



Proyectos de investigación en parques nacionales: 2009-2012

## ESTUDIO DE LOS RIESGOS SANITARIOS PARA LAS AVES ACUÁTICAS ASOCIADOS CON EL ABASTECIMIENTO DE LAS TABLAS DE DAIMIEL Y OTROS HUMEDALES MANCHEGOS CON AGUAS RESIDUALES URBANAS TRATADAS

IBONE ANZA<sup>1</sup>, DOLORS VIDAL<sup>1,2</sup>, SERGIO SÁNCHEZ-PRIETO<sup>1,3</sup>,  
SANDRA DÍAZ-SÁNCHEZ<sup>1,4</sup>, CRISTINA MARTÍNEZ-RUIZ<sup>1</sup>, CELIA LAGUNA<sup>5</sup>,  
ÁLVARO CHICOTE<sup>5</sup>, RAFAEL U. GOSÁLVEZ<sup>5</sup>, MÁXIMO FLORÍN<sup>5</sup> Y RAFAEL MATEO<sup>1\*</sup>

### RESUMEN

La escasez de agua en la cuenca alta del río Guadiana ha hecho que se valore el uso de las aguas residuales depuradas para la conservación de la biodiversidad de humedales como Las Tablas de Daimiel. En este trabajo hemos abordado el estudio de: (1) el riesgo que suponen las aguas residuales para aumentar la presencia de enteropatógenos en el medio y en las aves; (2) las condiciones ambientales que favorecen la presencia de *Clostridium botulinum* en el medio y la aparición de brotes de botulismo, incluyendo estudios experimentales y de campo; y (3) el papel de los invertebrados acuáticos, los dípteros necrófagos y las propias aves en la expansión de los brotes de botulismo. La presencia de *Escherichia coli* patógena aviar (APEC), *Clostridium perfringens* tipo A y *C. botulinum* tipo C/D ha sido generalmente mayor en muestras de agua, sedimento y heces de aves de las lagunas que reciben directamente aguas residuales (Navaseca y Veguilla) respecto a las Tablas de Daimiel. La aparición de un brote de botulismo en Navaseca en el verano de 2010 estuvo asociada con una bajada del potencial redox, clorofila y sulfatos en el agua, de la DBO<sub>5</sub> en sedimento y con un aumento del carbono inorgánico en el medio. Las condiciones de anoxia generadas, posiblemente asociadas con una proliferación de *Lemna* en la laguna, favorecieron la proliferación de *C. botulinum*. En muestreos previos a brotes de botulismo la mayor presencia de *C. botulinum* fue detectada en heces de aves, para después ser detectada en muestras de sedimento, agua, gasterópodos acuáticos, invertebrados acuáticos, moscas necrófagas y sus larvas. La muerte por cualquier motivo (por ejemplo infecciones por enterobacterias) de aves acuáticas con *C. botulinum* en su tracto digestivo actuaría como detonante de los brotes al servir el cadáver como medio de crecimiento de la bacteria y proliferación de larvas de mosca acumuladoras de toxina que pueden ser ingeridas por otras aves. Además se ha comprobado experimentalmente que las moscas son capaces de transportar *C. botulinum* a cadáveres exentos previamente de la bacteria, dando lugar así a larvas tóxicas que pueden iniciar el ciclo cadáver-larva-ave que magnifica los brotes de botulismo. Las aves afectadas por botulismo

<sup>1</sup> Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC), CSIC-UCLM-JCCM, Ciudad Real, Spain

<sup>2</sup> Departamento de Ciencias Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, España.

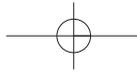
<sup>3</sup> Laboratorio de Enterobacterias, Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

<sup>4</sup> Department of Food Science and Technology, University of Tennessee, Knoxville, TN, USA.

<sup>5</sup> Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal y Genética, Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, España.

\* Contacto: Rafael.Mateo@uclm.es





ANZA, I. Y COLS.

«Riesgos para las aves acuáticas asociados con el abastecimiento con aguas residuales»

pueden excretar *C. botulinum* más de dos semanas después del ingreso en los centros de recuperación para su tratamiento, por lo que el papel de las aves en la dispersión de la bacteria durante los brotes puede ser importante. En conclusión, los humedales abastecidos con aguas residuales podrían actuar como trampas ecológicas para las aves acuáticas por el riesgo de exposición a enteropatógenos y brotes de botulismo.

**Palabras clave:** *Clostridium botulinum* tipo C/D, humedales, aves acuáticas, mortalidad, aguas residuales.

## SUMMARY

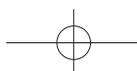
The scarcity of water in the upper Guadiana River has led to value the treated wastewater for the conservation of biodiversity in wetlands such as Tablas de Daimiel. In this work we have studied: (1) the risk posed by the wastewater to increase the presence of enteric pathogens in the environment and in birds, (2) environmental conditions that have favoured the presence of *Clostridium botulinum* in the environment and in the onset of botulism outbreaks, including experimental and field studies, and (3) the role of aquatic invertebrates, carrion flies and the birds themselves in expanding the outbreaks. The presence of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), *Clostridium perfringens* type A and *C. botulinum* type C/D has been generally higher in samples of water, sediment and bird feces collected in wetlands receiving wastewater (Navaseca and Veguilla) than in Tablas de Daimiel. The occurrence of an outbreak of botulism in Navaseca in 2010 was associated with a lowering of the redox potential, chlorophyll and sulfates in water, BOD<sub>5</sub> in sediment and with an increase of inorganic carbon in the medium. The anoxic conditions generated, possibly associated with a proliferation of *Lemna* in the lagoon, favoured the growth of *C. botulinum*. Samplings previous to botulism outbreaks revealed the highest presence of *C. botulinum* in feces of birds, being later detected in sediment, water, aquatic gastropods aquatic invertebrates, carrion flies and their larvae. Death from any cause (eg Enterobacteriaceae infections) of waterbirds with *C. botulinum* in their intestinal tract acts as a trigger for outbreaks because the carcass offers a perfect media for its growth and subsequent proliferation of maggots accumulating toxin that can be ingested by other birds. Furthermore it has been shown experimentally that the flies are capable of carrying *C. botulinum* to previously exempt carcasses, thus resulting larvae can initiate the cycle carcass-maggot-bird that magnifies the botulism outbreaks. Birds affected by botulism may excrete *C. botulinum* more than two weeks after admission to the wildlife rehabilitation centres for treatment, so the role of birds in the spread of bacteria during outbreaks may be important. In conclusion, wetlands supplied with wastewater could act as ecological traps for waterfowl because of the risk of exposure to enteropathogens and botulism outbreaks.

**Key words:** *Clostridium botulinum* type C/D, wetlands, waterbirds, mortality, wastewater.

## INTRODUCCIÓN

La escasez de agua es un problema en casi toda España, pero si hay una zona en la que los efectos se han hecho notar en las últimas décadas con todas sus consecuencias, esa es la conocida paradójicamente como Mancha Húmeda (LLAMAS, 1988; MARTÍNEZ-SANTOS *et al.*, 2008). Los tra-

bajos de encauzamiento del río Guadiana en su cuenca alta y todo el regadío instaurado en la llanura manchega, antes dedicada a la agricultura de secano, han terminado por dejar al borde de la desaparición un ecosistema único como es el que abarca el Parque Nacional de Las Tablas de Daimiel (LLAMAS, 1988; ÁLVAREZ COBELAS & CIRUJANO, 1996; SÁNCHEZ-CARRILLO *et al.*,



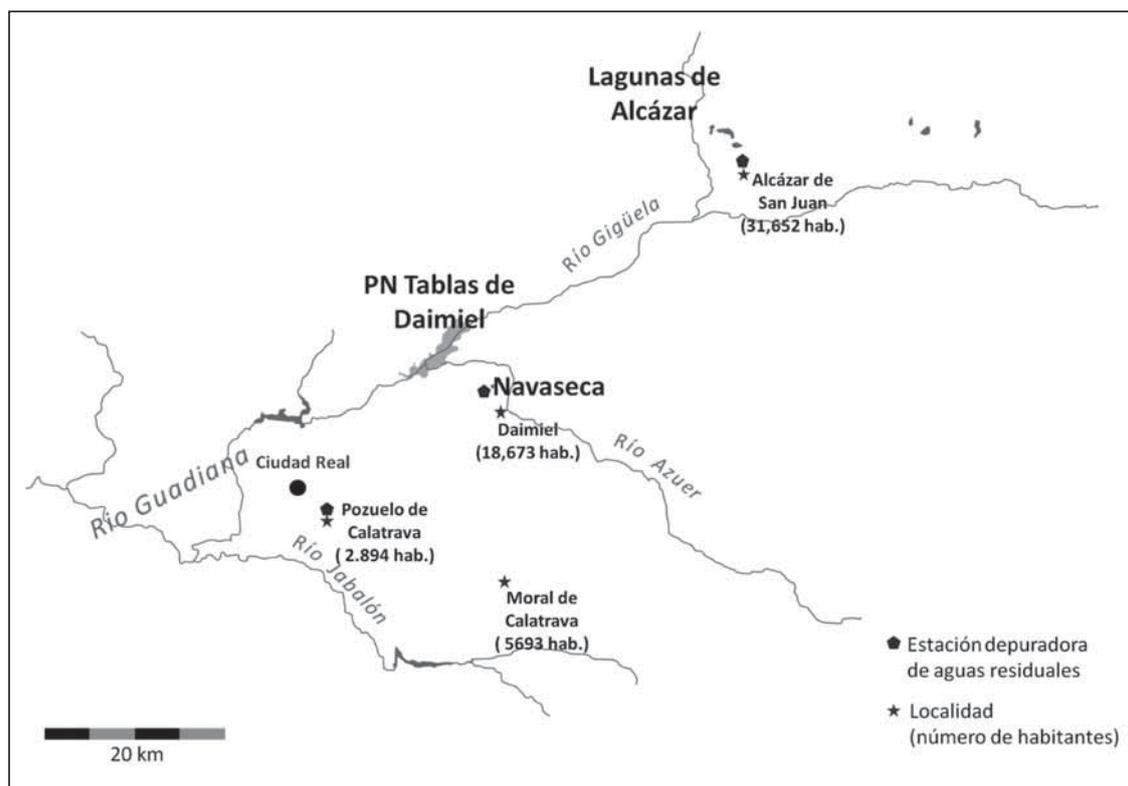


*Proyectos de investigación en parques nacionales: 2009-2012*

2010). Las pocas aguas que corren por los ríos de La Mancha en buena parte del año no son más que las aguas residuales de poblaciones de mediano tamaño (Figura 1). Estas poblaciones cuentan con estaciones depuradoras de aguas residuales, pero en la mayoría de los casos resultan insuficientes y se ven desbordadas en épocas de lluvias ya que no existe una adecuada separación de las aguas pluviales y las residuales como sería recomendable (HEADLEY & TANNER, 2012). A todo esto hay que sumar que muchas poblaciones ni siquiera tienen un río cerca en el que verter las aguas una vez que han sido tratadas, de forma que se han usado humedales naturales como lagunas endorreicas, normalmente salinas, para recoger estas aguas (CIRUJANO & MEDINA, 2002). Esto, evidentemente, altera de forma importante la ecología de las lagunas, ya que aun en el caso de que el agua vertida estu-

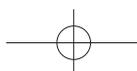
viere totalmente depurada modificaría la salinidad del humedal y de esta forma toda su ecología (FLORÍN & MONTES, 1999). En otros casos las aguas tratadas han sido utilizadas para crear nuevos humedales, pero raramente han sido estos diseñados para afrontar con garantías un aporte continuado de nutrientes y contaminantes (WORRALL *et al.*, 1997; CIRUJANO & MEDINA, 2002; MITSCH & DAY, 2004).

En esta situación creciente de escasez de agua, incluso el agua residual se puede ver revalorizada para diversos usos como, por ejemplo, la conservación de la biodiversidad (CIRUJANO & MEDINA, 2002; NAVARRO *et al.*, 2011). No obstante, las aguas residuales pueden ser un arma de doble filo al producir generalmente un aporte de nutrientes y contaminantes al medio receptor, y ser una fuente potencial de organis-



**Figura 1.** Mapa de la zona de estudio, incluida en la Mancha Húmeda de la Provincia de Ciudad Real.

**Figure 1.** Map of the study area which is included in the Mancha Húmeda of the Province of Ciudad Real. Wastewater treatment plants (pentagons) and their corresponding towns (with number of inhabitants) (stars) are shown in the map.



mos patógenos (OKAFOR, 2011). Entre los microorganismos presentes en las aguas residuales abundan por razones obvias los enteropatógenos, algunos de ellos capaces de afectar negativamente a las aves acuáticas (FRIEND & FRANSON, 1999; BENSKIN *et al.*, 2009). A todo esto se suma que el botulismo, una de las principales causas de mortalidad en las aves acuáticas (ROCKE, 2006), aparece frecuentemente en humedales que se abastecen de aguas residuales tratadas (VIDAL *et al.*, 2009). El botulismo es una intoxicación causada por la ingestión de una potente neurotoxina producida por *Clostridium botulinum* que causa parálisis flácida y la muerte de los animales por parada respiratoria. *C. botulinum* no se considera como abiertamente patógeno, sino que actúa como una bacteria que utiliza una neurotoxina para matar a fin de crear un medio apropiado para su mantenimiento (PECK, 2009). La mortalidad exponencial observada durante los brotes de botulismo aviar se ha asociado con el ciclo de vida de las moscas necrófagas y sus larvas. Estas últimas actúan como portadoras de neurotoxina desde los cadáveres en descomposición en los que crece la bacteria a las aves vivas que se alimentan de dichas larvas (EVELSIZER *et al.*, 2010). Entre 1978 y 2008, 13 brotes de botulismo aviar fueron registrados en los humedales de La Mancha Húmeda. Estos brotes causaron la muerte de unas 20.000 aves de más de 50 especies, algunas de ellas en peligro de extinción como la malvasía cabeciblanca (*Oxyura leucocephala*). En estudios previos se ha visto una asociación significativa entre el número de aves muertas cada año por botulismo y la temperatura media en julio (>26 °C). *C. botulinum* no es una bacteria muy frecuente en el sedimento de los humedales manchegos como indica el dato de presencia en solo el 5,8% de 207 muestras recogidas entre 2005 y 2008, principalmente en puntos con menor salinidad y mayor carga de materia orgánica (VIDAL *et al.*, 2013). No obstante, esta prevalencia parece ser suficiente para desencadenar brotes de botulismo cuando aparece un detonante como puede ser una mortalidad causada por otro patógeno, tóxico o agente físico (FRIEND & FRANSON, 1999; SOOS & WOBESER, 2006). De aquí la importancia que pueden tener los enteropatógenos

presentes en las aguas residuales al ser capaces de causar enfermedades en las aves y así generar un brote.

En este trabajo hemos abordado el estudio de: (1) el riesgo que suponen las aguas residuales para aumentar la presencia de enteropatógenos en el medio y en las aves; (2) las condiciones ambientales que favorecen la presencia de *C. botulinum* en el medio y la aparición de brotes, incluyendo estudios experimentales y de campo; y (3) el papel de invertebrados acuáticos, los dípteros necrófagos y las propias aves en la expansión de los brotes.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Caracterización de los serotipos de *C. botulinum*

Se ha llevado a cabo el aislamiento de cepas de 49 aves muertas en brotes de botulismo ocurridos entre 2010 y 2011 en las lagunas manchegas de Navaseca, Pozuelo de Calatrava, Moral de Calatrava y Mocejón (Figura 1). Para ello se usó una separación magnética utilizando anticuerpos monoclonales para *C. botulinum* (H. Skarin, en preparación). Sobre las cepas aisladas se hizo primero una confirmación mediante una qPCR (PCR a tiempo real cuantitativa) que engloba a *C. botulinum* tipo C y el mosaico tipo C/D (LINDBERG *et al.*, 2010). Una vez comprobado que eran positivas, se procedió a genotiparlas mediante la técnica de electroforesis en campo pulsado (PFGE) (SKARIN *et al.*, 2010) y se realizó la comparativa genética entre cepas españolas y suecas usando el programa BioNumerics 5.5 (Applied Maths). Este trabajo se realizó en el Instituto Nacional de Veterinaria de Uppsala (Suecia) durante una estancia de investigación. Posteriormente en el IREC se analizaron 30 muestras de aves acuáticas mediante una PCR convencional que distingue entre los toxinotipos C, D y sus mosaicos C/D (TAKEDA *et al.*, 2005) y comparando los resultados con una qPCR usada en anteriores estudios (SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2008; VIDAL *et al.*, 2011).

*Proyectos de investigación en parques nacionales: 2009-2012*

De forma paralela se ha llevado a cabo el diagnóstico de botulismo mediante el bioensayo en ratones con plasma de aves recogidas en brotes acontecidos en el verano del 2010 en las lagunas de Navaseca y Pozuelo de Calatrava. Cuando la muestra de plasma resultó suficiente se testó el bioensayo con antitoxinas C y D. Cuando fue escaso se testó únicamente con una antitoxina hexavalente (FACH *et al.*, 1996). Este trabajo se inició durante una estancia de investigación en la Unidad de Bacterias Anaerobias del Centro del Instituto Pasteur de París (Francia). Posteriormente, este bioensayo fue realizado en el IREC con aves de los brotes ocurridos en las lagunas de Navaseca y Pozuelo de Calatrava en 2012 usando la antitoxina C (Centers for Disease Control, Atlanta, GA; Cat No.BS0611, Lot 05-0100), ya que se ha visto que es el más frecuente en la intoxicaciones en aves acuáticas.

#### **Estudio de campo de los factores asociados con la presencia de enteropatógenos y *C. botulinum***

La presencia de bacterias enteropatógenas (*Salmonella* spp., *Escherichia coli* patogénica aviar (APEC) y *Clostridium perfringens* tipo A) y *C. botulinum* tipo C/D ha sido estudiada junto con diversas variables ambientales en 24 puntos distribuidos entre las Tablas de Daimiel (12 puntos), la laguna de Navaseca (6 puntos), que recoge las aguas residuales tratadas de Daimiel, y la laguna de La Veguilla (6 puntos), que recibe de forma intermitente las aguas residuales tratadas de Alcázar de San Juan (Figura 1). Los muestreos han sido llevados a cabo entre abril de 2010 y febrero de 2011, con una periodicidad mensual en verano y trimestral en las otras estaciones. Adicionalmente se llevó a cabo un muestreo durante un brote ocurrido entre finales de julio y principios de agosto de 2010 en la laguna de Navaseca. En cada punto y momento fue recogida una muestra de sedimento hasta 5 cm de profundidad (n=176) y agua (superficial e intersticial tomada con sondas de porcelana y tubos de vacío) (n=164), dípteros necrófagos adultos con trampas cebadas con carne (n=149) e invertebrados acuáticos con una malla de 1 mm de luz

(n=103). Además en cada humedal se recogieron heces de aves en cada muestreo, principalmente de anátidas, rállidos y láridos (n=655).

En cada muestreo se anotó la altura del agua, y en las muestras de agua superficial se midió mediante una sonda multiparamétrica Hydrolab DS5X la temperatura, conductividad, pH, potencial redox (Eh), clorofila  $\alpha$ , turbidez y oxígeno disuelto. Los sólidos volátiles y totales, demanda biológica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>), carbono inorgánico, orgánico y total, iones amonio, nitrito, nitrato, fosfato, sulfato y cloruro, calcio, sodio, potasio, magnesio y alcalinidad total y la debida a carbonatos en agua superficial fueron medidos mediante diferentes métodos estandarizados en laboratorio (EATON & FRANSON, 2005). En el agua intersticial se midieron los parámetros químicos antes descritos (excepto sólidos y alcalinidad), mientras que en el sedimento se midió la materia orgánica, humedad, conductividad, pH y DBO<sub>5</sub>.

En las muestras de agua, sedimento y heces se llevó a cabo la detección de *E. coli* APEC mediante cultivo en agar McConkey y caracterización de genes de virulencia por PCR (DÍAZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2012), de *Salmonella* spp. mediante cultivo e identificación bioquímica aplicando la normativa ISO para tejidos y alimentos (UNE-EN ISO 6579:2002) y de *C. perfringens* tipo A con un cultivo en agar TSCA y caracterización del toxinotipo mediante PCR (VAN ASTEN *et al.*, 2009). La detección de *C. botulinum* tipo C/D en agua, sedimento, heces e invertebrados se hizo mediante cultivo de enriquecimiento seguido de qPCR (VIDAL *et al.*, 2011).

#### **Estudio experimental de factores limitantes para *C. botulinum***

El estudio de factores predisponentes para la presencia de *C. botulinum* en el campo fue ampliado con cuatro estudios experimentales para valorar el efecto inhibitorio de la salinidad y la competencia de otras bacterias anaerobias. Estos estudios tienen una doble vertiente, al valorar

efectos sobre la presencia de la bacteria en el medio natural y también en su posterior detección en el laboratorio. En un primer estudio se valoró el efecto que podría tener la salinidad en la detección de la bacteria, para lo cual *C. botulinum* fue cultivado en medios con salinidades entre 0 y 10 mg de NaCl/ml que serían las que tendríamos en el caso de inocular sedimentos de humedales manchegos en el caldo de cultivo (1 g de sedimento: 10 ml de caldo). Después del cultivo la determinación se llevó a cabo mediante qPCR como se ha citado antes. En un segundo experimento la concentración de sal sería 10 veces superior (0-100), con lo que valoraríamos el efecto de la salinidad en condiciones similares a cuando la bacteria se desarrolla en el sedimento del humedal. En un tercer experimento se valoró el efecto que tiene de cara a la detección de *C. botulinum* el calentamiento de las muestras de sedimento a 70 °C tal y como recomiendan algunos autores (LINDSTRÖM & KORKEALA, 2006) y como se realiza en laboratorios de referencia sobre muestras clínicas. De esta forma se eliminarían bacterias anaerobias competidoras y así las esporas termorresistentes de *C. botulinum* podrían crecer más fácilmente en el cultivo. Para valorar este efecto se inocularon con *C. botulinum* sedimentos antes y después de ser tratados con calor y sin dicho tratamiento. Por último, se estudió el efecto de la competencia de la comunidad microbiana presente en un sedimento sobre el desarrollo de *C. botulinum*. Para esto se procedió a la esterilización de muestras de sedimento que después fueron inoculadas con esporas de *C. botulinum*, comparando el crecimiento con sedimentos no esterilizados.

#### **Papel de invertebrados y aves en la expansión de brotes de botulismo**

El papel de los invertebrados acuáticos en la aparición y expansión de brotes ha sido estudiado mediante el análisis de la presencia de *C. botulinum* en 126 muestras compuestas («pooles») de larvas de quironómidos (n=16), heterópteros acuáticos (notonéctidos y corixidos) (n=27), larvas de efímeras (n=3), crustáceos (cladóceros, co-

pépodos y ostrácodos) (n=17), gasterópodos acuáticos (n=37) y otros (n=26). Estas muestras fueron tomadas entre junio y octubre de 2011 en humedales manchegos (lagunas de Navaseca, Moral de Calatrava y Pozuelo de Calatrava) en momentos en que aparecieron brotes de botulismo y en las Tablas de Daimiel en las mismas fechas, como zona exenta de brotes (control). Además fueron tomadas muestras de agua (n=70), sedimento (n=76) y raíces de plantas (n=12) para detectar la presencia en el medio en que estos invertebrados habitan.

En cuanto a los dípteros necrófagos, el estudio se ha llevado a cabo mediante el muestreo de formas adultas en momento de brotes con trampas cebadas con carne (n=34) y de formas larvianas sobre los cadáveres de aves acuáticas (n=7). El papel de los dípteros necrófagos en la dispersión de *C. botulinum* entre cadáveres también ha sido estudiado de forma experimental en los veranos de 2011 y 2012 colocando en humedales con brotes activos de botulismo unas trampas para moscas (n=24) cebadas con carne o cadáveres de aves de granja exentos de *C. botulinum*. Estos cebos han sido monitorizados durante varios días para detectar la presencia de larvas nacidas en ellos debido a la entrada de moscas que han depositado allí sus huevos. Trampas similares fueron colocadas como controles (n=5) en zonas en las que no se daban brotes de botulismo. Las larvas (muestras compuestas por trampa, n en brotes=22, n controles=3) fueron recogidas y analizadas para detectar *C. botulinum*.

El papel de las aves ha sido estudiado mediante el muestreo de heces de aves acuáticas en momentos de brotes (n=355) tal y como se ha explicado para los invertebrados acuáticos. También han sido analizados hisopos cloacales (n=151) de aves capturadas vivas con nasas entre febrero y octubre de 2012 en la laguna de Navaseca (en la que se producen brotes de botulismo, n=116), las Tablas de Daimiel y el Delta del Ebro (como zonas control, n=35). Por último, se ha llevado a cabo un seguimiento de la presencia de *C. botulinum* en hisopos cloacales de las aves acuáticas (principalmente anátidas, rálidos y láridos, n=71) intoxicadas en brotes de botulismo ocurri-

*Proyectos de investigación en parques nacionales: 2009-2012*

dos en las lagunas de Navaseca y Pozuelo de Calatrava en verano de 2012 e ingresadas en el Centro de Recuperación de Fauna del Chaparrillo (Ciudad Real). Las muestras han sido tomadas cada dos días desde el momento del ingreso hasta la liberación o la muerte.

### Análisis estadístico

Las prevalencias de detección de enteropatógenos y *C. botulinum* en los diferentes experimentos y estudios de campo han sido comparadas entre grupos, humedales o tipos de muestra con test de  $\chi^2$  o de Fisher. Los parámetros fisicoquímicos de agua y sedimento han sido comparados entre humedales o entre diferentes muestreos en un mismo humedal para estudiar relaciones temporales o espaciales con la aparición de brotes de botulismo mediante análisis de varianzas de una vía. La relación entre la presencia de los diferentes tipos de enterobacterias y *C. botulinum* y las características fisicoquímicas de agua y sedimento ha sido estudiada mediante modelos lineales generalizados (MLGz) para una respuesta logística binomial (presencia/ausencia de la bacteria) con los parámetros medidos en agua y sedimento y el humedal como descriptores. El nivel de significación de los tests ha sido establecido en  $p < 0.05$  y los análisis han sido llevados a cabo con el programa IBM SPSS Statistics 19.

## RESULTADOS

### Caracterización de los serotipos de *C. botulinum*

Los análisis de genotipado realizados indican que existe una gran similitud entre las diferentes cepas aisladas en los humedales manchegos y también con las aisladas en Suecia. Este perfil se corresponde con el toxinotipo del mosaico C/D descrito últimamente en Europa. También se ha visto que la qPCR resulta adecuada y más sensible que una PCR convencional para la detección de este mosaico C/D. Por otra parte, los bioen-

sayos en ratones también apuntan a la presencia del mosaico C/D ya que la protección de los ratones testados se ha conseguido con ambas anti-toxinas C y D.

### Estudio de campo de los factores asociados con la presencia de enteropatógenos y *C. botulinum*

y *C. botulinum*

La presencia de *E. coli* APEC ha sido más frecuente en heces de Navaseca y Veguilla y en sedimentos de Navaseca que en las Tablas de Daimiel ( $p \leq 0,02$ ; Figura 2), siendo además más detectada en las heces de las aves que en agua y sedimentos. *C. perfringens* tipo A también está muy presente en los humedales que reciben o han recibido de forma directa aguas residuales tratadas, como son las lagunas de Navaseca y la Veguilla ( $p < 0,01$ ; Figura 2), y siendo más frecuente en sedimento y heces de las aves que en el agua. En cuanto a *Salmonella* spp., se observa que es menos frecuente que las anteriores y únicamente en la Veguilla destaca su presencia en un muestreo de heces de gaviotas (30% positivas en láridos; más frecuente que en las Tablas de Daimiel,  $p = 0,01$ ). Por último la presencia de *C. botulinum* en las muestras de las Tablas de Daimiel ha sido nula, mientras que en Navaseca fue detectada en heces, agua, sedimento e invertebrados (acuáticos y moscas necrófagas) después de la aparición de un brote de botulismo en el verano de 2010 (significativamente más frecuente en agua y heces de Navaseca que en las Tablas de Daimiel,  $p \leq 0,02$ ). Sorprendentemente, *C. botulinum* fue detectado en las heces de aves acuáticas antes de aparecer el brote de botulismo, lo que apunta a que las mismas aves pueden tener un papel importante en la ecología de esta bacteria (Figura 3). En las muestras tomadas en la Veguilla *C. botulinum* ha sido también muy poco frecuente (Figura 2).

Los factores ambientales que pueden estar relacionados con la aparición de brotes de botulismo han sido la elevada temperatura del agua, una caída del potencial redox en el agua, la muerte del fitoplancton reflejada por la bajada de la clorofila  $\alpha$  en agua, la caída de la  $DBO_5$  en sedi-

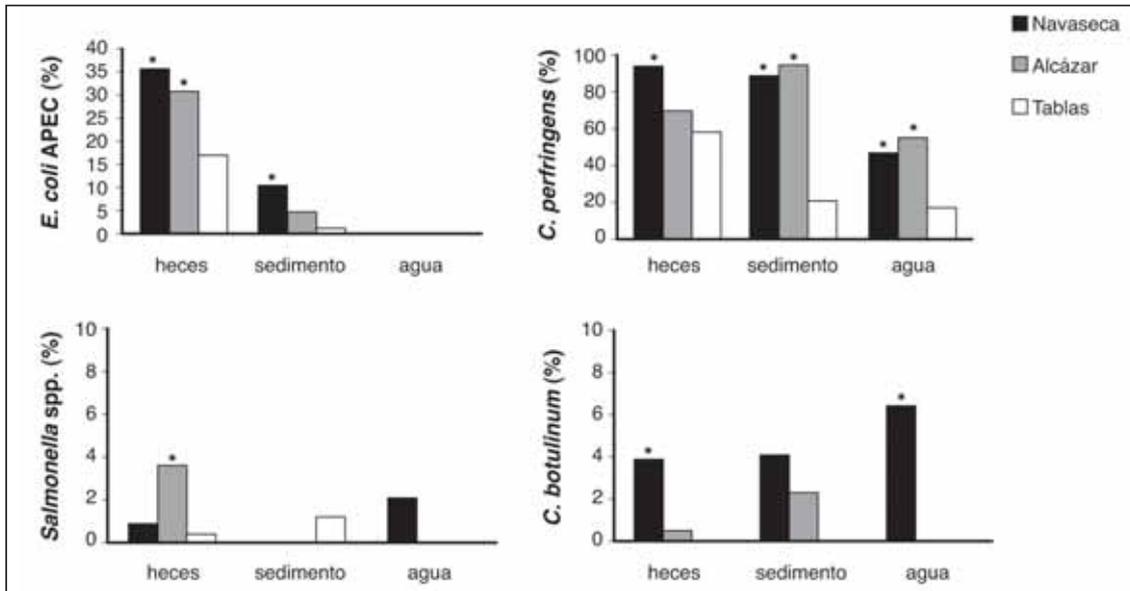
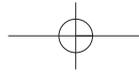


Figura 2. Prevalencias de *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens* tipo A, *Clostridium botulinum* tipo C/D y *E. coli* patógeno aviar (APEC) en heces, sedimento y agua de los tres humedales estudiados. Los asteriscos señalan las prevalencias significativamente más elevadas en esos humedales que en las Tablas de Daimiel.

Figure 2. Prevalence of *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens* type A, *Clostridium botulinum* type C/D and avian pathogenic *E. coli* (APEC) in feces, sediments and water of the three studied wetlands. The asterisks indicate the prevalences (in Alcázar and Navaseca) that are significantly higher than in Las Tablas de Daimiel.

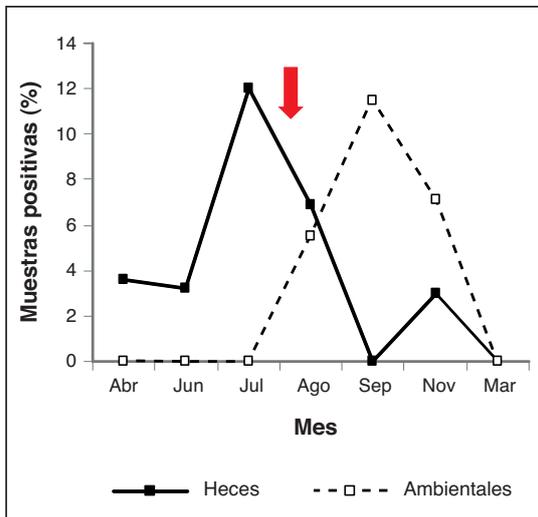
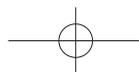
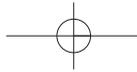


Figura 3. Evolución temporal de la presencia de *C. botulinum* en heces de aves acuáticas y muestras ambientales (aguas y sedimentos) en Navaseca durante el periodo de monitoreo de 2010-2011.

Figure 3. Temporal trend of the presence of *C. botulinum* in feces of waterbirds and environmental samples (water and sediments) of Navaseca during the sampling period of 2010-2011.

mento, la bajada de sulfatos en agua y el aumento del carbono inorgánico en agua (Figura 4). Estos factores o cambios han sido observados en el momento de la aparición del brote ocurrido en Navaseca en 2010. También las diferencias entre humedales para dichos parámetros apuntan a una mayor susceptibilidad de la laguna de Navaseca para el desarrollo de brotes de botulismo (Figura 5). La presencia de *C. perfringens* en sedimento apareció relacionada positivamente con diversos parámetros fisicoquímicos del agua intersticial (por ejemplo carbono orgánico total, calcio, sulfato, sodio;  $p < 0,05$ ). No obstante, el mayor efecto del factor zona en los MLGz ( $p < 0,001$ ) indica que esta bacteria podría ser un buen marcador de la presencia de aguas residuales en las dos lagunas abastecidas con aguas de depuradoras. No han sido detectadas relaciones significativas entre las características de agua y sedimento y la presencia de *E. coli* APEC. La baja prevalencia de *C. botulinum* y *Salmonella* spp. impide este tipo de análisis mediante MLGz para estas bacterias.





Proyectos de investigación en parques nacionales: 2009-2012

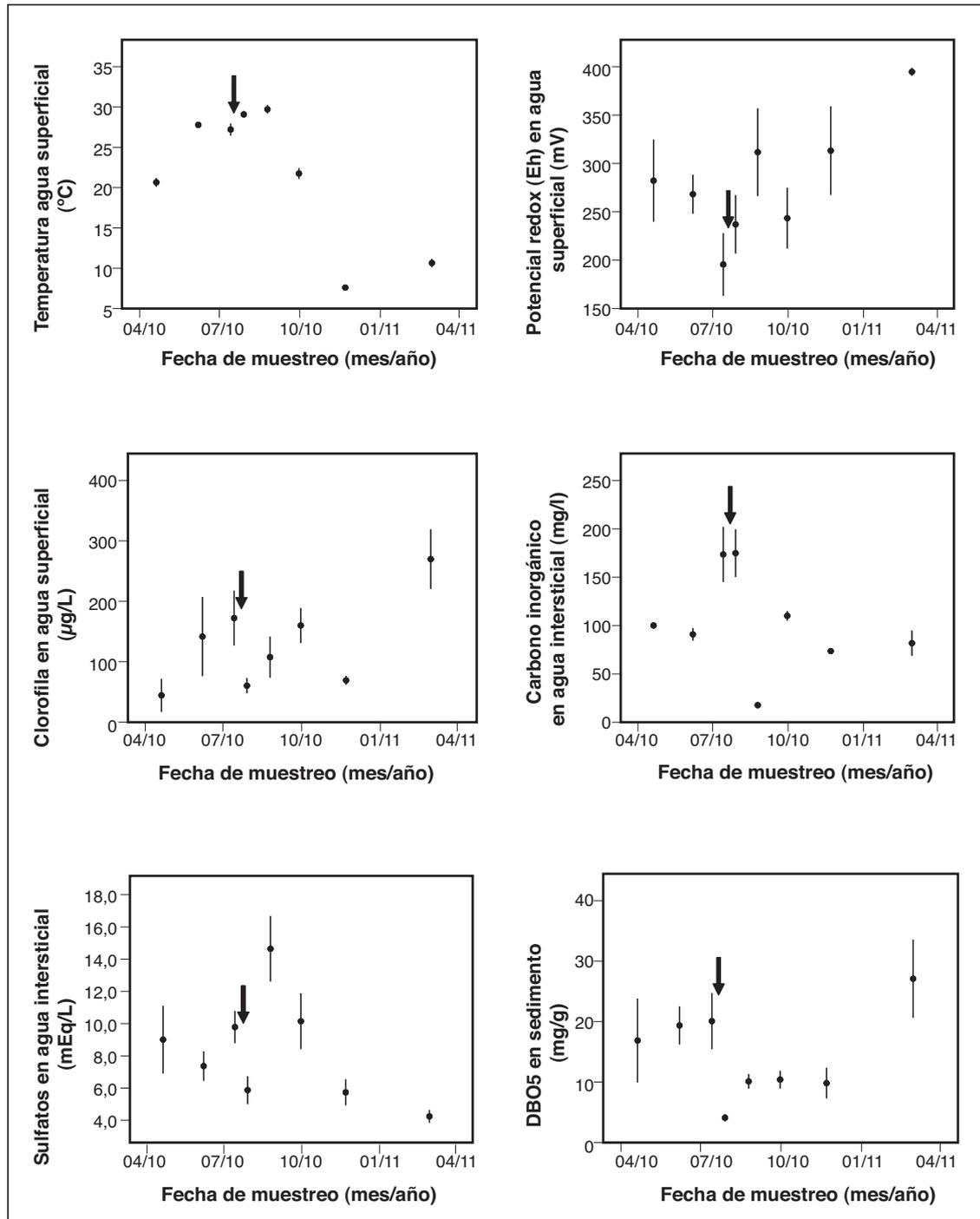
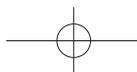


Figura 4. Evolución anual de diversos factores ambientales en Navaseca que han experimentado cambios bruscos entorno al momento del brote (flechas) ocurrido a finales de julio de 2010 o que pueden favorecer el desarrollo de *C. botulinum* en el humedal.

Figure 4. Annual trend of several environmental factors in Navaseca that have suffered sharp changes around the outbreak period (arrows) occurred at the end of 2010 or that may favor the growth of *C. botulinum* in the wetland.



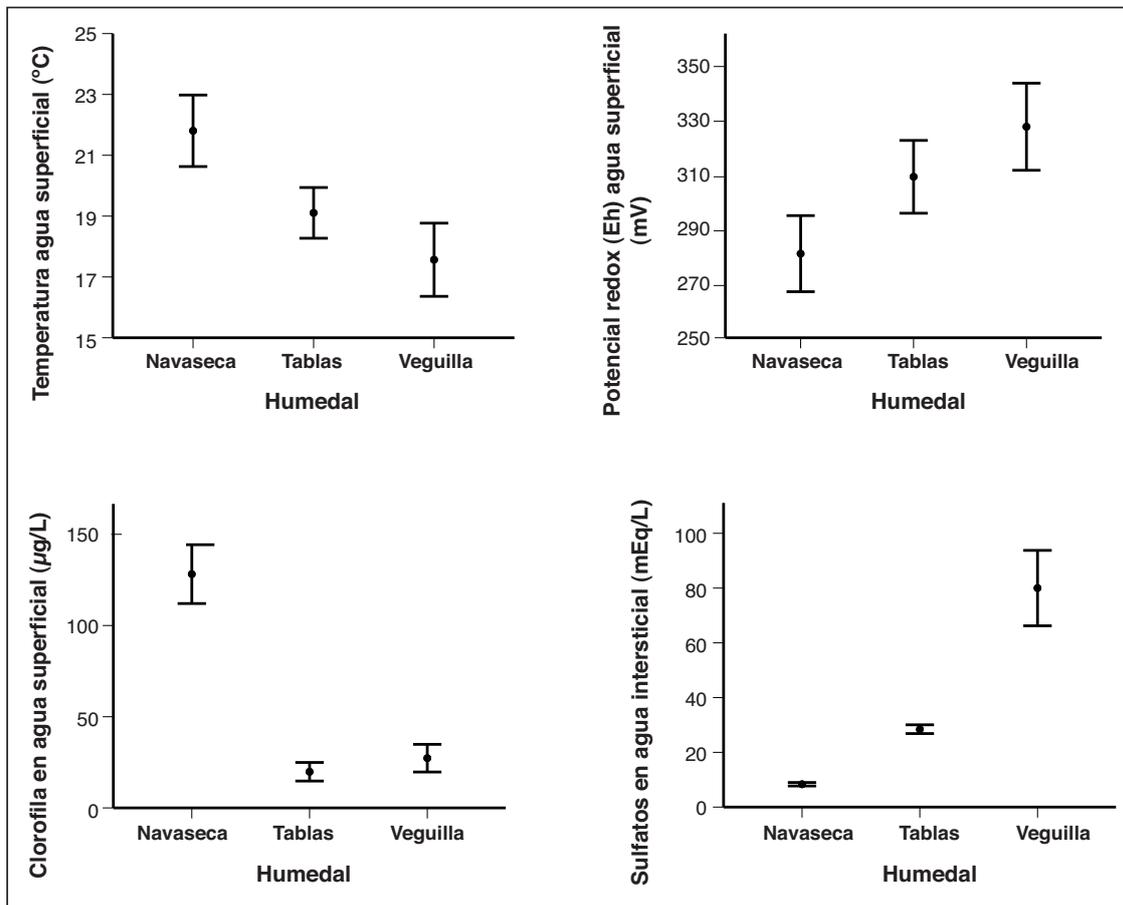


Figura 5. Factores ambientales que se diferencian en Navaseca y que podrían asociarse con los brotes de botulismo ocurridos en ese humedal.

Figure 5. Environmental factors that are different in Navaseca and that could be associated with the botulism outbreaks that occurred in that wetland.

#### Estudio experimental de factores limitantes para *C. botulinum*

La concentración teórica de sal de los sedimento de humedales manchegos no ha afectado a la posibilidad de detección de *C. botulinum* mediante el cultivo de enriquecimiento seguido de qPCR una vez esas muestras quedaban diluidas en el caldo de cultivo. Concentraciones superiores a 12,5 mg/ml de NaCl, en lo que sería el equivalente a lo que presenta el sedimento sin diluir, sí que han afectado al desarrollo de la bacteria. Estos resultados indican que la salinidad puede ser un factor limitante para la presencia de la bac-

teria en los humedales, pero no para su detección en el laboratorio.

El calentamiento de las muestras a 70 °C para reducir la competencia de otras bacterias durante el cultivo de enriquecimiento en laboratorio no ha mejorado la capacidad de detección de *C. botulinum* en sedimento (12,5% en controles y tratados). Por el contrario, la esterilización del sedimento ha favorecido el crecimiento de *C. botulinum* en muestras inoculadas tras ese tratamiento térmico (37,5%) en comparación a las no tratadas (12,5%;  $p = 0,009$ ). Este resultado indica que la competencia de otros microorganismos

Proyectos de investigación en parques nacionales: 2009-2012

puede ser un factor importante en el desarrollo de la bacteria, tanto en los humedales como en los cultivos para su detección.

### Papel de invertebrados y aves en la expansión de brotes de botulismo

La mayor frecuencia de detección de *C. botulinum* tipo C/D en los brotes ocurridos en 2011 en tres lagunas manchegas se observó en las larvas de dípteros necrófagos, seguido del sedimento y los dípteros adultos (Figura 6). También hubo diferencias entre humedales, ya que del total de muestras analizadas la frecuencia de aparición de *C. botulinum* fue observada en Navaseca (9,8%), seguida de Pozuelo de Calatrava (6,3%) y Moral de Calatrava (4,2%).

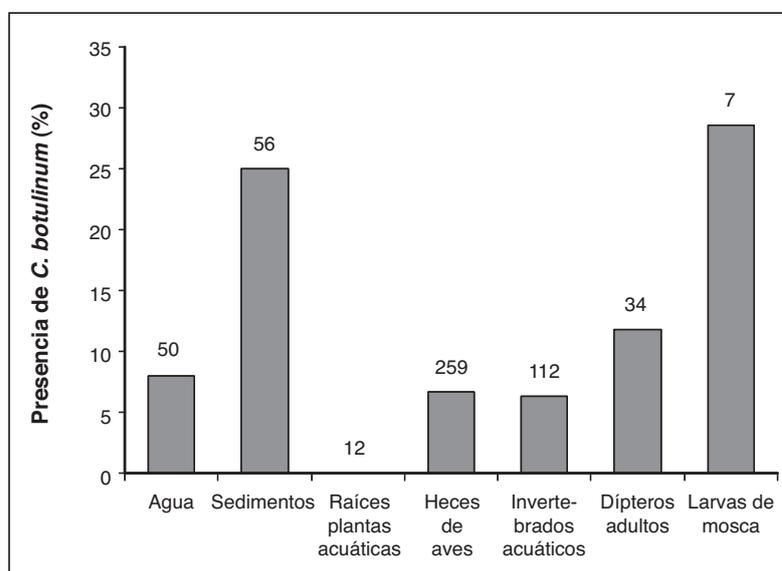
Durante el brote de botulismo ocurrido en Navaseca se alcanzó una presencia de *C. botulinum* en el 29% de las muestras de sedimento. En ese momento los invertebrados acuáticos que mostraron mayor presencia de *C. botulinum* fueron

los gasterópodos acuáticos (16,2%). También fue detectada la bacteria en una larva de estratiómido.

El otro grupo de invertebrados en el que fue detectada la bacteria en los humedales con brotes son los dípteros necrófagos, tanto las formas larvianas (28,6%) como las moscas adultas (11,8%). En el estudio experimental realizado con trampas cebadas con carne o cadáveres se ha podido confirmar que las moscas adultas son capaces de transportar *C. botulinum* de un cadáver a otro y aparecer después en las larvas desarrolladas en el 16,7% de esos cadáveres (8,1% usando filetes de carne enrollados) que no presentaban inicialmente esta bacteria.

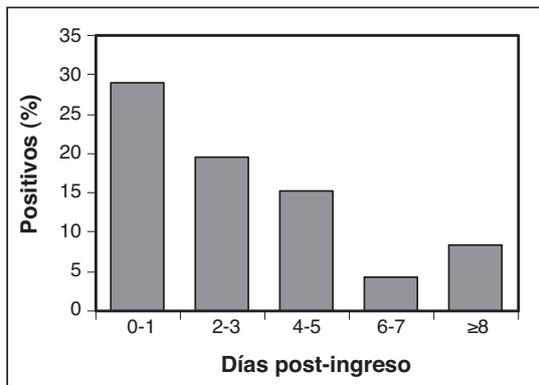
Por último la presencia de *C. botulinum* en los hipos cloacales tomados en las aves vivas ha sido muy baja. Tan solo ha sido detectada en una focha muestreada en Navaseca durante el brote de 2012 y que posiblemente empezaba a estar intoxicada. Las heces recogidas directamente en el campo, sin tener que capturar a las aves parecen dar resultados positivos con mayor frecuencia, ya que el 7,7% de las muestras recogidas durante el citado brote de Navaseca resultaron positivas y en momentos al margen de los brotes este valor se mantuvo en un 3,7%.

El seguimiento de las aves ingresadas por botulismo en el Centro de Recuperación muestra que las aves pueden continuar portando la bacteria en su tracto digestivo hasta dos semanas después del ingreso, lo que indica que la bacteria puede mantenerse en el tracto digestivo de las aves durante un tiempo mayor de lo que se esperaría por un mero tránsito con la dieta (Figura 7).



**Figura 6.** Presencia de *C. botulinum* tipo C/D en muestras tomadas en brotes ocurridos en 2011 en tres humedales manchegos (Lagunas de Navaseca, Pozuelo de Calatrava y Moral de Calatrava). Los números mostrados en cada categoría son el tamaño de muestra (n).

**Figure 6.** Presence of *C. botulinum* type C/D in samples collected during outbreaks occurred in 2011 in wetlands of Ciudad Real (Navaseca lagoon, Pozuelo de Calatrava and Moral de Calatrava). The numbers shown in each category are the sample size (n).



**Figura 7.** Presencia de *C. botulinum* tipo C/D en intestino de aves acuáticas durante su tratamiento en el Centro de Recuperación de Fauna.

**Figure 7.** Presence of *C. botulinum* type C/D in intestine of waterbirds during their recovery at the Wildlife Rehabilitation Center.

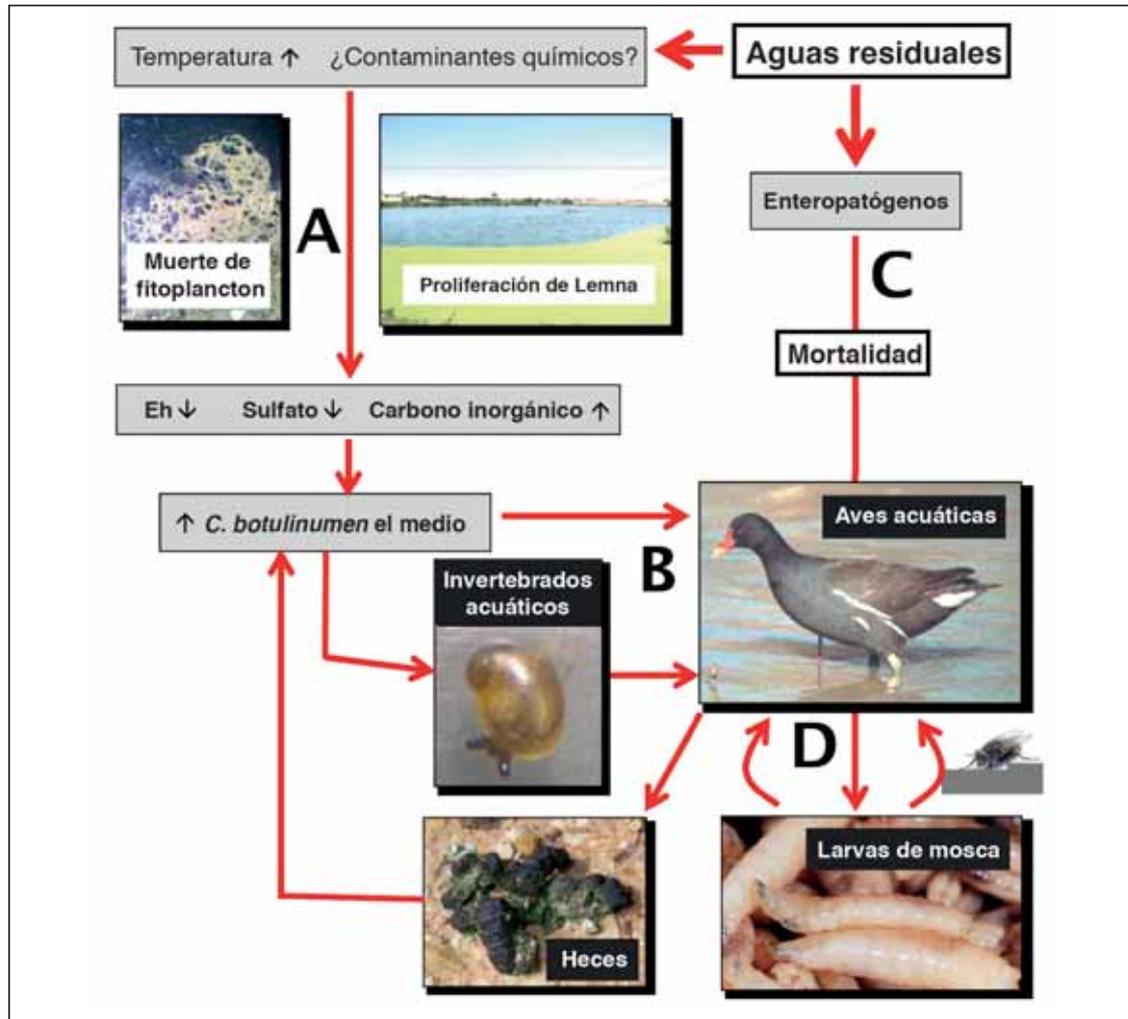
## DISCUSIÓN

El uso de aguas residuales representa un riesgo sanitario para las aves por ser una fuente de enteropatógenos y por alterar la ecología de los humedales y así favorecer en determinados momentos la aparición de brotes de botulismo aviar. Los brotes registrados en la Mancha Húmeda corresponden al mosaico C/D recientemente descrito y que parece ser el predominante en las aves acuáticas en Europa (WOUNDSTRA *et al.*, 2012). Este mosaico C/D tiene una mayor actividad letal que otros tipos y reacciona de forma cruzada contra antiseros tipo C y D en el bioensayo de ratón (TAKEDA *et al.*, 2005; SKARIN *et al.*, 2010; LINDBERG *et al.*, 2010; WOUNDSTRA *et al.*, 2012).

Valorando los resultados globalmente podemos barajar la hipótesis de que un proceso facilitado por las elevadas temperaturas y la abundancia de nutrientes (por ejemplo el crecimiento explosivo de *Lemna* spp.) causó una bajada del potencial redox (Eh) en el agua y una reducción del fitoplancton, tal y como indica la disminución de la clorofila en el agua. Además se produjo una bajada de los sulfatos que podría ser explicada por una proliferación de bacterias sulfato-reductoras. Esto estaría además asociado a la disminución del carbono fijado en forma orgánica en el agua

y de la DBO<sub>5</sub> del sedimento. El conjunto de cambios observados en los parámetros fisicoquímicos en el momento del brote y el hecho de que también se observen los mismos más favorecedores en Navaseca apuntan a que se han dado unas condiciones de anaerobiosis con un empobrecimiento de la comunidad microbiana del sedimento que ha podido permitir la proliferación de *C. botulinum*. No obstante, su escasa presencia en sedimento y la aparición en las heces de aves antes del brote apuntan a que el tracto digestivo de las aves puede ser una parte importante del proceso que desencadena un brote. Por lo tanto, las condiciones ambientales facilitarían en parte la presencia de *C. botulinum* en el medio y algunos invertebrados (por ejemplo gasterópodos), aumentando así la posibilidad de ingestión y posterior magnificación de la bacteria en el medio por parte de las aves. A esto hay que añadir la presencia de enteropatógenos presentes en las aguas residuales que podrían producir mortalidades puntuales que actuarían como detonadores de brotes de botulismo, ya que cualquier ave muerta con *C. botulinum* en su tracto digestivo podría ser el caldo de cultivo perfecto para que se multiplique dicha bacteria, se acumule la toxina botulínica en las larvas de moscas necrófagas que se alimentan de los cadáveres y a través de estas larvas se puedan intoxicar más aves acuáticas. A esto se añade que las moscas necrófagas puedan transportar la bacteria entre cadáveres, aumentando el riesgo asociado con la formación de la toxina botulínica (Figura 8).

Es bien sabido que cualquier causa de mortalidad en aves puede actuar como detonante de la aparición de un brote de botulismo (SOOS & WOBESER, 2006). De ahí que la mayor presencia de enteropatógenos como *E. coli* APEC en agua, sedimento y heces de las aves de humedales que reciben aguas residuales pueda ser una de las razones que explique la regular aparición de estos brotes en lagunas como la de Navaseca en Daimiel. También los basureros de residuos urbanos podrían representar un riesgo adicional, ya que hemos detectado una mayor presencia de *Salmonella* spp. en las heces de gaviotas que se alimentan en esos lugares y después van a dormir a las lagunas como la de la Veguilla en Alcázar de San



**Figura 8.** Esquema de los posibles mecanismos implicados en la aparición y expansión de los brotes de botulismo en los humedales manchegos. A: Varios factores pueden alterar el estado redox de un humedal, como pueden ser la muerte del fitoplancton por el efecto de contaminantes químicos, o la proliferación de *Lemna* spp. debido a las altas temperaturas y la abundancia de nutrientes, siendo ambos riesgos posibles en humedales que reciben aguas residuales. El cambio brusco del potencial redox puede afectar a la comunidad microbiana, empobreciéndola y permitiendo solo la proliferación de bacterias sulfatoredutoras, favoreciendo así a un anaerobio como *C. botulinum*. B: *C. botulinum*, más abundante en el medio, puede ser ingerido por las aves acuáticas con el sedimento o bien con invertebrados como gasterópodos que se alimentan de detritus. Además, las propias aves pueden contribuir en la dispersión de esporas de *C. botulinum* en sus heces. C: Los humedales abastecidos con aguas residuales presentan un riesgo de infección con enteropatógenos en aves acuáticas, con lo que cualquier ave que muera con esporas de *C. botulinum* en su tracto digestivo puede actuar como detonante de un brote de botulismo. D: En este momento tan solo es necesario que se mantenga el ciclo cádaver-larvas necrófagas para que el brote se magnifique y afecte a cientos de aves.

**Figure 8.** Diagram of the possible mechanisms implicated in the starting and spreading of a botulism outbreak in a Mediterranean wetland. A: various factors can change the redox potential of a wetland, for example, the death of phytoplankton due to chemical pollutants or the overgrowth of *Lemna* spp. due to elevated temperatures and abundance of nutrients; both risks are feasible in wetlands that receive sewage water. A sharp change in the redox potential of a wetland can affect the microbial community, impoverishing it and favoring the growth of sulfate-reducing bacteria as *C. botulinum*. B: The more abundant *C. botulinum* is ingested by waterbirds along with the sediment or along with invertebrates, such as water snails, that feed on *detritus*. Waterbirds can also excrete the pathogen and spread its spores. C: A risk of infection of waterbirds with enteropathogens exists in wetlands that receive sewage water; if a bird dies with spores in its digestive tract, it may act as an initiator of an outbreak. D: In this moment, the maintenance of the carcass-maggot cycle is enough to magnify the outbreak and affect hundreds of birds.

Juan (FRIEND & FRANSON, 1999). Las mejoras en el tratamiento del agua en las estaciones depuradoras y la eliminación de sistemas de bypass que terminan vertiendo las aguas residuales sin tratar en humedales como Navaseca deberían ser prioritarias para garantizar un buen estado sanitario de las aves acuáticas.

Los cambios ambientales que genera el vertido de aguas residuales en un humedal, tanto natural como semiartificial, pueden ser varios (FLORÍN & MONTES, 1999; CIRUJANO & MEDINA, 2002). De entrada, el mayor aporte de agua dulce en lagunas salinas o hipersalinas como las de la Mancha Húmeda comporta cambios en la salinidad que, entre otras cosas, puede favorecer al crecimiento de *C. botulinum* (FRIEND & FRANSON, 1999). Tal y como hemos visto en trabajos de campo anteriores (VIDAL *et al.* 2013) y los estudios experimentales aquí descritos, la elevada salinidad de las lagunas manchegas puede ser un factor limitante de la expansión de *C. botulinum*. Por otra parte, la temperatura del agua de las lagunas que reciben aguas residuales, como Navaseca, parece ser en general más alta que en otros humedales, como por ejemplo las Tablas de Daimiel, con lo que las posibilidades de crecimiento de *C. botulinum* se ven favorecidas (SEGNER *et al.*, 1971; FRIEND & FRANSON, 1999; VIDAL *et al.*, 2013). Además las lagunas en las que se vierten aguas residuales se pueden ver sujetas a cambios repentinos debidos al aporte de nutrientes o la presencia de contaminantes urbanos e industriales de diverso tipo (AGUAYO *et al.*, 2004; FARRÉ *et al.*, 2005). Esto puede tener efectos sobre la comunidad microbiana que compite con *C. botulinum*, en el fitoplancton o en el crecimiento de plantas como *Lemna* spp. que pueden alterar la ecología del humedal (SEGURA *et al.*, 2009; TUKAJ *et al.*, 2011; BEDOUX *et al.*, 2012). En el brote observado en Navaseca se pudo observar que justo antes de ocurrir hubo una explosión de *Lemna* spp., de forma que llegó a cubrir casi por completo la laguna, afectando al desarrollo del fitoplancton y produciendo la anoxia (PAPADOPOULOS *et al.*, 2011). Este pudo ser el desencadenante de los cambios observados en agua y sedimento hacia un ambiente de menor potencial redox y mejores condiciones para las

bacterias anaerobias como *C. botulinum* (PÉREZ-FUENTETAJA *et al.*, 2006). No obstante, un seguimiento de los brotes de botulismo durante más años en estos humedales sería necesario para confirmar esta hipótesis.

Los invertebrados acuáticos, y en especial los gasterópodos pueden ser portadores, y quizás acumuladores, de *C. botulinum* (DUNCAN & JENSEN, 1976; PÉREZ-FUENTETAJA *et al.*, 2011). De esta forma, las aves que se alimentan de estos gasterópodos pueden ingerir la bacteria y en el caso de morir por cualquier causa con *C. botulinum* en su tracto digestivo podrían ser el origen de la formación de la neurotoxina y desencadenar un brote. También hemos observado que otros vertebrados acuáticos, como quironómidos, estratiómidos o corixidos, son capaces de portar *C. botulinum* (VIDAL *et al.*, 2013), pero por el momento la presencia más constante se ha detectado en los gasterópodos. Un aspecto que debería ser estudiado es la posibilidad de que estos gasterópodos acumulen la toxina como sucede en las larvas de moscas necrófagas, pero los datos existentes hasta el momento indican que los invertebrados acuáticos acumulan pequeñas cantidades de toxina en comparación con las larvas de mosca que se alimentan directamente de los cadáveres (DUNCAN & JENSEN, 1976).

Anteriormente ya habíamos detectado *C. botulinum*, no sólo en larvas y pupas, sino también en adultos de moscas Calliphoridae y Sarcophagidae (VIDAL *et al.*, 2013). La presencia de las bacterias en la mosca adulta representa un nuevo aspecto a considerar en la epidemiología del botulismo aviar, ya que como hemos observado en este proyecto, las moscas pueden transportar *C. botulinum* de un cadáver a otro.

Las aves acuáticas pueden ingerir esporas de *C. botulinum* presentes en el sedimento, ya que hasta un 22% de la dieta de algunas especies de aves, como las anátidas, es sedimento que tragan mientras filtran el alimento (BEYER *et al.*, 2008). Además las aves podrían ingerir *C. botulinum* con los invertebrados acuáticos (por ejemplo gasterópodos), y por último con las larvas de moscas necrófagas. En este último caso se podría llegar a

*Proyectos de investigación en parques nacionales: 2009-2012*

producir la intoxicación por botulismo al ingerir una dosis suficiente de toxina. No obstante, la detección de *C. botulinum* en heces de aves, principalmente rálidos, en momentos que no hay brotes o el hecho de que las aves intoxicadas sigan siendo portadoras (y excretoras) hasta más de dos semanas después de ingresar en un Centro de Recuperación indican que *C. botulinum* podría mantenerse en el tracto digestivo de las aves, posiblemente en los ciegos (MIYAZAKI & SAKAGUCHI, 1978). En niños y potros se puede dar el botulismo toxiinfeccioso, en el que la bacteria se multiplica en el intestino, forma toxina y desencadena la intoxicación. Esto es debido a que el desarrollo de la microbiota intestinal que evita la proliferación de *C. botulinum* por competencia es todavía deficiente en individuos jóvenes (MIDURA, 1996; WHITLOCK & McADAMS, 2006). Esta forma toxiinfecciosa también ha sido descrita en aves (TRAMPEL *et al.*, 2005), pero tanto si *C. botulinum* llega a colonizar el intestino y produce el cuadro tóxico en el ave como si permanece asintomática, las implicaciones que podría tener la persistencia de la bacteria en el tracto digestivo aviar en la aparición de brotes serían importantes.

En conclusión, el uso de aguas residuales para abastecer humedales representa un riesgo para la conservación de estos ecosistemas si esta agua no ha sido tratada correctamente. El hecho de que en periodos de sequía sean estos los únicos humedales con agua hace que cantidades importantes de aves se concentren en ellos, incluidas algunas especies seriamente amenazadas como la malvasía cabeciblanca. Un brote de botulismo puede tener en esos momentos consecuencias devastadoras para la conservación de especies amenazadas por la elevada mortalidad que se

produce en poco tiempo (WORK *et al.*, 2010). Además, existe el riesgo de que las aves que se ven atraídas por estos humedales eutróficos puedan estar expuestas a numerosos tipos de contaminantes químicos de origen urbano e industrial con efectos poco conocidos en las aves hasta ahora (MARKMAN *et al.*, 2011). En definitiva, los humedales abastecidos con aguas residuales, más que suponer un beneficio para la conservación de la biodiversidad, podrían actuar como trampas ecológicas para las aves acuáticas como sucedería con otras zonas contaminadas (GAINES *et al.*, 2011, MØLLER *et al.*, 2012).

## AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer la colaboración del personal del Parque Nacional de las Tablas de Daimiel y los Agentes de Medio Ambiente de la Junta de Castilla-La Mancha (JCCM). También a Jordi Feliu, por su colaboración en los muestreos de campo, a Elena Crespo –veterinaria del centro de recuperación del Chaparrillo de Ciudad Real (JCCM)-y a Juan Andrés –técnico del mismo centro- por su disposición a ayudar en todo lo posible, a Raúl por recoger datos sobre aves enfermas, a Hanna Skarin del Departamento de Bacteriología de la Facultad de Veterinaria de Uppsala (Suecia) y al Dr. Michel-Robert Popoff del Departamento de Bacterias Anaerobias y Toxinas del Instituto Pasteur de Paris por las estancias realizadas en sus centros. I. Anza es becaria predoctoral con una beca I3P del CSIC, D. Vidal ha tenido un contrato post-doctoral I3P del CSIC, S. Díaz ha tenido una beca predoctoral de la JCCM y S. Sánchez ha tenido una beca post-doctoral de la JCCM. Este proyecto ha sido financiado por el OAPN (ref 35/2009).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

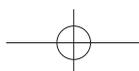
- AGUAYO, S., MUÑOZ, M.J., DE LA TORRE, A., ROSET, J., DE LA PEÑA, E. & CARBALLO, M. 2004. Identification of organic compounds and ecotoxicological assessment of sewage treatment plants (STP) effluents. *Science of the Total Environment* 328: 69-81.
- ÁLVAREZ-COBELAS M. & CIRUJANO, S. 1996. Las Tablas de Daimiel. *Ecología Acuática y Sociedad*. Organismo Autónomo Parques Nacionales, Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, Spain.



ANZA, I. Y COLS.

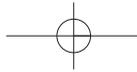
«Riesgos para las aves acuáticas asociados con el abastecimiento con aguas residuales»

- EATON, A. D. & FRANSON, M.A.H. 2005. Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater. A.D. American Public Health Association, USA.
- BEDOUX, G., ROIG, B., THOMAS, O., DUPONT, V. & LE BOT, B. 2012. Occurrence and toxicity of antimicrobial triclosan and by-products in the environment. *Environmental Science and Pollution Research* 19: 1044-1065.
- BENSKIN, C. M.H., WILSON, K., JONES, K. & HARTLEY, I. R. 2009. Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. *Biological Reviews* 84: 349-373.
- BEYER, W.N., PERRY, M.C. & OSENTON, P.C. 2008. Sediment ingestion rates in waterfowl (Anatidae) and their use in environmental risk assessment. *Integrated environmental assessment and management* 4: 246-251.
- CIRUJANO, S. & MEDINA, L. 2002. Plantas acuáticas de las lagunas y humedales de Castilla-La Mancha. Real Jardín Botánico, CSIC y Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, Madrid, Spain.
- DÍAZ-SÁNCHEZ, S., SÁNCHEZ, S., EWERS, C. & HÖFLE, U. 2012. Occurrence of avian pathogenic *Escherichia coli* and antimicrobial-resistant *E. coli* in red-legged partridges (*Alectoris rufa*): sanitary concerns of farming. *Avian Pathology* 41: 337-344.
- DUNCAN, R.M. & JENSEN, W.L. 1976. A relationship between avian carcasses and living invertebrates in the epizootiology of avian botulism. *Journal of Wildlife Disease* 12: 116-126.
- EVELSIZER, D.D., BOLLINGER, T.K., DUFOUR, K.W. & CLARK, R.G. 2010. Survival of radio-marked mallards in relation to management of avian botulism. *Journal of Wildlife Disease* 46: 864-877.
- FACH, P., GIBERT, M., GRIFFAIS, R. & POPOFF, M. R. 1996. Investigation of animal botulism outbreaks by PCR and standard methods. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 13: 279-285.
- FARRÉ, M., BRIX, R. & BARCELÓ, D. 2005. Screening water for pollutants using biological techniques under European Union funding during the last 10 years. *Trends in Analytical Chemistry* 24: 532-545.
- FLORÍN, M. & MONTES, C. 1999. Functional analysis and restoration of Mediterranean *lagunas* in the Mancha Húmeda Biosphere Reserve (Central Spain). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 9: 97-109.
- FRIEND, M. & FRANSON, J.C. 1999. Field Manual in Wildlife Diseases: General Field Procedures and Diseases of Birds. US Department of Interior and US Geological Survey, Washington, DC.
- GAINES, K.F., SUMMERS, J.W., CUMBEE J.R., J.C., STEPHENS J.R., W.L. & MILLS, G.L. 2011. Is the LCP superfund site an ecological trap for clapper rails? *Southeastern Naturalist* 10: 703-712.
- HEADLEY, T.R. & TANNER, C.C. 2012. Constructed wetlands with floating emergent macrophytes: An innovative stormwater treatment technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 42: 2261-2310.
- LINDSTRÖM, M. & KORKEALA, H. 2006. Laboratory Diagnostics of Botulism. *Clinical Microbiology Reviews* 19: 298-314.
- LLAMAS, M. R. 1988. Conflicts between wetland conservation and groundwater exploitation: Two case histories in Spain. *Environmental Geology and Water Sciences* 11: 241-251.
- LINDBERG, A., SKARIN, H., KNUTSSON, R., BLOMQVIST, G. & BÅVERUD, V. 2010. Real-time PCR for *Clostridium botulinum* type C neurotoxin (BoNTC) gene, also covering a chimeric C/D sequence-application on outbreaks of botulism in poultry. *Veterinary Microbiology*. 146: 118-123.
- MARKMAN, S., MÜLLER, C.T., PASCOE, D., DAWSON, A. & BUCHANAN, K.L. 2011. Pollutants affect development in nestling starlings *Sturnus vulgaris*. *Journal of Applied Ecology* 48: 391-397.
- MARTÍNEZ-SANTOS, P., DE STEFANO, L., LLAMAS, M.R. & MARTÍNEZ-ALFARO, P.E. 2008. Wetland restoration in the Mancha occidental aquifer, Spain: A critical perspective on water, agricultural, and environmental policies. *Restoration Ecology* 16: 511-521.
- MIDURA, T. F. 1996. Update: Infant botulism. *Clinical Microbiology Reviews* 9: 119-125.
- MITSCHE, W. J. & DAY J. W. 2004. Thinking big with whole-ecosystem studies and ecosystem restoration - A legacy of H.T. Odum. *Ecological Modelling* 178: 133-155.
- MIYAZAKI, S. & SAKAGUCHI, G. 1978. Experimental botulism in chickens: the cecum as the site of production and absorption of botulinum toxin. *Japanese Journal of Medical Science and Biology* 31: 1-15.



*Proyectos de investigación en parques nacionales: 2009-2012*

- MØLLER, A.P., BONISOLI-ALQUATI, A., RUDOLFSSEN, G. & MOUSSEAU, T.A. 2012. Elevated mortality among birds in Chernobyl as judged from skewed age and sex ratios. *PLoS ONE* 7: 35223.
- NAVARRO, V., GARCÍA, B., SÁNCHEZ, D. & ASENSIO, L. 2011. An evaluation of the application of treated sewage effluents in Las Tablas de Daimiel National Park, Central Spain. *Journal of Hydrology* 401: 53-64.
- OKAFOR, N. 2011. Pollution of aquatic systems: Pollution through eutrophication, fecal materials, and oil spills. En: *Environmental Microbiology of Aquatic and Waste Systems*. pp 151-183. Springer, Dordrecht.
- PAPADOPOULOS, F.H., TSIHRINTZIS, V.A. & ZDRAGAS, A.G. 2011. Removal of faecal bacteria from septage by treating it in a full-scale duckweed-covered pond system. *Journal of Environmental Management* 92: 3130-3135.
- PECK, M.W. 2009. Biology and genomic analysis of *Clostridium botulinum*. *Advances in Microbial Physiology* 55: 183-265.
- PÉREZ-FUENTETAJA, A., CLAPSADL, M.D., EINHOUSE, D., BOWSER, P.R., GETCHELL, R.G. & LEE, W.T. 2006. Influence of limnological conditions on *Clostridium botulinum* type E presence in eastern Lake Erie sediments (Great Lakes, USA). *Hydrobiologia* 563: 189-200.
- PÉREZ-FUENTETAJA, A., CLAPSADL, M.D., GETCHELL, R.G., BOWSER, P.R. & LEE, W.T. 2011. *Clostridium botulinum* type E in Lake Erie: Inter-annual differences and role of benthic invertebrates. *Journal of Great Lakes Research* 37: 238-244.
- ROCKE, T.E. 2006. The global importance of avian botulism. En: G.C. Boere, C.A. Galbraith & D.A. Stroud (eds.) *Waterbirds Around the World*. pp. 422-426. The Stationery Office. Edinburgh, UK.
- SÁNCHEZ-CARRILLO, S., ANGELER, D.G., CIRUJANO, S. & ÁLVAREZ-COBELAS. 2010. The wetlands, its catchment settings and socioeconomic relevance: An overview. En: S. Sánchez-Carrillo & D.G. Angeler (Eds.) *Ecology of Threatened Semi-Arid Wetlands: Long-Term Research in Las Tablas de Daimiel*. pp. 3-18. Springer, Dordrecht.
- SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, L., CIFUENTES, A., JIMÉNEZ, B., MATEO, R. & GONZÁLEZ, R. 2008. Detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin coding genes: analysis of PCR products by real time versus capillary gel electrophoresis methods. *European Food Research Technology* 227: 495-502.
- SEGNER, W. P., SCHMIDT, C. F. & BOLTZ J. K. 1971. Minimal growth temperature, sodium chloride tolerance, pH sensitivity, and toxin production of marine and terrestrial strains of *Clostridium botulinum* type C. *Applied Microbiology* 22: 1025-1029.
- SEGURA, P.A., FRANÇOIS, M., GAGNON, C. & SAUVÉ, S. 2009. Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated wastewaters and natural and drinking waters. *Environmental Health Perspectives* 117: 675-684.
- SKARIN, H., LINDBERG, A., BLOMQUIST, G., ASPÁN, A. & BÅVERUD, V. 2010. Molecular characterization and comparison of *Clostridium botulinum* type C avian strains. *Avian Pathology*. 39: 511-518.
- SOOS, C. & WOBESER, G. 2006. Identification of primary substrate in the initiation of avian botulism outbreaks. *The Journal of Wildlife Management* 70: 43-53.
- TAKEDA, M., TSUKAMOTO, K., KOHDA, T., MATSUI, M., MUKAMOTO, M. & KOZAKI, S. 2005. Characterization of the neurotoxin produced by isolates associated with avian botulism. *Avian Diseases*. 49: 376-381.
- TRAMPEL, D. W., SMITH, S. R. & ROCKE, T. E. 2005. Toxicoinfectious botulism in commercial caponized chickens. *Avian Diseases* 49: 301-303.
- TUKAJ, S., BISEWSKA, J., ROESKE, K. & TUKAJ, Z. 2011. Time- and dose-dependent induction of HSP70 in *Lemna minor* exposed to different environmental stressors. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 87: 226-230.
- VAN ASTEN, A. J. A. M., VAN DER WIEL, C. W., NIKOLAOU, G., HOUWERS, D. J. & GRONE, A. 2009. A multiplex PCR for toxin typing of *Clostridium perfringens* isolates. *Veterinary Microbiology* 136: 411-412.



ANZA, I. Y COLS.

«Riesgos para las aves acuáticas asociados con el abastecimiento con aguas residuales»

- VIDAL, D., TAGGART, M.A., HÖFLE, U., GONZÁLEZ, R., CIFUENTES, A., SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, L., BARCENILLA, J., JIMÉNEZ, B., GREEN, A.J. & MATEO, R. 2009. Análisis del riesgo de intoxicación por botulismo en malvasía cabeciblanca y otras especies de aves acuáticas en las Tablas de Daimiel y humedales cercanos. En: L. Ramírez & B. Asensio (Eds.) *Proyectos de Investigación en Parques Nacionales 2005-2008*. pp. 229-247. Organismo Autónomo Parques Nacionales, Ministerio de Medio Ambiente, Madrid.
- VIDAL, D., TAGGART, M.A., BADIOLA, I. & MATEO R. 2011. Real-time polymerase chain reaction for the detection of toxigenic *Clostridium botulinum* type C<sub>1</sub> in waterbirds and sediment samples: Comparison with other PCR techniques. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23: 942-946.
- VIDAL, D., ANZA, I., TAGGART, M.A., PÉREZ, E., CRESPO, E., HOFLE, U., MATEO, R. 2013. Environmental factors influencing the prevalence of *Clostridium botulinum* type C/D mosaic strain in nonpermanent Mediterranean wetlands. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 4264-4271.
- WHITLOCK, R. H. & McADAMS, S. 2006. Equine botulism. *Clinical Techniques in Equine Practice* 5: 37-42.
- WORK, T.M., KLAVITTER J.L., REYNOLDS, M.H. & BLEHERT, D. 2010. Avian botulism: a case study in translocated endangered Laysan ducks (*Anas laysanensis*) on Midway Atoll. *Journal of Wildlife Disease* 46: 499-506.
- WORRALL, P., PEBERDY, K. J. & MILLETT, M.C. 1997. Constructed wetlands and nature conservation. *Water Science and Technology* 35: 205-213.
- WOUNDSTRA, C., SKARIN, H., ANNIBALLI, F., FENICIA, L., BANO, L., DRIGO, I., KOENE, M., BÄYON-AUBOYER, M.H., BUFFEREAU, J.P., DE MEDICI, D. & FACH, P. 2012. Neurotoxin gene profiling of *Clostridium botulinum* types C and D native to different countries within Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 3120-3127.

