



**Universidad**  
Zaragoza

## **TRABAJO FIN DE GRADO**

**Grado en Ciencias Ambientales**

### **Peces hospedadores de la margaritona *Pseudunio auricularius* (Spengler, 1793) en la cuenca del río Ebro**

Host fish of the Giant Freshwater Pearl Mussel *Pseudunio auricularius*  
(Spengler, 1793) in the Ebro River basin

**Autor:**

Ignacio González Navarro

**Directores:**

Keiko Nakamura Antonacci

Rocío López Flores

**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR 2023**

*El Trabajo de Fin de Grado que presento para su exposición y defensa es original y todas las fuentes empleadas para su realización han sido debidamente citadas en el mismo.*

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'AGENCIÓ', written over a horizontal line.

## Agradecimientos

A todo el personal del centro de cría de *P. auricularius* en La Alfranca: Keiko Nakamura, Carlos Salinas, Eva Elbaile, Joaquim Boix y de la Escuela Politécnica Superior de Huesca: especialmente a Rocío López, que me han ayudado en la elaboración de este trabajo.

A Ester Ginés del Gobierno de Aragón.

Al Dr. Imanol Ruiz-Zarzuela del Laboratorio de Ictiopatología de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza.

A Natalia Gonzalo Romero por su apoyo incondicional durante este trabajo.

# Índice

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Servicios ecosistémicos .....	2
1.2 Amenazas .....	3
1.3 La margaritona .....	4
1.4 Peces de la cuenca del Ebro .....	6
1.5 Objetivos .....	8
<b>2. Material y métodos .....</b>	<b>8</b>
2.1 Área de estudio .....	8
2.2 Metodología .....	11
2.2.1 Instalaciones para los experimentos.....	14
2.2.2 Trabajo de campo.....	15
2.2.3 Trabajo de laboratorio .....	17
<b>3. Resultados .....</b>	<b>21</b>
3.1 Condiciones de referencia de los ecosistemas de origen y condiciones en cautividad....	21
3.2 Mantenimiento de peces en cautividad y mortalidad .....	22
3.3 Especies hospedadoras potenciales y soluciones de infestación .....	24
3.4 Evolución de los gloquidios por especie.....	25
3.5 Comparación del grado de infestación entre especies de peces.....	29
3.5.1 Metodología de estimación de gloquidios en solución.....	29
3.5.2 Metodología de contaje de gloquidios en branquias.....	30
3.6 Tasa de transformación de gloquidios a juveniles en gambusia.....	33
<b>4. Discusión .....</b>	<b>34</b>
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>39</b>
<b>6. Recomendaciones .....</b>	<b>40</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>40</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Anatomía interna de una náyade (Fuente: Zapater <i>et al.</i> 2006). .....	2
<b>Figura 2.</b> Puntos de pesca en los tres ríos visitados para la captura de peces hospedadores potenciales de la margaritona. Elaborado con QGIS. ....	9
<b>Figura 3.</b> Ejemplar de <i>Luciobarbus graellsii</i> capturado durante el muestreo.....	12
<b>Figura 4.</b> Ejemplar de <i>Gobio lozanoi</i> capturado durante el muestreo.....	12
<b>Figura 5.</b> Ejemplar de <i>Gambusia holbrooki</i> capturada durante el muestreo. ....	13
<b>Figura 6.</b> Ejemplar de <i>Alburnus alburnus</i> capturado durante el muestreo. ....	14
<b>Figura 7.</b> Tanques de 1.000 l en exterior. ....	14
<b>Figura 8.</b> Tanques de 300 l y de 120 l respectivamente en interior.....	15
<b>Figura 9.</b> Metodología de pesca eléctrica. ....	16
<b>Figura 10.</b> Tanques de recolección de gloquidios.....	17
<b>Figura 11.</b> Gloquidios observados en lupa.....	18
<b>Figura 12.</b> Arcos branquiales extraídos de un ejemplar de la especie <i>L. graellsii</i> para revisar bajo la lupa binocular.....	20
<b>Figura 13.</b> Ejemplar de gobio afectado por bacterias y un hongo del género <i>Saprolegnia</i> .....	23
<b>Figura 14.</b> Hifas de hongo ( <i>Saprolegnia</i> spp.) en tejido.....	24
<b>Figura 15.</b> Relación entre el número de gloquidios promedio por individuo y día adheridos en las branquias de gambusias, grados-día acumulados y juveniles promedio por individuo y día. ....	27
<b>Figura 16.</b> Juveniles de <i>P. auricularius</i> vivos recogidos en el acuario de gambusia. ....	27
<b>Figura 17.</b> Relación entre el número de gloquidios promedio por individuo y día adheridos en las branquias de los barbos y grados-día acumulados.....	28
<b>Figura 18.</b> Relación entre el número de gloquidios promedio por individuo y día adheridos en las branquias de los gobios y grados-día acumulados. ....	29
<b>Figura 19.</b> Comparación de infestación entre especies en la primera semana (Gloq/individuo: gloquidios estimados por individuo de cada especie; Gloq ponderado= gloquidios por individuo de cada especie/longitud media de la especie). ....	30
<b>Figura 20.</b> Grado de infestación de las especies estudiadas a partir del conteo de gloquidios en branquias.....	31
<b>Figura 21.</b> Branquia de barbo infestado. ....	31
<b>Figura 22.</b> Branquia de gambusia infestada.....	32
<b>Figura 23.</b> Branquia de gobio infestada. ....	32
<b>Figura 24.</b> Branquia de alburno sin gloquidios adheridos. ....	33

**Figura 25.** Branquias de barbo con gloquidios adheridos visibles a simple vista. .... 33

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Zonas de pesca con su ubicación en coordenadas UTM, especies capturadas, fecha de pesca y si fueron llevadas a laboratorio.....	10
<b>Tabla 2.</b> Parámetros fisicoquímicos de los lugares de origen en los que se capturaron los peces utilizados en la experimentación. ....	22
<b>Tabla 3.</b> Parámetros fisicoquímicos procedentes de la monitorización de los tanques en cautividad.....	22
<b>Tabla 4.</b> Especies utilizadas y características (Nº ind: número de individuos, Long ( $\bar{x}$ )(mm): longitud media en milímetros, TI: tiempo de infestación, VSG: volumen solución de gloquidios, Gini: nº gloquidios antes de infestar en la disolución, Gfin: nº gloquidios después de infestar en la disolución, G/Ind: gloquidios por individuo. ....	24
<b>Tabla 5.</b> Número de gloquidios promedio por individuo y día contados diariamente durante la revisión de las branquias por especie. ....	25
<b>Tabla 6.</b> Juveniles vivos y muertos de gambusia sifonados por día.....	26

## Resumen

*Pseudunio auricularius* (Spengler, 1793) es una especie de almeja de agua dulce o náyade, catalogada como “en peligro crítico”, que experimenta un declive poblacional grave en España. Actualmente, aunque la población se ha reducido de forma notable, se encuentra presente en el río Ebro, Canal de Tauste y Canal Imperial de Aragón. En este último habitaba la colonia más numerosa y, desde el año 2013, se ha producido un fenómeno de mortalidad elevada perdiéndose alrededor de un 80% de los ejemplares.

Una de las causas por las cuales *P. auricularius* se encuentra en situación crítica en España, es la ausencia de peces hospedadores en el hábitat para cerrar su ciclo reproductivo. En el presente trabajo se han infestado, en condiciones controladas, diversas especies de peces presentes en la cuenca del Ebro: gambusia, barbo común, alburno y gobio. Los objetivos fueron determinar su capacidad hospedadora, comparar el grado de infestación de las diversas especies utilizadas, determinar la evolución de los gloquidios en función de los grados-día acumulados y comprobar el nacimiento de juveniles. Se utilizó, además, esturión siberiano como control positivo de la infestación.

La gambusia fue la única especie capaz de completar la metamorfosis del gloquidio de *P. auricularius* y dar lugar a juveniles. De las dos metodologías utilizadas para determinar el grado de infestación, el conteo directo de gloquidios adheridos en branquias fue el método más exacto para determinar el grado de infestación de los hospedadores. Mediante esta metodología, la especie en la que se registró un mayor número de gloquidios adheridos en branquias, en relación a su tamaño medio, fue el barbo común, aunque finalmente, sin éxito en la transformación de los gloquidios en juveniles.

**Palabras clave:** infestación, gloquidios, peces hospedadores, *Pseudunio auricularius*, juveniles



## Abstract

*Pseudunio auricularius* is a freshwater mussel species or a naiad, listed as “critically endangered”, which is experiencing a serious population decline in Spain. Currently, although the population has been significantly reduced, the species is present in the Ebro River, “Canal de Tauste” and in the “Canal Imperial de Aragón”, where the largest colony was located until 2013. In this last canal, a high mortality episode has been recorded since 2013, losing up to 80% of the specimens.

The absence of host fish in the habitat is one of the reasons of its critical situation. In this work, several fish species currently present in the Ebro River basin had been infested under controlled conditions: the mosquitofish, the common barbel, the bleak and the goby. The aim was to determine their host capacity, compare the infestation degree of the different fish species, determine the evolution of the glochidia based on the accumulated degree days and test the birth of juveniles. Siberian sturgeon was used as a positive control for infestation.

*Gambusia* was the only species completing the metamorphosis of the glochidium of *P. auricularius* and from which juveniles were obtained. Two methodologies were used to determine the degree of infestation. The most accurate of them was the direct count of glochidia attached to gills. The species with the greatest number of glochidia attached in relation to their average size was the common barbel although it was not successful transforming glochidia into juveniles.

**Keywords:** infestation, glochidia, host fish, *Pseudunio auricularius*, juveniles

## 1. Introducción

Las náyades son grandes bivalvos de agua dulce pertenecientes al phylum Mollusca, clase Bivalvia, orden Unionoida caracterizados por su peculiar ciclo biológico, donde interviene un hospedador, en su mayoría peces, para el desarrollo de sus larvas (Lopes-Lima *et al.*, 2017). Se trata de especies cuyo origen según el registro fósil se encuentra en el periodo Devónico y actualmente se pueden localizar en todos los continentes del planeta a excepción de la Antártida (Zapater Galve *et al.*, 2006). Son organismos que viven enterrados o semienterrados en el sustrato y forman colonias de gran tamaño. Poseen una larga esperanza de vida con algunas especies que pueden superar los 100 años (San Miguel *et al.*, 2004). Son de gran importancia para el medio acuático debido a que oxigenan el fondo de los cauces y tienen una gran capacidad de filtración contribuyendo al mantenimiento de una buena calidad del agua (Zapater Galve *et al.*, 2006).

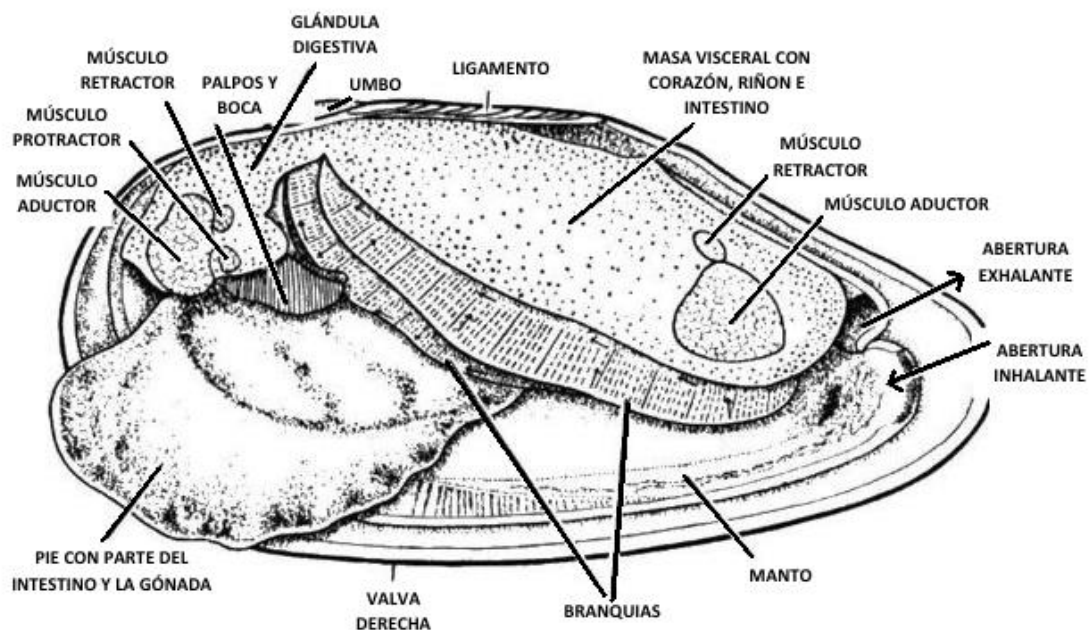
Son organismos generalmente dioicos, aunque también existen especies hermafroditas y presentan fecundación interna (Zapater Galve *et al.*, 2006). Como se ha comentado, para que su ciclo biológico se lleve a cabo con éxito requieren de la presencia de organismos hospedadores. Esta fase específica se conoce como fase parásita larvaria y en ella, las larvas también llamadas gloquidios, se adhieren a las branquias o aletas de peces formando quistes (Modesto *et al.*, 2018). Posteriormente, estas larvas sufren metamorfosis y alcanzan la fase juvenil desprendiéndose de las branquias del organismo hospedador y continuando su ciclo vital en el lecho del río (Reis *et al.*, 2014). En algunas especies de náyades como *Margaritifera margaritifera* (Linnaeus, 1758) se tiene constancia de que peces que ya han estado en contacto con sus gloquidios, al volverse a poner en contacto con estos, sufren una menor intensidad de infestación ya que se genera una respuesta inmune por parte del pez (Treasurer *et al.*, 2006).

Las náyades por regla general son bivalvos que poseen una morfología uniforme y simple (Figura 1). El cuerpo del organismo se encuentra recubierto por dos valvas unidas entre sí por un ligamento proteico próximo al umbo. El ligamento proteico se encarga de abrir las valvas. El umbo es el punto en el que se inicia el crecimiento de las valvas. Debajo del umbo encontramos la charnela que en la cara interna posee una serie de dientes que encajan a la perfección con los de la valva opuesta.

Del cierre de las conchas se encargan los músculos aductores y su inserción en el interior de las valvas deja marcas redondeadas. La línea paleal es una marca originada en la cara interna de las valvas por el cuerpo del molusco. Bajo la cobertura y protección de las valvas se encuentran

los lóbulos del manto que envuelven el cuerpo del organismo. El extremo donde se unen los lóbulos del manto posee tres aberturas. Una de ellas es ocupada por el pie y otras dos de ellas son ocupadas por los sifones (el superior es exhalante y el inferior inhalante).

El pie es el órgano que permite a las náyades moverse y enterrarse por lo que además de ser un órgano musculoso posee un gran tamaño. Junto con el pie, otro de los órganos de mayor tamaño que poseen las náyades son las branquias. Las branquias se encuentran entre el pie y el manto, concretamente dos a ambos lados del pie. En cada una de las branquias poseen dos lamelas mejorando así su capacidad de filtración y favoreciendo el intercambio de oxígeno (Zapater Galve *et al.*, 2006).



**Figura 1.** Anatomía interna de una náyade (Fuente: Zapater *et al.* 2006).

### 1.1 Servicios ecosistémicos

Las náyades pueden constituir más de un 90% de la biomasa béntica y es uno de los grupos de invertebrados más numerosos en los ecosistemas dulceacuícolas a nivel global (Sousa *et al.*, 2008). El estudio, investigación y conservación de las náyades está respaldado por la gran variedad de servicios ecosistémicos que éstas proporcionan al ser humano, principalmente de suministro y culturales. Los servicios ecosistémicos de suministro pueden ser medicinales, de materiales, nutrición y energía. Los servicios ecosistémicos de suministro relativos a la nutrición hacen referencia a las náyades que directamente se capturan o se cultivan para contribuir a la alimentación del ser humano, sobre todo en algunas zonas de Asia como pueden ser China o India y en algunas zonas de África occidental. Sin embargo, el consumo de

náyades procedentes de aguas contaminadas puede causar efectos adversos para la salud del ser humano debido a los altos ratios de bioacumulación que poseen estos moluscos (Zieritz *et al.*, 2022).

Los servicios relativos a usos medicinales se originan mayoritariamente en Asia y los relativos a la energía hacen referencia al potencial uso de las náyades en el sector energético, como catalizadores para la producción de biocombustible (Hu *et al.*, 2011; Zieritz *et al.*, 2022). Además, las náyades se han usado desde tiempos de la prehistoria para la fabricación de herramientas y otros materiales. Este es el caso del nácar de la concha de *Pseudunio auricularius*, el cual era utilizado en el bajo Ebro para la fabricación de los mangos de los cuchillos (Álvarez-Halcón, 1998).

Los servicios ecosistémicos culturales se dividen en los relativos al conocimiento, la estética, las interacciones físicas y las actitudes de la gente. Los moluscos pueden utilizarse como bioindicadores para la obtención de información acerca de: la calidad de las aguas, comunidades humanas pasadas, paleoambientes, educación social y la mejora en la producción de materiales.

De la misma forma también han sido usadas en actividades relacionadas con la estética dándoles un uso ornamental, principalmente sus conchas o perlas. En algunas partes de Asia y en China, el uso ornamental de éstos constituye una pieza importante dentro de su economía (Fiske & Shepherd, 2007; Zieritz *et al.*, 2022). A lo largo del siglo pasado, en Europa y Norteamérica se produjo un gran declive de las poblaciones de organismos pertenecientes a la familia Unionidae por la exhaustiva “pesca de perlas”. Actualmente esta práctica se encuentra prohibida en estos dos continentes (Strack, 2015; Zieritz *et al.*, 2022).

Finalmente, antiguas comunidades humanas que vivían en Mongolia (Kiryushin *et al.*, 2011; Zieritz *et al.*, 2022), Argentina (Fabra, Gordillo & Piovano, 2012; Zieritz *et al.*, 2022), Egipto (Burleigh, 1983; Zieritz *et al.*, 2022) y Rusia (Zieritz *et al.*, 2022) utilizaban tanto las conchas como las perlas de náyades del orden Unionoida como objetos funerarios.

## 1.2 Amenazas

A pesar de todos los servicios que nos proporcionan citados anteriormente, los bivalvos de agua dulce son uno de los grupos de organismos más amenazados del planeta (Lopes-Lima *et al.*, 2018). Algunas de las amenazas más importantes son la fragmentación de hábitats, la contaminación, la introducción de especies exóticas invasoras, la pérdida de peces hospedadores, el cambio climático y la sobreexplotación.

La fragmentación de hábitats fluviales puede originarse por la construcción de presas y canalizaciones provocando una limitación en el flujo de genes (e.g. Geist & Kuehn, 2005; Lopes-Lima *et al.*, 2017). Las presas a su vez causan cambios en la temperatura, flujo y sedimentos del río alterando de forma negativa el hábitat de las náyades (Lopes-Lima *et al.*, 2017). La contaminación de los hábitats puede afectar a las náyades ya sea por afección directa o por bioacumulación en sus tejidos pudiendo producir efectos crónicos a largo plazo (Nakamura *et al.*, 2021).

La introducción de especies exóticas invasoras es otra de las amenazas que tiene incidencia sobre las náyades. Algunas de las especies de bivalvos invasoras que pueden afectar a las náyades autóctonas son: el mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*; Pallas 1771), la almeja asiática (*Corbicula* spp.) y la almeja del cieno (*Sinanodonta woodiana*; Lea 1834), compitiendo por los mismos recursos, incluso los peces hospedadores.

La amenaza que supone la pérdida de peces hospedadores autóctonos reside en el hecho de que náyades como *P. auricularius* y *M. margaritifera* requieren de unas especies específicas las cuales se encuentran cada vez más mermadas en el medio natural (Lopes-Lima *et al.*, 2017).

El cambio climático también es una amenaza para las náyades ya que los cambios de temperatura pueden alterar el desarrollo de las larvas y los procesos de metamorfosis (Taeubert *et al.*, 2014; Lopes-Lima *et al.*, 2017). Además, fenómenos acarreados por el cambio climático como las sequías e inundaciones producen fenómenos de mortalidad muy grandes en las poblaciones de náyades europeas (Bódis *et al.*, 2014; Lopes-Lima *et al.*, 2017).

Por último, la sobreexplotación de náyades mediante la “pesca de perlas” en el norte y centro de Europa ha supuesto una amenaza para las poblaciones de algunas especies como *M. margaritifera* en el pasado (Makhrov *et al.*, 2014; Lopes-Lima *et al.*, 2017). Actualmente estas prácticas han quedado estrictamente prohibidas (Lopes-Lima *et al.*, 2017). Durante el siglo XX, en España, más concretamente en la localidad aragonesa de Sástago se llevó a cabo una explotación no controlada de nácar de la concha de *P. auricularius*. Este nácar era utilizado para la fabricación de mangos de navajas y cuchillos (Álvarez Halcón, 1998).

### 1.3 La margaritona

*P. auricularius* también conocida comúnmente como margaritona, es una de las especies de náyade más amenazadas en toda Europa (Altaba, 1990; 1997; Araujo *et al.*, 2000). Es un molusco que anteriormente tenía una distribución muy amplia pudiéndose localizar en la

mayor parte de los ríos europeos pero su distribución actual se restringe a la cuenca del río Ebro en España y a algunas cuencas de ríos franceses (Nakamura *et al.*, 2022; Prié *et al.* 2018).

Según la UICN (2022) esta especie se cataloga “En peligro crítico” a nivel global. Según el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas, se encuentra como “En peligro de extinción”. En el año 2018 (TEC/1078/2018) es declarada por el Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico como una de las siete especies en España catalogadas como en peligro crítico.

Respecto a su biología y ecología se puede decir que la margaritona es un molusco bivalvo filtrador perteneciente al orden Unionoida que pasa gran parte de su vida en el lecho de los ríos y posee una longitud que puede alcanzar los 18 cm. Posee valvas alargadas y gruesas, periostraco negruzco y borde ventral excavado dándole forma auriculada. En su interior, la valva derecha posee un diente cardinal grueso y un diente lateral. En cambio, la valva izquierda posee dos dientes laterales posteriores y dos dientes cardinales gruesos. Posee un pie grande, musculoso y blanco (Gobierno de Aragón, 2019). Presenta un diafragma que, junto a una serie de engrosamientos de los bordes del manto, conforma las aberturas inhalante y exhalante. En cuanto a su ciclo reproductivo se puede decir que es bastante complejo ya que, en la fase parasita larvaria, depende normalmente de peces como huéspedes. La gametogénesis se produce entre diciembre y marzo (Zapater *et al.*, 2006).

El inicio del ciclo se produce en invierno cuando las hembras inhalan el esperma liberado por los machos en el agua, con el fin de fecundar los huevos contenidos en una cámara formada por cuatro láminas branquiales. Una vez fecundados, los huevos dan lugar a larvas parásitas conocidas como gloquidios que se desarrollan en un periodo de uno a tres meses. Finalmente, éstos serán liberados en el agua entre los meses de marzo y abril (Zapater *et al.*, 2006). Los gloquidios de esta especie tienen un tamaño de 140x130x60 micras y poseen unos pequeños dientes en su borde ventral para adherirse a las branquias de los peces hospedadores (Araujo & Ramos, 1998). Una vez adheridos, éstos se encapsulan durante un periodo que oscila entre cuatro y seis semanas donde sufren una metamorfosis, finalmente liberándose del pez hospedador ya transformados en juveniles. Estos juveniles quedan libres cayendo en el lecho del río donde se desarrollarán hasta su etapa adulta. En su etapa adulta son frecuentes los organismos hermafroditas (Grande *et al.*, 2001; Zapater *et al.*, 2006).

Respecto a su distribución en España, se tiene registro de ejemplares vivos solo en la cuenca del río Ebro, en cambio, en Francia se tiene constancia de la presencia de 8 poblaciones: tres

en la cuenca del río Adour, dos en la cuenca del río Garona, dos en la cuenca del río Loira y una en la cuenca del río Charente (Prié *et al.*, 2018).

En España, la localidad con mayor densidad de la especie se encuentra en el Canal Imperial de Aragón. De la misma forma, el Canal de Tauste es la localidad con mayor porcentaje de ejemplares jóvenes. Además, se descubrió una pequeña colonia (algunos subadultos) en la acequia de Quinto (Nakamura *et al.* 2018; Guerrero *et al.*, 2021).

En el pasado, la sobrepesca tuvo influencia en la decadencia de las colonias de margaritonas (Araujo *et al.*, 2016; Prié *et al.*, 2018). Hoy en día, una de las causas de su desaparición es debida a la actividad humana (Prié *et al.*, 2018; Nakamura *et al.*, 2023). La agricultura y gestión del río son dos de las causas que amenazan notablemente a esta especie y, además, la construcción de presas genera condiciones desfavorables para su supervivencia (Prié *et al.*, 2018; Nakamura *et al.*, 2023).

En 2013 y años posteriores en el Canal Imperial de Aragón se registró un episodio de mortalidad masiva, pero no solo de la margaritona sino también de las otras tres náyades presentes en la cuenca del Ebro, *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758), *Potomida littoralis* (Cuvier, 1798) y *Unio mancus* (Lamarck, 1819) declarándose extintas hoy en día en los canales. La margaritona es la única que aun sobrevive, pero alcanzando un alto porcentaje de mortalidad de hasta un 80 % en 2019 (Guerrero *et al.* 2021).

#### 1.4 Peces de la cuenca del Ebro

En la cuenca del río Ebro podemos encontrar un total de 14 especies de peces autóctonas y 19 especies alóctonas invasoras (Abad *et al.*, 2020). Concretamente en Aragón, dentro de las especies autóctonas presentes en la cuenca del Ebro, se encuentran entre las más abundantes especies de la familia Cyprinidae como pueden ser: el gobio (*Gobio lozanoi*; Doadrio & Madeira, 2004), la bermejuela (*Achondrostoma arcasii*; Steindachner, 1866), el barbo de Graells (*Luciobarbus graellsii*; Steindachner, 1866) y la madrilla (*Parachondrostoma miegii*; Steindachner, 1866) (Abad *et al.*, 2020).

Una de las amenazas más comunes entre las especies autóctonas es la introducción de especies exóticas invasoras depredadoras de la ictiofauna local. Entre las exóticas invasoras presentes en la cuenca del Ebro en Aragón se encuentran especies como: el siluro (*Silurus glanis*; Linnaeus, 1758), la lucioperca (*Sander lucioperca*; Linnaeus, 1758), el alburno (*Alburnus alburnus*; Linnaeus, 1758) y la gambusia (*Gambusia holbrooki*; Girard, 1859) (Abad *et al.*, 2020).

En la cuenca del Ebro, el esturión común (*Acipenser sturio*; Linnaeus, 1758) se consideraba el principal pez hospedador de *P. auricularius*. Esta especie remontaba el río y servía de agente de dispersión para las margaritonas (López *et al.*, 2007). En el siglo XV tras la construcción del azud de Xerta, el esturión empezó a tener problemas ya que esta infraestructura evitaba que remontara territorio aguas arriba. Entre los años 1926 y 1946, debido a la reducción del número de áreas de desove y a su pesca intensiva, las poblaciones de esturión europeo en el río Ebro fueron disminuyendo. Esto condujo a que, para mediados del siglo XX desapareciera del bajo Ebro (López Prera, 2020).

Actualmente la única población reproductora de *A. sturio* en Europa se localiza en el río Garona, Francia (Soler *et al.*, 2019). Además de esta especie de esturión, se conocen otras tres del mismo género que pueden ser hospedadoras de *P. auricularius* probadas en condiciones experimentales en cautividad: el esturión siberiano (*Acipenser baerii*; J.F. Brandt, 1869), esturión del Atlántico (*Acipenser naccari*; Bonaparte, 1836) y el esturión checo (*Acipenser ruthenus*; Linnaeus, 1758) (Altaba & López, 2001; Araujo, Bragado, & Ramos, 2001; Araujo, Quirós, & Ramos, 2003; López, Altaba *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2012), produciendo todas ellas juveniles viables.

En Francia, la lamprea marina (*Petromyzon marinus*; Linnaeus, 1758), se considera el principal pez hospedador de *P. auricularius* por lo que es una especie clave en la supervivencia de las poblaciones de la náyade. Otras especies como el espinoso (*Gasterosteus aculeatus*; Linnaeus, 1758) y el siluro se consideran especies generalistas ya que pueden transformar en menor proporción los gloquidios de la margaritona en juveniles viables (Soler *et al.*, 2019).

Tras la extinción, en España, del esturión común, actualmente, el blenio de río (*Salaria fluviatilis*; Asso, 1801) es la única especie autóctona capaz de transformar los gloquidios de *P. auricularius* en la cuenca del Ebro (Altaba & López, 2001). En Aragón, el blenio de río está igualmente catalogado como “Vulnerable” (Decreto 129/2022) y por esta razón, es esencial su recuperación para la supervivencia de la margaritona. De la misma forma, es necesario conocer si existen otras especies de peces que puedan ser hospedadoras potenciales de los gloquidios y contribuir a completar su ciclo reproductivo.



## 1.5 Objetivos

**Objetivo principal:** Evaluar la viabilidad de infestación y desarrollo del gloquidio de *Pseudunio auricularius* en especies de peces presentes en la actualidad en la cuenca del río Ebro.

**Objetivos específicos:**

- Verificar la infestación con gloquidios de *P. auricularius* en especies de peces presentes en la cuenca del Ebro.
- Evaluar la evolución de los quistes en las branquias de los individuos infestados.
- Evaluar el porcentaje de gloquidios transformados en juveniles (viabilidad).
- Discutir la compatibilidad y viabilidad de las diferentes especies piscícolas utilizadas de cara a la conservación de *P. auricularius*.

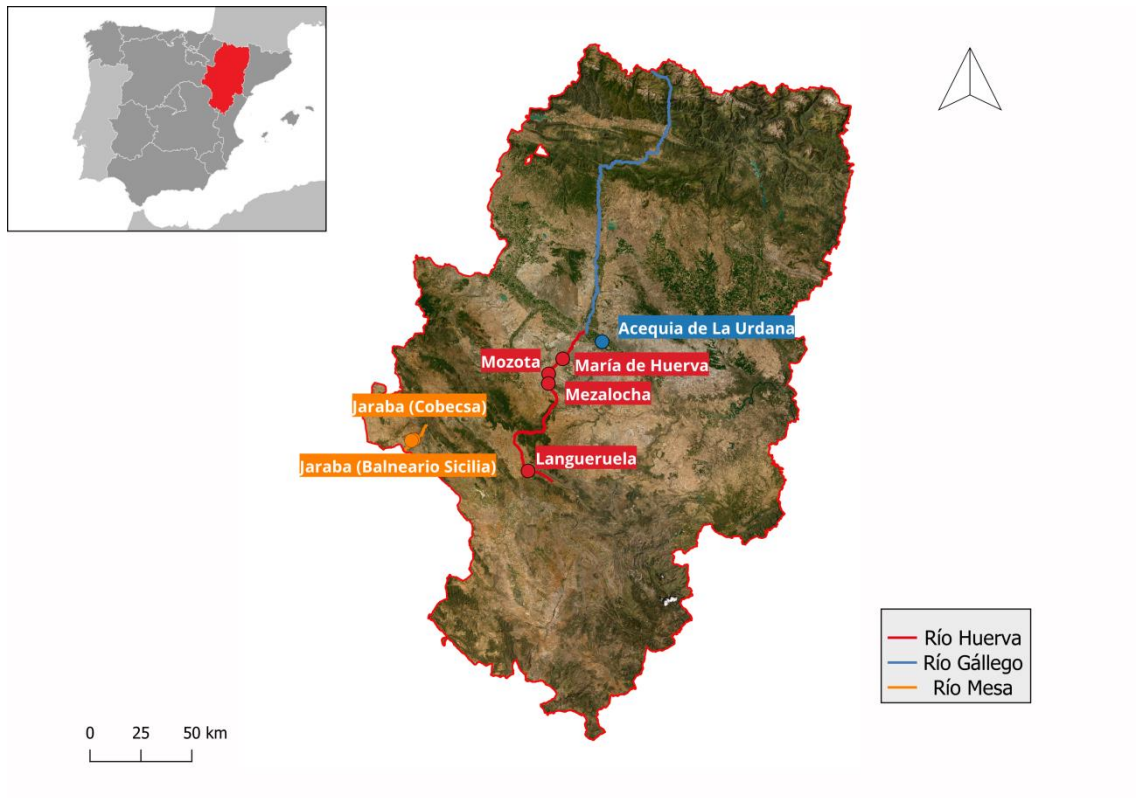
## 2. Material y métodos

### 2.1 Área de estudio

La cuenca del río Ebro se localiza en el cuadrante noreste de la Península Ibérica y posee una superficie total de 85.534 km<sup>2</sup>. Es la cuenca más grande de España y está delimitada por los Pirineos y los montes Cantábricos en el norte, por la cadena Costero-Catalana en el este y por el Sistema Ibérico en el sureste.

El río Ebro recorre esta cuenca en sentido noroeste-sureste, desde la cordillera Cantábrica hasta su desembocadura en el Mediterráneo. Algunos afluentes pertenecientes a la zona pirenaica y montes cantábricos (margen izquierda) son el Gállego, Aragón, Segre, Cinca, etc. Por otra parte, algunos afluentes que nacen en la margen derecha son: Guadalupe, Jalón, Iregua, Martín, Matarraña, etc. En esta cuenca, las precipitaciones se concentran en mayor medida en las zonas montañosas como es la zona pirenaica, donde se alcanzan valores hasta de 1.000 mm/año (Portal CHEbro. <https://www.chebro.es/eu/la-cuenca-del-ebro>).

El presente TFG se llevó a cabo con especies de peces silvestres capturadas en los ríos Huerva, Gállego y Mesa (Figura 2), pertenecientes a la comunidad autónoma de Aragón. Se aseguró acudir a ríos donde los peces no hubieran tenido contacto previo con ejemplares de *P. auricularius* para evitar el rechazo de los gloquidios por posible inmunidad desarrollada. En la Tabla 1 se muestran los puntos en los cuales se llevó a cabo el trabajo de campo.



**Figura 2.** Puntos de pesca en los tres ríos visitados para la captura de peces hospedadores potenciales de la margaritona. Elaborado con QGIS.

**Tabla 1.** Zonas de pesca con su ubicación en coordenadas UTM, especies capturadas, fecha de pesca y si fueron llevadas a laboratorio.

Fecha de pesca	Río	Localidades de pesca	UTM		Especies capturadas	Llevadas a laboratorio
			X	Y		
27/02/23	Río Ebro	Balsa de la Expo (Zaragoza)	673.518	4.614.869	Black bass	No
27/02/23	Río Ebro	Balsa de la Expo (Zaragoza)	673.465	4.615.024	-	-
03/03/23	Río Gállego	Peñaflor de Gállego	682.226	4.623.433	Barbo	No
07/03/23	Río Piedra	Castejón de Armas	599.826	4.574.547	Trucha	No
07/03/23	Río Piedra	Carenas	599.229	4.571,327	Trucha	No
10/03/23	Río Huerva	María de Huerva	667.506	4.600.277	Gobio, alburno y barbo	Si
10/03/23	Río Huerva	Mozota	660.596	4.592.920	Gobio, alburno y barbo	Si
13/03/23	Río Huerva	Mezalocha	660.457	4.588.161	Alburno y gobio	Si
13/03/23	Río Huerva	Langueruela	650.466	4.545.221	Bermejuela	No
20/03/23	Río Mesa	Ibdes	598.677	4.564.482	Blenio y barbo	No
20/03/23	Río Mesa	Jaraba (Cobecsa)	594.208	4.560.555	Barbo y gobio	Si
20/03/23	Río Mesa	Jaraba (Balneario Sicilia)	593.176	4.560.110	Barbo y gobio	Si
08/03/23	Río Gállego	Acequia de La Urdana	686.832	4.608.717	Gambusia	Si

El río Huerva es un río que nace en la sierra Cucalón, su cuenca ocupa una extensión de 1.034 km<sup>2</sup> y recorre 128 km hasta que desemboca en el río Ebro en la localidad de Zaragoza. Su aporte medio es de 76 Hm<sup>3</sup> al año (Pérez, 2018). El río Mesa es un río que se encuentra localizado en el sector central de la cordillera ibérica y posee una longitud de 50 km. Nace en la localidad de Selas y desemboca en el embalse de la Tranquera. Su cuenca de drenaje tiene una superficie de 622 km<sup>2</sup> y es afluente indirecto del río Ebro (Auqué *et al.*, 2013). El río Gállego es un afluente del río Ebro que nace en el collado de Canal Roya y tras recorrer 200 km

desemboca en el río Ebro. Posee una cuenca hidrográfica alargada que cubre una superficie de 4.020 km<sup>2</sup> (Ollero *et al.*, 2004).

## 2.2 Metodología

El trabajo se desarrolló en el marco del Plan de Recuperación de *P. auricularius* en Aragón promovido por el Gobierno de Aragón a través de la empresa pública SARGA.

Se siguió la metodología estándar de pesca eléctrica, sin maltrato a los peces y asegurando sus condiciones de sanidad, a pesar de que posteriormente en cautividad surgieron problemas asociados con hongos y/o bacterias saprófitas.

Las especies de peces con las que se trabajó en el presente TFG son las siguientes:

- Autóctonas: barbo común (*Luciobarbus graellsii*) y gobio (*Gobio lozanoi*).
- Alóctonas: gambusia (*Gambusia holbrooki*) y alburno (*Alburnus alburnus*).

El barbo común (*Luciobarbus graellsii*) (Figura 3) es un pez de la familia de los ciprínidos presente en las cuencas de ríos al norte de España como el Nervión, Ter, Llobregat, y Ebro. Su coloración suele ser parda o verdosa y alcanza un tamaño que puede rondar los 80 cm, siendo el tamaño medio de 35 cm. Los machos alcanzan menor tamaño que las hembras. Es una especie gregaria con una alimentación basada en macroinvertebrados y algas. La freza tiene lugar entre los meses de mayo y agosto. Cada hembra suele depositar una cantidad de huevos que oscila entre los 5.000 y 25.000. Esta especie alcanza la madurez sexual a los 4 años (Salvador, 2017).



**Figura 3.** Ejemplar de *Luciobarbus graellsii* capturado durante el muestreo.

El gobio (*Gobio lozanoi*) (Figura 4) es un pez de la familia de los ciprínidos que en España se distribuía de forma natural en las cuencas del Ebro y Bidasoa. Posteriormente se expandió a las cuencas del Júcar, Turia, Oria, Nalón, Guadalquivir, Nansa, Miño, Guadiana, Mondego, Duero, Segura, Tâmega, Guadalete, Mijares y Tajo. Presenta una coloración marrón en la parte dorsal con una serie de manchas negras sobre los flancos a lo largo de la línea lateral. Su tamaño suele ser inferior a los 15 cm. Su alimentación está basada en macroinvertebrados (crustáceos, moluscos y larvas de insectos). El periodo de freza tiene lugar en los meses de verano (finales de mayo y agosto). Cuando tienen aproximadamente un tamaño de 7 cm alcanzan su madurez sexual y, dependiendo de la edad de la hembra, puede poner entre 3.000 y 7.000 huevos (MITECO, 2006; Amat-Trigo, 2017).



**Figura 4.** Ejemplar de *Gobio lozanoi* capturado durante el muestreo.

La gambusia (*Gambusia holbrooki*) (Figura 5) es una especie invasora de la familia de los Poecílidos. Respecto a su distribución, es una especie que fue introducida en España en 1921 y que actualmente se encuentra distribuida en la mayoría de las cuencas de la Península Ibérica. Presenta una coloración que varía desde el verdoso hasta el grisáceo en el dorso y los flancos. La parte ventral del cuerpo presenta tonalidades blanquecinas. En referencia a su tamaño, los machos suelen medir en torno a 4 cm y las hembras en torno a 7 cm. Su dieta está basada en zooplancton pudiendo también consumir insectos, moluscos, plantas, algas, gusanos, etc. Es una especie ovovivípara. El periodo de freza tiene lugar entre los meses de mayo y septiembre. La gestación tiene una duración de entre 21 y 28 días con una media de individuos producidos que oscila alrededor de los 50 (Moreno-Valcárcel *et al.*, 2017).



**Figura 5.** Ejemplar de *Gambusia holbrooki* capturada durante el muestreo.

El alburno (*Alburnus alburnus*) (Figura 6) es una especie exótica invasora perteneciente a la familia de los ciprínidos. Respecto a su distribución, fue introducido en la cuenca del Ebro en la década de los 90 y actualmente se ha expandido a todas las cuencas principales de la Península Ibérica (Latorre *et al.*, 2019). Posee una coloración verdosa o azulada en el lomo cubierto por escamas plateadas. Presenta un tamaño que suele ser menor de 15 cm. Es una especie omnívora y gregaria que frecuentemente forma grandes bancos que surcan la superficie (MITECO, 2006). Su periodo de freza se da entre los meses de primavera y principios de verano. La hembra desova sobre vegetación o sustratos blandos dando lugar a una cantidad de huevos que oscila entre los 3.000 y 15.000 (Latorre *et al.*, 2019).



**Figura 6.** Ejemplar de *Alburnus alburnus* capturado durante el muestreo.

### 2.2.1 Instalaciones para los experimentos

En primer lugar, se organizó la distribución de los tanques en el espacio disponible y se montaron con sus respectivos sistemas de desagüe, filtrado y oxigenación. Se utilizaron cuatro tanques de fibra de vidrio de 1.000 l (Figura 7), dos de 300 l y cuatro acuarios de 120 l (Figura 8).



**Figura 7.** Tanques de 1.000 l en exterior.



**Figura 8.** Tanques de 300 l y de 120 l respectivamente en interior.

Para los filtros de los tanques de 1.000 y 300 l se utilizó un cajón de fibra de vidrio compartimentado con sacos de biobolas para albergar las bacterias nitrificantes. A este cajón iban a parar cuatro bombas (dos por tanque) (marca Eheim). Dos de ellas eran destinadas a la oxigenación de los tanques y las otras dos iban a parar al interior del cajón haciendo que el agua pasara a través del filtro. Para los acuarios, se utilizaron 4 filtros externos modelo Eheim Classic.

Una vez elegido el emplazamiento, los tanques y filtros se llenaron y se dejaron un día para observar si tenían fugas. Posteriormente se desinfectaron para evitar así posibles problemas bacterianos y fúngicos. Tras la desinfección se enjuagaron varias veces para evitar restos de lejía en el agua.

Antes de liberar los peces en los tanques, se realizó una medición de parámetros fisicoquímicos con la finalidad de realizar una correcta aclimatación de los peces.

### **2.2.2 Trabajo de campo**

Se llevó a cabo la pesca eléctrica en los ríos Mesa y Huerva con la finalidad de capturar las especies destinadas a la investigación. Únicamente la gambusia fue capturada sin necesidad de utilizar pesca eléctrica, en la acequia de la Urdana proveniente del río Gállego, que discurre a través de la finca de La Alfranca.

Una vez en los puntos de pesca, se realizó la medición de los parámetros fisicoquímicos: pH, conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) y oxígeno disuelto ( $\text{mg}/\text{l}$ ) para conocer las



características del hábitat. De la misma forma se recabo información hablando con gente de la zona para previamente tener conocimiento de las especies presentes en el tramo de río que se iba a pescar.

Una vez con la vestimenta adecuada (vadeador), se empezó el procedimiento de la pesca (Figura 9). El equipo de pesca eléctrica estaba formado por un generador con un panel de control que permitía regular el voltaje y la frecuencia de impulso por segundo, una lanza con red que contenía el ánodo y un látigo de cobre que contenía el cátodo. El modelo del equipo de pesca eléctrica utilizado fue *ELT 60II GI HONDA GXV50* con una potencia de 1,8 kW. Cuando ánodo y cátodo se encuentran sumergidos en el agua y se acciona el pulsador, se origina un campo eléctrico haciendo que los peces respondan involuntariamente y naden en dirección hacia el ánodo. En función de la especie y la intensidad aplicada, éstos quedan paralizados momentáneamente por la contracción de sus músculos y pueden ser capturados con redes.

La persona certificada para poder realizar la pesca eléctrica fue la encargada de usar el equipo. El resto de integrantes se situó detrás del mismo a ambos lados con sacaderas grandes y cubos para capturar los peces.

Tras la captura de los ejemplares, se comenzó con el proceso de aclimatación de los peces y se transportaron en bidones hasta el laboratorio.



**Figura 9.** Metodología de pesca eléctrica.

### 2.2.3 Trabajo de laboratorio

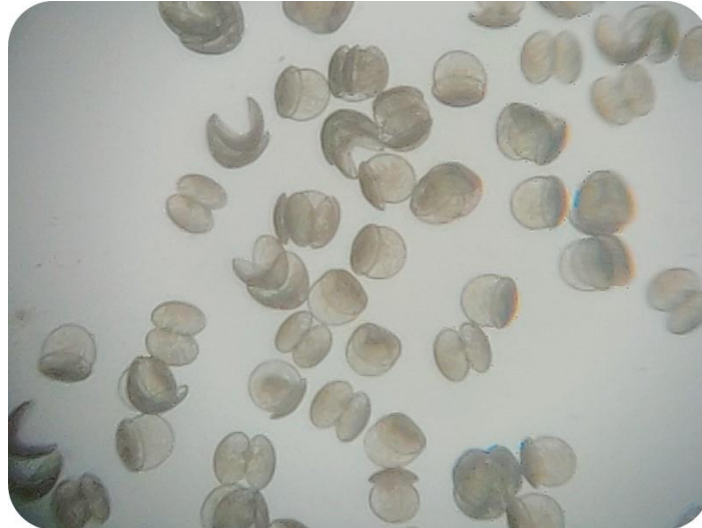
Una vez en laboratorio, se midió la longitud total de cada uno de los individuos y se depositaron los peces separándolos por especie en tanques. Los días posteriores se llevó a cabo una monitorización diaria para controlar su adaptación a las condiciones de cautividad.

A partir de la primera semana de adaptación, se realizaron controles de parámetros fisicoquímicos semanales: pH, temperatura (°C), oxígeno disuelto (mg/l), conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) (mg/l) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) (mg/l). En función del resultado de las analíticas, especialmente si la concentración de amonio era alta, se realizaba un cambio parcial de agua.

En el proyecto de cría en cautividad de *P. auricularius* se mantienen a las almejas adultas en sistemas de recirculación cerrados (Figura 10) donde se recogen automáticamente, mediante tamices, los gloquidios que van liberando los ejemplares estabulados. Cuando las náyades comenzaron a liberar gloquidios (Figura 11) se llevó a cabo el proceso de infestación de los peces.



**Figura 10.** Tanques de recolección de gloquidios.



**Figura 11.** Gloquidios observados en lupa.

### *Infestación de los peces*

Cuando se empezaron a recolectar cantidades abundantes de gloquidios, estos se extrajeron de los tamices y se preparó una solución con agua prefiltrada para llevar a cabo la estimación del número de gloquidios. Esta solución se pasó a un cilindro graduado de 2.000 ml y se enrasó. Con un agitador se homogenizó la muestra y seguidamente se tomaron 3 réplicas mediante una pipeta de 10 ml en placas de Petri. Estas réplicas se revisaron bajo lupa binocular y se contó el número de gloquidios presentes en cada una de éstas. Si el número de gloquidios era muy elevado (>100 gloquidios) y dificultaba el conteo, se hacía una doble dilución y se volvían a sacar tres réplicas de 10 ml para nuevamente contar los gloquidios. Tras el conteo, mediante una regla de tres se obtuvo la estimación del número de gloquidios presentes en la solución concentrada. A continuación, se muestra un ejemplo de los cálculos realizados:

#### **Contaje de réplicas de 10 ml:**

I: 33 gloquidios	}	Promedio ( $\bar{x}$ ) = 31 gloquidios/ 10 ml.
II: 30 gloquidios		
III: 30 gloquidios		

### Solución diluida de 2.000 ml

$$\left. \begin{array}{ll} 31 \text{ gloquidios} & 10 \text{ ml} \\ X & 2.000 \text{ ml} \end{array} \right\} x = 6.200 \text{ gloquidios.}$$

### Solución concentrada de 2.000 ml

$$\left. \begin{array}{ll} 6.200 \text{ gloquidios} & 10 \text{ ml} \\ X & 2.000 \text{ ml} \end{array} \right\} x = 1.240.000 \text{ gloquidios.}$$

En la solución concentrada se estimó un total de 1.240.000 gloquidios y esta fue la concentración inicial que se utilizó para infestar a los peces.

Una vez que se realizó la estimación, los individuos de una especie de las capturadas se introdujeron en la solución concentrada de gloquidios durante un tiempo determinado en función del tamaño del pez.

Una vez que todos los individuos de esa misma especie fueron infestados, se mantenían en cubos con aireación para chequear su comportamiento durante al menos 30 minutos y finalmente eran devueltos a sus respectivos tanques. Posteriormente se llevó a cabo la estimación de los gloquidios que quedaban en la solución tras el proceso de infestación. Se tomaron de nuevo 3 réplicas de la solución previamente utilizada para infestar y se repitieron los cálculos. Tras este procedimiento, se obtuvo la estimación de gloquidios finales en la solución tras la infestación (773.200), que junto con el dato de gloquidios iniciales (1.240.000), permitió estimar el número de gloquidios utilizados en el proceso y que se estima se adhieren a cada pez.

Tras la infestación se llevó a cabo un monitoreo diario del estado de los peces y de la temperatura de los tanques para así determinar los grados-día de evolución de los gloquidios y detectar si se presentaba alguna mortalidad asociada a la sobreinfestación.

### *Seguimiento de los peces infestados*

El protocolo inicial era el control una vez por semana de la evolución de la infestación de los peces. Para ello se preparó una disolución de aceite de clavo (10 gotas/3 litros de agua) con la finalidad de anestésiar a los peces y facilitar su revisión. Se mantuvieron siempre con abundante aireación suplementaria en el proceso de anestesiado y posterior proceso de recuperación.

En cada ocasión se revisaron hasta seis ejemplares de cada especie. Una vez anestesiados se revisaba rápidamente el estado de infestación bajo lupa binocular tanto de branquias como de aletas y se devolvía para su recuperación. Un ejemplar era sacrificado para el conteo de los gloquidios en branquias. Se dejaba más tiempo en la disolución de clavo y posteriormente en alcohol al 70%. Se le extrajeron las branquias y se revisaron en la lupa con detenimiento pudiendo contabilizar el número de gloquidios adheridos por arco branquial. En el caso de detectar individuos muertos igualmente se revisaron bajo lupa binocular y se extrajeron las branquias para el contaje detallado de gloquidios.

### **Revisión de branquias**

Una vez que se extraían los arcos branquiales (Figura 12), se revisaba cada uno de ellos por ambas caras, se contaba el número de gloquidios y se determinaba si estaban adheridos superficialmente, más profundamente o incrustados en el arco branquial.

Tras la infestación, también se llevaba a cabo un sifonado semanal de cada uno de los tanques para determinar la posible presencia de juveniles de margaritona. Los tamices utilizados fueron de 400, 120 y 75 micras. Finalmente se revisaron en la lupa binocular en busca de juveniles.



**Figura 12.** Arcos branquiales extraídos de un ejemplar de la especie *L. graellsii* para revisar bajo la lupa binocular.

### *Análisis estadístico de los datos*

Se comparó el grado de infestación de las diferentes especies de peces por parte de los gloquidios de la margaritona (gloquidios revisados en branquias), mediante un test de la varianza. Previamente se comprobó la homogeneidad de las varianzas con el test de Levene y la normalidad con el test de Shapiro-Wilk. Finalmente se optó por un test no paramétrico, Kruskal-Wallis, por no cumplirse los supuestos requeridos para aplicar el test ANOVA. El análisis estadístico se realizó con el software de análisis de datos PAST.

Asimismo, se obtuvo el porcentaje de gloquidios que se transformaron en juveniles, en este caso de gambusia, ya que fue la única especie de la cual se obtuvieron juveniles.

## **3. Resultados**

### **3.1 Condiciones de referencia de los ecosistemas de origen y condiciones en cautividad**

En general, las condiciones del agua de los ecosistemas de origen presentaron valores de pH levemente básicos entre 7,7 y 8,6, conductividad entre 636,3 y 2.845,2  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , temperatura propia de la fecha y prácticamente saturación de oxígeno en todos los puntos de los ríos visitados (Tabla 2). En el caso de la Acequia Urdana, se observó que la conductividad fue más elevada y el porcentaje de oxígeno disuelto menor al resto de valores. Esto se debe a que hubo un periodo en el cual la conductividad del agua procedente directamente del río Gállego presentaba unos valores especialmente altos para la fecha. Por otra parte, el oxígeno disuelto en agua tiene un valor menor debido a que la zona en la cual se capturaron los ejemplares de gambusia estaba estancada, y por lo tanto había poca oxigenación.

**Tabla 2.** Parámetros fisicoquímicos de los lugares de origen en los que se capturaron los peces utilizados en la experimentación.

Fecha	Localidad	Río	pH	Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Oxígeno disuelto (%)
10/03/23	María de Huerva	Río Huerva	8,1	1.444,0	9,1	96,3
10/03/23	Mozota	Río Huerva	7,7	813,3	9,4	95,8
13/03/23	Mezalocha	Río Huerva	7,8	636,3	14,0	110,5
20/03/23	Jaraba (Cobecsa)	Río Mesa	8,0	816,0	16,6	95,7
20/03/23	Jaraba (Balneario Sicilia)	Río Mesa	8,4	761,2	16,2	96,2
08/03/23	La Puebla de Alfindén (Acequia Urdana)	Río Gállego	8,6	2.845,2	15,8	63,1

En cautividad (Tabla 3), los valores de temperatura medios obtenidos fueron semejantes, oscilando en torno a 13 ( $^{\circ}\text{C}$ ). El pH que predominó fue un pH básico entorno al valor 8, la conductividad entre 1.300 y 1.700  $\mu\text{S}/\text{cm}$  y las concentraciones de nitrito y amonio se mantuvieron bajas, aun así, todas las semanas se llevó a cabo un cambio de agua del 50 %.

**Tabla 3.** Parámetros fisicoquímicos procedentes de la monitorización de los tanques en cautividad.

Especie	Temperatura del agua ( $^{\circ}\text{C}$ )	pH	Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	Oxígeno disuelto (%)	$\text{NO}_2^-$ (mg/l)	$\text{NH}_4^+$ (mg/l)	% cambio de agua	N
Alburno	12,7	8,0	1.399,9	98,5	0,3	0,04	50	7
Barbo	13,8	7,9	1.708,2	90,0	0,3	0,08	50	4
Gobio	12,8	8,0	1.345,6	94,2	0,4	0,08	50	7
Gambusia	13,1	8,0	1.484,6	94,2	0,3	0,09	50	6

### 3.2 Mantenimiento de peces en cautividad y mortalidad

Se capturaron un total de 119 peces de cuatro especies para ser infestados. Se registró una mortalidad del 52,9% al finalizar la fase de experimentación. Antes de que este fenómeno de mortalidad se produjera, se pudo constatar que gran parte de los ejemplares estudiados ya habían perdido los gloquidios que inicialmente poseían adheridos en las branquias.

En el caso del barbo común, se infestaron todos los ejemplares el 04/04/23 y no se produjeron muertes hasta finales de mes. Entre el 21/04/23 y 22/04/23 de abril hubo una mortalidad del 85%. Los alburnos se infestaron el 05/04/23 y no se registró mortalidad. En el caso de los

gobios se infestaron el 05/04/23 y hasta el 14/04/23 se tuvo una mortalidad del 7,4%. Entre el 17/04/23 y 26/04/23 el porcentaje de mortalidad ascendió al 92,5%. Por último, las gambusias fueron infestadas el 06/04/23, tan solo un día después la mortalidad fue del 35,9%. Del total de gambusias capturadas, a lo largo del mes de abril se registró una mortalidad total del 53,8%.

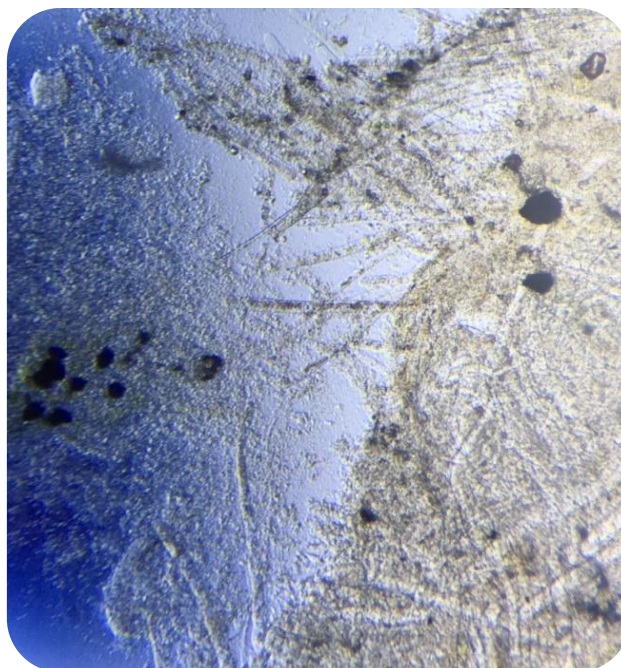
Como consecuencia de la alta mortalidad y para conocer las causas, el Dr. Imanol Ruiz-Zarzuela, del Laboratorio de Ictiopatología de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, realizó una necropsia de parte de los ejemplares muertos de las diferentes especies.

El diagnóstico que se obtuvo fue que, en el caso de la mortalidad en gobios, las bacterias implicadas eran todas oportunistas de los siguientes tipos: *Aeromonas* móviles (principalmente), *Alteromonas putrefaciens* y enterococos; además de la presencia de hongo del género *Saprolegnia* (Figuras 13 y 14).



**Figura 13.** Ejemplar de gobio afectado por bacterias y un hongo del género *Saprolegnia*.





**Figura 14.** Hifas de hongo (*Saprolegnia* spp.) en tejido.

### 3.3 Especies hospedadoras potenciales y soluciones de infestación

Se capturaron un total de 33 alburnos, 20 barbos, 39 gambusias y 27 gobios. Se midieron y se infestaron en soluciones de gloquidios de *P. auricularius* de entre 200 mil y un millón en volúmenes de entre 20 y 2 litros (Tabla 4). Se reporta el número de gloquidios iniciales (Gini) y finales (Gfin) utilizados por especie y la estimación de gloquidios que se adhirieron a cada individuo (G/Ind). El tiempo de infestación se fijó en función del tamaño del pez y de su capacidad branquial, siendo de 25 minutos para alburno, barbo y gobio, y de 5 minutos para gambusia.

**Tabla 4.** Especies utilizadas y características (Nº ind: número de individuos, Long ( $\bar{x}$ )(mm): longitud media en milímetros, TI: tiempo de infestación, VSG: volumen solución de gloquidios, Gini: nº gloquidios antes de infestar en la disolución, Gfin: nº gloquidios después de infestar en la disolución, G/Ind: gloquidios por individuo.

Fecha	Especie	Nº ind	Long ( $\bar{x}$ )(mm)	TI	VSG	Gini	Gfin	G/Ind
05/04/2023	Alburno	33	114,1	25´	10 l	1.180.000	400.000	23.636
04/04/2023	Barbo	20	190,8	25´	20 l	1.240.000	773.200	23.340
06/04/2023	Gambusia	39	20,0	5´	2 l	226.400	106.400	3.157
05/04/2023	Gobio	27	91,2	25´	10 l	1.000.000	920.000	2.580

El barbo fue la especie que mayor longitud promedio registró seguido del alburno. En cuanto a la especie a la que, teóricamente, más gloquidios quedaron adheridos fue el alburno (23.636 gloquidios/individuo), teniendo en cuenta el número de gloquidios iniciales y finales en la solución. El gobio fue la especie a la que menos gloquidios quedaron adheridos (2.580 gloquidios/individuo) (Tabla 4).

### 3.4 Evolución de los gloquidios por especie

De la revisión de las branquias de cada uno de los individuos de las especies estudiadas se obtuvo el número de gloquidios promedio por individuo y día (Tabla 5), obteniendo la mayor cantidad de datos y variabilidad en la gambusia. El gobio presentó gloquidios en branquias solo en la primera revisión, una semana después de la infestación, y el barbo perdió prácticamente todos los gloquidios tras la primera semana.

**Tabla 5.** Número de gloquidios promedio por individuo y día contados diariamente durante la revisión de las branquias por especie.

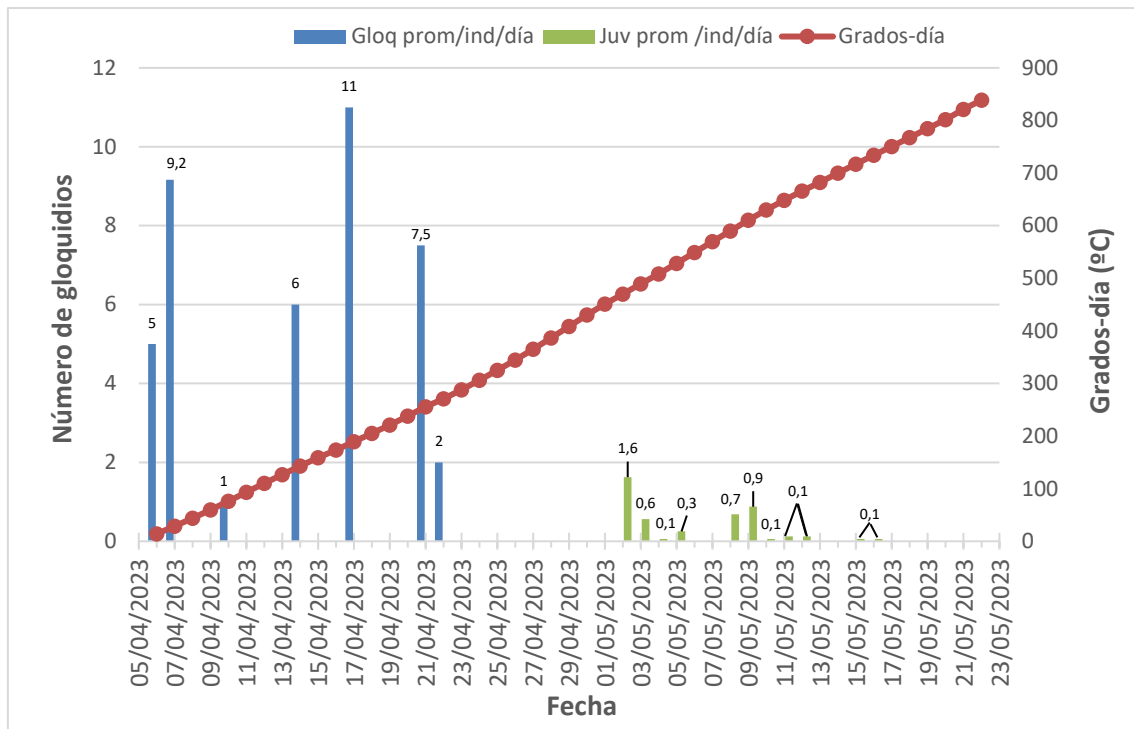
Fecha de muerte	Gambusia		Barbo		Gobio	
	Nº individuos	Gloquidios/día	Nº individuos	Gloquidios/día	Nº individuos	Gloquidios/día
06/04/2023	1	5	1	1.509	-	-
07/04/2023	6	55	-	-	1	15
10/04/2023	1	1	-	-	-	-
13/04/2023	-	-	1	5	2	0
14/04/2023	1	6	-	-	1	0
17/04/2023	2	22	-	-	2	0
18/04/2023	-	-	-	-	3	0
19/04/2023	-	-	-	-	5	0
20/04/2023	-	-	1	21	-	-
21/04/2023	2	15	3	3	-	-
22/04/2023	1	2	14	0	2	0
24/04/2023	-	-	-	-	1	0
25/04/2023	-	-	-	-	8	0
26/04/2023	-	-	-	-	2	0
23/05/2023	16	0	-	-	-	-

En la Tabla 6, se describe el número de juveniles vivos (Figura 16) y muertos recogidos del acuario de gambusia cada día y el número de gambusias que dieron lugar a esos juveniles por día. Se puede observar que el pico de juveniles vivos desprendidos se produjo entre el 08/05/23 y el 09/05/23 con 11 y 14 juveniles.

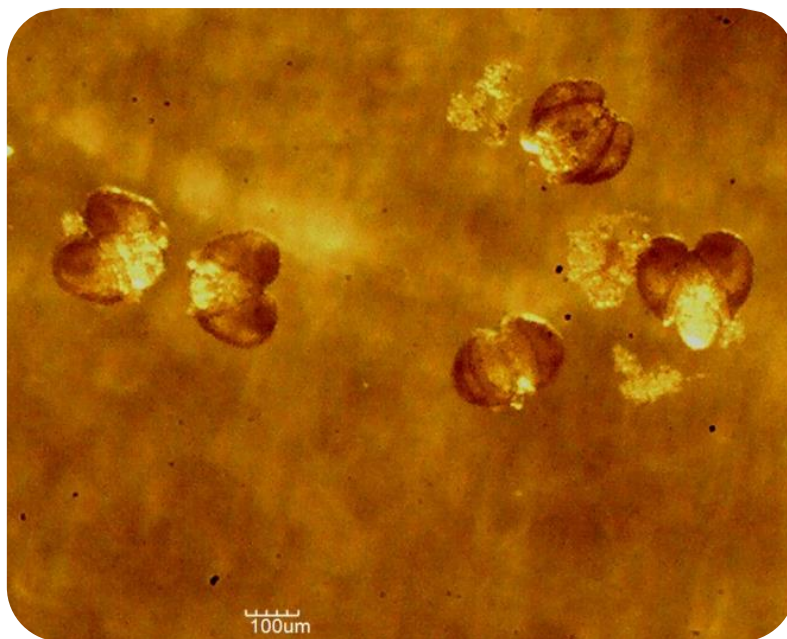
**Tabla 6.** Juveniles vivos y muertos de gambusia sifonados por día.

<b>Fecha</b>	<b>Nº gambusias</b>	<b>Juveniles vivos</b>	<b>Juveniles muertos</b>
02/05/23	16	1	25
03/05/23	16	7	2
04/05/23	16	1	0
05/05/23	16	4	0
08/05/23	16	11	0
09/05/23	16	14	0
10/05/23	16	1	0
11/05/23	16	2	0
12/05/23	16	2	0
15/05/23	16	1	0
16/05/23	16	1	0

En el caso de gambusia (Figura 15) se observa que los individuos sacrificados y revisados en abril todavía tenían gloquidios adheridos. A partir de los 470 grados-día se comienzan a registrar los primeros juveniles, extendiéndose hasta los 734,2 grados-día, cuando se recoge el último juvenil (16/05/23).



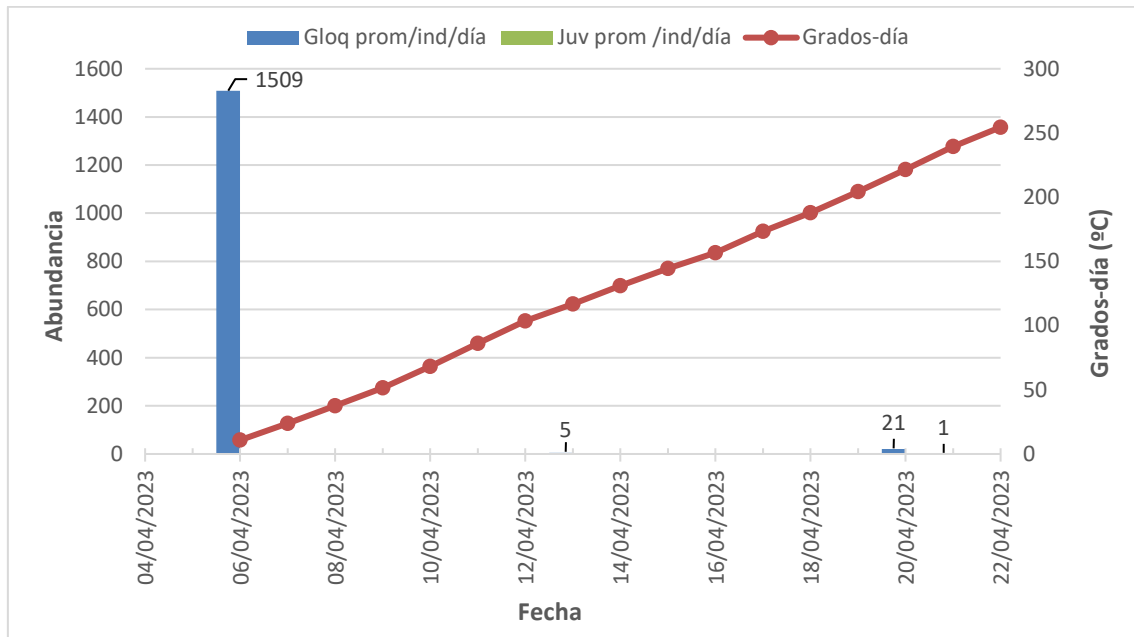
**Figura 15.** Relación entre el número de gloquidios promedio por individuo y día adheridos en las branquias de gambusias, grados-día acumulados y juveniles promedio por individuo y día.



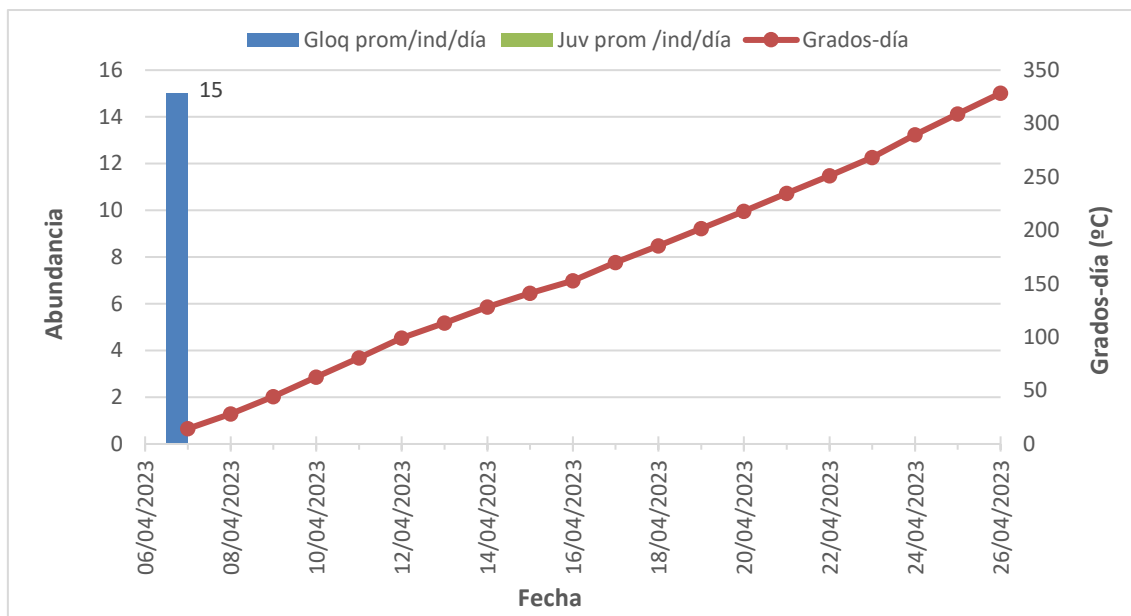
**Figura 16.** Juveniles de *P. auricularius* vivos recogidos en el acuario de gambusia.

Tanto en barbo como en gobio (Figuras 17 y 18) se puede observar que, en la primera semana tras la infestación, los individuos sacrificados presentaban gloquidios adheridos. En el caso del barbo, el número inicial de gloquidios promedio por individuo y día adheridos era bastante superior al del gobio (1.509 en el barbo frente a 15 en el gobio). En los gobios no se volvieron a

encontrar gloquidios en ningún otro ejemplar y, por el contrario, en barbo se volvió a encontrar algún individuo con muy pocos gloquidios. No se logró alcanzar los 700 grados-día de infestación con estas dos especies hospedadoras porque se registró un 100% de mortalidad con anterioridad y, en consecuencia, no se pudo comprobar si había transformación de gloquidios en juveniles. Durante el evento de mortalidad todos los individuos de ambas especies fueron revisados y se verificó que ya para la fecha no poseían gloquidios adheridos que pudieran dar lugar a juveniles (Tabla 5).



**Figura 17.** Relación entre el número de gloquidios promedio por individuo y día adheridos en las branquias de los barbos y grados-día acumulados.

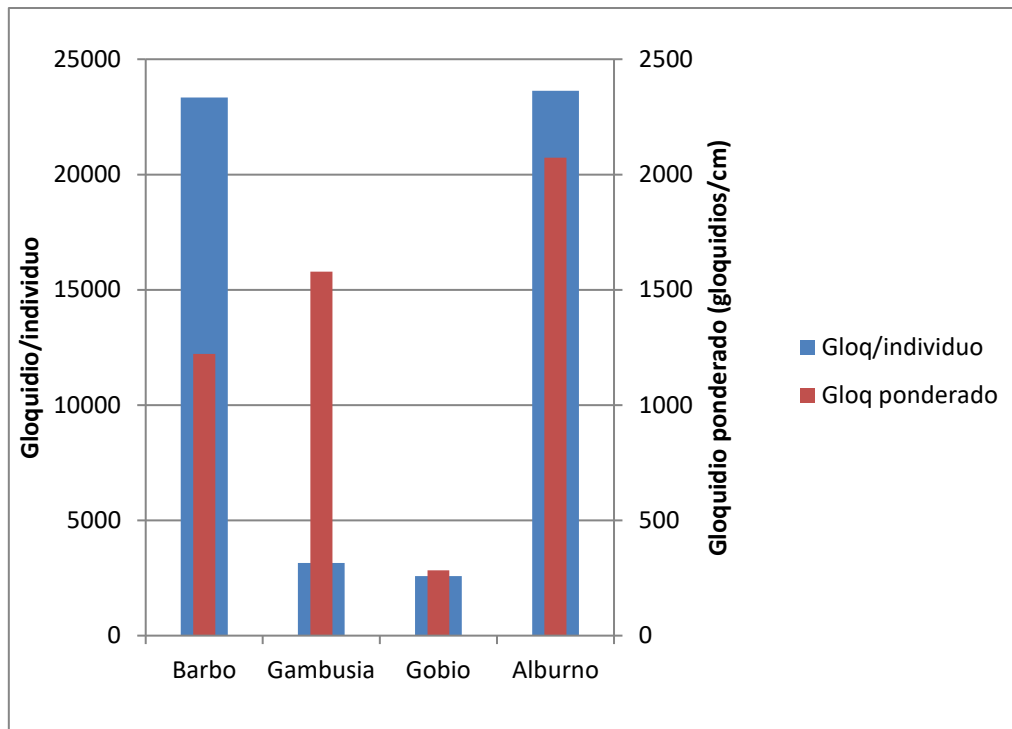


**Figura 18.** Relación entre el número de gloquidios promedio por individuo y día adheridos en las branquias de los gobios y grados-día acumulados.

### 3.5 Comparación del grado de infestación entre especies de peces

#### 3.5.1 Metodología de estimación de gloquidios en solución

Se puede observar en la Figura 19 que las especies que se infestaron con mayor intensidad fueron el alburno (23.636 gloquidios) y el barbo (23.340 gloquidios). El que menor infestación presentó fue el gobio (2.580 gloquidios). Respecto al número de gloquidios que se adhieren en función del tamaño del pez (gloquidios ponderados), se estimó que el alburno nuevamente es el que infestó en mayor proporción comparado con el resto de especies (alburno= 2.073,3 gloquidios/cm, gambusia= 1.578,5 gloquidios/cm, barbo= 1.221,9 gloquidios/cm y gobio= 282,8 gloquidios/cm).

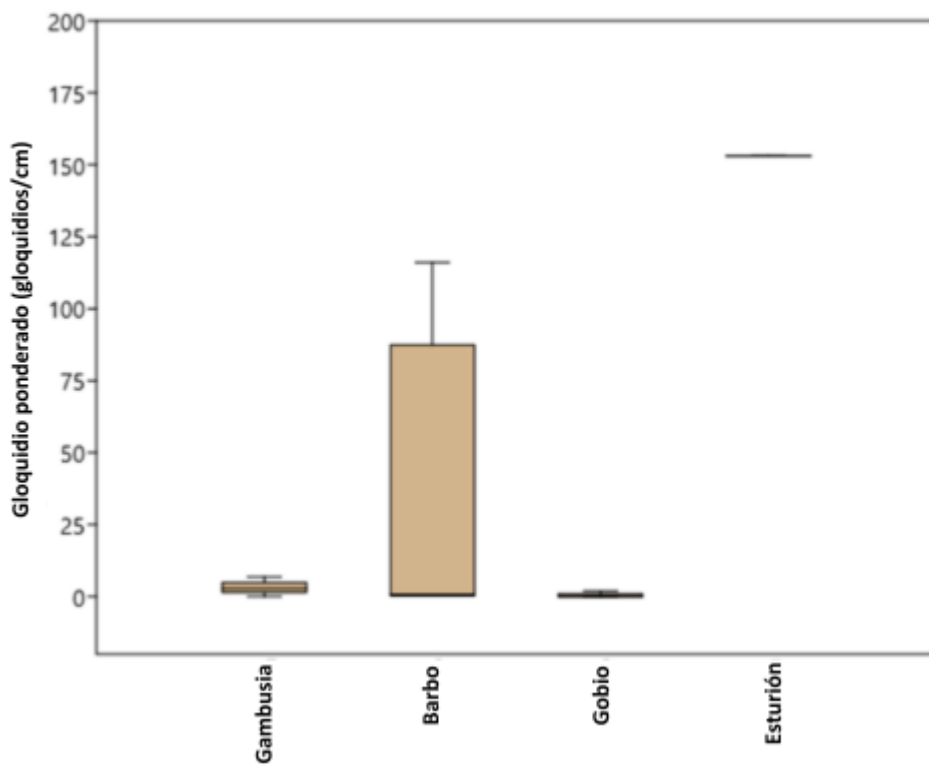


**Figura 19.** Comparación de infestación entre especies en la primera semana (Gloq/individuo: gloquidios estimados por individuo de cada especie; Gloq ponderado= gloquidios por individuo de cada especie/longitud media de la especie).

### 3.5.2 Metodología de conteo de gloquidios en branquias

Se realizó un análisis de la varianza, para determinar si la infestación de gloquidios era superior en alguna de las especies de peces. Tras realizar el test de Kruskal-Wallis se obtuvo que había diferencias estadísticamente significativas entre el número de gloquidios adheridos por especie ( $\text{Chi}^2= 7,68$ ,  $p= 0,02$ ).

La especie que poseía adheridos un mayor número de gloquidios relativos a su tamaño fue el esturión (control positivo de la infestación) (153,1 gloquidios/cm) (Figura 20). Únicamente se pudo sacrificar un individuo de esturión ya que el resto estaba destinado al programa de cría en cautividad de *P. auricularius*. La segunda especie que más gloquidios relativos a su tamaño presentó fue el barbo (Figura 21 y 25) presentando un rango amplio de datos, desde 0,1 gloquidios/cm hasta 116,1 gloquidios/cm con una media de 29,4 gloquidios/cm. Por último, las especies que presentaron menos gloquidios adheridos relativos a su tamaño fueron gambusia (Figura 22) con un valor máximo de 4,8 gloquidios/cm y gobio (Figura 23) con un único valor de 1,8 gloquidios/cm.

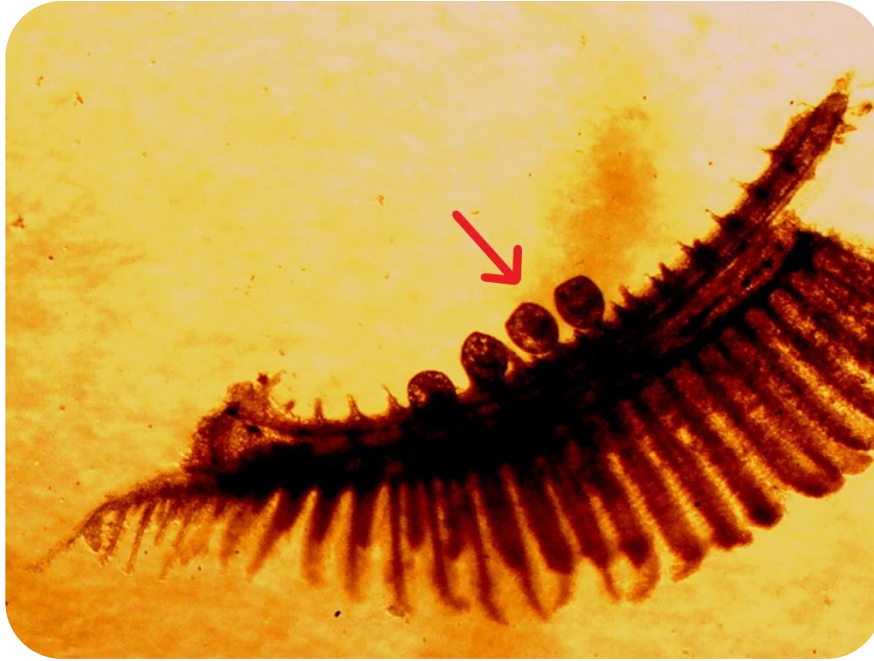


**Figura 20.** Grado de infestación de las especies estudiadas a partir del conteo de gloquidios en branquias.



**Figura 21.** Branquia de barbo infestado.

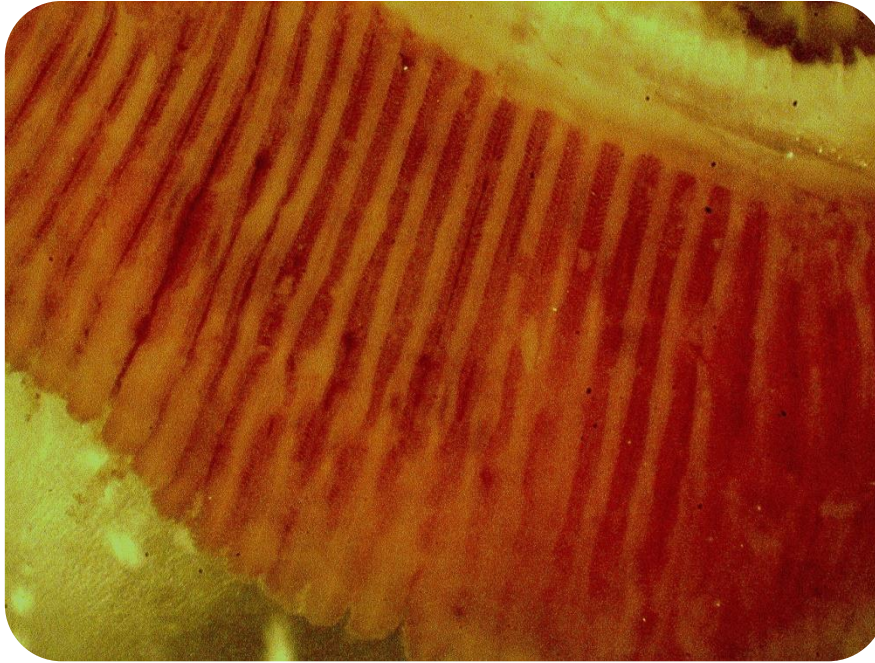




**Figura 22.** Branquia de gambusia infestada.



**Figura 23.** Branquia de gobio infestada.



**Figura 24.** Branquia de alburno sin gloquidios adheridos.



**Figura 25.** Branquias de barbo con gloquidios adheridos visibles a simple vista.

### **3.6 Tasa de transformación de gloquidios a juveniles en gambusia**

Se llevó a cabo la estimación de la transformación de gloquidios a juveniles con la única especie de la que se obtuvieron juveniles: la gambusia.

Se contaba inicialmente con el dato del número promedio de gloquidios adheridos por individuo y el número total de juveniles recogidos en el acuario provenientes de 16 individuos infestados:

**Media de gloquidios por gambusia = 7,5 gloquidios.**

**Gambusias que dan lugar a juveniles = 16 gambusias.**

**Gloquidios potenciales en el acuario =  $7,57 \times 16 = 121$  gloquidios.**

**Total real de juveniles obtenidos = 72, de los cuales 27 muertos y 45 vivos.**

Con los anteriores datos se estimó la tasa de transformación de gloquidios en juveniles para la gambusia como pez hospedador:

**% Gloquidios transformados en juveniles = 59,50%**

**% Gloquidios que dan lugar a juveniles vivos = 37,19%**

**% Gloquidios que dan lugar a juveniles muertos = 22,31%**

De 100% de gloquidios adheridos hay una transformación de casi el 60% que se recogen como juveniles y de los cuales solo el 37% permanecieron vivos.

#### **4. Discusión**

Los parámetros fisicoquímicos para el mantenimiento en cautividad de los peces infestados en este estudio, en general, se consideraron dentro de un rango apropiado para la supervivencia de los gloquidios de *P. auricularius* (adheridos en las branquias de los peces), siendo similares a los reportados previamente por Nakamura *et al.* (2022). Sin embargo, algunos de los parámetros, como es el caso de la concentración de nitrito (0,3-0,4 mg/l), se registraron por encima del rango óptimo (<0,05 mg/l), aunque habitual en condiciones de cautividad en circuito cerrado. Según Galván *et al.* (2013), en los sistemas de circuito cerrado la generación de compuestos que poseen nitrógeno como amoníaco, nitrato y nitrito se producen como consecuencia de los residuos fecales y el exceso de alimento, pudiendo tener consecuencias sobre el medio ambiente y la productividad. La alta concentración de nitrito provoca la disminución del transporte de oxígeno en sangre en peces y el amoníaco en bajas concentraciones, es capaz de quemar las branquias (Linbo, 2009; De la Cruz *et al.*, 2021).

A pesar de llevar un control exhaustivo de los parámetros fisicoquímicos, se registró una elevada mortalidad en los peces silvestres debido a problemas de adaptación a las condiciones de cautividad. El estrés generado en el procedimiento de pesca y transporte, junto con las condiciones de cautividad dio lugar a una baja adaptabilidad de los individuos de las especies de peces capturadas. Esta falta de adaptabilidad probablemente originó una inmunosupresión, siendo atacados por hongos y bacterias saprófitas, causando su muerte.

Según Aguilar *et al.* (2017), condiciones de estrés ambiental como cambios en las propiedades fisicoquímicas del agua junto con cambios bruscos de temperatura generan condiciones de inmunosupresión en los peces lo que induce a una mayor facilidad de infección por bacterias y hongos como por ejemplo *Saprolegnia* spp.

Según Sobenes *et al.* (2012) es necesario conocer las condiciones adecuadas que permitan reducir o mitigar el estrés generado durante el procedimiento de transporte y cambio de entorno para así facilitar el proceso de aclimatación de los peces. Según la experiencia adquirida en el experimento, la especie más sencilla de mantener fue el alburno, seguido de la gamba. Por el contrario, las especies más complejas de mantener fueron el gobio y el barbo por ser las especies que presentaron más problemas de infecciones por hongos y bacterias.

En el presente trabajo se llevaron a cabo dos metodologías para determinar el grado de infestación de los peces. La primera, basada en la diferencia entre las estimaciones de las concentraciones de los gloquidios en solución antes y después del proceso de infestación. Según esta metodología se estimó que el alburno fue la especie que más gloquidios poseía adheridos. El barbo fue la segunda especie con más gloquidios adheridos seguido de la gamba y finalmente el gobio. El diferente grado de infestación entre especies puede ser debido a la existencia de diferencias en los sistemas inmunológicos. Presentando algunas especies sistemas inmunes más débiles en los primeros momentos de la infestación como es el caso del alburno, y otras, en las que sistema inmune se activa de manera rápida, deshaciéndose de los gloquidios que quedan adheridos, como es el caso del gobio.

Destacar que un buen número de gloquidios probablemente se perdieron en el proceso de manipulación de las soluciones ya que pueden quedar adheridos al material de laboratorio utilizado (vasos de precipitado, redes, tubos de aireación, etc.), lo que puede estar sobreestimando la cantidad de gloquidios adheridos a los peces.

Las soluciones de infestación utilizadas en este trabajo poseían una alta concentración de gloquidios que oscilaron entre 200 mil y 1 millón con volúmenes de entre 20 l y 2 l. Douda *et*

al. (2013), utilizaron soluciones de infestación con gloquidios de *Anodonta anatina* que oscilaban entre 333 a 4.220 gloquidios en un volumen de 0,5 l por pez. Soler et al. (2019), infestaron cuatro ejemplares de lamprea con gloquidios de *P. auricularius* en soluciones de 10.800 gloquidios/l en un volumen de 40 l, y tres ejemplares de siluro con una concentración de 8.500 gloquidios/l en un volumen de 30 l. En los dos trabajos citados anteriormente se realizaron test para determinar la viabilidad de los gloquidios. En nuestro caso, al no poder realizarlos y tener un mayor número de individuos que infestar, fue compensado utilizando altas concentraciones de gloquidios asegurando así la correcta infestación de los peces.

El alburno fue la especie que se estimó que en relación a su tamaño medio tenía una mayor capacidad de ser infestada (2.073,3 gloquidios/cm). En segundo lugar, la gambusia (1.578,5 gloquidios/cm), seguido del barbo (1.221,9 gloquidios/cm) y en último lugar el gobio (282,8 gloquidios/cm). Al analizar los datos de gloquidios brutos estimados en los individuos de cada especie, es el barbo el que posee un mayor número de gloquidios adheridos por su mayor capacidad branquial, pero si se analizan los datos ponderados por tamaño, la gambusia se infesta más que el barbo pudiendo atribuirle un sistema inmune más débil, y permitiéndole así alcanzar un grado de infestación superior.

La segunda metodología llevada a cabo para determinar el grado de infestación se basa en la extracción de branquias y conteo de gloquidios adheridos de cada uno de los individuos de las diferentes especies estudiadas. Con esta metodología se obtiene un resultado directo, sin estimaciones, pero con la desventaja de tener que sacrificar a los peces. En este caso, se fueron revisando branquias de individuos de las diversas especies utilizadas y se observó que el número de gloquidios que poseían adheridos era mucho menor que el número de gloquidios adheridos estimados con la primera metodología. Por ello, se presume que gran parte de los gloquidios estimados mediante la primera metodología se pierden adheridos en los materiales de laboratorio utilizados para el proceso de infestación, o probablemente ingeridos accidentalmente por los mismos peces.

Se observaron diferencias del número de gloquidios en las branquias entre aquellas especies que se infestaron y no dieron lugar a juveniles: barbo común ( $\bar{x}$ = 29,4 gloquidios/cm) y gobio ( $\bar{x}$ = 1,8 gloquidios/cm). El primero posiblemente presenta un sistema inmunológico más débil ya que inicialmente se infestó de forma masiva pero posteriormente perdió todos los gloquidios. De la misma forma, la variabilidad de resultados obtenidos en el contaje de gloquidios en las branquias de los barbos sugiere diferentes grados de desarrollo del sistema inmune entre individuos de la misma especie; observándose que aquellos con el sistema más

débil se infestaron más y viceversa. Por el contrario, el gobio se infesta mucho menos por lo que su sistema inmunológico se puede considerar más desarrollado o potente.

El número de gloquidios por pez determinados a partir de la diferencia entre las soluciones de infestación (concentración inicial – concentración final) (primera metodología) no se considera un buen indicador del grado de infestación de los peces debido a que se sobreestima el número de gloquidios utilizados. En cambio, el número de gloquidios por branquia contados en cada pez se considera la metodología más exacta para determinar el grado de infestación (segunda metodología), con la desventaja de tener que sacrificar el pez.

En cuanto a la respuesta inmune de los peces hospedadores, el alburno a pesar de ser la especie que teóricamente (según el balance de gloquidios en solución) más gloquidios tenía adheridos, tras la revisión de sus branquias no se encontró ninguno. Por ello, se supone que los gloquidios se pudieron quedar adheridos al principio y rápidamente fueron rechazados por su sistema inmunológico. En base a estos resultados, el alburno fue de los que mostraron una mejor respuesta inmunológica de todas las especies que se probaron ante los gloquidios de *P. auricularius*. Los resultados coinciden con los obtenidos por el trabajo de López *et al.* (2005), donde se infestaron 16 especies con gloquidios de *P. auricularius* entre ellos alburnos, gambusias, barbos y gobios. En el caso del alburno, tras revisar las branquias, los autores reportan que no quedaron infestados. En cuanto a la gambusia, en el trabajo citado, se contabilizaron menos de 10 gloquidios adheridos por pez y, el número de gloquidios adheridos en barbo común fue muy variable entre ejemplares ya que había algunos que inicialmente poseían adheridos muchos gloquidios (>100) y otros una menor cantidad (<10). Con barbo nuestros resultados son semejantes, con gambusia el número de gloquidios adheridos por pez en algunos casos fue superior al del trabajo citado anteriormente. Por último, los autores reportan que en gobio no encontraron gloquidios adheridos, a diferencia del presente trabajo, donde únicamente tras la infestación, se encontraron 15 gloquidios adheridos en el primer individuo revisado. A partir de una semana tras su infestación, no se volvieron a encontrar. Tanto en barbo como en gobio, se presentó un 100% de mortalidad alrededor de los 300 grados-día por lo que no se pudo realizar la comprobación de una posible transformación de gloquidios en el caso de que estuvieran adheridos. A pesar de esto, los ejemplares muertos fueron revisados uno a uno comprobando que para la fecha no se encontraban gloquidios adheridos en las branquias.

López *et al.* (2005) no consiguieron obtener juveniles de gambusia, sin embargo, sugerían que podría ser un huésped adecuado bajo ciertas condiciones favorables dándose una producción

a gran escala y rentable de juveniles. De la misma forma, Araujo *et al.* (2000) llevaron a cabo infestaciones con gloquidios de *P. auricularius* en la cuales se llegó a la conclusión de que los datos obtenidos de la infestación de gambusia no eran determinantes, y por ello sugirieron repetir el experimento.

En este trabajo, la única especie que dio lugar a juveniles fue precisamente la gambusia. El primer juvenil se recogió el 2 de mayo cuando se acumuló una temperatura que rondaba los 470 grados-día. El pico de juveniles se obtuvo entre el 08/05/23 y 09/05/23 con 11 y 14 juveniles vivos y un valor de 610,6 grados-día. Estos resultados son similares a los obtenidos por Araujo *et al.* (2000) donde observaron que el pico de desprendimiento de los juveniles de *P. auricularius* se producía cuando acumulaban alrededor de 700 grados-día utilizando esturiones siberianos.

Se pudo comprobar que la metamorfosis de los gloquidios de *P. auricularius* no es 100% exitosa en gambusia, ya que solo un 59,5% de los gloquidios dan lugar a juveniles, similar a lo que ocurre con otras especies de náyades como *Anodonta anatina*, en la que, en condiciones experimentales, muestra una tasa de metamorfosis entre 10 y 73% con diferentes peces hospedadores (Douda *et al.*, 2013).

La diferencia existente entre las especies que se infestaron y dieron lugar a juveniles: esturión siberiano y gambusia, radica en que el primero es un hospedador más específico, al igual que otras especies del género *Acipenser*. Estas han sido descritas como buenas hospedadoras de *P. auricularius* debido a su cercanía filogenética con su hospedador original: *A. sturio*. Varios autores han descrito especies del género *Acipenser* como *A. baerii*, *A. naccari* y *A. ruthenus* como buenas especies hospedadoras funcionales para utilizar en la cría en cautividad de *P. auricularius* (Altaba & López, 2001; Araujo, Bragado, & Ramos, 2001; Araujo, Quirós, & Ramos, 2003; López *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2012; Soler *et al.*, 2019). Esto quiere decir que, independientemente de la diferencia de tamaño entre ambas especies, el esturión tiene mayor especificidad con *P. auricularius* lo que permite una mayor y mejor tasa de transformación del gloquidio en juvenil.

## 5. Conclusiones

- El mantenimiento de peces silvestres en cautividad es complejo y su supervivencia puede verse comprometida por variables ambientales.
- A pesar de las desinfecciones llevadas a cabo en los tanques de mantenimiento antes de la liberación de los peces y los controles rutinarios de los parámetros fisicoquímicos, se tuvo una mortalidad elevada debido, probablemente, a una falta de adaptación a la que se suma la infección por bacterias y hongos.
- De las dos metodologías utilizadas para determinar el grado de infestación de los peces por *P. auricularius*, se considera que la más exacta es la basada en el contaje directo de los gloquidios adheridos en branquias.
- En tres especies de peces, de las cuatro expuestas a la infestación durante el estudio, se observaron gloquidios adheridos por lo que se verificó su infestación.
- El alburno fue la única especie en la cual no se encontraron gloquidios de *P. auricularius* adheridos, posiblemente por su respuesta inmune más desarrollada contra estos.
- Especies como el alburno, el barbo y el gobio no se consideran peces hospedadores adecuados para los gloquidios de *P. auricularius* ya que estos perdieron todos los gloquidios tras la infestación o pocos días después.
- La gambusia dio lugar a juveniles, por lo que se considera pez hospedador de los gloquidios de *P. auricularius*.
- Del total de gloquidios potenciales que se estimaron que podrían producir las gambusias infestadas, la tasa de transformación de gloquidio a juvenil fue del 59,50% de los cuales un 37,19% correspondió a juveniles vivos.
- De las especies de peces infestadas, ninguna de ellas dio lugar a un gran número de juveniles de *P. auricularius* como para considerarse especies hospedadoras específicas, sin embargo, la gambusia podría ser considerada como una especie hospedadora generalista.



## 6. Recomendaciones

- Es importante llevar cabo un proceso de desinfección adecuado a la hora de preparar los tanques y acuarios para la recepción de las especies piscícolas, a la vez que una buena aclimatación de los mismos al llegar a las instalaciones de cautividad.
- Es fundamental causar el menor estrés posible a los peces capturados tras la pesca eléctrica manipulándolos con precaución y evitando que puedan recibir golpes a la hora del transporte.
- Durante el proceso de infestación es necesario ajustar las concentraciones de gloquidios para evitar mortalidades por sobreinfestación.
- Cuando se realicen revisiones de branquias en vivo con anestesia, es necesario manipular los peces con rapidez y posteriormente dejar que estos se recuperen de la anestesia en un tanque preparado con oxigenación auxiliar antes de liberarlos en el tanque definitivo.
- Para tratar de prevenir futuros brotes de hongos y bacterias en los tanques se recomienda la administración periódica de baños de sal (Ej: 1-2 gramos/l durante 1 hora), como desinfectante más económico, fácil de utilizar y sin riesgos para la salud del operario.

## 7. Bibliografía

- Abad Ibáñez, C., Ginés Llorens, E., & López Flores, R. (2020). Ictiofauna de Aragón. Evolución, estado de conservación y análisis de amenazas.
- Aguilar Rosales, N. (2017). Aislamiento de *Saprolegnia* spp, en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de diferentes estadios de desarrollo, criados en cautiverio en la Unidad Productora de Molinos-Pachitea-Huánuco 2017.
- Altaba, C. R. (1990). The last known population of the freshwater mussel *Margaritifera auricularia* (Bivalvia, Unionoida): a conservation priority. *Biological Conservation*, 52(4), 271-286.
- Altaba, C. R. (1997). Al límit de l'extinció: *Margaritifera auricularia* (Bivalvia: Unionoida). *Butlletí de la Institució Catalana d'Història Natural*, 137-148.
- Altaba, C. R., & López, M. A. (2001). Experimental demonstration of viability for the endangered giant pearl mussel *Margaritifera auricularia* (Bivalvia: Unionoida) in its natural habitat. *Bolleti de la Societat d'Historia Natural de les Balears*, 44, 15–21.

Álvarez-Halcón, R. M. (1998). La industria del nácar de " *Margaritifera auricularia*" en Aragón y la gestión ambiental. *Temas de antropología aragonesa*, (8), 113-212.

Amat-Trigo, F. (2017). Gobio – *Gobio lozanoi*. En: *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Sanz, J. J., Oliva Paterna, F. J. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/>. Fecha de consulta: 10/05/23.

Araujo, R., & Ramos, M. A. (1998). Description of the glochidium of *Margaritifera auricularia* (Spengler 1793) (Bivalvia, Unionoidea). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 353(1375), 1553-1559.

Araujo, R., & Ramos, M. A. (2000). Status and conservation of the giant European freshwater pearl mussel (*Margaritifera auricularia*) (Spengler, 1793) (Bivalvia: Unionoidea). *Biological Conservation*, 96(2), 233-239.

Araujo, R., Bragado, D., & Ramos, M. A. (2001). Identification of the river blenny, *Salaria fluviatilis*, as a host to the glochidia of *Margaritifera auricularia*. *Journal of Molluscan Studies*, 67, 128–129. <https://doi.org/10.1093/mollus/67.1.128>

Araujo, R., Quirós, M., & Ramos, M. A. (2003). Laboratory propagation and culture of juveniles of the endangered freshwater mussel *Margaritifera auricularia* (Spengler, 1793). *Journal of Conchology*, 38, 53–60.

Araujo, R. & M. Álvarez-Cobelas, (2016). Influence of Flow Diversions on Giant Freshwater Pearl Mussel Populations in the Ebro River, Spain. *Marine and Freshwater Ecosystems, Aquatic Conservation*. <https://doi.org/10.1002/aqc.2622>.

Auqué, L. F., Arenas, C., Osácar, C., Pardo, G., Sancho, C., & Urbez, M. V. (2013). Tufa sedimentation in changing hydrological conditions: the River Mesa (Spain). *Geologica Acta*, 85-102.

Bódis, E., Tóth, B. & Sousa, R. (2014). Massive mortality of invasive bivalves as a potential resource subsidy for the adjacent terrestrial food web. *Hydrobiologia* 735, 253–262.

Burleigh, R. (1983). Two radiocarbon dates for freshwater shells from Hierakonpolis: archaeological and geological interpretations. *Journal of Archaeological Science* 10,361–367.

Campo, J. G., Nakamura, K., & Ginés, E. (2021). Desaparece la principal población de *Margaritifera auricularia* en España. *Quercus*, (419), 23-29.

De la Cruz, T. P. C., Reyes, M. Á. V., & Lorenzo, P. M. (2021). Modalidad: Reporte final. Colección: Investigación Universitaria, 365.

DECRETO 129/2022, de 5 de septiembre, del Gobierno de Aragón, por el que se crea el Listado Aragonés de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y se regula el Catálogo de Especies Amenazadas de Aragón.

Douda, K., Lopes-Lima, M., Hinzmann, M., Machado, J., Varandas, S., Teixeira, A., & Sousa, R. (2013). Biotic homogenization as a threat to native affiliate species: fish introductions dilute freshwater mussel's host resources. *Diversity and Distributions*, 19(8), 933-942.

Fabra, M., Gordillo, S. & Piovano, E. L. (2012). Arqueomalacología en las costas de Ansenusa: análisis de una almeja nacarífera (*Anodontites trapesialis*) hallada en contexto funerario del sitio El Diquecito (Laguna Mar Chiquita, Córdoba). *Arqueología* 18, 257–266.

Fiske, D. & Shepherd, J. (2007). Continuity and change in Chinese freshwater Pearl culture. *Gems & Gemology* 43, 138–145.

Galván Jiménez, L. A., & Ríos Osorio, L. A. (2013). Procesos, bacterias y arqueobacterias involucrados en el ciclo biológico del nitrógeno para la eliminación de compuestos nitrogenados en ecosistemas de agua dulce, una revisión sistemática.

Geist, J. & Kuehn, R. (2005). Genetic diversity and differentiation of central European freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) populations: implications for conservation and management. *Molecular Ecology* 14, 425–439.

Gobierno de Aragón (2019), Proyecto LIFE Conservación de *Margaritifera auricularia* en Aragón. <https://www.aragon.es/-/proyecto-life-conservacion-de-margaritifera-auricularia-en-aragon>. Fecha de consulta: 03/10/23.

Grande, C., Araujo, R., & Ramos, M. A. (2001). The gonads of *Margaritifera auricularia* (Spengler, 1793) and *M. margaritifera* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Unionoidea). *Journal of Molluscan Studies*, 67(1), 27-36.

Guerrero, J., Nakamura, K., & Ginés, E. (2021). Desaparece la principal población de *Margaritifera auricularia* en España. *Quercus*, 419, 22-29.

Hu, S., Wang, Y., & Han, H. (2011). Utilization of waste freshwater mussel shell as an economic catalyst for biodiesel production. *Biomass and Bioenergy*, 35(8), 3627–3635. doi:10.1016/j.biombioe.2011.05.00.

Kiryushin, Y. F., Kiryushin, K. Y., Schmidt, A. V. & Abdulganev, M. T. (2011). Ornaments made from animal teeth in human burials at Tuzovskiye bugry-1 and their relevance to ethnic processes in the Altai, 3rd millennium BC. *Archaeology, Ethnology and Anthropology of Eurasia* 40,59–66.

*La Cuenca del Ebro - CHEbro*. (s. f.). Portal CHEbro. <https://www.chebro.es/eu/la-cuenca-del-ebro>. Fecha de consulta: 23/07/23.

Latorre, D., Almeida, D. (2019). Alburno – *Alburnus alburnus*. En: *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. López, P., Martín, J., García-Berthou, E. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.

Linbo, T. L. (2009). Zebrafish (*Danio rerio*) husbandry and colony maintenance at the Northwest Fisheries Science Center.

Lopes-Lima, M., Sousa, R., Geist, J., Aldridge, D. C., Araujo, R., Bergengren, J., ... & Zogaris, S. (2017). Conservation status of freshwater mussels in Europe: state of the art and future challenges. *Biological reviews*, 92(1), 572-607.

Lopes-Lima, M., Burlakova, L. E., Karatayev, A. Y., Mehler, K., Seddon, M., & Sousa, R. (2018). Conservation of freshwater bivalves at the global scale: diversity, threats and research needs. *Hydrobiologia*, 810, 1-14.).

López Prera, E. (2020). LIFE migratoebre (LIFE12 NAT/ES/0237): avaluació de les migracions de diverses espècies de peixos per sistemes de telemetria ultrasònica al tram final del riu Ebre (Catalunya).

López M.A. y Altaba C.R. (2005). Fish host determination for *Margaritifera auricularia* (Bivalvia: Unionoida): results and implications. *Bolletino Malacologico*, 41 (9-12): 89-98.

López, M. A., Altaba, C. R., Rouault, T., & Gisbert, E. (2007). The European sturgeon *Acipenser sturio* is a suitable host for the glochidia of the freshwater pearl mussel *Margaritifera auricularia*. *Journal of Molluscan Studies*, 73(2), 207-209.

Makhrov, A., Bespalaya, J., Bolotov, I., Vikhrev, I., Gofarov, M., Alekseeva, Y. & Zotin, A. (2014). Historical geography of pearl harvesting and current status of populations of freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* (L.) in the western part of Northern European Russia. *Hydrobiologia* 735, 149–159.

Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. (2006). <https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/inventario-especies-terrestres/inventario-nacional-de-biodiversidad/bdn-ieet-atlas-vert-peces.aspx>.

Fecha de consulta: 11/05/23

Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. (2006). [https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/conservacion-de-especies/alburnusalburnuslinnaeus1758\\_tcm30-436635.pdf](https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/conservacion-de-especies/alburnusalburnuslinnaeus1758_tcm30-436635.pdf). Fecha de consulta: 12/05/23.

Modesto, V., Ilarri, M., Souza, A. T., Lopes-Lima, M., Douda, K., Clavero, M., & Sousa, R. (2018). Fish and mussels: importance of fish for freshwater mussel conservation. *Fish and Fisheries*, 19(2), 244-259.

Moreno-Valcárcel, R., Ruiz-Navarro, A. (2017). *Gambusia* – *Gambusia holbrooki*. En: *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Sanz, J. J., García-Berthou, E. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/>

Nakamura, K., Elbaile, E., Muñoz-Yanguas, M. A., Catalá, C. & Salinas, C. (2012). Captive breeding of the endangered peal mussel *Margaritifera auricularia* (Spengler, 1793). Large scale laboratory production of juveniles. In: International Meeting on Conservation and Biology of Freshwater Bivalves. Bragança, Portugal.

Nakamura K., Cucala L., Mestre A., Mesquita-Joanes F., Elbaile E., Salinas C., Muñoz Yanguas M.A. (2018). Modelling growth in the critically endangered freshwater mussel *Margaritifera auricularia* (Spengler, 1793) in the Ebro basin.

Nakamura, K., Cañete, J., Vijuesca, D., Guillén, N., Sosa, C., Mesquita-Joanes, F., ... & Sorribas, V. (2021). Sensitivity of *Pseudunio auricularius* to metals and ammonia: first evaluation. *Hydrobiologia*, 848(12-13), 2977-2992.

Nakamura, K., Guerrero-Campo, J., Ginés, E., Mesquita-Joanes, F., Alcántara, M., & Sousa, R. (2022). Translocation as an ultimate conservation measure for the long-term survival of a critically endangered freshwater mussel. *Hydrobiologia*, 849(15), 3401-3417.

Nakamura, K., Sousa, R., & Mesquita-Joanes, F. (2023). Collapse of native freshwater mussel populations: Prospects of a long-term study. *Biological Conservation*, 279, 109931.

Ollero, A.; Sánchez, M.; Marín, J.M.; Fernández, D.; Ballarín, D.; Mora, D.; Montorio, R.; Beguería, S. y Zúñiga, M. (2004). Caracterización hidrogeomorfológica del Río Gállego. En: Peña, J.L.; Longares, L.A. y Sánchez, M. Geografía Física de Aragón. Aspectos generales y temáticos. Zaragoza: Universidad de Zaragoza e Institución Fernando el Católico, p. 117-129.

Orden TEC/1078/2018, de 28 de septiembre, por la que se declara la situación crítica de *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis*, *Lanius minor*, *Margaritifera auricularia*, *Marmaronetta angustirostris*, *Mustela lutreola*, *Pinna nobilis* y *Tetrao urogallus cantabricus* en España, y se declaran de interés general las obras y proyectos encaminados a la recuperación de dichos taxones. Boletín Oficial del Estado, 251, de 17 de octubre de 2018.

<https://www.boe.es/eli/es/o/2018/09/28/tec1078>.

Pérez Ramírez, E. J., & Ballarín Ferrer, D. (director) (2018). Análisis de riesgos naturales: Riesgos de inundación en la cuenca del río Huerva.

Prié, V., Soler, J., Araujo, R., Cucherat, X., Philippe, L., Patry, N., ... & Wantzen, K. M. (2018). Challenging exploration of troubled waters: a decade of surveys of the giant freshwater pearl mussel *Margaritifera auricularia* in Europe. *Hydrobiologia*, 810, 157-175.

Reis, J., Collares-Pereira, M. J., & Araujo, R. (2014). Host specificity and metamorphosis of the glochidium of the freshwater mussel *Unio tumidiformis* (Bivalvia: Unionidae). *Folia parasitologica*, 61(1), 81.

Salvador, A. (2017). Barbo de Graells – *Luciobarbus graellsii*. En: *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Sanz, J. J., Elvira, B. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/>. Fecha de consulta: 09/05/23.

San Miguel, E. S., Monserrat, S., Fernández, C., Amaro, R., Hermida, M., Ondina, P. & Altaba, C. R. (2004). Growth models and longevity of freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*) in Spain. *Canadian Journal of Zoology* 82, 1370–1379.

Sobenes, C., García, A., Habit, E., & Link, O. (2012). Mantención de peces nativos dulceacuícolas de Chile en cautiverio: un aporte a su conservación ex situ. *Boletín de Biodiversidad de Chile*, (7), 27-41.

Soler, J., Boisneau, C., Jugé, P., Richard, N., Guerez, Y., Morisseau, L., ... & Araujo, R. (2019). An unexpected host for the endangered giant freshwater pearl mussel *Margaritifera auricularia*

(Spengler, 1793) as a conservation tool. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 29(10), 1758-1770.

Sousa, R., Dias, S., Freitas, V. & Antunes, C. (2008). Subtidal macrozoobenthic assemblages along the River Minho estuarine gradient (north-west Iberian Peninsula). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 18, 1063–1077.

Strack, E. (2015). European freshwater pearls: part 1 Russia. *The Journal of Gemmology* 34, 580–592.

Taeubert, J.-E., El-Nobi, G. & Geist, J. (2014). Effects of water temperature on the larval parasitic stage of the thick-shelled river mussel (*Unio crassus*). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 24, 231–237.

Treasurer, J. W., Hastie, L. C., Hunter, D., Duncan, F., & Treasurer, C. M. (2006). Effects of (*Margaritifera margaritifera*) glochidial infection on performance of tank-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 256(1-4), 74-79.

UICN. (2022). Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. Versión 2022-2. <https://www.iucnredlist.org>. Fecha de consulta: 20/07/23

Zapater, M., Araujo, R., Álvarez, R.M., Nakamura, K. (2006). Las almejas de agua dulce en Aragón: *Margaritifera auricularia* y otros bivalvos. Consejo de Protección de la Naturaleza de Aragón.  
<https://bibliotecavirtual.aragon.es/repos/es/consulta/registro.do?control=ARA20110001230>.  
Fecha de consulta: 13/05/23.

Zieritz, A., Sousa, R., Aldridge, D. C., Douda, K., Esteves, E., Ferreira-Rodríguez, N., ... & Vaz, A. S. (2022). A global synthesis of ecosystem services provided and disrupted by freshwater bivalve molluscs. *Biological Reviews*, 97(5), 1967-1998.