



# Estudio de acumulación e infección bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus sp.* en el mejillón cebra

**Natividad Miguel** Grupo de Investigación Calidad y Tratamiento de Aguas del Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales (IUCA) del Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza

**Carlos Ugasteburu** Grupo de Investigación Calidad y Tratamiento de Aguas del Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales (IUCA) del Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza

**Rosa Mateo** Grupo de Investigación Calidad y Tratamiento de Aguas del Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales (IUCA) del Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza

**María P. Ormad** Grupo de Investigación Calidad y Tratamiento de Aguas del Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales (IUCA) del Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza

**José L. Ovelleiro** Grupo de Investigación Calidad y Tratamiento de Aguas del Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales (IUCA) del Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza

Como consecuencia del potencial invasor del mejillón cebra y su condición de organismo filtrador, este trabajo pretende evaluar el papel ecológico de esta especie como potencial bioindicador de la calidad microbiológica del agua, a través del estudio de su capacidad de acumulación e infección de *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus sp.* Los experimentos de acumulación bacteriana muestran que el mejillón cebra es capaz de acumular la práctica totalidad de las bacterias presentes en un agua tras 24 horas, siendo mayor el porcentaje de acumulación de bacterias *P. aeruginosa* con respecto a *Enterococcus sp.* como consecuencia del mayor tamaño de las primeras, factor que favorece su metabolización. Asimismo, se demuestra que el mejillón cebra es capaz de infectar aguas nuevas con microorganismos previamente acumulados, aunque en mucha menor proporción que su acumulación, concentrando, como consecuencia, estos microorganismos en su tejido interno y dejando constancia de su potencial uso como bioindicador de la calidad microbiológica de las aguas.

## Palabras clave

Mejillón cebra, bioacumulación, infección bacteriana, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus sp.*

## *Bioaccumulation and pollution of bacteria Pseudomonas aeruginosa and Enterococcus sp. by zebra mussel*

*As a consequence of the invader potential of zebra mussel and its filtration power, this work is focused on the evaluation of zebra mussel as bioindicator of the water microbial quality by the study of its bioaccumulation and pollution of Pseudomonas aeruginosa and Enterococcus sp. Experiments about bacterial bioaccumulation show zebra mussel is capable to accumulate almost total bacteria present in water after 24 hours. The accumulation percentage obtained is higher in the case of P. aeruginosa with respect to Enterococcus sp. as a consequence of their size which favors their metabolization. Moreover, zebra mussel is capable of polluting clean water with microorganisms previously accumulated although in lower quantity that its accumulation. This is because zebra mussel can concentrate microorganisms inside so it has a potential use as bioindicator of the water microbial quality.*

## Keywords

*Zebra mussel, bioaccumulation, bacterial pollution, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus sp.*



## 1. Introducción

En la actualidad, la expansión de especies exóticas invasoras, favorecida a raíz del desarrollo del comercio mercantil intra e intercontinental, está considerada como la segunda causa de pérdida de biodiversidad a nivel global (Van der Velde y Platvoet, 2007; Orendt *et al.*, 2010). En este sentido, una de las especies que mayor alarma está generando es el mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*), que es considerado como un invasor perfecto como consecuencia de su gran capacidad reproductora y colonizadora y su elevada plasticidad fisiológica y cuyos efectos ecológicos y económicos han derivado en un empobrecimiento progresivo de la calidad de los ecosistemas en los que habita (Duran *et al.*, 2009).

Este molusco, originario de la región Pronto-Cáslica y descrito por primera vez por Pyotr Simon Pallas en 1771, ha sufrido una amplia y rápida dispersión por la práctica totalidad del continente europeo y Norteamérica durante los siglos XX y XXI, derivada de la adhesión de individuos adultos a los cascos de las embarcaciones y mediante el transporte involuntario de larvas en el agua de lastre las mismas (Bij de Vaate *et al.*, 2002), siendo la fase larvaria la que presenta un mayor potencial de colonización debido a su eleva-

da movilidad en corrientes de agua. Su entrada en un hábitat supone la modificación de las condiciones físicas, químicas y biológicas del mismo (Sanz-Ronda *et al.*, 2014).

Si bien *Dreissena polymorpha* presenta un elevado potencial invasor, es una especie que también requiere una serie de condiciones bióticas y abióticas para su crecimiento y reproducción, ampliamente definidas por numerosos autores (Maxwell, 1992; McMahon, 1996; Wu *et al.*, 2010), siendo los más limitantes la temperatura, el pH y la concentración de calcio del agua. La **Tabla 1** muestra las condiciones de preferencia del mejillón cebra para su colonización y crecimiento (Claudi y Mackie, 1994; O'Neil, 1996).

Este organismo se adhiere a sustratos duros, donde se alimenta, mediante la filtración del agua, de fitoplancton, zooplancton de pequeño tamaño y distintos tipos de materia orgánica e inorgánica (Maxwell, 1992; Cia, 2008), asimilando por lo tanto los compuestos químicos y microbianos presentes en el medio. Es capaz de filtrar hasta 2,5 L/día de agua y de retener en su tejido partículas de hasta 0,7  $\mu\text{m}$  de diámetro (Claudi y Mackie, 1994; Palos Laderio *et al.*, 2014).

Este potencial acumulativo convierte a *Dreissena polymorpha* en

un reservorio de microorganismos indicadores de contaminación fecal, constituyéndose como un riesgo para la salud pública por su gran extensión en todo tipo de aguas y, en consecuencia, en potenciales bioindicadores de calidad microbiológica de las aguas naturales, debido a su utilidad para detectar la presencia de determinados microorganismos en las aguas en las que habitan ya que facilitan su concentración.

Debido a la práctica inexistencia de estudios referidos al papel ecológico del mejillón cebra asociado a este poder bioacumulativo de microorganismos indicadores de contaminación fecal, el objetivo de este trabajo de investigación es estudiar la presencia de microorganismos indicadores de contaminación fecal en el interior de mejillones cebra de aguas superficiales, y determinar la capacidad de este tipo de moluscos para acumular diversas bacterias, en concreto *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus sp.*, de aguas contaminadas e infectar aguas nuevas con estas bacterias acumuladas previamente, permitiendo conocer, de forma más concreta y exhaustiva, el papel y utilidad del mejillón cebra como organismo bioindicador de la calidad microbiológica de las aguas naturales. Los objetivos concretos son:

**Tabla 1.** Condiciones de preferencia del mejillón cebra.

Variable	Condiciones de colonización y crecimiento potenciales					
	Nula	Muy bajas	Bajas	Medias	Altas	Óptimas
Calcio (mg/L)	5 - 6	<9	9 - 20	20 - 25	25 - 125	>125
Dureza total (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	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 / 8,7 - 9,0	7,5 - 8,7	8,0 - 8,5
Temperatura (°C)	<2 / >40	<8 / >30	9 - 15 / 28 - 30	16 - 18 / 25 - 28	18 - 25	18 - 20
Oxígeno disuelto (mg/L)	Anoxia	<4	4 - 6	6 - 8	8 - 10	+/- 100% saturación
Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	0 - 21	<22	22 - 36	37 - 82	83 - 100	>100

- Desarrollar y aplicar una metodología de puesta en marcha y control para la cría y mantenimiento en cautividad de individuos de mejillón cebra.

- Determinar la presencia de *Enterococcus sp.* y *Pseudomonas aeruginosa* en aguas superficiales.

- Desarrollar una metodología de análisis microbiológico para *Enterococcus sp.* y *Pseudomonas aeruginosa* en individuos de *Dreissena polymorpha*.

- Determinar la capacidad de acumulación e infección bacteriana in vitro de esta especie, utilizando los individuos de mejillón cebra mantenidos en cautividad en acuario, tanto de *Pseudomonas aeruginosa* como de *Enterococcus sp.* y *Pseudomonas aeruginosa* en combinación.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Toma y preparación de las muestras

Para todos los ensayos realizados en este estudio se utilizan muestras de agua natural superficial y de individuos de mejillón cebra tomados en una acequia adyacente a la desembocadura del río Guadalupe (acequia Rimer), afluente del río Ebro, en la localidad de Caspe (Zaragoza). Las muestras de agua natural se toman utilizando botellas de 5 L de capacidad y se conservan a -20 °C para mantener sus propiedades fisicoquímicas. Se realizan dos muestreos en dos épocas del año diferentes, siendo los resultados siguientes la media de los valores obtenidos en cada uno de ellos. La **Tabla 2** muestra la calidad del agua de la acequia Rimer.

El agua natural de estudio presenta una baja concentración de *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus sp.* (ver **Tabla 2**), insuficiente para evaluar la eficacia de los experimentos. Por esa razón, se añaden a este

Parámetro	Valor
O <sub>2</sub> disuelto (mg/L)	8,68
pH	8,0
Conductividad (µS/cm)	1.794
Temperatura (°C)	14,3
Dureza total (mg/L CaCO <sub>3</sub> )	1.047,5
Calcio (mg/L Ca <sup>2+</sup> )	253,7
<i>Enterococcus sp.</i> (UFC/mL)	7,90·10 <sup>1</sup>
<i>P. aeruginosa</i> (UFC/mL)	1,93·10 <sup>4</sup>

agua suspensiones bacterianas artificiales preparadas a partir de inóculos de cepas de estas bacterias, que son cultivados en agar nutritivo (Scharlau).

Tras 48 horas a 37 °C se prepara la suspensión bacteriana en una solución estéril de NaCl al 0,9% y se añade al agua, previamente esterilizada en autoclave a 121 °C y 1 bar durante 15 minutos, para obtener una concentración bacteriana de 10<sup>4</sup> o 10<sup>6</sup> UFC/ml (en función del experimento).

### 2.2. Mantenimiento y cría en cautividad del mejillón cebra

Debido a la necesidad de disponer de ejemplares de mejillón cebra para la experimentación, se diseña un procedimiento para mantener en cautividad esta especie. En este sentido, se dispone un acuario en el que se introducen tanto los individuos como el agua natural muestreados. Se instalan bombas de aire como aporte de oxígeno y bombas de recirculación que favorecen la autodepuración del agua haciéndola pasar a través de un filtro natural de arena y grava. Además, se añade periódicamente extracto de *Chlorella*

*sp.* como suplemento alimenticio.

El procedimiento experimental se basa en el control de las condiciones fisicoquímicas del agua del acuario más influyentes en la cría y desarrollo de estos organismos, establecidas en la **Tabla 1**, realizando semanalmente análisis de las mismas y manteniéndolas en los valores más óptimos posibles. La **Tabla 3** muestra los métodos normalizados para la determinación de los principales parámetros de control.

### 2.3. Obtención del extracto de mejillón cebra

Para realizar el análisis de contaminación microbiológica en los individuos de mejillón cebra es necesario obtener el extracto homogeneizado del tejido interno de los mismos. Para ello, se extrae el tejido interno del molusco junto con el agua retenida en el interior de las valvas y se homogeneiza mecánicamente en un recipiente de porcelana. Al extracto homogeneizado mecánicamente se le añade una cierta cantidad de tampón fosfato salino (Scharlau), el cual es estéril, obteniendo así el extracto del mejillón sobre el que se realizan los análisis.



## 2.4. Procedimiento experimental

Todo el material de vidrio utilizado durante la experimentación se autoclava a 121 °C durante 15 minutos para asegurar su esterilidad. Todas las soluciones y los medios de cultivo se preparan con agua MillQ. Además, cada experimento se realiza por duplicado, presentando el valor medio de cada análisis.

### 2.4.1. Acumulación bacteriana

Para evaluar la capacidad de acumulación bacteriana se diseña un procedimiento experimental consistente en la disposición de 4 vasos de precipitados con 1 L de agua esterilizada en cada uno sobre los que se añaden las suspensiones bacterianas, de forma que se parte de dos vasos con una concentración bacteriana de  $10^4$  UFC/ml y otros dos con una concentración bacteriana de  $10^6$  UFC/ml. En dos vasos con concentraciones distintas se añaden 4 mejillones, que serán los experimentos de estudio, y los dos restantes serán los experimentos control. El experimento presenta una duración de 24 horas, realizando análisis del agua de estudio de los 4 vasos a las 0, 2, 5, 10 y 24 horas de experimentación. También se analiza el tejido interno del mejillón de 2 individuos de cada vaso al inicio y tras 24 horas de experimentación. Estos experimentos se llevan a cabo con *P. aeruginosa* y con *Enterococcus sp.* y *P. aeruginosa* de forma simultánea con una concentración bacteriana inicial en el agua de  $10^4$  y  $10^6$  UFC/mL.

**Tabla 3.** Métodos normalizados para la determinación de los parámetros de control del acuario.

Parámetro	Método normalizado	Referencia
O <sub>2</sub> disuelto	Standard Method 4500-O G	Eaton <i>et al.</i> , 2005
Temperatura	Standard Method 2550 B	
pH	Standard Method 4500-H <sup>+</sup> B	
Conductividad	Standard Method 2510 B	
Dureza total	Standard Method 2340 C	
Dureza calcio	Standard Method 3500 Ca B	

### 2.4.2. Infección bacteriana

Para evaluar la capacidad de infección bacteriana, en dos vasos de precipitados con 1 L de agua esterilizada se añaden los dos pares de mejillones cebra del experimento anterior, de forma que se tiene un experimento con 2 individuos que han sido sometidos a una concentración bacteriana de  $10^4$  UFC/ml y otro con 2 individuos que han sido sometidos a una concentración bacteriana de  $10^6$  UFC/ml. Presenta una duración de 24 horas, realizándose análisis del agua de estudio a las 2, 5, 10 y 24 horas de experimentación y análisis del tejido interno del mejillón a las 24 horas. Estos experimentos se llevan a cabo con *P. aeruginosa* y con *Enterococcus sp.* y *P. aeruginosa* de forma simultánea, con mejillones sometidos a una concentración bacteriana inicial en el agua de  $10^4$  y  $10^6$  UFC/mL.

### 2.4.3. Cultivo y recuento de *Enterococcus sp.* y de *P. aeruginosa*

El cultivo y recuento de *Enterococcus sp.* y de *P. aeruginosa* se lleva a

cabo de acuerdo con los procedimientos establecidos en las normas ISO 7899-2:2001 e ISO 16266:2006, respectivamente. El porcentaje de acumulación bacteriana se determina de dos formas: según análisis de la concentración bacteriana en el agua y en el interior del mejillón cebra. El porcentaje de acumulación por gramo de mejillón se determina mediante las ecuaciones  $(N/N_0) \cdot 100$  y  $[(N/g_{mej})/N_0] \cdot 100$ , respectivamente, donde N representa la cantidad de bacterias acumuladas según los análisis del agua y  $N_0$  la concentración bacteriana inicial.

## 3. Resultados y discusión

### 3.1. Mantenimiento y cría en cautividad del mejillón cebra

La **Tabla 4** muestra los valores máximos y mínimos obtenidos durante todo el periodo de experimentación para las variables más importantes en relación con la colonización y crecimiento potenciales del mejillón cebra. Comparando los resultados obtenidos con los rangos de prefe-

**Tabla 4.** Valores máximo y mínimos de las principales variables estudiadas.

Valor	O <sub>2</sub> (mg/L)	T <sup>a</sup> (°C)	Conductividad (μS/cm)	pH	Dureza total (mg/L CaCO <sub>3</sub> )	Calcio (mg/L Ca <sup>2+</sup> )
Máximo	8,3	24	2.270	7,55	1.010	332,6
Mínimo	7,2	20	1.353	8,32	617	177,7

**Tabla 5.** Concentración bacteriana en mejillones cebra y aguas superficiales.

Bacteria	Concentración en agua	Concentración en mejillón
<i>Enterococcus sp.</i>	$8,0 \cdot 10^1$ UFC/mL	$2,3 \cdot 10^2$ UFC/g <sub>mej</sub>
<i>P. aeruginosa</i>	$1,9 \cdot 10^4$ UFC/mL	$1,1 \cdot 10^6$ UFC/g <sub>mej</sub>

rencia (ver **Tabla 1**), se observa que se han mantenido las condiciones en torno a unos valores altos y óptimos para la colonización y crecimiento del mejillón, excepto en el caso del oxígeno disuelto, que se encuentra en un rango medio.

Manteniendo las variables en torno a los valores que se muestran y utilizando extracto de *Chlorella sp.* como suplemento alimenticio, se consigue un correcto mantenimiento de la especie en cautividad. Sin embargo, pese a haberse observado larvas en el agua del acuario, no se han observado individuos nuevos, por lo que no se ha conseguido la cría en cautividad.

### 3.2. Presencia de *Enterococcus sp.* y *P. aeruginosa* en mejillones cebra de aguas superficiales

La **Tabla 5** muestra los resultados medios de las analíticas bacterianas realizadas, en los muestreos llevados a cabo sobre el agua natural circundante y sobre los individuos de mejillón cebra. En ambos casos, y para ambas bacterias, se observa, en términos generales, una mayor concentración de microorganismos en el tejido interno del mejillón en relación con los presentes en el agua.

El tejido interno del mejillón cebra presenta mayor concentración, en términos generales, que el agua natural circundante, lo que podría ser indicativo del potencial de esta especie como bioindicador de la calidad microbiológica de las aguas, derivado de su capacidad de concentración de microorganismos. Además,

se observa que *Enterococcus sp.*, que se encuentra en baja concentración en el agua, está en baja concentración en el tejido interno también, mientras que *P. aeruginosa*, que se encuentra en mayor concentración en el agua, también está en mayor concentración en el tejido interno del mejillón. Esto dejaría constancia de una posible relación entre ambas concentraciones.

### 3.3. Determinación de la capacidad de acumulación e infección bacteriana del mejillón cebra

#### 3.3.1. Acumulación e infección de *P. aeruginosa*

La **Figura 1** muestra los resultados obtenidos para los experimentos de acumulación de *P. aeruginosa* a con-

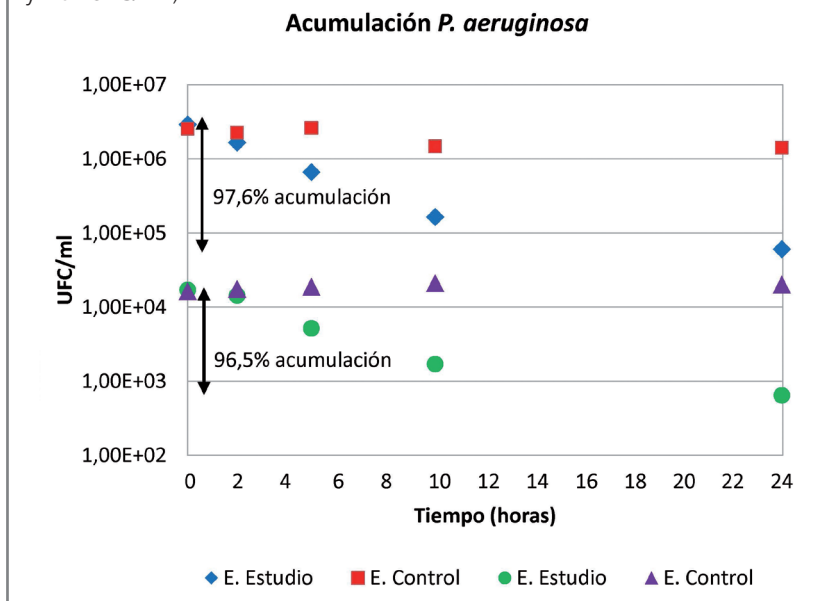
centraciones iniciales en el agua de  $10^4$  y  $10^6$  UFC/mL. En ella aparece representada la concentración en el agua frente al tiempo, tanto para el experimento de estudio como para el experimento control.

En ambos casos se observa que el experimento control mantiene la concentración bacteriana más o menos constante, mientras que en el experimento de estudio esta disminuye de forma progresiva con el tiempo, lo que implica que la disminución de la concentración en el agua de estudio solo se deba a la acumulación por parte de los mejillones.

Se observan, por un lado, unos porcentajes de acumulación muy elevados, siendo del 97,6% en el experimento a concentración inicial  $10^6$  UFC/ml y del 96,5% en el experimento a concentración inicial  $10^4$  UFC/ml. Es decir, en 24 horas los individuos de mejillón cebra son capaces de acumular la práctica totalidad de las bacterias de *P. aeruginosa* presentes en el agua.

Por otro lado, se observa que la cantidad de bacterias acumuladas

**Figura 1.** Resultados del experimento de acumulación de *P. aeruginosa* a concentraciones bacterianas iniciales en el agua de  $10^6$  UFC/mL y  $10^4$  UFC/mL).

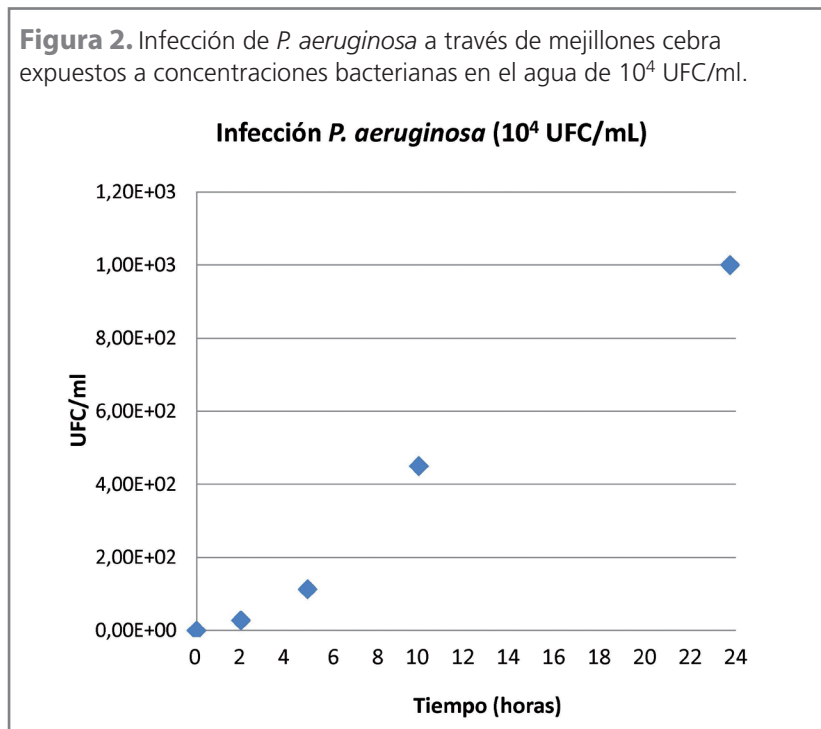




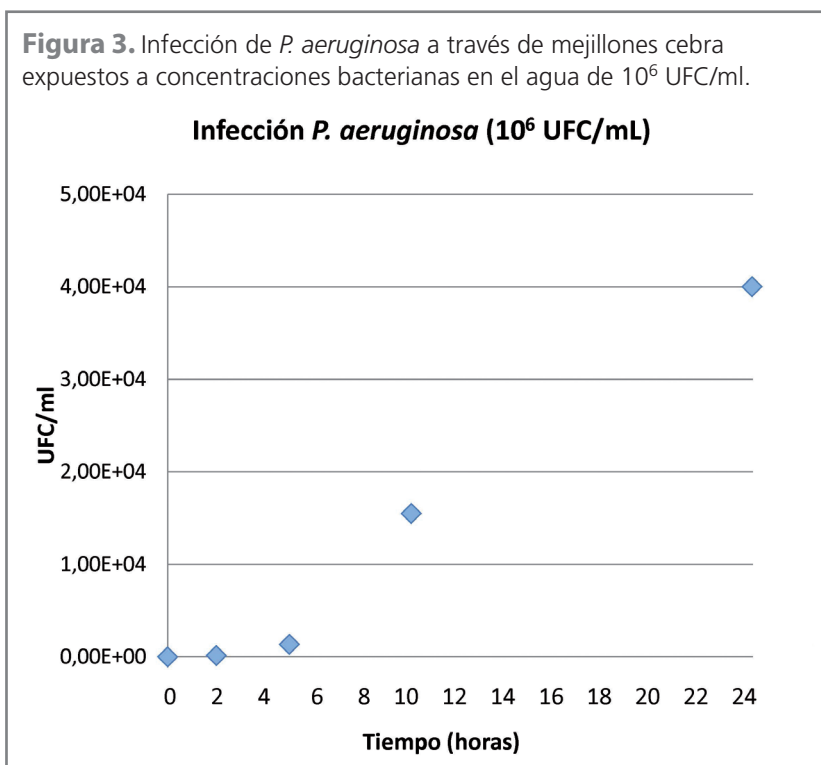
**Tabla 6.** Resultados de acumulación de *P. aeruginosa* según análisis microbiológico del agua y del tejido interno del mejillón cebra a ambas concentraciones bacterianas iniciales.

Concentración	[ <i>P. aeruginosa</i> ] <sub>0</sub> = 10 <sup>6</sup> UFC/mL		[ <i>P. aeruginosa</i> ] <sub>0</sub> = 10 <sup>4</sup> UFC/mL	
	Agua	Tejido mejillón	Agua	Tejido mejillón
UFC <sub>acumuladas</sub> /g mejillón	1,1·10 <sup>9</sup>	2,2·10 <sup>7</sup>	7,1·10 <sup>6</sup>	1,7·10 <sup>6</sup>

**Figura 2.** Infección de *P. aeruginosa* a través de mejillones cebra expuestos a concentraciones bacterianas en el agua de 10<sup>4</sup> UFC/ml.



**Figura 3.** Infección de *P. aeruginosa* a través de mejillones cebra expuestos a concentraciones bacterianas en el agua de 10<sup>6</sup> UFC/ml.



por el mejillón es diferente si se comparan los resultados de los análisis del agua y del tejido interno del mejillón, siendo la concentración menor en esta última. La **Tabla 6** muestra los resultados de ambos tipos de análisis.

Así, en el experimento a concentración bacteriana inicial de 10<sup>6</sup> UFC/ml se acumulan, según los análisis del agua, 1,07·10<sup>9</sup> UFC/gr mejillón y según los datos del tejido interno del mejillón 2,15·10<sup>7</sup> UFC/g mejillón; y en el experimento de concentración bacteriana inicial de 10<sup>4</sup> UFC/ml se acumulan, según análisis del agua, 7,05·10<sup>6</sup> UFC/g mejillón y según los datos del tejido interno del mejillón 1,68·10<sup>6</sup> UFC/g mejillón. Las razones de que el valor sea inferior en el tejido interno del mejillón son la propia metabolización de las bacterias (Frischer *et al.*, 1996) y la eliminación de parte de ellas al desechar las valvas y el biso (Selegean *et al.*, 2001).

Atendiendo a los resultados obtenidos, no existen grandes diferencias en la acumulación de *P. aeruginosa* en función de la concentración bacteriana inicial del experimento.

Las **Figuras 2 y 3** muestran los resultados obtenidos para los experimentos de infección de *P. aeruginosa* a través de mejillones previamente sometidos a una concentración de *P. aeruginosa* en el agua de 10<sup>6</sup> y 10<sup>4</sup> UFC/mL. En ellas se representa la concentración bacteriana del agua frente al tiempo.

Se observa una elevada capacidad de infección de *P. aeruginosa*, siendo del orden de 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> UFC/mL en ambos casos. Sin embargo, se observa una clara superioridad en la capacidad de acumulación bacteriana del mejillón en relación con la capacidad de infección bacteriana del mismo, dejando constancia de su potencial uso como bioindicador

de la calidad microbiológica de las aguas debido a la concentración de microorganismos en sus tejidos.

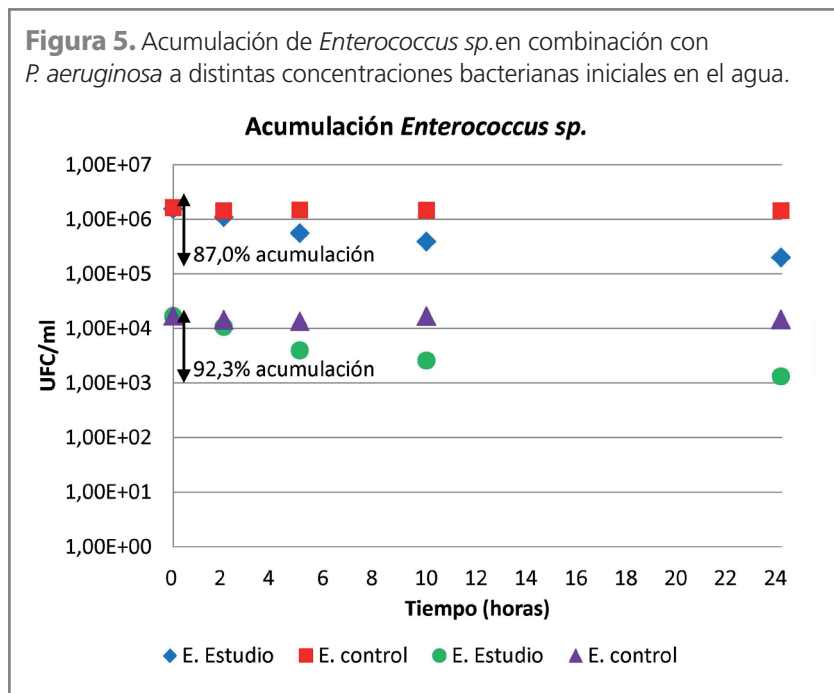
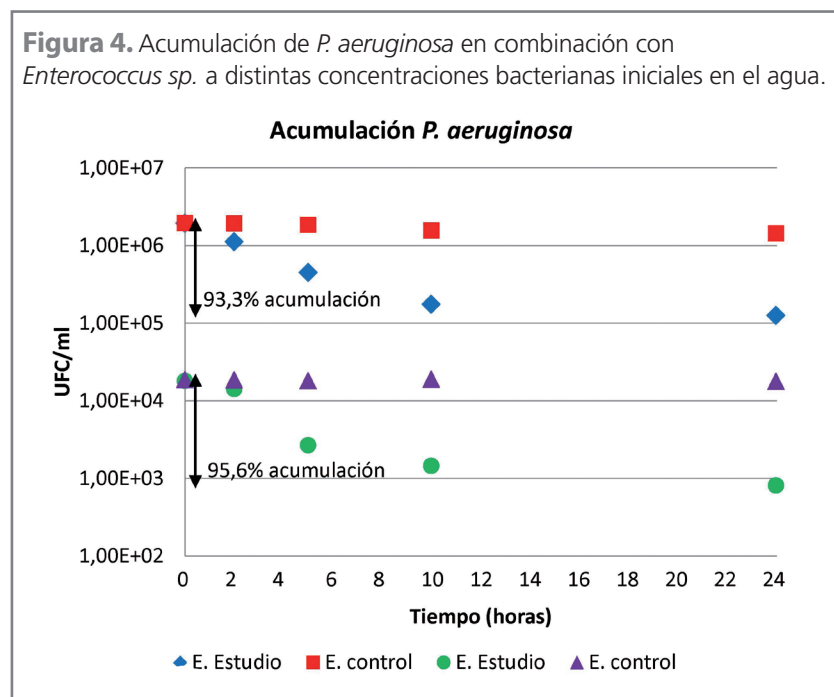
### 3.3.2. Acumulación e infección combinada de *P. aeruginosa* y *Enterococcus sp.*

En las Figuras 4 y 5 se muestran los resultados obtenidos para los experimentos de acumulación bacteriana combinada de *P. aeruginosa* y *Enterococcus sp.* a concentraciones iniciales de estas bacterias en el agua de  $10^4$  y  $10^6$  UFC/mL. En ellos se representa la concentración bacteriana del agua frente al tiempo para los experimentos de estudio y control.

Por un lado, se observa que, en combinación bacteriana, la capacidad del mejillón cebra para acumular microorganismos continúa siendo muy elevada tanto en los experimentos a concentración  $10^6$  UFC/ml como en los experimentos a concentración  $10^4$  UFC/ml, siendo, respectivamente, del 93,3% y del 95,6% para *P. aeruginosa* y del 87,0% y del 92,3% para *Enterococcus sp.* Se observa que la evolución de la concentración de ambas bacterias, al igual que sucedía con *P. aeruginosa* únicamente, disminuye progresivamente con el tiempo.

Por otro lado, en combinación bacteriana se observa que en los experimentos a concentración inicial en el agua de  $10^4$  UFC/ml el porcentaje de acumulación es ligeramente superior al porcentaje de acumulación de los experimentos a concentración inicial en el agua de  $10^6$  UFC/mL, pudiendo deberse a una reducción del rendimiento de acumulación del mejillón en estos por saturación.

De igual forma, se observa que el porcentaje de acumulación de *P. aeruginosa* en ambos experimentos es superior al porcentaje de acumulación de *Enterococcus sp.* Este he-



cho radica en el mayor tamaño de las bacterias de *P. aeruginosa* con respecto a las de *Enterococcus sp.*, que facilitan su retención durante el proceso de filtrado del agua (Frischer et al., 1996).

Además, y al igual que ocurría en el experimento de acumulación bacteriana de *P. aeruginosa*, el análisis microbiológico del tejido interno del

mejillón muestra unos valores de acumulación bacteriana inferiores a los derivados de los análisis del agua, tanto para *P. aeruginosa* como para *Enterococcus sp.* La **Tabla 7** muestra estos resultados.

Así, en el experimento de concentración inicial en el agua de  $10^6$  UFC/mL las bacterias de *P. aeruginosa* y *Enterococcus sp.* acumuladas según



**Tabla 7.** Resultados de acumulación de *P. aeruginosa* según análisis microbiológico del agua y del tejido interno del mejillón cebra a ambas concentraciones bacterianas iniciales.

Concentración	Concentración inicial $10^6$ UFC/mL				Concentración inicial $10^4$ UFC/mL			
	<i>P. aeruginosa</i>		<i>Enterococcus sp.</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>Enterococcus sp.</i>	
	Agua	Tejido mejillón	Agua	Tejido mejillón	Agua	Tejido mejillón	Agua	Tejido mejillón
UFC/g mejillón	$5,6 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^6$	$4,2 \cdot 10^8$	$5,7 \cdot 10^6$	$5,4 \cdot 10^6$	$5,9 \cdot 10^5$	$4,8 \cdot 10^6$	$6,6 \cdot 10^4$

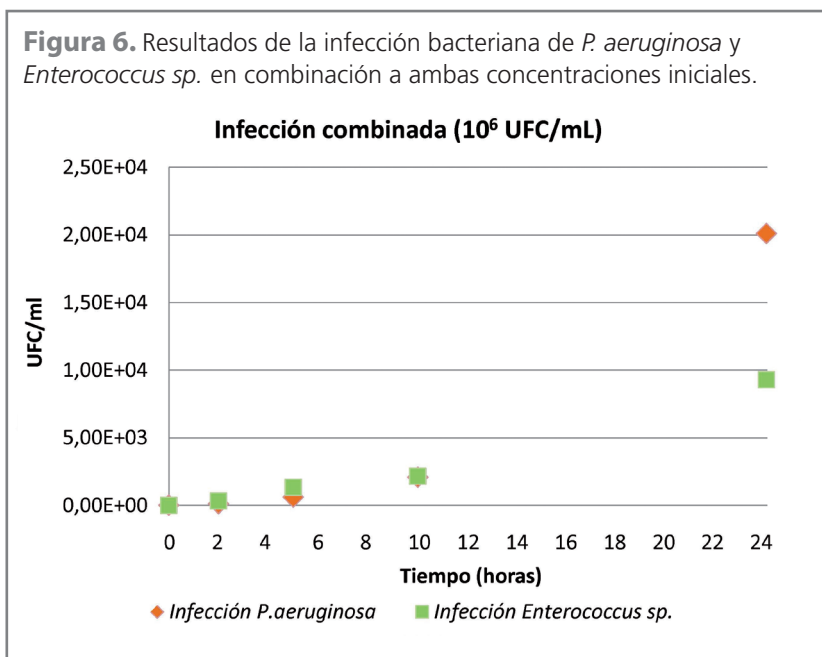
análisis del agua son  $5,6 \cdot 10^8$  UFC/g mejillón y  $4,2 \cdot 10^8$  UFC/g mejillón, respectivamente, mientras que según los resultados del análisis microbiológico del mejillón son  $3,0 \cdot 10^6$  UFC/g mejillón y  $5,7 \cdot 10^6$  UFC/g mejillón, respectivamente. Lo mismo ocurre en el experimento de concentración inicial inferior, siendo  $5,4 \cdot 10^6$  UFC/g mejillón y  $4,8 \cdot 10^6$  UFC/g mejillón las bacterias de *P. aeruginosa* y *Enterococcus sp.*, respectivamente, acumuladas según el agua, y  $5,9 \cdot 10^5$  UFC/g mejillón y  $6,6 \cdot 10^4$  UFC/g mejillón las bacterias acumuladas según el análisis del mejillón.

Se observa que, aunque se acumulan mayor cantidad de bacterias de *P. aeruginosa* con respecto a *Enterococcus sp.*, los resultados de los análisis microbiológicos del tejido interno del mejillón muestran una mayor metabolización de las primeras, debido posiblemente a su mayor tamaño (Frischer *et al.*, 1996).

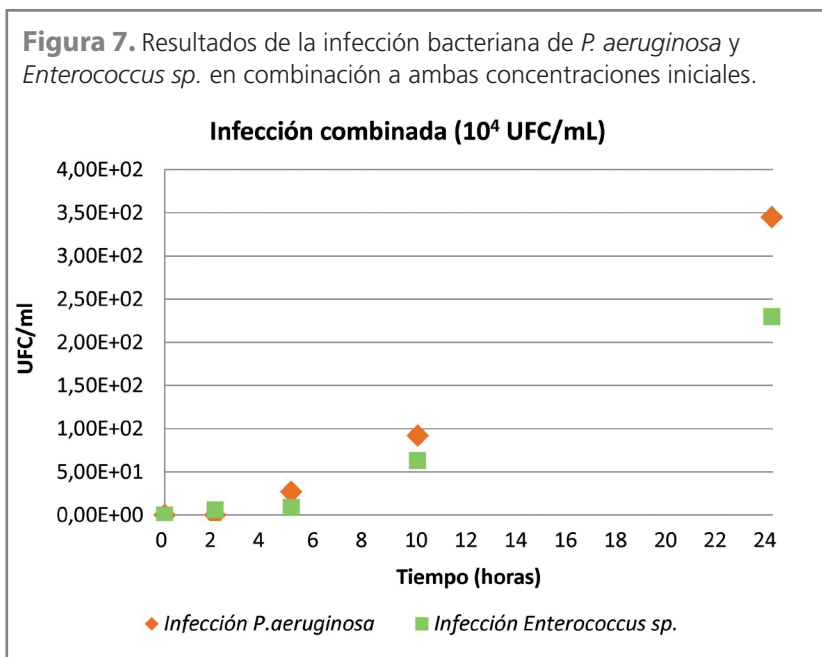
Las **Figuras 6** y **7** muestran los resultados de los experimentos de infección combinada con *P. aeruginosa* y *Enterococcus sp.* de mejillones previamente expuestos a ambas bacterias con concentraciones iniciales en el agua de  $10^4$  y  $10^6$  UFC/mL.

Se observa que la infección es elevada para ambas bacterias y en ambos experimentos, siendo del orden de  $10^4$  UFC/100 mL y  $10^2$  UFC/100 mL para *P. aeruginosa* y de  $10^3$  UFC/100 mL y  $10^2$  UFC/100 mL para *Enterococcus sp.* La capacidad de infección es ligeramente inferior en combinación bacteriana

**Figura 6.** Resultados de la infección bacteriana de *P. aeruginosa* y *Enterococcus sp.* en combinación a ambas concentraciones iniciales.



**Figura 7.** Resultados de la infección bacteriana de *P. aeruginosa* y *Enterococcus sp.* en combinación a ambas concentraciones iniciales.



que considerando las bacterias por separado, siendo en combinación mayor la capacidad de infección con

*P. aeruginosa* por su mayor tamaño, que facilita su liberación (Frischer *et al.*, 1996). También es diferente la



## El mejillón cebra tiene una gran capacidad de acumulación y concentración bacteriana, lo que implica su potencial uso como bioindicador de la calidad microbiológica de las aguas

forma de infección, teniendo lugar de forma más progresiva en *Enterococcus sp.* y siendo en el caso de *P. aeruginosa* una liberación lenta hasta las 10 horas de experimentación seguida de una liberación brusca entre las 10 y las 24 horas de experimentación.

### 4. Conclusiones

Las conclusiones obtenidas de esta investigación pueden resumirse en los siguientes puntos:

- Se ha logrado un correcto mantenimiento de individuos de mejillón cebra en condiciones de laboratorio, mediante el control de las condiciones fisicoquímicas del agua, no habiéndose logrado la cría en cautividad.

- Se ha demostrado que el mejillón cebra acumula y concentra en su interior *Enterococcus sp.* y *Pseudomonas aeruginosa* del agua natural, en concentraciones de  $9,3 \cdot 10^1$  y  $3,65 \cdot 10^2$  UFC/gr mejillón y  $8,98 \cdot 10^3$  y  $2,22 \cdot 10^6$  UFC/gr mejillón, respectivamente, pudiendo existir una relación entre esta concentración y la existente en el tejido interno de los mejillones cebra de esas aguas.

- Tras 24 horas de exposición, los mejillones cebra son capaces de acumular la práctica totalidad de las bacterias de *Pseudomonas aeruginosa* (97,6% y 96,5% de acumulación) presentes en un agua, independientemente de la concentración inicial de las mismas en el agua. Ocurre lo mismo en los experimentos en combinación bacteriana, en los que se observan porcentajes de acumulación muy eleva-

dos aunque superiores para *P. aeruginosa* (93,3% y 956%) que para *Enterococcus sp.* (87,0% y 92,3%) en los dos experimentos a distinta concentración bacteriana inicial en el agua.

- El mayor tamaño de *P. aeruginosa* favorece que liberación al medio sea de mayor cantidad con respecto a *Enterococcus sp.*, siendo la infección del orden de  $10^2$ - $10^4$  UFC/ml para *P. aeruginosa* y de  $10^1$ - $10^3$  UFC/ml para *Enterococcus sp.*, existiendo asimismo diferencias en la forma de infección, produciéndose la infección de *P. aeruginosa* mayoritariamente a partir de las 10 horas de experimentación, y de forma brusca, y siendo más paulatina en el caso de *Enterococcus sp.*, en la que las bacterias se empiezan a liberar al medio poco antes de las 5 horas de experimentación. De igual forma, la infección de *P. aeruginosa* en combinación bacteriana es inferior a la infección con las bacterias individualmente.

- La capacidad de acumulación bacteriana ha sido muy superior a la capacidad de infección bacteriana en todos los casos, dejando constancia de la gran capacidad de concentración bacteriana del mejillón cebra y, por lo tanto, de su potencial uso como bioindicador de la calidad microbiológica de las aguas.

### 5. Agradecimientos

Los autores de esta investigación agradecen al Gobierno de Aragón (grupo de investigación T33) y a la Universidad de Zaragoza (proyecto JIUZ-2013-TEC-14) por la financiación de este trabajo.

### Bibliografía

- [1] Bij de Vaate, A.; Jazdzewski, K.; Ketelaars, H.A.M.; Gollasch, S.; Van der Velde G. (2002). Geographical patterns in range extension of Prontocaspian macroinvertebrate species in Europe. Can J. Fish. Aquat. Sci., núm. 59, págs. 1.159-1.174.
- [2] Cia, I. (2008). Ecología del mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*) en el tramo inferior del río Ebro. Problemática y posibilidades de control. Tesis Doctoral. Universidad de Lleida.
- [3] Claudi, R.; Mackie, G.L. (1994). Practical manual for zebra mussels monitoring and control. Lewis, Boca Raton, Florida.
- [4] Durán, C.; Touya, V.; Anadón, A.; Lanao, M. (2009). Afección y control del mejillón cebra en la cuenca del Ebro. Tecnología del Agua, núm. 307, págs. 20-28.
- [5] Eaton, A.D.; Clesceri, L.S.; Rice, E.W.; Greenberg, A.E. (2005). Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater. APHA, AWWA, WEF, 21st Edition.
- [6] Frischer, M.E.; Parsons, R.H.; Waitkus, K.; Vathanodorn, K.; Nierzwicki-Bauer, S.A. (1996). Bacteria as a direct food source for zebra mussels (*D. polymorpha*). Final Reports of the Tibor, T. Polgar Fellowship Program. Hudson River Foundation, New York.
- [7] Maxwell, L. (1992). The biology, invasion and control of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in North America. State University College Oneonta.
- [8] McMahon, R.F. (1996). The physiological ecology of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, in North America and Europe. Amer. Zool., núm. 36, págs. 339-363.
- [9] O'Neil, C.R. (1996). The zebra mussel. Impact and control. Cornell Cooperative Extension, Information Bulletin, 238. New York Sea Grant, Cornell University, State University of New York.
- [10] Orendt, C.; Schimtt, C.; Lieferringe, C.; Wolfram, G.; Deckere, E. (2010). Include or exclude? A review on the role and suitability of aquatic invertebrate neozoa as indicators in biological assessment with special respect to fresh and brackish European waters. Biol Invasions, núm. 12, págs. 265-283.
- [11] Palos Ladeiro, M.; Aubert, D.; Villena, I.; Geffard, A.; Bigot, A. (2014). Bioaccumulation of human waterborne protozoa by zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): Interest for water biomonitoring. Wat. Res. núm. 48, págs. 148-155.
- [12] Sanz-Ronda, F.J.; López-Sáenz, S.; San-Martín, R.; Palau-Ibars, A. (2014). Physical habitat of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in the lower Ebro River (Northeastern Spain): Influence of hydraulic parameters in their distribution. Hydrobiologia, núm. 735, págs. 137-147.
- [13] Selegean, J.P.W.; Kusserow, R.; Patel R.; Heidtke, T.M.; Ram, J.L. (2001). Using zebra mussels to monitor *Escherichia coli* in environmental waters. J. Environ. Qual., núm. 30, págs. 171-179.
- [14] Van der Velde, G.; Platvoet, D. (2007). Quagga mussels *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov, 1897) in the Main River (Germany). Aquatic Invasions, núm. 2(3), págs. 261-264.
- [15] Wu, Y.; Bartell, S.M.; Orr, J.; Ragland, J.; Anderson, D. (2010). A risk-based decision model and risk assessment of invasive mussels. Ecological Complexity, núm. 7(2), págs. 243-255.