

ANEXOS

ANEXO A. DREISSENA POLYMORPHA

El mejillón cebra, científicamente denominado *Dreissena polymorpha*, es una especie descrita por primera en 1771 por Pallas.

- Clase: BIVALVIA, Linnaeus, 1758.
- Subclase: EULAMELIBRANCHIA, Neumayr, 1884.
- Orden: VENEROIDA, Adams, 1856.
- Suborden: DREISSENACEA, Gray, 1840.
- Familia: DREISSENIDAE, Gray, 1840.
- Género: *Dreissena*, S.1 van Beneden, 1835.
- Subgénero: *Pontodreissena*, Logvinenko y Starobogatov, 1966.
- Especie: *Dreissena polymorpha*, Palla 1771.

Los individuos de este molusco presentan una morfología característica, la forma de sus valvas es triangular y suele alcanzar unos 3 cm de longitud; su nombre común (mejillón cebra) hace referencia a la coloración de éstas con bandas alternas de color claro y oscuro en forma de zig-zag.

El ciclo biológico del mejillón cebra, de unos tres años de duración, presenta dos fases: la primera planctónica, es decir, libre en la masa de agua y la segunda bentónica, fijada al sustrato mediante el biso, formando extensos y densos racimos (Figura A-1). Tiene especial preferencia por aguas estancadas y con poca corriente, con velocidades inferiores a 1,5 m/s y se alimenta por filtración de materia en suspensión en un rango de temperaturas 5-30°C y un pH entre 8-9; pese a ello, esta especie destaca por su elevada tolerancia ya que aguanta entre 7 y 10 días fuera del agua y soporta también altas variaciones de temperatura y salinidad (Durán et al., 2007; 2009) No sobrevive cerca de los 0°C ni tampoco por encima de los 31-32°C, si bien estos límites no son estrictos dado que son posibles pequeñas desviaciones como consecuencia de la aclimatación de los individuos (Cia et al., 2008). La reproducción se interrumpe por debajo de los 10°C y por encima de los 28°C y el crecimiento se ralentiza por encima de los 25°C y por debajo de los 8-9°C. El rango térmico óptimo de crecimiento se encuentra entre 18 y 20°C, con el subóptimo entre 16-18°C y 21-24°C, según distintos autores (O'Neill, 1996; Claudi and Mackie, 1994).

Los adultos son sexos separados y normalmente mantienen un proporción 1:1. El ciclo comienza con la fertilización de los gametos, después pasan por una fase embrionaria durante 6-20 horas tras la que se transforma en larva trocófera; su desarrollo posterior da lugar a un estadio en el que comienza a visualizarse el velum, utilizado por la larva para alimentarse y para su desplazamiento, a los 2-9 días se forma una concha y pasa a ser larva velígera con forma de D, que a los 7-14 días y con la aparición de una región umbonal en la cocha se convierte en larva velígera. Tras esta fase, el velum se transforma en el aparato sinfonal, aparece el pie y comienzan a desarrollarse los órganos, lo que proporciona a la larva la capacidad de fijarse, denominándose ahora larva pedivelígera y una vez que se encuentra en un lugar adecuado para su fijación será larva plantígrada. Ya fijada, comienza una metamorfosis que dará lugar al individuo juvenil y posteriormente adulto. La tasa de crecimiento de estos dos estadios del ciclo de vida, está estrechamente ligada a factores ambientales, básicamente temperatura, velocidad del agua y disponibilidad del alimento (Claudi and Mackie, 1994).

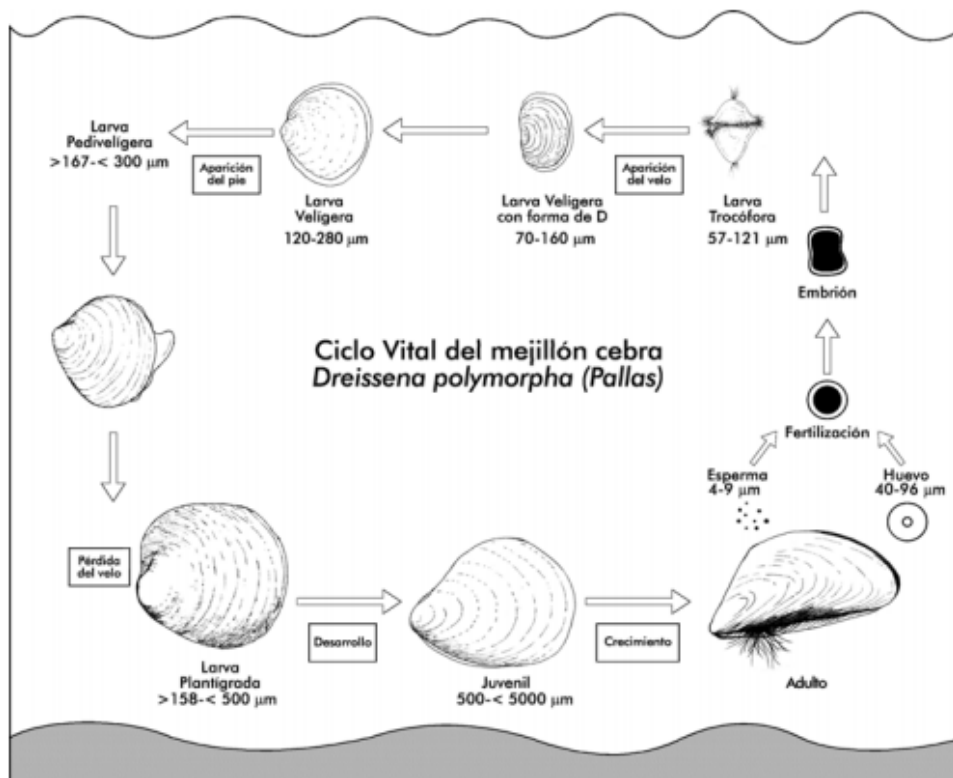


Figura A-1 Ciclo biológico de *Dreissena polymorpha* (Fuente: CEAM 2003)

El mejillón cebra se alimenta mediante filtración, extrayendo el material suspendido en el agua (seston): algas unicelulares, zooplacton, bacterias y detritus orgánicos diversos. Retiene preferentemente partículas de 15 a 40 µm, aunque este tamaño puede bajar hasta 0,7 µm. Un adulto puede filtrar entre 1 y 2,5 litros al día, lo que individualmente puede resultar no muy elevado si se compara con otros individuos moluscos de agua dulce, pero si se considera que esta especie forma densas poblaciones disponiéndose incluso en capas unos encima de otros, el volumen total de filtración puede resultar muy elevado.

El agua es captada a través del sifón inhalante del mejillón, de ahí las partículas menos de 40 µm son conducidas hacia la boca del mismo; mientras que las de mayor tamaño no son aprovechables y salen al exterior bien por el sifón exhalante o bien en las heces (Durán et al., 2007).

Su primera detección en España se produjo en 2001 en el tramo inferior del Ebro (Ruiz-Altava et al., 2001). Desde entonces, debido a su rápida capacidad de adaptación y sus características invasivas, su presencia se ha ido prodigando por toda la cuenca del Ebro, extendiéndose también a otras cuencas como la del río Júcar o el río Segura. El mejillón cebra, por lo tanto es un caso paradigmático de las consecuencias potencialmente devastadoras de la introducción accidental o intencional de especies exóticas en nuevos ecosistemas (Navarro et al., 2013). En la Figura A-2 se muestran las zonas actualmente afectadas por la presencia del mejillón cebra en la cuenca hidrográfica del Ebro.



Figura A-2 Mapa de aguas afectadas por la presencia de *Dreissena polymorpha* en la cuenca del Ebro. Mayo 2014 (Fuente: CHE)

El impacto que produce *Dreissena polymorpha*, no sólo afecta a la biodiversidad sino que también provoca impactos socioeconómicos en las zonas colonizadas. Los principales impactos que produce la especie son los siguientes (O'Neill, 1996; Claudi and Mackie, 1994):

- Incremento de la transparencia del agua debidos a la eliminación del seston y, como resultado, condiciones bentónicas más favorables a la proliferación de algas y macrófitas acuáticas, creando en ellas condiciones anóxicas e impidiendo la infiltración de la luz solar.
- Acumulación, biosedimentación y luego, deposición de materia orgánica de las heces y material de desecho.
- Desplazamiento y/o eliminación de las especies bénticas nativas como resultado de la competencia por el hábitat, comida, etc.
- Disminución de la disponibilidad de alimento y oxígeno para las especies autóctonas, que puede ocasionar la disminución de las poblaciones o incluso su desaparición.
- Cambios estructurales en las asociaciones del zooplacton por eliminación selectiva de algunas especies según su tamaño.
- Taponado de tuberías de agua en abastecimientos para localidades, agricultura, industrias y centrales de producción de energía, etc. pudiendo dañar incluso motores al introducirse en torres de refrigeración.
- Cubrimiento de casco de barcos y de otros sistemas de navegación.
- Gastos derivados de la prevención y la erradicación de los daños que ocasiona.
- Efectos sobre la Salud Pública y el medio ambiente (objeto de este Proyecto Final de Carrera), ya que son capaces de concentrar en su interior contaminantes químicos contribuyendo a su 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); pero también retienen y acumulan en su interior microorganismos procedentes del agua; entre los que se incluyen protozoos y hongos patógenos (Graczyk et al., 2001, 2003; McLaughlan et al., 2013, Palos Ladeiro et al., 2014), convirtiendo a *D. polymorpha* en un posible transmisor de enfermedades, ya que acumula estos microorganismos pudiéndolos expulsar más tarde en otro hábitat o en ese mismo, una vez el microorganismo ya no está presente en el agua.

ANEXO B. MICROORGANISMOS POTENCIALMENTE PATÓGENOS OBJETO DE ESTUDIO

Bacterias indicadoras de contaminación fecal

El control de los parámetros físico-químicos y microbiológicos resulta muy importante tanto en sistemas de depuración como de potabilización; sin embargo, es en estos últimos y en los sistemas de reutilización de aguas donde el factor de riesgo más importante está asociado a la exposición de agentes biológicos. El control de calidad microbiológica, requiere análisis dirigidos a determinar la presencia de microorganismos patógenos. La alternativa para realizar un control fiable, económico y rápido de la calidad microbiológica del agua es el uso de indicadores de contaminación fecal y son elegidos de acuerdo a los siguientes criterios (Lanao et al. 2012)

- Ser un constituyente de la microbiota intestinal.
- Ser relativamente inocuos para el hombre.
- Estar presentes siempre que existan agentes patógenos entéricos
- Fáciles de aislar y cuantificar, y presentarse en número elevado facilitando así su aislamiento e identificación.
- No multiplicarse en aguas naturales generando un resultado superior al real.
- Mantener un grado de eliminación durante el tratamiento similar al de los patógenos.

Ningún microorganismo reúne todas estas cualidades, por lo que no existe un indicador ideal. Además se ha demostrado la presencia de virus, oquistes y quistes de protozoos y esporos bacterianos en muestras de agua en ausencia de indicadores fecales. En consecuencia, su ausencia no garantiza necesariamente la calidad microbiológica de esta. Según el destino del agua, se eligen unos indicadores bacterianos u otros, en este proyecto, se analizan los que se muestran a continuación.

- *Clostridium perfringens*: Bacteria Gram positiva, anaerobia, inmóvil y formadora de esporas. Tienen forma de bacilo con un tamaño de 1-4 μm de media. Ampliamente distribuidas en la naturaleza y de origen no exclusivamente fecal. Se encuentra en el intestino del ganado porcino y bovino y de hombres sanos, pero a su vez *C. perfringens* tipo A y *C. perfringens* tipo C resultan patógenos para los humanos (generan toxiinfecciones alimentarias y enteritis necrótica respectivamente). Su principal característica es que sus esporos (forma de resistencia) sobreviven en el agua mucho más tiempo que los coliformes y pueden ser resistentes a los tratamientos de desinfección convencional si no se realizan de manera adecuada.
- *Enterococcus* spp.: Bacterias Gram positivas, anaerobias facultativas. No forman esporos y son relativamente tolerantes a varios antibacterianos de uso frecuente. Tienden a unirse en parejas o formando cadenas cortas. Son células esféricas u oviodes, de tamaño 0,6-2,0 x 0,6-2,5 μm . Está directamente relacionado con gastroenteritis, enfermedades respiratorias, conjuntivitis y dermatitis, entre otras.

- *Escherichia coli*: Bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa que forma parte del intestino del ser humano y animales homeotermos, residiendo también en aguas contaminadas y en cualquier otro medio que favorezca su aparición. Tiene forma de bacilo con un tamaño de 1,1 a 7 µm. Si no adquiere elementos genéticos virulentos actúa de forma natural, formando parte de la flora intestinal; y si lo hacen, producen gastroenteritis, infecciones urinarias y otras afecciones.
- *Salmonella spp.*: Bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa. Tienen forma de bacilo de tamaño 0,7-1,5 x 2-5µm. Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, siendo el hombre y los animales los principales reservorio.

Protozoos

Organismos unicelulares que en conjunto forman un grupo parafilético dentro del reino protista. Presentan orgánulos que tienen papel funcional de órganos. Presentan una gran variedad de tamaño, morfología, formas de nutrición y ciclo de vida en función del organismo que se trate. En este proyecto se analizan:

- *Cryptosporidium spp.*: Protista parásito al que se asocia con una enfermedad llamada cryptosporidiosis que es una zoonosis de transmisión feco-oral de amplia distribución mundial. Las especies que causan el 90% de cryptosporidiosis en humanos son *C. parvum* y *C. hominis*. La transmisión a través del agua se ve favorecida por la resistencia al cloro de los ooquistes, que son la forma infectante, La manifestación clínica más importante es la diarrea en humanos y animales, pudiendo llevar a la deshidratación y desequilibrio electrolítico, sobretodo en niños y pacientes inmunodeprimidos.
- *Giardia duodenalis*: Protozoo flagelado patógeno que parasita el tracto digestivo de humanos y otros mamíferos.. Los quistes son la forma resistente del parásito y responsables de la transmisión de la giardiosis, debido a su elevada resistencia y capacidad de supervivencia de varios meses. La infección se transmite de forma directa por ingestión de quistes en agua y alimentos contaminados, o por vía feco-oral.
- Amebas de Vida Libre (AVL): Son protozoos ubicuos, presentes en un gran número de hábitats, incluyendo aire, suelo, biofilms y fuentes de agua tanto naturales como antropogénicas, aunque algunas de ellas generan enfermedades en seres humanos actuando como parásitos oportunistas. Varias amebas patógenas pertenecientes a *Acanthamoeba*, *Naegleria* y en menor medida al género *Hartmannella* han sido encontrados en aguas abastecimiento, torres de refrigeración, aguas recreativas y aguas hospitalarias. La mayoría de la AVL tienen al menos dos estadios de desarrollo: trofozoíto y quiste, aunque algunas como el género *Naegleria* tiene tres: trofozoíto, quiste y forma flagelada que es transitoria. El trofozoíto es el estado metabólicamente activo que se alimenta de bacterias y se multiplica por fisión binaria. Los quistes son la forma de resistencia que sobreviven a condiciones adversas y resisten los métodos desinfectantes más utilizados.

Bacterias endosimbiontes de las AVL (ARB)

Como se ha dicho anteriormente, las amebas tienen a las bacterias como base nutricional, lo que supone un control ambiental de las mismas ya que las bacterias son fagocitadas por las AVL y digeridas en los fagolisosomas. Sin embargo, la interacción entre bacterias y amebas en algunos casos se caracteriza por una simbiosis en la que ambos microorganismos se benefician de la asociación; y en otros se produce un parasitismo, que termina con la liberación de la bacteria y la lisis de la ameba. Estas bacterias se denominan “Bacterias Resistentes a la Depredación de las amebas”.

Dentro de este grupo están las que permanecen en el interior de las amebas pero no se multiplican como algunas coiformes o *Mycobacterium*, las que se reproducen en su interior como *Vibrio cholerae* pero no destruyen la célula y las que sí lo hacen y además se multiplican en su interior como *Legionella* o *Listeria*.

En cualquier caso, las amebas realizan una función protectora de estas amebas frente a tratamientos químicos de desinfección y agentes medioambientales adversos que hacen que algunos autores las hayan denominado como “Caballos de Troya”. Convirtiéndose en auténticos reservorios biológicos que permiten la multiplicación de la bacteria en su interior, y protegerlas mediante el enquistamiento hasta que las condiciones se vuelva favorables y se liberen al exterior en un número suficiente para producir la enfermedad, como ocurre con *Legionella pneumophila*.

Las bacterias que utilizan a las AVL como protección y que tienen una mayor capacidad patógena para el ser humano son *L. pneumophila*, *E. coli* 0157, *Coxiella burnetii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes* y *Mycobacterium avium* (Fernández et al., 2014).

ANEXO C. CARACTERÍSTICAS DE LOS PUNTOS DE MUESTREO

Las cuatro muestras fueron tomadas a lo largo de la cuenca hidrográfica del Ebro. Estos puntos de muestreo, como se puede observar en la Figura C-1, están ubicados tanto en el propio río Ebro como en afluentes del mismo.



Figura C-1 Situación de los distintos puntos de muestreo a lo largo de la cuenca hidrográfica del Ebro.

- Embalse de La Sotonera.

El embalse de La Sotonera, recoge las aguas de los ríos Astón y Sotón, y debido a su construcción en derivación del embalse de Ardisa a través del canal del Gállego, llegan también las aguas del río Gállego, que aportan aproximadamente el 86% del volumen con que cuenta este pantano.

Este embalse es el origen del Canal de Monegros que une en Tardienta sus aguas con las del Canal del Cinca, que parte del embalse de El Grado, comenzando en ese punto el tramo llamado Monegros II (Figura C-2)

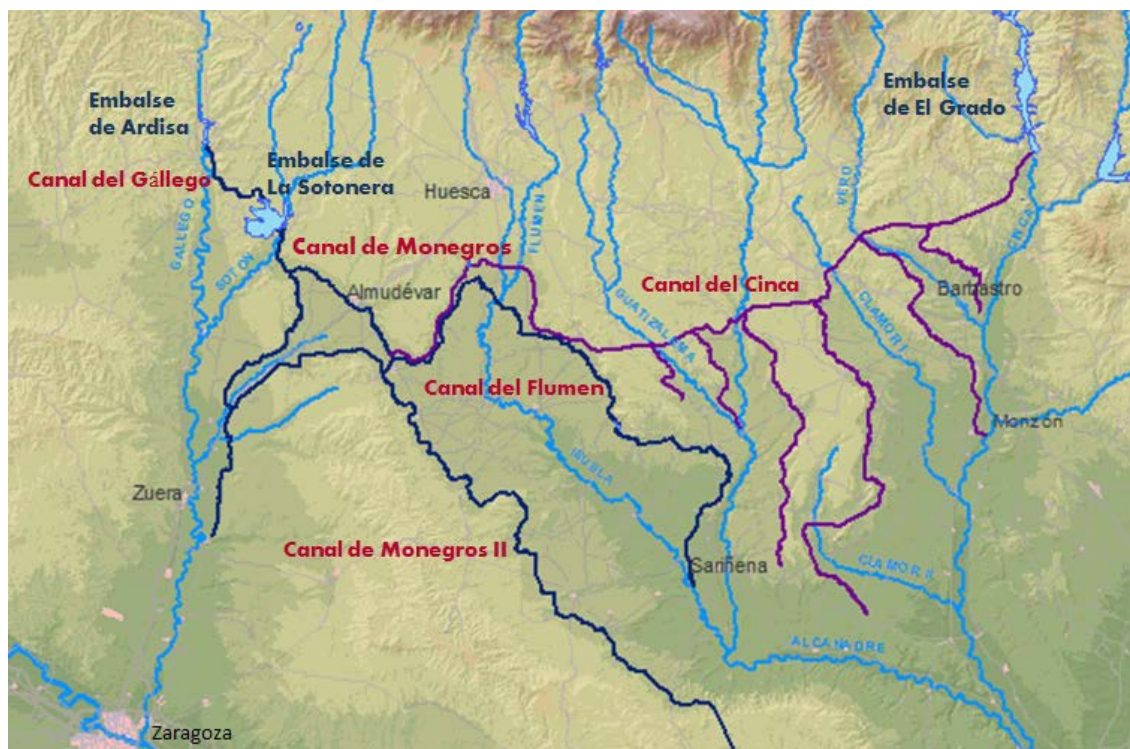


Figura C-2 Mapa de situación del embalse de La Sotonera.

Actualmente, sus usos son:

- Hidroeléctrico.
- Abastecimiento.

Las muestras se toman el 20 de marzo de 2014, con una temperatura del agua consultada en la web de la Confederación Hidrográfica del Ebro de aproximadamente 17°C en la fecha de la recogida.

- Embalse de Flix.

Situado en un meandro del tramo bajo del río Ebro, a su paso por la población de Flix (Tarragona). La margen derecha de este embalse, se ve afectada por la deposición de lodos contaminados cuyo origen se encuentra en los vertidos de una industria cloro-álcali allí localizada, estos lodos están compuestos por metales pesados, organoclorados y radionucleidos. Los usos de este embalse son:

- Hidroeléctrico.
- Regulación.

Los ejemplares de mejillón cebrado se recogen el 22 de marzo de 2014, con una temperatura del agua consultada en la web de la Confederación Hidrográfica del Ebro de aproximadamente 12°C en la fecha de la recogida.

- **Embalse de Sobrón.**

El embalse de Sobrón se encuentra situado en tramo alto del cauce del río Ebro, en el límite de las provincias de Burgos y Álava. Aunque actualmente los usos de embalse son:

- Hidroeléctrico.
- Abastecimiento.

Sus aguas también se empleaban en la refrigeración de la Central Nuclear de Santa María de Garoña durante su funcionamiento (2 de marzo de 1971 a 16 de diciembre de 2012).

La muestra de este embalse se recoge el 5 de mayo de 2014, con una temperatura del agua consultada en la web de la Confederación Hidrográfica del Ebro de aproximadamente 16°C en la fecha de la recogida.

- **Acequia de Rimer (Caspe)**



Figura C-3 Localización de la acequia de Rimer (Caspe)

Como se muestra en la Figura C-3 la acequia de Rimer se encuentra adyacente al río Guadalope junto a su desembocadura al río Ebro en el embalse de Mequinenza, situado en Caspe.

La muestra de este embalse se recoge el 6 de junio de 2014.

ANEXO D. METODOLOGÍA ANALÍTICA FÍSICO-QUÍMICA DE MANTENIMIENTO Y CRÍA EN CAUTIVIDAD DE *D. POLYMORPHA*

Oxígeno disuelto

El parámetro Oxígeno Disuelto (O.D.) informa de la calidad del agua para dar soporte a la vida acuática. Se analiza siguiendo el método utilizado es el 5814:1990 (UNE-EN ISO) con un medidor de oxígeno y temperatura, que se introduce en el agua del acuario. El. Los niveles de oxígeno disuelto e expresan en partes por millón (ppm o mg/L).

La medida se realiza una vez por semana y en caso de que su valor sea excesivamente bajo en comparación con los rangos de preferencia recogidos en la Tabla 2-2 del apartado 2.2, se cambia el difusor para evitar su obstrucción. En función de la medida obtenida se determina el número de bombas de aire que deben de funcionar.

Temperatura

Para conocer la temperatura se utiliza un termómetro que permanece introducido en el interior de acuario. Los valores obtenidos se expresan en grados centígrados (°C)

Las variables de calidad del agua más importantes para el mantenimiento del mejillón cebra en cautividad son la temperatura y el pH (Tesis Doctoral Imanol Cia, 2008). Es por este motivo que la temperatura se controla tres veces por semana, y en caso de ser excesivamente elevada en comparación con los rangos de preferencia recogidos en la Tabla 2-2 del apartado 2.2, se extrae un volumen importante de agua del interior de acuario y se regenera con agua superficial natural recogida en el Canal Imperial de Zaragoza.

pH

Para cuantificar el pH del agua en el acuario se utiliza un pH-metro marca CRISON modelo GLP 21. El método utilizado es el 4500-HB del Estándar Methods (Clesceri et al., 2005).

Se controla tres veces por semana, y si su valor es bajo comparado con los rangos de preferencia recogidos en la Tabla 2-2 del apartado 2.2, se añade un volumen de una solución de hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), que es función del pH obtenido.

Conductividad

Esta variable está relacionada con la presencia de sales en el agua ya que indica la concentración de iones presentes. Para determinar este parámetro se utiliza un conductímetro CRISON modelo Basic 30. El método utilizado es el 25888:1994 (UNE-EN ISO). Los datos obtenidos se expresan en $\mu\text{S}/\text{cm}$.

La medida se realiza una vez por semana.

Dureza total

La dureza total es la medida de cuantificación de iones Mg^{2+} y Ca^{2+} presentes en el agua. El valor de este parámetro se determina mediante valoración. El método utilizado es el 77040:2002 (UNE-EN ISO). La dureza total se expresa como el número equivalente de miligramos de carbonato de calcio por litro de agua ($\text{mg CaCO}_3/\text{l}$).

El control de este parámetro se realiza una vez por semana, y si su valor es bajo [Tabla 2-2, apartado 2.2], se añade un volumen de una solución de hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), que es función de la dureza total.

Dureza de calcio

La dureza de calcio es la medida de la cantidad de iones Ca^{2+} presentes en el agua. Su valor se obtiene mediante valoración. El método utilizado es el SM 3500-Ca B (Standard Methods) (Clesceri et al., 2005). La dureza de calcio se expresa como el número equivalente de miligramos de carbonato de calcio por litro de agua ($\text{mg CaCO}_3/\text{l}$).

La medida de se realiza una vez por semana, y si su valor es bajo en comparación con los rangos de preferencia recogidos en la Tabla 2-2 del apartado 2.2, se añade cierta cantidad de una solución de hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), el volumen a añadir se estima en función de la dureza calcio.

ANEXO E. DETECCIÓN Y RECuento DE BACTERIAS INDICADORAS DE CONTAMINACIÓN FECAL

Los indicadores bacterianos de contaminación fecal objeto de estudio son *Clostridium perfringens*, *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp.

E.1. Procedimientos normalizados

Las normas UNE contenidas en el módulo referido a calidad del agua constituyen un referente esencial para el análisis y determinación de las características del agua destinadas a diferentes usos. Los protocolos utilizados para cultivo y recuento de los indicadores bacterianos en este trabajo son los siguientes:

- *Clostridium perfringens*: La detección y recuento de células vegetativas y esporos de *Clostridium perfringens* se realiza de acuerdo al procedimiento que se describe en la Norma Española UNE-EN 26461-2: "Calidad del agua. Detección y recuento de los esporos de microorganismos anaerobios sulfito-reductores (clostridia). Parte 2: Método de filtración por membrana." Esta norma UNE se ha adoptado íntegramente de la Norma Internacional ISO 6461-2:1986.
- *Enterococcus* spp.: Se sigue el procedimiento que se detalla en la Norma Española UNE-EN ISO 7899-2: "Calidad del agua. Detección y recuento de enterococos intestinales. Parte 2: Método de filtración de membrana." Esta norma UNE ha sido adoptada íntegramente de la Norma Internacional ISO 7899-2:2000.
- *Escherichia coli*: Se sigue el proceso que se recoge en la Norma Española UNE-EN ISO 9308-1: "Detección y recuento de *Escherichia coli* y de bacterias coliformes. Parte 1: Método de filtración en membrana." Esta norma es la versión oficial, en castellano, de la Norma Europea EN ISO 9308-1 de septiembre 2000, que a su vez adopta íntegramente la Norma Internacional ISO 9308-1:2000.
- *Salmonella* spp.: Se realiza de acuerdo al procedimiento descrito en la Norma Española UNE-EN ISO 19250: "Calidad del agua. Detección de *Salmonella* spp". Esta norma es la versión oficial, en castellano, de la Norma Europea EN ISO 19259:2013, que a su vez adopta la Norma Internacional ISO 19250:2010.

E.2. Diluciones seriadas

El volumen de muestra de agua para analizar que se recomienda en el RD 140/2003 es de 100 mL, aunque muchas veces debido al elevado número de bacterias presentes en las aguas naturales el recuento sería imposible debido a la elevada densidad de colonias que aparecerían en la placa. Por tanto, como generalmente al hacer el análisis se desconoce el número de bacterias presentes en la muestra, se analizan varias diluciones de la misma.

A partir del agua natural o extracto de mejillón cebra (dilución 0), se agita con ayuda del vórtex el tubo que contiene la muestra y se toma 1 mL con pipeta que se transfiere a otro tubo con 9 mL de suero fisiológico estéril (0,9% NaCl), posteriormente se agita este tubo en el vórtex obteniéndose así la dilución (1:10) o dilución -1. Para obtener diluciones sucesivas se repite el proceso, se toma 1 mL de la dilución anterior, previamente homogeneizada, y se transfiere a un tubo con 9 mL de suero fisiológico estéril (0,9% NaCl). La operación se repite tantas veces como se considere oportuno en función de las diluciones que se quieran obtener. La Figura E-1 representa gráficamente el proceso de diluciones seriadas.

Todo el procedimiento se realiza con el material previamente esterilizado y en un ambiente estéril proporcionado por el mechero bunsen.

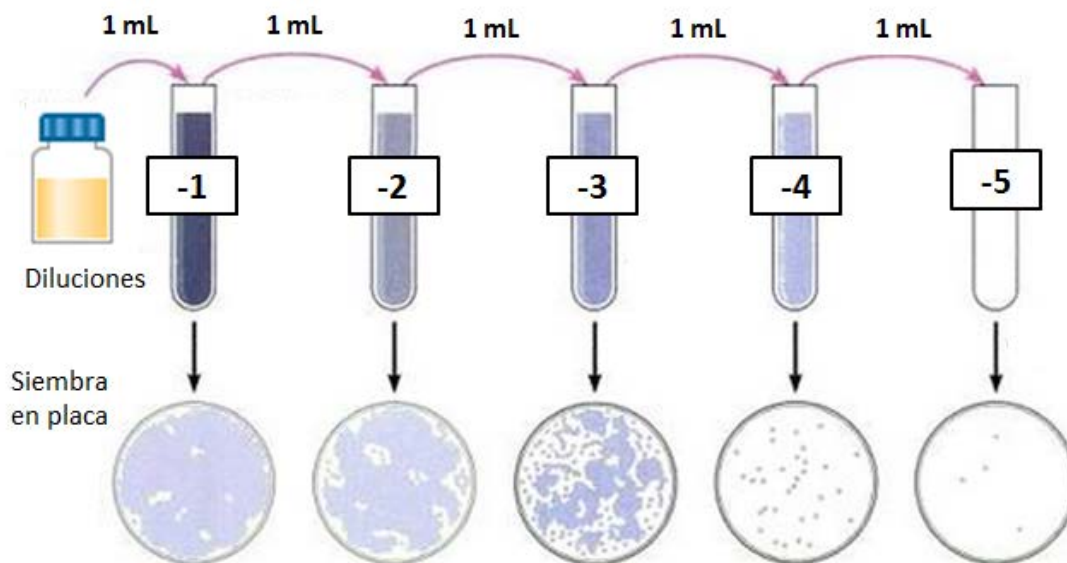


Figura E-1 Método de las diluciones seriadas.

E.3. Medios de cultivo

Los medios de cultivo son ambientes artificiales diseñados por el hombre para que se pueda desarrollar el crecimiento microbiano en el laboratorio proporcionando todos los nutrientes necesarios para ello. En función del tipo de medio, se encuentran en estado líquido, sólido o semisólido. En este proyecto, se utilizan únicamente medios en estado sólido que se presentan de manera diversa, pero la forma más común es desecada en forma de polvo fino o granular.

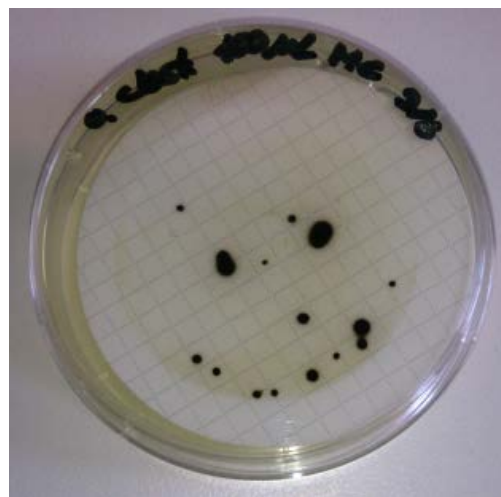
Los productos químicos que se utilizan en la preparación de los medios de cultivo son de calidad analítica reconocida.

E.3.1. Medio *Clostridium perfringens*

Para el análisis de bacterias de *Clostridium perfringens* se utiliza el agar SPS (Scharlau). Para la preparación del medio se pesa la cantidad exacta de polvo que se precisa y se diluye en agua llevando la mezcla a ebullición con agitación. La solución obtenida se transfiere a un frasco y se esteriliza durante 15 minutos a una temperatura de 121 °C en autoclave. Tras finalizar el proceso de autoclavado, el frasco con el agar líquido se colocan en el baño termostático a 50 °C y se mantiene hasta su utilización, ya que este medio, como se explica en el apartado E.4.2. Método de filtración por membrana para *Clostridium perfringens*, se vierte licuado sobre la muestra.

Tabla E-1 Composición del agar SPS.

Ingredientes	Concentración (g/l)
Sulfito sódico	0,50
Sulfato de polimixina (B)	0,01
Sulfadiazina de sodio	0,12
Peptona de caseína	15,00
Extracto de levadura	10,00
Citrato férrico	0,50
Tioglicolato sódico	0,10
Polisorbato 80	0,05
Agar	15,00

Figura E-2 Aspecto colonias *Clostridium perfringens* en agar SPS.

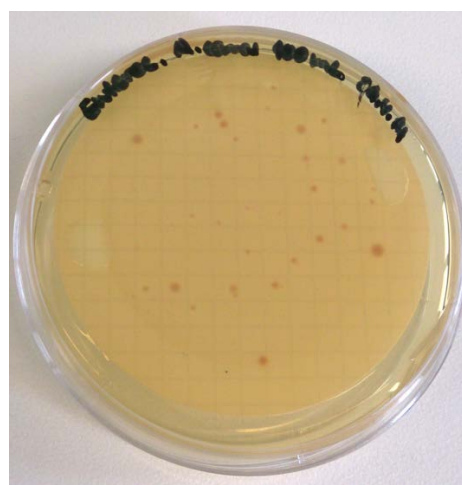
Al tratarse de una bacteria sulfito-reductora, el sulfito que presenta el medio en su composición (Tabla E-1) se reduce durante el crecimiento bacteriano a sulfuro ferroso, apareciendo colonias de color negro (Figura E-2).

E.3.2. Medio *Enterococcus sp*

Para analizar las bacterias del género *Enterococcus* spp. se elige el agar selectivo Slanetz & Bartley agar, cuya composición se detalla en la Tabla E-2. Para la reconstitución del medio se suspende la cantidad precisa de polvo en agua destilada y se lleva a ebullición con agitación. Una vez disuelto, se transfiere la solución a una botella en la que se esteriliza en autoclave durante 15 minutos, a 121°C de temperatura y presión de 1 bar. Finalizado el proceso de esterilización se enfría en el baño termostático a 50°C y después se añade, en presencia de mechero bunsen para proporcionar una atmósfera estéril, cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) al 1% (Scharlau) en una proporción 10 mL por cada litro de medio base. Por último, se vierten unos 20 mL de medio en placas Petri de 9 cm de diámetro y se deja solidificar sobre una superficie horizontal fría. Si el medio de cultivo preparado no se utiliza inmediatamente, se guarda refrigerado y etiquetado durante un periodo no superior a un mes.

Tabla E-2 Composición agar Slanetz & Bartley.

Ingredientes	Concentración (g/l)
Triptosa	20,0
Extracto de levadura	5,0
Glucosa	2,0
Hidrógenofosfato de dipotasio (K ₂ HPO ₄)	4,0
Azida de sodio (NaN ₃)	0,4
Agar	12,0

Figura E-3 Aspecto colonias *Enterococcus sp.* en agar Slanetz & Bartley

La solución TTC se utiliza como indicador de color, ya que es un compuesto incoloro que se reduce debido al efecto del metabolismo de estas bacterias a trifeniformazán (rojo), de forma que las colonias aparecen coloreadas de un color rojo-granate como se observa en la Figura E-3 Aspecto colonias *Enterococcus* sp. en agar Slanetz & Batrley.

E.3.3 Medio *Escherichia coli*

El agar escogido para la preparación de medio de cultivo de análisis *Escherichia coli* es McConkey (Scharlau), cuya composición se muestra en la Tabla E-3. Para su preparación se ha de suspender una cantidad precisa del polvo en agua destilada y seguidamente llevar a ebullición en un erlenmeyer con agitación, una vez disuelto el agar se transfiere del erlenmeyer a una botella en la se esteriliza en autoclave durante 15 minutos y una temperatura de 121°C. Finalizado el proceso de esterilización, la botella que contiene el medio líquido y esterilizado se coloca en el baño termostático a 50°C. Por último, se vierten unos 20 mL de medio en placas Petri de 9 cm de diámetro y se deja solidificar sobre una superficie horizontal fría. Si el medio de cultivo preparado no se utiliza inmediatamente, se guarda refrigerado y etiquetado durante un periodo no superior a un mes.

Tabla E-3 Composición agar McConkey.

Ingredientes	Concentración (g/l)
Peptonas	20,000
Lactosa	10,000
Sales biliares	1,500
Cloruro de sodio	5,000
Rojo neutro	0,030
Cristal violeta	0,001
Agar	15,000

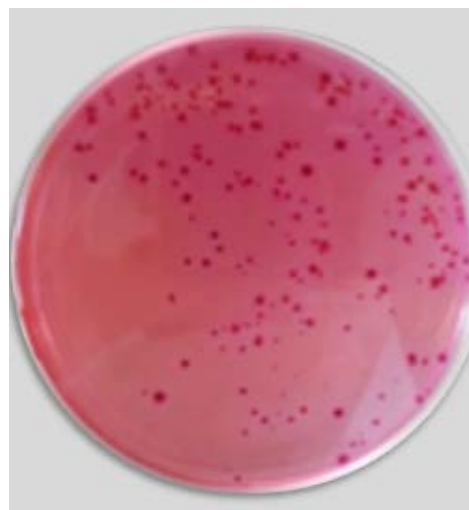


Figura E-4 Aspecto colonias *Escherichia coli* en agar McConkey.

En este medio las colonias de *E. coli* presentan un color violeta oscuro, como se puede observar en la Figura E-4.

E.3.4. Medio *Salmonella*

Las bacterias del género *Salmonella* sp. se analizaron utilizando el medio de cultivo Salmonella-Shigela (Scharlau) (SS agar), cuya composición se muestra en Tabla E-4. Se suspende la cantidad precisa de polvo en agua destilada y se lleva a ebullición. Para la preparación de este medio el agua destilada que se precisa y todo el material utilizado ha sido previamente esterilizado en autoclave durante 15 minutos y una temperatura de 121°C. Obtenida una solución homogénea, se transfiere el contenido a una botella y seguidamente se

enfría a 50°C en el baño termostático. Finalmente, se vierten aproximadamente 20 mL de medio en placas Petri de 9 cm de diámetro y se deja solidificar sobre una superficie horizontal fría. Si el medio preparado no se utiliza de inmediato, se conserva refrigerado y correctamente etiquetado durante un periodo no superior a un mes.

Se trata de una bacteria productora de sulfuro de hidrógeno por lo que desarrollan colonias con centro ennegrecido (Figura E-5).

Tabla E-4 Composición Salmonella-Shigella agar.

Ingredientes	Concentración (g/l)
Extracto de carne	5,000
Peptona	5,000
Lactosa	10,000
Sales biliares	5,600
Citrato de sodio	10,000
Tiosulfato de sodio	8,500
Citrato férrico	1,000
Verde brillante	0,00033
Rojo neutro	0,025
Agar	15,000

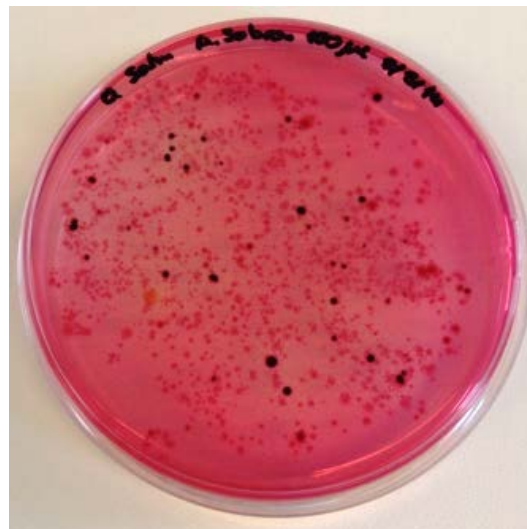


Figura E-5 Aspecto colonias *Salmonella sp.* en Salmonella-Shigella agar.

E.4. Métodos de siembra

Para la detección y recuento de bacterias indicadoras de contaminación fecal se utilizan los métodos, filtración por membrana y siembra en superficie, que se describen a continuación.

E.4.1. Método de filtración por membrana para *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.* y *Salmonella spp.*

En presencia de una atmósfera estéril que proporciona el mechero bunsen, se coloca, mediante pinzas previamente flameadas, un filtro de membrana estéril (Millipore) de 0,45 µm de poro sobre el soporte de la rampa de filtración (Figura E-6.b). Tras adaptar el embudo (Figura E-6.c) se humedece el filtro con una pequeña cantidad de suero fisiológico estéril (0,9% NaCl) y se vierte la muestra previamente homogeneizada (Figura E-6.d). Si el volumen de muestra que se va a filtrar es pequeño (entre 1 y 30 mL), como es el caso de las muestras de extracto de mejillón, se añaden primero 30 mL de suero aproximadamente y posteriormente la muestra que se desea analizar; si el volumen de muestra está comprendido entre 30 y 100 mL, se añade directamente al embudo.

Finalizada la filtración, se retira el embudo y la membrana con las pinzas nuevamente flameadas (Figura E-6.e) y se coloca sobre el medio de cultivo con la cara en que se encuentran las bacterias hacia arriba sobre una placa Petri de diámetro pequeño (45 mm Ø) (Figura E-6.f) que contiene el medio ya preparado y solidificado previamente.

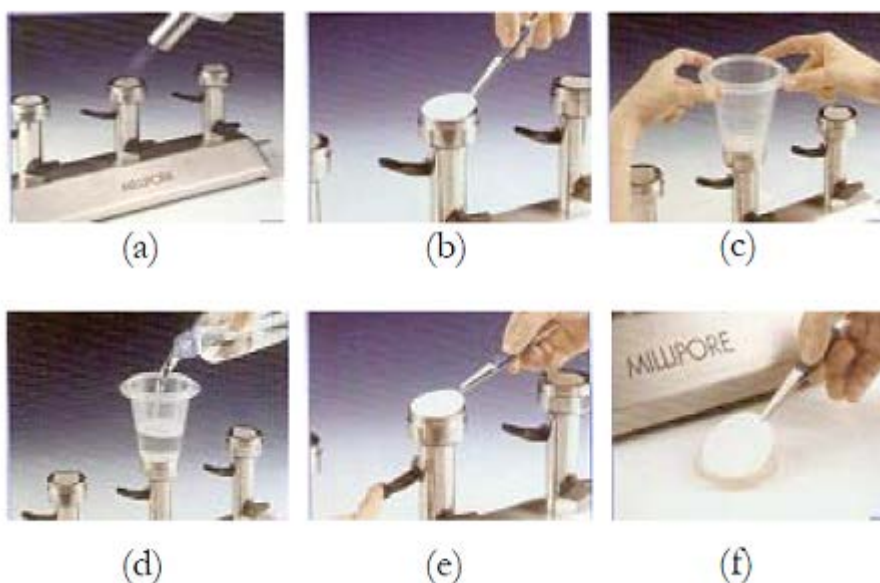


Figura E-6 Método de filtración por membrana paso a paso (Millipore)

E.4.2. Método de filtración por membrana para *Clostridium perfringens*

Se realiza la filtración igual que en el apartado anterior (E.4.1. Método de filtración por membrana para *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. y *Salmonella* spp.), con la diferencia de que para la detección de *Clostridium perfringens* la membrana utilizada tiene un diámetro de poro de 0,22 μm de tal forma que retengan los esporos bacterianos en el interior o sobre la membrana.

Finalizado el proceso de filtración, se retira la membrana con ayuda de pinzas esterilizadas y se coloca boca abajo en el fondo de una placa Petri de diámetro pequeño (45 mm) de manera que no quede ninguna burbuja de aire debajo del filtro. Posteriormente se vierten aproximadamente 18 mL de medio de cultivo licuado, el cual se ha enfriado previamente hasta alcanzar una temperatura de alrededor de 50°C, sobre la membrana que no se ha dejado de sostener con las pinzas y se deja enfriar sobre una superficie fría y horizontal.

E.4.3. Método de siembra en superficie

Este método se utiliza, tanto para el agua natural como para el extracto de mejillón, cuando la concentración bacteria de *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. o *Salmonella* spp. es elevada. Con la ayuda de una pipeta, se inocula con 100 μL de muestra el medio sólido anteriormente preparado en una placa Petri de 90 mm \varnothing , posteriormente se extiende cuidadosamente con ayuda del asa de Digrafsky por la superficie del medio con cuidado de que éste no quede dañado.

La siembra se realiza en presencia de mechero bunsen con el fin de esterilizar la atmósfera de trabajo.

E.5. Incubación

El procedimiento de incubación varía en función de si se trata de bacterias aerobias o anaerobias (*C. perfringens*).

E.5.1. Incubación *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. y *Salmonella* spp.

Una vez finalizado el proceso de siembra, se invierten las placas y se introducen en las estufas de cultivo a la temperatura y durante el tiempo adecuado a cada una de ellas y que se recogen en la Tabla 2-4.

E.5.2. Incubación *Clostridium perfringens*.

En el caso de *Clostridium perfringens*, tras solidificarse el medio de cultivo, se invierten las placas y se hace incubar la membrana bajo condiciones que garanticen anaerobiosis, para ello se emplea una jarra de anaerobiosis que permite conseguir una atmósfera sin oxígeno.

Se introduce en la jarra, junto con las placas, una tableta a la que se añade el volumen de agua destilada que corresponde según su tamaño, de manera que se genera la liberación de CO₂ e hidrógeno. Para garantizar las condiciones anaeróbicas en la jarra, se introduce también una tira indicadora que vira de azul a blanco en ausencia de oxígeno.

Por último, se introduce la jarra en la estufa de cultivo a la temperatura y durante el tiempo indicados en la Tabla 2-4 (24 horas a 37 °C).

E.6. Recuento de bacterias

El recuento bacteriano parte de la suposición de que cada bacteria crece y se divide para producir una sola colonia, pero esto no siempre se cumple ya que las bacterias pueden crecer unidas en cadena o agrupadas. Por tanto, una colonia puede ser el resultado de un agregado de bacterias. Es por ello que para reflejar este hecho en el recuento de placas es más correcto hablar de unidades formadoras de colonias (UFC) (*Tortora et al., 2007*).

Es importante que el número de colonias que aparecen en las placas no sea demasiado elevado, ya que algunas colonias se pueden fusionar y por tanto se realizaría un recuento de las mismas erróneo. También se debe evitar que el número de colonias sea demasiado bajo porque si no el cálculo no sería estadísticamente significativo. El número de UFC adecuado para placas sembradas por el método de filtración de membrana sería entre 20 y 200, y entre 30 y 300 para las placas sembradas por el método de siembra en superficie (*Clesceri et al., 2005*).

ANEXO F. IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS POTENCIALMENTE PATÓGENOS MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

En el presente Anexo se describen con más detalle la metodología llevada a cabo para la identificación de microorganismos potencialmente patógenos utilizando técnicas de Biología Molecular.

F.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realiza siguiendo los pasos y de acuerdo a los principios que se muestran a continuación:

- **Obtención y almacenamiento de la muestra:** En el caso de cultivos de amebas de vida libre, la placa Petri con el cultivo de la ameba se lava por fricción con 2 mL de H₂O y la ayuda de una pipeta pasteur, se transfiere la suspensión a un eppendorf de 1,5 mL. Se centrifuga el eppendorf 10 minutos a 6000 rpm y se retira el sobredrenante. El sedimento resultante se utiliza como muestra. En el caso de aguas, la muestra de agua se somete a centrifugación en las mismas condiciones y el sedimento se utiliza como muestra y en el caso de extracto de mejillón se utilizan directamente 200 µl para la extracción de ADN: Para la extracción se utilizó el kit comercial (Ron's Tissue DNA Mini Kit) de columna en gel de sílice, que se basa en el anclaje del ADN en una columna de gel-sílice en presencia de sales caotrópicas.
- **Ruptura de las estructuras que contienen el material genético:** el proceso persigue la liberación de los ácido nucleicos de las células. Para ello, se añaden al eppendorf 100 µL de solución buffer lisis que generalmente contienen proteasas o sustancias caotrópicas que degradan las estructuras protectoras y emulsificantes de los lípidos presentes en las membranas externas y endomembranas. Se adicionan también 15 µL de Proteinasa K, ya que junto con RNasa tampón de lisis a una temperatura de 52°C durante 24 horas proporciona, antes de los procedimientos comerciales, un aumento significativo en las tasas de detección. Se trata de una modificación de la técnica propuesta por Goldschmidt (Goldschmidt et al., 2008).
- **Separación del material genético de los componentes homogeneizados:** En condiciones nativas, los ácidos nucleicos están recubiertos de una capa hidratante de moléculas de agua que además mantienen en la solubilidad del ADN en soluciones acuosas. Al añadir sustancias caotrópicas a los ácidos nucleicos se destruye esta capa hidratante de moléculas de agua, creándose un ambiente hidrofóbico alrededor de las moléculas de ADN.
- **Precipitación de los ácidos nucleicos:** bajo estas condiciones hidrofóbicas que se han creado, los ácidos se unen con facilidad a la membrana de sílica-gel de las columnas.

- **Purificación:** Las proteínas, metabolitos y otros contaminantes no se unen a la columna y por tanto se eliminarán durante los procesos de lavado.
- **Elución:** finalmente, los ácidos nucleicos se eluyen de la membrana de sílica-gel con la ayuda de tampones de elución con baja concentración de sales o simplemente con agua, ya que de esta manera se recupera la capa hidratante de moléculas de agua de los ácidos nucleicos y por tanto, se liberan de la membrana.
- **Preservación:** solubilizado el material, se reparte en alícuotas recogidas en eppendorf de 1,5 mL y se conservaron a -20°C hasta su utilización.

F.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa

Como ya se ha explicado en el apartado 2.6.2 la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un método de síntesis de ADN in vitro en el que se amplifica en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable una región determinada de ADN que se sitúa entre dos regiones de ADN cuya secuencia se conoce.

Esta técnica consiste, de manera resumida, en ciclos repetitivos de:

- **Desnaturalización** del ADN a temperatura elevada.
- Obtenida la cadena monocatenaria de ADN, **unión (annealing)** de los oligonucleóticos que se utilizan como cebadores al ADN diana.
- **Extensión** de la cadena de ADN por adición de nucleótidos (dNTPs) a partir de los cebadores y en presencia de las enzimas ADN polimerasas. Estas enzimas únicamente añaden nucleótidos al extremo 3' libre de una doble cadena de ADN, creando así una cadena complementaria a la cadena molde.

Para que la ADN polimerasa desarrolle su función correctamente la reacción se realiza en un tampón adecuado. Además como cofactores de la polimerasa se añaden cationes divalentes, generalmente cloruro de magnesio (MgCl₂).

Los cebadores consisten normalmente en cadenas relativamente cortas, que son diferentes entre sí y complementarias de los extremos del fragmento que se desea amplificar. Las fases de desnaturalización del ADN molde, annealing del cebador y extensión constituyen un ciclo del método de amplificación de PCR, compuesto por n ciclos. La Figura F-1 ilustra las tres principales fases del proceso de amplificación de ADN por PCR.

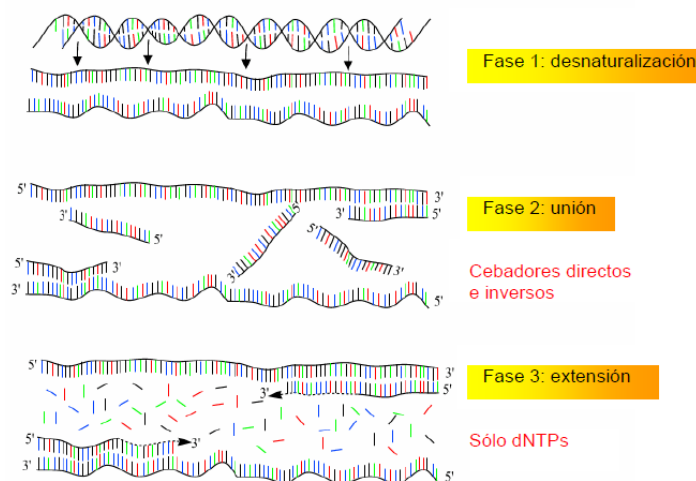


Figura F-1 Fases de la amplificación por PCR (imagen: Andy Vierstraete, 1999).

F.3. Electroforesis en gel de agarosa

Como se ha descrito en el apartado 2.6.3 este proceso consiste en la separación electroforética de ADN en un gel de agarosa. A continuación se describen los pasos a seguir tanto en la preparación del gel como en la electroforesis.

F.3.1. Preparación del gel de agarosa

El tamaño de los fragmentos de ADN que se desean separar condicionan la concentración del gel de agarosa. La concentración utilizada para visualizar los fragmentos de ADN amplificados por PCR durante la realización de este proyecto fue del 1,5%.

El gel se prepara mediante disolución de la agarosa (Agar Gel Tupe IME, Linus) en TBE X 0,5 (Tris 0,045 M, ácido bórico 0,045 M, EDTA 0,001 M, pH 8) llevando la mezcla a ebullición. Una vez disuelto, se añade a la solución acuosa el bromuro de etidio (Sigma, Mo, USA) a una concentración final de 5 µg/mL y se vierte sobre la bandeja de electroforesis previamente sellada y con el correspondiente molde que forma los pocillos sobre los que se cargará el producto de la PCR. Finalmente se deja enfriar sobre una superficie horizontal hasta que el gel solidifica; se retira el molde y se coloca la bandeja en la cubeta de electroforesis con tampón TBE X 0,5. La Figura F-2 recoge gráficamente el proceso de preparación del gel.

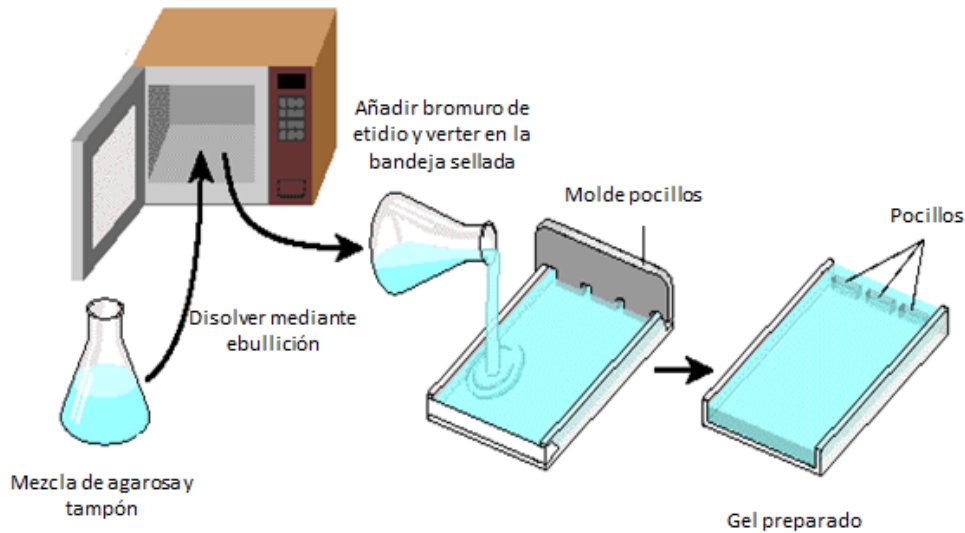


Figura F-2 Preparación del gel de agarosa.

F.3.2. Electroforesis

La muestra que se carga en cada pocillo independiente del gel se prepara mezclando 5 μL de ADN amplificado en la PCR con 2 μL de solución de carga (1% SDS, 50% glicerol, 0,05% azul de bromofenol) en papel de Parafilm mediante resuspensión con ayuda de la micropipeta.

En el primer pocillo se introducen también 5 μL de una mezcla de 2 μL de la solución de carga anteriormente mencionada y 5 μL del marcador de peso molecular ADN del Fago λ PstI (116 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Tampón Multi-core 1x, enzima PstI 200U (Promega Corporation, USA), agua miliQ estéril 240 μL - Incubar 24 horas a 37°C en el baño termostatzado).

La electroforesis se desarrolla a 100 V de forma constante y durante un tiempo que varía en función de las muestras a analizar o el tamaño de la cubeta (Bio-Rod Mod 250/2.5; 45v) y que oscila entre 45 minutos y 1 hora y media. La Figura F-3 es una fotografía tomada en el laboratorio al inicio de una electroforesis.

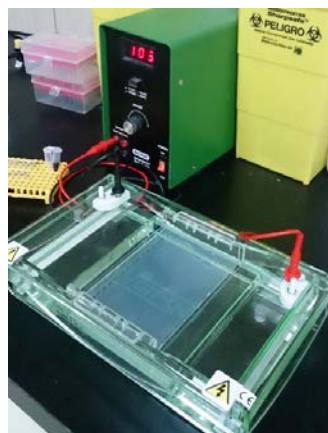


Figura F-3 Electroforesis.

F.4. Purificación de ADN

La purificación del ADN cortado del gel de agarosa se lleva a cabo con el kit comercial GFX™ PCR ADN and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) y se basa en los siguientes principios:

- Captación de la muestra: se añade buffer a la banda de gel de agarosa que se ha cortado con la amplificación de molécula de ADN con el fin de eliminar las proteínas y disolver la agarosa.
- Una vez que la solución se transfiere a una columna de sílice, se realizan lavados sucesivos de ésta para eliminar sales y contaminantes de la membrana.
- Posteriormente, los ácidos nucleicos se eluyen de la membrana de sílice mediante tampones ligeramente alcalinos, de manera que se liberan de la membrana utilizando un buffer estéril y libre de ADNasas, para que las muestras sean secuenciadas.
- Finalmente, se preserva el producto obtenido en un tubo eppendorf de 1,5 mL a -20°C hasta el momento de su secuenciación.

F.5. Condiciones de la PCR para la identificación y genotipificación de *Acanthamoeba spp*

Para la identificación de *Acanthamoeba spp* se realizó una PCR del amplicón ASA.S1 del gen 18S rADN (423 a 551 pb) utilizando los primer JDP 1 y JDP 2.

El programa de amplificación comprende 45 ciclos en las condiciones que se muestran en la Figura F-4, con un volumen de reactivos recogida en la Tabla F-1.

Tabla F-1 Reactivos necesarios en la PCR para la identificación de *Acanthamoeba spp*.

Reactivo	Volumen (µL)
Buffer 5X	10
MgCl ₂ (25 mM)	8
dNTPs (25 mM)	0,5
JDP1 (5µM)	5
JDP2 (5µM)	5
Taq. Go (5U/µl)	0,4
H ₂ O	19,1
ADN	2

V final= 50 µL

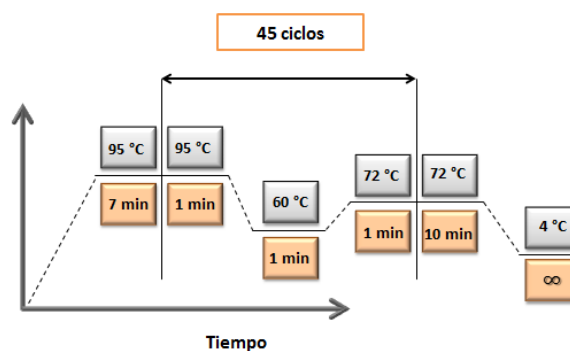


Figura F-4 Distribución de tiempo y temperatura del programa de amplificación JDP (Schroeder et al., 2001).

F.6. Condiciones de la PCR para la identificación de AVL

Se lleva a cabo una PCR específica para AVL, con inespecificidad de género, aunque algunos de ellos como *Hartmannella*, *Vahlkampfia* y *Acanthamoeba* amplifican preferentemente sobre otros.

Para ello se amplifican las regiones conservadas del 18S rADN utilizando los cebadores FLA F y el reverso primer FLA R.

El programa de amplificación comprende 40 ciclos en las condiciones que se muestran en la Figura F-5, con un volumen de reactivos recogida en la Tabla F-2.

Tabla F-2 Reactivos necesarios en la PCR para la identificación de AVL.

Reactivo	Volumen (µL)
Buffer x 5	5
MgCl ₂ (25 mM)	1,5
dNTPs (25 mM)	0,2
FLA F (10µM)	2
FLA R (10µM)	2
Taq. Go (5U/µl)	0,3
H ₂ O	13
ADN	1

V final= 25 µL

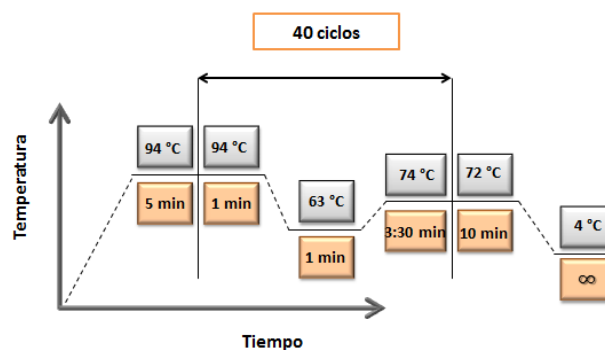


Figura F-5 Distribución de tiempo y temperatura del programa FLA (Tsvetkova et al., 2004)

F.7. Condiciones de la PCR para la identificación y genotipificación de *Naegleria spp.*

Para la amplificación de la región ITS (ribosomal internal transcript) y 5.8S rADN de *Naegleria*, se utilizó la nested-PCR descrita por Pelandakis & Pernin (2002). Los primers utilizados para el género *Naegleria spp* fueron ITS-1 e ITS-2 y para la especie *Naegleria fowleri*, Fw1 y Fw2.

El programa de amplificación consta, para las dos PCR, de 35 ciclos en las condiciones que se reflejan en la Figura F-6, con el volumen de reactivos que aparece en Tabla F-3.

Tabla F-3 Reactivos necesarios en la PCR para la identificación de *Naegleria spp* y *Naegleria fowleri*.

PCR 1 (<i>Naegleria spp</i>)		PCR 2 (<i>N. fowleri</i>)	
Reactivo	Volumen (µL)	Reactivo	Volumen (µL)
Buffer 10x	5	Buffer 10x + MgCl ₂ (1,5 mM)	5
MgCl ₂ (100 mM)	1	dNTPs (25 mM)	0,4
dNTPs (25 mM)	0,4	Fw1 (10 µM)	3
ITS-1 (10µM)	2	Fw2 (10 µM)	3
ITS-2 (10µM)	2	Taq. Go (5U/µl)	0,3
Taq. Go (5U/µl)	0,3	H ₂ O	37,3
H ₂ O	38,3	ADN (PCR 1)	1
ADN	1		

V final= 50 µL	V final= 50 µL
----------------	----------------

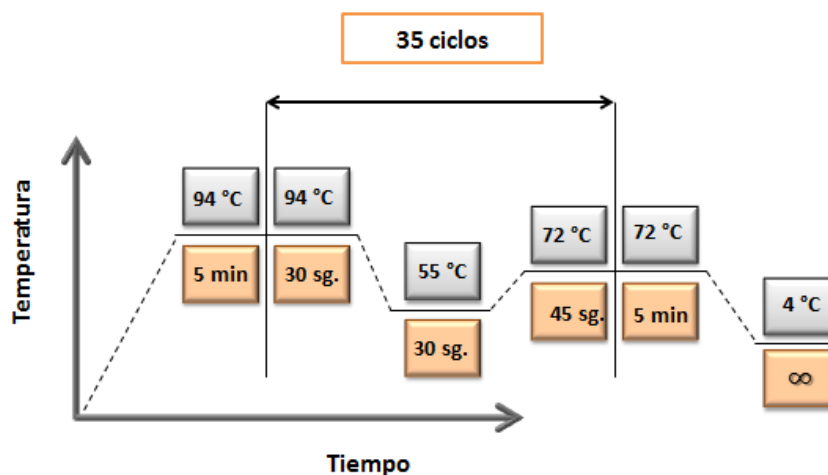


Figura F-6 Distribución de tiempo y temperatura del programa ITS (Pelandakis & Pernin, 2002).

F.8. Condiciones de la PCR para *EUKARIOTAS*

Con el fin de identificar muestras con resultado positivo en la observación microscópica, pero negativo en las amplificaciones anteriores, se utilizaros los primers EUK F y EUK R, que amplifican las regiones conservadas del 18S rADN, descrita Robert P. Hirt et al., 1997.

El programa de amplificación consta de 40 ciclos y en las condiciones mostradas en la Figura F-7, en un volumen de reactivos reflejado en la Tabla F-4.

Tabla F-4 Reactivos necesarios en la PCR para la identificación de *EUKARIOTAS*.

Reactivo	Volumen (μL)
Buffer x 5	10
MgCl ₂ (50 mM)	1,5
dNTPs (25 mM)	0,4
EUK F (10μM)	1
EUK R (10μM)	1
Taq. Go (5U/μl)	0,3
H ₂ O	30,8
ADN	5

V final= 50 μL

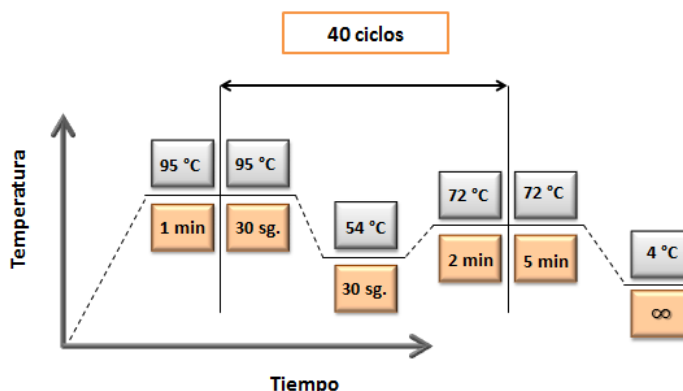


Figura F-7 Distribución de tiempo y temperatura del programa EUK (Robert P. Hirt et al., 1997).

F.9. Condiciones de la PCR para la identificación de *Cryptosporidium* spp.

Para la identificación de *Cryptosporidium* spp se realizó la técnica de PCR anidada que amplifica el gen de subunidad 18S del rARN (SSU rARN) (Xiao et al., 1999). En la primera PCR se utilizaron los primers SSU1 y SSU2 y con el producto de esta primera PCR, se realizó la segunda con los cebadores SSU3 y SSU4.

El programa de amplificación es igual para las dos PCR, constando de 35 ciclos en las condiciones mostradas en la Figura F-8, en un volumen de reactivos reflejado en la Tabla F-5.

Tabla F-5 Reactivos necesarios en la PCR para la identificación de *Cryptosporidium* spp.

PCR 1	
Reactivo	Volumen (μL)
Buffer 10x	2,5
Cl ₂ Mg (50 mM)	1
dNTPs (25 mM)	0,2
SSU 1 (10μM)	0,25
SSU 2 (10μM)	0,25
Taq. Go (5U/μl)	0,3
H ₂ O	18,8
ADN	2

V final= 25 μL

PCR 2	
Reactivo	Volumen (μL)
Buffer 10x	5
Cl ₂ Mg (50 mM)	1,5
dNTPs (25 mM)	0,4
SSU 3 (10μM)	0,5
SSU 4 (10μM)	0,5
Taq. Go (5U/μl)	0,3
H ₂ O	38,8
ADN (PCR 1)	3

V final= 50 μL

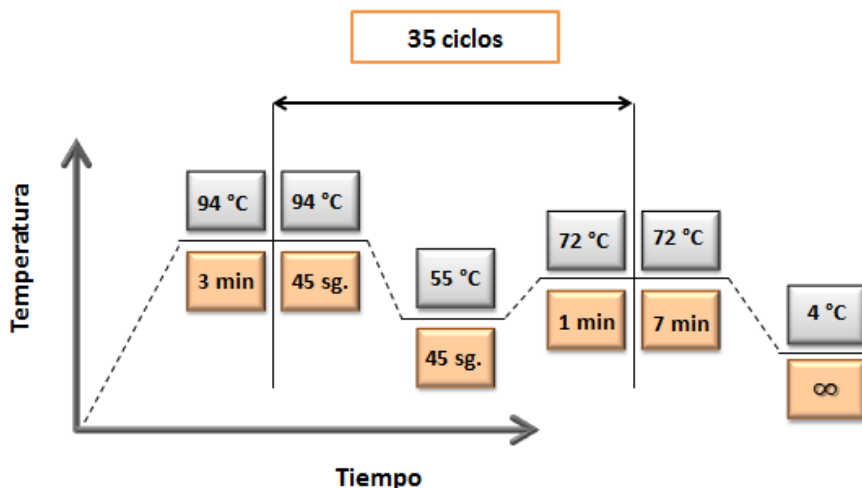


Figura F-8 Distribución de tiempo y temperatura del programa de amplificación del SSU rRNA (Xiao et al., 1999).

F.10. Condiciones de la PCR para la identificación de *Giardia duodenalis*

Giardia duodenalis presenta una amplia diversidad genética que se puede observar analizando el fragmento del *gen tpi*, que codifica la triosafosfato isomerasa (Ey et al., 1993; Barunch et al., 1996; Monis et al., 1996; Monis et al., 1999).

Para ello se realiza una nested-PCR que amplifica este fragmento del *gen tpi*, desarrollada por Sulaiman y que utiliza en la primera PCR los cebadores AL3543 y AL3546; y AL3544 y AL 3545 en la segunda.

El programa de amplificación es igual ambas PCR, constando de 35 ciclos en las condiciones mostradas en la Figura F-9, en un volumen de reactivos reflejado en la Tabla F-6.

Tabla F-6 Reactivos necesarios en la PCR para la identificación de *Giardia duodenalis*.

PCR 1	
Reactivo	Volumen (µL)
Buffer 10x	5
Cl ₂ Mg (50 mM)	3
dNTPs (25 mM)	0,4
AL 3543 (5µM)	2
AL 3546 (5µM)	2
Taq. Go (5U/µl)	0,3
H ₂ O	32,3
ADN	5

V final= 50 µL

PCR 2	
Reactivo	Volumen (µL)
Buffer 10x	5
Cl ₂ Mg (50 mM)	2
dNTPs (25 mM)	0,4
AL 3545 (5µM)	2
TPIBF (10 µM)	1
Taq. Go (5U/µl)	0,3
H ₂ O	34,3
ADN (PCR 1)	5

V final= 50 µL

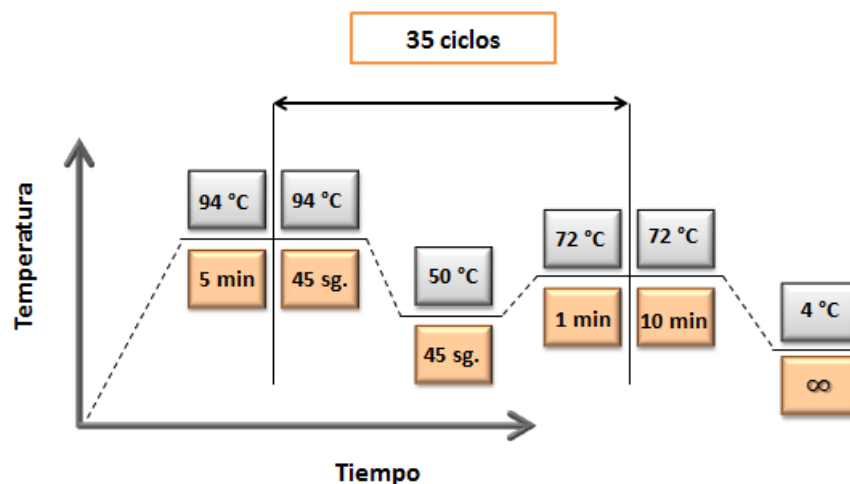


Figura F-9 Distribución de tiempo y temperatura del programa de amplificación del gen *tpi* (Sulaiman et al., 2003).

F.11. Condiciones de la PCR para la identificación de microorganismos patógenos albergados en el interior de las AVL

La técnica utilizada para la detección de microorganismos patógenos albergados en el interior de las AVL fue la pentaplex-nested PCR, publicada en 2013 por Calvo et al. Esta técnica se llevó a cabo como resultado de la colaboración entre los grupos consolidados “Biologías estructural” del departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular y el de “Protozoosis entéricas de interés económico y sanitario” del Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, ambos de la universidad de Zaragoza.

En la Tabla 2-7 del apartado 2.7 se muestra la relación de primers utilizados para cada bacteria en las dos PCR de las que consta el proceso.

El programa de amplificación para la primera PCR consta de 25 ciclos en las condiciones mostradas en la Figura F-10, en un volumen de reactivos reflejado en la Tabla F-7.

En el caso de la segunda PCR, el programa de amplificación es de 20 ciclos en las condiciones mostradas en la, en un volumen de reactivos reflejado en la Tabla F-8.

Tabla F-7 Reactivos necesarios en la PCR 1 para la identificación de Bacterias.

PCR 1	
Reactivo	Volumen (µL)
Buffer 10x + Cl ₂ Mg (1,5 mM)	2,5
dNTPs (25 mM)	0,5
MipLeg186-F (10 µM)	2
MipLeg186-R (10 µM)	2
McyD-fow (10 µM)	1,25
McyD-rev (10 µM)	1,25
Hsp65-dir (10 µM)	2,5
Hsp65-rev (10 µM)	2,5
R16s-dir (10 µM)	2,5
R16s-rev (10 µM)	2,5
Taq. Go (5U/µl)	0,75
H ₂ O	1,75
ADN	3

V final= 25 µL

Tabla F-8 Reactivos necesarios en la PCR 2 para la identificación de Bacterias

PCR 2	
Reactivo	Volumen (µL)
Buffer 10x + Cl ₂ Mg (1,5 mM)	2,5
dNTPs (25 mM)	0,5
N-MipLeg186-F (10 µM)	2
SN-MipLeg186-R (10 µM)	2
N-McyD-dir (10 µM)	1,25
N-McyD-rev (10 µM)	1,25
N-Hsp65-dir (10 µM)	2,5
N-Hsp65-rev (10 µM)	2,5
N-R16s-dir (10 µM)	2,5
N-R16s-rev (10 µM)	2,5
Taq. Go (5U/µl)	0,75
H ₂ O	0
ADN*	5

V final= 25 µL

* Dilución producto PCR 1/agua 1:10

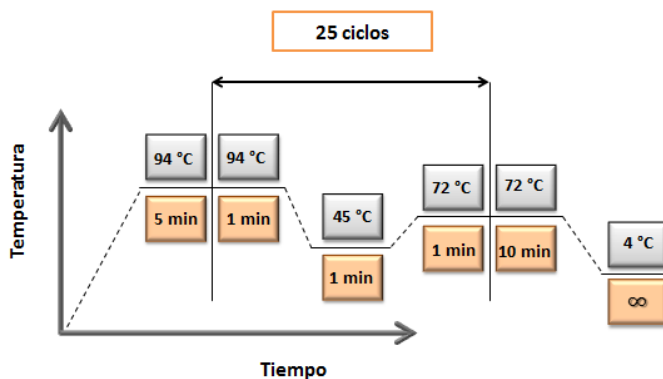


Figura F-10 Distribución de tiempo y temperatura del programa de amplificación de la pentaplex-nested PCR (PCR1) (Calvo et al., 2013).

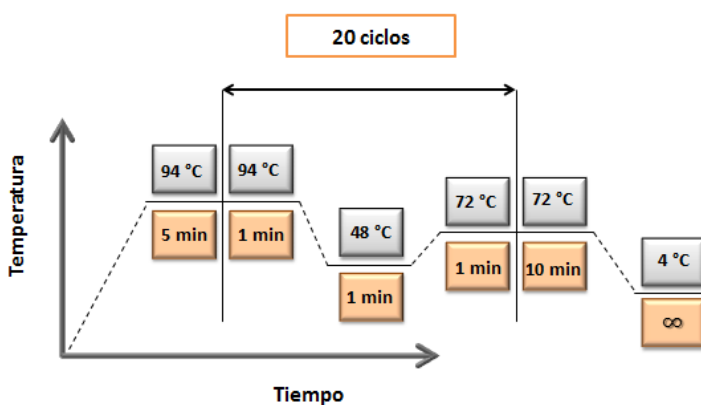


Figura F-11 Distribución de tiempo y temperatura del programa de amplificación de la pentaplex-nested PCR (PCR2) (Calvo et al., 2013).

ANEXO G. ESTUDIO DE LA CALIDAD DEL AGUA

La elección de las estaciones de control de la red de Control del Estado de las Masas de Agua Superficiales en la cuenca del Ebro se realiza según los criterios especificados en el apartado 2.8. De acuerdo con esto, en la Figura G-1 se señalan con flechas de color rojo las estaciones de control escogidas para la recopilación de los datos necesarios para este análisis, y con las verdes se indican los puntos de toma de muestra de *Dreissena polymorpha* y agua natural.



Figura G-1 Localización de los puntos de recogida de *Dreissena polymorpha* y agua natural y las estaciones de control escogidas para el análisis de aguas de cada uno de ellos.

A continuación se detallan, de manera más específica, los criterios que marcan la elección de las estaciones de control en cada uno de los cuatro puntos de muestreo, teniendo la información de la que se dispone en ellas y las características específicas de cada embalse.

- Embalse de la Sotonera

Como se detalla en el Anexo C. el embalse de La Sotonera, recoge las aguas de los ríos Astón y Sotón, además recibe las aguas del embalse de Ardisa (embalse situado en el cauce del río Gállego) a través del canal del Gállego, esta aportación supone aproximadamente el 86% del volumen de agua. El Canal de Monegros, cuyo origen está en este embalse, une sus aguas con el Canal del Cinca en Tardienta.



Figura G-2 Localización del embalse de La Sotonera y la estación de control escogida.

Como parámetros imperativos, necesarios para clasificar las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable en categoría A1, A2, A3 o peor que A3, se utilizan los proporcionados por la estación de control 0421 Canal de Monegros/ Almodévar, situada aproximadamente a 17 km del embalse de La Sotonera (Figura G-2) y anterior al punto de unión con el embalse del Cinca en Tardienta, ya que en punto de control que se encuentra en el embalse de La Sotonera no se dispone de resultados para estos parámetros para los tres años en que se realiza el estudio. Se elige esta estación ya que se trata de un canal construido en derivación del embalse por lo que se espera que el valor de los parámetros no varíe respecto a los de La Sotonera. En este punto se completan todos los datos necesarios para calidad del agua excepto de fenoles, del que no se encuentra ningún valor lo suficientemente cerca para que resulte representativo.

- **Embalse de Flix**

En este embalse, es posible realizar el estudio consultando la información de la estación de la red de Control del Estado de las Masas de Agua Superficiales en la cuenca del Ebro situada en el propio embalse (Figura G-3): 0121-Ebro/Flix (abastecimiento desde el embalse).



Figura G-3 Localización del embalse de Flix y la estación de control escogida.

En este punto se completan todos los datos necesarios para calidad del agua excepto de fenoles, del que no se dispone ningún valor lo suficientemente cerca para que resulte representativo.

- Embalse de Sobrón

El embalse de Sobrón se sitúa en el cauce del río Ebro, por lo que los puntos de control seleccionados pertenecen a este río. En este caso, no se dispone de la suficiente información en una sola estación, por lo que, como se puede observar en la Figura G-4, será necesario obtener la información de tres de ellas.



Figura G-4 Localización del embalse de Sobrón y las estaciones de control escogidas.

En la estación situada en el propio embalse, 2189-Ebro/Sobrón, los datos proporcionados son:

- Nitratos
- Amonio
- Temperatura del agua
- Sulfatos

Además, únicamente se recoge información de estos parámetros hasta 2012. Por este motivo, se utilizarán los datos de ese punto de control únicamente para ese año, y en el 2013 y 2014 se emplearán los proporcionados por la estación 2122- Ebro/Frías, municipio situado aproximadamente 20 km aguas arriba del embalse, este punto además facilita los resultados para el aspecto del agua. La estación proporciona por tanto, la siguiente información:

- Año 2012
 - o Aspecto
- Años 2013-2014
 - o Nitratos
 - o Amonio
 - o Temperatura del agua
 - o Sulfatos
 - o Aspecto

Estos valores no son suficientes para la realización del estudio de calidad del agua, ya que falta información de muchos de los parámetros descritos como imperativos para este análisis. Por este motivo, se recurre a la utilización de una tercera estación 0001 Ebro/ Miranda de Ebro, situada aproximadamente 25 km aguas abajo del embalse, por lo que se considera que los parámetros no habrán sufrido una importante variación. De nuevo el problema es que no se proporciona toda la información necesaria, ya que faltan datos de:

- Salmonelas
- Hidrocarburos método IR
- Fenoles
- Total HPA
- Bario
- Hierro
- Plaguicidas Orden 11/05/1988

En este caso, no existe ninguna estación cercana que pueda proporcionar estos valores de una forma muy aproximada, ya que la más cercana, perteneciente al cauce del Ebro, se sitúa en el embalse de Reinosa: 0599-Ebro/ Reinosa, embalse del Ebro; muy alejada del embalse de Sobrón. Por este motivo, se va a realizar el estudio de calidad con los datos de salmonelas obtenidos en este estudio, y sin información de los otros tres parámetros (Hidrocarburos de origen petrolero, fenoles, total HPA, bario, hierro y plaguicidas Orden 11/05/1988).

Los datos de la estación situada en el municipio de Frías en los años 2012 (aspecto) y 2013 (nitratos, amonio, sulfatos, temperatura del agua y aspecto), resultan pobres de cara a una aproximación ya que únicamente se realizan uno o dos análisis anuales, por este motivo, se estudia tanto la información proporcionada, para esos parámetros, por el punto de control de Frías como la ofrecida por el situado en Miranda de Ebro.

En el parámetro Salmonelas del año 2014 se emplean los datos obtenidos en el presente proyecto.

- **Acequia de Rimer (Caspé)**

La acequia de Rimer se encuentra adyacente al río Guadalupe junto a su desembocadura al río Ebro en el embalse de Mequinenza, situado en Caspe Figura G-5.

Para el estudio de calidad en este punto de muestreo se ha recurrido a los datos proporcionados por la estación de control 0099-Guadalupe/ Embalse de Caspe; este embalse se sitúa en el cauce del río Guadalupe a menos de 20 km aguas arriba de la acequia de Rimer. Con la información proporcionada por esta estación, es suficiente para la realización del

estudio, ya que aporta datos de todos los parámetros imperativos para el análisis de calidad de aguas prepotables a excepción, de nuevo, de datos de fenoles, de los que no se encuentra ningún valor lo suficientemente cercano para que resulte adecuado.



Figura G-5 Localización del embalse de la acequia de Rimer (Caspe) y la estación de control escogida.

ANEXO H. RESULTADOS

H.1. Mantenimiento y cría en cautividad de *Dreissena polymorpha*

Los parámetros se empiezan a controlar días antes de la introducción de los primeros ejemplares de bivalvo, para asegurar que el acuario se encuentre en las condiciones adecuadas en ese momento. El control finaliza en el momento en que se retiran los ejemplares.

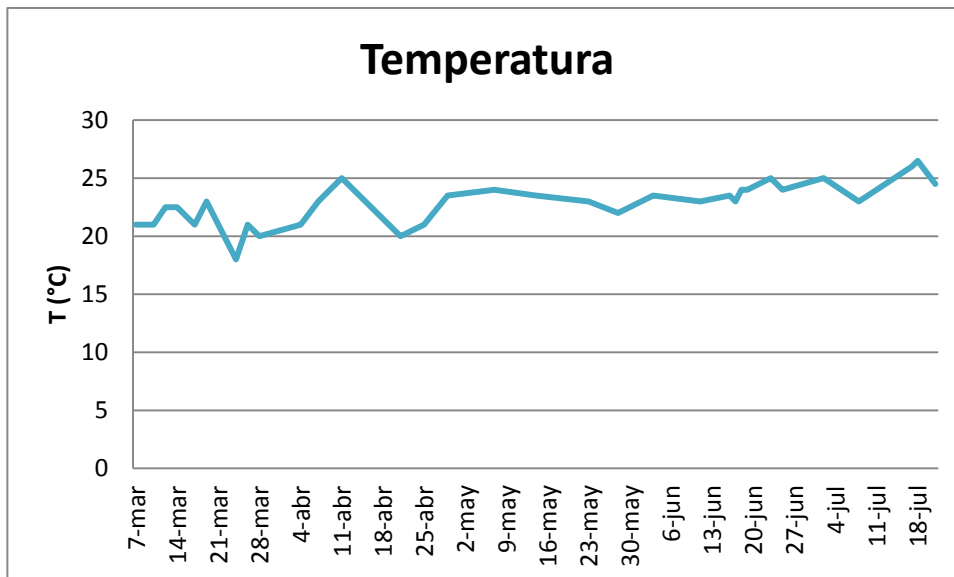


Figura H-1 Variación de la temperatura en el acuario durante la presencia de *Dreissena polymorpha*

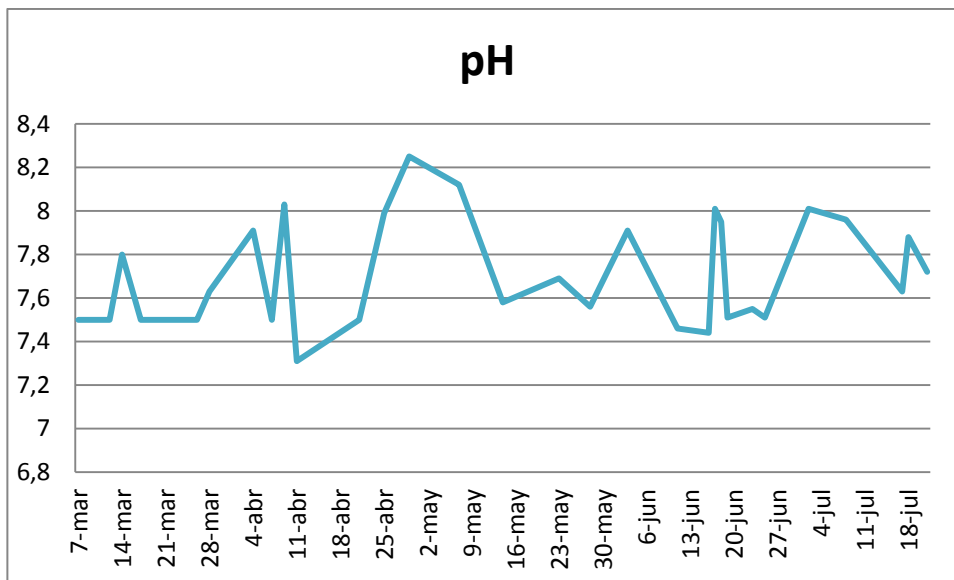


Figura H-2 Variación de pH en el acuario durante la presencia de *Dreissena polymorpha*.

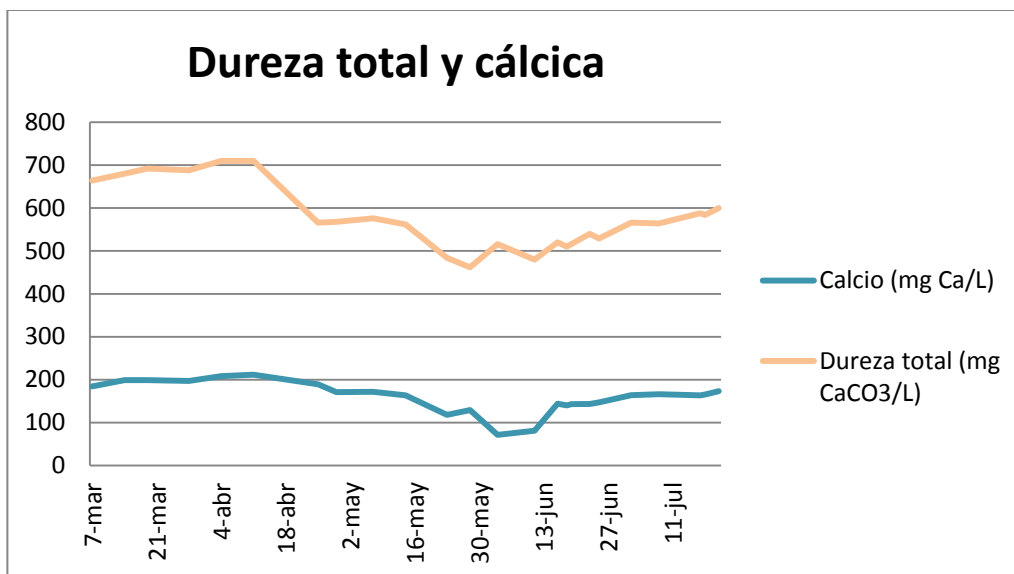


Figura H-3 Variación de dureza total y dureza cálcica en el acuario durante la presencia de *Dreissena polymorpha*.

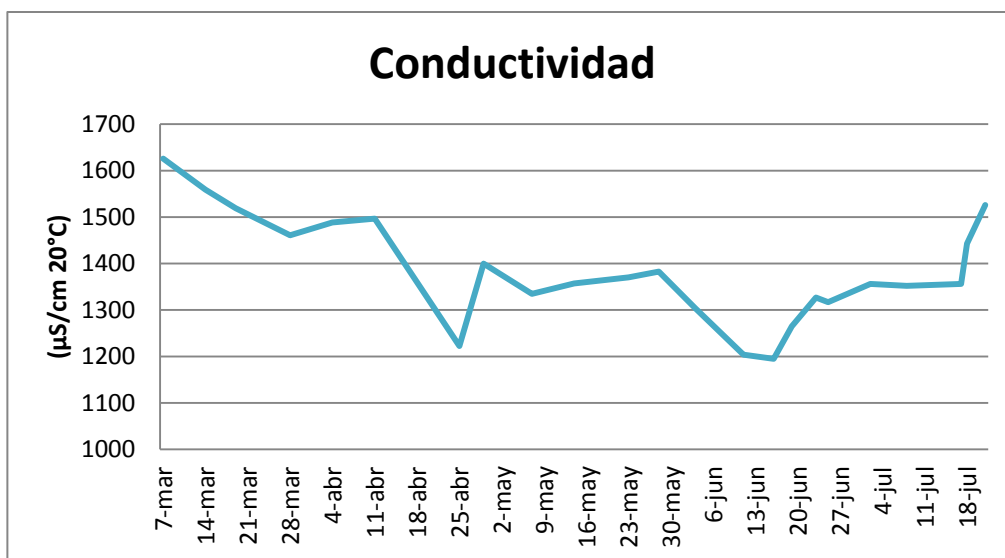


Figura H-4 Variación de conductividad en el acuario durante la presencia de *Dreissena polymorpha*.

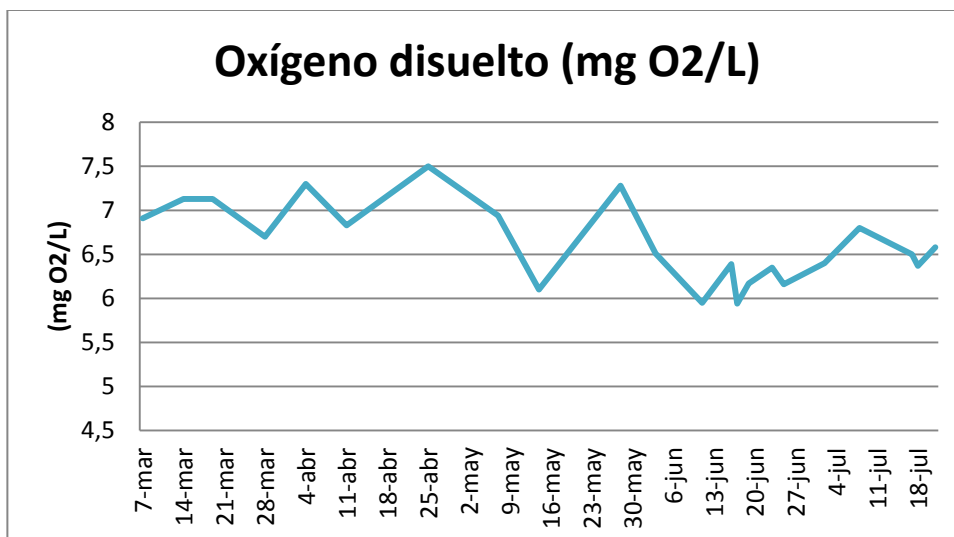


Figura H-5 Variación del oxígeno en el acuario durante la presencia de *Dreissena polymorpha*.

H.2. Estudio de la calidad del agua en los puntos de muestreo

Los datos obtenidos de los parámetros imperativos, necesarios para clasificar las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable en categoría A1, A2, A3 o peor que A3, de los que se tiene información en cada punto de muestreo se detallan a continuación para los años 2012, 2013 y 2014; así como la clasificación de cada uno de ellos.

H.2.1. Embalse de La Sotonera

Tabla H-1 Parámetros imperativos para la determinación de la calidad de aguas prepotables y caracterización de cada uno de ellos. Año 2012, embalse de La Sotonera.

Parámetro	Unidades	Año 2012												Clasif.
		18/01/12	25/01/12	01/02/12	26/03/12	07/05/12	30/05/12	27/06/12	16/07/12	08/08/12	26/09/12	26/11/12	12/12/12	
Amonio total	mg/L NH4	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	0,16	<0,13	A1
Aspecto	--	1		2	2	2	2	1		2	1	3	2	A1
Nitratos	mg/L NO3	1,0	1,0	1,0	1,3	1,2	1,3	1,1	<1,0	<1,0	<1,0	9,4	10,9	A1
Cobre	mg/L				<0,0020	<0,0020					<0,0020	0,0021		A1
Temperatura del agua	°C	5,2	7,3	5,7		19,6	19,9	24,4	23,1	23,2	17,0	11,9	1,1	A1
Sulfatos	mg/L SO4		42,4	44,8	35,3	34,6	32,2	30,6	30,0	30,1	34,0	91,5	106,0	A1
Zinc	mg/L				<0,010	<0,010					<0,010	<0,010		A1
Hierro	mg/L				0,042	0,044					0,034	0,16		A1
Arsénico	mg/L					0,00063								A1
Bario	mg/L					0,0364								A1
Cadmio	mg/L					<0,00002								A1
Cromo	mg/L					<0,0020								A1
Mercurio	mg/L					<0,000012								A1
Plomo	mg/L					<0,0005								A1
Selenio	mg/L					<0,00020								A1
Fenoles	mg/L					<0,025								A1
Hidrocarburos método IR	mg/L													
Cianuros	mg/L CN					<0,005								A1
Fluoruros	mg/L F					0,11								A1
Plaguicidas Orden 11/05/1988	µg/l					0								A1
Salmonelas 1L	/1000 mL					AUSENCIA								A2
Total HPA Orden 11/05/1988	µg/l					0								A1

Tabla H-2 Parámetros imperativos para la determinación de la calidad de aguas prepotables y caracterización de cada uno de ellos. Año 2013, embalse de La Sotonera.

Parámetro	Unidades	Año 2013											Clasif.
		23/01/13	13/02/13	13/03/13	25/03/13	15/04/13	21/05/13	12/06/13	10/07/13	16/09/13	19/11/13	12/12/13	
Amonio total	mg/L NH4	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	A1
Aspecto	--	1	2	2	1	2	2	1	1	2	2		A1
Nitratos	mg/L NO3	6,3	4,7	5,9	3,3	3,5	2,9	2,5	1,9	1,1		1,2	A1
Cobre	mg/L				<0,0020	<0,0020	<0,0020						A1
Temperatura del agua	°C	5,4	6,2	9,6	9,1	12,1	14,8	18,8	20,3	18,7	8,5	4,1	A1
Sulfatos	mg/L SO4	82,0	61,5	81,9		37,1	35,3	33,6	28,8	28,7	33,6	28,2	A1
Zinc	mg/L				<0,010	<0,010	<0,010						A1
Hierro	mg/L				0,022	0,059	0,081						A1
Arsénico	mg/L						0,00051						A1
Bario	mg/L						0,0364						A1
Cadmio	mg/L						0,00003						A1
Cromo	mg/L						<0,0020						A1
Mercurio	mg/L						<0,000012						A1
Plomo	mg/L						0,0005						A1
Selenio	mg/L						<0,00020						A1
Fenoles	mg/L												
Hidrocarburos método IR	mg/L						<0,025						A1
Cianuros	mg/L CN						<0,005						A1
Fluoruros	mg/L F						0,13						A1
Plaguicidas Orden 11/05/1988	µg/l						0						A1
Salmonelas 1L	/1000 mL						PRESENCIA						A3
Total HPA Orden 11/05/1988	µg/l						0						A1

Tabla H-3 Parámetros imperativos para la determinación de la calidad de aguas prepotables y caracterización de cada uno de ellos. Año 2014, embalse de La Sotonera.

Parámetro	Unidades	Año 2014										Clasif.
		21/01/14	26/02/14	06/03/14	08/04/14	21/05/14	19/06/14	30/07/14	25/08/14	17/09/14	24/09/14	
Amonio total	mg/L NH4	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	A1
Aspecto	--	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	A1
Nitratos	mg/L NO3	10,1	2	1,9	<1,0	2	1,6	1,3	1	1,1		A1
Cobre	mg/L	<0,0020			<0,0020					<0,00020		A1
Temperatura del agua	°C	5,5	8,7	10,9	18,7	15,8	19,9	20,6	21,9	21,5	20,1	A1
Sulfatos	mg/L SO4	69,5	40,6	42,4	47,3	30,2	26,8	26,6	26,6	31,0		A1
Zinc	mg/L	<0,010			<0,010					<0,010		A1
Hierro	mg/L	0,021			0,19					0,04		A1
Arsénico	mg/L				0,00137							A1
Bario	mg/L				0,0298							A1
Cadmio	mg/L				<0,00002							A1
Cromo	mg/L				<0,0020							A1
Mercurio	mg/L				<0,000012							A1
Plomo	mg/L				<0,0005							A1
Selenio	mg/L				0,00020							A1
Fenoles	mg/L											
Hidrocarburos método IR	mg/L											
Cianuros	mg/L CN				0,005							A1
Fluoruros	mg/L F				<0,10							A1
Plaguicidas Orden 11/05/1988	µg/l				0							A1
Salmonelas 1L	/1000 mL				PRESENCIA							A3
Total HPA Orden 11/05/1988	µg/l				0							A1

Como se observa en la Tabla H-1, Tabla H-2 y Tabla H-3, no se tiene datos de fenoles en ninguno de los tres años. Por este motivo, no sería posible determinar la calidad de las aguas de abastecimiento en dicho punto, ya que como se indica en la Orden 11/05/88 es uno de los parámetros cuyo análisis es de carácter obligatorio.

Obviando la falta de dicha medida se podría decir que la calidad de las aguas en el año 2012 sería A2, debido a la ausencia de salmonelas en 1L. En el caso de 2013 y 2014 la calidad empeora ya que existe presencia de salmonelas en 1L, por lo que se clasifica como categoría A3.

H.2.2. Embalse de Flix

En la Tabla H-4, Tabla H-5 y Tabla H-6 se recoge la información de los parámetros imperativos objetos de estudio, para los tres años, así como la caracterización de todos ellos. Como se menciona en el ANEXO G, de nuevo no se obtienen datos de fenoles, por lo que no se puede realizar una caracterización del punto totalmente rigurosa y se hace obviando la determinación de dicho parámetro.

Tabla H-4 Parámetros imperativos para la determinación de la calidad de aguas prepotables y caracterización de cada uno de ellos. Año 2012, embalse de Flix.

Parámetro	Unidades	Año 2012			
		25/01/12	02/04/12	08/10/12	Clasificación
Amonio total	mg/L NH4	<0,13	<0,13	<0,13	A1
Aspecto	--	1	1	2	A1
Nitratos	mg/L NO3	9,1	10,4	7,0	A1
Cobre	mg/L	<0,0020		<0,0020	A1
Temperatura del agua	°C	9,1	12,3	22,6	A1
Sulfatos	mg/L SO4	270,0		346,0	A1
Zinc	mg/L	<0,010		<0,010	A1
Hierro	mg/L	0,009		0,016	A1
Arsénico	mg/L			0,00125	A1
Bario	mg/L			0,0418	A1
Cadmio	mg/L			0,00007	A1
Cromo	mg/L			<0,0020	A1
Mercurio	mg/L			<0,000012	A1
Plomo	mg/L			<0,0005	A1
Selenio	mg/L			0,00060	A1
Fenoles	mg/L				
Hidrocarburos método IR	mg/L			<0,025	A1
Cianuros	mg/L CN			<0,005	A1
Fluoruros	mg/L F			0,30	A1
Plaguicidas Orden 11/05/1988	µg/l			0	A1
Salmonelas 1L	/1000 mL			AUSENCIA	A2
Total HPA Orden 11/05/1988	µg/l			0	A1

En el año 2012 se observa una concentración de sulfatos superior a la permitida (250 mg SO₄/L), sin embargo, el parámetro se clasifica igualmente como categoría A1 ya que aparece como una de las excepciones de la calidad exigida a las aguas superficiales en el ANEXO II de la Orden 11/05/88, puesto que el origen de este resultado más elevado es natural, ya que se trata de un punto situado en el tramo bajo de una cuenca yesífera.

Si se tiene esta consideración en cuenta, la calidad de aguas de abastecimiento en este punto viene de nuevo marcada por las salmonelas y será A2.

Tabla H-5 Parámetros imperativos para la determinación de la calidad de aguas prepotables y caracterización de cada uno de ellos. Año 2013, embalse de Flix.

Parámetro	Unidades	Año 2013				Clasificación
		30/01/13	04/04/13	04/07/13	22/10/13	
Amonio total	mg/L NH ₄	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	A1
Aspecto	--	2	1	1	2	A1
Nitratos	mg/L NO ₃	8,8	8,2	6,4	8,9	A1
Cobre	mg/L	<0,0020			<0,0020	A1
Temperatura del agua	°C	8,9	11,9	21,4	19,8	A1
Sulfatos	mg/L SO ₄	99,4			242,0	A1
Zinc	mg/L	<0,010			<0,010	A1
Hierro	mg/L	0,069			0,014	A1
Arsénico	mg/L				0,00159	A1
Bario	mg/L				0,0361	A1
Cadmio	mg/L				<0,000020	A1
Cromo	mg/L				<0,0020	A1
Mercurio	mg/L				<0,000012	A1
Plomo	mg/L				<0,0005	A1
Selenio	mg/L				0,00057	A1
Fenoles	mg/L					
Hidrocarburos método IR	mg/L				<0,025	A1
Cianuros	mg/L CN				<0,005	A1
Fluoruros	mg/L F				0,16	A1
Plaguicidas Orden 11/05/1988	µg/l				0	A1
Salmonelas 1L	/1000 mL				AUSENCIA	A2
Total HPA Orden 11/05/1988	µg/l				0	A1

En el año 2013, no se supera el límite de sulfatos en este embalse. Por lo que como muestra la Tabla H-5 la calidad del agua ese año será de nuevo A2 (Ausencia de salmonelas en 1L).

Tabla H-6 Parámetros imperativos para la determinación de la calidad de aguas prepotables y caracterización de cada uno de ellos. Año 2014, embalse de Flix.

Parámetro	Unidades	Año 2014			Clasificación
		14/01/14	02/04/14	21/07/14	
Amonio total	mg/L NH4	<0,13	<0,13	<0,13	A1
Aspecto	--	2	2	2	A1
Nitratos	mg/L NO3		6,2	7,1	A1
Cobre	mg/L	0,0027		0,0022	A1
Temperatura del agua	°C	7,6	11,5	2,1	A1
Sulfatos	mg/L SO4	203,0		205,0	A1
Zinc	mg/L	<0,010		<0,010	A1
Hierro	mg/L	0,01		0,013	A1
Arsénico	mg/L			0,00211	A1
Bario	mg/L			0,0335	A1
Cadmio	mg/L			<0,000020	A1
Cromo	mg/L			<0,0020	A1
Mercurio	mg/L			<0,000012	A1
Plomo	mg/L			<0,0005	A1
Selenio	mg/L			0,00047	A1
Fenoles	mg/L				
Hidrocarburos método IR	mg/L			<0,025	A1
Cianuros	mg/L CN			<0,005	A1
Fluoruros	mg/L F			0,18	A1
Plaguicidas Orden 11/05/1988	µg/l			0	A1
Salmonelas 1L	/1000 mL			AUSENCIA	A2
Total HPA Orden 11/05/1988	µg/l			0	A1

De nuevo, no se supera el límite de sulfatos en 2014. Por tanto, la calidad del agua vuelve a ser categoría A2.

H.2.3. Embalse de Sobrón

Tabla H-7 Parámetros imperativos para la determinación de la calidad de aguas prepotables y caracterización de cada uno de ellos. Año 2012, embalse de Sobrón.

Año 2012														
EMBALSE DE SOBRÓN														
Parámetro	Unidades	08/02/2012					16/05/2012					Clasif.		
Amonio total	mg/L NH4	<0,13					<0,13					A1		
Nitratos	mg/L NO3	3,6					2,6					A1		
Temperatura del agua	°C	4,7					17,7					A1		
Sulfatos	mg/L SO4	12,3					28,2					A1		
MUNICIPIO DE FRÍAS														
Parámetro	Unidades	03/10/2012												Clasif.
Aspecto	--	1												A1
MIRANDA DE EBRO														
Parámetro	Unidades	17/01/12	08/02/12	05/03/12	23/04/12	16/05/12	13/06/12	10/07/12	08/08/12	12/09/12	03/10/12	26/11/12	13/12/12	Clasif.
Aspecto	--	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	A1
Cobre	mg/L	<0,0020	<0,0020	0,0022	<0,010	0,0023	0,0025	0,0034	0,0072	0,0032	0,0020	0,0028	<0,0020	A1
Zinc	mg/L	<0,010	<0,010	0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	0,026	<0,010	0,034	<0,010	<0,010	A1
Arsénico	mg/L	0,00032	0,00040	0,00028	0,00027	0,00038	0,00076	0,00048	0,00080	0,00061	0,00081	0,00054	0,00027	A1
Cadmio	mg/L	0,00003	0,00004	0,00003	<0,00010	0,00002	0,00006	0,00006	0,00002	0,00009	0,00006	<0,00002	0,00002	A1
Cromo	mg/L	<0,0020	<0,0020				<0,0020							A1
Mercurio	mg/L	<0,000012	<0,000012	<0,000012	<0,000012	<0,000012	<0,000012	<0,000012	<0,000012	<0,000012	<0,000012	<0,000012	<0,000012	A1
Plomo	mg/L	<0,0005	0,0008	<0,0005	<0,0005	<0,0005	<0,0005	0,0005	<0,0005	0,0012	0,0011	<0,0005	0,0018	A1
Selenio	mg/L	0,00025	0,00020				0,00020							A1
Cianuros	mg/L CN	<0,005	<0,005											A1
Fluoruros	mg/L F	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	0,10	0,10	<0,10		<0,10	0,10	<0,10	A1

Tabla H-8 Parámetros imperativos para la determinación de la calidad de aguas prepotables y caracterización de cada uno de ellos. Año 2013, embalse de Sobrón.

Año 2013													
MUNICIPIO DE FRÍAS													
Parámetro	Unidades	21/08/2013					19/08/2013					Clasif.	
Amonio total	mg/L NH4	-					<0,13					A1	
Nitratos	mg/L NO3	-					14,1					A1	
Temperatura del agua	°C	20,0					6,6					A1	
Sulfatos	mg/L SO4	-					20,03					A1	
Aspecto	--	-					2					A1	
MIRANDA DE EBRO													
Parámetro	Unidades	17/01/13	07/02/13	14/03/13	29/04/13	09/05/13	20/06/13	02/07/13	26/09/13	01/10/13	19/11/13	18/12/13	Clasif.
Aspecto	--	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	A1
Amonio total	mg/L NH ₄	<0,13			<0,13			<0,13		0,15			A1
Nitratos	mg/L NO ₃	6,2			10,5			5,2		2,7			A1
Temperatura del agua	°C	7,1	7,2	8,0	11,3	12,1	17,0	18,3	18,9	18,9	9,9	7,5	A1
Sulfatos	mg/L SO4	22,6	-	-	83,5	-	-	76,0	-	86,4	-	-	A1
Cobre	mg/L	0,0033	<0,0020	<0,0020	<0,0020	<0,0020	<0,0020	<0,0020	0,0066	<0,0020	<0,0020	<0,0020	A1
Zinc	mg/L	<0,010	0,01	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	0,014	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	A1
Arsénico	mg/L	0,00029	0,00044	0,00046	0,00046	0,00024	0,00038	0,00032	0,00113	0,00040	0,00064	0,00052	A1
Cadmio	mg/L	0,00003	0,00003	0,00003	0,00004	0,00002	<0,000020	<0,000020	<0,000020	<0,000020	<0,000020	<0,000020	A1
Cromo	mg/L					<0,0020							A1
Mercurio	mg/L	<0,000012	<0,000012	<0,000012	<0,000012	<0,000012	<0,000012	<0,000012	<0,000012	<0,000012	<0,000012	<0,000012	A1
Plomo	mg/L	0,0013	0,0008	<0,0005	<0,0005	<0,0005	<0,0005	<0,0005	<0,0005	<0,0005	<0,0005	<0,0005	A1
Selenio	mg/L					<0,00020							A1
Cianuros	mg/L CN					<0,005							A1
Fluoruros	mg/L F	0,10	0,11	0,11	0,13	<0,10	0,16	0,11	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	A1

Tabla H-9 Parámetros imperativos para la determinación de la calidad de aguas prepotables y caracterización de cada uno de ellos. Año 2014, embalse de Sobrón.

Año 2014											
MUNICIPIO DE FRÍAS											
Parámetro	Unidades	25/03/2014			24/06/2014			22/07/2014			Clasif.
Amonio total	mg/L NH ₄	<0,13			<0,13			<0,13			A1
Nitratos	mg/L NO ₃	14,0			2,6			3,0			A1
Temperatura del agua	°C	14,2			18,9			19,2			A1
Sulfatos	mg/L SO ₄	25,8			37,3			35,7			A1
Aspecto	--	2			2			2			A1
MIRANDA DE EBRO											
Parámetro	Unidades	15/01/14	13/02/14	17/03/14	01/04/14	22/05/14	10/06/14	08/07/14	24/08/14	09/09/14	Clasif.
Cobre	mg/L	<0,0020	<0,0020	<0,0020	<0,0020	<0,0020	<0,0020	0,023	<0,0020	<0,0020	A1
Zinc	mg/L	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	0,017	<0,010	<0,010	A1
Arsénico	mg/L	0,00047	0,00083	0,00051	0,00031	0,00041	0,00035	0,00068	0,00112	0,00070	A1
Cadmio	mg/L	<0,000020	0,000021	<0,000020	<0,000020	<0,000020	<0,000020	<0,000020	<0,000020	<0,000020	A1
Cromo	mg/L					<0,0020					A1
Mercurio	mg/L	<0,000012	<0,000012	<0,000012	<0,000012	<0,000012	<0,000012	<0,000012	<0,000012	<0,000012	A1
Plomo	mg/L	<0,0005	0,0006	<0,0005	<0,0005	<0,0005	<0,0005	<0,0005	<0,0005	<0,0005	A1
Selenio	mg/L					<0,00020					A1
Cianuros	mg/L CN					<0,005					A1
Fluoruros	mg/L F	0,11	<0,10	<0,10	<0,10	0,12	0,10	0,10	<0,10	0,11	A1
MIRANDA DE EBRO											
Parámetro	Unidades	05/05/2014									Clasif.
Salmonelas 1L	/1000 mL	PRESENCIA									A3

En el embalse de Sobrón aparece una gran ausencia de datos para realizar el análisis de aguas superficiales destinadas a la producción de aguas potables, ya que como se ha indicado en el ANEXO G, no existe información de los siguientes parámetros en ninguna estación de control, lo suficientemente cercana, de manera que los resultados obtenidos quedan condicionados por el valor de esos parámetros de los que no se tiene información :

- Salmonelas
- Hidrocarburos método IR
- Fenoles
- Total HPA
- Bario
- Hierro
- Plaguicidas Orden 11/05/1988

En cambio parámetros como mercurio, arsénico, cobre o cadmio presentan una frecuencia de análisis mucho más elevada que en el resto de puntos de control; 9-12 análisis anuales, mientras que en los demás se realiza sólo uno. Todos estos parámetros se clasifican como categoría A1 en los tres años (Tabla H-7, Tabla H-8 y Tabla H-9).

Si se compara la calidad de los años 2012 y 2013, con la de 2014 en la que se emplean los resultados de salmonelas del análisis de bacterias realizado, es decir, presencia en 1L, se observa que cambia de A1 a A3., lo que demuestra que en realidad la información de la que se dispone no es suficiente.

H.2.4. Acequia de Rimer (Caspe)

En la Tabla H-10, Tabla H-11 y Tabla H-12 se muestran los datos obtenidos de la estación de control escogida para la acequia de Rimer y su caracterización. Igual que ocurre en los embalses de La Sotenera y Flix, tampoco se cuenta con información de fenoles, por lo que se realiza el estudio de calidad obviando la determinación de dicho parámetro.

Tabla H-10 Parámetros imperativos para la determinación de la calidad de aguas prepotables y caracterización de cada uno de ellos. Año 2012, acequia de Rimer (Caspe).

Parámetro	Unidades	Año 2012				Clasificación
		23/01/12	30/04/12	17/07/12	16/10/12	
Amonio total	mg/L NH4	<0,13	<0,13	0,16	<0,13	A1
Aspecto	--	1	2	1	1	A1
Nitratos	mg/L NO3	1	2,8	<1,0	2,3	A1
Cobre	mg/L	<0,0020		<0,0020		A1
Temperatura del agua	°C	10,0	11,7	25,6	19,2	A1
Sulfatos	mg/L SO4			784		A1
Zinc	mg/L	<0,010		<0,010		A1
Hierro	mg/L	0,036		0,019		A1
Arsénico	mg/L			0,0022		A1
Bario	mg/L			0,0302		A1
Cadmio	mg/L			<0,00002		A1
Cromo	mg/L			<0,0020		A1
Mercurio	mg/L			<0,000012		A1
Plomo	mg/L			<0,0005		A1
Selenio	mg/L			0,00047		A1
Fenoles	mg/L					
Hidrocarburos método IR	mg/L			<0,025		A1
Cianuros	mg/L CN			<0,005		A1
Fluoruros	mg/L F			0,41		A1
Plaguicidas Orden 11/05/1988	µg/l			0		A1
Salmonelas 1L	/1000 mL			AUSENCIA		A2
Total HPA Orden 11/05/1988	µg/l			0		A1

Se observa, igual que en Flix en 2012, que la concentración de sulfatos es superior a la permitida (250 mg SO₄/L); ocurre lo mismo con la temperatura que supera los 25°C. Como se ha indicado anteriormente, los sulfatos se clasifican igualmente como categoría A1 ya que aparece, de igual manera que la temperatura, como una de las excepciones de la calidad exigida a las aguas superficiales en el ANEXO II de la Orden 11/05/88. En el caso temperatura, su elevado valor también se debe a una causa natural, ya que este dato pertenece a meses de

verano con elevadas temperaturas, por lo que se clasifica como categoría A1. Por tanto, como se observa en la Tabla H-10 la calidad del agua en este punto es A2.

Tabla H-11 Parámetros imperativos para la determinación de la calidad de aguas prepotables y caracterización de cada uno de ellos. Año 2013, acequia de Rimer (Caspé).

Parámetro	Unidades	Año 2013				Clasificación
		08/01/13	29/04/13	22/07/13	02/10/13	
Amonio total	mg/L NH4	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	A1
Aspecto	--	1	2	2	2	A1
Nitratos	mg/L NO3	3,3	9,1	1,2	1,8	A1
Cobre	mg/L	<0,0020		<0,0020		A1
Temperatura del agua	°C	8,9	13,6	30,5	22,4	A1
Sulfatos	mg/L SO4	925,0		482,0		A1
Zinc	mg/L	<0,010		<0,010		A1
Hierro	mg/L	0,011		0,072		A1
Arsénico	mg/L			0,00122		A1
Bario	mg/L			0,03		A1
Cadmio	mg/L			<0,00002		A1
Cromo	mg/L			<0,0020		A1
Mercurio	mg/L			<0,000012		A1
Plomo	mg/L			<0,0005		A1
Selenio	mg/L			0,00067		A1
Fenoles	mg/L					
Hidrocarburos método IR	mg/L			<0,025		A1
Cianuros	mg/L CN			<0,005		A1
Fluoruros	mg/L F			0,28		A1
Plaguicidas Orden 11/05/1988	µg/l			0		A1
Salmonelas 1L	/1000 mL			AUSENCIA		A2
Total HPA Orden 11/05/1988	µg/l			0		A1

En 2013, ocurre lo mismo con sulfatos y temperaturas que en el año anterior. La calidad del agua viene de nuevo condicionada por las salmonelas, que presenta ausencia en 1L, por lo que la calidad será A2.

Tabla H-12 Parámetros imperativos para la determinación de la calidad de aguas prepotables y caracterización de cada uno de ellos. Año 2014, acequia de Rimer (Caspe).

Parámetro	Unidades	Año 2014			Clasificación
		15/01/14	03/04/14	01/07/14	
Amonio total	mg/L NH4	<0,13	<0,13	<0,13	A1
Aspecto	--	2	2	2	A1
Nitratos	mg/L NO3	3,3	3,2	1,3	A1
Cobre	mg/L	0,0032		<0,0020	A1
Temperatura del agua	°C	7,6	12,2		A1
Sulfatos	mg/L SO4	492,0		596,0	A1
Zinc	mg/L	<0,010		<0,010	A1
Hierro	mg/L	0,01		0,013	A1
Arsénico	mg/L			0,00056	A1
Bario	mg/L			0,0254	A1
Cadmio	mg/L			<0,000020	A1
Cromo	mg/L			<0,0020	A1
Mercurio	mg/L			<0,000012	A1
Plomo	mg/L			<0,0005	A1
Selenio	mg/L			0,0006	A1
Fenoles	mg/L				
Hidrocarburos método IR	mg/L			<0,025	A1
Cianuros	mg/L CN			<0,005	A1
Fluoruros	mg/L F			0,34	A1
Plaguicidas Orden 11/05/1988	µg/l			0	A1
Salmonelas 1L	/1000 mL			AUSENCIA	A2
Total HPA Orden 11/05/1988	µg/l			0	A1

En 2014 se supera el límite de sulfatos pero no el de temperatura. La calidad del agua vuelve a ser A2.

H.3. Acumulación de metales en *Dreissena polymorpha*

En la Tabla H-13y Tabla H-13 bis se muestran los valores de todos los metales analizados en los ejemplares liofilizados de *Dreissena polymorpha* de los cuatro puntos de muestreo. El análisis se realiza por Ionización en Plasma de Acoplamiento Inductivo-Espectrometría de Masas.

Tabla H-13 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 µg/g
	Conc. µg/g	Conc. µg/g	Conc. µg/g	Conc. µg/g	Conc. µg/g
Li	1,45	2,54	0,27	0,42	0,02
Be	0,06	0,08	<MCD	<MCD	0,04
B	<MCD	0,92	1,10	0,76	0,61
Na	466,25	762,07	1675,53	1322,57	22,74
Mg	664,57	955,01	798,80	933,60	0,33
Al	833,07	1447,86	100,19	151,98	8,76
Si	205,35	64,63	190,30	287,64	4,69
P	5738,01	7062,68	6330,52	6646,46	17,08
K	831,08	2278,90	1404,72	1286,42	3,98
Ca	7225,84	10604,49	14801,30	8819,35	4,76
Sc	3,63	3,70	1,44	1,91	0,78
Ti	28,77	45,71	24,94	27,71	0,91
V	<MCD	<MCD	<MCD	<MCD	4,56
Cr	67,26	4,65	3,38	2,68	0,07
Mn	40,19	72,89	16,43	41,39	0,09
Fe	952,19	1287,81	353,08	461,34	34,24
Co	0,90	1,13	0,89	0,92	0,02
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
Ga	0,41	0,67	0,10	0,11	0,01
As	3,91	4,13	6,59	7,50	1,21
Se	<MCD	<MCD	<MCD	<MCD	3,25
Rb	3,18	6,40	2,46	2,40	0,02
Sr	66,95	62,73	86,01	60,75	0,06
Y	0,24	0,51	0,08	0,13	0,01
Zr	0,21	0,51	0,09	0,24	0,06
Nb	0,09	0,10	0,02	0,04	0,01
Mo	0,13	0,34	0,36	0,15	0,04
Ru	<MCD	<MCD	<MCD	<MCD	0,01
Pd	<MCD	<MCD	<MCD	<MCD	0,03
Ag	<MCD	0,68	<MCD	<MCD	0,24
Cd	0,62	0,64	2,51	1,28	0,03
Sn	<MCD	<MCD	<MCD	<MCD	0,1
Pr	0,11	0,21	0,04	0,06	0,01

Tabla H-13 bis 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 µg/g
	Conc. µg/g	Conc. µg/g	Conc. µg/g	Conc. µg/g	Conc. µg/g
Sb	<MCD	0,17	0,03	0,04	0,01
Te	<MCD	<MCD	<MCD	<MCD	0,06
Cs	0,24	0,35	0,05	0,06	0,01
Ba	12,29	17,48	5,53	3,91	0,05
La	0,43	0,90	0,17	0,19	0,01
Ce	<MCD	1,42	<MCD	<MCD	0,36
Nd	0,37	0,85	0,15	0,17	0,01
Sm	0,08	0,18	0,03	0,04	0,01
Eu	0,02	0,04	<MCD	<MCD	0,01
Gd	0,08	0,18	0,02	0,04	0,01
Tb	0,01	0,02	<MCD	<MCD	0,01
Dy	0,05	0,11	0,02	0,03	0,01
Ho	<MCD	0,02	<MCD	<MCD	0,01
Er	0,03	0,05	0,01	0,01	0,01
Tm	<MCD	<MCD	<MCD	<MCD	0,01
Yb	0,02	0,04	<MCD	<MCD	0,01
Lu	<MCD	<MCD	<MCD	<MCD	0,01
Hf	0,01	0,01	<MCD	<MCD	0,01
Ta	<MCD	<MCD	<MCD	<MCD	0,01
W	0,38	0,24	0,18	0,22	0,09
Re	<MCD	<MCD	<MCD	<MCD	0,01
Os	<MCD	<MCD	<MCD	<MCD	0,01
Ir	<MCD	<MCD	<MCD	<MCD	0,01
Pt	<MCD	<MCD	<MCD	<MCD	0,17
Au	0,03	<MCD	<MCD	<MCD	0,01
Hg	<MCD	0,10	0,15	<MCD	0,08
Tl	0,03	0,05	0,01	0,02	0,01
Pb	0,58	1,78	0,19	0,45	0,06
Bi	<MCD	<MCD	<MCD	<MCD	0,05
Th	0,21	0,35	0,04	0,06	0,01
U	0,08	0,21	0,15	0,31	0,01

En la Tabla H-14 se realiza también una comparación con la concentración en aguas de calcio, magnesio, sodio y potasio, cationes muy abundantes en el agua cuya concentración depende de la mineralización de la zona. En este caso, se compara con los datos de la CHE únicamente del año 2014, ya que en este caso, como se trata de minerales naturales en el agua no se espera que queden retenidos en el interior del mejillón durante todo su ciclo de vida, si no que estos minerales serán metabolizados.

Tabla H-14 Comparación de los datos concentración en aguas (www.chebro.es) y resultados 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)
Ca	35,0 - 65,2 7225,84	- 10604,49	- 14801,30	- 8819,45
Mg	7,9 - 16,5 664,57	- 955,61	- 798,80	- 933,60
Na	7,4 - 16,4 466,25	92,4 - 99,9 762,07	- 1675,3	35,8 - 47,3 1322,57
K	1,1 - 4,1 831,08	- 2278,9	- 1403,7	- 1286,42

No se dispone de la suficiente información para realizar una comparativa entre los puntos de muestreo. Únicamente se tienen datos de sodio en La Sotonera, Flix y la acequia de Rimer. En ese caso, no se observa una relación directa entre la concentración del agua y la del tejido de mejillón, ya que aunque el punto de menor concentración en el agua se corresponde con el de menor concentración en el mejillón, en las otras dos localizaciones donde la concentración en el mejillón es más elevada no ocurre lo mismo, puesto que el punto donde se detecta mayor concentración en el agua es Flix, mientras que la más elevada en el molusco pertenece a la muestra de Caspe. Por tanto, en los puntos donde la concentración es elevada en el agua también lo será en *D. polymorpha*, y si es baja en el agua también lo será en el mejillón, pero no existe una correlación directa. Aunque hay que resaltar la posibilidad de que al existir una distancia de 15-20 km entre la estación de control de la CHE de la que se toman los datos y el lugar de la recogida de muestra, muy probablemente la concentración de sodio pueda cambiar, ya que se trata de un mineral muy abundante en la naturaleza, cuya concentración cambia en función de las características mineralógicas del lugar, lo que puede ser un factor clave para explicar esta diferencia en los resultados, más aun si se tiene en cuenta que Caspe es un importante ZIG, fundamentalmente por sus características geomorfológicas, hidrogeológicas y mineralógicas, abundando minerales como la halita, que es una fuente de sodio.

Si se analizan los resultados de La Sotonera, ya que es del único embalse del que se tiene información de los cuatro metales, se observa que su orden de concentración en el agua es: $Ca^{2+} > Mg^{2+} \cong Na^+ > K^+$ y en el mejillón cebra: $Ca^{2+} > K^+ > Mg^{2+} > Na^+$ lo que muestra que en esta ocasión, el que mejor se acumula en el interior del mejillón es el potasio. Teniendo en cuenta que se trata de minerales esenciales, este hecho probablemente podría estar relacionado con el radio atómico de los cuatro elementos, que se ordena: $K^+ > Ca^{2+} > Na^+ > Mg^{2+}$. Como se muestra, el elemento de mayor radio atómico es el potasio por lo que se acumularía más en el interior del mejillón a pesar de ser el que se encuentra en menor concentración en el medio.

Este orden de concentración en *D. polymorpha* coincide con el de Flix; pero sin embargo, difiere del obtenido en el embalse de Sobrón y la acequia de Rimer se encuentra que

el orden varía: $\text{Ca}^{2+} > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Mg}^{2+}$, por lo que probablemente, y teniendo en cuenta que su radio atómico es menor que el del potasio, la concentración de sodio en estas dos localizaciones sea mayor.

Si se compara la concentración de los metales de manera global en cada uno de los puntos, se observa que el embalse de La Sotonera es el menos salino; en el caso de los otros tres, la concentración es más elevada, pero no se puede establecer un orden entre las tres localizaciones, ya que la concentración de cada uno es mayor en un punto distinto.

