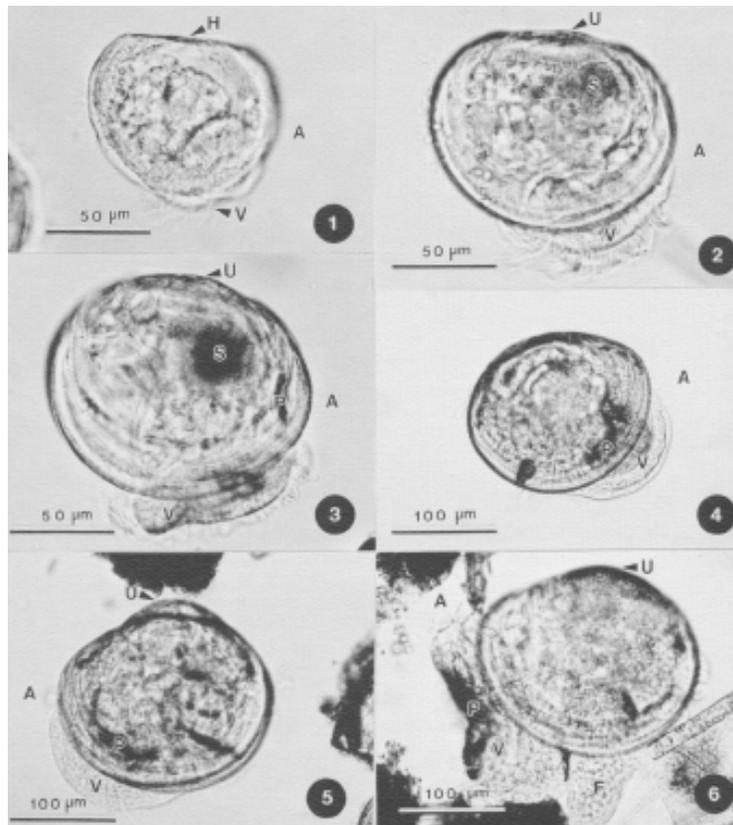


MUESTREO Y DETERMINACIÓN DE LARVAS DE MEJILLÓN CEBRA



Octubre 2006

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO
2. MATERIAL NECESARIO
3. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA
4. PROCEDIMIENTO OPERATIVO
5. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN
6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El mejillón cebra es un molusco bivalvo de aproximadamente 3 cm. de tamaño en su estado adulto y con un aspecto similar a los mejillones marinos. Las hembras se reproducen en el segundo ciclo de vida; la fecundación es externa, y cada puesta es de unos 40.000 huevos; unos días después de la fertilización nace una larva planctónica que el primer mes se convertirá en juvenil. Puede producir un millón de descendientes en un año. Es altamente tolerante a variaciones de salinidad y temperatura, incluso resiste varios días fuera del agua, lo cual permite su dispersión, pudiendo ocasionar un grave riesgo ambiental.

El estudio visual es la técnica más utilizada para la identificación y cuantificación de larvas de bivalvos. La identificación se realiza con microscopía simple para observar sus características morfológicas y mediante microscopía de polarización para reconocer la peculiaridad óptica que le confiere el acumulo de calcita en sus valvas. En ambos casos, a pocos aumentos (x100).

El uso de pruebas moleculares es útil para la identificación en algún caso, aunque inadecuado para recuento.

La cuantificación se lleva a cabo tomando muestras de agua con una red de plancton de 50 μm de tamaño de malla (figura 1); estas larvas retenidas se separan de la red mediante la apertura de la válvula que se encuentra en el cilindro de muestreo (figura 2). El agua resultante es centrifugada y su sedimento llevado al microscopio y estudiado cuantitativamente, mediante cámara de contaje (figura 3). El resultado es el número de larvas contenidas en la muestra (usualmente 50 litros).



2. MATERIAL NECESARIO

- Cubo de plástico de capacidad 5L ó 10 L. Se utiliza un cubo diferente en cada estación de muestreo. Al llegar al laboratorio se impregna cada uno de los cubos en una solución de lejía al 50% y se le deja actuar 12 horas antes de aclararlos.
- Red de plancton de 250 mm de diámetro, 400 cm de tamaño y tamaño de malla de 50 μm con cilindro de muestra.
- Cámara de contaje 0.0025 mm^2 .
- Cubres de 22 x 22 mm.
- Botes de plástico estériles de 100 mL de capacidad conteniendo 0.3 mL de etanol para recolectar el agua filtrada.

- Termómetro digital portátil.
- Conductivímetro portátil.
- Microscopio de luz polarizada.
- Microscopio simple.
- Tubos de ensayo.
- Centrifugadora.
- Agua destilada.

3. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La muestra tiene que ser analizada antes de las 24 horas de haber sido recogida.

Mientras tanto, se almacenará la muestra a temperatura no superior a 20 ° C y en oscuridad.

4. PROCEDIMIENTO OPERATORIO

Consta de tres pasos: recolección de la muestra, concentración en tubos de ensayo y estudio del sedimento.

4.1. Recolección de la muestra.

4.1.1. Tomar 50 litros de agua con cubo, preferiblemente del centro del río y pasarlos por la red de plancton. Un último cubo con agua limpia, se vierte por fuera de la red, de modo que arrastre las larvas que se hayan quedado adheridas en las paredes interiores.

4.1.2. Recoger el concentrado en un bote de 100 mL y guardarlo en nevera.



4.2. Concentración en tubos de ensayo

- 4.2.1. Verter aproximadamente 10 mL de muestra en un tubo de ensayo.
- 4.2.2. Centrifugar 5 minutos a 3500 r.p.m
- 4.2.3. Retirar el sobrenadante.
- 4.2.4. Volver a verter muestra hasta aproximadamente 10 mL de volumen.
- 4.2.5. Centrifugar a 3500 r.p.m.
- 4.2.6. Repetir los pasos 4.2.3, 4.2.4 y 4.2.5 hasta agotar la muestra.
- 4.2.7. Desechar el sobrenadante.

4.3. Estudio del sedimento

- 4.3.1. Retirar el sedimento y colocarlo sobre la cámara de contaje; protegerlo con el cubre y llevarlo al microscopio. Realizar el recuento contabilizando todos los individuos de mejillón cebra que se hallen en la superficie destinada al recuento de la cámara de contaje. Anotar en el cuaderno de laboratorio el número de individuos reconocido así como la fase larvaria en la que se encuentran.

Al terminar el procedimiento operativo, se retira todo el material desechable al contenedor de residuos. **El material reutilizable se desinfecta con lejía, o en su caso, se pasa por el autoclave.**

4.3.2. En el cuaderno de laboratorio se anotará, además del número de individuos y fase larvaria, el volumen de muestra filtrado si éste ha sido distinto a 50 litros y cualquier incidente susceptible de influir en los resultados.

5. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN

5.1.1. **Identificación:** se considera larva del mejillón cebra a las estructuras que a la luz polarizada del microscopio muestran la cruz de Malta en su superficie, ya que en el Ebro no se han detectado otras especies. Comprobar su morfología con microscopía simple, para poder hacer la clasificación de la fase larvaria así como hacer una identificación de su morfología.

5.1.2. **Cuantificación:** es la suma de todos los individuos para una misma estación de muestreo.

6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Se expresará el número de individuos identificados por litro (Nº/ L).