho, unido a la actividad ganadera que se desarrolla en la zona, donde se sitúan varias granjas agropecuarias y avícolas, pueden explicar la elevada concentración tanto *Salmonella* spp. como del resto de bacterias estudiadas, también en concentración considerablemente mayor.

En ambos casos la bacteria menos abundante en aguas es *Enterococcus* spp., aunque la diferencia entre Sobrón y Caspe para esta bacteria es de un orden de magnitud. Si se obvia el pico obtenido en *Salmonella* spp., la de mayor presencia es *Escherichia coli*, de nuevo con un orden de magnitud de diferencia entre ambas localizaciones.

Si se realiza una aproximación con objeto de intentar comparar la cantidad de bacterias encontradas en el agua y las encontradas en el mejillón y se supone que la densidad del agua analizada corresponde a la del agua destilada, 1g/ml, se observa que las UFC/g en el mejillón son muy superiores a las UFC/g agua, por lo que se puede hablar de una acumulación de bacterias en el interior de *D. polymorpha*. De acuerdo con los resultados obtenidos, la capacidad total de acumulación del mejillón podría priorizar la acumulación de *Salmonella* spp. o *Clostridium perfringens*, bien porque las prefiera o bien porque en el medio en que se ha encontrado en los últimos tiempos sean las predominantes, además, llama también la atención la menor acumulación de *E. coli* en referencia a su abundancia en el agua, que podría ser consecuencia de una menor preferencia por el mejillón o su mayor metabolización.

Otro factor a tener en cuenta, son los resultados obtenidos del análisis de correlación, de donde se deduce que a excepción de *Escherichia coli*, existe una clara relación entre la concentración bacteriana en el agua y la encontrada en el mejillón cebra, mucho más evidente en el caso de los resultados del embalse de Sobrón.

Un análisis llevado a cabo por Silverman et al. en 1995 analiza el comportamiento del mejillón cebra frente a *Escherichia coli*, para ello marca estas bacterias, que van a servir de alimento a *D. polymorpha*, con el isótopo S^{35} . Los resultados muestran que el bivalvo incorpora el S^{35} a sus proteínas, lo que confirma la metabolización de *E. coli* por parte del mejillón. Además, determinan que en comparación con los mejillones marinos el mejillón cebra tiene una estructura branquial más fina, lo que les facilita poder filtrar bacterias de menor tamaño.

Dos años más tarde, en 1997, Vathanodorn et al. realizan un estudio sobre las preferencias de filtración de bacterias en *D. polymorpha* y encuentran que conforme disminuye el tamaño de las bacterias también lo hace el ratio de filtración, aunque igualmente se siguen observando una significativa clarificación de las bacterias de menor tamaño presentes en el agua. En consecuencia, las bacterias pueden ser una fuente de carbono, especialmente cuando otras fuentes son escasas.

Con el fin de analizar la tendencia de acumulación de *Dreissena polymorpha*, los grupos de investigación "Protozoosis entéricas de interés económico y sanitario" y "Calidad y Tratamiento de Aguas", desarrollan un estudio en el que se observa la capacidad de acumulación a lo largo de 24 horas que tiene el mejillón cebra para diferentes bacterias por

separado (*Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. y *Salmonella* spp.). Para ello realiza varios experimentos con agua de distintas concentraciones de cada bacteria estudiada, con el fin de evaluar la capacidad de acumulación para cada una de ellas a lo largo del tiempo y la influencia de esta concentración en el agua. Este estudio muestra, tanto para *Enterococcus* spp. como para *E. coli*, un menor porcentaje de acumulación de bacteria por gramo de mejillón cuando la concentración bacteriana del agua disminuye. Además esta capacidad de acumulación (obtenida a partir del descenso de UFC en el agua y no del aumento de estas en *D. polymorpha*), para una misma concentración bacteriana en el agua, es mayor en *E. coli* que en *Enterococcus* spp. lo que podría estar relacionado con el mayor tamaño de la primera. En contraposición, los resultados obtenidos del análisis del extracto de mejillón tras las 24 horas de exposición, muestran mayor número de UFC de *Enterococcus* spp. que de *E. coli*; lo puede estar relacionado con las conclusiones obtenidas por los otros autores, y acumularse más *E. coli* que *Enterococcus* spp. por su tamaño, ésta sea mejor metabolizada por el mejillón, provocando una mayor disminución del número de *E. coli* que de *Enterococcus* spp. en su interior, dando estos resultados en el análisis del extracto. En el caso de *Salmonella* spp. no se obtuvieron unos resultados concluyentes, la concentración de *Salmonella* spp. fue inferior a la de las otras dos bacterias, pero este hecho probablemente esté relacionado con la elevada mortalidad de la bacteria observada durante el experimento debido a la gran sensibilidad de la mayoría de cepas de *Salmonella* spp. a las condiciones ambientales (Abadías et al., 2013).

Todo esto, coincidiría con los resultados obtenidos en este proyecto, ya que se muestra una relación entre la concentración bacteriana del agua y la del mejillón cebra para *Clostridium perfringens*, *Enterococcus* spp. y *Salmonella* spp. y una preferencia de acumulación, mediante el índice ($\text{UFC}\cdot\text{g. mejillón}^{-1} / \text{UFC}\cdot\text{g. agua}^{-1}$), que viene marcada por la facilidad de metabolización de la bacteria y por el tamaño de esta. Por este motivo, los resultados de concentración de *Escherichia coli* hacen que la correlación entre agua y mejillón disminuya notablemente, ya que en realidad esta bacteria muy probablemente haya sido mucho mejor metabolizada por el mejillón que las otras, dando resultados de concentración en su interior más bajos. En cambio, se observa una priorización de acumulación de *Salmonella* spp. y *Clostridium perfringens* que se explica tanto por la elevada presencia que se obtiene de estas bacterias en el agua (sobre todo en el embalse de Sobrón) como por el tamaño de las mismas, mayor que el de *Enterococcus* spp. Por otra parte, la acumulación de *Enterococcus* es mayor en Caspe que en Sobrón, lo que podría deberse a un pico de concentración de esta bacteria en el agua anterior a la toma de muestra, quedando retenida en su interior.

De estos análisis se puede concluir que es evidente que existe una acumulación de bacterias en el interior de mejillón cebra y que los moluscos pueden utilizarse como indicadores semi-cuantitativos para determinar la calidad del agua, ya que aunque existe una relación entre la concentración bacteriana del agua y la del mejillón, también intervienen factores como el tamaño de las bacterias y su metabolización que hacen que esta proporción no sea directa. Además, cuando la concentración de bacterias es elevada en el medio, o lo ha sido anteriormente, también lo es en el molusco, por lo que además también puede ofrecer información de aumentos de concentración bacteriana antes de la toma de muestra.

En la muestra de mejillón muerto de Sobrón se identifican tres bacterias *Citrobacter brakki*, *Pseudomonas* spp. y *S. maltophilia*. *Citrobacter brakii* es una bacteria perteneciente al género *Citrobacter* que se presenta en forma de bacilo gram-negativo que pueden causar infecciones oportunistas en huéspedes inmunocomprometidos (Gupta et al., 2003). El género *Stenotrophomonas* está formado por bacterias ubicuas, asociadas a plantas pero no como fitopatógeno. *S. maltophilia* es la única especie patógena reconocida de este género, caracterizada por una resistencia intrínseca a metales y múltiple a fármacos, por su habilidad para formar biofilms y su actividad citotóxica sobre las células de mamíferos. *S. maltophilia*

está asociada con varias infecciones, muy frecuentemente de carácter nosocomial (Corsaro et al., 2013). Los pacientes con infección por este microorganismo presentan factores de riesgo intrínseco, como la inmunodepresión de diferente naturaleza y enfermedades previas subyacentes (del Toro et al., 2006).

Estas bacterias se han acumulado en el interior del mejillón muerto del embalse de Sobrón, pudiendo ser las causantes de la muerte masiva de mejillones; aunque no se puede tener certeza de la implicación de estas bacterias, ya que existen otros factores como el estrés que les supone el cambio de medio que podría haber causado las muertes de los ejemplares. Por otra parte, su acumulación muestra que puede ser necesario evaluar la presencia de otras bacterias acumuladas en el mejillón cebrá, diferentes a las bacterias indicadoras de contaminación en aguas, ya que si alcanzan altas concentraciones en las aguas pueden suponer un riesgo para la salud de humanos y animales.

Respecto a las amebas identificadas en cada muestra, es importante destacar que se confirma la presencia de amebas pertenecientes a géneros diferentes en la misma muestra, tanto en las pertenecientes a agua como a mejillón; y que los géneros identificados en el agua no coinciden con los del extracto de mejillón. Este no es un hallazgo inesperado por tratarse de muestras ambientales.

En este trabajo se demuestra también el papel del mejillón cebrá en la acumulación de otros microorganismos como los protozoos. En este caso, los protozoos hallados con mayor frecuencia corresponden a amebas de vida libre, que corresponde a lo esperado debido a su alta presencia en prácticamente todos los tipos de aguas. Dicha acumulación tiene una doble implicación, una ambiental por su capacidad para cambiar en un momento dado las poblaciones que conforman un nicho ecológico y otra sanitaria en aquellos casos en que las amebas alojadas en el interior del mejillón fuesen patógenas para el hombre y los animales ya que su posibilidad de colonización quedaría latente.

Para algunas muestras se han obtenido resultados negativos en la PCR, que pueden ser consecuencia de la presencia de inhibidores en la muestra, que impiden que la reacción transcurra normalmente, también se puede deber a que la rotura de las células no haya sido adecuada y haya bajas cantidades de ADN o que la identificación morfológica por visualización al microscopio no proporciona certeza absoluta de género y especie y por lo tanto, la ameba no corresponda realmente a ninguno de los géneros que amplifica la PCR. Además, de otras muestras no se ha podido obtener la secuencia al haber amplificado débilmente por lo que no ha sido posible obtener las cantidades necesarias de DNA o porque se obtienen picos múltiples en el cromatograma que indican la presencia de amebas con genotipos diferentes (muestras mixtas).

El 40% de las AVL identificadas, tanto en el agua (33,33%) como en *Dreissena polymorpha* (42,85%), forman parte de género *Naegleria* spp. Es decir, se trata del género de mayor presencia de las muestras estudiadas. De los cientos de especies de AVL que existen, *Naegleria* es una de las AVL predominantes en lagos, río, aguas geotermales, vertidos de plantas industriales, piscinas y spas, por lo que este resultado no es sorprendente. Más de 30 especies del género *Naegleria* han sido clasificadas utilizando técnicas de biología molecular, siendo *Naegleria fowleri* la más virulenta; *N. australiensis*, *N. itálica* y *N. philippinensis* han mostrado su patogenicidad pero su virulencia es menor (Huang et al., 2010). Los estudios realizados por otros autores muestran que la presencia de *Naegleria* en aguas corrientes alcanza el 14,7 % (Huang et al., 2010) y el 7% en la 57 muestras estudiadas procedentes de embalses y lagos de Taiwan, (Kao et al., 2014), un resultado inferior al obtenido en este estudio en aguas, siendo aun mayor la diferencia en el mejillón.

De las 4 muestras identificadas por secuenciación como *Naegleria* spp. 3 pertenecen a la especie *Naegleria clarki* y la cuarta se identifica como *Naegleria* spp. con un 99% de homología con *Naegleria clarki* (KC527832.1) y con *Naegleria gruberi* (GU320598.1). *N. clarki* ha sido descrita como ameba no patógena, hospedadora de organismos endosimbiontes (Walochnik et al., 2005).

Nótese asimismo, la baja frecuencia de *Acanthamoeba* y *Hartmannella*, suponen únicamente el 10% de las amebas identificadas en aguas y *D. polymorpha*, y que junto con *Naegleria* son los géneros de amebas de vida libre potencialmente patógenas más frecuentes en todo tipo de aguas.

En un estudio previo realizado en la Comunidad Autónoma de Aragón a 83 muestras pertenecientes a los ríos Júcar y Ebro y recogidas en embalses que suministran agua a plantas de potabilización, se aislaron un total de 98 AVL y fueron morfológicamente clasificadas. De ellas 31 se identifican por PCR como *Acanthamoeba*, 22 como *Hartmannella* y 13 como *Naegleria* (García et al., 2013). Estos resultados difieren de los obtenidos en el presente estudio, si se considera el conjunto de amebas identificadas en agua y mejillón, ya que la presencia de *Naegleria* es superior, mientras que la de los géneros *Acanthamoeba* y *Hartmannella* es considerablemente menor. Si se analizan por separado los resultados obtenidos en aguas, tenemos una situación similar a la del estudio anteriormente mencionado en el que *Acanthamoeba*, *Hartmannella* y *Naegleria* aparecen con la misma frecuencia 33,33%. Esto puede indicar una preferencia de *Dreissena polymorpha* por el género *Naegleria* spp.

Otras AVL identificadas en el extracto del mejillón son *Vexillifera bacillipedes* (Sobrón y Caspe) descrita por Page, 1969 y no patógena; *Cercomonadida* (Sobrón), perteneciente al género Cercozoa, se trata de una ameba biflagelada y filtradora de bacterias abundante en suelo y agua cuyo movimiento se realiza por deslizamiento (Bass et al., 2009); *Protacanthamoeba bohémica* (Caspe) descrita en 2005 por Dikova et al., pertenece al género *Protacanthamoeba*.

Las amebas de vida libre pueden colonizar las redes de abastecimiento, debido a su resistencia a los productos químicos que se utilizan para desinfectar un peligro, especialmente si se encuentran en su forma quística (Delafont et al., 2014). Además las AVL juegan un importante papel como vehículos de transmisión de varios patógenos como *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium*, virus y hongos que se reproducen dentro del citoplasma de las amebas. Teniendo esto en cuenta, el principal riesgo es que las bacterias albergadas en el interior de las AVL no se ven afectadas por el tratamiento de desinfección, pudiendo incluso reproducirse en su interior, y pudiendo infectar finalmente el medio en el que se encuentran al ser liberadas al exterior. Por ello se considera a las AVL como verdaderos “Caballos de Troya”, capaces de transportar bacterias patógenas que colonicen ecosistemas y sistemas artificiales de agua.

En las muestras procedentes del embalse de La Sotenera se identifican las mismas bacterias (*Pseudomonas* spp. y *Legionella* spp.) tanto en el análisis directo del mejillón como en las amebas cultivadas de esa muestra, lo que puede indicar que en el análisis directo del mejillón se amplifican las que se encuentran en el interior de las amebas, pero posiblemente la bacteria se encuentra también acumulada en el mejillón.

En este modelo, el mejillón a merced de su capacidad para filtrar y acumular, habría almacenado bacterias y amebas, que a su vez, también transportan estas bacterias. Todos estos microorganismos estarían protegidos de la acción de los elementos externos y cuando el mejillón muere, se liberan siendo capaces de colonizar el medio. En este caso, las poblaciones se mantienen. Por otra parte, el hallazgo de bacterias y amebas diferentes en agua y mejillón es indicador de que en algún momento anterior las bacterias y amebas que se localizan en el

mejillón se encontraban presentes en el agua, constituyendo el mejillón y las amebas (en el caso ARB) una protección para el mantenimiento de estas poblaciones que colonizarán el ecosistema a la muerte del mejillón.

En el interior de las AVL únicamente se detecta *Legionella* spp. (en el 50% de las AVL identificadas) y *Pseudomonas* spp. (en el 40% de las AVL identificadas); *Mycobacterium* spp., que en el estudio realizado por García et al. en 2013 alcanza el 41,9% de las muestras de AVL, no se identifica en el interior de ninguna de las amebas cultivadas en este proyecto. Este mismo estudio encuentra *Pseudomonas* spp. en el 32,6% de las muestras, *Legionella* spp. en el 13,9% y *M. aeruginosa* en el 2,3% .

Legionella spp. supone un problema, cuando se encuentra en cualquier AVL sea patógena o no ya que consigue alcanzar los sistemas artificiales de agua como fuentes ornamentales, aspersores de agua o torres de refrigeración, donde esta bacteria puede quedar libre, colonizar los conductos y llegar a producir brotes de *Legionella* si alcanza elevadas concentraciones(Thomas et al., 2004)

La infección por *Pseudomonas* spp. (Sharma et al., 2013 et al.; Dini et al., 2000); es la que se ha encontrado más frecuentemente asociada a queratitis amebiana y tanto *Hartmannella* spp. (Abedkhozasteh, 2013) como *Acanthamoeba* spp. (Por et al., 2009) están descritas como productoras de queratitis.

En el caso de los análisis directos de las muestras, sí que se ha identificado tanto en el mejillón como en el agua *Mycobacterium* spp. En el caso del extracto de mejillón de la acequia de Rimer se identifica por secuenciación la especie *Mycobacterium nonchromogenicum* que es un colonizador poco común del epitelio humano y generalmente se considera no patógeno, pero que en ocasiones puede causar enfermedades humanas como infección pulmonar (Sawai et al., 2006).

Destacar así mismo la presencia de *Pseudomonas* y *Legionella* en amebas consideradas como no patógenas indicando que aunque estas amebas por sí mismas no constituyen un riesgo para la salud, sí que lo pueden suponer las bacterias que albergan en su interior.

Pero los mejillones cebrá no solo son capaces de acumular microorganismos, sino que los resultados obtenidos del análisis de metales muestran la gran capacidad del mejillón para acumular altas cantidades de algunos metales, que en otros seres vivos se consideran tóxicos. Además se observa que no existe una relación directa entre los datos de concentración de metales en agua y los obtenidos en *Dreissena polymorpha*; hecho que puede deberse a varios factores:

En primer lugar, ya se ha demostrado la capacidad acumuladora del bivalvo; en el caso de los metales, hay que diferenciar entre aquéllos que son elementos esenciales en la vida de estos organismos en pequeñas cantidades pero tóxicos en altas concentraciones, como por ejemplo cobre, hierro, manganeso o zinc; y aquéllos que no juegan un papel metabólico y son generalmente clasificados como tóxicos como por ejemplo cadmio, cromo, mercurio o plomo (Singh et al., 2011), en el caso de estos metales no esenciales en *Dreissena polymorpha* no se observa que se eliminen o la eliminación es muy lenta (Roditi et al., 2000). Los metales se acumulan principalmente en los sedimentos, se bioacumulan en la biota acuática y son biomagnificados a lo largo de toda la cadena alimentaria. Además, pueden tener, incluso en bajas concentraciones, posibles efectos nocivos sobre el medio ambiente, la fauna, los productos agrícolas y la salud humana (Alcaraz et al., 2010). Teniendo esto en cuenta, pueden existir aumentos puntuales en la concentración de metales en el agua que no quedan recogidos en la red de datos de los puntos de control, ya que no se realizan análisis diarios,

pero en cambio estos metales sí permanecen retenidos en el interior del mejillón; por este mismo motivo, muy probablemente tampoco hubiese existido correspondencia si se hubiera medido la concentración en el agua en el momento de la recogida, ya que el mejillón habrá acumulado metales en su interior durante todo su ciclo de vida.

Resultaría por lo tanto, interesante establecer unos valores de referencia para *Dreissena polymorpha* que permitan establecer si la calidad del agua en ese punto es la adecuada o no, ya que como se ha podido comprobar, los resultados obtenidos en zonas industrializadas como Flix y La Sotonera (embalse situado aguas abajo de la zona industrial de Sabiñánigo) son considerablemente más elevados que en zonas agrícolas. Esto significa que el mejillón cebrá es un biomarcador más que aceptable que nos permite conocer la calidad del agua en el punto donde se encuentra.

La Tabla 4-1 recoge los valores de metales hallados en *Dreissena polymorpha* en otro estudios. Los niveles en el embalse de Flix son similares a los referenciados en aguas contaminadas en zonas industriales; también se aproxima a estos valores los resultados obtenidos en La Sotonera, aguas arriba de este embalse se encuentra Sabiñánigo donde se sitúa un núcleo industrial. En el caso de la concentración de metales en la acequia de Rimer y el embalse de Sobrón son los resultados son más similares a los obtenidos en los lugares no contaminados de las referencias bibliográficas.

En los resultados obtenidos para arsénico los valores más bajos se encuentran precisamente en las zonas más contaminadas, esto puede ocurrir porque el aumento de concentración de arsénico no esté relacionada con la contaminación si no con los cambios de litología del suelo (Terrado et al., 2006); también hay que tener en cuenta que el embalses de Sobrón y la acequia de Rimer, son zonas ganaderas y agrícolas en las que se pueden producir residuos con contenidos de arsénico debido a su presencia en herbicidas, fungicidas, insecticidas y fosfatos que contienen arsénico, y a la utilización del ácido arsánico como suplementación mineral de los piensos en la alimentación de cerdos y aves para promover su crecimiento.

También se encuentran valores más elevados de cadmio en Sobrón y la acequia de Rimer, zonas de uso agrícola en las que el cadmio puede estar relacionado con la utilización fertilizantes fosfatados, en los que se emplea este metal; en el caso de Sobrón se corresponde el resultado más elevado en *Dreissena polymorpha* con el más alto recogido en los puntos de control de calidad de aguas.

En los metales como cobre y zinc su elevada concentración no está únicamente vinculada con la contaminación ya que, como se puede observar, los valores de éstos son altos en todas las localizaciones aunque, generalmente, aparecen concentraciones más elevadas en las zonas contaminadas de la bibliografía y el estudio. El cobre es un constituyente esencial en la hemocianina del molusco y el zinc está implicado en la formación y función de varias enzimas. Ambos son por tanto oligoelementos esenciales que dependen también de la concentración exterior y que en concentraciones adecuadas son regulados por el mejillón cebrá pero en altas resulta tóxico para los bivalvos (Gundacker, 1998).

Ocurre lo mismo con el manganeso y el hierro, que se encuentran entre los elementos esenciales para la vida de estos organismos en pequeñas cantidades, pero se consideran tóxicos en altas concentraciones (Rzymiski et al., 2014).

En el caso del manganeso, resalta la diferencia de concentración de este metal entre los embalses de Flix (72,89 µg/g) y Sobrón (16,43 µg/g). Comparando con los datos de manganeso obtenidos por Alcaraz en 2010 en zonas no contaminadas 48,32-82,17 µg/g y los de áreas contaminadas 305,07-518,31 µg/g, se puede concluir que no son resultados

preocupantes, aunque sí que de nuevo, en el caso del manganeso, existe diferencia entre los lugares que sufren contaminación y los que no.

El hierro detectado en las muestras oscila entre 353,08 $\mu\text{g/g}$ en Sobrón y 1287 $\mu\text{g/g}$ en Flix, no se corresponde con los resultados obtenidos en los puntos de control en aguas ya que la concentración más elevada en el medio acuático se presenta en La Sotonera, el segundo valor más alto en *D. polymorpha* y el dato de concentración en aguas obtenido en Flix es el más bajo de los que se tiene información (no se analiza hierro en el punto de control escogido para Sobrón). Si se compara con los resultados obtenidos en un estudio realizado en las glándulas digestivas del mejillón de agua salada *Mytilus galloprovincialis*, en la zona no contaminada (Forte dei Marmi) la concentración es $524 \pm 76,2 \mu\text{g/g}$ y en la contaminada (Scarolino) $782 \pm 52,7 \mu\text{g/g}$ (Betti et al., 2002), los resultados obtenidos en Flix y La Sotonera son más elevados, lo que podría estar relacionado con los residuos industriales que afectan a ambas zonas.

Las concentraciones más altas de níquel, se encuentran en la Sotonera (18,64 $\mu\text{g/g}$) y Flix (8,7 $\mu\text{g/g}$), comparando con los datos de la Tabla 4-1 los valores en las zonas no contaminadas varían entre 4,2-12,1 $\mu\text{g/g}$ y entre 7,4-37,7 $\mu\text{g/g}$ en las zonas que si lo están, estos datos coinciden con los obtenidos en este estudio, ya que los resultados obtenidos en Sobrón y la acequia de Rimer se sitúan dentro del rango de valores de 4,2-12,1 $\mu\text{g/g}$.

La presencia de plomo, mercurio y cromo están únicamente vinculadas la acción humana y la contaminación que esta produce. De acuerdo con esto, el plomo presenta un resultado típico de zonas contaminadas en el embalse de Flix y en La Sotonera la concentración es más alta que en los otros dos puntos de muestreo (Sobrón y Caspe) pero no alcanza los datos de zonas contaminadas obtenidos en bibliografía.

Los resultados de mercurio muestran su valor más elevado en Sobrón en primer lugar, seguido de Flix donde se hubiese esperado el resultado más alto, ya que este metal forma parte de la composición del vertido residual de la industria allí emplazada. La concentración de mercurio en Sobrón, podría estar relacionada con las industrias productoras de fertilizantes situadas en los alrededores del embalse; su proceso de producción crea subproductos de mercurio que se encuentran también en pequeñas cantidades en producto fertilizantes; estos productos residuales pueden contener altos niveles de mercurio en el aire y el agua si no se tratan adecuadamente.

El análisis de los resultados de cromo merece especial atención debido a la concentración de este metal detectada en La Sotonera 67,26 $\mu\text{g/g}$ muy superior al valor más alto encontrado en bibliografía 4,97 $\mu\text{g/g}$ y los obtenidos en los demás puntos de muestreo. Los resultados de cromo en aguas en el punto de control escogido para el estudio de calidad de aguas en la Sotonera se muestran en la Tabla 3-11 y son inferiores a 0,0020 mg/L durante los tres años anteriores a la recogida de la muestra. El origen de este vertido se podría encontrar en los residuos industriales producidos en Sabiñánigo aguas arriba del embalse de La Sotonera. Allí el control que la CHE realiza sobre el cromo en aguas es mucho mayor que en otras estaciones, cada 2-3 días; analizando los datos de cromo en aguas en esta estación de control (904) durante los tres últimos años, se obtiene un rango de valores que oscila entre 0,0020-0,0322 mg Cr/L. Se ha demostrado que a pesar de que el mejillón cebra muestra una velocidad de captación del cromo lenta, es un organismo muy adecuado para su monitorización (Soto et al., 2010). Por lo que teniendo todo esto en cuenta, se puede concluir que aunque el contenido de cromo en aguas sea inferior al permitido por la normativa:

- RD 60-2011: El cromo aparece como sustancia preferente, con un valor medio anual que debe ser inferior a 0,005 mg/L para Cr VI e inferior a 0,050 mg/l para Cr.

- Orden de 11 de mayo de 1988: El cromo total debe ser inferior a 0,050 mg/L para que se permita la potabilización del agua.

Este metal queda acumulado en el interior del mejillón cebrá, en concentraciones mucho más elevadas que las del agua, suponiendo un grave problema, ya que una vez que el ciclo de vida de los bivalvos finalice, este cromo se liberará al exterior y pasará a formar parte de la masa de aguas.

Otros resultados como los obtenidos para aluminio, cesio, torio y antimonio no tienen datos en agua ni en bibliografía que permitan una comparación, pero analizando las diferencias de concentración entre unos puntos y otros se observa que de nuevo los valores más altos en los cuatro metales se encuentra en Flix, seguidos por el embalse de La Sotonera, a excepción del antimonio que en ese embalse no alcanza el mínimo de detección. Son especialmente elevados los 14447,86 µg/g de aluminio obtenidos en Flix, más de quince veces superior que el menor resultado del estudio para este metal (100,19 µg/g en Sobrón); el aluminio es uno de los metales que se encuentran en mayor proporción en los lodos industriales que allí se encuentran.

Con todo esto, se puede concluir, que el mejillón cebrá es un bioacumulador más que aceptable que nos permite conocer las sustancias que se vierten en el lugar donde se recogen o que se han vertido con anterioridad y han quedado retenidas en su interior, presentando resultados de concentración de metales en su interior mucho más elevados que los detectados en el agua, representando un grave peligro para el ecosistema y la salud una vez que estos bivalvos mueren liberando al exterior los metales retenidos. A la vez que actúan como indicadores de la presencia en algún momento anterior de concentraciones altas de estos metales en aguas.

Tabla 4-1 Resumen de los resultados obtenidos en otros estudios del análisis de metales pesados en *D. polymorpha*.

Localización	As	Cd	Pb	Hg	Cr	Cu	Ni	Zn	Mn	Referencias
Agua no contaminada										
Lago Garda, Italia		0,78±0,43	1,96±0,48	0,065±0,006	2,87±0,28	18,1±3,6	12,1±2,4	158±27		Camusso et al., 2000
Lago Lugano, Italia		0,6±0,15	2,46±0,72	0,049±0,002	2,03±0,19	26,3±8,5	11,9±1,7	163±13		Camusso et al., 2000
Lago Oneida, USA		0,68	1,03	0,05	1,55	4,6	4,2	99,4		Secor et al., 1933
E. de Mequinenza, España	5,77±0,11	0,30±0,03	0,86±0,01	0,04±0,01	2,52±0,14	8,37±0,08	7,01±0,07	78,98±0,98	48,32±0,48	Alcaraz et al., 2010
Marnay-sur-Seine, Francia		0,23			1,03	2,42	4,39	246,19		Bourgeault et al., 2011
E. de Ribaraja, España	6,19±0,12	0,31±0,03	0,50±0,15	0,10±0,03	0,62±0,15	7,91±1,18	9,77±1,68	92,50±9,56		Faria et al., 2009
Groß Enzersorfer Arm, Austria		0,71±0,30	0,22±0,08			7,6±0,4		111±15		Gundacker, 1998
Agua contaminada										
Lago Como, Italia		2,06±0,93	3,08±0,96	0,053±0,006	4,55±0,41	14,6±3,0	24,2±1,7	247±10		Camusso et al., 2000
Lago Maggiore, Italia		3,44±0,23	5,87±0,71	0,158±0,007	4,97±0,88	25,2±1,0	18,2±1,4	346±22		Camusso et al., 2000
Lago Onondaga, USA		1,71	1,24	0,2	2,45	10,2	7,4	94,4		Secor et al., 1933
Triel-sur-Seine, Francia		1,51			7,2	18,4	7,23	246,19		Bourgeault et al., 2011
E. de Flix (meandro aguas abajo), España	4,38±0,14	2,34±0,03	1,40±0,13	0,56±0,01	3,35±0,034	21,13±2,27	14,94±0,24	100,44±199	518,31±53,94	Alcaraz et al., 2010
E. de Flix (meandro aguas abajo), España	5,35±0,03	3,96±0,13	0,77±0,09	0,87±0,01	1,3±0,05	30,52±2,38	37,77±7,12	136,38±13,43		Faria et al., 2009
E. de Flix (cerca del vertido), España	4,84±0,08	1,82±0,42	0,71±0,001	3,01±0,1	0,99±0,01	35,75±0,90	25,34±2,49	129,83±5,29		Faria et al., 2009
Presente estudio										
Embalse de La Sotonera	3,91	0,62	0,58	<0,08	67,26	13,37	18,64	97,49	40,19	
Embalse de Flix	4,13	0,64	1,78	0,10	4,65	13,06	8,7	110,5	72,89	
Embalse de Sobrón	6,59	2,51	0,19	0,15	3,38	8,09	5,85	98,38	16,43	
Acequia de Rimer (Caspé)	7,5	1,28	0,45	<0,08	2,68	7,17	7,16	117,73	41,39	

Si se compara todo esto con los resultados obtenidos del estudio de calidad del agua de acuerdo a La Orden del 11 Mayo de 1988 relativa a las aguas prepotables, realizado a partir de los datos ofrecidos por las estaciones de control de la CHE, se observa que todos los parámetros, a excepción de salmonelas, se clasifican como categoría A1 durante los tres años en todos los puntos de análisis, lo que significa que se encuentran en el agua en una concentración que se considera adecuada. Entre estos parámetros clasificados como A1, se encuentran varios de los metales analizados en el mejillón y que en ocasiones dan unos resultados de concentración altos, es decir, que aunque su concentración obtenida en los análisis de aguas pueda resultar adecuada, no significa que estos bivalvos no tengan retenidos en su interior elevadas concentraciones del metal en cuestión, ya que como se ha dicho anteriormente, podría estar relacionado con vertidos realizados con anterioridad.

Los resultados de ausencia de salmonelas en 1L, no coinciden con los obtenidos en la experimentación del presente proyecto, ya que se hace recuento de colonias de *Salmonella* spp. en todas las muestras. Esto podría estar relacionado con el hecho de que la recogida de ejemplares no se realiza en el mismo sitio exacto en el que se localizan las estaciones de control de la CHE, si no que existe una distancia de unos pocos km entre ambas localizaciones (ANEXO G.), tampoco el análisis se realiza el mismo día, hecho que probablemente también influya en esa diferencia.

Resaltar además, la diferencia en el estudio del embalse de Sobrón entre los años 2012-2013 (a priori A1) y el 2014 (A3), en el que se toma el resultado de salmonelas de la experimentación, decir, presencia en 1L. Este hecho pone de manifiesto que el resultado del estudio de calidad de aguas en este punto para los dos primeros años no es concluyente, ya que falta información de varios parámetros, entre ellos salmonelas que en todos casos anteriores ha marcado la calidad del agua. Es decir, el resultado de calidad A1 en 2013 y 2013 únicamente indica la calidad de los parámetros que se han podido analizar.

Finalmente, es preciso preguntarse qué influencia puede tener la alta concentración de algunos de estos metales en la selección de los microorganismos que quedan acumulados y viables en el interior del mejillón cebra, ya que es bien conocida la toxicidad de algunos de ellos para bacterias y protozoos, pero también los requerimientos de bacterias como *Legionella* y *Pseudomonas* para su crecimiento y supervivencia.

5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones a las que se llega tras la realización del presente proyecto son:

1. Es posible un mantenimiento adecuado de *Dreissena polymorpha* bajo condiciones de laboratorio mediante el control, dentro de los rangos adecuados, de los principales parámetros físico-químicos que influyen en su desarrollo. Sin embargo, estas condiciones adecuadas para el crecimiento no aseguran también la cría en cautividad de nuevos ejemplares, ya que la sensibilidad de las larvas es mucho mayor.
2. Se ha demostrado la acumulación de bacterias en el interior del mejillón cebra, determinada por factores como el tamaño de la misma y su metabolización, haciendo que a pesar de que exista relación entre la concentración en el tejido del bivalvo y la del agua natural, esta no es directa e igual en todas las bacterias, observándose las mayores diferencias en *E. coli*. Esto hace de *Dreissena polymorpha* un bioindicador semi-cuantitativo de calidad microbiológica del agua, ya que muestra resultados elevados de la concentración bacteriana su interior, si también lo son en el agua o lo han sido anteriormente, quedando retenidas en su interior.
3. Se demuestra la capacidad del mejillón cebra para la acumulación de protozoos. Aunque no se han encontrado *Cryptosporidium* spp. ni *Giardia duodenalis* en ninguna de las muestras, si se encuentran AVL, habiendo identificado diferentes géneros simultáneamente en la misma muestra; además no existe correspondencia entre los géneros identificados en el mejillón y los del agua, con una doble interpretación cuando son liberadas al exterior: una ambiental por la posibilidad de modificar las poblaciones que conforman un nicho ecológico y otra sanitaria si las amebas retenidas fuesen patógenas para el ser humano y animales, ya que su posibilidad de colonización quedaría latente.
4. El 50% de las amebas aisladas presentan en su interior *Legionella* spp. y el 40% *Pseudomonas* spp. a las que confieren protección frente a los desinfectantes más utilizados, permitiendo incluso que se reproduzcan en su interior. El principal riesgo que esto conlleva, es que dichas bacterias pueden infectar el medio en el que se encuentran al ser liberadas al exterior, colonizando ecosistemas y sistemas artificiales del agua; suponiendo en este caso, un riesgo para la Salud Pública si se alcanzasen concentraciones elevadas de las mismas.
5. En la capacidad de acumulación de metales se observa que existe correspondencia entre los metales de mayor concentración en cada punto de muestreo, por la actividad que allí se desarrolla, y la obtenida en el interior del mejillón. Teniendo en cuenta también, que la capacidad de eliminación de metales tóxicos del mejillón cebra es muy lenta o prácticamente nula, se demuestra que el bivalvo es un

bioacumulador que permite conocer las sustancias que se vierten o se han vertido con anterioridad quedando retenidas en su interior y presentando concentraciones mucho más elevadas en su tejido que en el agua, por lo que puede resultar de utilidad como indicador de calidad del agua en biota. Esto supone, además, un grave riesgo para los ecosistemas, ya que se produce una redistribución de los contaminantes, y para la Salud Pública a través de una doble vía: la liberación al medio de los metales retenidos en su interior una vez que mueren y la posibilidad de que se produzca una transferencia a niveles tróficos superiores.

6. Destacar la utilidad de estos bivalvos para analizar el estado ecológico de una localización concreta, ya que una vez que se fija al sustrato, permanece en él almacenando en su interior tanto microorganismos como contaminantes del agua que por allí transcurre. De esta manera, proporciona información no sólo de la situación actual del medio si no de posibles vertidos realizados con anterioridad. Además, debido a su capacidad de concentración, son capaces de mostrar elevadas concentraciones de contaminantes y patógenos que sin embargo en el agua no proporcionan resultados preocupantes, como se observa en el estudio de calidad de aguas, ya que aparecen diluidos; pero en cambio, se acumulan en la biota a lo largo del tiempo, con el riesgo que ello supone.

Con los resultados obtenidos en este proyecto, se pueden proponer las siguientes líneas de trabajo futuro:

- Estudio de la acumulación de cada una de las bacterias por separado, analizando, en un amplio número de localizaciones de distinta calidad microbiológica, su concentración en el agua y el mejillón, y comprobar si existe una buena correlación agua/mejillón para cada una de ellas.
- Analizar si existe una preferencia de acumulación según el género de la AVL mediante técnicas que permitan su cuantificación, con el fin de detectar si presenta ésta preferencia por algún género o especie descrito como patógeno.
- Establecer unos valores de referencia de concentración de metales en *Dreissena polymorpha* que fomente su utilidad como bioindicadores de calidad de aguas.
- Estudio del comportamiento de *D. polymorpha* frente a las bacterias detectadas en el ejemplar muerto, *Citrobacter brakki*, *Pseudomonas* spp. y *S. maltophilia*, que permita determinar con seguridad si alguna de ellas ha podido causar la muerte de los ejemplares multiplicándose en su interior, de manera similar a lo que ocurre con algunas ARB en las AVL; y si así fuese, la posible utilidad de esta bacteria para el control de la invasión del mejillón cebra.
- Estudiar la posible asociación entre los metales y los géneros y especies de otros microorganismos acumulados en él.

6. BIBLIOGRAFÍA

- 📖 Abadías J. "Presencia y acumulación de microorganismos potencialmente patógenos en el mejillón cebr de aguas superficiales de Aragón". Trabajo Fin de Máster. Universidad de Zaragoza, 2013.
- 📖 Abedkhozasteh H, Niyyati M., Rahimi F., Heidari M., Farnia S., Rezaeian M. First Report of *Hartmannella* keratitis in a Cosmetic Soft Contact Lens Wearer in Iran. Iran J Parasitol. 2013;8(3):481-5
- 📖 Alcaraz C., Caiola N., Ibáñez C. Bioaccumulation of pollutants in the zebra mussel from hazardous industrial waste and evaluation of spatial distribution using GAMs, Science of The Total Environment, Volume 409, Issue 5, 1 February 2011, Pages 898-904, ISSN 0048-9697
- 📖 Bass D., Howe A.T., Mylnikov A. P., Vickerman K., Chao E.E., Smallbone J. E., Snell J., Cabral Jr C., Cavalier-Smith T., Phylogeny and Classification of Cerc Paracercomonas, and Cavernomonas gen. nov., Protist, Volume 160, Issue 4, November 2009, Pages 483-521, ISSN 1434-4610
- 📖 Betti L., Giannaccini G., Nigro M., Dianda S., Gremigni V., Lucacchini A. Studies of peripheral benzodiazepine receptors in mussels: comparison between a polluted and a nonpolluted site, Ecotoxicology and Environmental Safety, Volume 54, Issue 1, January 2003, Pages 36-42, ISSN 0147-6513
- 📖 Bourgeault A., Gourlay-Francé C., Priadi C., Ayrault S., M.H. Tusseau-Vuillemin. Bioavailability of particulate metal to zebra mussels: Biodynamic modelling shows that assimilation efficiencies are site-specific, Environmental Pollution, Volume 159, Issue 12, December 2011, Pages 3381-3389, ISSN 0269-7491
- 📖 Calvo L., Gregorio I., García A., Fernández M.T., Goñi P., Clavel A., Peleato M.L., Fillat M.F. A new pentaplex-nested PCR to detect five pathogenic bacteria in free living amoebae. Water Res. 2013; 47(2):493-502.
- 📖 Claudi R., Mackie G.L. "Practical Manual for Zebra Mussel Monitoring and Control". Lewis, Boca Raton, FL. 1994.
- 📖 Camusso M., Balestrini R., Binelli A. Use of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) to assess trace metal contamination in the largest Italian subalpine lakes. Chemosphere 2001. 44:263-270
- 📖 Clesceri L.S., Eaton A.D., Rice E.W., Greenberr A.E. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" 21ª edición. APHA, AWWA, WEF, 2005.
- 📖 Cia Abaurre, I. "Ecología del mejillón cebr (*Dreissena polymorpha*) en el tramo inferior del río Ebro. Problemática y posibilidades de control". Tesis doctoral. Universidad de Lleida 2008
- 📖 Corsaro D., Müller K.D., Michel R. Molecular characterization and ultrastructure of a new amoeba endoparasite belonging to the *Stenotrophomonas maltophilia* complex, Experimental Parasitology, Volume 133, Issue 4, April 2013, Pages 383-390, ISSN 0014-4894
- 📖 Dini L.A.; Cockinos C., Frea J.A., Niszl I.A. Markus M.B. Unusual case of *Acanthamoeba polyphaga* and *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in a contact lens wearer from Gauteng, South Africa. J Clin Microbiol. 200;9(2):826-829
- 📖 Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas,

- por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE y 86/280/CEE del Consejo, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE.
- 📖 Directiva 2009/90/CE de la Comisión, de 31 de julio de 2009, por la que se establecen, de conformidad con la Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las especificaciones técnicas del análisis químico y del seguimiento del estado de las aguas.
- 📖 DIRECTIVA 2013/39/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 12 de agosto de 2013, por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias.
- 📖 prioritarias en el ámbito de la política de aguas
- 📖 Dykova I., Veverkova-Fialova M., Fiala I., Dvorakova, H. (2005). *Protoacanthamoeba bohemica* sp. n., isolated from the liver of tench *Tinca tinca* (Linnaeus, 1758). *Acta Protozool* 44, 369–376.
- 📖 Durán C., Viamonte A. Bernat Y., Diez-Antoñanzas L., Jiménez C., Anadón A. Mejillón cebrá en aguas de la cuenca del Ebro. Ed. Confederación Hidrográfica del Ebro 2007.
- 📖 Durán C., Touya V., Anadón A. Lanao M. Afección y control del mejillón cebrá en la cuenca del Ebro. *Tecnología del Agua* 2009, 307:20-28
- 📖 Ey P.L., Andrews R.H., Mayrhofer G. Differentiation of major genotypes of *Giardia Intestinalis* by polymerase chain reaction analysis of gene encoding a trophozoite surface antigen. *Parasitology*. 1993; 106(4):347-56.
- 📖 Faria M., Huertas D., Soto C. X., Grimalt J O., Catalan J., Riva M.C., Barata C. Contaminant accumulation and multi-biomarker responses in field collected zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and crayfish (*Procambarus clarkii*), to evaluate toxicological effects of industrial hazardous dumps in the Ebro river (NE Spain), *Chemosphere*, Volume 78, Issue 3, January 2010, Pages 232-240, ISSN 0045-6535
- 📖 Fernández Rodrigo M.T. “Caracterización molecular de Amebas de Vida Libre e identificación de otros parásitos en aguas de red de la provincia de Zaragoza. Asociación con otros microorganismos y riesgos para la Salud Pública. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.
- 📖 Ferreras E., Torres C., Galetto L., Fruit removal of an invasive exotic species (*Ligustrum lucidum*) in a fragmented landscape, *Journal of Arid Environments*, Volume 72, Issue 9, September 2008, Pages 1573-1580, ISSN 0140-1963
- 📖 García A., Goñi P., Cieloszyk J., Fernández M.T., Calvo-Beguería L., Rubio E., Fillat M.F. Pelato M.L., Clavel A. Identification of Free-Living Amoebae and Amoeba-Associated Bacteria from Reservoirs and Water Treatment Plants by Molecular Techniques. *Environmental Science & Technology*. 2013, 47, 3132-3140.
- 📖 Goldschmidt P., Degorge S., Saint-Jean C., Year H., Zekhnini F., Batellier L., Laroche L., Chaumeil C. Resistance of *Acanthamoeba* to classic DNA extraction methods used for diagnosis of corneal infections. *Br J Ophthalmol*. 2008; 92(1):112-5. Erratum in: *Br J Ophthalmol*. 2009; 93(3):418. Year, H [corrected to Yera, H].

- 📖 González de Buitrago J.M., 15 - Electroforesis, In Técnicas y Métodos de Laboratorio Clínico (Terza edizione), edited by José Manuel González de Buitrago, Elsevier España, 2010.
- 📖 Graczyk T.K., Macogliese 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 2001, 87: 231-234
- 📖 Graczyk T.K., Conn D.B., Macogliese D.J., Gracyk H. De Lafontaines Y. Accumulation of human waterborne parasites by zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and Asian freshwater calms (*Corbicula fluminea*). Parasitology Research 2003, 89:107-112.
- 📖 Gundacker C., Tissue-specific heavy metal (Cd, Pb, Cu, Zn) deposition in a natural population of the zebra mussel *Dreissena polymorpha pallas*, Chemosphere, Volume 38, Issue 14, June 1999, Pages 3339-3356, ISSN 0045-6535
- 📖 Gupta R., Rauf S.J., Singh S., Smith J., Agraharkar M.L. Sepsis in a renal transplant recipient due to *Citrobacter braakii*. Southern Medical Journal. 2003 August;96(8):796-8
- 📖 Huang S. W., Hsu B. M. Survey of *Naegleria* from Taiwan recreational waters using culture enrichment combined with PCR, Acta Tropica, Volume 119, Issues 2–3, August 2011, Pages 114-118, ISSN 0001-706X
- 📖 Jović M., Stanković S., Human exposure to trace metals and possible public health risks via consumption of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic coastal area, Food and Chemical Toxicology, Volume 70, August 2014, 241-251.
- 📖 Kao P-M., Hsu B-M., Hsu T-K., Chiu Y-C., Chang C-L., Ji W-T., Huang S-W., Fan C-W. Application of TaqMan qPCR for the detection and monitoring of *Naegleria* species in reservoirs used as a source for drinking water. Parasitology Research. October 2014, Volume 113(10), pp 3765-3771
- 📖 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.
- 📖 McLaughlan C., Aldridge D.C., Cultivation of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) within their invaded range to improve water quality in reservoirs, Water Research, Volume 47, Issue 13, 1 September 2013:4357-4369
- 📖 Monis P.T., Andrews R.H., Mayrhofer G., Ey P.L. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. Mol Bio Evol. 1999; 16(9):1153-44.
- 📖 Monis P.T., Mayrhofer G., Andrews R.H., Homan W.L., Limper L., Ey P.L. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. Parasitology. 1996; 112(Pt 1):1-12.
- 📖 Navarro A., Campos B., Barata C., Piña B. Transcriptomic seasonal variations in a natural population of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*), Science of The Total Environment, Volumes 454–455, 1 June 2013, Pages 482-489, ISSN 0048-9697
- 📖 Nichols S.J. "Maintenance of 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 en 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 26461-2:1986. Calidad del agua. Detección y recuento de los esporos de microorganismos anaerobios sulfito reductores (clostridia). Parte 2: método de filtración por membrana.
- 📖 Norma UNE-EN ISO 19250. Calidad del agua. Detección de *Salmonella* spp.
- 📖 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.
- 📖 Orden de 11 de mayo de 1988, sobre características básicas de calidad que deben ser mantenidas en las corrientes de agua superficiales cuando sean destinadas a la producción de agua potable.
- 📖 Page F.C. Mitosis and pseudopod formation in *Vexillifera bacillipedes* n. sp., a Mayorellid Amoeba. Transactions of the American Microscopical Society. July 1969; 88(3):394-400.
- 📖 Page F.C. A new key to freshwater and soil Gymnamoebae with instruction for culture. Freshwater Biological Association, Ambleside. 1988.
- 📖 Palau A., Durán C., Romeo R. Vulnerabilidad de las masas de agua frente al mejillón cebra. Ingeniería del agua 2008. 15(4):267-280
- 📖 Palos Ladeiro M., Aubert D., Villena I., Geffard A., Bigot A. Bioaccumulation of human waterborne protozoa by zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): Interest for water biomonitoring, Water Research, Volume 48, 1 January 2014, Pages 148-155, ISSN 0043-1354
- 📖 Pèlandakis M., Pernin P. Use of multiplex PCR and PCR restriction enzyme analysis for detection and exploration of the variability in the free-living amoeba *Naegleria* in the environment. Appl Environ Microbol. 2002; 68(4):2061-5.
- 📖 Por Y.M., Mehta J.S., Chua J.L., Koh T.H., Khor W.B., Fong A.C. Lim J.W., Heng W.J., Loh R.S., Lim L., Tan D.T. *Acanthamoeba* keratitis associated with contact lens wear in Singapore. Am J Ophthalmol. 2007; 14(1):7-12.e2.
- 📖 Posso Duque D., Ghneim Herrera T. 2008. Uso de Marcadores para la Estimación de Diversidad Genética en Plantas. Ediciones IVIC.
- 📖 Real Decreto 60/2011, de 21 de enero, sobre las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas.
- 📖 Real Decreto 630/2013, de 2 de agosto, por el que se regula el Catálogo español de especies exóticas invasoras.
- 📖 Reeves MW, Pine L, Hutner SH, George JR, Harrell WK. Metal requirements of *Legionella Pneumophila*. J Clin Microbiol. 1981 Apr;13(4):688-95.
- 📖 REGLAMENTO (UE) 1143/2014 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 22 de octubre de 2014, sobre la prevención y la gestión de la introducción y propagación de especies exóticas invasoras.
- 📖 Robert P. Hirt, Bryan Healy, Charles R. Vossbrinck, Elizabeth U. Canning and T. Martin Embley. A mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorpha necatrix*: molecular

- evidence that microsporidia once contained mitochondria. *Current Biology*. 1997. 7:995-998.
- 📖 Roch N., Maurin M. Antibiotic susceptibilities of *Legionella pneumophila* strain Paris in THP-1 cells as determined by real-time PCR assay. *J. Antimicrob Chemother.* 2005; 55(6):866-71.
- 📖 Ruíz-Altaba C., Jiménez P. J., López M.A. El temido mejillón cebrá empieza a invadir los ríos españoles desde el curso bajo del río Ebro. *Quercus* 2001. 188: 50-51
- 📖 Rzymiski P., Niedzielki P., Klimaszuk P., Poniedzialek B. Bioaccumulation of selected metals in bivalves (*Unionidae*) and *Phragmites australis* inhabiting a municipal water reservoir. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2014, 186, 3199-3212.
- 📖 Sawai T., Inoue Y., Doi S., Izumikawa K., Ohno H., Yanagihara K., Higashiyama Y., Miyazaki Y., Hirakata Y., Tashiro T., Kohno S. A case of *Mycobacterium nonchromogenicum* pulmonary infection showing multiple nodular shadows in an immunocompetent patient, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Volume 54, Issue 4, April 2006, Pages 311-314, ISSN 0732-8893
- 📖 Schroeder J.M., G. C. Booton, J. Hay, I.A. Niszl, D. V. Seal, M. B. Markus, P. A. Fuerst, and T.J. Byers. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001, 39: 1903-1911.
- 📖 Sharma R., Jhanji V., Satpathy G., Sharna N, Khokhar S. Agarwar T. Coinfection with *Acanthamoeba* and *Pseudomonas* in contact lens-associated keratitis. *Optom Vis Sci*. 2013 Feb; 90(2)
- 📖 Silverman H., Achberger E.C., Lynn J.W., Dietz T.H. Filtration and utilization of laboratory-cultured bacteria by *Dreissena polymorpha*, *Corbicula fluminea*, and *Carunculina texasensis*. *Biol. Bull* 1995. 189: 308-319
- 📖 Smirnov A.V., Chao E., Nassonova E.S., Cavalier-Smith T. A Revised Classification of Naked Lobose Amoebae (Amoebozoa: Lobosa). *Protist*. 2011; 162(4): 545-570.
- 📖 Smirnov A., Nassonova E., Berney C., Fahrni J., Bolivar I., Pawlowski J. Molecular Phylogeny and Classification of lobose amoebae. *Protist*. 2005; 156(2):129-42.
- 📖 Smirnov A. and Goodkov A. An illustrated list of basis morphotypes of Gymnamoebia (Rhizopoda, Lobosea). *Protistology*. 1999; 1:20-29.
- 📖 Smirnov A.V., Chao E.E., Nassonova E., Cavalier-Smith T. Revised classification of non-mycetozoa naked lobose amoebae (Amoebozoa). *Protist*. 2011; 162:545-570.
- 📖 Soto D.X., Roig R., Gacia E., Catalan J. Differential accumulation of mercury and other trace metals in the food web components of a reservoir impacted by a chlor-alkali plant (Flix, Ebro River, Spain): Implications for biomonitoring, *Environmental Pollution*, Volume 159, Issue 6, June 2011, Pages 1481-1489, ISSN 0269-7491
- 📖 Sulaiman I.M., Fayer R., Bern C., Gilman R.H., Trout J.M., Schantz P.M., Das P., Lal A.A., Xiao L. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9(11):1444-52.
- 📖 Terrado M., Barceló D., Tauler R. Identification and distribution of contamination sources in the Ebro river basin by chemometrics modelling coupled to geographical information systems, *Talanta*, Volume 70, Issue 4, 15 November 2006, Pages 691-704, ISSN 0039-9140

- 📖 Thomas V., Bouchez T., Nicolas V., Robert S., Loret J.F., Lévi Y. Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implications in *Legionella* persistence. *Journal of Applied Microbiology* 2004. 97(5):950-63
- 📖 del Toro M.D., Rodríguez-Baño J., Martínez-Martínez L., Pascual A., Pérez-Canoa R., Perea E.J., Muniain M.A. Características epidemiológicas, clínicas y pronósticas de la infección por *Stenotrophomonas maltophilia*. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Vol.24 (1). Enero 2006. 4:9
- 📖 Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. 2007. Introducción a la microbiología. Ed. Médica Paramericana, 9ª Ed. ISBN: 978-95-0060-740-7.
- 📖 Tsvetkova N., Schild M., Panaiotov S., Kurdova-Mintcheva R., Gottstein B., Walochnik J. Aspöck H., Lucas M.S., Müller N. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitol Res.* 2004; 92(5): 405-13.
- 📖 Ugarteburu C. Presencia y acumulación de microorganismos indicadores de contaminación fecal en el mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*) de aguas superficiales de Aragón. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Zaragoza, 2013.
- 📖 Vathanodorn K., Parsons R.H. 1997. Bacteria as a direct foot source of zebra mussels. Section III: 19pp. In W.C. Nieder and J.R. Waldman (eds.) Final Reports of the Tibor T. Polgar Fellowship Program, 1996. Hudson River Foundation, New York.
- 📖 Voets J, Redeker E. S., Blust R., Bervoets L. Differences in metal sequestration between zebra mussels from clean and polluted field locations, *Aquatic Toxicology*, Volume 93, Issue 1, 4 June 2009, Pages 53-60, ISSN 0166-445X
- 📖 Walochnik J., Müller K.D., Aspöck H., Michel R. An endocytobiont harbouring *Naegleria* strain identified as *N. clarki* De Jonckheere, 1994 *Acta Protozool.*, 44 (2005), pp. 301–310
- 📖 Xiao L., Escalane L., Yang C. Sulaiman I., Escalante A.A., Montali R.J., Fayer R., Lal A.A. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites base on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65(4): 1578-83.