



**Prospección de mejillón
cebra en algunos embalses
de la CAPV mediante técnicas
de análisis genético**

Informe Final
Septiembre 2019

Anbiotek S.L.

Tipo de Documento: Informe Final.

Título del Documento: Prospección de mejillón cebra en algunos embalses de la CAPV mediante técnicas de análisis genético

Elaborado por: Anbiotek S.L.

Referencia del Documento: LA20191802

Autores: Henar Fraile Fraile, Álvaro Fanjul Miranda y Alberto Aguirre Gaitero.

Fecha: Septiembre 2019.

Índice

Prospección de mejillón cebra en algunos embalses de la CAPV mediante técnicas de análisis genético

Septiembre 2019.

1. Resumen	4
2. Laburpena	5
3. Introducción	6
4. Metodología	7
Estaciones de muestreo	7
Trabajo de campo. Toma de muestras	9
Campaña de Julio	9
Campaña de Septiembre	10
Traslado de las muestras a laboratorio	12
Trabajo de laboratorio. Análisis genético	12
5. Resultados fisicoquímicos	14
6. Resultados genéticos	16
7. Conclusiones y Propuestas	17
Conclusiones	17
Propuestas	17
8. Anexo I. Estaciones	18
9. Anexo II. Informes de ensayo	20

1.

Resumen

En el mes de Febrero de 2019 se detectó por primera vez la presencia de mejillón cebra en el embalse de Aixola, con la localización de un solo ejemplar adulto. Prospecciones visuales para detección de adultos y muestreos larvarios realizados en los días siguientes no arrojaron más resultados positivos. Con la intención de aumentar la eficacia en la detección de una posible población asentada en el embalse, se decidió añadir muestreos genéticos de las aguas del embalse a los otros métodos de seguimiento utilizados anteriormente. En concreto, se decidió realizar dos campañas de muestreo genético, en Julio y Septiembre, para detección de mejillón cebra tanto en el embalse de Aixola como en varios otros en los que de no existían detecciones previas de esta especie invasora pero que son altamente susceptibles a su presencia.

En Julio y Septiembre de 2019, Anbiotek S.L. ha tomado muestras en varios embalses de la CAPV con susceptibilidad de infestación moderada o alta de la especie invasora mejillón cebra. El objetivo ha sido identificar la presencia o no de la especie a través de una técnica de análisis genético (qPCR, *quantitative polymerase chain reaction*). Para el análisis genético se ha utilizado una región específica (*primer*) para el género *Dreissena*, por lo que los resultados corresponden al sumatorio de las especies *D. polymorpha* y *D. rostriformis*.

El 3 de Julio se tomaron muestras cuantitativas en los embalses de Aixola, Ibaieder, Ibiur, Maroño y Urkulu, mediante el filtrado de un volumen concreto de agua a través de una red de 50 µm. El resultado del análisis genético mediante técnica de qPCR fue negativo en todas ellas.

El 12 de Julio se realizó una toma de muestra cualitativa desde embarcación en la zona central del embalse de Aixola. Esta repetición fue solicitada por la Agencia Vasca del Agua tras la comunicación por parte del Consorcio de Aguas de Gipuzkoa de la presencia de ejemplares adultos de mejillón cebra en los testigos que tienen instalados en Aixola. El resultado del análisis genético confirma la presencia de mejillón en el embalse, con una biomasa elevada en la muestra: 18,25 mg de tejidos de *Dreissena* (*D. polymorpha* y/o *D. rostriformis*).

Entre el 9 y el 10 de Septiembre se tomaron muestras cualitativas en los embalses de Ibaieder, Ibiur, Maroño y Urkulu, mediante el filtrado de un volumen indeterminado de agua e integrando el filtrado de varias zonas. El resultado del análisis genético mediante técnica de qPCR fue negativo en todas las muestras. Los parámetros fisicoquímicos de campo correspondientes a las fechas de toma de muestras biológicas indican que tanto la temperatura del agua como el pH se encuentran en un rango favorable (óptimo) para la colonización de la especie. No obstante, se observa una notable disminución en la concentración de oxígeno en los embalses analizados en Septiembre.

2.

Laburpena

2019ko Otsailean detektatu zen lehen aldiz Aixolako urtegian zebra muskuiluaren presentzia (ale heldu bakar bat). Ondorengo egunetan burututako helduen detekzioarako azterketa bisualek eta larba-laginketek ez zuten emaitza positibo gehiagorik azaldu.

Urtegian finkaturiko populazio posible baten detekzio-eraginkortasuna areagotzeko asmoz, uda garaian, aurretik erabilitako jarraipen metodoei urtegiako uren laginketa genetikoak gehituko zitzaizkiela erabaki zen. Hain zuzen ere, zebra muskuiluaren presentzia detektatzeko laginketa genetikoko bi kanpaina burutzea erabaki zen, Uztailean eta Irailean. Kanpaina horiek Aixola urtegian burutzeaz gain, aurretik espezie inbasore honen detekzioerik izan ez duten baina honen presentzia izateko sentikortasun handia duten hainbat urtegitan ere burutu ziren.

2019ko Uztaila eta Irailean, Anbiotek S.L.-k zebra-muskuilu espezie inbaditzailearen infestazio suszeptibilitate neurritsua edo altua duten EAeko hainbat urtegi lagindu ditu. Laginketa honen helburua espeziaren presentzia edo presentzia eza identifikatzea izan da, analisi genetikoa oinarritzen den teknika baten bidez (*qPCR*, *quantitative polymerase chain reaction*). Analisi genetikoa burutzeko, *Dreissena* generoarentzat eskualde espezifiko bat (primer) erabili da. Hori dela eta, emaitzak *D. polymorpha* eta *D. rostriformis* espezieen batukaria dira.

Uztailak 3an Aixola, Ibaieder, Ibiur, Maroño eta Urkulu urtegitan lagin kuantitatiboak jaso ziren. Horretarako, ur bolumen zehatz bat 50 µm-ko sare baten bidez iragazi zen. qPCR teknikaren bidezko analisi genetikoa emaitzak ezezekoak izan ziren kasu guztietan.

Uztailak 12an ontzitiko laginketa kualitatiboa burutu zen Aixola urtegiaren erdigunean. Errepikapen hau Uraren Euskal Agentziak eskatu zuen, Gipuzkoako Ur Partzuergoaren adierazpen bat jaso ondoren. Adierazpen horren arabera, Aixola urtegian kokaturik dituzten testiguetan zebra-muskuilu helduen presentzia antzeman zen. Analisi genetikoa emaitzek muskuilu honen presentzia baieztatzen dute, laginean biomasa handia azalduz: *Dreissena*-ren (*D. polymorpha* edota *D. rostriformis*) 18,25 mg ehun.

Irailak 9 eta 10 bitartean lagin kualitatiboak jaso ziren Ibaieder, Ibiur, Maroño eta Urkulu urtegitan. Horretarako, zehaztu gabeko bolumen bat iragazi zen, hainbat eremutako iragazketak uztartuz. qPCR teknikaren bidezko analisi genetikoa emaitzak ezezekoak izan ziren kasu guztietan.

Lagin biologikoak jaso ziren egunei dagozkien eremuko parametro fisikokimikoek adierazten dutenez, bai uraren tenperatura, bai pH-a espeziaren kolonizazioarako lagungarria (optimoa) den tartean aurkitzen dira. Hala ere, Iraileko kanpaina aztertutako urtegitan oxigeno kontzentrazioa nabarmen jaitsi dela antzeman da.

3.

Introducción

El *Plan de Acción para el Control del Mejillón cebra en la Comunidad Autónoma del País Vasco (2018-2020)*¹ (Agencia Vasca del Aguas, 2018) establece una serie de acciones coordinadas para combatir la posible colonización de las masas de agua de la CAPV aún no afectadas por esta especie, al tiempo que persigue minimizar los impactos en aquellos ecosistemas donde ya se encuentra presente. Entre las acciones que se vienen llevando a cabo en el marco de este plan están las medidas de seguimiento de las poblaciones de mejillón cebra, tanto de la fase larvaria como de las poblaciones de ejemplares adultos.

Una de las técnicas que se viene utilizando, aunque en menor medida, es la identificación genética de la especie en situaciones concretas en las que los muestreos de larvas ofrecen resultados no homogéneos, o cuando se necesita confirmar por un método diferente la presencia o no de la especie en masas de agua o tramos de río concretos.

Este documento corresponde al informe de resultados de las campañas de Julio y Septiembre de 2019 realizadas por *Anbiotek S.L.* en varios embalses de la CAPV con susceptibilidad de infestación por mejillón cebra moderada o alta, con el objetivo de identificar la presencia de esta especie invasora (género *Dreissena*) a través de una técnica qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*), de análisis genético.

Hasta este momento la identificación rutinaria de la fase larvaria de dicha especie se viene realizando mediante el análisis de las muestras recogidas por un taxónomo experto y utilizando medios ópticos (microscopio y lupa).

El objetivo de este estudio ha sido identificar la presencia de la especie a través de una técnica alternativa a la tradicional, más objetiva, menos laboriosa y más rápida que la identificación taxonómica.

¹ https://www.uragentzia.euskadi.eus/contenidos/informacion/invasoras_mejillon_cebra_2014/es_def/adjuntos/Plan_MC_2018-2020.pdf

4.

Metodología

ESTACIONES DE MUESTREO

Se propuso realizar análisis genético para detección de presencia de mejillón cebra en embalses no infestados que contasen con valores del índice de susceptibilidad (ISIM) moderados o altos (de acuerdo al documento elaborado por Anhidra Consultoría Agroambiental SLP para la Agencia URA en 2011 ²).

La susceptibilidad de infestación se valora cruzando diversa información: por un lado se valoran los parámetros fisicoquímicos y biológicos que determinan la capacidad de acogida de la masa de agua (CAM); y por otro lado, se analizan los factores geográficos y socioeconómicos, que determinan el riesgo de entrada (RE). Posteriormente, la CAM y el RE se relacionan en una tabla de doble entrada y se determina la susceptibilidad de cada masa frente a la posible colonización del mejillón cebra.

El ISIM es moderado o alto en los embalses de las cuencas del Deba, Oria, Urola, Zadorra y Ebro. Los embalses del Zadorra (Urrunaga y Ullibarri-Gamboa) ya están infestados, y el embalse de Albina, que no lo está, tiene un ISIM muy bajo, por lo que no se incluyeron en esta propuesta.

De este modo, y después de consensuar otros criterios adicionales de inclusión o no de embalses en la propuesta, se decidió realizar el estudio en lasiguiente lista de embalses:

Unidad Hidrológica	Embalse	RE	CAM	ISIM_Susceptibilidad
Deba	Aixola	Alto	Moderada	Moderada
	Urkulu	Alto	Moderada	Moderada
Oria	Ibiur	Alto	Alta	Alta
Urola	Ibaieder	Alto	Moderada	Moderada
Ibaizabal	Maroño	Alto	Alta	Alta

² Asistencia técnica en relación a la Susceptibilidad de las masas de agua de la Comunidad Autónoma del País Vasco al asentamiento del mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*). 2011. Informe elaborado por Anhidra para Ur Agentzia.

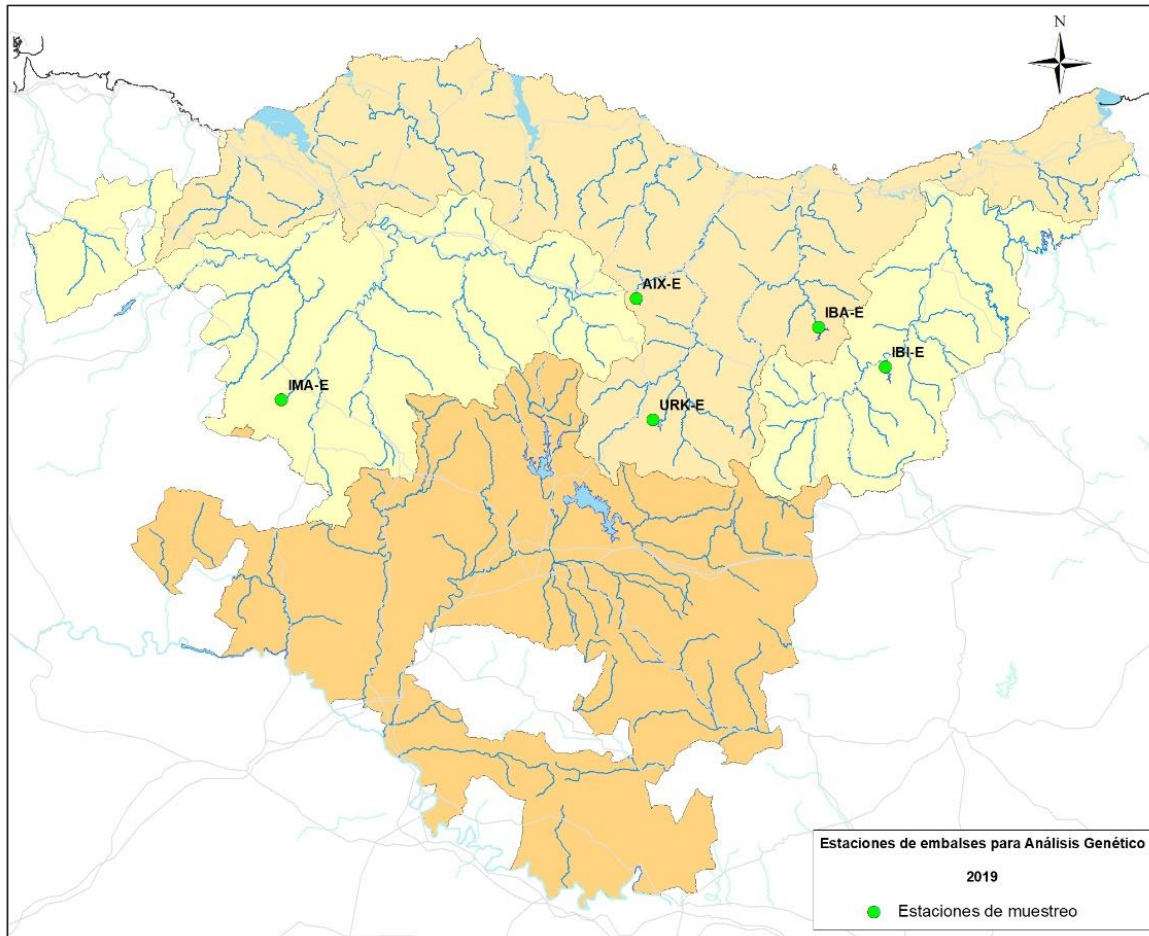


Figura 1. Localización de las estaciones de muestreo 2019 para análisis genético de mejillón cebra.

En Julio se visitaron los embalses de Aixola, Urkulu, Ibiur, Ibaieder y Maroño; el de Aixola, en dos ocasiones. En Septiembre se visitaron Ibaieder, Ibiur, Maroño y Urkulu.

Los puntos de muestreo y las técnicas de recogida de muestra de agua filtrada fueron las mismas que se utilizan habitualmente en la *Red de Seguimiento larvario de mejillón cebra en la CAPV (URA/003A/2017)*.

TRABAJO DE CAMPO. TOMA DE MUESTRAS

En cada punto de muestreo se realizaron las siguientes labores:

- Medición de variables fisicoquímicas *in situ* del agua: temperatura, pH, conductividad, oxígeno disuelto y % de saturación de oxígeno.
- Filtrado de entre 100 y 400 litros de agua por una red de zooplancton de 50 µm de tamaño de malla, que permite una determinación cuantitativa de la presencia larvaria en la muestra
- Cumplimentado de la hoja de campo y anotación de incidencias.
- Documentación fotográfica y georreferenciación del punto de toma de la muestra.

Tanto el volumen de agua como la técnica de muestreo varían en función del tipo de masa de agua y las posibilidades de acceso.

En los embalses en los que no es posible la utilización de un sistema de bombeo desde la propia presa u orilla por el tipo de construcción del muro principal (muro inclinado), se utiliza la técnica de pozales adaptada a embalses: la técnica varía ya que se filtran 200 litros de agua mediante un cubo con lastre que está sujeto a una cuerda, y mediante esta cuerda se eleva a la zona donde esté el muestreador para realizar el filtrado.

En los embalses con muro vertical, se utiliza el sistema de bombeo hidráulico mediante el uso de una bomba de succión sumergible, que permite ajustar la toma de la muestra a la posible distribución de la densidad de larvas de mejillón cebra a lo largo de la columna de agua. Según estudios realizados, se aprecian tres focos de mayor densidad a 2, 5 y 10 metros de profundidad; al mismo tiempo, en superficie y a partir de los 15 metros de profundidad la densidad de larvas es notablemente menor (Cia, 2008)³. En total se filtran 400 litros de agua. El filtrado se recoge en un único bote estéril. De este modo, la muestra queda concentrada a un volumen final de unos 50 ml, que facilita el posterior procesado en el laboratorio.

Campaña de Julio

La toma de las muestras se realizó el 3 de Julio.

Posteriormente, el día 12 de Julio se procedió a realizar un muestreo exhaustivo de barrido horizontal y vertical con red, siendo la muestra recogida de tipo cualitativo, a petición de la Agencia URA. El motivo es que se se valoró conveniente la repetición del muestreo realizado en Aixola el día 3 de Julio, ya que en Marzo de 2019 el Consorcio de Aguas de Gipuzkoa detectaba ejemplares adultos en los testigos que tienen instalados en el embalse de Aixola.

Para este segundo muestreo se solicitó el acompañamiento de personal del Consorcio de Gipuzkoa y la utilización de la embarcación confinada en el embalse.

³ Cia, Imanol. 2008. Ecología del mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*) en el tramo inferior del río Ebro. Problemática y posibilidades de control. Tesis Doctoral.

Tabla 1. Listado de estaciones de muestreo en embalses para detección genética de mejillón cebra en Julio de 2019. En el caso de muestras cuantitativas se indica el volumen filtrado en litros.

Unidad Hidrológica	Embalse	Código	COD_LAB	UTMx	UTMy	Fecha	Técnica
Deba	E. Aixola	AIX-E	ZM-31988	539961	4778882	03/07/2019	Pozal (200L)
Deba	E. Aixola	AIX-E	ZM-32772	Barrido vertical y horizontal		12/07/2019	Red (Muestra Cualitativa)
Urola	E. Ibaieder	IBA-E	ZM-32036	562790	4775286	03/07/2019	Pozal (200L)
Oria	E. Ibiur	IBI-E	ZM-32030	571159	4770277	03/07/2019	Bombeo hidráulico (400L)
Ibaizabal	E. Maroño	IMA-E	ZM-32005	495478	4766173	03/07/2019	Pozal (200L)
Deba	E. Urkulu	URK-E	ZM-31990	542076	4763701	03/07/2019	Pozal (200L)

Campaña de Septiembre

Entre el 9 y el 10 de Septiembre se tomaron muestras cualitativas en los embalses de Ibaieder, Ibiur, Maroño y Urkulu, mediante el filtrado de un volumen indeterminado e integrando el filtrado de varias zonas del embalse.

En esta campaña se desestimó la toma de muestra en el embalse de Aixola, debido a la confirmación de presencia de la especie de mejillón cebra (tanto por muestreo de adultos, larvas, como análisis genético).

En la campaña de septiembre de toma de muestras para análisis genético de *Dreissena polymorpha* se ha realizado un muestreo de tipo cualitativo, mediante barrido y arrastre de red de 50 µm de tamaño de poro. Se ha filtrado un volumen indeterminado de agua en varias zonas de fácil acceso desde el perímetro de cada embalse. Sin embargo, el volumen filtrado es mayor que en la campaña anterior de julio; y además, se ha tomado muestra integrada de varias localizaciones del perímetro de cada embalse, con el objetivo de que la muestra sea más representativa del conjunto de la masa de agua.

Tabla 2. Listado de estaciones de muestreo en embalses para detección genética de mejillón cebra en septiembre de 2019.

UH	NOMBRE	CODIGO	COD_LAB	TIPO MUESTRA	FECHA	TÉCNICA
Urola	E. Ibaieder	IBA-E	ZM-32797	Integrada Cualitativa	09/09/2019	Red (Barrido)
Oria	E. Ibiur	IBI-E	ZM-32796	Integrada Cualitativa	09/09/2019	Red (Barrido)
Ibaizabal	E. Maroño	IMA-E	ZM-32799	Integrada Cualitativa	10/09/2019	Red (Barrido)
Deba	E. Urkulu	URK-E	ZM-32798	Integrada Cualitativa	03/07/2019	Red (Barrido)

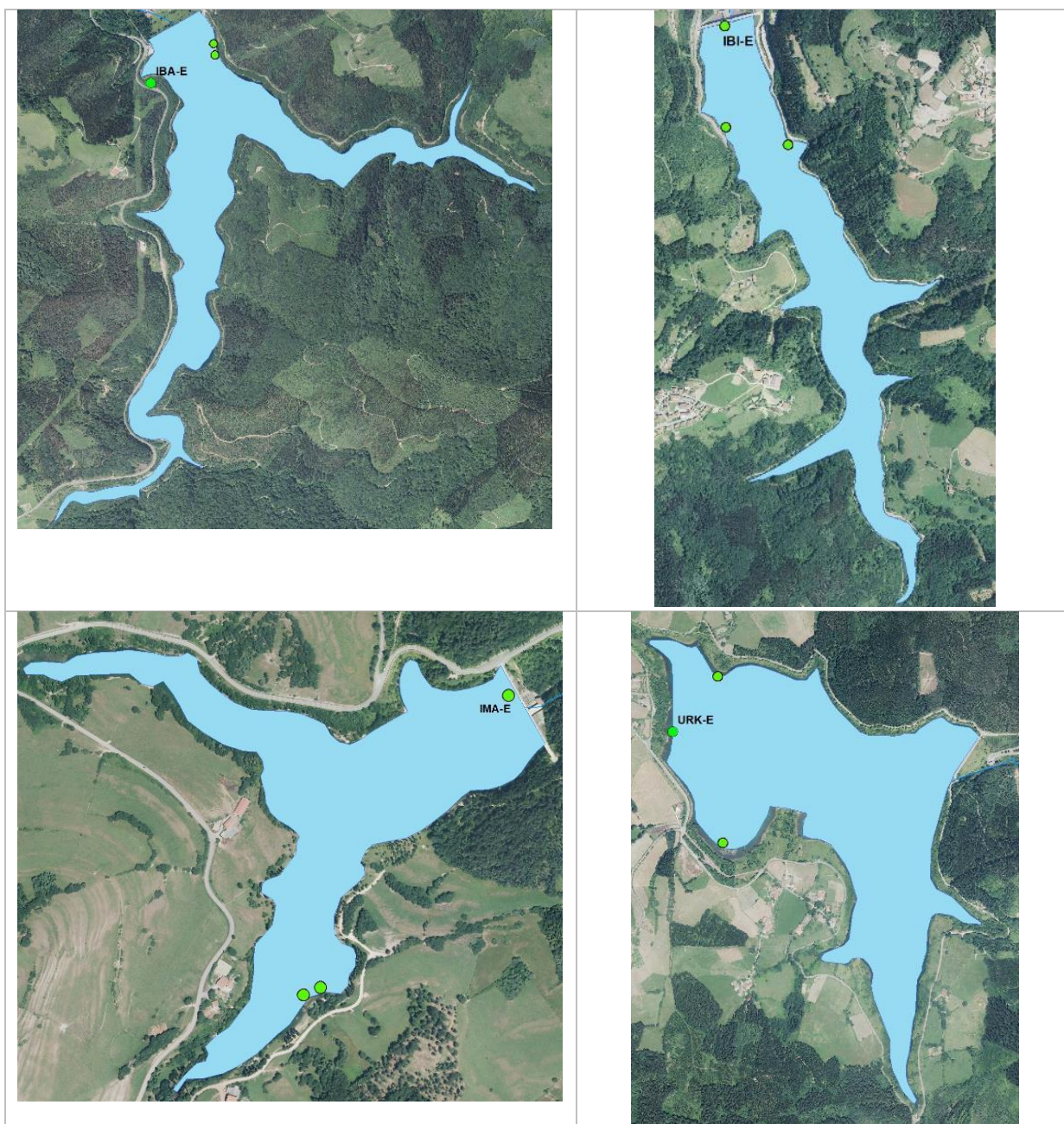


Figura 1. Localización de las zonas de toma de muestra que conforman la muestra integrada en cada uno de los embalses.

En ambas campañas, se han medido los principales parámetros fisicoquímicos en campo: T° , pH, conductividad, oxígeno disuelto y % de saturación.

Se ha completado una ficha de campo por estación de muestreo, donde también se han registrado las posibles incidencias detectadas. El trabajo de campo se ha completado con un reportaje fotográfico de cada estación.

Al finalizar el muestreo en cada estación se ha procedido a la limpieza y desinfección de todo el material en contacto con la masa de agua, siguiendo el "Protocolo de desinfección de equipos en masas de agua infectadas por mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*)" (Confederación Hidrográfica del Ebro, noviembre 2008).

Traslado de las muestras a laboratorio

Las muestras son identificadas con un código alfanumérico individualizado que proporciona información sobre un inventario de muestreo único, que incluye localización UTM y fecha. Este código identificará a la muestra a lo largo de toda la cadena de custodia.

Las muestras son almacenadas en recipientes herméticos, protegidos de la luz y el calor, y se guardan en un recipiente isotérmico (nevera) durante su transporte hasta el laboratorio de análisis.

TRABAJO DE LABORATORIO. ANÁLISIS GENÉTICO

La qPCR es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con la cual se puede cuantificar el ADN/ARN perteneciente a un gen, mediante la emisión de fluorescencia. Gracias a este tipo de técnica se pueden llevar a cabo cuantificaciones de abundancias de microorganismos de forma rápida y sencilla mediante el diseño de sondas específicas. Estas sondas se adhieren al ADN y detectan únicamente la especie de interés y, de esta manera, se puede saber cuánto está cambiando la abundancia de un organismo en el medio.

Ventajas de la técnica

Método rápido que, además, al estar basado en la información que nos proporciona un gen, es independiente del momento de desarrollo del individuo y no es necesaria la identificación óptica de sus larvas, juveniles ni adultos. Se propone como alternativa a la identificación tradicional de larvas de moluscos, ya que los métodos tradicionales están basados en observación bajo lupa de caracteres morfológicos específicos.

El método es totalmente objetivo, menos laborioso y más rápido que la identificación taxonómica. Para detectar una especie es suficiente con que exista una única larva en la muestra.

Otra de las principales ventajas (que se comparte con el método de cuantificación larvaria, pero no con la identificación de moluscos adultos) es lo poco invasivo que es este análisis, ya que se realizaría un filtrado de agua en los puntos de muestreo, con el fin de recabar información genética sin alterar el medio y en particular, sin hacer ningún tipo de alteración en el sustrato en el que se encuentran los moluscos adultos, el cual en el caso de las especies vulnerables y en peligro debe ser preservado para no causar alteraciones de hábitat para estas especies y otras que pudieran verse afectadas.

Limitaciones de la técnica

Las técnicas moleculares requieren de personal especializado y con experiencia en el campo de los análisis genéticos, ya que la clave del éxito de un análisis molecular reside en el correcto diseño previo con el fin de evitar errores de interpretación de los resultados. Se requiere un estudio bioinformático previo de obtención de datos de secuencias de DNA disponibles en las bases de datos disponibles (públicas). A partir de estos datos, se procede a diseñar el estudio experimental.

También es limitante la disponibilidad de los organismos que estén descritos en las bases de datos. La mayoría de los organismos macroscópicos tienen secuencias en las bases de datos públicas y por lo tanto son detectables y cuantificables. Pero no todos los organismos de menor tamaño están secuenciados ni identificadas sus funciones, aunque esta limitación cada día es menor ya que se añaden nuevas secuencias de forma constante a las bases de datos públicas.

Otra limitación es que el método es altamente sensible: cualquier resto de DNA podría dar positivo en una muestra. Para evitar estos falsos positivos han de realizarse 3 réplicas por muestra, validando el positivo si ocurre en 3 ó 2 de las réplicas. Este falso positivo se evita totalmente con esta metodología.

Ejecución

El análisis genético ha sido realizado por el laboratorio AnbioLab, radicado en Zamudio (Bizkaia). Para ello se ha utilizado una región específica (*primer*) para el género *Dreissena*, por lo que los resultados corresponden al sumatorio de las especies *D. polymorpha* y *D. rostriformis*.

Se ha realizado una extracción de DNA con el kit de extracción específico para suelos, ya que es más efectivo para evitar la interacción de elementos del medio ambiente (ácidos húmicos, sales, etc.) que el kit de tejidos. Se siguieron las indicaciones de ejecución del fabricante.

Posteriormente se ha cuantificado la cantidad de DNA extraído y se ha comprobado su calidad.

El siguiente paso ha consistido en el análisis de los productos de extracción mediante una qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*) para cuantificar el DNA perteneciente a las especies *Dreissena polymorpha* (mejillón cebra) y *Dreissena rostriformis* (mejillón quagga). Se ha utilizado un *primer* específico para el género *Dreissena*, por lo que los resultados corresponden al sumatorio de ambas especies.

Para cada una de las muestras se analizaron 3 réplicas.

5.

Resultados fisicoquímicos

En todas las estaciones de muestreo se han medido *in situ* los datos de Temperatura, Conductividad, pH y Oxígeno, tanto disuelto como en porcentaje de saturación.

Aunque de un modo u otro todas estas variables están relacionadas con la presencia y la proliferación del mejillón cebrá, de todas ellas, la temperatura y el pH resultan excluyentes para la proliferación de esta especie, de acuerdo a lo señalado en el cuadro adjunto.

Tabla 3. Grados de potencial colonizador para *Dreissena polymorpha* según O'Neill (1996)

	ALTO	MODERADO	BAJO
pH	7,5-8,7	7,2-7,5 8,7-9,0	6,5-7,2 >9,0
Temperatura	18-25	16-18 25-28	9-15 28-30
Oxígeno disuelto (mg/l)	8-10	6-8	4-6

Tabla 4. Resultados fisicoquímicos de campo de las Campañas de Julio y Septiembre de 2019 en embalses para análisis genético. En los embalses muestreados mediante bomba hidráulica se señalan los datos de las diferentes profundidades separados por una barra vertical: datos de la primera profundidad (2 m) / datos de la 2ª profundidad (5 m). Las celdas coloreadas indican color rojo: potencial colonizador alto; color naranja: potencial colonizador moderado; fondo blanco: potencial colonizador bajo.

Unidad Hidrológica	Estación	Fecha	Hora	Tª Agua (° C)	pH (ud.)	OXIG (% Sat.)	OXIG (mg/l)	COND (µS/cm)
Deba	AIX-E	03/07/2019	9:45	22	8,07	101,2	8,84	297
Urola	IBA-E	03/07/2019	13:45	24	8,34	102,6	8,63	275
Oria	IBI-E	03/07/2019	12:15	23,7 / 21,6	8,27 / 8,3	105,3 / 104,9	8,91 / 9,21	331 / 344
Ibaizabal	IMA-E	03/07/2019	13:00	24,15	8,12	112,7	9,05	308
Deba	URK-E	03/07/2019	11:00	22,7	8,35	101,2	8,71	275
Urola	IBA-E	09/09/2019	11:30	22,26	8,34	55,1	4,76	313
Oria	IBI-E	09/09/2019	14:00	22,2	8,46	77,4	6,60	333
Ibaizabal	IMA-E	10/09/2019	13:40	18,55	7,78	67,5	5,96	307
Deba	URK-E	09/09/2019	09:30	21,04	8,19	63,4	5,38	370

Los parámetros fisicoquímicos de campo indican que tanto la temperatura como el pH de las estaciones analizadas en Julio y Septiembre se encuentran en un rango favorable (óptimo) para la colonización de las especies *Dreissena* sp. No obstante, se observa una disminución en la concentración de oxígeno en todos los embalses en la campaña de Septiembre.

6.

Resultados genéticos

A partir de la aplicación de técnicas genéticas a las muestras recogidas, se obtuvieron los siguientes resultados (ver informes de ensayo en Anexo II):

- Las muestras recogidas el 3 de Julio en los embalses de Ibaieder, Ibiur, Maroño, Urkulu y Aixola, dieron resultados negativos.
- Sin embargo, la repetición de muestreo realizada en la zona central del embalse de Aixola el 12 de Julio dio resultado positivo.
- A su vez, las muestras recogidas entre el 9 y el 10 de Septiembre en los embalses de Ibaieder, Ibiur, Maroño y Urkulu, volvieron a dar resultados negativos.

7.

Conclusiones y Propuestas

CONCLUSIONES

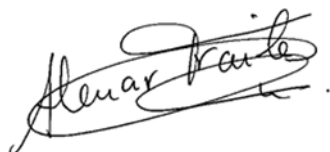
En Julio de 2019 se confirmó la presencia de *Dreissena* sp. en el embalse de Aixola, mediante técnica de análisis genético qPCR.

Por el contrario, no se ha detectado presencia del género *Dreissena* mediante técnica de análisis genético qPCR en los embalses de Ibaieder, Ibiur, Maroño y Urkulu, en ninguna de las dos campañas realizadas (Julio y Septiembre 2019).

PROPUESTAS

Seguir trabajando en la aplicación de técnicas de análisis genético como metodología de detección temprana de mejillón cebra, de cara a valorar su posible uso como método de referencia para este tipo de trabajos.

Erandio, a 27 de Septiembre de 2019



Fdo. Henar Fraile Fraile
Doctora en Biología
Gestión y coordinación del Proyecto



Fdo. Alberto Aguirre Gaitero
Colegiado 0247 - COBE
Dirección Técnica

Anexo I. Estaciones

Se presentan fotografías de los embalses visitados.



AIX-E (Embalse de Aixola)



Muestreo de barrido en Aixola



IBA-E (Embalse de Ibaieder)



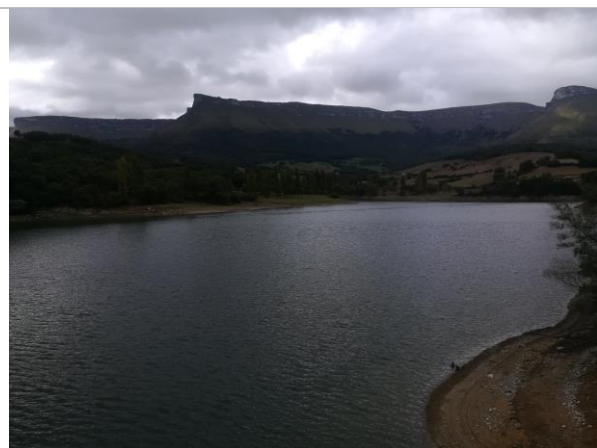
IBA-E (Embalse de Ibaieder)



IBI-E (Embalse de Ibiur)



IBI-E (Embalse de Ibiur)



IMA-E (Embalse de Maroño)



IMA-E (Embalse de Maroño)



URK-E (Embalse de Urkulu)



URK-E (Embalse de Urkulu)

Anexo II. Informes de ensayo

- IE20190010_01 (ANBIOLAB)
- IE20190010_02 (ANBIOLAB)
- IE20190010_03 (ANBIOLAB)

·Análisis mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*) y mejillón quagga (*Dreissena rostriformis*) mediante qPCR

Contratista: Anbiotek SL

Fecha: 08/07/2019



Astondo bidea, Ed. nº 612 – BIC BIZKAIA
Parque Científico y Tecnológico de Bizkaia
48160 Derio. Bizkaia, España

1. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Se realizó una extracción de DNA, cuantificación y comprobación de calidad. Posteriormente, el análisis que se llevó a cabo es una qPCR (quantitative polymerase chain reaction), en el que se cuantificó DNA perteneciente a la especie *Dreissena polymorpha* (mejillón cebra) y *Dreissena rostriformis* (mejillón quagga), la cuantificación de ambas especies se realizó conjuntamente, con un par de *primers* específicos para el género *Dreissena*, por lo tanto, los resultados corresponderán al sumatorio de ambas especies.

2. DATOS DE LAS MUESTRAS

Cod. Muestra	Cod. Muestra ANBIOLAB	Fecha análisis	Técnico analista	Análisis
ZM-31988	ZM-31988_rep1	08/07/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR
ZM-31988	ZM-31988_rep2	08/07/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR
ZM-31988	ZM-31988_rep3	08/07/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR
ZM-32036	ZM-32036_rep1	08/07/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR
ZM-32036	ZM- 32036_rep2	08/07/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR
ZM-32036	ZM- 32036_rep3	08/07/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR
ZM-32030	ZM- 32030_rep1	08/07/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR
ZM-32030	ZM- 32030_rep2	08/07/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR
ZM-32030	ZM- 32030_rep3	08/07/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR
ZM-32005	ZM- 32005_rep1	08/07/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR
ZM-32005	ZM- 32005_rep2	08/07/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR
ZM-32005	ZM- 32005_rep3	08/07/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR
ZM-31990	ZM- 31990_rep1	08/07/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR
ZM-31990	ZM- 31990_rep2	08/07/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR
ZM-31990	ZM- 31990_rep3	08/07/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR

Para cada una de las muestras se analizan 3 réplicas (rep1, rep2, rep3).

3. RESULTADOS

Muestra_replica	Ct (Ciclo)	DNA (ng/ul)	Biomasa estimada (mg)
ZM-31988_rep1	0	0	0
ZM-31988_rep2	0	0	0
ZM-31988_rep3	0	0	0
ZM-32036_rep1	0	0	0
ZM- 32036_rep2	0	0	0
ZM- 32036_rep3	0	0	0
ZM- 32030_rep1	0	0	0
ZM- 32030_rep2	0	0	0
ZM- 32030_rep3	0	0	0
ZM- 32005_rep1	0	0	0
ZM- 32005_rep2	0	0	0
ZM- 32005_rep3	0	0	0
ZM- 31990_rep1	0	0	0
ZM- 31990_rep2	0	0	0
ZM- 31990_rep3	0	0	0
<i>Resultados medios por muestra</i>			
ZM-31988	0	0	0
ZM-32036	0	0	0
ZM-32030	0	0	0
ZM-32005	0	0	0
ZM-31990	0	0	0

* Al ser una muestra que se aleja más que la desviación estándar de la media del conjunto se elimina del resultado final.

No hubo amplificación de DNA de *Dreissena* en ninguna de las 3 réplicas de las 5 muestras, los resultados son negativos. Por lo tanto, las muestras analizadas no contenían tejidos de *Dreissena* (*D. polymorpha* y/o *D. rostriformis*).

VºBº

Derio, a 15 de julio de 2019



Fdo. JOANA HEVIA
Directora I+D+i

Conforme a lo previsto REGLAMENTO (UE) 2016/679 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO, de 27 de abril de 2016 y a la legislación vigente, sus datos de carácter personal forman parte de un fichero inscrito en el Registro de la Agencia de Protección de Datos y cuyo responsable es ANBIOTEK BIOTECHNOLOGIES SL, cuya finalidad es Gestión Administrativa, Comunicación General y Comunicación Comercial. Con la aceptación de este contenido está usted aceptando expresamente el tratamiento de sus datos personales para las finalidades precedentemente expresadas. Así mismo se le informa de la posibilidad de ejercer en cualquier momento los derechos de acceso, rectificación, oposición, cancelación, derecho al olvido, portabilidad de los datos, de acuerdo con lo establecido en el Reglamento Europeo de Protección de Datos y demás normativa aplicable al efecto, dirigiéndose a ANBIOTEK BIOTECHNOLOGIES S.L., Ribera de Axpe 11-B201, 48950 Erandio, Bizkaia, indicando en la comunicación 'RGPD'

·Análisis mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*) y mejillón quagga (*Dreissena rostriformis*) mediante qPCR

Contratista: Anbiotek SL

Fecha: 15/07/2019



ANBIOLAB

Astondo bidea, Ed. nº 612 – BIC BIZKAIA
Parque Científico y Tecnológico de Bizkaia
48160 Derio. Bizkaia, España

1. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Se realizó una extracción de DNA, cuantificación de la cantidad y comprobación de la calidad. El análisis que se llevó a cabo es una qPCR (quantitative polymerase chain reaction), en el que se cuantificó DNA perteneciente a la especie *Dreissena polymorpha* (mejillón cebra) y *Dreissena rostriformis* (mejillón quagga), la cuantificación de ambas especies se realizó conjuntamente, con un par de *primers* específicos para el género *Dreissena*, por lo tanto, los resultados corresponderán al sumatorio de ambas especies.

2. DATOS DE LAS MUESTRAS

Cod. Muestra	Cod. Muestra ANBIOLAB	Fecha análisis	Técnico analista	Análisis
ZM-32772	ZM-32772_rep1	15/07/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR <i>Dreissena</i>
ZM-32772	ZM-32772_rep2	15/07/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR <i>Dreissena</i>
ZM-32772	ZM-32772_rep3	15/07/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR <i>Dreissena</i>

Para cada una de las muestras se analizan 3 réplicas (rep1, rep2, rep3).

3. RESULTADOS


Muestra_replica	Ct (Ciclo)	DNA (ng/ul)	Biomasa estimada (mg)
ZM-32772_rep1	16,41	67,098	12,8
ZM-32772_rep2	16,06	92,592	17,7
ZM-32772_rep3	16	97,916	18,7
<i>Resultados (medias)</i>			
ZM-32772	16,03	95,254	18,25

* Al ser una muestra que se aleja más que la desviación estándar de la media del conjunto se elimina del resultado final.

Las tres réplicas presentan resultados muy homogéneos, confirmándose la presencia de las especies diana en 3 de las 3 réplicas analizadas, se descartan falsos positivos. Por lo tanto, la muestra analizada contenía aproximadamente 18,25 mg de tejidos de *Dreissena* (*D. polymorpha* y/o *D. rostriformis*).

VºBº

Derio, a 15 de julio de 2019



Fdo. JOANA HEVIA
Directora I+D+i

Conforme a lo previsto REGLAMENTO (UE) 2016/679 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO, de 27 de abril de 2016 y a la legislación vigente, sus datos de carácter personal forman parte de un fichero inscrito en el Registro de la Agencia de Protección de Datos y cuyo responsable es ANBIOTEK BIOTECHNOLOGIES SL, cuya finalidad es Gestión Administrativa, Comunicación General y Comunicación Comercial. Con la aceptación de este contenido está usted aceptando expresamente el tratamiento de sus datos personales para las finalidades precedentemente expresadas. Así mismo se le informa de la posibilidad de ejercer en cualquier momento los derechos de acceso, rectificación, oposición, cancelación, derecho al olvido, portabilidad de los datos, de acuerdo con lo establecido en el Reglamento Europeo de Protección de Datos y demás normativa aplicable al efecto, dirigiéndose a ANBIOTEK BIOTECHNOLOGIES S.L., Ribera de Axpe 11-B201, 48950 Erandio, Bizkaia, indicando en la comunicación 'RGPD'

·Análisis mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*) y mejillón quagga (*Dreissena rostriformis*) mediante qPCR

Contratista: Anbiotek SL

Fecha: 11/09/2019



1. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Se realizó una extracción de DNA, cuantificación de la cantidad y comprobación de la calidad. El análisis que se llevó a cabo es una qPCR (quantitative polymerase chain reaction), en el que se cuantificó DNA perteneciente a la especie *Dreissena polymorpha* (mejillón cebra) y *Dreissena rostriformis* (mejillón quagga), la cuantificación de ambas especies se realizó conjuntamente, con un par de *primers* específicos para el género *Dreissena*, por lo tanto, los resultados corresponderán al sumatorio de ambas especies.

2. DATOS DE LAS MUESTRAS

Cod. Muestra	Cod. Muestra ANBIOLAB	Fecha análisis	Técnico analista	Análisis
ZML-32798	ZML-32798_rep1	11/09/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR <i>Dreissena</i>
ZML-32798	ZML-32798_rep2	11/09/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR <i>Dreissena</i>
ZML-32798	ZML-32798_rep3	11/09/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR <i>Dreissena</i>
ZML-32796	ZML-32796_rep1	11/09/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR <i>Dreissena</i>
ZML-32796	ZML-32796_rep2	11/09/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR <i>Dreissena</i>
ZML-32796	ZML-32796_rep3	11/09/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR <i>Dreissena</i>
ZML-32797	ZML-32797_rep1	11/09/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR <i>Dreissena</i>
ZML-32797	ZML-32797_rep2	11/09/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR <i>Dreissena</i>
ZML-32797	ZML-32797_rep3	11/09/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR <i>Dreissena</i>
ZML-32799	ZML-32799_rep1	11/09/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR <i>Dreissena</i>
ZML-32799	ZML-32799_rep2	11/09/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR <i>Dreissena</i>
ZML-32799	ZML-32799_rep3	11/09/2019	Dr. Mikel Aguirre	Extracción DNA/ qPCR <i>Dreissena</i>

Para cada una de las muestras se analizan 3 réplicas (rep1, rep2, rep3).


3. RESULTADOS

Muestra_replica	Ct (Ciclo)	DNA (ng/ul)	Biomasa estimada (mg)
ZML-32798_rep1	0	0	0
ZML-32798_rep2	0	0	0
ZML-32798_rep3	0	0	0
ZML-32796_rep1	0	0	0
ZML-32796_rep2	0	0	0
ZML-32796_rep3	0	0	0
ZML-32797_rep1	0	0	0
ZML-32797_rep2	0	0	0
ZML-32797_rep3	0	0	0
ZML-32799_rep1	0	0	0
ZML-32799_rep2	0	0	0
ZML-32799_rep3	0	0	0

* Al ser una muestra que se aleja más que la desviación estándar de la media del conjunto se elimina del resultado final.

Todas las muestras han dado resultados negativos, se descarta la presencia de tejidos de *Dreissena* (*D. polymorpha* y *D. rostriformis*) en las muestras.

VºBº
Derio, a 11 de septiembre de 2019



Fdo. JOANA HEVIA
Directora I+D+i

Conforme a lo previsto REGLAMENTO (UE) 2016/679 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO, de 27 de abril de 2016 y a la legislación vigente, sus datos de carácter personal forman parte de un fichero inscrito en el Registro de la Agencia de Protección de Datos y cuyo responsable es ANBIOTEK BIOTECHNOLOGIES SL, cuya finalidad es Gestión Administrativa, Comunicación General y Comunicación Comercial. Con la aceptación de este contenido está usted aceptando expresamente el tratamiento de sus datos personales para las finalidades precedentemente expresadas. Así mismo se le informa de la posibilidad de ejercer en cualquier momento los derechos de acceso, rectificación, oposición, cancelación, derecho al olvido, portabilidad de los datos, de acuerdo con lo establecido en el Reglamento Europeo de Protección de Datos y demás normativa aplicable al efecto, dirigiéndose a ANBIOTEK BIOTECHNOLOGIES S.L., Ribera de Axpe 11-B201, 48950 Erandio, Bizkaia, indicando en la comunicación 'RGPD'