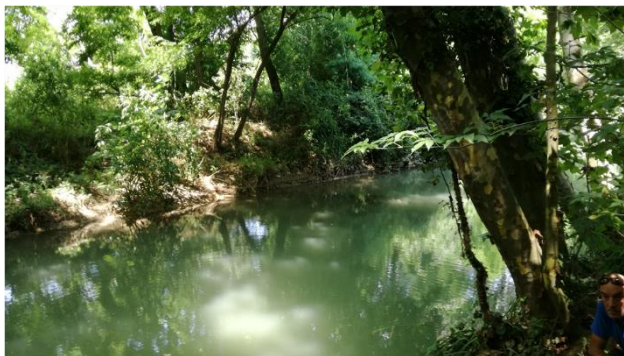




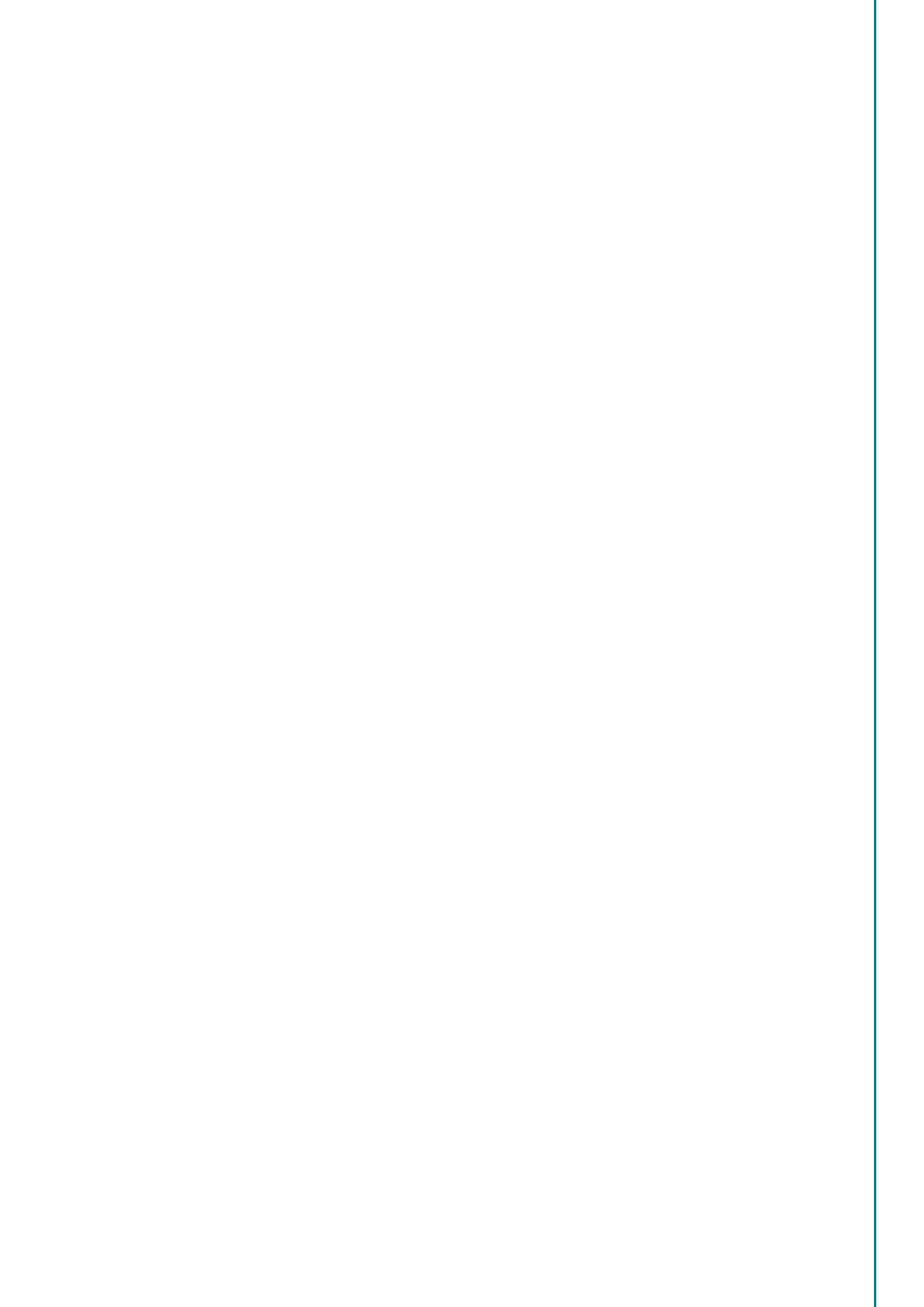
PROVA PILOT PER L'ESTUDI DE LA VIABILITAT DE LA NÀIADA (*Unio mancus*) COM A SENTINELLA DE MALALTIES INFECCIOSES D'IMPORTÀNCIA PER A LA SALUT PÚBLICA



INFORME TÈCNIC FINAL



Novembre de 2019





Coordina:



Plaça dels Estudis, 2
17820 – Banyoles
Web: <http://www.consorcidelestany.org>

Redactat per:

Dr. Roberto Merciai
Ambientòleg
Consorci de l'Estany

Miquel Campos
Biòleg
Consorci de l'Estany

Dr. Oscar Cabezón
Veterinari
Universitat Autònoma de Barcelona

Dr. Ignasi Marco Sánchez
Veterinari
Universitat Autònoma de Barcelona

Dr. Rafael Araujo
Biòleg
Museo Nacional de Ciencias Naturales [CSIC]

Finançat per:



Diputació de Girona



Obra Social "la Caixa"





Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccioses d'importància per a la salut pública.

ÍNDEX

CAPÍTOL 1 – INTRODUCCIÓ GENERAL	3
1. SITUACIÓ	3
2. PROMOTOR	4
3. JUSTIFICACIÓ	6
4. LES NÀIADES	8
<i>El cicle biològic de les nàiades</i>	<i>9</i>
<i>El laboratori de cria de nàiades de l'estany de Banyoles</i>	<i>10</i>
<i>Protocol de reproducció en captivitat</i>	<i>11</i>
<i>Re població de nàiades al medi natural</i>	<i>15</i>
5. EL PROJECTE	17
<i>Objecte.....</i>	<i>17</i>
<i>Àrea d'actuació.....</i>	<i>18</i>
<i>Organismes biològics emprats</i>	<i>21</i>
6. ACTUACIONS	24
<i>ACTUACIÓ 1: Exposició experimental d'Unio mancus a agents infecciosos.</i>	<i>24</i>
<i>ACTUACIÓ 2: Estudi en el medi natural de la presència d'agents infecciosos a través d'Unio mancus</i>	<i>24</i>
<i>ACTUACIÓ 3: Producció y repoblació de nàiades al medi natural</i>	<i>25</i>
CAPÍTOL 2: LA NÀIADE UNIO MANCUS COM A SENTINELLA D'AGENTS INFECCIOSOS (ACTUACIONS 1 I 2)	27
<i>Introducció.....</i>	<i>27</i>
7. AVALUACIÓ EXPERIMENTAL EN LABORATORI AMB ENTERO-BACTERIACEAE RESISTENTS A ANTIBIÒTICS (ACT. 1)	31
<i>Objectiu.....</i>	<i>31</i>
<i>Metodologia.....</i>	<i>31</i>
<i>Recol·lecció i instal·lació de les nàiades</i>	<i>31</i>
<i>Preparació de l'inòcul i procediment</i>	<i>32</i>
<i>Mostreig</i>	<i>32</i>
<i>Anàlisi de teixits i aigua</i>	<i>33</i>
<i>Resultats i discussió</i>	<i>33</i>
<i>Conclusions.....</i>	<i>34</i>
8. AVALUACIÓ EXPERIMENTAL EN LABORATORI AMB EL PARÀSIT ZONÒTIC TOXOPLASMA GONDII (ACT. 1)	35
<i>Objectiu.....</i>	<i>35</i>
<i>Metodologia.....</i>	<i>35</i>
<i>Resultats i discussió</i>	<i>36</i>
<i>Conclusions.....</i>	<i>36</i>
9. AVALUACIÓ EXPERIMENTAL EN LABORATORI AMB EL VIRUS DE L'HEPATITIS E (ACT. 1).....	37
<i>Objectiu.....</i>	<i>37</i>
<i>Metodologia.....</i>	<i>37</i>
<i>Resultats i discussió</i>	<i>38</i>
<i>Conclusions.....</i>	<i>38</i>
10. ESTUDI EN EL MEDI NATURAL DE LA PRESÈNCIA D'AGENTS INFECCIOSOS A TRAVÉS D'UNIO MANCUS (ACT 2).....	39

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

<i>Introducció</i>	39
<i>Objectiu</i>	39
<i>Metodologia</i>	39
<i>Resultats</i>	43
<i>Discussió</i>	46
<i>Conclusions</i>	47
11. CONCLUSIONS GENERALS.....	49
CAPÍTOL 3: PRODUCCIÓ I REPOBLACIÓ DE NÀIADES AL MEDI NATURAL (ACTUACIÓ 3)	51
<i>Objectiu</i>	51
<i>Metodologia de cria</i>	51
<i>Producció de juvenils i repoblació</i>	53
<i>Metodologia d'engreix</i>	56
<i>Experiment de cultiu in vitro</i>	61
<i>Histologia</i>	64
CAPÍTOL 4: CARTOGRAFIA DE LA VEGETACIÓ DE RIBERA DEL RIU TERRI	67
<i>Objectius</i>	67
<i>Anàlisi i definició</i>	67
<i>Metodologia</i>	68
<i>Llegenda</i>	70
<i>Simplificacions derivades del mapa de vegetació</i>	74
<i>Selecció dels punts de repoblació d'Unio mancus</i>	78
<i>Característiques dels punts seleccionats:</i>	78
BIBLIOGRAFIA	81
ANNEX I	85
ANNEX II	85

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccioses d'importància per a la salut pública.

CAPÍTOL 1 – INTRODUCCIÓ GENERAL

1. SITUACIÓ

La nàiada allargada (*Unio mancus*) és un bivalve d'aigua dolça molt sensible als canvis del medi aquàtic on viu. Presenta unes bones qualitats com a bioindicador. És un invertebrat filtrador que s'alimenta de les partícules i organismes que viuen en la columna de l'aigua i en el sediment. Filtren un gran volum d'aigua i per això acumulen en el seu interior una gran quantitat de microorganismes, entre els quals es troben virus, bacteris i paràsits zoonòtics i, per tant, d'interès per la salut pública.

Els agents infecciosos que afecten a l'ésser humà i que tenen origen animal són estudiats, actualment, en el marc del concepte "Una Sola Salut" (*One Health*). Es tracta d'integrar el seu estudi en diferents àrees del coneixement: la salut humana, la salut animal i la salut mediambiental, de manera que es pugui enriquir amb informació transversal i pluridisciplinària de l'epidemiologia de les malalties infeccioses.

Així doncs, en la prova pilot realitzada en aquest informe, es vol assajar la viabilitat de l'espècie *U. mancus* com a sentinella per la detecció i monitorització de malalties infeccioses com ara el paràsit zoonòtic *Toxoplasma gondii*, el bacteri *Escherichia coli* i el Virus de l'Hepatitis E (VHE). Es pretén assolir tres objectius generals: 1) estudiar la potencialitat de *U. mancus* d'emmagatzemar aquests tres agents infecciosos a través de la seva exposició experimental en condicions controlades, 2) estudiar la presència d'aquests agents infecciosos a individus de *U. mancus* de l'Estany de Banyoles i a la conca del riu Terri, i 3) treballar en la recuperació de les poblacions d'aquesta nàiada dins aquest territori/ecosistema.

Aquest treball s'executa a través de la cooperació entre el Laboratori de cria de nàiades de l'Estany de Banyoles (gestionat pel Consorci de l'Estany), el Servei d'Ecopatologia de Fauna Salvatge de la Facultat de Veterinària (Universitat Autònoma de Barcelona) i el Museo Nacional de Ciencias Naturales (Centro Superior de Investigaciones Científicas - CSIC).

Per altra banda cal indicar que les actuacions realitzades han sigut possibles gràcies al finançament del projecte per part de la Diputació de Girona (aprovació per Junta de Govern de 17 d'abril 2018) i l'Obra Social de la Caixa, i gràcies al projecte de col·laboració entre la Diputació de Girona i la Caixa en matèria d'espais naturals 2017". El projecte finançat ha comportat un ajut de 75.000,00 € executats durant el període 1 de gener de 2018 a 15 de novembre de 2019.



Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

2. PROMOTOR

El projecte desenvolupat en la present memòria ha estat promogut pel Consorci de l'Estany i el Servei d'Ecopatologia de Fauna Salvatge (Universitat Autònoma de Barcelona). També hi col·labora el Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid (CSIC) a través del Dr. Rafael Araujo, especialista en bivalves d'aigua dolça.

Entitats promotores:

CONSORCI DE L'ESTANY

Plaça dels Estudis, 2, 17.820 – Banyoles

Tel./fax. 972 57 64 95

mcampos@consorcidelestany.org; <http://www.consorcidelestany.org>

SERVEI D'ECOPATOLOGIA DE FAUNA SALVATGE

Universitat Autònoma de Barcelona

Edifici Rectorat – Campus UAB (08193, Bellaterra)

Tel./fax. 935813445

oscar.cabazon@uab.cat

La relació entre les dues entitats beneficiàries associades s'ha establert a través d'un conveni de col·laboració per l'execució del present projecte de recerca en base a la Llei 38/2003, de 17 de novembre, General de Subvencions, i seguint les condicions indicades als seus articles 11 i 13.

Ambos entitats han proporcionat un equip executiu per a la realització del projecte format per diversos especialistes que han participat de diferent manera en funció de les activitats a desenvolupar.

Pel Consorci de l'Estany (CES) s'han dedicat al projecte dos treballadors, Miquel Campos, el tècnic coordinador i responsable tècnic del Laboratori de cria de nàiades i especialista en la cria de nàiades, i un tècnic auxiliar, Roberto Merciai, que va ser contractat específicament. Puntualment, i quan ha estat necessari hi han participat en el desenvolupament d'activitats altre personal del Consorci o estudiants en pràctiques.

Pel que fa al Servei d'Ecopatologia de Fauna Salvatge de la Universitat Autònoma de Barcelona hi ha participat, com a responsable investigador, el Dr. Oscar Cabezón. Investigador ordinari que ha dut a terme el disseny experimental, execució, anàlisi i redacció dels documents resultants. La seva dedicació ha estat parcial al llarg de tot el període d'execució. Per altra banda, ha participat el Dr. Ignasi Marco, tan en la coordinació com en el disseny experiment i anàlisi de resultats. Aquest equip ha estat complementat al final de període executiu per Johan Espunyes Nocieres per facilitar el tractament final de les mostres. També hi han participat altres col·laboradors com



Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

la Dra. Lourdes Migura (microbiòloga) i estudiants de màster en pràctiques universitàries que realitzen al SEFAS.

Per altra banda, i formant part de l'equip, es va realitzar un contracte d'assessorament del Dr. Rafael Araujo, investigador especialista en el bivalves d'ambients continentals, en concret en el grup dels Uniònid que també havia participat en els projectes LIFE de Banyoles (LIFE Projecte Estany i LIFE Potamo Fauna). Ha format part de les decisions en els dissenys experimentals, seguiment i revisió de documents.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

3. JUSTIFICACIÓ

El concepte "Una Sola Salut" (One Health) consisteix en abordar l'estudi i el control dels agents zoonòtics (agents infecciosos que afecten a l'ésser humà i que tenen un origen animal) integrant diferents àrees de coneixement: la salut humana, la salut animal i la salut mediambiental. En un principi, aquest concepte s'estava treballant des de les àrees de salut humana i animal (metges, veterinaris, ramaders, etc.). En aquests moments ja es treballa per enriquir la informació sobre l'epidemiologia de les malalties infeccions amb els professionals del medi ambient. Es busca un equip òptim que disposi d'una visió transversal i multidisciplinària.

La nàiada allargada (*Unio mancus*) és un bivalve d'aigua dolça molt sensible als canvis del medi aquàtic on viu i la seva qualitat. És una espècie que es troba catalogada en perill crític per la International Union for Conservation of the Nature (IUCN), amenaçada i protegida per diverses normes, també forma part del catàleg nacional espanyol amb la categoria de "vulnerable", com també la Directiva Hàbitats de la CE. Les nàiades o musclos d'aigua dolça són un grup d'invertebrats que filtren un gran volum d'aigua del medi amb l'objectiu d'alimentar-se. Està descrit que com a conseqüència d'aquest mecanisme de filtració, acumulen gran quantitat de microorganismes, entre els quals es troben virus, bacteris i paràsits zoonòtics i, per tant, d'interès per la salut pública.

Existeixen treballs científics que han usat la capacitat filtradora de les nàiades com a tècnica aplicada per l'estudi de malalties, per exemple:

- M. Palos Ladeiro, D. Aubert, I. Villena, A. Geffard & A. Bigot. 2014. *Bioaccumulation of human waterborne protozoa by zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): Interest for water biomonitoring*. Water Research núm. 48, 148-155.
- M. Palos Ladeiro & A. Bigot-Clivot & D. Aubert & I. Villena & A. Geffard. 2015. *Assessment of *Toxoplasma gondii* levels in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) by real-time PCR: an organotropism study*. Environmental Science and Pollution Research núm. 22:13693-13701
- Niveen S. Ismail, Jake P. Tommerdahl, Alexandria B. Boehm, and Richard G. Luthy. 2016. *Escherichia coli Reduction by Bivalves in an Impaired River Impacted by Agricultural Land Use*. Environmental Science & Technology, núm. 50, 11025-11033

El medi aquàtic en particular (rius, llacs, maresmes, etc.) són el destí de nombrosos d'aquests microorganismes que tenen el seu origen a l'activitat i concentració humana: ciutats, depuradores, explotacions ramaderes, etc. Tot i així, la importància d'aquests ecosistemes en la dispersió d'aquests agents infecciosos perillosos per la salut pública no es coneix en detall.

El coneixement dels diferents factors que actuen en la dispersió d'aquests microorganismes en el medi és bàsic per establir les bases de futures línies d'actuació en matèria de Salut Pública.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccioses d'importància per a la salut pública.

Així doncs, aplicar el coneixement de cria en captivitat dels musclos d'aigua dolça, aprofitar la seva capacitat filtradora i aplicar les tècniques moleculars pot esdevenir un nou mètode de detecció de patògens en el medi aquàtic a través de l'ús de les nàiades com a sentinelles.

El projecte executat que es presenta ha treballat en tres grups biològics diferents d'organismes microscòpics: els protozous, els bacteris i els virus. El seu estudi tant en un medi controlat de laboratori i el seu posterior monitoreig en el medi natural fan la proposta més interessant i singular. Per altra banda, el fet de treballar amb una espècie la qual el Laboratori de cria de nàiades de l'Estany de Banyoles en disposa d'estoc suficient i produït a través de tècniques d'aqüicultura, i sumat a la necessitat de revalorització de les espècies protegides fan que aquesta iniciativa sigui excepcional i d'elevat interès.

El resultat esperat és confirmar l'espècie *U. mancus* com a òptim sentinella de la presència d'algun dels agents infecciosos analitzats (*T. gondii*, *E. coli* multiresistent a antibiòtics, VHE), tant experimentalment com en condicions naturals.

Els resultats obtinguts en aquest projecte són estratègics per a establir línies futures de monitorització d'agents infecciosos perillosos per la Salut Pública.

Més enllà de la importància dels resultats obtinguts de la presència d'un o més dels microorganismes estudiats al medi ambient, aquest estudi obre la porta a la necessitat d'establir programes de control de zoonosis presents al medi, reconeixent l'ecosistema aquàtic com a un ens viu en sí mateix. Els resultats generats ajuden a augmentar el coneixement de la epidemiologia dels agents infecciosos estudiats, i a l'elaboració de models de distribució d'aquests microorganismes al medi natural.

Un altre impacte positiu és la posada en valor de les espècies autòctones amenaçades, com les nàiades, com a indicador de la contaminació del medi ambient i com a actor en la neteja del medi d'agents infecciosos per la Salut Pública.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

4. LES NÀIADES

Les nàiades o grans bivalves d'aigua dolça (*Mollusca*, *Bivalvia*, *Unionoidea*) es distribueixen per tot el món a excepció del continent antàrtic. Potser la principal característica d'aquests mol·luscs és el seu cycle vital (veieu figura 1). Una de les etapes del cycle és la paràsita de peixos, on existeix una elevada especificitat entre espècies de nàiades i les espècies de peixos que fa que sigui clau en la seva reproducció (no totes les espècies de peixos poden actuar com a hostes de les larves paràsites de les nàiades). Aquesta i altres raons poden fàcilment explicar perquè les nàiades estan considerades actualment com un dels grups animals més amenaçats del planeta.

Una altra característica important de les nàiades és el paper que juguen en els ecosistemes d'aigua dolça on viuen, i es pot afirmar que en un ecosistema sense modificar les nàiades serien el grup d'animals amb major biomassa (Negus, 1966). Intervenien a més en la dinàmica dels nutrients dels sistemes aquàtics, remenant fitoplàncton, bacteris i matèria orgànica de l'aigua i sediment i col·laboren en la bioturbació dels fons augmentant el seu contingut d'oxigen (Strayer i col., 1999; Vaughn, Nichols & Spooner, 2008).

Són, a més, espècies amb un alt poder bioindicador, el que probablement ha volgut reflectir el nom de nàiade, en referència a les fades o nimfes que mantenen la puresa de les aigües dolces. D'aquesta manera, la presència o la desaparició documentada de les poblacions reproductores amb exemplars juvenils d'aquests mol·luscs, pot ser de gran utilitat per conèixer canvis en l'estat de qualitat i conservació de les aigües superficials, el que fa de les nàiades excel·lents espècies sentinelles de la qualitat de l'ecosistema.

Com està passant en altres parts del món, també a la península Ibèrica, els Unionoideus són actualment un dels grups animals més amenaçats de desaparició. Entre les causes fonamentals estan la fragmentació i/o desaparició dels seus hàbitats (detraccions d'aigua, alteració dels cabals i fluxos per les centrals hidroelèctriques i regs, augment exponencial d'indústries contaminants i cultius), encara que altres factors com la presència d'espècies de peixos i bivalves invasors també poden estar jugant un paper important (Bogan, 1993; Ricciardi, Neves & Rasmussen 1998; Lydeard i col., 2004; Strayer i col., 2004).

Actualment es considera l'existència a la península Ibèrica de les següents 10 espècies (Araujo i col., 2009): *Margaritifera auricularia* (Spengler, 1793), el *M. margaritifera* (L., 1758), *Potomida littoralis* (Cuvier, 1798), *Unio mancus* Lamarck, 1819, *U. gibbus* Spengler, 1793, *U. delphinus* Spengler, 1793, *U. tumidiformis* Castro, 1885, *U. ravoisieri* Deshayes, 1847, *Anodonta anatina* (L. 1758) i *A. cygnea* (L., 1758), de les quals 4 viuen a l'Estany de Banyoles: *U. mancus*, *U. ravoisieri*, *P. littoralis*, i *A. anatina*.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

El cicle biològic de les nàiades

El cicle biològic d'aquest grup d'invertebrats és complex i presenta diverses fases que fan disminuir el seu èxit de supervivència. Cicle similar en tots els uniónids però amb diferències importants en la seva durada. L'individu masculí allibera a l'aigua els seus espermatozoides durant la primavera de cada any, la femella els captura i fecunda els seus òvuls dins d'ella mateixa. Òvuls que es desenvolupen en el seu interior fins a donar lloc a milers de larves anomenades gloquidis que són alliberades a l'aigua (tenen una mida d'unes 200 micres en el cas *Unio mancus*). Aquestes larves són paràsits dels peixos autòctons on existeix una elevada especificitat, s'instal·len principalment a les brànquies on hi formen un petit quist i s'alimenten dels fluids sanguinis de peix hoste. Durant aquesta etapa, la larva realitza un procés de metamorfosi amb una durada de entre 7 i 20 dies (en el cas d'*Unio mancus*) fins a donar lloc a un juvenil. En aquest moment es deixa anar del peix i cau fins arribar a un sediment adequat on hi passarà la resta de la seva vida. En aquest lloc creixerà fins a formar-se com a nou individu adult reproductor; el temps fins a la seva maduresa oscil·la entre 3 o 4 anys.

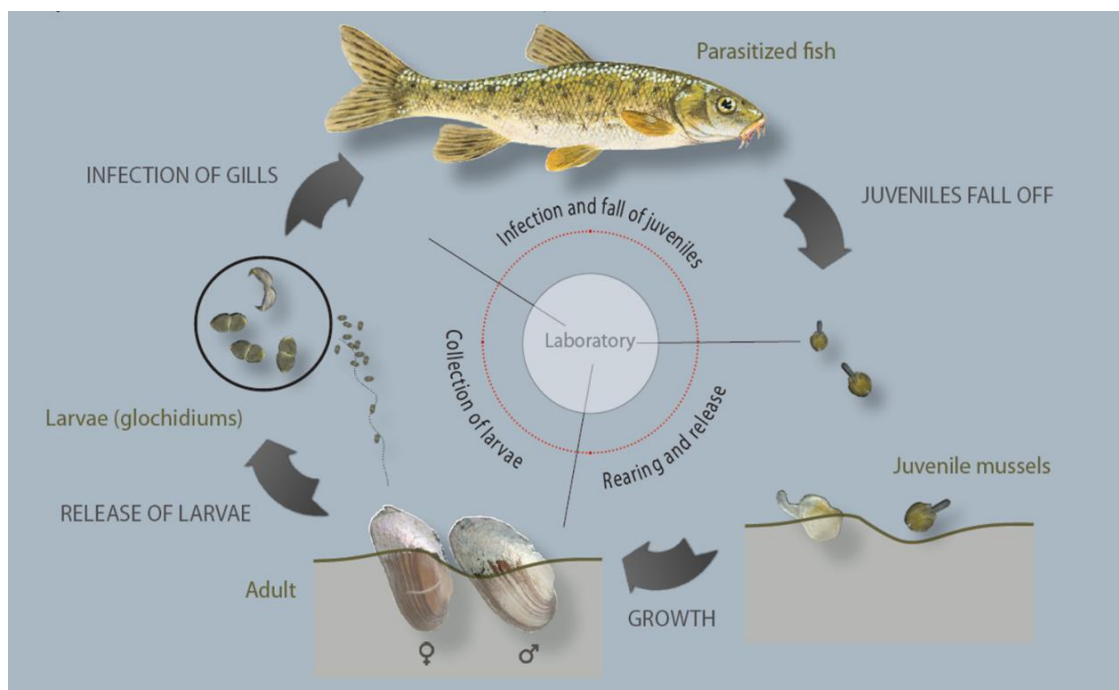


Figura 1. – El cicle vital de les nàiades, en concret d'*Unio mancus*.

Tant la fase d'alliberament dels espermatozoides, com el contacte amb el peix autòcton viable per la fase paràsita, com la caiguda del juvenil en un lloc adequat on implantar-se passa per una probabilitat d'èxit baixa. Aquest fet fa que el seu èxit de supervivència depengui d'un estoc reproductor amb poblacions amb nombrosos individus. La bona qualitat de l'hàbitat, la bona estructura poblacional de les

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccioses d'importància per a la salut pública.

poblacions de peixos autòctons, la baixa contaminació, la manca de patògens, etc. són paràmetres importants que condicionen a la supervivència d'aquestes espècies.

El laboratori de cria de nàiades de l'estany de Banyoles

L'any 2010, i gràcies al projecte LIFE Projecte Estany [LIFE08 NAT/E/000067], el Consorci de l'Estany va iniciar la construcció del Laboratori de cria de nàiades de l'Estany de Banyoles. Laboratori situat a la finca de Casa Nostra al terme municipal de Porqueres i a uns 500 m de la riba de l'Estany de Banyoles. Laboratori que ha estat ampliat i millorat per diferents ajuts de la Diputació de Girona i la Obra Social de la Caixa. L'any 2014, i arran de l'inici del projecte LIFE Potamo Fauna [LIFE12 NAT/ES/001091] va rebre una nova inversió important que va permetre la millora de les instal·lacions a través de la construcció de nous canals i adquisició d'equips.

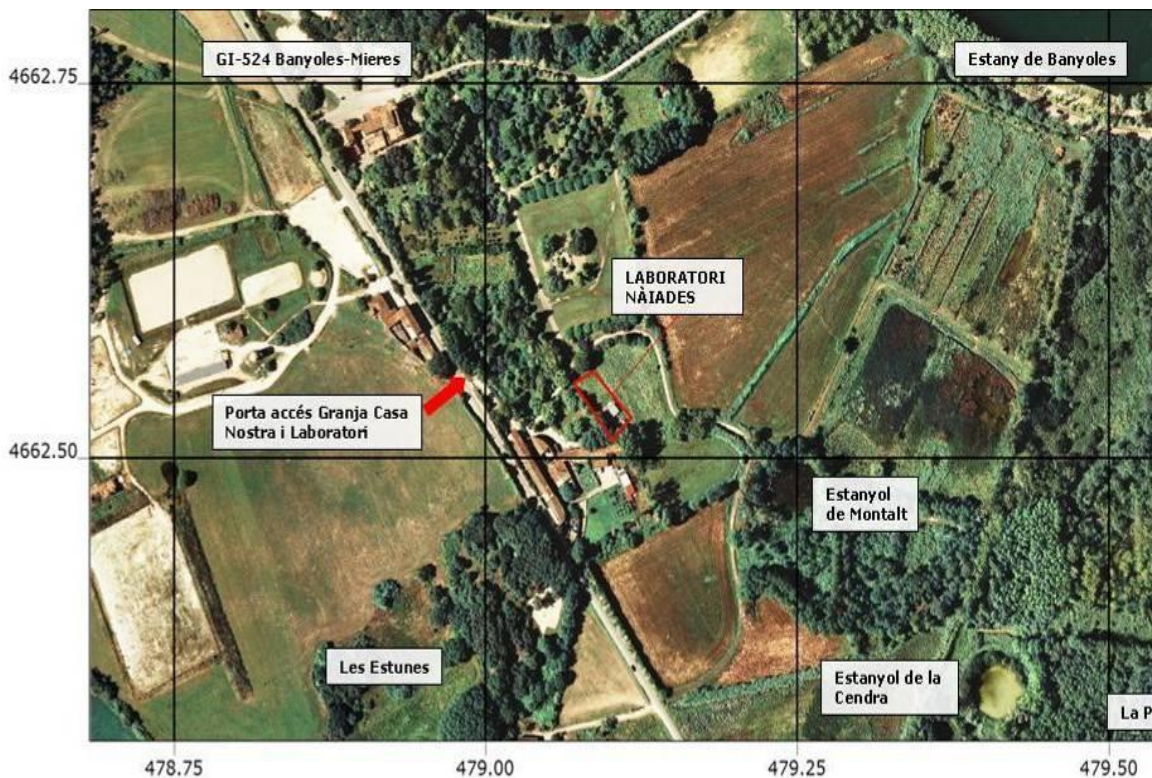


Figura 2. – Localització del laboratori de cria de nàiades.

El laboratori de cria de nàiades té per objectius:

- Mantenir en bones condicions poblacions de peixos i nàiades adultes que han de servir per a l'obtenció de juvenils de nàiades.
- Millorar el coneixement de la biologia reproductiva de les nàiades: peixos hoste, fenologia, període de maduració, relació amb la temperatura, viabilitat

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

dels juvenils, patologies, etc.

- Reproduir amb èxit les diferents espècies de nàiade objecte de conservació a la província de Girona.
- Optimitzar i millorar de forma constant el sistema de cria de nàiades, des de la infecció dels peixos amb els gloquidis, passant per la recollida dels juvenils, fins a l'engreix i creixement d'aquests juvenils.
- Obtenir milers de juvenils viables cada any.
- Mantenir un estoc permanent d'individus juvenils per a repoblar el medi natural.
- Establir les bases metodològiques per a la reproducció de nàiades que puguin servir d'experiència per a altres projectes similars d'arreu del món
- Esdevenir un centre de referència en la conservació de nàiades a nivell català, espanyol i europeu.

Actualment, aquest laboratori, és referent a nivell peninsular i l'únic de les seves característiques. Ha pogut aportar coneixement i millores tècniques al cicle reproductor d'aquests organismes en captivitat i així ho demostren dues de les seves publicacions:

- Araujo, R, C. Feo, M. Campos and Q. Pou. 2015. Conservation of two endangered European freshwater mussels (Bivalvia: Unionidae): A three-year, semi-natural breeding experiment. *The Nautilus* 129(3): 126–135, 2015
- Araujo R, Campos M, Feo C, Varela C, Soler J, Ondina P. *Who wins in the weaning process? Juvenile feeding morphology of two freshwater mussel species*. *Journal of Morphology*. 2017;00:000–000. <https://doi.org/10.1002/jmor.20748>

Protocol de reproducció en captivitat

El protocol de cria desenvolupat en el Laboratori de cria de nàiades de l'Estany de Banyoles es fonamenta en tres etapes principals: la recollida de larves gloquidi, la infecció de peixos amb les larves gloquidi, incubació i recollida de juvenils, i engreix dels juvenils (veieu Figura 1). Aquest protocol ha estat assajat i és apte per les diferents nàiades autòctones de la província de Girona.

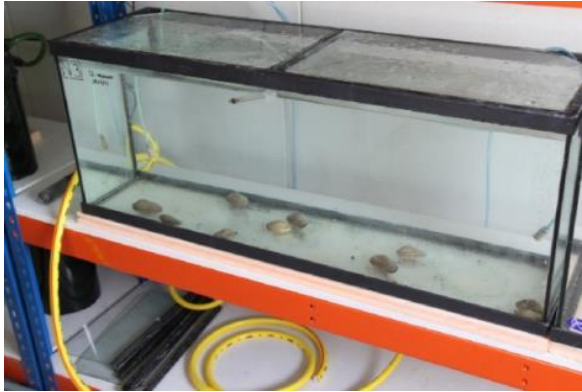
A continuació es descriuen breument les diferents fases:

La recollida de larves gloquidi

Es tracta de la recollida a la natura d'exemplars femelles de musclos d'aigua dolça madures, anomenades gràvides, amb ous fecundats o també amb gloquidis. Aquestes es disposen en aquaris sense sediment i sense filtració. Les femelles gràvides alliberen, abans d'un mes, les larves gloquidi en forma de filaments que acaben formant grumolls densos i enganxosos. Aquests grumolls es recullen amb una pipeta i es reserven en una placa de petri. Amb l'ajut de la lupa binocular i amb pinces es provoca una agitació del grumoll i s'aconsegueix separar els gloquidis per

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccioses d'importància per a la salut pública.

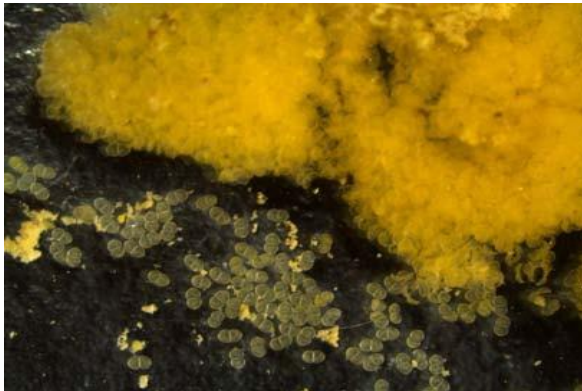
unitats. Gloquidis que es pipetegen de nou i es reserven en un pot per procedir a la infecció dels peixos (veieu Figura 3).



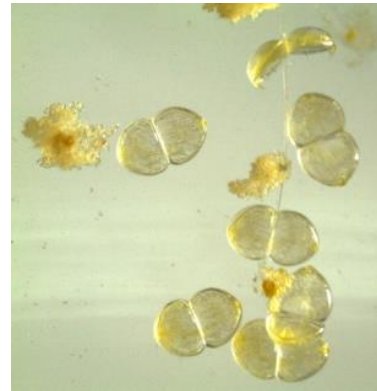
A - Aquari amb exemplars de nàiades gràvides



B - Grumolls de gloquidis enganxats al vidre de l'aquari o al tub d'oxigenació



C- Detall del grumoll de gloquidis



D - Vista dels gloquidis aïllats a través de la lupa binocular

Figura 3. La recollida de larves gloquidis.

Infecció de peixos i recollida de juvenils

Per dur a terme aquesta etapa (veieu Figura 4) és necessari disposar de peixos autòctons aptes per la infecció i d'un estoc de gloquidis. Els peixos autòctons que s'utilitzen al laboratori de cria de nàiades de l'Estany de Banyoles són el barb de muntanya (*Barbus meridionalis*) i el barb de l'Ebre (*Luciobarbus graellsii*). Aquestes dues espècies es capturen a la natura en llocs on es disposa de poblacions sanes i lliures de nàiades (per què no tinguin gloquidis), normalment al riu Terri. Es recullen exemplars de mida mitjana quinze dies o un mes abans de l'inici de les infeccions per tal que aquests individus hagin fet un petit procés d'adaptació a la captivitat.

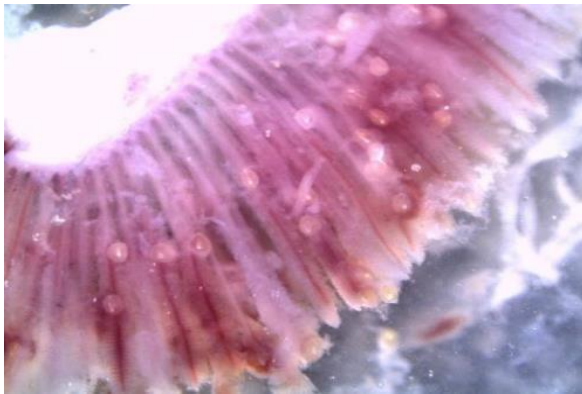
Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.



A - Tanc amb peixos (barb de muntanya) en aclimatació i reserva



B - Caixes de plàstic on es realitza la infecció dels peixos amb les gloquidis preseleccionats



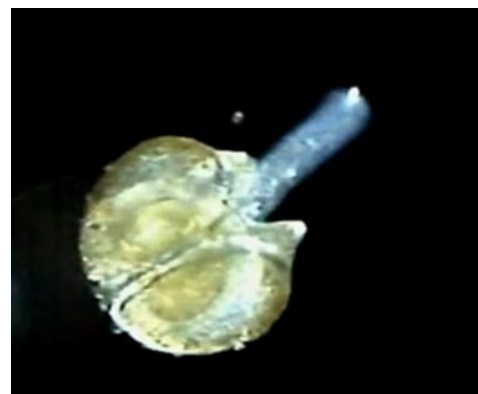
C - Brànquia d'un peix amb els gloquidis enquistats



D - Tancs cilindre-cònics per la residència dels peixos infectats i per la recollida de juvenils



E - Recipient pel filtratge dels juvenils recent nascuts en els cilindre-cònics



F - Juvenil acabat de néixer. Té una mida de 265 micres.

Figura 4. Infecció de peixos i recollida de juvenils.

Un cop es disposa dels peixos i també del concentrat dels gloquidis obtinguts a través de la fase anterior, es procedeix a posar en contacte els peixos i els gloquidis. Procés

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccioses d'importància per a la salut pública.

que dura de 3 a 5 minuts. Un cop infectats els peixos, aquests es col·loquen en tancs de 70 litres que disposen un sistema de renovació de l'aigua. Tancs on els peixos poden alimentar-se i medicar si s'escau. Passats un dies són traslladats a un altres dipòsits, els cilíndrics. Aquí els peixos no s'alimenten per evitar que s'embrutin les mostres de juvenils, es renova l'aigua de forma automàtica i l'aigua sortint del sistema es filtra a través d'una malla de 200 micres. Tot el procés té una durada d'entre 7 i 21 dies en funció de la temperatura de l'aigua. En aquest filtre és on queden atrapats els juvenils que s'han de traspasar a un altre filtre de concentració i neteja. El material obtingut de la filtració es trasllada a una placa de petri i és revisat amb lupa binocular, on es comptabilitzen, es seleccionen i es netegen abans de procedir a la seva sembra.



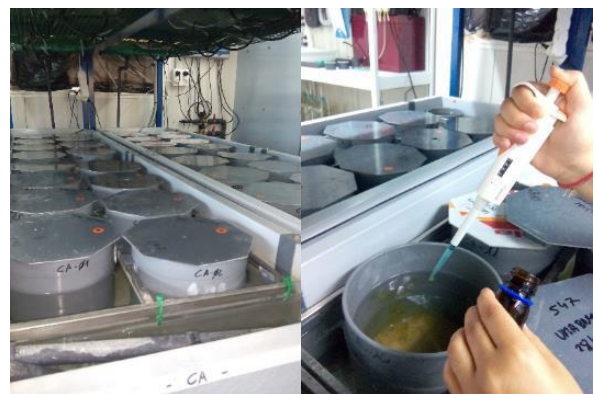
A – Piscina amb sediment al fons



B – Canals



C – Contenedors amb alimentació manual.



D – Canals amb filtres de cultiu i alimentació manual amb microalgues

Figura 5. Sistemes d'engreix de juvenils.

Engreix de juvenils

Un cop s'han obtingut els juvenils es pot procedir a sembrar-los en els sistemes d'engreix. Sistemes que són diversos. Hi ha sistemes extensius situats a l'aire lliure com per exemple piscines i canals; i d'altres intensius a l'interior del laboratori: tancs amb cilindres de cultiu (recipients amb una malla de filtre al fons) on s'alimenten de forma artificial i amb microalgues marines. La Figura 5 il·lustra els diferents sistemes.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

Els sistemes d'interior s'utilitzen per temporada. S'ha pogut comprovar que el primer any de vida dels juvenils és el més delicat, i un cop superat aquest període la supervivència és més estable (es troba al voltant del 90%). Les piscines i els canals exteriors permeten mantenir un estoc important de juvenils sense la necessitat d'una alimentació continuada; l'aliment prové de l'aigua natural, que prové de l'estany, i que es renova de forma continua, i també del sediment.

Els sistemes interiors necessiten d'atenció i, per tant, d'una mà d'obra continuada. S'ha pogut comprovar que les tècniques desenvolupades a Banyoles estan millorant el mètode de cultiu i la seva eficiència. Aquest any 2017 s'han realitzat noves experiències que han permès superar el període crític (0 a 200 dies després del naixement) amb un supervivència del voltant del 60%; quan anys enrere no s'arribava al 10%.

Re població de nàiades al medi natural

La repoblació o reforçament poblacional amb nàiades al medi natural es pot realitzar amb diferents tècniques. En el Consorci de l'Estany i gràcies als projectes LIFE Natura, LIFE Projecte Estany i LIFE Potamo Fauna, s'han assajat diverses tècniques de repoblació i s'ha obtingut l'experiència pràctica amb bons resultats. A continuació es comenten breument les tècniques principals:

Re població amb peixos infectats amb larves gloquidi

És una de les tècniques més emprada i generalitzada. Es tracta de l'alliberament de peixos recent infectats amb gloquidis en masses d'aigua adequades i amb potencial per la repoblació de nàiades. Aquesta tècnica és difícil d'avaluar la seva efectivitat. Al cap de 7 o 20 dies d'haver-se infectat els peixos els juvenils comencen a alliberar-se de les nàiades presents a les seves brànquies i aquestes nàiades cauen al sediment. Durant aquest temps els peixos s'hauran desplaçat al llarg del curs d'aigua de manera que no es pot saber el lloc de caiguda dels juvenils. Al cap de 3 o 4 anys es pot comprovar si la tècnica ha funcionat.

Els treballs de repoblació amb peixos infectats duts a terme pel Consorci de l'Estany a l'Estany de Banyoles i als recs de desguàs han resultat molt positius. S'ha pogut comprovar l'èxit d'aquesta tècnica. En els recs de desguàs de l'Estany són cursos limitats i molt estudiats; era conegut que abans d'aplicar aquesta tècnica no hi havia nàiades als recs, així doncs, es va poder comprovar que al cap de 3 anys la presència de individus juvenils de 3 a 4 cm a la majoria de recs.

És una tècnica vàlida i senzilla que és emprada en la majoria de projectes de repoblació.

Alliberament de juvenils recent nascuts

Aquesta tècnica necessita disposar d'un laboratori de cria de nàiades per tal de poder disposar de juvenils recent nascuts. Es tracta d'una tècnica mixta. S'aplica el protocol de cria en captivitat dels musclos d'aigua dolça fins a superar l'etapa d'infecció del peix hoste, és a dir, fins que el juvenil neix. Els juvenils nascuts són recollits en els

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccioses d'importància per a la salut pública.

filtres dels dipòsits cilíndrics i es preparen per la repoblació: es netegen, es comptabilitzen i se seleccionen. Els lots de juvenils nascuts es traslladen als punts de repoblació on seran alliberats. Aquests punts han de ser estudiats prèviament, presentar la potencialitat i ser adequats per assegurar l'èxit de la repoblació.

És una tècnica vàlida i més costosa en temps i mà d'obra. Els resultats són avaluable: es pot saber l'estoc d'individus alliberats, es coneix el lloc exacta de l'alliberament i es pot estudiar amb facilitat l'èxit de la repoblació passat un temps (dos o tres anys), quan els juvenils tenen ja una mida que permeti recuperar-los.

Repoblació amb nàiades engreixades al laboratori

En aquesta tècnica es tracta d'aplicar el protocol complet de cria en captivitat: recollida de gloquidis, infecció de peixos hoste, manteniment dels peixos, recollida de juvenils, engreix dels juvenils. Els juvenils recent nascuts en captivitat se sembren amb les diferents tècniques d'engreix. Es mantenen en captivitat fins que disposen una mida d'un 3 a 4 cm (3 a 4 anys d'edat) moment en el qual poden ser traslladats i alliberats en el punt de repoblació al medi natural. Els juvenils han de disposar d'una mida adequada per suportar la pressió dels depredadors.

És una tècnica costosa degut al manteniment dels juvenils en instal·lacions de cria durant un període llarg de temps. L'aplicació de la tècnica al medi natural fa que sigui avaluable. Els resultats de la seva aplicació a l'Estany de Banyoles i als recs de desguàs de l'Estany és molt bona.

Translocació d'individus adults de poblacions sanes

Una altra tècnica és el trasllat d'individus adults de nàiades recollits en poblacions mare que estan en bon estat als punts de repoblació. És una tècnica que provoca un impacte sobre la població donant. S'aconsella no utilitzar-la en freqüència.

És poc utilitzada ja que les poblacions actuals de nàiades presents a les nostres contrades és poc adequada. Són poblacions disperses i de poc nombre d'efectius.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccioses d'importància per a la salut pública.

5. EL PROJECTE

Objecte

A la província de Girona es troben poblacions naturals fragmentades d'*Unio mancus* i amb un baix nombre d'individus a la conca del riu Ter i el riu Fluvià, també és present a l'Estany de Banyoles. Gràcies als projectes LIFE (LIFE Projecte Estany i LIFE Potamo Fauna) s'ha permès la seva recuperació.

Aquesta espècie és objecte de cria en captivitat en el Laboratori de cria de nàiades de l'Estany de Banyoles. És una espècie catalogada en el Catàleg espanyol d'espècies amenaçades com a Vulnerable i actualment protegida per diverses normes, com per exemple la Directiva hàbitats de la CE. La seva capacitat de filtració i el que fet es pot cultivar en captivitat fa que sigui un bon candidat com a bioindicador.

En aquest treball s'ha desenvolupat un seguit d'actuacions com a prova pilot per estudiar la viabilitat de l'ús de la nàiada allargada (*Unio mancus*) com a sentinella o sensor biològic per la detecció de malalties infeccioses per a la salut pública.

Els agents zoonòtics que es volen monitoritzar són el paràsit que dona lloc a la malaltia paràsita anomenada toxoplasmosi i que es ocasionada pel protozou *Toxoplasma gondii*, el bacteri *Escherichia coli* i el Virus de l'Hepatitis E (VHE). A més de determinar la presència d'aquests microorganismes a l'interior de les nàiades sentinella, en el cas concret de l'*Escherichia coli*, també determinar la seva resistència en front antibiòtics. La presència de bacteris multiresistents a antibiòtics és un de les principals reptes per la Salut Pública identificats per l'Organització Mundial de la Salut per a aquest segle.

Així doncs s'ha pretès assolir els objectius específics següents:

- **ACTUACIÓ 1** - Assajar a través de l'exposició experimental de nàiades (*Unio mancus*) de 2 a 3 cm de longitud (de 2 a 3 anys d'edat) la capacitat de les nàiades per filtrar i emmagatzemar diferents agents infecciosos zoonòtics potencialment presents (*Toxoplasma gondii*, *Escherichia coli* i VHE) en el medi ambient i en condicions controlades a un laboratori de bioseguretat.
- **ACTUACIÓ 2** - Estudiar, en el medi natural i al llarg d'un any, la presència dels agents infecciosos zoonòtics *Toxoplasma gondii*, *Escherichia coli* i VHE a l'Estany de Banyoles, el seu pas per la ciutat de Banyoles i en diferents punts del riu Terri, a través de l'ús de juvenils (de 2 a 3 cm de longitud) d'*Unio mancus*.
- **ACTUACIÓ 3** - Reforçar poblacions d'*Unio mancus* de l'entorn immediat de l'espai natural protegit de l'Estany Banyoles i expandir l'espècie extinta al llarg del riu Terri a través de la producció de juvenils al laboratori de cria de nàiades de l'Estany de Banyoles.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccioses d'importància per a la salut pública.

Àrea d'actuació

L'Estany de Banyoles, els recs de desguàs del propi estany, la riera Canaleta i el riu Terri són les masses d'aigües on s'han dut a terme les accions d'estudi en el medi natural dels agents infecciosos i els reforçaments poblacionals d'*Unio mancus*.

Per altra banda, els treballs de cria de nàiades s'han executat en al Laboratori de cria de nàiades de l'Estany de Banyoles situat al municipi de Porqueres del Pla de l'Estany i els treballs en laboratori de recerca i de seguretat a les instal·lacions del Servei d'Ecopatologia de Fauna Salvatge a la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona a Bellaterra.

La conca lacustre de l'Estany de Banyoles

La conca lacustre de Banyoles és el punt inferior de surgències d'aigua d'un sistema hidrogeològic de major extensió, anomenat de Banyoles-Garrotxa. L'origen de les aigües és a l'Alta Garrotxa, a 25 km al nord-oest. L'aigua de la pluja i de les escorrenties penetra en un aflorament superficial de calcàries a 900 m d'altitud, originant un enorme aquífer confinat. Aquest aquífer circula vers el sud-est fins que es troba amb materials impermeables, molt a prop de Banyoles, que configuren un dic en el subsòl provocat per la falla coneguda com de Celrà-Albanyà. La dissolució de les capes subjacents de guixos i margues eocèniques per part de l'aigua subterrània va produir enfonsaments del terreny (dolines) en forma de cubetes que donen lloc a petites llacunes o "Estanyols".

L'Estany de Banyoles és la manifestació lacustre més gran d'aquest procés tectònic-càrstic. Es troba situat a 174 m d'altitud i té una extensió de 108,5 ha, un volum de 16,2 hm³, una profunditat mitjana de 14,6 m i una màxima de 132 m. Al seu entorn s'hi han format un 8 estanyols i abundants surgències. La conca de recepció de l'escorrentia superficial de l'entorn de l'Estany de Banyoles és d'uns 12,1 km² i aporta només un 20 % del total d'aigua que rep, mentre que la major part, uns 40.000 m³ al dia, entren de forma subterrània. Només quatre de les rieres que afluïxen a l'Estany són permanents, mentre que la resta dels cursos tributaris són torrents temporals (veieu Figura 6)

Pel que fa a la vegetació, a les ribes hi predomina la vegetació hidròfila de canyissar (*Typho-Schoenoplectetum glauci*) i mansegar (*Soncho maritimi-Cladietum marisci*) formant un cinturó en tot el seu perímetre. També apareixen comunitats de plantes submergides del *Potamogetonetum denso-nodosi*, o formacions de macroalgues, les carofícies (*C. vulgaris*, *C. aspera* o *C. hispida*). Part de la ribera està ocupada per boscos de ribera freixes i verns (*Alno-padion*).

La zona també presenta un elevat interès pel seu poblament faunístic. Així, per exemple, fins al moment s'han citat fins 40 espècies d'odonats (33% de les europees). Tot i la important reducció de les poblacions d'amfibis i rèptils aquàtics, l'herpetofauna inclou fins a 11 espècies d'amfibis reproductors a la zona, destacant *Alytes obstetricans*, *Pelobates cultripes*, *Bufo calamita*, *Hyla meridionalis*, i les dues tortugues aquàtiques autòctones, *Emys orbicularis* i *Mauremys leprosa*. Per altra banda, l'Estany també constitueix un punt important per als ocells aquàtics, ja sigui en la migració la hivernada o en la reproducció, amb espècies com *Nyctocorax nyctocorax*, *Ixobrychus minutus*, *Tringa totanus*, *Actitis hypoleucos*, *Tringa nebularia*,

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccioses d'importància per a la salut pública.

Alcedo atthis, *Tachybaptus ruficollis* o *Fulica atra*, entre altres. Entre els mamífers aquàtics, destacar la presència d'una població estable de llúdriga (*Lutra lutra*).

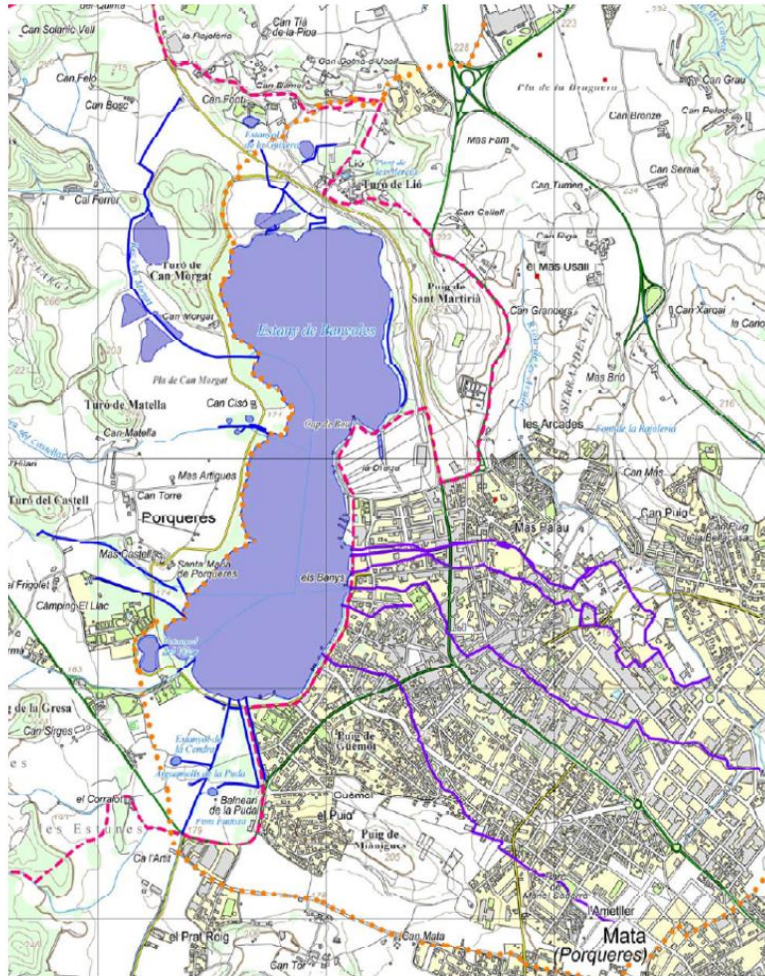


Figura 6. L'Estany de Banyoles i els recs desguàs que creuen pel centre de la ciutat de Banyoles.

L'Estany de Banyoles i els seus estanyols formen part de l'Espai Natural Protegit en la forma de diverses figures de protecció (EIN [PEIN, 1992, Generalitat de Catalunya], xarxa Natura 2000 de la Unió Europea i espai RAMSAR).

Per altra banda, s'ha de tenir en compte que l'Estany, els estanyols i els recs de desguàs de l'Estany són de competència municipal, ja l'ajuntament de Banyoles actua com administrador del bé comunal de l'Estany i és reconegut per la Llei d'aigües (Real Decret Legislatiu 1/2001, de 20 de juliol, pel que s'aprova el text refós de la Llei d'aigües). L'ajuntament de Banyoles actua com a òrgan de conca de la massa d'aigua de l'Estany de Banyoles, l'aigua dels recs fins arribar a la riera Canaleta i al riu Terri. Per altra banda, les aigües que duen la riera Canaleta i el riu Terri fins arribar al seu

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

aiguabarreig al Ter l'òrgan de conca és la Generalitat de Catalunya a través l'Agència Catalana de l'Aigua.

Els recs i sèquies de l'estany de Banyoles

Les aigües de l'Estany de Banyoles vessen cap a la riera Canaleta i al riu Terri a través de cinc recs artificials construïts a l'època medieval pels monjos benedictins del Monestir de Sant Esteve. Els recs creuen la ciutat de Banyoles que és habitada per uns 19.400 habitants. Són de caràcter típicament urbà i en diferents èpoques porten força aigua (veieu Figura 6). En aquests recs s'hi troben les millors poblacions de nàiades de l'espècie *Unio mancus* de la conca de l'Estany de Banyoles i últimament s'ha pogut constatar la presència de peixos autòctons com el barb de muntanya i la bagra.

En els últims anys, l'ajuntament de Banyoles, ha dur a terme obres que han permès l'eliminació parcial dels abocaments d'aigües grises, i en algun cas aigües negres, del clavegueram dels habitatges propers als recs. D'aquesta manera s'ha pogut millorar la qualitat de l'aigua que hi circula.

En els recs també hi van a parar els desguassos de la xarxa d'aigües pluvials de la ciutat.

La conca fluvial del riu Terri

Un cop les aigües han creuat la ciutat de Banyoles arriben en diferents punts a la riera Canaleta i al riu Terri. La riera Canaleta és un dels afluents del riu Terri que neix al nord de la ciutat sota el Mas d'Usall i a la zona coneguda de la font de les Arcades, pren direcció sud creuant la ciutat fins arribar a la confluència amb el rec Major. A partir d'aquest es considera el riu Terri.

El Terri discorre del nord-oest al sud-est a contactar amb riu Ter a l'alçada de Medinyà. Al llarg del seu curs recull les aigües de l'Estany de Banyoles i les de les rieres (per exemple el Matamorts i el Revardit) i torrenteres (per exemple la de Marmanya o la de Riudellots).

Creua la plana al.luvial i agrícola de Cornellà del Terri o la de Ravòs del Terri entre altres. Espais rurals amb nombroses explotacions ramaderes. També destacar que a l'alçada de Cornellà del Terri es troba la depuradora de Banyoles i comarca.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccioses d'importància per a la salut pública.

Organismes biològics emprats

L'organisme utilitzat com a sentinella ha estat:

- *Unio mancus*

La nàiade allargada (*Unio mancus*), és una espècie que viu a la conca de l'Ebre i els rius mediterranis de la part Est de la península Ibèrica. A l'Estany de Banyoles es va detectar la seva presència convivint amb una altra espècie, *U. ravoisieri*. Les dues espècies s'agrupaven dins el nom *Unio elongatulus* fins el 2010, moment en que es van separar taxonòmicament gràcies a estudis moleculars que van determinar que es tractava de dos espècies.

A Banyoles *U. mancus* és més freqüent als recs de desguàs de l'Estany i a les zones de corrent. L'aigua dels recs de desguàs de l'Estany circula i creua la ciutat de Banyoles fins arribar a la riera Canaleta i d'aquí va al riu Terri on acaba arribant al riu Ter. Tant la riera Canaleta com el riu Terri van ser dos cursos d'aigua altament contaminats a les dècades del 70, 80 i 90. Actualment, aquest cursos fluvials presenten un bon estat ecològic i han recuperat el seu potencial natural; fet que ho demostren les bones poblacions de peixos autòctons hostes de les nàiades com ho són el barb de muntanya (*Barbus meridionalis*) i la bagra (*Squalius laietanus*).

Té una forma variable, els exemplars poden ser de closca fina i delicada o fins i tot robusta, tot depenen del lloc on viuen. Té aspecte de musclo de riu amb unes valves generalment bombada i allargada amb una coloració marró-negrosa o marró-grogosa amb tonalitats verdoses. Presenta una longitud, normalment, menor de 10 cm.

Es tracta d'una espècie típicament fluvial que s'ha refugiat en canals i sèquies. Viu semi-enterrat en fons de sorres i graves, sota talussos ben conservats amb ombra i vegetació de ribera. És pròpia d'aigües dures amb concentracions de calci superiors a 100 mg/l. Com la majoria de nàiades necessita que les aigües on viu siguin netes.

Des del 2010 ha ja sigut objecte de producció al Laboratori de cria de nàiades de l'Estany de Banyoles i de repoblació a l'Espai Natural Protegit de l'Estany de Banyoles, al riu Fluvià i també al riu Ter i els seu afluents el riu Brugent o la riera de Llèmena.

Els exemplars necessaris pel desenvolupament d'aquest projecte de prova pilot han estat proporcionats per l'estoc en engreix del laboratori de cria de Banyoles.

Per altra banda, també ha sigut necessari l'ús de peixos hoste ja que intervenen directament en el cicle reproductiu de les nàiades. S'han utilitzat:

- *Barbus meridionalis*

El barb de muntanya, és un ciprínid autòcton endèmic de les conques mediterrànies del nord-est de Catalunya que es distribueix a Girona per les conques de la Muga, Fluvià i Ter i en tots els seu afluents. Viu en rius de mida petita o mitjana, amb aigües corrents, fresques i oxigenades, amb substrats

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccioses d'importància per a la salut pública.

rocosos, pedres i graves. És una espècie bentònica que busca refugi sota pedres, vegetació (arrels, branques, etc.) i s'alimenta de macro invertebrats (larves d'insectes, crustacis, cucs, etc.). El mascle és lleugerament més petit (20 cm) que les femelles (25 cm). Té una coloració marró-groguenca, amb tonalitats daurades i pigallat.

Aquesta espècie és la que s'utilitza al laboratori de cria de nàiades com a peix hoste en la fase d'infecció del cicle reproductiu d'*Unio mancus*. És un peix que té un bon comportament i resistència en condicions de captivitat. És l'espècie que s'utilitzarà en les accions de repoblament de nàiades i la cria en captivitat.

Els exemplars necessaris es capturaran a les poblacions naturals del riu Terri que es troben en bon estat.

També s'ha usat de forma puntual el barb de l'Ebre *Luciobarbus graellsii*.

Organismes d'estudi causants de malalties infeccioses emprats:

- *Toxoplasma gondii*

La toxoplasmosi o infecció per *Toxoplasma* és una malaltia parasitària ocasionada pel protozou intracel·lular *Toxoplasma gondii*, que té una enorme capacitat per envair cèl·lules de l'hoste de vertebrats gràcies a la forma invasora mòbil. Pot causar infeccions lleus i asimptomàtiques, així com infeccions mortals que afecten majorment al fetus, ocasionant l'anomenada toxoplasmosi congènita. També pot revestir gravetat quan afecta immune deprimits com infectats pel VIH sense tractament antiretroviral efectiu.

Es considera la malaltia com una zoonosi, la qual cosa vol dir que, de manera habitual, es transmet des dels animals als éssers humans a través de diferents vies de contagi, sent els hostes definitius el gat i altres sis espècies de felins.

Les mesures de prevenció són particularment importants en les dones embarassades i consisteixen en normes generals d'higiene per evitar la transmissió per aliments o aigua contaminada, no consumir carn crua o mal cuita i evitar contacte amb excrements de gat.

Les nàiades s'han exposat a oocists de *T. gondii* obtinguts comercialment.

- *Escherichia coli*

Escherichia coli és un bacteri indicador de contaminació fecal del medi. L'interès en exposar experimental les nàiades a aquest bacteri és la freqüència amb la que *E. coli* es detecta a ambients aquàtics com rius, llacs, etc., i el problema per la salut pública que suposa l'entrada en contacte d'aquest bacteri amb aliments o aigua de consum humà.

El projecte ha confirmat que les nàiades poden ser sentinelles de *E. coli* i també altres bacteries resistents a antibiòtics.

L'*E. coli* que s'han emprat al laboratori s'han produït amb tècniques in vitro en el Centre de Recerca en Sanitat Animal (IRTA, Campus UAB).

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

- VHE

L'hepatitis E és una malaltia del fetge causada per la infecció per l'anomenat virus de l'hepatitis E (VHE). Es calcula que cada any hi ha uns 20 milions de casos d'infecció pel VHE, que produeixen 3,3 milions de casos simptomàtics d'hepatitis E1 arreu del món. L'OMS estima que el 2015 l'hepatitis E va provocar aproximadament 44 000 defuncions (el que representa el 3,3% de la mortalitat deguda a una hepatitis vírica). L'hepatitis E sol ser autolimitada, però en alguns casos pot ser fulminant (insuficiència hepàtica aguda). El virus es transmet per via fecal-oral, principalment a través d'aigua contaminada. A la Península ibèrica, s'ha detectat la presència del VHE a senglars.

El VHE necessari per "infectar" les nàiades s'ha obtingut d'un altre grup de recerca.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccioses d'importància per a la salut pública.

6. ACTUACIONS

ACTUACIÓ 1: Exposició experimental d'*Unio mancus* a agents infecciosos.

Objectiu:	Assaig a través de l'exposició experimental de nàiades (<i>Unio mancus</i>) de 2 a 3 cm de longitud la capacitat de les nàiades per filtrar i emmagatzemar diferents agents infecciosos zoonòtics potencialment presents (<i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Escherichia coli</i> i VHE) en el medi natural en condicions controlades i en un laboratori de seguretat.
Responsable:	Servei d'Ecopatologia de Fauna Salvatge de la Universitat Autònoma de Barcelona
Equip humà:	L'investigador (Dr. Oscar Cabezón) amb el suport del tècnic coordinador (Miquel Campos) i el tècnic auxiliar (Dr. Roberto Merciai). També hi ha participat en el disseny i anàlisi dels resultats el Dr. Ignasi Marco, Johan Espunyes, Lourdes Migura, Lourdes Lobato i estudiants en pràctiques, amb l'assessorament del Dr. Rafael Araujo.
Productes:	<ul style="list-style-type: none"> • Capítol a l'informe tècnic final. • La proposta provisional d'un article científic (part compartida amb l'actuació 2).

ACTUACIÓ 2: Estudi en el medi natural de la presència d'agents infecciosos a través d'*Unio mancus*

Objectiu:	Estudi, en el medi natural i al llarg d'un any, de la presència d'agents infecciosos zoonòtics (<i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Escherichia coli</i> i VHE) a l'Estany de Banyoles, el seu pas per la ciutat de Banyoles i en diferents punts del riu Terri, a través de l'ús de juvenils (de 2 a 3 cm de longitud) d' <i>Unio mancus</i> .
Responsable:	El Consorci de l'Estany ha estat el responsable de la part de camp de l'actuació. El Servei d'Ecopatologia de Fauna Salvatge de la Universitat Autònoma de Barcelona ha estat el responsable de la part d'anàlisi de les mostres.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

Equip humà:	<p>El tècnic coordinador (Miquel Campos), el tècnic auxiliar (Dr. Roberto Merciai) i l'investigador (Dr. Oscar Cabezón).</p> <p>També hi ha participat en l'assessorament tècnic el Dr. Ignasi Marco del SEFaS i el Dr. Rafael Araujo del MNCN.</p> <p>Per l'anàlisi de mostres hi ha col·laborat la Dra. Lourdes Migura i les estudiants de màster.</p>
Productes:	<ul style="list-style-type: none"> • Capítol a l'informe tècnic final. • La proposta provisional d'un article científic (part compartida amb l'actuació 1).

ACTUACIÓ 3: Producció y repoblació de nàiades al medi natural

Objectiu:	Reforçament de les poblacions d' <i>Unio mancus</i> de l'entorn immediat de l'espai natural protegit de l'Estany Banyoles i expandir l'espècie extinta al llarg del riu Terri a través de la producció de juvenils al laboratori de cria de nàiades de l'Estany de Banyoles.
Responsable:	Consorti de l'Estany
Equipo humà:	<p>El tècnic coordinador (Miquel Campos), el tècnic auxiliar (Dr. Roberto Merciai) i puntualment personal de suport del Consorci.</p> <p>També hi ha participat en el disseny, cria i repoblament del Dr. Rafael Araujo.</p>
Productes:	<ul style="list-style-type: none"> • Capítol a l'informe tècnic final. • Mapa de vegetació del Riu Terri • Capítol sobre l'Estudi dels trams fluvials de la conca del riu Terri (Pla de l'Estany) aptes per la repoblació de nàiades i per l'experiment de camp de l'Actuació 2.



Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccioses d'importància per a la salut pública.

CAPÍTOL 2: LA NÀIADE *UNIO MANCUS* COM A SENTINELLA D'AGENTS INFECCIOSOS (ACTUACIONS 1 I 2)

Introducció

Existeixen mecanismes naturals de descontaminació i manteniment d'ecosistemes aquàtics, considerats com serveis a l'ecosistema. Un d'aquests exemples són els mol·luscs bivalves, que gràcies al seu sistema de filtració durant l'alimentació, transloquen nutrients al llarg de la columna d'aigua, fent accessible recursos a altres organismes i mantenint la qualitat de l'aigua (Aceves *et al*, 2018; Burket *et al*, 2019). Addicionalment, els musclos d'aigua dolça han demostrat ser bons bio-indicadors de contaminació aquàtica. La majoria de literatura al respecte es focalitza en l'espècie americana *Dreissena polymorpha*, comunament coneguda com a musclo zebra, i en la seva gran capacitat de bioacumular contaminants i patògens, i reduir recomptes d'*E. coli* en aigua (Mezzanotte *et al.*, 2016). No obstant la nàiade *Unio mancus* podria tenir l'habilitat de preservar i restaurar els ecosistemes aquàtics deteriorats com fan altres mol·luscs bivalves tals com el musclo zebra o la cloïssa asiàtica *Corbicula fluminea*, actualment no hi ha estudis que demostrin el potencial rol que podrien tenir com a sentinelles de patògens presents als ecosistemes aquàtics d'aigua dolça.

La resistència antimicrobiana es un mecanisme de selecció natural pel qual una població de bacteris es torna capaç de multiplicar-se i/o sobreviure sota la presència d'un agent antimicrobià, en comparació amb la població bacteriana de la mateixa espècie però de tipus salvatge. L'ús inadequat d'antibiòtics en medicina veterinària i humana -juntament amb la intensificació de la ramaderia i la degradació del medi ambient- han provocat l'acceleració d'aquest procés d'adaptació natural fins a tal punt que, a dia d'avui, es considera un dels majors problemes de salut pública a nivell mundial (Aslam *et al*, 2018). A més a més, durant les últimes dècades, s'ha reportat un augment considerable d'infeccions hospitalàries degudes a bacteris Gram-negatiu multiresistents, l'origen principal dels quals és la microbiota humana i animal (Walsh, 2018). Per aquest motiu, institucions internacionals amb la OMS a la capçalera han iniciat una campanya de lluita contra l'aparició i el control d'Enterobacteriaceae multiresistents (World Health Organization, 2016).

El virus de l'hepatitis E (VHE) és un virus RNA monocatenari de sentit positiu (27-34nm de mida) (Balayan *et al.*, 1990; Reyes *et al.*, 1991), pertany a la família Hepeviridae (Genus Orthohepevirus) i existeixen cinc genotips descrits que afectin els humans: VHE 1, 2, 3, 4 i 7 (Kenney *et al.*, 2019). El VHE es va descriure per primera vegada l'any 1989. Avui en dia, a part de les hepatitis A, B, C i D, el VHE és un dels principals virus hepatotòpics humans que es troben a tot el món. Segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS), el VHE afecta gairebé 20 milions d'individus cada any arreu del món, causant aproximadament 3,3 milions de malalts hepàtics i 56.600 morts, amb grans pèrdues econòmiques posteriors associades a la salut (WHO, 2019). A Europa, els nombre de persones infectades per virus de l'hepatitis

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccioses d'importància per a la salut pública.

han augmentat durant els últims anys (ECDC, 2017). Els genotips VHE 1 i 2 predominen als països en desenvolupament d'Àfrica, Àsia i Amèrica Central i estan

restringits principalment als humans, transmetent-se a través del consum d'aigua contaminada per restes fecals. Els genotips VHE 3 i 4 s'han confirmat com a principals causes de la Hepatitis-E zoonòtica (transmissió animals-humans) a tot el món; aquests VHE 3 i 4 s'han descrit principalment a porcs i porcs senglars com a espècies reservori (Khuroo et al., 2016; Smith et al., 2013; WHO, 2019). Tot i que la transmissió entre persones és possible, les vies més efectives de transmissió del VHE són el consum d'aigua, aliments contaminats (especialment d'origen porcí) o el contacte amb animals infectats (ECDC, 2017; WHO, 2019). Els milions de porcs criats a Europa - Catalunya és una de les principals zones productores de porcí a Europa - produeixen grans quantitats de fems, que potencialment podrien contaminar el medi ambient amb HEV (Kenney et al., 2019; Lewis et al., 2010). En aquest sentit, hi ha treballs científics que han detectat virus (no VHE) excretats per persones y/o animals a zones de recollida de a prop de zones urbanes o ramaderes (Barreira et al., 2010; Wyn-Jones et al., 2001). A Espanya, un estudi recent va demostrar que un 57% dels porcs senglars tenien anticossos en front el VHE, és a dir que havien estat infectats per virus en algun moment de la seva vida i, per tant, amb capacitat d'excretar-lo al medi ambient (Caballero-Gómez et al., 2019). Així també, estudis recents han detectat el HEV en un 24,4% dels mol·luscs d'aigua marina a les costes galegues (Rivadulla et al., 2019). L'estudi de la distribució del VHE al medi i, especialment, la detecció de possibles espècies reservori o "acumuladores" del virus és d'importància vital per a l'elaboració d'estratègies de salut pública.

La toxoplasmosi és una zoonosi d'àmplia distribució mundial causada pel paràsit *Toxoplasma gondii*, un protozou intracel·lular del grup de los coccidis, capaç de parasitar a la majoria d'animals de sang calenta (Dubey & Beattie, 1988) inclòs l'ésser humà. *Toxoplasma gondii* causa avortaments a les dones i malformacions a fetus, però també afecta altres espècies animals quan la infecció s'adquireix durant la gestació (Dubey & Beattie, 1988). Aquesta toxoplasmosi congènita continua essent una de les causes més comunes de les malformacions en el naixement a països tan desenvolupats com en desenvolupament (Hill & Dubey, 2002). Tanmateix, la toxoplasmosi és una de les principals causes de mort de persones immunodeprimides. L'exposició de *T. gondii* a persones és freqüent. Estudis de seroprevalença a Espanya indiquen que les tasses de prevalença en dones seropositives gestants o en edat fèrtil es troben al voltant del 35-40% (Ortega-Benito, 2001). Una de les vies de transmissió més freqüent de *T. gondii* a les persones és el consum de menjar contaminat pel paràsit (Dubey & Beattie, 1988), considerant-se, la toxoplasmosi, la tercera causa de mort associada als aliments a Estats Units, després de la salmonel·losi i la listeriosi (Mead et al., 1999). A més, les protozoosis són considerades com a infeccions emergents per la Organització Mundial de la Salut (OMS). En quant a l'epidemiologia del paràsit, l'únic hoste definitiu són els felins. Aquests tenen la capacitat d'excretar milions d'oocists de *T. gondii* per gram de femtes durant els 15 dies posteriors a la seva infecció (Dubey i Beattie, 1988). Recentment s'ha acceptat científicament que una de les vies de transport dels oocists a través del territori són els cursos d'aigua (rius, rieres) i que la degradació dels ecosistemes aquàtics afavoreix el desplaçament d'aquests oocists (Shapiro et al., 2012). Aquest aspecte és revelador en quant a que estableix la relació entre la



Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

conservació del medi amb la disminució en la dispersió geogràfica de patògens. En aquest sentit, els organismes filtradors presents als ecosistemes aquàtics podrien tenir un rol significatiu com "acumuladors" o "retenidors" de patògens. L'estudi de la distribució de *T. gondii* al medi i, especialment, la detecció de possibles espècies reservori o "acumuladores" del paràsit *T. gondii* és d'importància vital per a l'elaboració d'estratègies de salut pública i de preservació del medi natural.



Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

7. AVALUACIÓ EXPERIMENTAL EN LABORATORI AMB ENTERO-BACTERIAEAE RESISTENTS A ANTIBIÒTICS (ACT. 1)

Objectiu

L'objectiu d'aquest experiment és determinar la capacitat de la nàiade *U. mancus* de filtrar i retenir Enterobacteriaceae resistents a antibiòtic sota un ambient controlat a laboratori, amb el propòsit final de suggerir el seu ús com a sentinella d'enterobactèries patògenes en ambients naturals d'aigua dolça.

Metodologia

Recol·lecció i instal·lació de les nàiades

Dos dies previs a l'experiment, al centre de cria en captivitat del Consorci de l'Estany es van separar 26 nàiades juvenils (d'aproximadament 3 anys de vida), amb una longitud de 20-30 cm, i es van sotmetre a un procés de depuració amb l'objectiu de purgar-les de qualsevol nivell possible d'*E. coli* i altres microorganismes. En finalitzar aquest procés, es traslladaren a la Universitat Autònoma de Barcelona i es van adequar en un terrari amb 25 L d'aigua de l'Estany de Banyoles -prèviament tractada amb llum ultraviolada- constantment recirculant (amb una bomba d'aigua submergible; Syncra Nano Multifunction Pump, SICCE®) i amb una temperatura ambient controlada de 18°C. Les nàiades es van mantenir durant tot l'experiment sobre sorra silícica de 0.5-1mm prèviament filtrada i autoclavada dins d'un cilindre de PVC.



Figura 7. Nàiades en un aquari, en fase de depuració

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

Preparació de l'inòcul i procediment

La capacitat de filtració de les nàiades juvenils en una hora es va estimar a 40mL segons bibliografia (Ostrovsky *et al.*, 1993). L'inòcul que es va utilitzar va ser una colònia d'*E. coli* amb un mecanisme de resistència a cefalosporines conegut (*E. coli* CTX-M-14), a una concentració segura segons bibliografia de $1,5 \cdot 10^5$ CFUs/mL (Gu and Mitchell, 2002). Es va calcular el volum d'inoculació individual per a cada nàiade de 40µL mitjançant la fórmula:

$$[]_i \cdot V_i = []_f \cdot V_f$$

on $[]_i$ és la concentració inicial d'*E. coli* utilitzat en la solució ($1,5 \cdot 10^5$ CFUs/mL), V_i és el volum inicial i desconegut de l'inòcul; $[]_f$ és la concentració coneguda segura d'*E. coli* per l'inoculació ($1,5 \cdot 10^5$ CFUs/mL); i V_f és el volum final d'aigua filtrat en una hora (40mL). Per l'inoculació es van col·locar les 26 nàiades en posició amb el sífó cap amunt, cada una en un tub Falcon™ de 50ml amb 40ml d'aigua d'ampolla i es va pipetejar 40µL de l'inòcul preparat en 24 d'elles. Les dues restants es varen deixar sense inocular per fer-les servir com a controls negatius.



Figura 8. A l'esquerra: Inoculació d'*E. coli* en les nàiades; A la dreta: Dissecció d'una nàiade per l'obtenció del cos tou.

Mostreig

De manera general, el mostreig es va organitzar en subgrups de 3 nàiades per a cada temps d'anàlisi, escollint de manera visual una nàiade de mida petita, mitjana i gran. A més a més, es va recollir 1 litre d'aigua del terrari a cada moment de mostreig. D'aquesta manera, després d'una hora post-exposició a l'inòcul, totes les nàiades es van ruixar amb aigua de l'Estany de Banyoles i se les va col·locar al terrari prèviament preparat, excepte les dues nàiades control negatiu i tres nàiades inoculades, que es van portar directament al laboratori per analitzar, juntament amb una mostra d'algues de la seva alimentació i d'un litre d'aigua del terrari com a control negatiu.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

El següent mostreig es va realitzar a les 8 hores següents i després cada 24 hores per 8 dies seguits. Després de cada recollida es va procedir a la neteja i desinfecció del terrari, que a continuació es va reomplir amb aigua neta de l'Estany de Banyoles.

Anàlisi de teixits i aigua

Una vegada al laboratori, les nàiades es van pesar (amb closca, closca sola i teixit tou) i mesurar individualment. Seguidament es van dissecar i del teixit tou se'n va fer un macerat amb solució salina tamponada amb fosfat, de la qual es va pipetejar 100µL i es va sembrar amb nansa de Digralski en medis de cultiu McConkey i McConkey suplementat amb ceftriaxona (2 mg/ml). Les plaques sembrades es van incubar a 37°C per 24 hores, quan es va procedir a la seva lectura i recompte manual d'*E. coli*. El litre d'aigua recollit del terrari a cada mostreig es va filtrar amb paper (Durapore® membrane filters 0.45µL) i els filtres també van ser homogeneïtzats amb la mateixa solució tamponada per procedir a la sembra, incubació i lectura de plaques com s'ha comentat anteriorment amb el teixit de les nàiades.

Resultats i discussió

La presència d'*E. coli* resistent en el teixit de les nàiades es va detectar fins el 4rt dia de l'experiment, és a dir, 96 hores post-inoculació. Els dos dies següents no es va detectar la presència del patogen en cap nàiade analitzada. Pel que fa a les mostres d'aigua, es va detectar la presència d'*E. coli* resistent fins el 3er dia de l'experiment. En cap de les mostres control es va obtenir creixement bacterià.



Figura 9. Placa de Petri amb creixement de colònies d'*E.coli*.

No es va observar correlació segons el pes pel que respecta a la determinació d'UFC/ml (unitats formadores de colònies per mil·lilitre). No obstant, les nàiades de

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

mida mitjana i gran van mostrar concentracions més elevades que les nàiades de menor mida. Les concentracions obtingudes al llarg del temps queden il·lustrades en la següent taula:

		Temps de Mostreig (hores post-inoculació)							
		1	8	24	48	72	96	120	144
Mida petita	Teixit tou (g)	0.2	0.1	0.3	0.3	0.2	0.2	0.4	0.3
	<i>E.coli</i> UFC/mL	$1.65 \cdot 10^2$	25	15	15	0	15	0	0
Mida mitjana	Teixit tou (g)	0.5	0.3	0.4	0.5	0.6	0.5	0.7	0.5
	<i>E.coli</i> UFC/mL	$1.2 \cdot 10^3$	$2.46 \cdot 10^3$	10	55	5	5	0	0
Mida gran	Teixit tou (g)	0.9	0.9	0.7	1.1	0.9	0.8	0.7	0.7
	<i>E.coli</i> UFC/mL	$2.6 \cdot 10^2$	$2.32 \cdot 10^3$	5	10	0	10	0	0

Taula 1. Concentracions d'*E. coli* en *U. mancus* al llarg del temps.

Conclusions

Com a conclusió de l'experiment, podem dir que *U. mancus* és capaç de reduir concentracions d'*E.coli* resistent a antibiòtic en aigua dolça sota condicions de laboratori, i acumular-los per almenys 4 dies.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

8. AVALUACIÓ EXPERIMENTAL EN LABORATORI AMB EL PARÀSIT ZONÒTIC TOXOPLASMA GONDII (ACT. 1)

Objectiu

L'objectiu del present experiment és determinar experimental la capacitat de la nàiade *Unio mancus* de bioacumular el paràsit *Toxoplasma gondii*.

Metodologia

Trenta nàiades (*Unio mancus*) juvenils (3 anys; 20-30 mm) van ser exposades experimentalment a oocists de *Toxoplasma gondii* a les instal·lacions del Departament de Medicina i Cirurgia Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona. Els oocists es van inactivar mitjançant cicles de congelació-descongelació. Tot i així, totes les persones que van manipular les nàiades exposades al paràsit duien en tot moment bata i doble guant per evitar entrar en contacte amb el paràsit.

Disseny experimental

Cada nàiade va ser exposada individualment a 1×10^6 oocists inactivats de *T. gondii* en recipient estèril amb un volum d'aigua de 50 mL i es va deixar en contacte durant 1 hora per tal de garantir la filtració de la totalitat del volum d'aigua. Els oocists es van adquirir de SALUVET INNOVA, S.L. (Madrid). Finalitzat el temps (1h) d'exposició, les nàiades es van ubicar en un aquari de mides 40x35x25 cm (volum total = 5 litres). Les nàiades es van anar sacrificant amb congelació (-80°C) i es van conservar a aquesta temperatura fins el moment de la seva anàlisi. Els moments de sacrifici post-exposició van ser 1h post-exposició (pe), 8 h pe (n=3), 24h pe (n=3), 48 h pe (n=3), 5 dies pe (n=3), 7 dies pe (n=3), 9 dies pe (n=3), 11 dies pe (n=3), 15 dies pe (n=3), 19 dies pe (n=3), 23 dies pe (n=3).

Detecció DNA *T. gondii*

Per realitzar la determinació de DNA del paràsit, cada nàiade va ser mesurada i pesada. Una vegada separat el teixit tou de les valves, es va homogeneïtzar físicament i es va extraure el DNA a partir de 150 µl de homogeneïtzat utilitzant el kit comercial QIAamp cadour Pathogen Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). El DNA extret va ser amplificat mitjançant una real-time PCR utilitzant els primers Toxo-SE (5' AGGCGAGGGTGAGGATGA 3') i Toxo-AS (5' TCGTCTCGTCTGGATCGCAT 3'), la sonda (5' 6FAM-CGACGAGAGTCGGAGAGGGAGAAGATGT-BHQ1 3') i el kit comercial (TaqMan PCR Master Mix; Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

Resultats i discussió

Es va detectar presència de DNA de *T. gondii* a 1h post-exposició (100% de les nàiades), 8h post-exposició (100% nàiades), 24h post-exposició (33% nàiades) i 48h post-exposició (33% nàiades). Els experiments de bioacumulació de *T. gondii* s'han realitzat amb espècies de bivalves marins. Els temps d'exposició al virus sempre han estat superior a 24h. En el nostre cas, es va realitzar un temps d'exposició d'una hora per tal de garantir que les nàiades sobreviuen a les característiques de l'aigua posteriorment a la inoculació del patògen. En qualsevol cas, en els estudis realitzats amb espècies marines de bivalves, totes mostraven capacitat d'acumular els oocists durant dies. Els nostres resultats mostren la capacitat per primera vegada la capacitat d'un bivalve d'ecosistema aquàtic d'aigua dolça de bioacumular aquest paràsit. En comparació amb les exposicions experimentals a *T. gondii* realitzades a espècies de bivalves marins, els temps post-exposició en que s'ha pogut detectar el paràsit a *U. mancus* ha estat molt inferior (48h). Aquest resultat podria explicar-se pel poc temps d'exposició continuada de les nàiades al paràsit (en experiments amb espècies marines el temps d'exposició és de dies), bé perquè aquestes tinguin una fisiologia de filtració diferent a les descrites a les espècies marines, o perquè aquesta espècie tingui la capacitat de digerir i eliminar el paràsit del seu organisme. Aquests tres supòsits només es podran determinar amb exposicions experimentals complexes, que no eren objectiu del present projecte. En qualsevol cas, la capacitat demostrada de la nàiade de filtrar i retirar del medi ambient paràsits d'aquestes característiques posa en valor el rol ecològic d'aquesta espècie de bivalve autòctona dels ecosistemes aquàtics mediterranis.

Conclusions

La nàiade *Unio mancus* té la capacitat d'eliminar paràsits del medi ambient, reafirmant que la conservació dels ecosistemes aquàtics afavoreixen la no dispersió geogràfica de patògens.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

9. AVALUACIÓ EXPERIMENTAL EN LABORATORI AMB EL VIRUS DE L'HEPATITIS E (ACT. 1)

Objectiu

L'objectiu del present experiment és determinar experimentalment la capacitat de la nàiade *Unio mancus* de bioacumular el Virus de l'Hepatitis E.

Metodologia

Vint-i-set nàiades (*Unio mancus*) juvenils (3 anys; 20-30 mm) van ser exposades experimentalment al Virus de l'Hepatitis E a les instal·lacions del Centre de Recerca en Sanitat Animal (IRTA-CReSA) amb els protocols de bioseguretat necessaris per treballar amb VHE infecciós. La ubicació de l'aquari i la manipulació de les nàiades fins els moments de l'extracció del RNA, va tenir lloc a una cabina CSB classe II. Totes les persones que van manipular les nàiades exposades al VHE duien en tot moment bata i doble guant per evitar entrar en contacte amb el virus.

Disseny experimental

Cada nàiade va ser exposada individualment a 1×10^5 partícules de VHE en recipient estèril amb un volum d'aigua de 50 mL i es va deixar en contacte durant 1 hora per tal de garantir la filtració de la totalitat del volum d'aigua. El VHE provenia de femtes humanes amb presència de virus provinents del *Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC)*. Finalitzat el temps (1h) d'exposició, les nàiades es van ubicar en un aquari de mides 40x35x25 cm (volum total = 5 litres). Les nàiades es van anar sacrificant amb congelació (-80°C) i es van conservar a aquesta temperatura fins el moment de la seva anàlisi. Els moments de sacrifici post-exposició van ser 1h post-exposició (pe), 8 h pe (n=3), 24h pe (n=3), 48 h pe (n=3), 72 h pe (n=3), 5 dies pe (n=3), 6 dies pe (n=3), 7 dies pe (n=3), 8 dies pe (n=3).

Detecció RNA Virus Hepatitis-E

Per realitzar la determinació de RNA viral, cada nàiade va ser mesurada i pesada. Una vegada separat el teixit tou de les valves, es va homogeneïtzar físicament i es va extraure el RNA a partir de 150 µl de homogeneïtzat utilitzant el kit comercial QIAamp cadour Pathogen Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). El RNA extret va ser amplificat mitjançant una real time RT-PCR utilitzant sondes iTaq Universal One-Step Kit (Biorad) i els primers descrits prèviament per Abravanel et al. (2012).

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

Resultats i discussió

Cap de les nàiades de l'experiment va resultar positiva a la presència del Virus de l'Hepatitis E. Els experiments de bioacumulació de VHE s'han realitzat amb espècies de bivalves marins. Els temps d'exposició al virus sempre han estat de 24h. En el nostre cas, es va realitzar un temps d'exposició d'una hora per tal de garantir que les nàiades sobreviuen a les característiques de l'aigua posteriorment a la inoculació del patogen. En qualsevol cas, en els estudis realitzats amb espècies marines de bivalves, totes mostraven haver acumulat el virus a la hora post-exposició i la seva concentració augmentava a les 24h d'exposició continuada. El resultat negatiu del nostre experiment podria explicar-se pel poc temps d'exposició continuada de les nàiades al virus o bé perquè aquestes tinguin una fisiologia de filtració diferent a les descrites a les espècies marines. Aquests dos supòsits només es podran determinar amb exposicions experimentals complexes, que no eren objectiu del present projecte.

Conclusions

Unio mancus no és un bon sentinella per al Virus de l'Hepatitis E.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccioses d'importància per a la salut pública.

10. ESTUDI EN EL MEDI NATURAL DE LA PRESENCIA D'AGENTS INFECCIOSOS A TRAVÉS D'UNIO MANCUS (ACT 2)

Introducció

Degut als abocaments constants d'aigua contaminada amb residus biològics, químics i metalls pesants entre altres a fonts d'aigua dolça d'interior com efluent urbans, les anàlisis d'aigua són necessàries i molt habituals (Burket *et al*, 2019; Ricciardi and Rasmussen, 1999). No obstant, tot i que les anàlisis d'aigua poden ser relativament fàcils d'executar, degut a episodis naturals com ara pluges o fluctuacions de temperatura, els resultats poden no reflectir el nivell de contaminació real de l'aigua i tampoc permetre una distribució espacial dels patògens que es puguin arribar a detectar (Palos-Ladeiro *et al*, 2015).

Objectiu

L'objectiu del present experiment és determinar la presència de bacteris de la Família Enterobacteriaceae, *T. gondii* i Virus de l'Hepatitis E utilitzant la nàiade *Unio mancus* com a sentinella a l'ecosistema aquàtic de l'Estany de Banyoles i els seus afluents.

Metodologia

Disseny experimental i àrea d'estudi

Aquest estudi de camp es va realitzar a la província de Girona, Catalunya, a 7 punts de mostreig: 2 a L'Estany de Banyoles, 2 als recs de desguàs i 3 al llarg del Riu Terri (anomenat "Riera Canaleta" en el seu tram urbà), format per les mateixes aigües dels recs de desguàs (veure Figura 10). L'Estany de Banyoles es troba a la ciutat de Banyoles i és el llac natural més gran de Catalunya, amb una longitud de més de 2.000 metres i amb una superfície d'aproximadament 112 ha. Les aigües de l'Estany mostren una qualitat biològica elevada, per tant els Punts 1 i 2 ("Pesquera Mates" i "Pesquera Prat") havien de servir com a control. El Punt 3 ("Antiga fàbrica de paper") està situat al Rec d'en Teixidor, situat a la perifèria del ciutat de Banyoles, i suposadament també mostra una bona qualitat de les aigües, a més de tenir una important població natural de nàiades. El Punt 4 ("Bassa de la Farga") es troba a una bassa artificial construïda al Rec Major, que rep les aigües de l'Estany després d'haver recorregut la ciutat. El punt 5 ("Pont de Canaleta") rep directament una sortida d'aigües pluvials, que durant les pluges més forts poden barrejar-se amb aigües de clavegueram. A més, el punt es troba en proximitat d'una fàbrica d'embotits. El Punt 6 ("Pont de Pujals") es troba aigües amunt del poblat de Cornellà del Terri, mostra una qualitat aparentment acceptable, tot i trobar-se a una zona de granges de porcs, ja que la contaminació provinent de Banyoles, teòricament, s'ha depurat al llarg del curs del Riu Terri. El Punt 7 ("Depuradora de Cornellà"), finalment, rep directament les aigües residuals de l'EDAR. Les nàiades utilitzades com a sentinelles provenien del Laboratori de les Nàiades de l'Estany de Banyoles, gestionat pel Consorci de l'Estany i creat amb el suport de LIFE Projecte Estany [LIFE08 NAT/ES/000067].

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

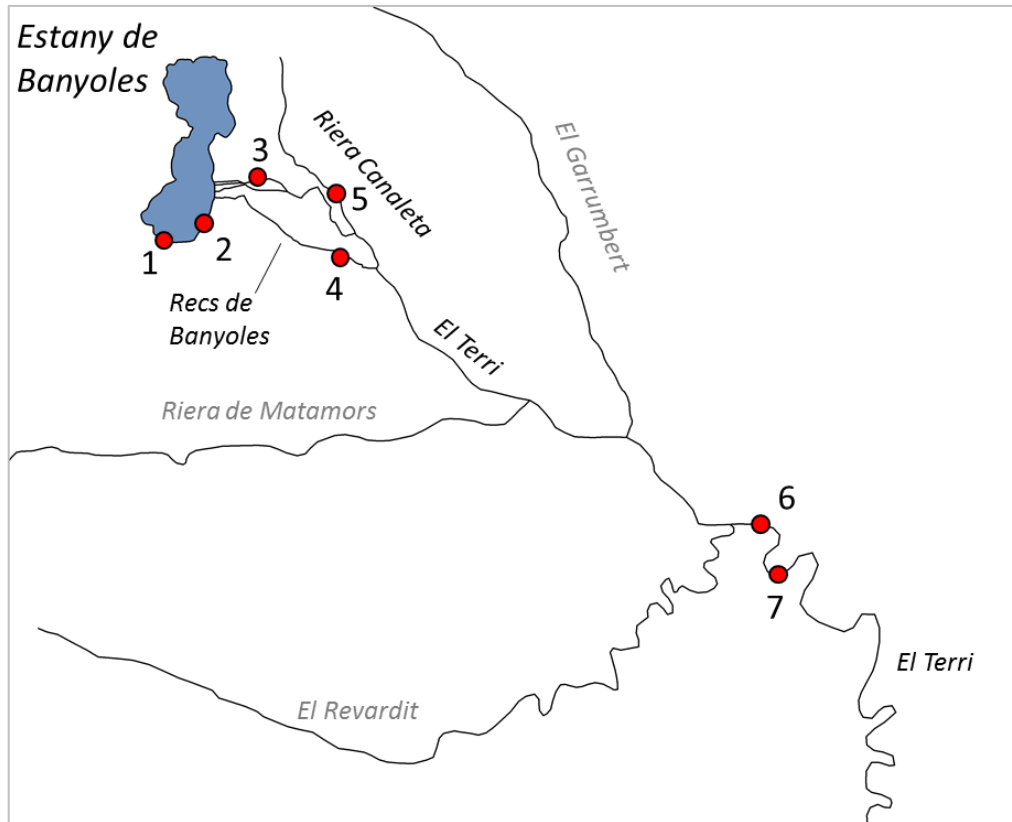


Figura 10. Punts de mostreig de l'Act. 2: 1) Pesquera Mates; 2) Pesquera Prat; 3) Antiga fàbrica de paper; 4) Bassa de la Farga; 5) Pont de Canaleta; 6) Pont de Pujals; 7) Depuradora de Cornellà.

Exposició al camp i recollida de mostres

Des de juliol del 2018 fins al juny del 2019 es van organitzar sis períodes d'exposició al camp, un cada dos mesos, amb una durada de dues setmanes cadascú. Per a cada període d'exposició, a cada punt es van col·locar a l'aigua dues gàbies amb tres nàiades cadascuna (en total, 42 nàiades per cada període). Els punts de mostreig estan descrits a les fitxes corresponents (veieu annex). Després del temps d'exposició, es van recollir dues nàiades de cada gàbia, es van col·locar dins d'uns tubs Falcon™ de 50mL a una nevera portàtil i es van transportar a la Universitat Autònoma de Barcelona per a anàlisis. Les restants nàiades es van tornar al laboratori i utilitzar successivament per repoblar el Riu Terri.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccioses d'importància per a la salut pública.



Figura 11. Gàbia per a l'exposició de nàiades en el medi natural.

Anàlisi de teixits

Una vegada al laboratori, les nàiades es van pesar (amb closca, closca sola i teixit tou) i mesurar individualment. Seguidament es van dissecar i del teixit tou se'n va fer un macerat amb solució salina tamponada amb fosfat, de la qual es va pipetejar 100µL i es va sembrar amb nansa de Digrafski en medis de cultiu McConkey i McConkey suplementat amb ceftriaxona (2 mg/ml). Les plaques sembrades es van incubar a 37°C per 24 hores, quan es va procedir a la seva lectura i recompte manual d'*Escherichia coli* (*E. coli*). El litre d'aigua recollit del terrari a cada mostreig es va filtrar amb paper (Durapore® membrane filters 0,45µL) i els filtres també van ser homogeneïtzats amb la mateixa solució tamponada per procedir a la sembra, incubació i lectura de plaques com s'ha comentat anteriorment amb el teixit de les nàiades.

Per a la detecció de bacteris gramnegatives i entèriques, es va utilitzar una resuspensió de teixit de cada individu per realitzar tres trams de quadrant de plats Petri que contenien respectivament agar sanguini (figura 13), agar de McConkey i McConkey suplementat amb ceftriaxona (2mg / mL). Les plaques es van incubar a 37°C durant 24 hores. Després de la incubació, les colònies aïllades es van tornar a colar sobre el mateix medi d'agar i es van incubar durant 24 hores per obtenir un cultiu pur. Finalment, es van produir colònies aïllades individualment amb 1 ml d'una solució que contenia el 80% d'infusió cerebral-cor (BHI) i el 20% de glicerol. Aquestes suspensions es van emmagatzemar a -80 °C per a la seva posterior identificació.

Per a la detecció de *Salmonella*, 100 µl de suspensió de teixit de cada nàvia es van barrejar amb 900 µl d'aigua peptona tampó (BPW) i es van incubar durant 24 hores a 42°C. Després del període d'incubació, 100 µl d'aquesta suspensió de BPW es van inocular en un medi Rappaport-Vassiliadis semi-sòlid (RV) i es van incubar durant 24

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

hores a 42°C. Es van observar els resultats de la incubació per VV a les 24 hores i si no es va produir cap canvi de color, es van implementar 24 hores més d'incubació. Les plaques RV sense canvi de color (quedant verd malachita) a les 48 hores es van classificar com a negatives per al creixement de Salmonella, mentre que aquestes plaques es van tornar blanques es van classificar com a positives i es va realitzar un reaprofitament posterior sobre un medi d'agar XLT4. Les colònies centrades en negre o negre procedents de l'agar-XLT4 van ser mòltes amb 1 ml d'una solució que contenia el 80% d'HHI i el 20% de glicerol i es van emmagatzemar a -80 °C per a una futura tipificació.

Identificació microbiològica

Tots els aïllaments bacterians es van provar en el sistema VITEK®2 amb targetes d'identificació gramnegatives. Les suspensions es van preparar emulsionant aïllats bacterians, prèviament emmagatzemats a -80 °C i reajustats en medi d'agar sanguini 24 hores abans, en una solució de clorur de sodi al 0,45% i es va ajustar un estàndard de turbiditat de 0,6 McFarland per a cadascun. Les suspensions i les targetes d'identificació gramnegatives es van carregar al sistema VITEK®2 d'acord amb les recomanacions del fabricant i els resultats del seu programari van informar automàticament en menys de 24 hores.

Concentració mínima d'inhibició (MIC)

Per determinar els MIC dels aïllats rellevants, es van preparar inòculs amb una turbiditat de 0,5 McFarland en una solució de clorur sòdic del 0,85%. Per a aquest propòsit va ser necessari remenar prèviament aquests aïllats bacterians en agar sanguini i incubar-los durant 24 hores. Un cop preparades 0,5 solucions de McFarland, es van inocular 10 µl en 10 ml de brou de Mueller-Hinton (MHB) respectivament. Per al control, la E. coli ATCC -25922 també es va preparar mitjançant el mateix procediment. Després, mitjançant una pipeta multicanal, es van col·locar 50 µl de cada solució MHB inoculada a la placa MIC Gram-negativa de Thermo Scientific™ Sensititre™ i es va portar a incubació a 37°C durant 24 hores. Els antimicrobians provats van ser: gentamicina (0,5-32 µg / ml), ampil·lina (1-64 pg / ml), cefotaxima (0,25-4 pg / mL), ceftazidima (0,5-8 pg / mL), meropenem (0,03-16 pg / mL), cloramfenicol (8-128 pg / ml), azitromicina (2-64 pg / mL), ciprofloxacina (0,015-8 pg / ml), àcid nalidixic (4-128 pg / ml), sulfametoxazol (8-1024 pg / mL), trimetoprim (0,25-32) µg / mL, tetraciclina (2-64 µg / mL), tigeciclina (0,25-8 pg / ml) i colistina (1-16 pg / mL).

La lectura de les plaques es va realitzar després del període d'incubació, mitjançant un mirall. Els valors de tall epidemiològic (ECOFF) es van interpretar segons el Comitè Europeu en les proves de susceptibilitat antimicrobiana (EUCAST). En aquest estudi, el terme "resistent" es referia a la presència de mecanismes de resistència adquirits i mutacionals en bacteris, no tant des del punt de vista clínic, sinó des del punt de vista epidemiològic. En aquest sentit, es va substituir el terme "no salvatge" als resultats per "resistent".

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

Detecció DNA *T. gondii*

Per realitzar la determinació de DNA del paràsit, es va utilitzar l'homogeneïtzat realitzat a la detecció d'enterobacteris (descriu prèviament). El DNA es va extreure a partir de 150 µl de homogeneïtzat utilitzant el kit comercial QIAamp cadour Pathogen Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

El DNA extret va ser amplificat mitjançant una real-time PCR utilitzant els primers Toxo-SE (5' AGGCGAGGGTGAGGATGA 3') i Toxo-AS (5' TCGTCTCGTCTGGATCGCAT 3'), la sonda (5' 6FAM-CGACGAGAGTCGGAGAGGGAGAAGATGT-BHQ1 3') i el kit comercial (TaqMan PCR Master Mix; Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

Detecció RNA Virus Hepatitis-E

Per realitzar la determinació de DNA del paràsit, es va utilitzar l'homogeneïtzat realitzat a la detecció d'enterobacteris (descriu prèviament). El RNA es va extreure a partir de 150 µl de homogeneïtzat utilitzant el kit comercial QIAamp cadour Pathogen Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). L'RNA extret va ser amplificat mitjançant una real time RT-PCR utilitzant sondes i Taq Universal One-Step Kit (Biorad) i els primers descrits prèviament per Abravanel et al. (2012).

Resultats

Enterobacteriaceae

Al llarg de l'experiment, es van identificar 12 gèneres i 16 espècies bacterianes diferents. Anomenades per ordre alfabètic -i entre parèntesi el nombre d'aïllats en total- són les següents: *Acinetobacter baumannii* (n=1), *Citrobacter braakii* (n=3), *C. freundii* (n=6), *E. coli* (n=20), *Enterobacter cloacae* (n=2), *Klebsiella oxytoca* (n=10), *K. pneumoniae* (n=9), *Leclercia adecarboxylata* (n=1), *Pantoea* spp. (n=1), *Pseudomonas mendocina* (n=1), *P. stutzeri* (n=1), *Raoultella planticola* (n=1), *Salmonella* spp. (n=1), *Serratia plymuthica* (n=2), *Vibrio cholerae* (n=1) i *V. fluvialis* (n=1). *E. coli* es va aïllar en la majoria dels mostres, comportant fins a un 32% del total, seguit de les dues espècies de *Klebsiella* spp. amb un 30% del total. Per avaluar l'efecte dels diferents nivells de pressió antropogènica (PA) sobre la diversitat i l'abundància d'aïllats bacterians, els resultats de tots els períodes d'exposició es van classificar per punt de mostreig. Els punts es van classificar d'acord amb els següents:

- Baixa pressió antropogènica (entorn força natural amb un contacte insignificant amb les activitats humanes);
- Pressió antropogènica mitjana (en contacte estret amb l'assentament i l'activitat humana);
- Alta pressió antropogènica (recollida d'aigua de reg contaminats de la ciutat i / o proximitat a una indústria alimentària animal).

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

Punt de mostreig	Nivell d'impacte antròpic	Susceptible (nombre d'aïllats)	Resistent a ceftriaxone (nombre d'aïllats)	TOTAL (susceptible; resistent)
Act02_1	A	<i>A. veronii</i> (1) <i>R. planticola</i> (1)		2
Act02_2	B	<i>C. freundii</i> (1) <i>K. pneumoniae</i> (1) <i>S. plymuthica</i> (1)		3
Act2_3	B	<i>C. braakii</i> (1) <i>E. coli</i> (2) <i>K. oxytoca</i> (1) <i>K. pneumoniae</i> (1) <i>Pantoea</i> spp. (1)		6
Act2_4	B	<i>A. hydrophila/caviae</i> (1) <i>K. oxytoca</i> (3) <i>K. pneumoniae</i> (2) <i>L. adecarboxylata</i> (1) <i>R. planticola</i> (1)		8
Act2_5	C	<i>C. freundii</i> (1) <i>E. coli</i> (2) <i>K. oxytoca</i> (1) <i>K. pneumoniae</i> (1) <i>Salmonella</i> spp. (1)	<i>A. hydrophila/caviae</i> (2) <i>A. sobria</i> (1) <i>E. coli</i> (2) <i>K. oxytoca</i> (1) <i>V. fluvialis</i> (1)	13 (6; 7)
Act2_6	C	<i>A. hydrophila/caviae</i> (1) <i>A. sobria</i> (3) <i>C. braakii</i> (1) <i>C. freundii</i> (1) <i>E. cloacae</i> (1) <i>E. coli</i> (4)	<i>A. hydrophila/caviae</i> (1) <i>P. mendocina</i> (1)	13 (11; 2)
Act2_7	C	<i>C. braakii</i> (1) <i>C. freundii</i> (2) <i>E. coli</i> (5) <i>K. oxytoca</i> (3) <i>K. pneumoniae</i> (3) <i>R. planticola</i> (2) <i>S. plymuthica</i> (1)	<i>A. sobria</i> (1) <i>E. coli</i> (2) <i>P. mendocina</i> (2) <i>P. stutzeri</i> (1) <i>V. fluvialis</i> (1)	24 (17; 7)

Taula 2. Distribució dels microorganismes identificats mitjançant el sistema VITEK®2.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccioses d'importància per a la salut pública.

El PL amb la pressió antropogènica més forta va mostrar la major quantitat d'aïllats bacterians i la major diversitat d'espècies bacterianes (veure Taula 2). A més, es va observar la presència de soques resistents a la ceftriaxona en tots aquests llocs, mentre que no es van identificar soques resistents a llocs amb menor pressió antropogènica. Les dues mostres de les quals es va aïllar *V. fluvialis* provenien del punt de mostreig a prop dels Punts Act2_5 i Act2_7. L'aïllament de *V. cholerae* es va produir en una mostra provinent del punt de mostreig a prop del Punt Act2_7. Del Punt Act2_5 es van obtenir en total vuit espècies bacterianes diferents durant tot el període d'estudi, amb un total de 13 aïllats. Set d'aquests aïllats bacterians (el 54% del mostreig total) van resultar resistents a la ceftriaxona. Addicionalment, el 15% dels 13 aïllats totals del Punt 6 també van mostrar resistència a la ceftriaxona. Els Punts Act2_1 i Act2_2, situats a l'Estany, van mostrar una escassa quantitat i diversitat d'aïllats bacterians, que reflecteixen la mínima contaminació de l'aigua.

De tots els bacteris identificats obtinguts pel sistema VITEK®2, se'n van seleccionar 62 per estudiar els seus MIC respectius. Es van analitzar un total de 16 espècies diferents. No obstant això, es van obtenir resultats concloents per a sis espècies bacterianes, ja que els valors ECOFF no s'han descrit per a la resta d'espècies del conjunt de dades. S'han trobat quatre soques resistents de *C. freundii* per a l'ampicil·lina, mentre que una era per als antimicrobians cefotaxima i ceftazidima (taula 6; vegeu els annexos). Els dos *E. cloacae* aïllats van resultar ser pansusceptibles. Es va detectar resistència a *E. coli* per a l'azitromicina (n = 6), seguida de ciprofloxacina (n = 5), cefotaxima (n = 5), àcid nalidix (n = 5) i trimetoprim (n = 5). Set soques de *K. oxytoca* de deu aïllades mostraven resistència a l'ampicil·lina i només una a ciprofloxacina. En relació als aïllats de *K. pneumoniae*, es va detectar resistència a la ampicil·lina (n = 7), cefotaxima (n = 1), ceftazidima (n = 1), ciprofloxacina (n = 2) i tetraciclina (n = 1). La *Salmonella* spp. mostrava resistència fenotípica a l'ampicil·lina. Dels 18 *E. coli* testats, 10 eren resistents a almenys un antimicrobià i 5 eren multi-resistents (MDR) a tres o més antimicrobians. Una *K. pneumoniae* també va ser MDR, amb resistència a l'ampicil·lina, ceftazidima, cefotaxima i ciprofloxacina. Del total d'aïllats, l'AMR a l'ampicil·lina va ser el més alt (40%) entre els antibiòtics provats, seguit de ciprofloxacina (12%) i cefotaxima (10%). Tots els aïllats eren susceptibles a azitromizina, tigeciclina i colistina.

Toxoplasma gondii

No es va detectar DNA de *T. gondii* a cap de les nàiades exposades a l'ambient aquàtic.

Virus de l'Hepatitis E

No es va detectar RNA del Virus de l'Hepatitis E a cap de les nàiades exposades a l'ambient aquàtic.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

Discussió

Les diferents espècies Enterobacteriaceae detectades en aquest estudi es troben àmpliament distribuïdes al medi (sòl i aigua) i es poden trobar a la microbiota intestinal d'animals i humans. Sovint apareixen com a patògens oportunistes que causen infeccions nosocomials, com ara infeccions secundàries de la pell (ferides quirúrgiques), infeccions urinàries i del tracte intestinal, septicèmia i meningitis entre d'altres, però són més representatius de pacients ancians amb compromís immunitari i ancians amb malalties subjacents.

Vibrio spp. –reportat en una àmplia gamma d'ambients costaners, mars, estuaris i aigües salobres– es considera un patogen emergent implicat en brots diarreics principalment a causa del consum d'aigua i/o marisc. A més, sembla que *V. fluvialis* presenta fenotip AMR amb més freqüència que altres espècies de *Vibrio*. A la conca mediterrània s'han trobat *V. fluvialis* resistents a diversos antimicrobians en piscifactories. Tot i que actualment *V. fluvialis* es considera un patogen emergent important, els valors de tall epidemiològic (ECOFF) de resistència als antimicrobians no estan disponibles a EUCAST per a aquesta espècie. S'han de fer esforços per estudiar aquest patogen per identificar ràpidament els fenotips de resistència i implementar estratègies de control.

En relació a la resta d'aïllats, cal fer incís en *Klebsiella pneumoniae*, que és sovint la causa d'infecció intrahospitalària per ventilació assistida i tendeix a mostrar MDR. D'altra banda, *E. coli* és un contaminant a l'aigua generalment associat als residus i se sol investigar com a indicador de la qualitat de l'aigua. A més, de tots els *E. coli* multiresistents (MDR) aïllats en aquest estudi, el 80% eren resistents a cefalosporines de tercera generació, quinolones i sulfonamides; i tots van resultar resistents a l'ampicil·lina. Aquests resultats coincideixen amb estudis actuals que descriuen una tendència clara de *E. coli* i *K. pneumoniae* a mostrar resistència a les fluoroquinolones i a les cefalosporines de tercera generació en entorns intrahospitalaris.

En el present estudi de camp, tots els bacteris MDR van quedar aïllats de llocs que es poden considerar amb una influència antropogènica més forta, com ara estar a prop de la indústria càrnia o sota el drenatge d'una planta de tractament d'aigua. La producció d'aliments animals ha demostrat tenir un paper important en l'aparició de bacteris resistents, mantenint una associació positiva i directa amb l'ús d'antimicrobians en granges. Els bacteris resistents es poden transmetre per diverses rutes, incloent el contacte directe amb animals, al llarg de la cadena de producció d'aliments i per contaminació d'aigües i superfícies del sòl amb residus.

Diversos investigadors han afirmat que factors com la mida corporal –el pes i la longitud– la concentració d'algues a l'aigua i la temperatura de l'aigua pot interferir amb les taxes de filtratge i fins i tot filtrar la saturació. En comparació amb aquests estudis, en el present estudi de laboratori no es va observar cap correlació entre les dades al·lomètriques i la taxa de filtració, tot i que es recomana una mida de la mostra més gran per obtenir un resultat més fiable.

Per avaluar l'efecte dels diferents nivells de pressió antropogènica (AP) sobre la diversitat i l'abundància d'aïllats bacterians, els resultats de tots els períodes



Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

d'exposició es van classificar per punt de localització (LP). El LP amb la pressió antropogènica més forta va mostrar la major quantitat d'aïllats bacterians i la major diversitat d'espècies bacterianes. A més, es va observar la presència de soques resistents a la ceftriaxona en tots aquests llocs, mentre que no es van identificar soques resistents a llocs amb menor pressió antropogènica.

Conclusions

Unio mancus pot ser un bon model per al bio-monitoratge d'AMR-Enterobacteriaceae en sistemes d'aigua dolça, reforçant els resultats de l'exposició experimental realitzada anteriorment. Per tant, les nàiades poden ser utilitzades com a sentinelles de pressió antropogènica en estudis observacionals en el medi ambient.



Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

11. CONCLUSIONS GENERALS

A partir dels resultats obtinguts durant l'experiment de laboratori (Act. 1) i l'estudi de camp (Act. 2), es pot concloure que la nàiade autòctona *Unio mancus*:

- pot ser utilitzada com a indicador biològic de la presència de patògens en el medi aquàtic, tot i algunes restriccions lligades al tipus de patògen.
- té la capacitat d'eliminar patògens del medi ambient, reafirmant que la conservació de la biodiversitat del medi aquàtic afavoreix la no dispersió geogràfica de patògens.
- és capaç d'acumular *Escherichia coli* resistents a antibiòtic i acumular-los per almenys 4 dies, amb concentracions més altes en els individus més grans.
- és capaç d'acumular *Toxoplasma gondii*, aparentment només per un període més breu del que reporta la literatura científica relativament als bivalves marins.
- no és un bon sentinella per detectar la presència del Virus de l'Hepatitis E

És necessari dedicar esforços en conèixer els índexs de filtració d'aquesta espècie i la densitat mínima requerida de la població de nàiades per reduir la presència de patògens al medi aquàtic. En general, caldrà fer més investigació sobre aquests temes per donar un impuls a la repoblació de la nàiade *Unio mancus* a les conques dels rius.



Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccioses d'importància per a la salut pública.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccionses d'importància per a la salut pública.

CAPÍTOL 3: PRODUCCIÓ I REPOBLACIÓ DE NÀIADES AL MEDI NATURAL (ACTUACIÓ 3)

Objectiu

La actuació 3 d'aquest projecte té com a objectiu la repoblació d'*Unio mancus* a partir d'individus juvenils criats al Laboratori de les Nàiaades de l'Estany de Banyoles, per tal de reforçar les poblacions existents a l'entorn immediat de l'Estany i reintroduir aquesta espècie en el curs principal del Riu Terri, en el qual s'havia extingit en el passat.

Metodologia de cria

El procés de cria de nàiaades ha seguit el protocol que s'ha posat a punt durant els anys previs. A més, durant les dues temporades de cria en què s'ha dut a terme el present projecte, la metodologia de cria, especialment pel que fa a la fase d'engreix de les nàiaades juvenils, s'ha perfeccionat ulteriorment, la qual cosa ens ha portat a tenir una taxa de supervivència molt alta durant els primers mesos de vida, que representen la fase més crítica per a aquests animals.

La primera fase de la producció de nàiaades en captivitat és la captura de peixos hostes que seran infestats amb larves gloquidi. Els peixos necessiten un període d'adaptació a la captivitat, durant el qual s'habituen a la presència dels treballadors del laboratori i sobretot a l'alimentació amb pinso. D'aquesta manera, al moment de ser infestats, els peixos hostes es troben en condicions de salut ideal i poden suportar millor l'estrès de la manipulació i de la infestació mateixa. Les espècies emprades per a la cria d'*Unio mancus* són el barb de muntanya (*Barbus meridionalis*) i la bagra (*Squalius laietanus*), ambdues abundants al Riu Terri, del qual provenen els exemplars emprats. Un cop capturats, els peixos es tracten amb verd de malaquita per reduir la càrrega parasitària que duen normalment del medi natural, i prevenir el desenvolupament de malalties durant la detenció al laboratori. Els peixos s'estabulen en tancs de 300 litres i s'alimenten cada dia amb pinso, integrant la seva dieta amb gambes i musclos marins congelats.

La recollida de nàiaades adultes inicia normalment a principis de primavera, quan les femelles d'*U. mancus* comencen a deixar anar les primeres larves gloquidi. Tanmateix, l'any 2018 es va iniciar la temporada de cria a finals de maig, quan el percentatge de femelles gràvides, i conseqüentment la quantitat i qualitat dels gloquidis, és màxima. La recollida de femelles per a la temporada 2019 es va dur a terme a partir del març i va seguir per 5 mesos, a mesura que es necessitaven gloquidis per efectuar noves infestacions, fins al juliol, quan en principi es finalitza la reproducció d'aquesta espècie al Pla de l'Estany. Els individus adults emprats provenien tots dels recs de desguàs de l'Estany, principalment dels Recs de Can Teixidor i de Ca l'Hort. Aquests reproductors es porten al laboratori i es col·loquen en aquaris de 100 L sense sediment, airejats i amb recanvi diari d'aigua de l'Estany.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccioses d'importància per a la salut pública.



Figura 11. Nàïades parentals provinents dels recs de Banyoles.

Un cop obtinguts els gloquidis, s'infesta una quantitat de peixos proporcional a la quantitat de gloquidis disponible. Cada infestació es considera que és un lot de peixos infestats de la mateixa origen, en una mateixa data, d'un mateix grup de nàiades parentals. Una part dels peixos infestats s'alliberen directament, per repoblar el medi amb juvenils recent metamorfosats. En particular, les bagres capturades es van destinar a aquesta tècnica de repoblació, ja que respecte al barb pateixen més l'estrès del manteniment en captivitat. Aquesta tècnica és la més senzilla, com que permet saltar-se la fase de maduració dels juvenils al laboratori, reduint l'estrès per als peixos hoste i també el temps i recursos de personal a dedicar, malgrat sigui difícil estimar-ne l'èxit a posteriori en termes quantitius. Els peixos restants, per altra banda, s'estabulen als contenidors "cilindrocònics" (fase de "maduració"), on es poden recollir els juvenils a través de filtres, un cop acabada la metamorfosi. Un cop acabat el període de caiguda dels juvenils recent metamorfosats, els peixos es traslladen a les instal·lacions externes del laboratori i després d'un breu període de recuperació es tornen al medi natural, normalment als recs de Banyoles, a on podran servir de nou, en el futur, com a peixos hoste per les poblacions residents de nàiades.

Els juvenils produïts es poden repartir en dos lots. El primer s'allibera directament el medi natural un cop acabada la metamorfosi. El segon lot es destina a l'engreix al laboratori fins als 4-5 anys d'edat, per tal de constituir una població de nàiades subadultes que un cop alliberades tinguin una alta probabilitat de supervivència i siguin capaces en breu de començar a reproduir-se al medi natural.

Durant la fase d'engreix, els juvenils se sembren en cilindres de PVC amb un fons de malla cobert de sorra silícica, col·locats en canals amb aigua corrent i temperatura controlada, a l'interior del laboratori. Aquí, les petites nàiades s'alimenten amb algues marines liofilitzades fins als 200 dies d'edat i després es recompten i es mesuren per determinar les taxes de supervivència i creixement, i se sembren a les instal·lacions exteriors (canals i piscines), a on s'alimenten del plàncton naturalment present a l'aigua de l'Estany que circula a la planta hidràulica del laboratori.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

Producció de juvenils i repoblació

Durant el bienni del projecte s'ha realitzat un total de 23 infestacions, de les quals 3 l'any 2018 i 20 el 2019 (Taulas 3 i 4). Amb aquestes 23 infestacions s'han produït un total de 271.320 juvenils (Taula 3), dels quals 101601 destinats a l'engreix al laboratori, 48.719 destinats a repoblar directament el medi natural un cop acabada la metamorfosi i uns 121000 alliberant el peixos infestats. Aquesta última quantitat s'ha estimat assumint que mitjanament, del nombre molt variable de gloquidis que es poden enganxar a un peix hoste, uns 200 duen a terme la metamorfosi.

A més de repoblar amb juvenils nascuts durant el període del projecte, es van seleccionar 303 individus subadults, d'una mida al voltant dels 30-40 mm de longitud, dels quals se'n van alliberar uns 50 per cada punt escollit (Taula 4, Figura 14).

Codi infestació	Data infestació	Núm. Juvenils
<i>Destinació engreix:</i>		
2018_01	08/06/2018	12.578
2018_02	13/06/2018	21.479
2019_01	09/04/2019	7.724
2019_02	11/04/2019	4.993
2019_03	15/04/2019	2.779
2019_04	23/04/2019	9.324
2019_05	03/05/2019	17.031
2019_06	07/05/2019	4.003
2019_08	10/05/2019	13.248
2019_11	15/07/2019	1.237
2019_12	17/07/2019	779
2019_13	17/07/2019	4.207
2019_14	19/07/2019	2.219
Total		101.601
<i>Destinació medi natural:</i>		
2019_05	03/05/2019	6.627
2019_06	07/05/2019	11.158
2019_07	09/05/2019	20.255
2019_09	13/05/2019	10.281
2019_10	21/05/2019	398
Total		48.719
Total juvenils madurats al laboratori:		150.320

Taula 3. Juvenils nascuts i madurats al laboratori durant els anys 2018 i 2019

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccioses d'importància per a la salut pública.

Punt	Codi	Peixos infestats					Juvènils recent nascuts			Subadults		Total general
		Data	Espècie	Núm.	Tota l	Núm. Juvènils punt (estima)	Data	Núm.	Total punt	Data	Núm.	
Rec Figuera d'en Xo	Act3_01	10/04/2019	SLA	60	109	21800	28/05/2019	9332	12854	28/06/2019	50	34704
		17/04/2019	SLA	49			13/06/2019	3522				
Ronda Canaleta	Act3_02	13/06/2018	BME + SLA	70	100	20000	28/05/2019	4914	4914	28/06/2019	50	24964
		10/04/2019	BME	30								
Naixement Riu Terri	Act3_03	10/04/2019	SLA	40	100	20000	28/05/2019	4268	4268	28/06/2019	50	24318
		16/05/2019	SLA	60								
Pont de Pujals	Act3_04	23/04/2019	BME	100	100	20000	28/05/2019	8843	15849	28/06/2019	50	35899
Molí de N'Avellana	Act3_05	16/05/2019	SLA	100	100	20000	28/05/2019	5480		5480	28/06/2019	50
Resclosa de N'Avellana	Act3_06	07/05/2019	SLA	21	96	20000	28/05/2019	5200	5200	28/06/2019	53	25253
		10/05/2019	SLA	70								
		10/05/2019	LGR	5								
Total per tècnica d'alliberament:					121800		48565		303	170668		

Taula 4. Peixos infestats amb gloquidis alliberats directament al medi natural. El nombre de juvenils estimat s'estima multiplicant el nombre de peixos per una mitjana de 200 juvenils per peix.

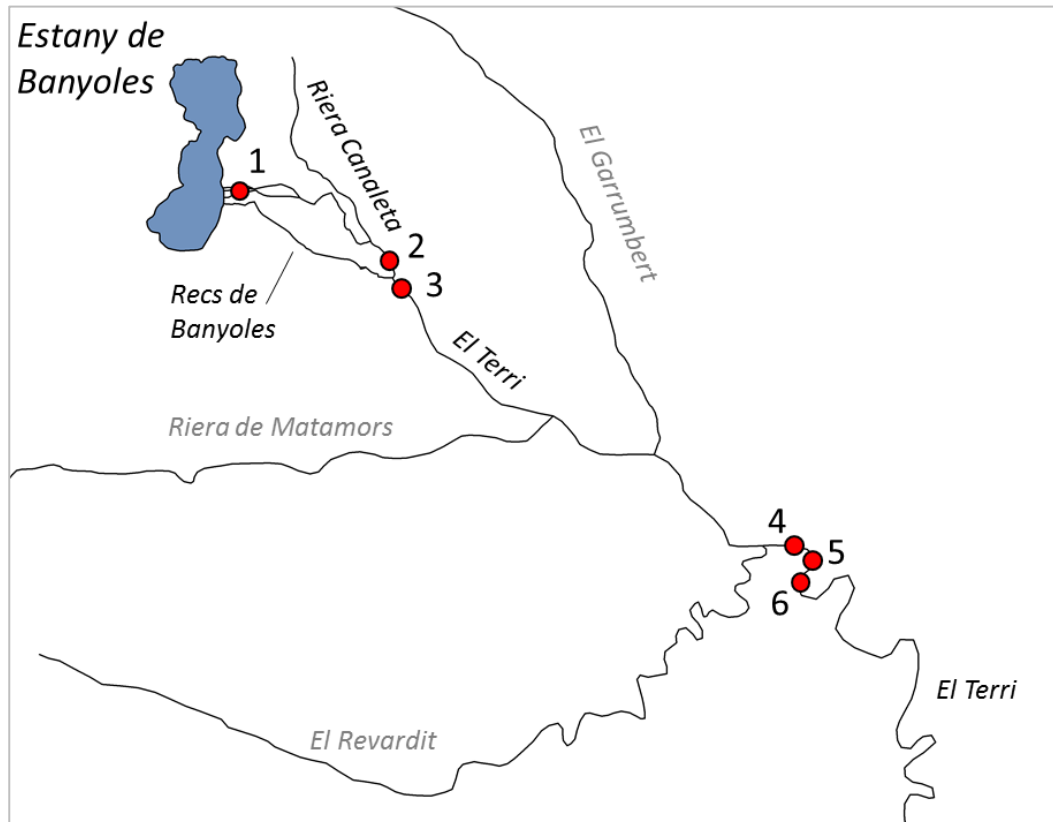


Figura 12. Punts de repoblació amb peixos infestats, juvenils i subadults d'*Unio mancus*.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

Producció total 2018-19	
Juvenils nascuts i destinats a l'engreix	101601
Juvenils nascuts i alliberats al medi	48719
Juvenils alliberats amb els peixos (estima)	121000
Total	271623

Taula 5. Resum del nombre de nàiades (juvenils + subadults) alliberades els anys 2018 i 2019

La repoblació s'ha dut a terme als següents 6 punts (Taula 4, Figura 12):

- **Rec de la Figuera d'en Xo (Act3_01).** Punt localitzat a la ciutat de Banyoles, a breu distància de la sortida de les aigües de l'Estany. Tot i trobar-se a una zona urbanitzada (com tots els recs de Banyoles, que per aquest motiu no s'han cartografiat), hi viuen uns pocs individus aïllats d'*Unio mancus*, per tant s'ha pensat de reforçar aquesta petita població natural. Presenta una qualitat elevada de les aigües, amb presència de macròfits, vegetació riberenca i peixos hoste (bagra) que poblen aquest tram especialment en el període primaveral, que coincideix amb la reproducció tant dels peixos com de les nàiades. A diferència d'altres recs de Banyoles, el seu cabal no es veu afectat per obres i altres activitats urbanes.
- **Ronda Canaleta (Act3_02) i Naixement del Riu Terri (Act3_03).** Aquests dos punts són molt propers entre ells, sent localitzats respectivament aigües amunt i aigües avall de la confluència de la Riera Canaleta amb el Rec Major. És a partir d'aquesta desembocadura que la Canaleta pren el nom de Riu Terri. La distància entre aquests punts i el tram amb més alta contaminació biològica de la Riera Canaleta (Punt Act2_05, veieu experiment de camp de l'Actuació 2) és tal que la qualitat de l'aigua es pot considerar suficientment recuperada. El tram passa a través d'una zona de bosc de ribera dominat per pollancre, freixe i saüc, sobreviscut a la urbanització sorgida al voltant, i es veu poblat per unes poblacions abundants de barb i bagra.
- **Pont de Pujals (Act3_04).** Punt localitzat en un tram amb aigua lenta, fons sorrenc i un bosc de ribera molt dens dominat per pollancre, saücar, canyar i plantacions de plàtans. Com tot el tram mitjà i baix del Terri, es veu poblat per una comunitat íctica autòctona molt abundant.
- **Molí de N'Avellana (Act3_05) i Resclosa de N'Avellana (Act3_06).** Aquests punts es troben aigües amunt i aigües avall d'una resclosa. Pel que fa a les característiques ecològiques, se semblen al punt previ, malgrat la presència de la resclosa i un bosc de ribera més obert.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.



Figura 13. Alliberament de peixos infestats amb gloquidis d'*Unio mancus* al Riu Terri.



Figura 14. Nàïades subadultes engreixades al laboratori, marcades i a punt de ser alliberades al medi natural.

Metodologia d'engreix

Abans de l'inici del projecte "Sentinelles", el 2017 havia sigut un any important pel que fa al perfeccionament del mètode d'engreix dels juvenils recent nascut, especialment en els primers mesos de vida, que són els més crítics per a la supervivència. Si és cert que, quan es va crear el Laboratori de les Nàïades, els individus que arribaven als 100 dies de vida eren un 1% del total de

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccioses d'importància per a la salut pública.

neometamorfosats, el 2017 s'havia aconseguit mantenir la mortalitat per sota del 50%.

L'any 2018 es va donar continuïtat al procés d'experimentació. Alimentar els juvenils amb algues marines liofilitzades havia sigut una de les claus de l'èxit dels anys previs: el 2018, amb el fi de millorar el règim d'alimentació i seguir augmentant la producció en termes de supervivència i creixement durant els primers mesos de vida, es van aplicar tractaments alimentaris diferents, tots a base d'algues marines, soles o barrejades amb altres algues liofilitzades d'aigua dolça (*Chlorella* i *Spirulina*) les quals, a més de sortir més barates que les algues marines, podrien aportar algun valor nutricional afegit. A més, a un dels canals de cria s'ha instal·lat un sistema d'alimentació automàtica, aquest també basat en algues marines, que té l'avantatge de poder subministrar quantitats diàries d'aliment sense la necessitat constant de mà d'obra humana, inclosos els caps de setmana (del revés, l'alimentació manual amb algues liofilitzades se sol fer només tres cops a la setmana).

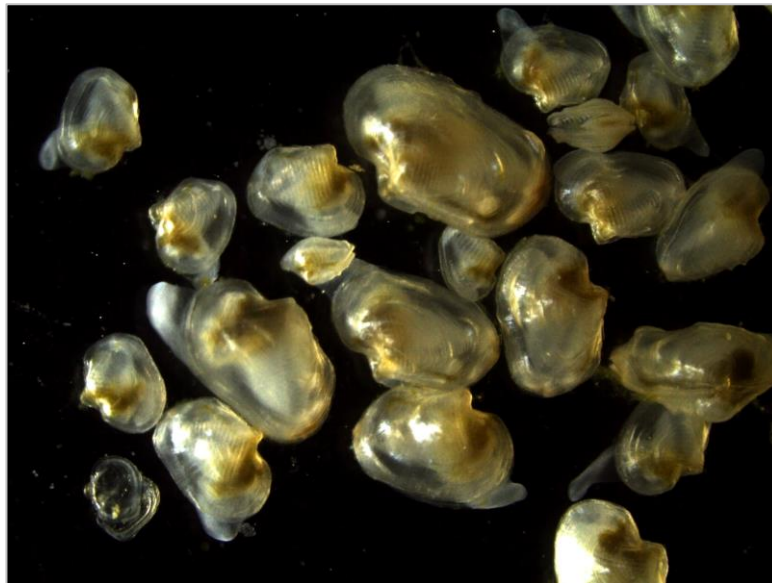


Figura 15. Nàïades juvenils de 200 dies d'edat, engreixades al laboratori.

Els resultats (Taula 6) mostren que la producció va ser alta amb tots els tractaments excepte el sistema automàtic, i que hi va haver una correlació negativa entre supervivència i creixement, és a dir que, allà on es va produir una supervivència més alta, el creixement va ser inferior, i viceversa (Figura 16).

La causa d'aquest fet, probablement, és que un nombre més alt de nàïades sembrades en un pot de cultiu genera una competència més alta pels recursos tròfics. Això genera dues conseqüències: 1) no es pot contrastar l'eficàcia de tractaments diferents si varia el nombre inicial de juvenils sembrats a cada pot; 2) amb aquestes dades seria difícil establir quin és el tractament més eficaç per a optimitzar la

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

producció, ja que els resultats canvien segons es miri la supervivència o el creixement. Conseqüentment es va decidir: 1) controlar estadísticament l'efecte del nombre

inicial de juvenils, per tal de demostrar quin és realment el tractament alimentari millor; 2) a part de les taxes de supervivència i creixement, que en tot cas ens donen informacions essencials, s'ha considerat com a índex de productivitat la biomassa, és a dir el pes total de les nàiades de cada cultiu, donat que aquesta variable depèn tant del nombre d'individus vius com de la seva mida. Per tant, s'han fet servir uns Models Lineals Generalitzats amb efectes Mixtos (GLMM) per individualar els factors més significatius entre aquells que podien afectar l'èxit de la cria i generar uns valors de supervivència, creixement i biomassa ajustats, és a dir com serien si el nombre inicial de juvenils sembrats hagués sigut el mateix per a cada pot de cultiu.

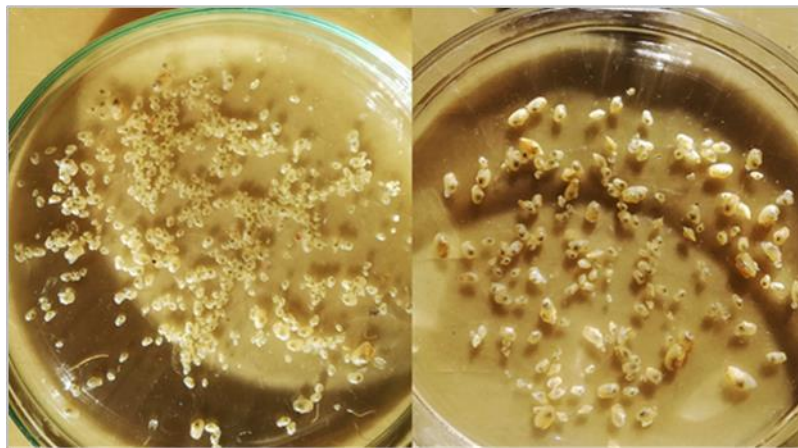
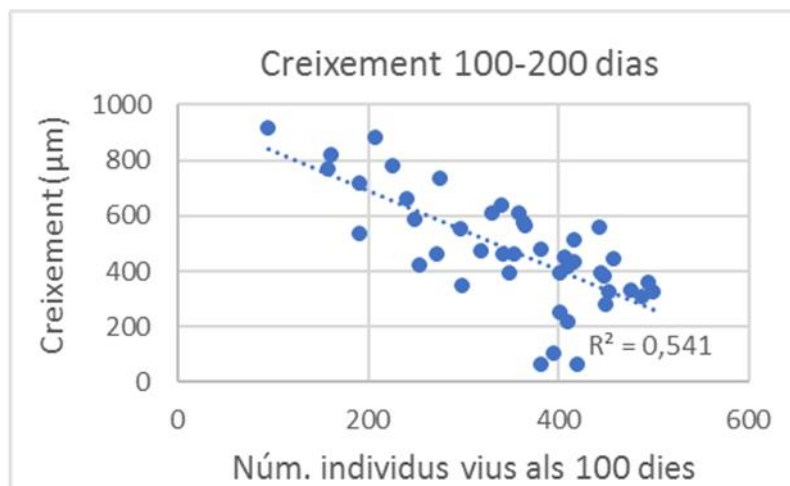


Figura 16. Relació negativa entre creixement i supervivència dels juvenils.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

Tractament alimentari	Núm. sembrades	Núm. rèpliques	Supervivència 0-200 dies					Longitud als 200 dies			
			Núm. vives als 200 dies	% Mitjana	% STD	% Mín.	% Màx.	Mitjana	STD	Mín.	Màx.
ALM	17186	37	8542	50,1	24,2	3	90,7	2809	729	1010	7210
ALM + CL	3597	6	2285	64,6	8,3	53,4	76,1	2179	627	980	4650
ALM + CL + SP	3638	6	2530	70,9	14,3	52,3	88,7	2186	673	940	5410
ALM + SP	3836	6	1956	64,8	23,7	30,5	91,5	2251	577	790	4600
AUTO	1942	5	703	32,8	14	9,7	47,4	3139	956	1090	6650
Total general	30199	60	16016	53,4	23,2	3	91,5	2663	719	790	7210

Taula 6: Resultats de la producció de nàiades 2018 als 200 dies de vida. Abreviacions: ALM = 2 ml d'algues marines; ALM + CL = 1 ml d'algues marines + 1 ml de Chlorella; ALM + CL + SP = 1 ml d'algues marines + 0,5 ml de Chlorella+ 0,5 ml de Spirulina; ALM + SP = 1 ml d'algues marines + 1 ml de Spirulina; AUTO = alimentació automàtica amb algues marines. El nombre de rèpliques és refereix als pots de cultiu per cada tractament.

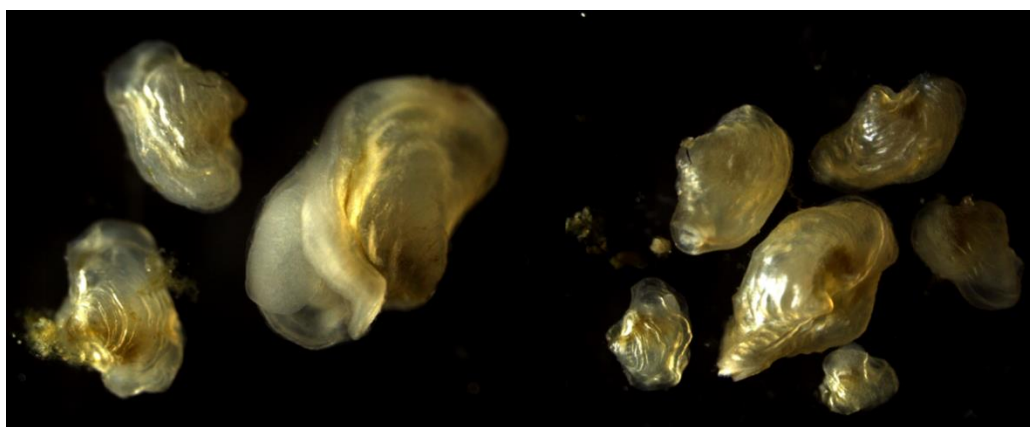


Figura 17. Juvenils deformes d'*Unio mancus* (2018).

La figura 18 mostra com supervivència i creixement canviïn força entre valors observats i ajustats, mentre la biomassa queda quasi inalterada, com que es tracta d'una variable escassament afectada pel nombre d'individus. Destaca la baixa supervivència observada als cultius alimentats automàticament. De fet, al canal equipat amb aquest sistema, tots els cultius tenien un percentatge alt de nàiades amb deformatats, en alguns casos extremes (Figura 17). Amb tota probabilitat aquesta va ser la causa de l'alta mortalitat, i conseqüentment de l'alt creixement dels individus restants. Tanmateix, a finals de temporada 2018, encara no es podia afirmar amb seguretat si el tipus d'alimentació havia sigut la causa de les deformatats, com que el mateix problema s'havia presentat també en un pot de cultiu d'un altre canal, aquest alimentat manualment. Per tal de resoldre aquest dubte, el 2019 s'ha repetit la prova de l'alimentació automàtica. Tot i que encara no són disponibles les dades de supervivència i creixement d'aquest any, algunes observacions preliminars

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

ens han mostrat que amb aquest tractament la supervivència als 100 dies de vida ha sigut elevada malgrat la presència de molts individus deformes, aquesta vegada amb un grau de deformitat aparentment més lleu. El proper pas serà investigar si l'aliment subministrat automàticament (algues marines en suspensió líquida) conté algun additiu responsable de la patologia observada i, si de cas, buscar una alternativa, en l'òptica de poder automatitzar, en un futur proper, tot el procés d'alimentació als canals interiors del laboratori.

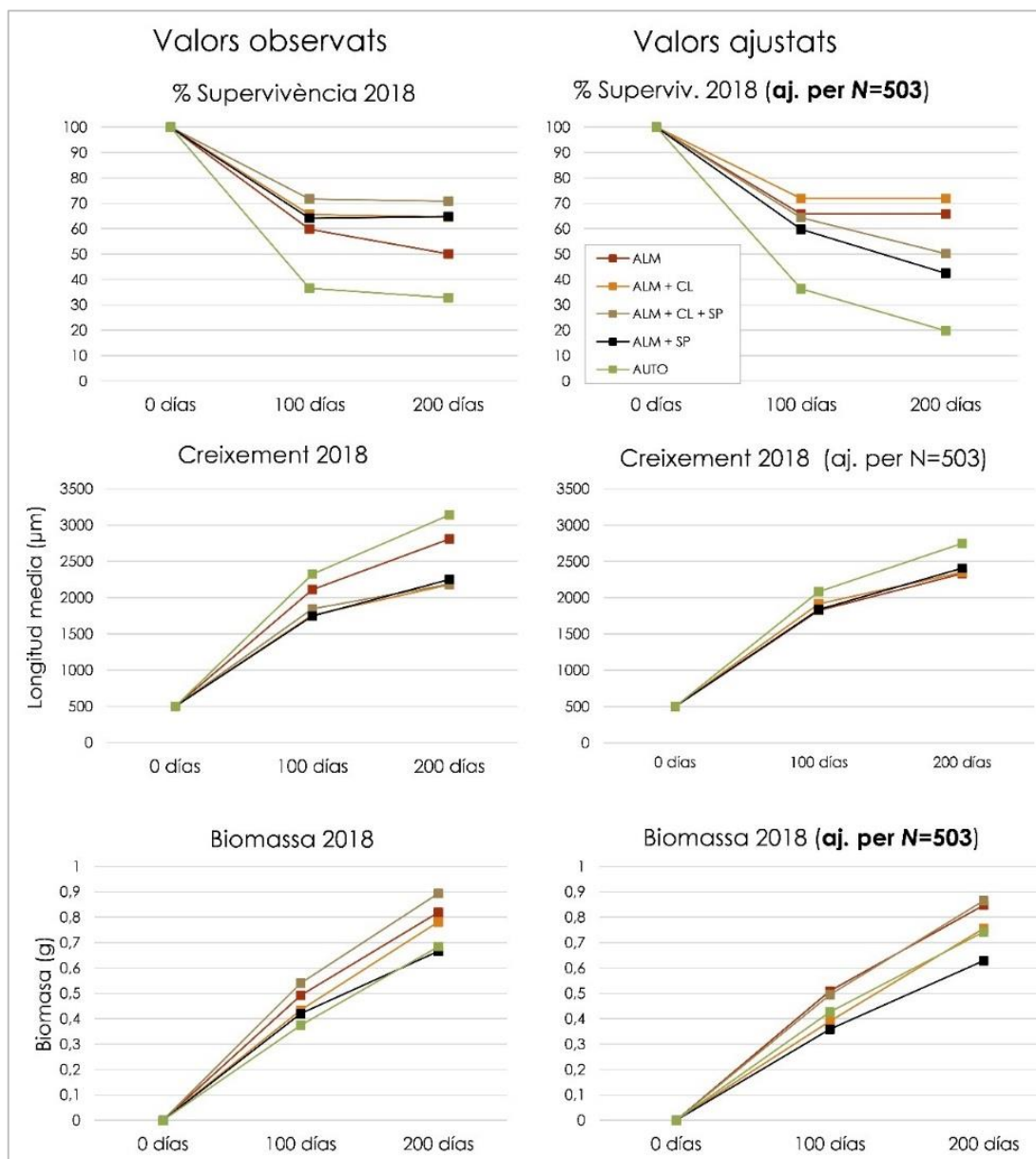


Figura 18. Valors observats i ajustats de supervivència, creixement i biomassa dels juvenils als 100 i 200 dies de la temporada de cria 2018.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccioses d'importància per a la salut pública.

Considerats els resultats excel·lents de l'alimentació manual amb alimentació basada en algues mixtes (la barreja d'algues marines, *Chlorella* i *Spirulina* va produir alta supervivència i biomassa), per al 2019 es va decidir alimentar tots els cultius amb aquest tractament, evidentment eficaç i més barat, excepte els dos canals dedicats a la segona prova d'alimentació automàtica amb algues marines en suspensió líquida.

Experiment de cultiu in vitro

Es coneixen dos mètodes per obtenir juvenils de musclos d'aigua dolça al laboratori: el mètode *in vivo* i el cultiu *in vitro*. El primer segueix el procés natural, que consisteix a utilitzar gloquidis per a la infecció de peixos hoste en condicions controlades de laboratori, i és el mètode que s'utilitza a les instal·lacions del Consorci de l'Estany per a la cria en captivitat d'*Unio mancus*. En canvi, l'altre mètode és una alternativa nova que permet als gloquidis experimentar la metamorfosi sense parasitar un peix hoste, cosa que teòricament permet obtenir un major nombre de juvenils, reduir el cost total de la reproducció i també evitar l'estrès de la captivitat per als peixos hoste (Lima et al., 2012). En aquest treball es pretén tornar a posar en pràctica la metodologia preestablerta per cultivar in vitro l'espècie *Unio mancus*, després de dos intents realitzats el 2016 i el 2017, dels quals només el primer va tenir èxit. Anticipem que, lamentablement, el del 2019 tampoc va donar resultats positius. A continuació, s'exposa la metodologia emprada i les dificultats sobrevingudes. Per aquest experiment es va seguir el protocol proposat per Owen et al., (2010). Es necessita un medi que compleixi totes les necessitats nutricionals dels gloquidis i que eviti la contaminació microbiana i fúngica, que representa un dels principals problemes que té el cultiu in vitro, la qual cosa ens obliga a treballar amb material esterilitzat i en condicions quant més asèptiques millor. Els ingredients del medi de cultiu són els següents: Medi M199 com a font de sals, aminoàcids i vitamines; sèrum de carpa i de conill com a font de proteïnes; i una barreja de tres antibiòtics (carbenicil·lina, gentamicina sulfat i rifampicina) i un antimicòtic (amfotericina B). La ràtio de M199: sèrum de carpa/conill és de 3:1.

Mentre el sèrum de conill es va comprar, el de carpa es va obtenir a partir d'exemplars pescats a Banyoles durant una actuació de control d'espècies invasores, seguint els protocols de Uthaiwan et al. (2001) i Owen (2009): a les carpes anestesiades se li va extreure la sang de l'arteria caudal, mitjançant tall de la cua. La sang recollida en un vas de precipitats es va deixar coagular a i es va refrigerar a 4°C per 20 hores. A continuació, la sang va ser centrifugada i el plasma sobrenedant es va aspirar, filtrar i congelar a -20°C.

Un cop obtinguts els gloquidis, es va procedir a la seva neteja i selecció. Primer es va observar si els gloquidis estaven actius i en bon estat. Aquests gloquidis seleccionats van ser netejats amb una malla de filtre de 125 µm i després rentats tres vegades per decantació en un medi de cultiu MEM (Minimal Essential Method) en un vas de precipitats de 50 ml. El medi, sent més viscos que l'aigua, fa que la majoria de les impureses, i especialment les espores fúngiques que podrien contaminar els cultius, es quedin en suspensió. A continuació, es van seleccionar manualment, sota la lupa, uns 7000 gloquidis actius (els que s'havien tancat a contacte amb el MEM, figura 20) a repartir entre 35 vials de cultiu, 200 per cada vial (el nombre de rèpliques de cultiu es va decidir en base a la quantitat de sèrum

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

disponible). Es va extreure tant medi MEM com va ser possible amb una pipeta Pasteur de vidre estèril, procurant no extreure cap gloquidi.



Figura 19. Extracció de sèrum de carpa a partir de sang centrifugada



Figura 20. Gloquidis d'*Unio mancus* durant la fase de triatge

Per preparar i transferir el medi de cultiu als vials es va treballar sota la campana i amb flama. El medi de cultiu amb els gloquidis es va guardar en una incubadora a una temperatura de 23°C i amb un pH al voltant de 7,4, controlat amb una aportació de CO₂ determinada a la incubadora.

Els 35 vials preparats amb gloquidis es van repartir entre els dos tractaments: 15 es van preparar amb sèrum de carpa i 20 amb sèrum de conill. Els vials van ser retolats, tapats i posats dins la incubadora, on es van incubar a 23°C amb una aportació constant del 5% de CO₂. Un 50% del medi de cultiu va ser canviat cada 24 hores. Quan es feien els canvis de medi diaris, també s'observava a simple vista si hi havia contaminació fúngica a cadascun dels vials (Figura 22). En els vials en què

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

s'observava la presència de fongs, s'extreia la contaminació amb la micropipeta, intentant emportar-se el menor nombre de gloquidis possible. Durant el cultiu *in vitro*, també es van fer mesures de pH diàries a una rèplica per cada tractament.



Figura 21. A l'esquerra: Estufa d'incubació enriquida amb CO₂; a la dreta: vials d'incubació.

El mètode *in vivo* utilitzat al Consorci de l'Estany per al cultiu de l'espècie *Unio mancus* ha determinat que aquesta espècie tarda uns 10 dies a metamorfitzar en juvenil des que els gloquidis infecten els peixos. Pel cultiu *in vitro* es va fer el supòsit que el temps seria el mateix, i per tal de detectar el moment de la metamorfosi es va fer un seguiment dels gloquidis incubats a partir del vuitè dia de cultiu.



Figura 22. Contaminació fúngica en un cultiu *in vitro*

Tal com s'ha anticipat, l'experiment no va tenir èxit positiu i no es va arribar a veure cap canvi morfològic. Entre els dies 3 i 4, tots els cultius del tractament amb carpa i la meitat dels de conill ja estaven contaminats per fongs. El dia 5 es van revisar alguns dels cultius contaminats, i com que la gran majoria dels gloquidis es veien morts (oberts i amb filaments de fongs, figura 22), es va decidir eliminar els cultius contaminats (tots excepte 10 rèpliques de conill) i fer servir el sèrum restant per

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

preparar 5 noves rèpliques amb sèrum de conill i 10 de carpa. Malgrat els esforços, la majoria dels cultius estaven contaminats, i en altres es va observar l'enterboliment del medi. En cap cas es van trobar gloquidis vius. Curiosament, es va comprovar la mortalitat total dels gloquidis fins i tot en un vial en què no s'havia detectat ni presència de fongs, ni enterboliment del medi. Per tant, se'n pot deduir que la contaminació fúngica va ser la causa més probable, però no necessàriament la única, de l'èxit negatiu de l'assaig.

Histologia

L'objectiu de la realització de talls histològics de nàiades és de disposar d'informació de detall de les estructures internes d'*Unio mancus* durant les primeres fases de vida; fases que presenten una alta mortalitat, caracteritzades per un ràpid procés de canvi morfològic. L'observació d'aquest canvis en l'anatomia dels juvenils pot proporcionar informació útil pel que fa a l'ecologia, i conseqüentment la conservació d'aquesta espècie, i també l'alimentació, un aspecte fonamental per al perfeccionament de la metodologia d'engreix en els primers mesos de vida.

Durant la temporada de cria 2018 s'han recollit mostres periòdicament des del naixement fins a l'assoliment de 3-4 mm de llargada. Les mostres han estat fixades amb solució de Bouin (formol, àcid cítric i àcid acètic) i conservades en alcohol 70° a 4°C. S'han tallat 3 exemplars de 3 a 4 mm de llargada i s'han practicat talls longitudinal-lateral, transversal i longitudinal per part de l'equip del SEFAS. Els talls realitzats han sigut tenyits amb hematoxilina-eosina i observats amb un microscopi òptic de la Facultat de Veterinària de la UAB.

S'aporten uns exemples d'estructures visualitzades (Figures 23 i 24). Amb el conjunt de mostres recollides, caldrà realitzar nous talls histològics per acabar de cobrir tot el període d'engreix del 1^{er} any de vida.

El tractament de mostres tan petites per obtenir talls histològics clarament orientats ha resultat ser una dificultat afegida i les proves realitzades en el marc d'aquest projecte ens ha permès millorar la tècnica per al seu tractament.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

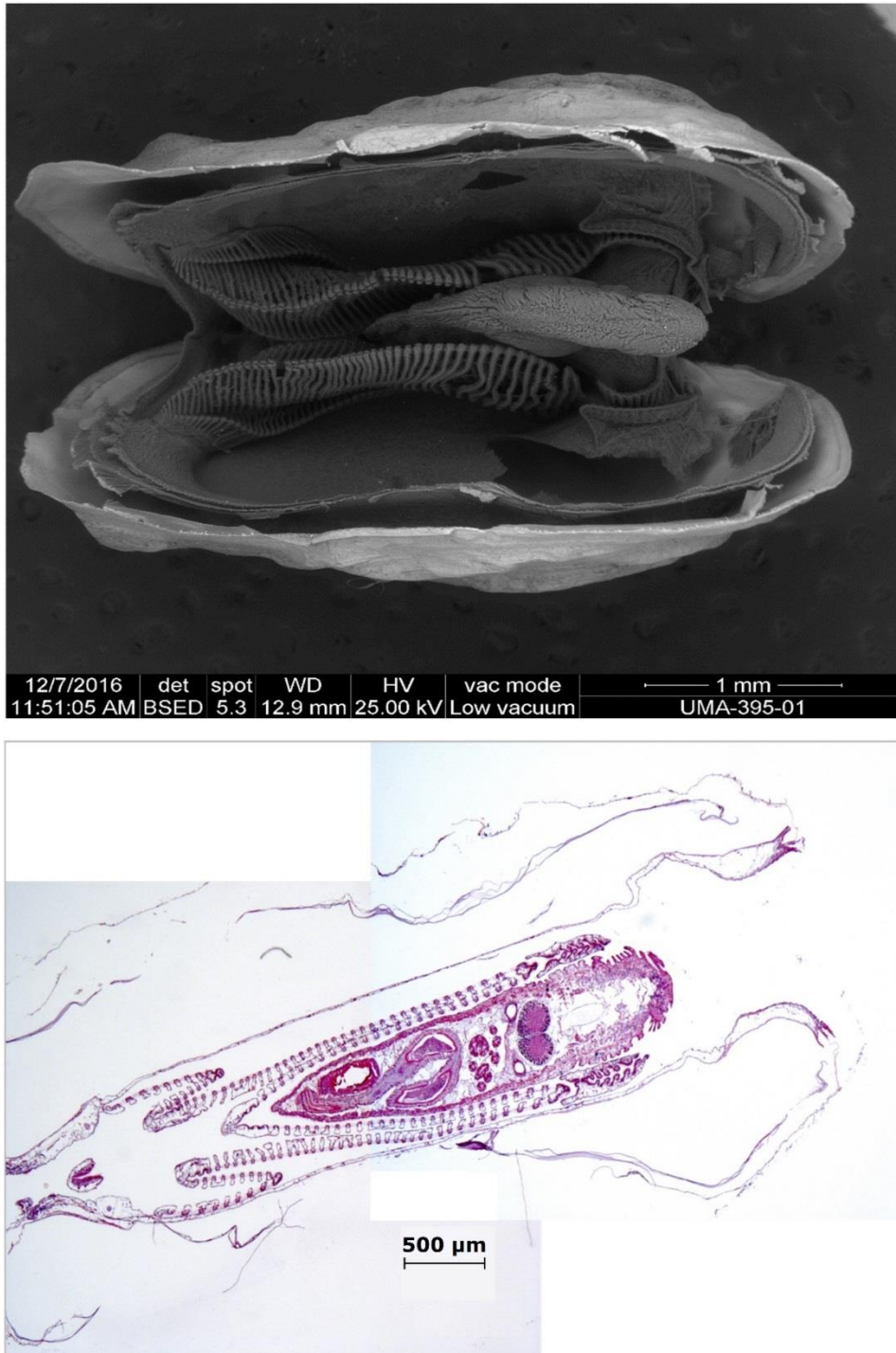


Figura 23. Imatge al microscopi electrònic (a dalt) i tall histològic d'un individu de nàiade d'uns 4 mm de llargada. Ambdues mostren el mantell, les brànquies, el peu i, en el cas del tall, són visibles els òrgans interiors.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

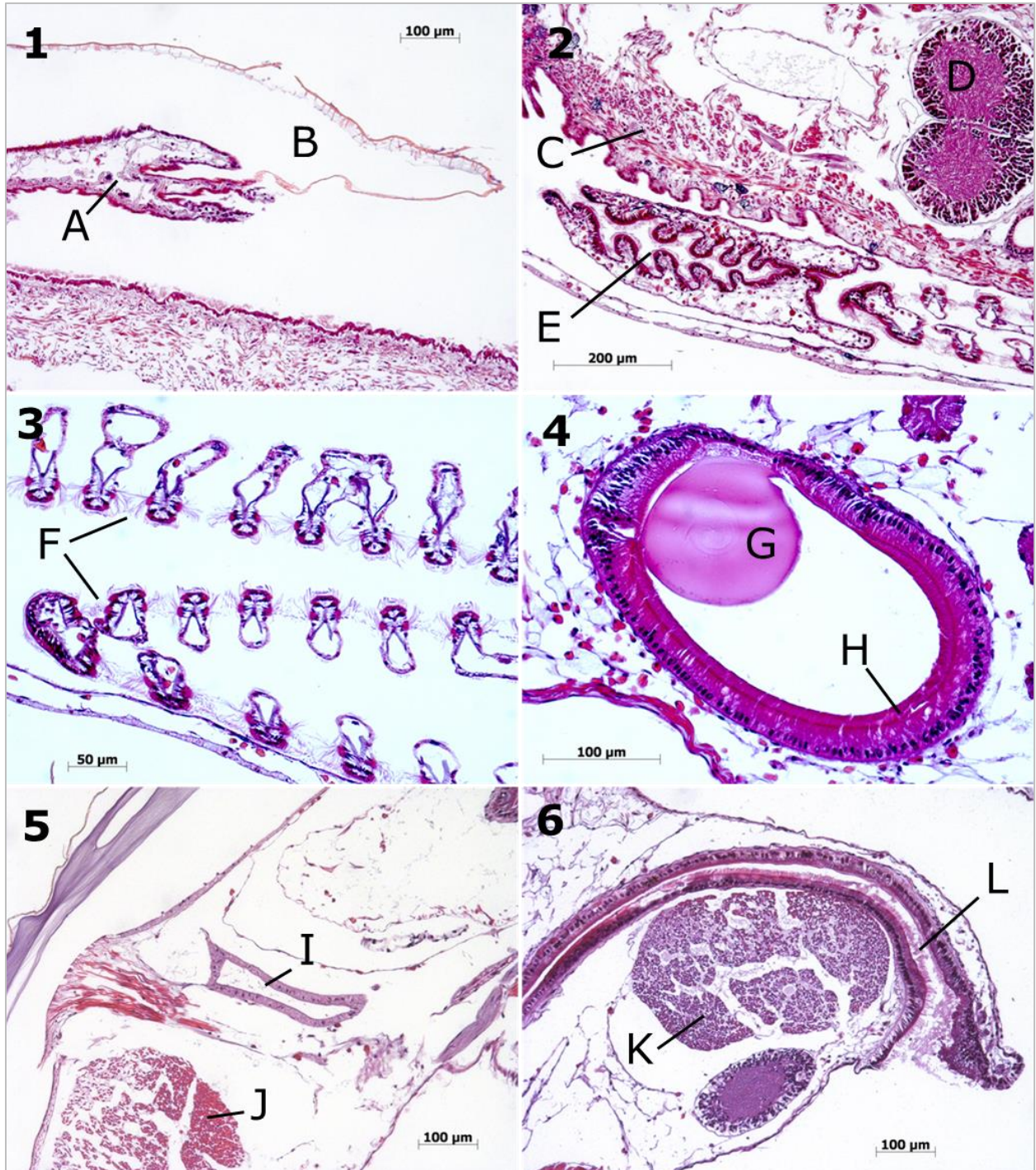


Figura 24. Talls histològics d'exemplars juvenils (3-4 mm) d'*Unio mancus*. 1) Porció distal del teixit del mantell (A) amb producció de periòstrac (B); 2) Teixit muscular del peu (C), gangli del peu (D) i palp labial (E); 3) Feixos branquials tallats transversalment: s'observen els cilis (F); 4) Estómac amb estilet (G) i cèl·lules piramidals amb cilis; 5) Nefridi (I) i múscul abductor (J); 6) Múscul abductor (K) i tracte final del recte (L).

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

CAPÍTOL 4: CARTOGRAFIA DE LA VEGETACIÓ DE RIBERA DEL RIU TERRI

El riu Terri neix a la confluència dels recs de desguàs de l'Estany de Banyoles, discorre pels municipis de Banyoles, Porqueres, Cornellà del Terri i Medinyà, abans de desembocar en el Riu Ter. La superfície de la seva conca és d'aproximadament 105,35 km². L'ús predominant del sòl és de conreus farratgers, ramaderia intensiva i urbanitzacions. La vegetació de ribera és dominada per plantacions de pollancre i plàtans, amb un percentatge reduït de superfície ocupada pel bosc de ribera natural. Després d'unes dècades durant les quals la qualitat de les seves aigües va estar fortament compromesa per les aigües residuals (urbanes, industrials i agrícoles/ramaderes) no tractades que abocaven directament en el riu, la situació ha millorat força a partir dels anys '90, gràcies a la instal·lació d'estacions de depuració d'aigües residuals.

Objectius

L'objectiu principal d'aquest treball és la realització d'un mapa digital de la vegetació a escala 1:5.000. Aquest mapa ha de mostrar les comunitats vegetals que constitueixen la vegetació que actualment ocupa el corredor fluvial, recollint el curs principal del Riu Terri i el curs inferior dels afluents principals. Es pretén dotar al mapa d'un equilibri teòric entre la interpretació de la vegetació i el nivell tècnic de la llegenda que permeti disposar d'unes tipologies correctament classificades, poligonades, georeferenciades i amb la necessària continuïtat territorial.

Els resultats d'aquest treball són necessaris com a estudi de camp preliminar, per seleccionar les zones més adients per a la reintroducció de la nàiada allargada *Unio mancus*, en el marc del present projecte.

Anàlisi i definició

El mètode de treball s'ha basat en:

- Definició conceptual dels elements de la llegenda.
- Criteris per a determinar la delimitació dels polígons.
- Criteris de prioritat de selecció de les comunitats vegetals respecte a les altres.

Procés i mètode de treball

El procés de treball es basa en les fases següents:

- Definició de l'espai a cartografiar.
- Preparació del material digital i a paper per graficar les interpretacions de camp.
- Fotointerpretació de les diferents unitats cartogràfiques.
- Treball de camp per la verificació de la fotointerpretació.
- Control de qualitat: comprovació de connectivitats gràfiques i etiquetatges.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

Tot seguit s'exposen detalladament.

Metodologia

Definició dels límits a cartografiar

Per iniciar aquesta cartografia ha estat necessari establir els criteris de definició dels límits de la vegetació de ribera, aquests són:

- Cartografiar el curs principal del Riu Terri i el curs inferior dels tres afluents principals (el Garrumbert, el Matamors i el Revardit).
- Cartografiar les àrees sense vegetació que formen part del curs fluvial per tal de donar continuïtat a aquest ecosistema (com per exemple les àrees antròpiques).
- El límit de l'àrea a cartografiar s'ha definit com la franja dins els 100 m de distància des del curs del riu.

Preparació del material digital i de camp

Com a material digital, s'han emprat ortoimatges en color i cartografia topogràfica, ambdues a escala 1:5.000, impreses en format A3, provinents de l'Institut Cartogràfic i Geològic de Catalunya (ICGC) oficials de Catalunya. Les ortoimatges es van preparar i imprimir en format A3, i cobrir amb un film d'acetat transparent que permetia sobreposar-lo amb les imatges i dibuixar els límits de les diferents unitats cartogràfiques.

Fotointerpretació i captura

Un cop preparat el material s'inicià la fotointerpretació i el treball de camp utilitzant complementàriament la interpretació de l'ortoimatge i les observacions de camp.

Durant el procés de fotointerpretació s'identifiquen aquelles textures, colors, objectes i elements classificables com a unitats cartogràfiques que poden ser representades a l'escala de treball. Cada unitat es dibuixa sobre el film d'acetat aconseguint delimitar amb precisió el límit.

El treball de camp es va dividir en dues fases:

- La primera va consistir en la presa de contacte amb la vegetació i la cartografia de camp. Es van iniciar les campanyes de recollida de dades, tant l'observació directa i grafia sobre els films d'acetat, i identificació de comunitats vegetals (segons l'escola Sigmatista o Fitosociològica) i hàbitats dels manuals d'hàbitats de Catalunya.
- La segona fase va consistir en traspasar la informació cartogràfica recollida durant la campanya de camp sobre la base ortofotogramètrica digital.

En les diferents seccions i en concret en els fulls d'acetat es van grafiar els següents elements:

- Els límits de les unitats cartogràfiques de tipus poligonal diferenciades en dos: els límits considerats clars o fronteres dures que corresponen a aquells marges del polígon clarament identificables (per exemple entre boscos i conreus, edificacions i

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

boscós, etc.) i els límits considerats difusos o fronteres laxes que corresponen a línies que no són perfectament delimitables.

- Les etiquetes dels polígons que són els identificadors numèrics i alfanumèrics de la llegenda.
- Els punts que corresponen a objectes d'interès ecològic o logístic, com ara abocaments, assuts, ponts, etc.

Integració de dades

Una vegada finalitzat el treball de camp es va passar a informatitzar les dades recollides. Aquesta etapa la coneixem com integració digital de les dades.

Es remarca aquesta fase del procés perquè es transcriu la informació sobre una base digital detallada, georeferenciada i amb un error planimètric molt baix, a una escala aproximada de digitalització 1:1.500 i amb un procés de restitució visual molt menys propens a errors que la restitució feta sobre cartografia topogràfica convencional.

S'elaboren 3 capes d'informació diferents:

- Els límits del polígons
- Les etiquetes o atributs corresponents a la llegenda per cada polígon
- Els objectes puntuals (elements d'interès)

Control de qualitat

L'aspecte tècnic del mapa s'ha controlat mitjançant processos automàtics o semiautomàtics per tal de comprovar la total connexió de les línies (localitzar línies no connectades, cues, etc.) i el correcte etiquetatge de tots els polígons (localitzar polígons amb manca d'etiquetes, polígons fantasma, etc...). Per efectuar aquesta tasca s'ha optat per una estructuració topològica de polígons per ser el sistema més efectiu i fiable.

En l'aspecte temàtic s'ha copsat la fidelitat de la fotointerpretació mitjançant la verificació amb el treball de camp.

El mapa digital definitiu s'obté en format d'estructura vectorial i queda integrat al Sistema d'Informació Geogràfica del projecte.

Característiques tècniques

Pel que fa al programari, el principal programa que s'ha utilitzat ha estat el SIG MiraMon v.8.0 de Xavier Pons (www.creaf.uab.es) que corre sobre el sistema operatiu Windows.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

Escala de treball

Per l'elaboració del mapa a escala 1:5.000 s'ha treballat amb diversos factors d'ampliació, des de 1:1000 fins a 1:5000. Bàsicament l'escala 1:2.500 ha estat la més emprada ja que era l'escala de treball de camp i aixecament de mapa, ara bé en el moment de reinterpretar la informació recollida en les diferents seccions de les ortoimatges i digitalitzar-la s'ha treballat entre 1:1000 i 1:2500 per tal de visualitzar el màxim detall.

Paràmetres de captura

L'àrea mínima prevista per a ser delimitada durant el procés d'aixecament del mapa ha estat de 200 m².

Llegenda

La llegenda prèvia

La llegenda prèvia serveix per estimar i llistar el nombre de classes de la vegetació que es poden identificar en el territori. És un material bàsic per emprendre el treball de camp, però cal anar modificant a mida que avança el treball per tal d'ajustar-la a la realitat.

La llegenda definitiva

Una vegada realitzat el treball de camp, la digitalització de les dades, validació i correcció d'errors tant del procés d'aixecament del mapa com de la digitalització es descarten unitats i es concreten les unitats bàsiques de la llegenda.

La llegenda definitiva està formada per 237 classes diferenciades en classes pures i compostes. S'han determinat 57 classes pures que corresponen a unitats bàsiques i 180 classes complexes que estan constituïdes per la combinació de les 62 classes pures de la llegenda definitiva bàsica. Es pot observar que és un mapa detallat tant per l'escala 1:5.000 com per la quantitat d'informació recollida en la llegenda.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

Codi	Descriptor	Codi Habitat CAT	Codi Habitat CORINE	Interès Comunitari
V01	Pollancredes amb lliri pudent (<i>Iris foetidissima</i>), del territori ruscínic i dels Prepirineus centrals	44j	44.612	Sí
V02	Freixenedes de <i>Fraxinus angustifolia</i> , de terra baixa	44l	44.637+	Sí
V03	Poblaments de pollancre (Populus nigra o híbrids)	-	-	No
V04	Poblaments de salzes blanc (<i>Salix alba</i>)	-	-	No
V05	Poblaments de freixes (<i>Fraxinus angustifolia</i>)	-	-	No
V06	Poblaments d'oms (<i>Ulmus minor</i>)	-	-	No
V07	Poblaments de plàtans (<i>Platanus orientalis</i> var. <i>acerifolia</i>)	-	-	No
V08	Poblaments de nogueres i/o figueres	-	-	No
V09	Poblaments d'ailants (<i>Ailanthus altissima</i>)	-	-	No
V10	Poblaments de Robinia pseudoacacia	-	-	No
V11	Plantacions de pollancre en boscos de ribera	-	-	No
V12	Plantacions de plàtans (<i>Platanus orientalis</i> var. <i>Acerifolia</i>) en boscos de ribera	-	-	No
V13	Pinedes de pi blanc (<i>Pinus halepensis</i>)	42a	42.84	Sí
V14	Poblaments de pins (<i>Pinus pinea</i> , etc.)	-	-	No
V15	Alzinars amb pins (<i>Pinus halepensis</i>) de terra baixa	45g	45.3123+	Sí
V16	Poblaments d'alzines (<i>Quercus ilex</i>)	-	-	No
V17	Alzinars amb roures (<i>Quercus pubescens</i>) de terra baixa i de l'estatge submontà	45d	45.3122+	Sí
V18	Boscos de roures (<i>Quercus pubescens</i>) sovint amb alzines (<i>Q. ilex</i>), de terra baixa	41m	41.714	Sí
V19	Poblaments de roures (<i>Quercus pubescens</i>)	-	-	No
V20	Poblaments de lledoners (<i>Celtis australis</i>)	-	-	No
V21	Saücars (bosquines de <i>Sambucus nigra</i>), amb vidalba (<i>Clematis vitalba</i>), esbarzer (<i>Rubus ulmifolius</i>)..., higròfils i subnitròfils, lligats sobretot als boscos de ribera	-	31.8127+	No
V22	Canyars d' <i>Arundo donax</i>	53d	53.62	No
V23	Bardisses amb esbarzers (<i>Rubus ulmifolius</i>), aranyoners (<i>Prunus spinosa</i>)..., mesòfiles, lligades a boscos mesohigròfils	31p	318.122	No
V24	Bardisses amb roldor (<i>Coriaria myrtifolia</i>), esbarzer (<i>Rubus ulmifolius</i>)..., de terra baixa (i de l'estatge montà)	31y	31.891	No
V25	Bardisses d'espina-vera (<i>Paliurus spina-christi</i>), d'ambients secs de terra baixa, al territori ruscínic	31z	31.895+	No
V26	Ginestars de ginesta vera (<i>Spartium junceum</i>), de les contrades mediterrànies (sobretot les marítimes)	32ac	32A	No
V27	Herbassars i vels de plantes enfiladisses, subnitròfils, de les vores d'aigua	37.71	6430	No
V28	Prats subnitròfils de teròfits (o cardassars), amb <i>Aegilops geniculata</i> (traiguera), <i>Bromus rubens</i> , <i>Medicago rigidula</i> , <i>Carthamus lanatus</i> ..., de terra baixa	34p	34.81	No

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

V29	Fenassars (prats de <i>Brachypodium phoenicoides</i>), amb <i>Euphorbia serrata</i> , <i>Galium lucidum</i> (espunyidella blanca)..., xeromesòfils, de sòls profunds de terra baixa i de la baixa muntanya mediterrània	34g	34.36	No
V30	Comunitats ruderals de terra baixa	86a, 87b	87.21+	No
C01	Plantacions de pollancre (Populus sp., híbrids)	83g	83.321	No
C02	Plantacions de freixes (<i>Fraxinus angustifolia</i>)	-	-	No
C03	Plantacions de plàtans (<i>Platanus orientalis</i> var. <i>acerifolia</i>)	83g	83.3251+	No
C04	Plantacions de lledoner (<i>Celtis australis</i>)	-	-	No
C05	Fruiterars de regadiu (pomeres, pereres, etc.)	83b	83.15	No
C06	Vivers de plantes llenyoses	83i	83.4+	No
C07	Vinyes	83d	83.211	No
C08	Fruiterars de secà (oliveres)	83a	83.11	No
C09	Conreus herbacis extensius de sòls humits (blat de moro i melca)	82b	82.31+	No
C10	Conreus herbacis intensius: hortes	82a2	82.2	No
C11	Conreus herbacis intensius: hivernacles	82a2	82.2	No
C12	Prat de dall (conreus herbacis)	-	-	No
C13	Conreus herbacis extensius de secà (cereals i farratgeres)	82c	82.32+	No
C14	Camps condicionats com a pastura intensiva	81a	81.1	No
C15	Conreus abandonats	87a	87.1	No
A01	Àrees urbanitzades, amb claps importants de vegetació natural	86b	-	No
A02	Edificacions aïllades amb àrea d'influència i vegetació associada (jardins i vegetació ruderal)	86a	87.21+	No
A03	Parcs i jardins	85a	-	No
A04	Fileres d'arbres caducifolis (pollancre híbrids o similars)	-	84.12+	No
A05	Granges	-	-	No
A06	Àrees industrials amb àrea d'influència (edificacions, aparcaments, patis d'acopis de mercaderies, vialitat, etc.)	86a	-	No
A07	Àrees industrials amb àrea d'influència (plantes de tractament d'aigües)	86a	89.24	No
A08	Plantes d'explotació d'àrids (acopi i tractament)	86c	-	No
A09	Carrils de bici	-	-	No
A10	Vies rurals no asfaltades	-	-	No
A11	Vies rurals asfaltades	-	-	No
A12	Carrers	-	-	No
A13	Carreteres	-	-	No
A14	Autovies	-	-	No
A15	Ferrocarrils	-	-	No
R01	Llera del riu amb fangars, arenys, codolars, amb o sense vegetació	-	-	No
R02	Canals artificials	-	-	No

Taula 7. Llegenda definitiva

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

A continuació es llisten 3 classes compostes de exemple de la llegenda: la columna "Codi" conté la combinació dels codis de les unitats bàsiques de la llegenda separats per un guionet, l'ordre ve definit pel grau d'abundància- recobriment respecte el recobriment total.

La columna "Descriptor" conté la descripció de la unitat en llengua catalana. No és més que la substitució del codi pel seu descriptor. Per exemple: el codi V18-V13 indica que el polígon conté, de més dominant a menys, boscos de roures i pinedes de pi blanc.

Les columnes "Codi Habitat CAT" i "Codi Habitat CORINE" indiquen els codis dels habitats corresponents a Catalunya i segons el projecte CORINE. La última columna indica si l'habitat és o no d'interès a nivell comunitari europeu.

CODI	Descriptor
V18-V13	Boscos de roures (<i>Quercus pubescens</i>) sovint amb alzines (<i>Q. ilex</i>), de terra baixa + Pinedes de pi blanc (<i>Pinus halepensis</i>)
V23-V10-V29	Bardisses amb esbarzers (<i>Rubus ulmifolius</i>), aranyoners (<i>Prunus spinosa</i>)..., mesòfiles, lligades a boscos mesohigròfils + Poblaments de Robinia pseudoacacia + Fenassars (prats de <i>Brachypodium phoenicoides</i>), amb <i>Euphorbia serrata</i> , <i>Galium lucidum</i> (espunyidella blanca)..., xeromesòfils, de sòls profunds de terra baixa i de la baixa muntanya mediterrània
V05-V03-V07-V27	Poblaments de freixes (<i>Fraxinus angustifolia</i>) + Poblaments de pollancre (Populus nigra o híbrids) + Poblaments de plàtans (<i>Platanus orientalis</i> var. acerifolia) + Herbassars i vels de plantes enfiladisses, subnitròfils, de les vores d'aigua

Taula 8: Exemples de la combinació de classes definitives de la llegenda que configuren les descripcions de les unitats cartografiades per polígon.

Objectes puntuals

A part de les superfícies que representen les classes de vegetació i les àrees antropitzades, es van digitalitzar els objectes d'interès ecològic o logístic d'extensió massa petita per poder ser dibuixats com a polígons, i per tant es van representar com a objectes puntuals (Taula 9).

Codi	Descriptor
P	Pont
A	Assut
E	Escullera
Sp	Abocament

Taula 9. Objectes cartografiats com a punts

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

Simplificacions derivades del mapa de vegetació

La llegenda simplificada

Davant la gran quantitat de classes del mapa de vegetació (237 classes diferents) es fa necessari crear una llegenda simplificada. Aquesta llegenda s'ha preparat per ser utilitzada com a complement de l'original. És útil com element de consulta dins les capes temàtiques digitals del SIG. La llegenda emprada es mostra a la taula 10.

Codi	Descriptor
1	Alberes i pollancredes amb lliri pudent
2	Freixenedes de terra baixa
3	Poblaments d'arbres (pollancre, freixe de fulla petita, salzes, om, plàtans, nogueres, figueres i ailant)
4	Plantacions forestals de ribera
5	Bosc d'aciculifolis
6	Bosc d'esclerofil·les
7	Bosc caducifolis
8	Saücars
9	Canyars
10	Bardisses
11	Ginestar
12	Herbassars
13	Plantacions forestals
14	Conreus llenyosos de regadiu
15	Conreus llenyosos de secà
16	Conreus herbacis d'àmbits humits i/o regadiu
17	Conreus herbacis de secà
18	Àrea urbanitzada
19	Parcs, jardins i tanques
20	Explotació agrària
21	Àrea amb activitat industrial i minera
22	Vialitat
23	Llera fluvial i afloraments rocosos
24	Canals artificials

Taula 10. Llegenda simplificada del mapa de vegetació

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

Els grups de vegetació

Una altra reclassificació de la llegenda simplificada ha estat la llegenda dels grups de vegetació. Aquesta s'ha creat per poder visualitzar el mapa en colors clarament diferenciables i tenir una llegenda el màxim de simplificada. Està formada per 6 classes, on cadascuna d'elles inclou els grups de classes que pertanyen a una mateixa formació vegetal o àrea antròpica, tant si es troben en bon estat com si estan alterats. A continuació es llisten les diferents classes:

Codi	Descriptor
1	Bosc i bosquines de ribera
2	Bosc d'esclerofil·les, aciculifolis i caducifolis
3	Vegetació arbustiva i herbàcia
4	Espai d'explotació agrària i forestal
5	Àrea antròpica
6	Llera fluvial i canals

Taula 11. Llegenda dels grups de vegetació

Quan es visualitza per l'ordinador el mapa complet es pinten els polígons i les línies segons aquesta llegenda.

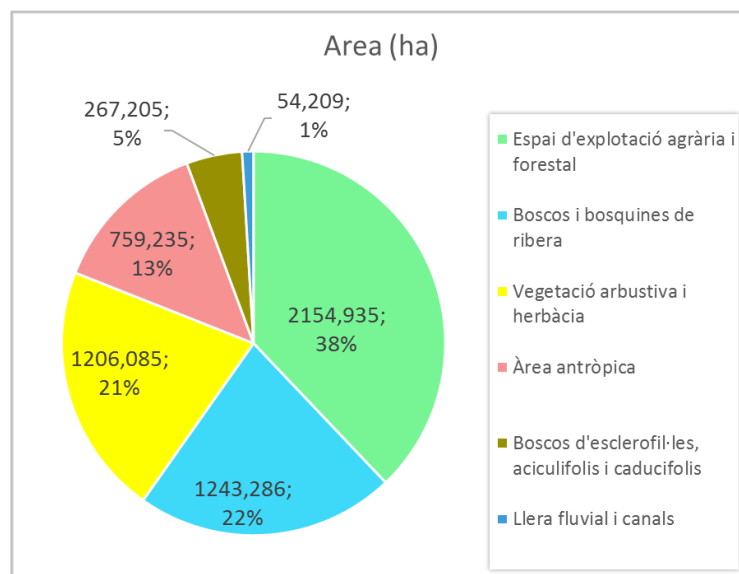


Figura 25. Percentatges de cobertura de l'àrea cartografiada segons els grups de vegetació.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

Estadístics

Segons el present treball, el sòl al marge del riu Terri està dominat per espais d'explotació agrària i forestal (38% del total, Figura 25), categoria representada sobretot per conreus herbacis de secà i plantacions forestals de pollancre i plàtans (Taula 12). Les següents categories més representades són els boscos i bosquines de ribera (22%) i la vegetació arbustiva i herbàcia (21%), amb unes extensions comparables. Els boscos d'altres tipus (principalment rouredes i alzinars) representen només el 5% del total. Les àrees urbanitzades, industrials i les granges ocupen conjuntament un 13% de la zona cartografiada.

Codi	Descriptor	Area (ha)
17	Conreus herbacis de secà	183,8704
1	Alberedes i pollancredes amb lliri pudent	46,6903
4	Plantacions forestals de ribera	33,6844
16	Conreus herbacis d'àmbits humits i/o regadiu	26,8150
3	Poblaments d'arbres (pollancre, freixe de fulla petita, salzes, om, plàtans, nogueres, figures i ailant)	25,5827
18	Àrea urbanitzada	18,7461
21	Àrea amb activitat industrial i minera	18,7461
22	Vialitat	14,7030
6	Boscos d'esclerofil·les	12,6098
20	Explotació agrària	10,3773
2	Freixenedes de terra baixa	10,2578
7	Boscos caducifolis	9,6187
10	Bardisses	5,0500
9	Canyars	5,0271
8	Saücars	4,1038
12	Herbassars	3,9467
23	Llera fluvial i afloraments rocosos	3,5880
13	Plantacions forestals	3,5083
19	Parcs, jardins i tanques	2,9474
5	Boscos d'aciculifolis	1,6128
14	Conreus llenyosos de regadiu	0,7754
24	Canals artificials	0,6150
15	Conreus llenyosos de secà	0,2717
11	Ginestar	0,0835

Taula 12. Àrees ocupades per les categories incloses a la llegenda simplificada, ordenades per extensió.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccioses d'importància per a la salut pública.

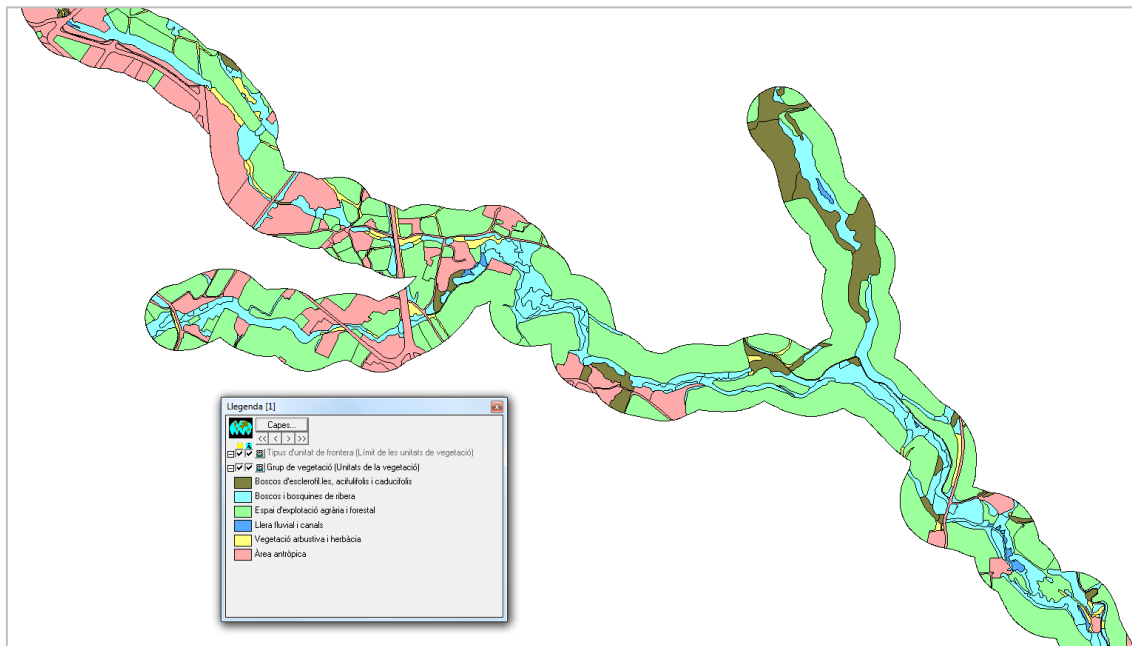


Figura 26. Mapa de la vegetació d'un tram mitjà del Riu Terri.

Selecció dels punts de mostreig per a l'Actuació 2 ("Estudi en el medi natural de la presència d'agents infecciosos a través d'*Unio mancus*")

Com a primer resultat del treball de cartografia, es van seleccionar uns punts per estudiar la capacitat de les nàiades de detectar patògens presents al medi aquàtic (Figura 10). Alguns d'aquests punts es van triar a zones "netes" que servissin de control i que no estaven incloses en el mapa de vegetació, donat que es trobaven fora del curs del Terri (Estany de Banyoles) o a la ciutat de Banyoles (recs de desguàs); altres, en canvi, eren possibles "punts calents" de contaminació biològica, p.e. en proximitat d'abocaments. A continuació es descriuen els punts seleccionats:

- **Pesquera Mates (Act2_1) i Pesquera Prat (Act2_2).** Punts de control localitzats a l'Estany de Banyoles, caracteritzat per una qualitat biològica excel·lent de les aigües.
- **Antiga fàbrica de paper (Act2_3).** Situat al Rec d'en Teixidor, a la perifèria del ciutat de Banyoles, suposadament també mostra una bona qualitat de les aigües, a més de tenir una important població natural de nàiades.
- **Bassa de la Farga (Act2_4).** Es troba a una bassa artificial construïda en el curs del Rec Major, que rep les aigües de l'Estany després d'haver recorregut la ciutat.
- **Pont de Canaleta (Act2_5).** Rep directament una sortida d'aigües pluvials, que durant les pluges més forts poden barrejar-se amb aigües de clavegueram. A més, el punt es troba en proximitat d'una fàbrica d'embotits.
- **Pont de Pujals (Act2_6).** Localitzat aigües amunt del poblat de Cornellà del Terri, mostra una qualitat aparentment acceptable, tot i trobar-se a una zona de granges

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccioses d'importància per a la salut pública.

de porcs, ja que la contaminació provinent de Banyoles, teòricament, s'ha depurat al llarg del curs del Riu Terri.

- **Depuradora de Cornellà (Act2_7).** Punt visiblement contaminat, rep directament les aigües residuals de l'EDAR del poble proper.

Selecció dels punts de repoblació d'*Unio mancus*

Es van escollir 6 punts (Figura 12) que representen un equilibri entre les següents característiques, individuades com a necessàries, o al menys desitjables, per a la reintroducció de les nàiades al Riu Terri:

- **Règim hidrològic permanent.** Per a que les nàiades i els seus peixos hoste, així com per tot el biota aquàtic, puguin sobreviure i formar unes poblacions reproductives, és necessària la presència d'aigua corrent tot l'any. Això es verifica tant al curs principal del Riu Terri com als trams dels recs de desguàs que s'han triat. Els afluents del Terri i alguns recs de desguàs, en canvi, poden ser subjectes a sequera estacional, d'origen natural o antròpica.
- **Qualitat acceptable de les aigües.** Les nàiades són organismes sensibles a la contaminació de les aigües, per tant els nous nuclis poblacionals s'han de formar necessàriament en absència d'abocaments directes d'aigües residuals.
- **Vegetació de ribera natural.** La presència del bosc de ribera afecta positivament la qualitat de l'habitat sota diversos punts de vista: i) absorció de nutrients i altres contaminants provinents de la lixiviació de conreus i zones antropitzades; ii) ombreig de la llera del riu amb mitigació dels efectes de la radiació solar, especialment a l'estiu, en presència de cabals reduïts i temperatures elevades; iii) presència de refugi per als peixos hoste, que per amagar-se dels depredadors com ara ocells aquàtics, llúdrigues, visons, etc. necessiten arrels d'arbres riberencs, branques d'arbres que s'estenen sobre la superfície de l'aigua, i troncs d'arbres caiguts.
- **Accessibilitat en cotxe.** Aquest requisit, òbviament, no afecta directament l'èxit de la reintroducció, però sí la possibilitat de transportar bidons plens de juvenils i peixos infestats fins al punt seleccionat, i també la possibilitat d'avaluar en el futur l'èxit del treball, a través seguiment dels nous nuclis poblacionals. De conseqüència, tots els punts escollits es troben a prop de carreteres o camins.

Característiques dels punts seleccionats:

- **Rec de la Figuera d'en Xo (Act3_01).** Punt localitzat al poble de Banyoles, a breu distància de la sortida de les aigües de l'Estany. Tot i trobar-se a una zona urbanitzada (com tots els recs de Banyoles, que per aquest motiu no s'han cartografiat), hi viuen uns pocs individus aïllats d'*Unio mancus*, per tant s'ha pensat de reforçar aquesta petita població natural. Presenta una qualitat elevada de les aigües, amb presència de macròfits, vegetació riberenca i peixos hoste (bagra) que poblen aquest tram especialment en el període primaveral, que coincideix amb la reproducció tant dels peixos com de les nàiades. A diferència d'altres recs de Banyoles, el seu cabal no es veu afectat per obres i altres activitats urbanes.
- **Ronda Canaleta (Act3_02) i Naixement del Riu Terri (Act3_03).** Aquests dos punts són molt propers entre ells, sent localitzats respectivament aigües amunt i aigües avall de la confluència de la Riera Canaleta amb el Rec Major. És a

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

partir d'aquesta desembocadura que la Canaleta pren el nom de Riu Terri. La distància entre aquests punts i el tram amb més alta contaminació biològica de la Riera Canaleta (Punt Act2_05) és tal que la qualitat de l'aigua es pot considerar parcialment recuperada. El tram passa a través d'una zona de bosc de ribera dominat per pollancre, freixe i saüc, sobreviscut a la urbanització sorgida al voltant, i es veu poblat per unes poblacions abundants de barb i bagra.

- **Pont de Pujals (Act3_04)**. Punt localitzat en un tram amb aigua lenta, fons sorrenc i un bosc de ribera molt dens dominat per pollancre, saücar, canyar i plantacions de plàtans. Com tot el tram mitjà i baix del Terri, hi viu una comunitat íctica autòctona molt abundant. Correspon al punt Act2_06.
- **Molí de N'Avellana (Act3_05) i Resclosa de N'Avellana (Act3_06)**. Aquests punts es troben aigües amunt i aigües avall d'una resclosa. Pel que fa a les característiques ecològiques, se semblen al punt previ, malgrat la presència de la resclosa i un bosc de ribera més obert.



Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

BIBLIOGRAFIA

Abravanel F, Sandres-Saune K, Lhomme S, Dubois M, Mansuy JM, Izopet J (2012) Genotype 3 diversity and quantification of hepatitis E virus RNA. *J Clin Microbiol* 50:897-902.

Aceves, A. K. *et al.* (2018) 'Description and characterization of the digestive gland microbiome in the freshwater mussel *Villosa nebulosa* (Bivalvia: Unionidae)', *Journal of Molluscan Studies*, 84(3), pp. 240–246. doi: 10.1093/mollus/eyy014.

Aslam, B. *et al.* (2018) 'Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis', *Infection and Drug Resistance*, 11, pp. 1645–1658. doi: 10.2147/IDR.S173867.

Balayan MS, Usmanov RK, Zamyatina DI, Karas FR (1990) Brief report: Experimental hepatitis E infection in domestic pigs. *J Med Virol* 32, 58–59.

Barreira DM, Ferreira MS, Fumian TM, Checon R, de Sadovsky AD, Leite JP, Miagostovich MP, Spano LC (2010) Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil. *J Clin Virol* 47, 60–64.

Burket, S. R. *et al.* (2019) '*Corbicula fluminea* rapidly accumulate pharmaceuticals from an effluent dependent urban stream', *Chemosphere*, 224, pp. 873–883. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.03.014.

Caballero-Gómez J, Jiménez-Ruiz S, Lopez-Lopez P, Vicente J, Risalde MA, Cano-Terriza D, Frias M, Barasona JA, Rivero A, García-Bocanegra I, Rivero-Juarez A (2019) Emergent subtype of hepatitis E virus genotype 3 in wild boar in Spain. *Transbound Emerg Dis* 66:1803-1808.

Dubey JP & Beattie, 1988. *Toxoplasmosis of animals and Man*. CRC Press, Boca Raton, FL., 220 p.

European Centre for Disease Prevention and Control – ECDC (2017). *Hepatitis E in the EU/EEA, 2005–2015*; ECDC: Stockholm, Sweden, 2017.

Hill y Dubey, 2002. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infec.* 8, 634-640.

Kenney SP (2019) The current host range of hepatitis E viruses. *Viruses* 11, 452.

Khuroo MS, Khuroo MS, Khuroo NS (2016) Hepatitis E: Discovery, global impact, control and cure. *World J Gastroenterol* 22, 7030–7045.

Lewis HC, Wichmann O, Duizer E (2010) Transmission routes and risk factors for autochthonous hepatitis E virus infection in Europe: A systematic review. *Epidemiol Infect* 138, 145–166.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccioses d'importància per a la salut pública.

Lima, P., Lima, M.L., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S., Owen, C., & Machado, J. (2012). A review on the "in vitro" culture of freshwater mussels (Unionoida). *Hydrobiologia*, 691: 21-33.

Mead y col 1999. Food related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5, 607-625.

Mezzanotte, V. *et al.* (2016) 'Removal of enteric viruses and *Escherichia coli* from municipal treated effluent by zebra mussels', *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 539, pp. 395-400. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.09.007.

Ortega-Benito, 2001. Cribado prenatal de la toxoplasmosis congenita. *Med Clin (Barc)* 116, 385-389.

Ostrovsky, I., Gophen, M. and Kalikhman, I. (1993) 'Distribution, growth, production, and ecological significance of the clam *Unio terminalis* in Lake Kinneret, Israel', *Hydrobiologia*, 271(1), pp. 49-63. doi: 10.1007/BF00005695.

Owen, C. T. (2009). Investigations for the conservation and propagation of freshwater mussels. University of Louisville.

Owen, C. T., Alexander Jr, J. E., & McGregor, M. (2010). Control of microbial contamination during in vitro culture of larval unionid mussels. *Invertebrate Reproduction & Development*, 54(4): 187-193.

Palos Ladeiro, M. *et al.* (2015) 'Assessment of *Toxoplasma gondii* levels in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) by real-time PCR: an organotropism study', *Environmental Science and Pollution Research*, 22(18), pp. 13693-13701. doi: 10.1007/s11356-015-4296-y.

Reyes GR, Purdy MA, Kim JP, Luk KC, Young LM, Fry KE, Bradley DW (1991) Hepatitis E virus (HEV): The novel agent responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Gastroenterol Jpn* 3, 142-147.

Ricciardi, A. and Rasmussen, J. B. (1999) 'Extinction rates of North American freshwater fauna', *Conservation Biology*, 13(5), pp. 1220-1222. doi: 10.1046/j.1523-1739.1999.98380.x.

Rivadulla E, Varela MF, Mesquita JR, Nascimento MSJ, Romalde JL (2019) Detection of Hepatitis E Virus in Shellfish Harvesting Areas from Galicia (Northwestern Spain). *Viruses*. doi: 10.3390/v11070618.

Shapiro K, Silver MW, Largier JL, et al (2012) Association of *Toxoplasma gondii* oocysts with fresh, estuarine, and marine macroaggregates. *Limnol Oceanogr* 57:449-456.

Shapiro K, Silver MW, Largier JL, et al (2012) Association of *Toxoplasma gondii* oocysts with fresh, estuarine, and marine macroaggregates. *Limnol Oceanogr* 57:449-456.



Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

Smith DB, Purdy MA, Simmonds P (2013) Genetic variability and the classification of hepatitis E virus. *J Virol* 87, 4161–4169.

Uthaiwan, K., Noparantnaraporn, N., & Machado, J. (2001). Culture of glochidia of the freshwater pearl mussel *Hyriopsis myersiana* (Lea, 1856) in artificial media. *Aquaculture*, 195: 61-69.

Walsh, T. R. (2018) 'A one-health approach to antimicrobial resistance', *Nature Microbiology*. Springer US, 3(8), pp. 854–855. doi: 10.1038/s41564-018-0208-5.

World Health Organization - WHO (2019). Hepatitis E. Available online: <https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/hepatitis-e>

World Health Organization (2016) *FAO/OIE/WHO Tripartite*. Available at: https://www.who.int/foodsafety/areas_work/antimicrobial-resistance/tripartite/en/.

Wyn-Jones AP, Sellwood J (2001) Enteric viruses in the aquatic environment. *J Appl Microbiol* 91, 945–962.



Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

ANNEX I

Es presenta en format digital les següents capes:

- Mapa de la vegetació de ribera del Riu Terri (Vegeta.mmzx)
- Límit de l'àmbit cartografiat (Lim_Ambit.mmzx)
- Xarxa hidrogràfica cartografiada (Hidrologia.mmzx)
- Elements d'interès (Element_int.mmzx)

ANNEX II

- Fitxes descriptives dels punts de mostreig (Actuació 2)
- Fitxes descriptives dels punts de repoblació (Actuació 3)
- Proposta d'article científic



Prova pilot per l'estudi de la viabilitat de la nàiada (*Unio mancus*) com a sentinella de malalties infeccions d'importància per a la salut pública.

**FITXES DESCRIPTIVES DELS PUNTS DE MOSTREIG
(ACTUACIÓ 2)**

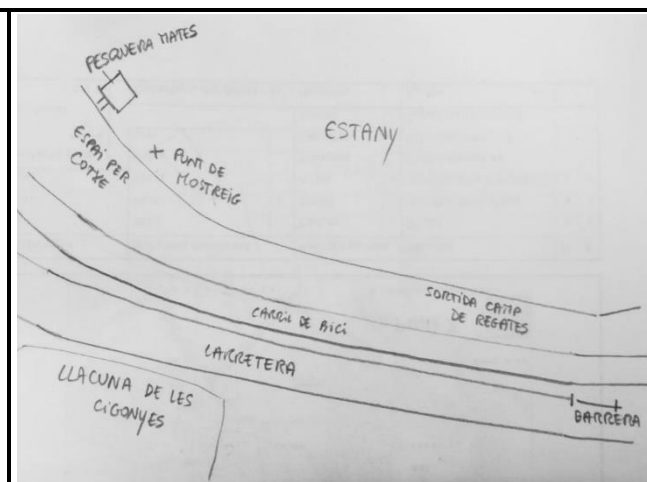
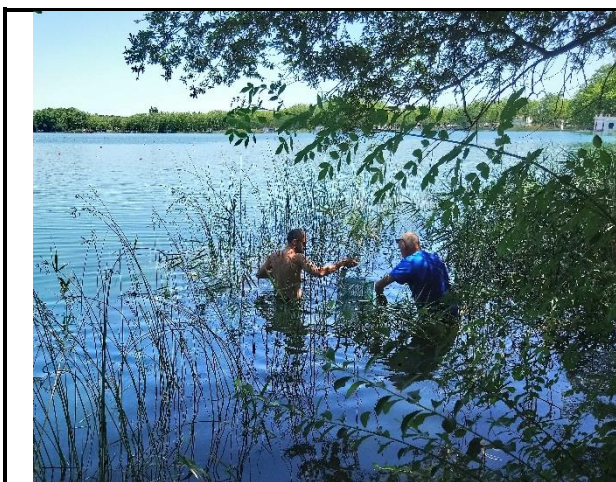
PROJECTE: "SENTINELLES"
 ACTUACIÓ 2 - ESTUDI EN EL MEDI NATURAL



Nom del punt: Pesquera Mates	Riu/massa d'aigua: Estany de Banyoles	Conca: Ter
Codi: Act2_01	UTMs: 479403.0, 4662770.0	

Tipus d'impacte que puguin afectar el punt:

Abocaments/Depuradores		Granges		Observacions: Punt d'aigua somera, freqüentat per ànecs i altres ocells.
Centres urbans	x	Rescloses/Preses		
Canalització		Sedimentació		
Tall de vegetació ribereña		Obres en curs		
Espècies invasores	x	Altres:		



Morfologia	Substrat dominant		Refugis peixos		Riba
NA	Roca		Roques	x	Arbres
	Pedra	x	Troncs		Matolls/Arbres joves
	Grava		Arrels		Veg. Hidròfila (canyes,...)
Fondària max:	Sorra		Branques		Plantes herbàcies
140 cm	Llim		Macròfits	x	Sòl pelat (roca, ...)
Amplada:	Cobertura del Substrat:		Absent		Canalitzat/Urbanitzat
NA	Macròfits	x	Algues		

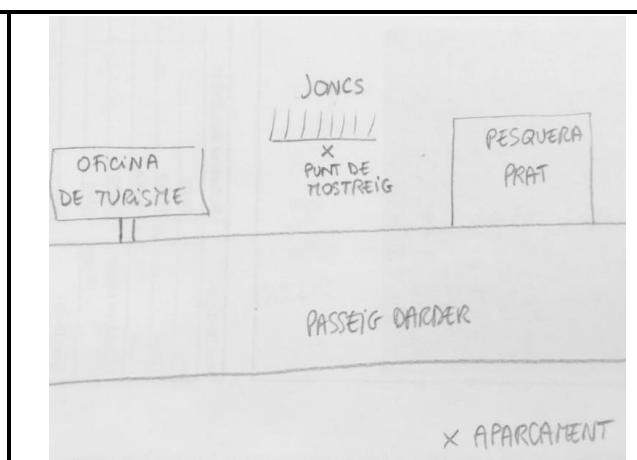
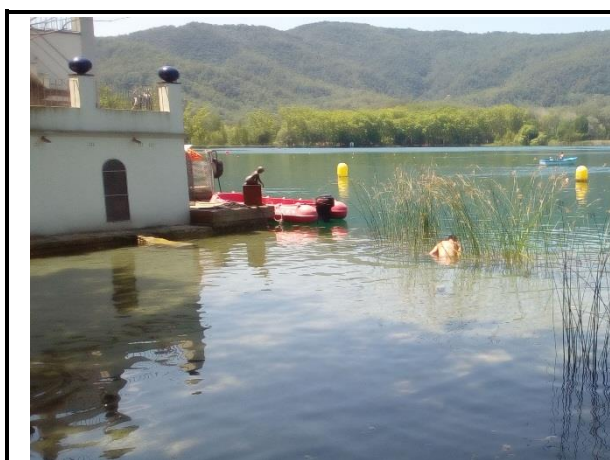
PROJECTE: "SENTINELLES"
ACTUACIÓ 2 - ESTUDI EN EL MEDI NATURAL



Nom del punt: Pesquera Prat	Riu/massa d'aigua: Estany de Banyoles	Conca: Ter
Codi: Act2_02	UTMs: 479875.1, 4662910.3	

Tipus d'impacte que puguin afectar el punt:

Abocaments/Depuradores		Granges	Observacions: Punt d'aigua somera, freqüentat per ànecs i altres ocells.
Centres urbans	x	Rescloses/Preses	
Canalització		Sedimentació	
Tall de vegetació riberenca		Obres en curs	
Espècies invasores	x	Altres:	



Morfologia	Substrat dominant	Refugis peixos	Riba
NA	Roca	Roques x	Arbres x
	Pedra x	Troncs	Matolls/Arbres joves
	Grava	Arrels	Veg. Hidròfila (canyes,...)
Fondària max:	Sorra	Branques	Plantes herbàcies
100 cm	Llim	Macròfits x	Sòl pelat (roca, ...)
Amplada:	Cobertura del Substrat:	Absent	Canalitzat/Urbanitzat x
NA	Macròfits x Algues		

PROJECTE: "SENTINELLES"

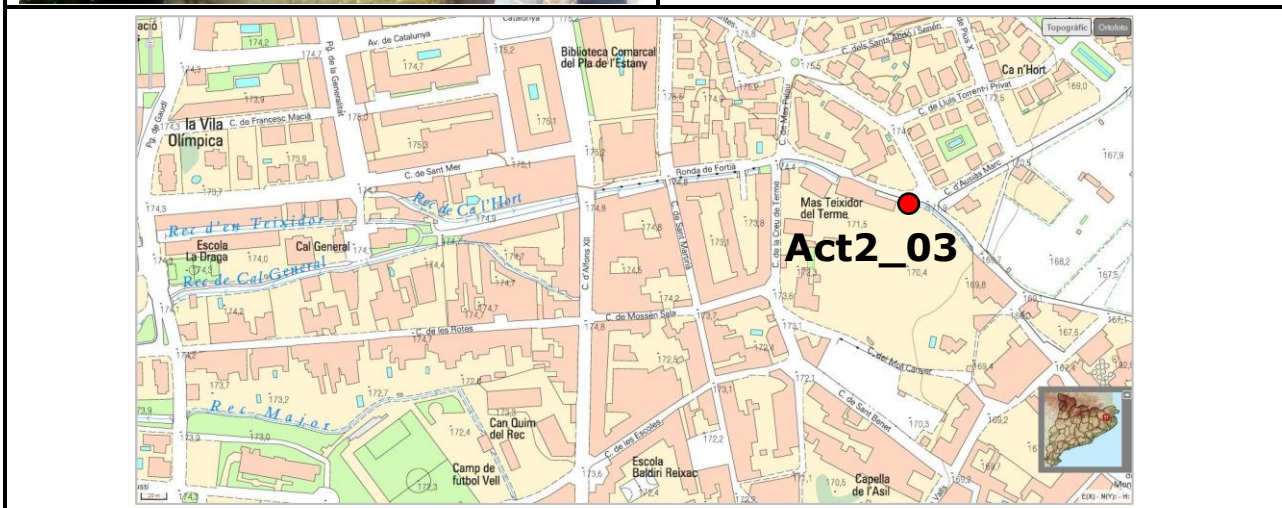
ACTUACIÓ 2 - ESTUDI EN EL MEDI NATURAL



Nom del punt: Antiga fabrica de paper	Riu/massa d'aigua: Rec d'en Teixidor	Conca: Ter
Codi: Act2_03	UTMs: 480734.9, 4662542.7	

Tipus d'impacte que puguin afectar el punt:

Abocaments/Depuradores		Granges		Observacions:
Centres urbans	x	Resclosos/Preses		Tram proper a la sortida de l'Estany de Banyoles. Aigües normalment de bona qualitat. Presencia de runes i escombraries a la llera. Població natural de nàiades molt abundant.
Canalització	x	Sedimentació		
Tall de vegetació riberenca		Obres en curs		
Espècies invasores	x	Altres:		



Morfologia	Substrat dominant		Refugis peixos		Riberes	D	E	
Pou		Roca	x	Roques	x	Arbres		
Taula	x	Pedra	x	Troncs		Matolls/Arbres joves		
Ràpid		Grava		Arrels		Veg. Hidròfila (canyes,...)		
Fondària max:		Sorra		Branques		Plantes herbàcies	x	
40 cm		Llim	x	Macròfits	x	Sòl pelat (roca, ...)		
Amplada:	Cobertura del Substrat:		Absent		Canalitzat/Urbanitzat		x	x
2 m	Macròfits	x	Algues					

PROJECTE: "SENTINELLES"

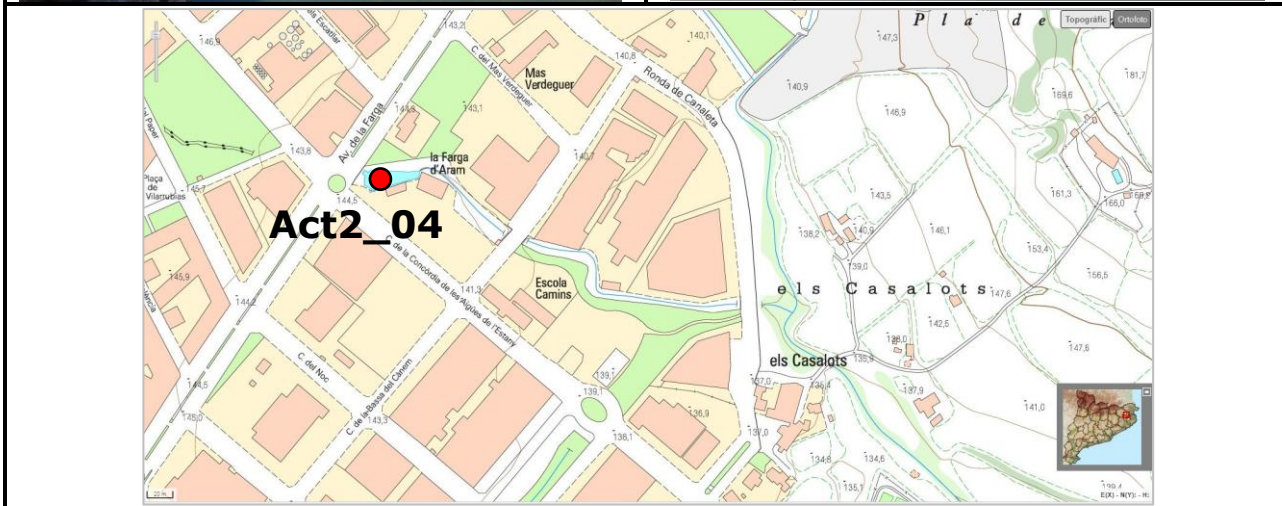
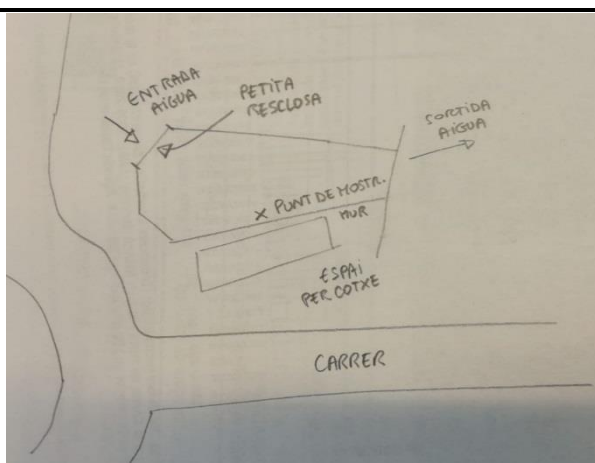
ACTUACIÓ 2 - ESTUDI EN EL MEDI NATURAL



Nom del punt: Bassa de la Farga	Riu/massa d'aigua: Rec Major	Conca: Ter
Codi: 04 Act2_04	UTMs: 481489.4, 4662542.7	

Tipus d'impacte que puguin afectar el punt:

Abocaments/Depuradores	x	Granges		Observacions: Bassa artificial situada al poble de Banyoles. Qualitat de l'aigua normalment bona, malgrat episodis d'abocament.
Centres urbans	x	Rescloses/Preses	x	
Canalització	x	Sedimentació		
Tall de vegetació riberenca		Obres en curs		
Espècies invasores	x	Altres:		



Morfologia	Substrat dominant		Refugis peixos	Riberes	D	E
Pou	x	Roca	Roques	Arbres		
Taula		Pedra	Troncs	Matolls/Arbres joves		
Ràpid		Grava	Arrels	Veg. Hidròfila (canyes,...)		
Fondària max:		Sorra	Branques	Plantes herbàcies		
120 cm		Llim	Macròfits	Sòl pelat (roca, ...)		
Amplada:	Cobertura del Substrat:		Absent	Canalitzat/Urbanitzat	x	x
10 m	Macròfits	Algues	x			

PROJECTE: "SENTINELLES"

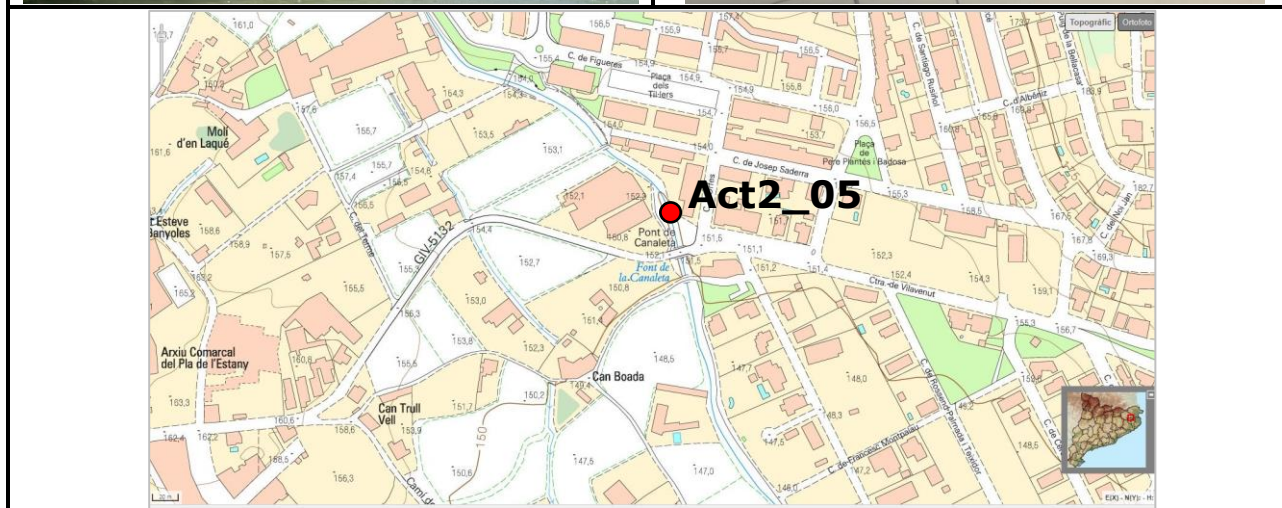
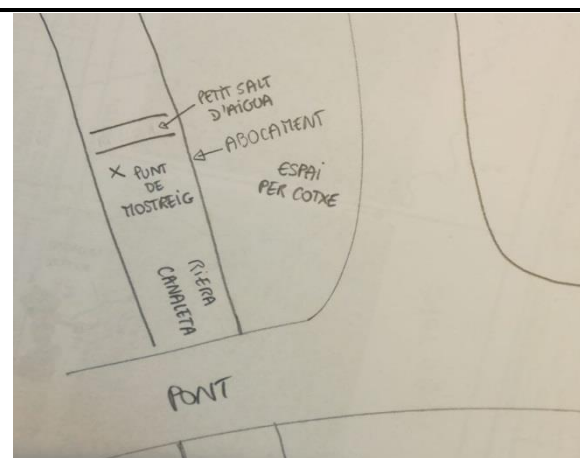
ACTUACIÓ 2 - ESTUDI EN EL MEDI NATURAL



Nom del punt: Pont de Canaleta	Riu/massa d'aigua: Riera Canaleta	Conca: Ter
Codi: Act2_05	UTMs: 481413.2, 4663203.9	

Tipus d'impacte que puguin afectar el punt:

Abocaments/Depuradores	x	Granges		Observacions: Tram situat al poble de Banyoles, en proximitat d'una fàbrica d'embotits. El punt de mostreig rep directament un abocament urbà.
Centres urbans	x	Rescloses/Preses	x	
Canalització	x	Sedimentació		
Tall de vegetació riberenca		Obres en curs		
Espècies invasores	x	Altres:		



Morfologia	Substrat dominant		Refugis peixos		Riberes		D	E
Pou	x	Roca	Roques	x	Arbres			
Taula		Pedra	Troncs		Matolls/Arbres joves			x
Ràpid		Grava	Arrels	x	Veg. Hidròfila (canyes,...)	x		
Fondària max:		Sorra	Branques	x	Plantes herbàcies			
130 cm		Llim	Macròfits		Sòl pelat (roca, ...)			
Amplada:	Cobertura del Substrat:		Absent		Canalitzat/Urbanitzat		x	x
4 m	Macròfits	Algues	x					

PROJECTE: "SENTINELLES"

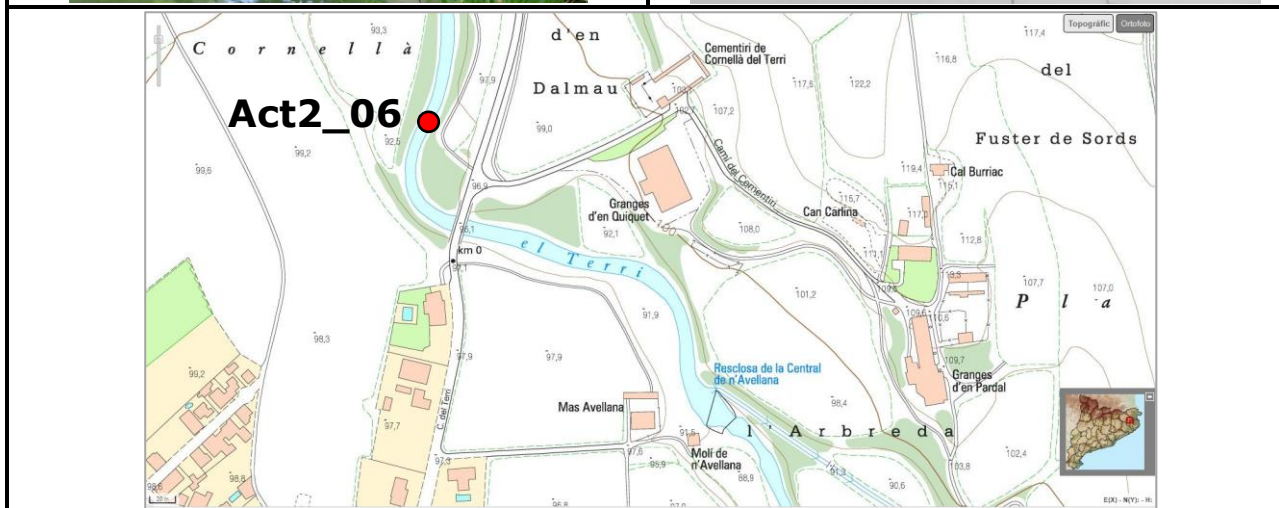
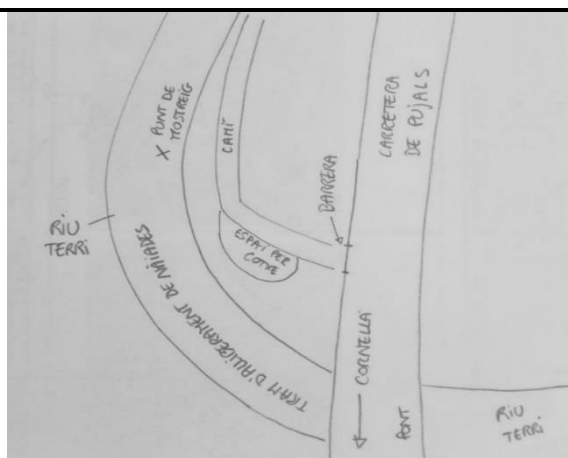
ACTUACIÓ 2 - ESTUDI EN EL MEDI NATURAL



Nom del punt: Pont de Pujals	Riu/massa d'aigua: Terri	Conca: Ter
Codi: Act2_06	UTMs: 484890.2, 4660237.4	

Tipus d'impacte que puguin afectar el punt:

Abocaments/Depuradores		Granges	x	Observacions: Tram amb bosc de ribera, aigua calmada i fons sorrenc, potencialment afectat per emissaris de granges. S'ha repoblat amb <i>Unio mancus</i> .
Centres urbans		Rescloses/Preses	x	
Canalització		Sedimentació		
Tall de vegetació riberenca		Obres en curs		
Espècies invasores	x	Altres:		



Morfologia	Substrat dominant	Refugis peixos	Riberes	D	E
Pou	x Roca	Roques	Arbres	x	x
Taula	Pedra	Troncs	Matolls/Arbres joves	x	x
Ràpid	Grava	Arrels	x Veg. Hidròfila (canyes,...)	x	x
Fondària max:	Sorra	x Branques	x Plantes herbàcies		
120 cm	Llim	x Macròfits	Sòl pelat (roca, ...)		
Amplada:	Cobertura del Substrat:		Absent	Canalitzat/Urbanitzat	
5.5 m	Macròfits	Algues			

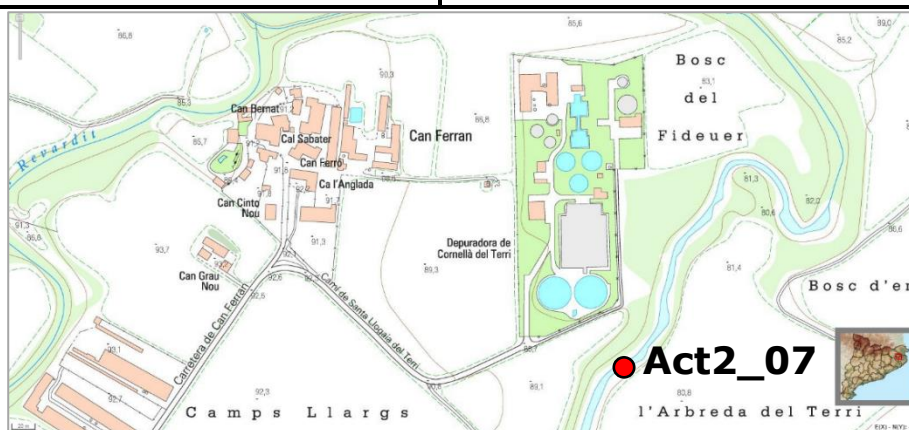
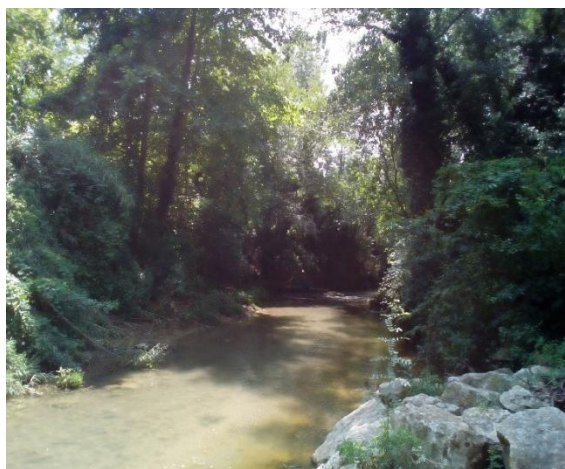
PROJECTE: "SENTINELLES"
 ACTUACIÓ 2 - ESTUDI EN EL MEDI NATURAL



Nom del punt: Depuradora de Cornellà	Riu/massa d'aigua: Terri	Conca: Ter
Codi: Act2_07	UTMs: 486158.4, 4659305.2	

Tipus d'impacte que puguin afectar el punt:

Abocaments/Depuradores	x	Granges	x	Observacions: Tram força contaminat per l'EDAR, amb episodis de sortida d'escuma molt abundant. Presència abundant de barb i bagra. Punt NO apte a la reintroducció de nàiades.
Centres urbans		Rescloses/Preses		
Canalització		Sedimentació		
Tall de vegetació riberenca		Obres en curs		
Espècies invasores	x	Altres:		



Morfologia	Substrat dominant		Refugis peixos		Riberes	D	E
Pou		Roca		Roques	Arbres	x	x
Taula	x	Pedra	x	Troncs	Matolls/Arbres joves	x	x
Ràpid	x	Grava		Arrels	Veg. Hidròfila (canyes,...)	x	x
Fondària max:		Sorra		Branques	Plantes herbàcies		
65 cm		Llim		Macròfits	Sòl pelat (roca, ...)		
Amplada:	Cobertura del Substrat:			Absent	Canalitzat/Urbanitzat		
4,5 m	Macròfits	Algues	x				

**FITXES DESCRIPTIVES DELS PUNTS DE REPOBLACIÓ
(ACTUACIÓ 3)**

PROJECTE: "SENTINELLES"

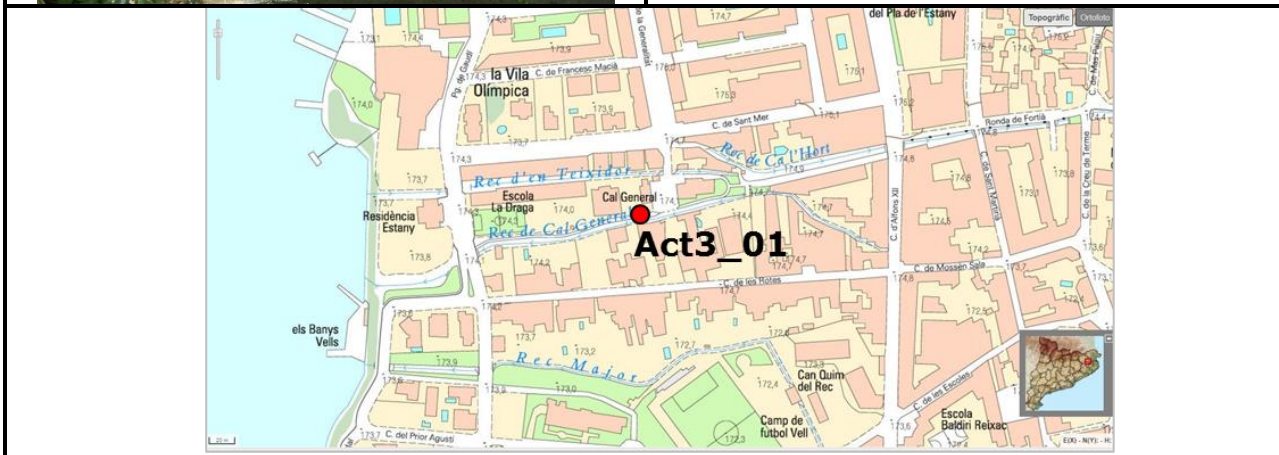
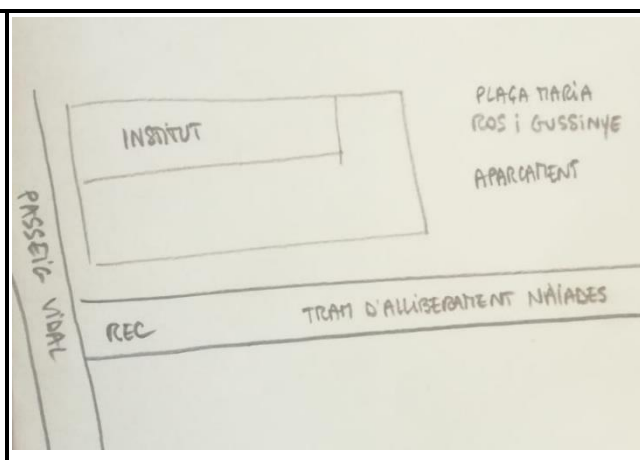
ACTUACIÓ 3 – PRODUCCIÓ I REPOBLACIÓ DE NÀIADES
AL MEDI NATURAL



Nom del punt: Rec Figuera d'en Xo	Riu/massa d'aigua: Recs de Banyoles	Conca: Ter
Codi: Act3_01	UTMs: 480268.0, 4663359.0	

Tipus d'impacte que puguin afectar el punt:

Abocaments/Depuradores	Granges	Observacions:
Centres urbans	x Resclores/Preses	Tram inicial d'un dels recs que actuen de desguàs de les aigües de l'Estany. Presència de vegetació aquàtica, d'uns pocs individus d' <i>Unio mancus</i> aïllats i de bagres que a la primavera baixen de l'Estany per fresar.
Canalització	x Sedimentació	
Tall de vegetació riberenca	Obres en curs	
Espècies invasores	x Altres:	



Morfologia	Substrat dominant	Refugis peixos	Riba
Pou	Roca	Roques	Arbres
Taula	x Pedra	Troncs	Matolls/Arbres joves
Ràpid	Grava	Arrels	Veg. Hidròfila (canyes,...)
Fondària max:	Sorra	Branques	Plantas herbàcies
40 cm	Llim	Macròfits	Sòl pelat (roca, ...)
Amplada:	Cobertura del Substrat:	Absent	Canalitzat/Urbanitzat
2 m	Macròfits x Algues		x

PROJECTE: "SENTINELLES"

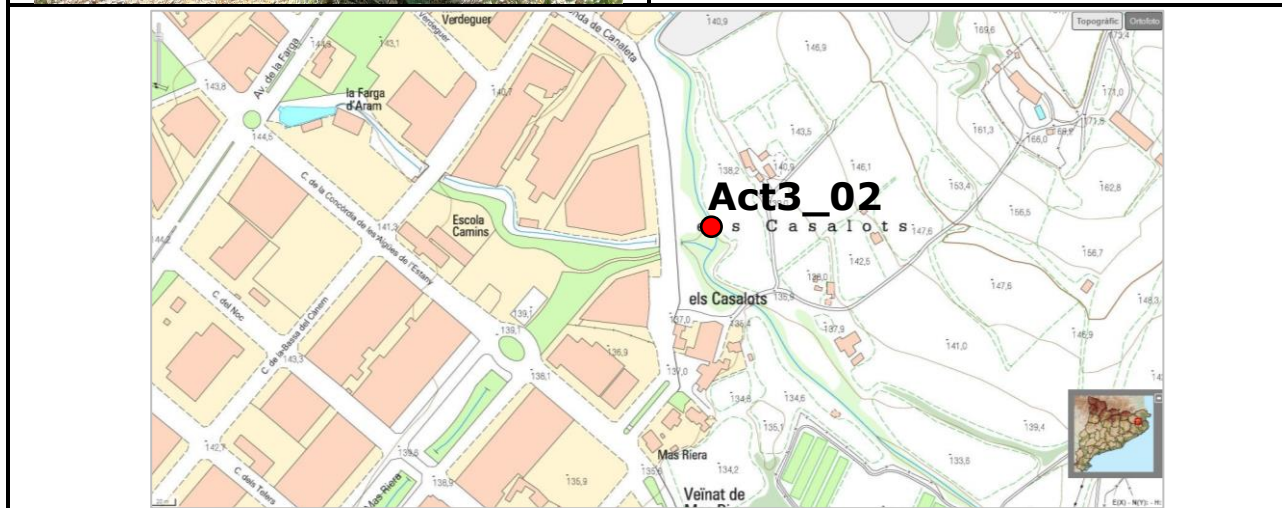
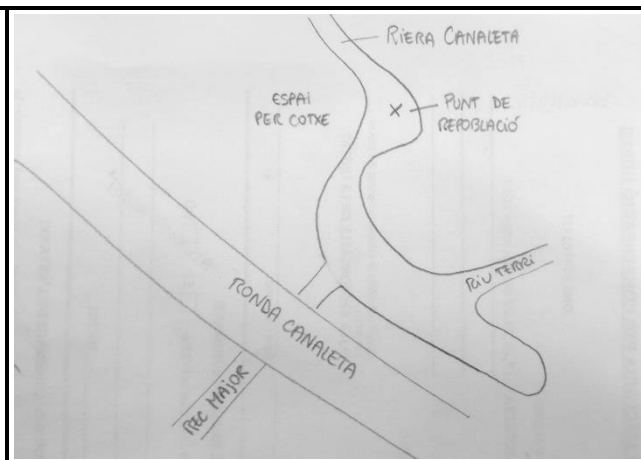
ACTUACIÓ 3 – PRODUCCIÓ I REPOBLACIÓ DE NÀIADES
AL MEDI NATURAL



Nom del punt: Ronda Canaleta	Riu/massa d'aigua: Riera Canaleta	Conca: Ter
Codi: Act3_02	UTMs: 480268.0, 4663359.0	

Tipus d'impacte que puguin afectar el punt:

Abocaments/Depuradores	Granges	Observacions:
Centres urbans	x Rescloses/Preses	Tram en què la qualitat de l'aigua es veu prou recuperada després de passar pel poble, malgrat la presència d'escombraries. Abundant presència de vegetació de ribera i peixos hoste per a les nàiaedes (barb i bagra).
Canalització	Sedimentació	
Tall de vegetació riberenca	Obres en curs	
Espècies invasores	x Altres:	



Morfologia	Substrat dominant	Refugis peixos	Riba
Pou	x Roca	Roques	x Arbres
Taula	Pedra	x Troncs	Matolls/Arbres joves
Ràpid	Grava	x Arrels	Veg. Hidròfila (canyes,...)
Fondària max:	Sorra	Branques	Plantes herbàcies
70 cm	Llim	Macròfits	Sòl pelat (roca, ...)
Amplada:	Cobertura del Substrat:	Absent	Canalitzat/Urbanitzat
3,5 m	Macròfits	Algues	x

PROJECTE: "SENTINELLES"

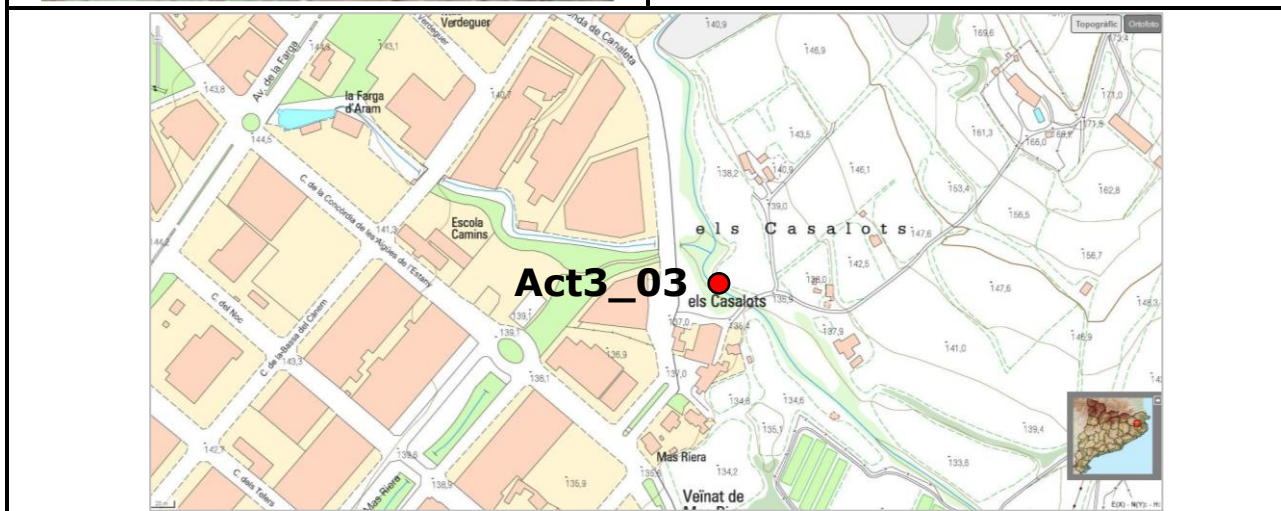
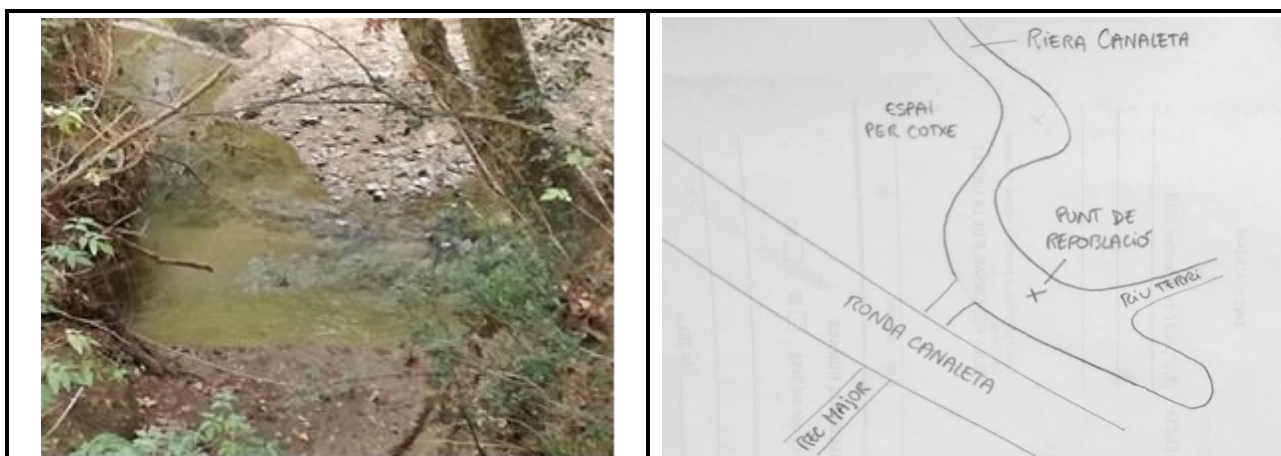
ACTUACIÓ 3 – PRODUCCIÓ I REPOBLACIÓ DE NÀIADES
AL MEDI NATURAL



Nom del punt: Naixement Riu Terri	Riu/massa d'aigua: Riu Terri	Conca: Ter
Codi: Act3_03	UTMs: 481817.4, 4662455.2	

Tipus d'impacte que puguin afectar el punt:

Abocaments/Depuradores	Granges	Observacions:
Centres urbans	x Rescloses/Preses	Tram en què la qualitat de l'aigua es veu prou recuperada després de passar pel poble, malgrat la presència d'escombraries. Abundant presència de vegetació de ribera i peixos hoste per a les nàiaes (barb i bagra).
Canalització	Sedimentació	
Tall de vegetació riberenca	Obres en curs	
Espècies invasores	x Altres:	



Morfologia	Substrat dominant	Refugis peixos	Riba
Pou	x Roca	x Roques	Arbres
Taula	Pedra	Troncs	Matolls/Arbres joves
Ràpid	Grava	Arrels	Veg. Hidròfila (canyes,...)
Fondària max:	Sorra	Branques	Plantes herbàcies
90 cm	Llim	Macròfits	Sòl pelat (roca, ...)
Amplada:	Cobertura del Substrat:	Absent	Canalitzat/Urbanitzat
2,75 m	Macròfits		
	Algues	x	

PROJECTE: "SENTINELLES"

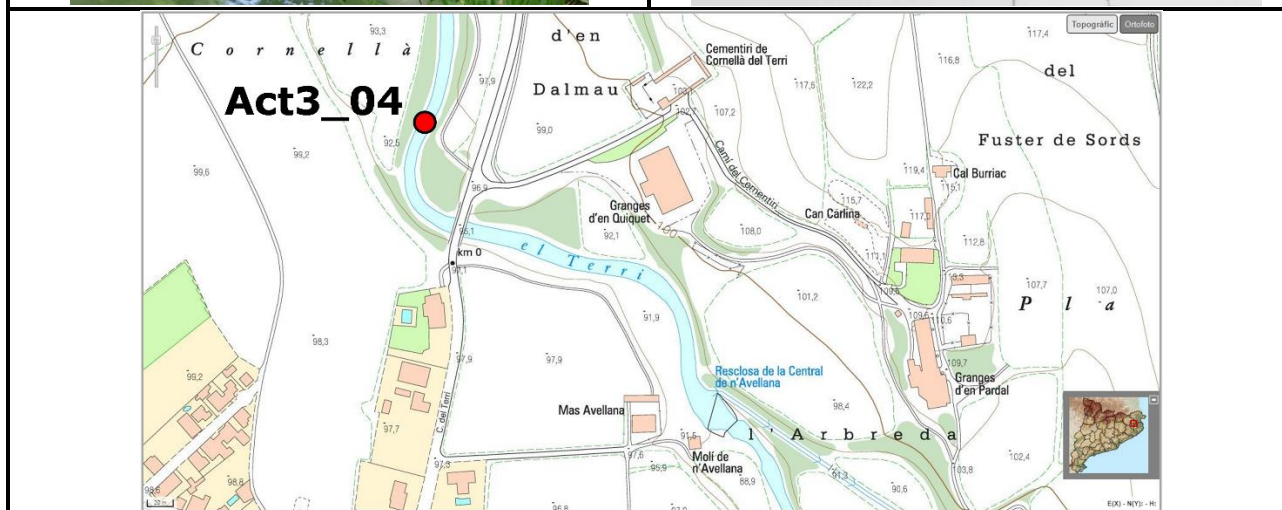
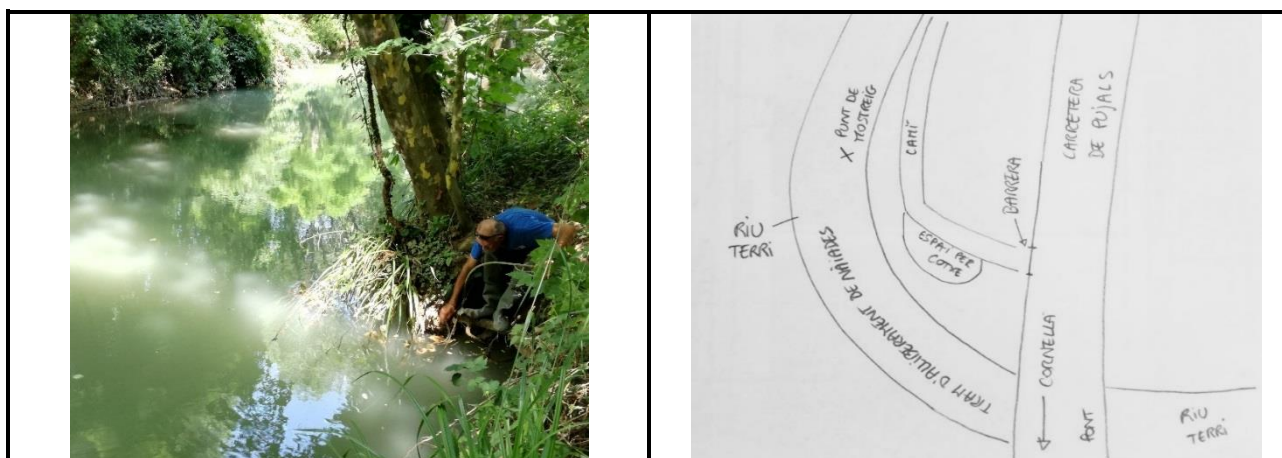
ACTUACIÓ 3 – PRODUCCIÓ I REPOBLACIÓ DE NÀIADES
AL MEDI NATURAL



Nom del punt: Pont de Pujals	Riu/massa d'aigua: Terri	Conca: Ter
Codi: Act3_04	UTMs: 484890.2, 4660237.4	

Tipus d'impacte que puguin afectar el punt:

Abocaments/Depuradores		Granges	x	Observacions: Tram amb bosc de ribera, aigua calmada i fons sorrenc, potencialment afectat per emissaris de granges. Correspon al punt Act2_06.
Centres urbans		Rescloses/Preses	x	
Canalització		Sedimentació		
Tall de vegetació riberenca		Obres en curs		
Espècies invasores	x	Altres:		



Morfologia	Substrat dominant	Refugis peixos	Riberes	D	E
Pou	x Roca	Roques	Arbres	x	x
Taula	Pedra	Troncs	Matolls/Arbres joves	x	x
Ràpid	Grava	Arrels	Veg. Hidròfila (canyes,...)	x	x
Fondària max:	Sorra	x Branques	x Plantes herbàcies		
120 cm	Llim	x Macròfits	Sòl pelat (roca, ...)		
Amplada:	Cobertura del Substrat:		Absent	Canalitzat/Urbanitzat	
5.5 m	Macròfits	Algues			

PROJECTE: "SENTINELLES"

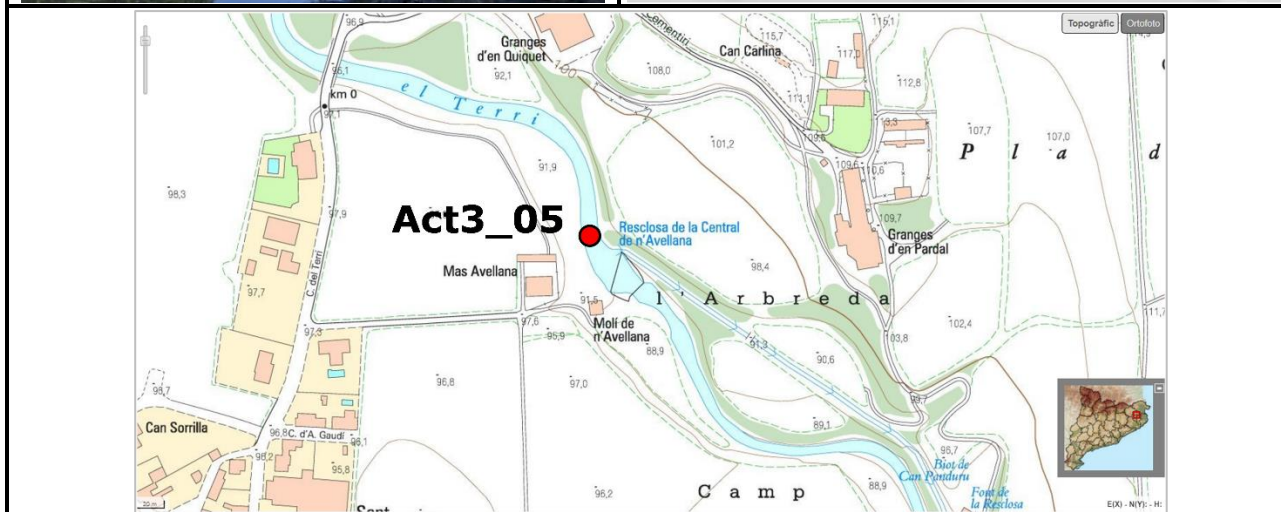
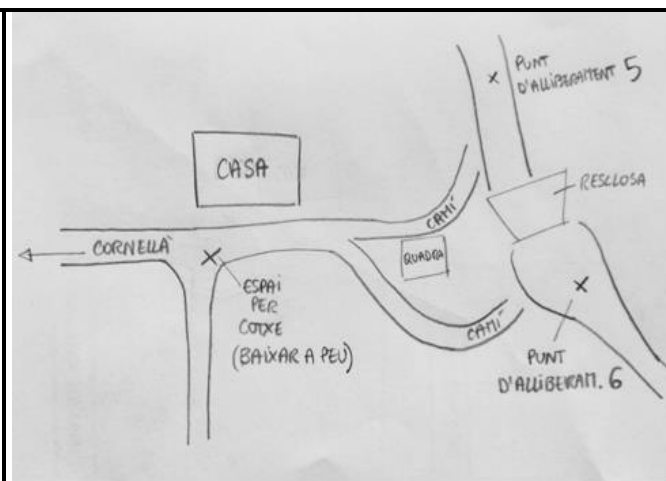
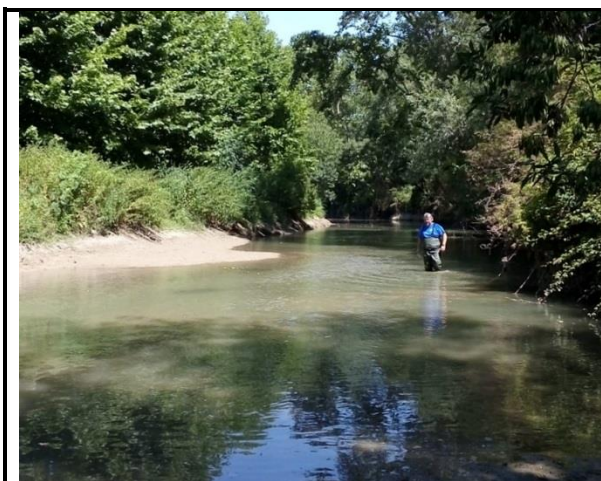
ACTUACIÓ 3 – PRODUCCIÓ I REPOBLACIÓ DE NÀIADES
AL MEDI NATURAL



Nom del punt: Molí de N'Avellana	Riu/massa d'aigua: Terri	Conca: Ter
Codi: Act3_05	UTMs: 485097.9, 4660042.0	

Tipus d'impacte que puguin afectar el punt:

Abocaments/Depuradores		Granges		Observacions: Punt localitzat aigües amunt de la resclosa de N'Avellana, amb bosc de ribera, fons sorrenc i abundància de barb i bagra.
Centres urbans		Rescloses/Preses	X	
Canalització		Sedimentació		
Tall de vegetació riberenca		Obres en curs		
Espècies invasores	X	Altres:		



Morfologia	Substrat dominant	Refugis peixos	Riba		
Pou	Roca	Roques	Arbres	X	X
Taula	Pedra	Troncs	Matolls/Arbres joves	X	X
Ràpid	Grava	Arrels	Veg. Hidròfila (canyes,...)		
Fondària max:	Sorra	Branques	Plantes herbàcies		
90 cm	Llim	Macròfits	Sòl pelat (roca, ...)		
Amplada:	Cobertura del Substrat:		Canalitzat/Urbanitzat		
5,5 m	Macròfits	Algues			

PROJECTE: "SENTINELLES"

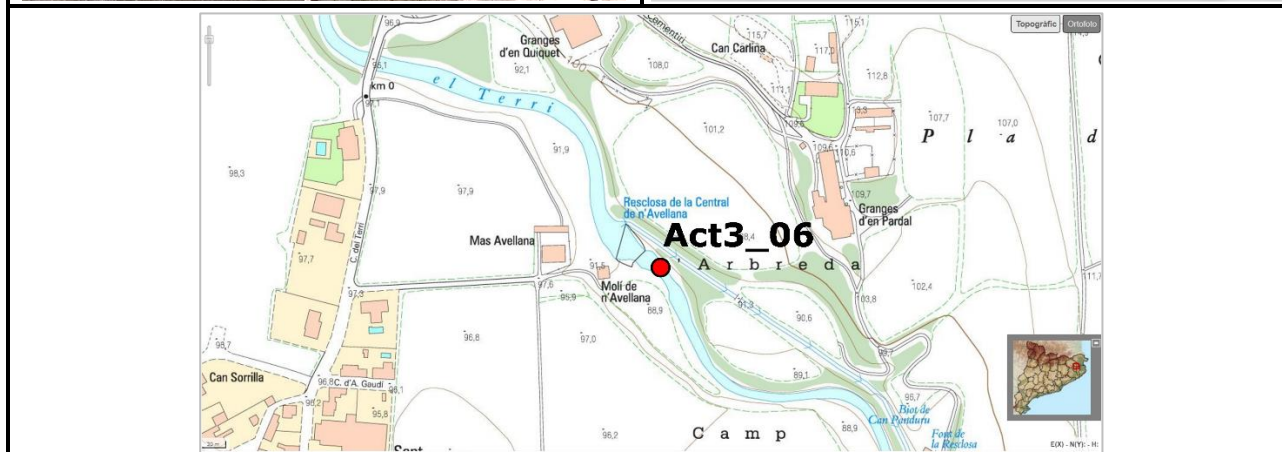
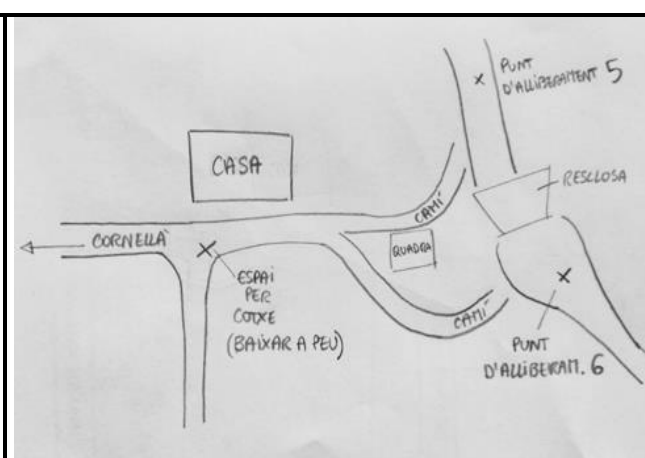
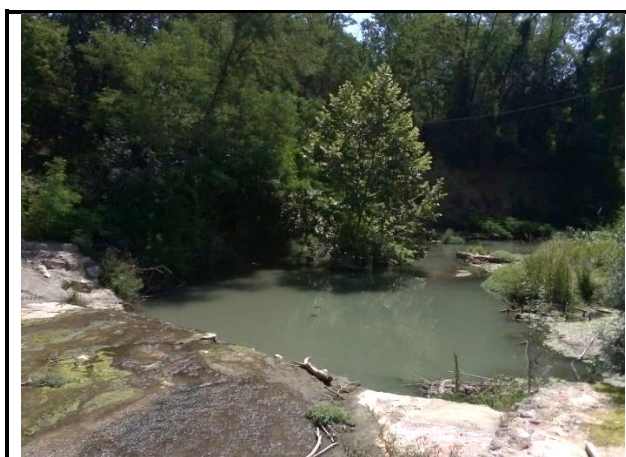
ACTUACIÓ 3 – PRODUCCIÓ I REPOBLACIÓ DE NÀIADES
AL MEDI NATURAL



Nom del punt: Resclosa de N'Avellana	Riu/massa d'aigua: Terri	Conca: Ter
Codi: Act3_06	UTMs: 485133.1, 4659993,7	

Tipus d'impacte que puguin afectar el punt:

Abocaments/Depuradores		Granges		Observacions: Punt localitzat aigües avall de la resclosa de N'Avellana, amb bosc de ribera, fons sorrenc i abundància de barb i bagra.
Centres urbans		Rescloses/Preses	x	
Canalització		Sedimentació		
Tall de vegetació riberenca		Obres en curs		
Espècies invasores	x	Altres:		



Morfologia	Substrat dominant	Refugis peixos	Riba					
Pou	x	Roca	x	Roques	x	Arbres	x	x
Taula		Pedra		Troncs	x	Matolls/Arbres joves	x	x
Ràpid		Grava		Arrels		Veg. Hidròfila (canyes,...)		
Fondària max:		Sorra	x	Branques		Plantes herbàcies		
200 cm		Llim	x	Macròfits		Sòl pelat (roca, ...)		
Amplada:		Cobertura del Substrat:		Absent		Canalitzat/Urbanitzat		
11 m		Macròfits						
		Algues						

The freshwater mussel *Unio mancus* as a sentinel for antibiotic-resistant Enterobacteriaceae present in inland waters

Lobato-Bailón L¹, Campos M², Merciai R², Cabezón O¹, Torres-Blas I¹, Araujo R⁴, Migura L^{3,*}

¹ Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain.

² Consorci de l'Estany, Plaça dels Estudis 2, 17820 Banyoles, Spain

³ IRTA, Centre de Recerca en Sanidad Animal (CReSA, IRTA-UAB), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain.

⁴MNCN, Museo Nacional de Ciencias Naturales – CSIC, C/José Gutiérrez Abascal 2, 28006, Madrid, Spain

* Corresponding author: Lourdes Migura. (Lourdes.migura@irta.cat) Phone. +34934674040 Fax. 93 581 44 90

Abstract

Freshwater mussels are known to provide ecosystem services in many ways. Their natural filter-feeding activity contributes to maintenance of water sources and also, they are considered good bio-indicators of water contamination. *Unio mancus* is a threatened naiad inhabiting inland freshwaters from the Mediterranean basin, whose population has been decreasing mainly due to degradation of the habitat by human activities. In the present study, *U. mancus* was tested as a tool for detecting Enterobacteriaceae from inland freshwater. For that purpose, two experiments were carried out. The first one evaluated the capability of these naiads to filter and retain inoculated cephalosporin-resistant *E. coli* in laboratory conditions. They proved to maintain bacterial loads in their soft tissue up to 4 days post-exposure. To determine the presence of antimicrobial-resistant Enterobacteriaceae under different levels of anthropogenic pressure, a field experiment was performed between July 2018 and June 2019 at seven sites along the Lake of Banyoles and its emissaries. Underwater caged naiads were exposed for six periods of 15 days each, at seven sampling sites. Among all isolated bacteria using *Vitek*^{®2} system, six MDR-*E. coli* and one MDR-*Klebsiella pneumoniae* were found in the most anthropized and polluted location points. Minimum inhibitory concentrations (MIC) for these bacteria were interpreted according to the Epidemiological cut-off (ECOFF) values from the European Committee in Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Our results suggest that *U. mancus* has potential to become sentinel of bacterial pathogens of Public Health concern.

1. INTRODUCTION

The connection among the health of animals, plants, people and shared environment is well recognized by One Health concept. Although the role of the environment is still scarcely acknowledged in Public Health (PH) research, it is well known that by integrating environmental factors in the One Health strategy, a better understanding of some PH concerns can be achieved. The study of the ecology of pathogens in the environment improves the identification of health risks before the potential exposure to the threat. In addition, it has long been recognized that wild animal populations can potentially act as sentinels for several zoonotic pathogens (Fox, 2001).

Antimicrobial resistance (AMR) is a natural selection mechanism in which a bacterial population becomes capable to multiply and/or survive under the presence of an antimicrobial agent in comparison with the wild type bacterial population of the same species. Intensive farming and human overcrowding have triggered serious environmental degradation and changes in water patterns. These factors, along with an inappropriate use of antimicrobials in human and veterinary medicine among others, have accelerated the emergence of resistant bacteria and nowadays it is considered a worldwide PH problem (Aslam *et al.*, 2018). In the last decades, the increasing numbers of multi-drug resistant Gram-negative bacteria causing infections in hospital settings has focused our concern on Enterobacteriaceae, which are part of human and animal gut microbiota (Walsh, 2018). Combating the emergence AMR is addressed by international institutions such as the *World Health Organization* (WHO), *Food and Agriculture Organization* of the United Nations (FAO) and the *World Organisation for Animal Health* (OIE) under a One Health approach (World Health Organization, 2016).

As a result, WHO has focused on developing a global action plan for tackling AMR, to which many Member States (MS) have joined. Furthermore, at the European Union (EU) and National level, coordinated actions are being implemented with a cross-sectional approach: PH, animal health and environmental health. The *European Food Safety Agency* (EFSA) works in conjunction with other EU organisms such as the *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) and the *European Medicines Agency* (EMA), gathering and analysing data from the MS regarding AMR and zoonoses. National control programmes of bacteria causing foodborne zoonoses are already implemented at national level, like for *Salmonella* in poultry production, which are being used to monitor AMR. The Decision 652/2013 also establish the screening and notification of antibiotic resistances in zoonotic and commensal bacteria and other microorganisms such as *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*-indicator and extended-spectrum β -lactamases (ESBL)/AmpC β -lactamases producing *Escherichia coli* (*E. coli*) are also monitored (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2016). In Spain the “*Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN)*” is in charge of controlling the risk of selection and dissemination of AMR, and thus, diminishing their impact on PH and animal health by preserving the efficacy of the existing antibiotics. The PRAN issues a report called JIACRA-ES, which integrates the relationship between antibiotic consumption and resistance development. For example, the data presented in this report demonstrate a clear correlation between increasing numbers of cefotaxime-resistant *E. coli* over the years and the use of 3rd and 4th generation cephalosporins in human medicine.

Five antibiotic groups are categorized as critically important for Public Health: carbapenems, 4th generation cephalosporins, (fluoro)quinolones, macrolides and polimixines. Except for carbapenems, all of them are also registered in veterinary medicine. For example, 3th and 4th generation cephalosporins are used in pig and bovine production, but they are also used in hospitals for the treatment of human infections caused by Gram-negative bacteria such as *E.*

coli (PN Resistencia Antibióticos, 2016). *E. coli* often exhibits resistance to cephalosporins, fluoroquinolones and also may carry resistance genes for last-line macrolides such as azithromycin. To a great extent, the drug resistance increase in Enterobacteriaceae has been mainly due to an increase in ESBL, whose genes are generally located on plasmids, extrachromosomal DNA that can be transferred between different bacterial species (Hazen *et al.*, 2017). Since Enterobacteriaceae are part of the gut microbiota, the main spread of ESBL genes to the environment comes from animal and human residues (Overdeest *et al.*, 2011).

Water sources are prone to get contaminated by natural events such as floods and additional side effects from urbanization. Continuous and substantial releases of sewage, chemical compounds, heavy metals and other contaminants are widely reported in urban streams and other inland freshwaters (Burket *et al.*, 2019; Ricciardi and Rasmussen, 1999). In addition, all of these processes can trigger the occurrence of diseases from waterborne pathogens. Water samples are fairly easy and simple to analyse but due to natural climate events such as rainfalls, flow rates and temperature flow, temporal sampling do not necessarily reflect contamination in watercourses and neither allow for spatial distribution analysis of pathogens (Palos Ladeiro *et al.*, 2015). Freshwater is specially subjected to quality analyses and many methods have been developed to provide safe drinking water. First steps are mostly based on sedimentation and filtration treatments. However, limited consideration has been given to those natural mechanisms that already exist on aquatic ecosystems. These mechanisms provide free maintenance and decontamination of water sources, in addition to advocate for biodiversity and healthy ecosystems. An example of ecosystem services is the water filtration carried out by bivalve molluscs during the feeding process. These sedentary organisms reside in sediment and consume bacteria, phytoplankton, detritus and organic matter besides others, translocating nutrients along the water column and making resources available to other organisms helping to maintain the quality of the aquatic environment (Ismail *et al.*, 2015, 2016; Burge *et al.*, 2016; Aceves *et al.*, 2018; Burket *et al.*, 2019).

Unio mancus (Phylum Mollusca; Class Bivalvia) is a freshwater mussel, or naiad, inhabiting inland Mediterranean freshwaters from NE-Spain, France and Italy. It is classified as “near threatened” by the *International Union for Conservation of Nature (IUCN)* Red List and it is included under the category of vulnerable in the National Catalogue of Endangered Species of Spain. Its population has been decreasing mainly because of the degradation of the habitat by residential and commercial development (urban areas, industry or tourism besides others), pollution and invasive species. Clean water free from pollution is an indispensable requirement for naiads and its presence of this species has been reported in rivers, lakes and freshwater channels.

The life cycle of *U. mancus* is complex and requires several development phases to achieve the maturity stage. As other freshwater mussels, it has a parasitic larval stage, called *glochidium*, which needs a host fish to develop into a juvenile stage. The life cycle starts in spring when an adult male (over 2-3-year-old) releases spermatozoa into the water and the adult female captures them, proceeding to an internal fertilisation. After this, thousands of *glochidia* are released into the water. *Glochidia* need to find a fish and settle into its gills, where they will develop into a small cyst and feed on the host’s blood. Some of their specific host fishes known are *Squalius* spp., *Barbus haasi*, *B. meridionalis*, *Luciobarbus graellsii*, *Parachondrostoma miegii*, *Phoxinus phoxinus* and *Salaria fluviatilis* (Araujo, Gómez & Machordon, 2005; Lopes-Lima, 2014; Araujo *et al.*, 2015). After 7-20 days of development, *glochidia* evolves into a juvenile. Juveniles are then released back into water where they fall onto the sediment and start the benthic stage, reaching the sexual maturity at the age of 3-4 years (Araujo, Gómez & Machordon, 2005; LifeUNIO, 2019).

Survival rate of *U. mancus* is low throughout the pre-adult stages of the life cycle due to difficulties to find an appropriate host during larvae parasitic phase and the correct settlement of the juveniles. The chances of *U. mancus* survival therefore rely on a large, reproductively-active population, a healthy population of autochthonous fishes and the absence of diseases and pollution in the environment.

Most of the literature on freshwater mussels have focused on bioaccumulation of contaminants and pathogens. Several filter-feeders such as zebra mussel (*Dreissena polymorpha*), Alabama rainbow mussel (*Villosa nebulosa*) and the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) are the research focus by scientist around the world. Previous studies have investigated the bioaccumulation and elimination kinetics of microorganisms by molluscs and have determined their vectorial capacity regarding bacterial, viral and protozoa pathogens such as *E. coli* and *Clostridium perfringens* (Burkhardt and Calci, 2000), Avian Influenza virus (Huyvaert *et al.*, 2012), Norwalk-like virus (Le Guyader *et al.*, 2006) and *Toxoplasma gondii* (Palos Ladeiro *et al.*, 2014; Palos Ladeiro *et al.*, 2015), among others. *Dreissena polymorpha*, in particular, is considered as a bivalve with a strong potential in reducing *E. coli* counts in freshwater systems (Mezzanotte *et al.*, 2016). Moreover, bivalves also have the ability to filter and accumulate pharmaceuticals and other chemical compounds from aquatic ecosystems, representing good biological indicators in ecotoxicological studies. (Ismail *et al.*, 2015, 2016; Burge *et al.*, 2016; Burket *et al.*, 2019).

Although *U. mancus* play an important role in preserving and restoring water quality in impaired Mediterranean ecosystems, as other bivalve molluscs already studied, no studies have been carried out about the importance of this species and their potential role as a sentinel.

The aim of this study is two-fold: first, to evaluate the capacity of *U. mancus* to act as an appropriate sentinel for the monitoring of pathogens of Public Health concern as *E. coli* under a controlled environment in the laboratory. Second, to determine the presence of antimicrobial resistance in freshwater systems under different levels of anthropogenic pressure using *U. mancus* as sentinel. Moreover, this work is expected to give a boost to the conservation of this endangered species by recognizing its importance for the aquatic environment.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Experimental exposure

Twenty-six juvenile (approximately 3-year-old) *Unio mancus*, with a length of 20-30 mm, were collected from the breeding center of the *Consorti de l'Estany* ("The Lake's Consortium", Figure 3; see on *Annexes*) on April 11th 2019 and transported alive to *Universitat Autònoma de Barcelona* for the experimental exposure study. They previously underwent a process of two days of fasting ("depuration") in a water tank without sediment in order to ensure that naiads purged any possible level of *E. coli* and other microorganisms.

The experimental use of captive-breeding naiads from *Consorti de l'Estany* was authorized by the Catalan Government. The experiment was designed to ascertain if *U. mancus* was able to filter and retain *E. coli* loads and to assess the shedding time. Twenty-six naiads were used for this purpose.

Laboratory room temperature was set at 18°C with air conditioning to avoid temperature oscillation and to ensure that naiads underwent no thermal stress. Water pumped from the Lake of Banyoles was brought to the laboratory and placed in 25L plastic tanks (tupperware-like containers). To continually monitor the temperature in the water tank, a submersible

thermometer was used. Filtered and autoclaved silica sand about 0.5-1 mm was used as a sediment, which was placed in a semi-floating polyvinyl chloride (PVC) cylinder with a pinpoint grid at the bottom. A submersible water pump (*Syncra Nano Multifunction Pump, SICCE®*) was attached to the tank wall to achieve uniform mixing and constant recirculation of water.

For the inoculum, an *E. coli* with a known mechanism of resistance to cephalosporins was selected (*E. coli* CTX-M-14). Filtration capacity of juvenile naiads in one hour was estimated at 40mL (Ostrovsky, Gophen and Kalikhman, 1993). A concentration of $1.5 \cdot 10^5$ CFUs/mL was prepared as a safe inoculum, after performing a literature review about experimental infection with bivalve species (Gu and Mitchell, 2002). Knowing the final volume for the inoculation procedure (40mL) and starting with an *E. coli* concentration of $1.5 \cdot 10^8$ CFUs/mL (0.5 McFarland turbidity), the inoculum volume needed was calculated with the following formula: $[]_i \cdot V_i = []_f \cdot V_f$ where $[]_i$ was the initial concentration of *E. coli* used for preparing the solution; V_i was the unknown initial volume of the inoculum; $[]_f$ was the chosen *E. coli* concentration for the inoculation; and V_f was the final volume filtered by naiads in one hour. The calculated initial volume of the inoculum (V_i) was 40 μ L.

Once the final volume of *E. coli* was calculated, the 26 naiads were individually placed with the siphon in upright position in 50mL Falcon™ tubes with 40mL of bottled water. 40 μ L of *E. coli* inoculum were pipetted in 27 Falcon™ tubes with naiads and were left to rest in a quiet surface. The two remaining naiads were used as negative control samples and no inoculum was used.

Sample collection was organized in subsets of three naiads for each time point, selecting roughly one naiad of each small, medium and large size. Also, a 1L tank water sample was collected for every naiad's sampling for further analyses.

After one-hour exposure to the inoculum, naiads were rinsed with lake water from and were placed in the silica sand sediment of the water tank, except for the two control naiads and three inoculated naiads, which were directly brought to the laboratory for the first analyses. Along with these five first naiads, a microalgae feed sample (*Easy Reef, Blueclownfish* Company) and 1L of tank water were also taken for analyses. Eight hours post-inoculation, three more naiads were collected and brought to the laboratory for analysing. Sampling times were then defined every 24 hours for eight days, following a strict protocol of tank disinfection and maintenance.

After every sample collection, the dirty tank was emptied, washed up and correctly disinfected with a solution of sodium hypochlorite. Approximately one cup of commercial 2% sodium hypochlorite solution was used in a 25L water tank, obtaining a 0.05% sodium hypochlorite solution. Later on, the tank was carefully rinsed and let dry for the next use. Silica sand was rinsed and autoclaved as well. Two identical tanks were needed to move naiads from one to another during cleaning and disinfection procedures. Just before the tank swap, naiads were rinsed with clean lake water and placed in upright position on the clean sediment. Thereafter, the remaining naiads in the tank were fed with 3 ml of rehydrated microalgae.

Once in the laboratory, naiads were weighted, measured and recorded individually. Subsequently, they were dissected and processed as follows. The whole organism (soft tissue) was ground individually with 1mL phosphate-buffered saline solution (PBS) and homogenized using a vortex. From each of the resulting suspensions, 100 μ L were pipetted in the middle of two different media: McConkey and McConkey agar supplemented with ceftriaxone (2mg/L); and streaked with a spreader (*Digralski* handle). Streaked plates were brought to incubation at 37°C for 24 hours and naiad's suspensions were kept at -80°C.

One-liter water samples were filtered with a paper filter (*Durapore*® membrane filters 0.45µL) (Figure 8; see *Annexes*). Filters were later homogenized with 10mL PBS and vortexed. From this suspension, 100µL were pipetted on same agar media described above and streaked with a spreader (*Digralski* handle). Streaked plates were brought to incubation at 37°C for 24 hours and filter's suspensions were stored at -80°C.

2.2 Sentinel study

This field study was carried out in the province of Girona, Catalonia, on the Lake of Banyoles and its five emissaries, which flow into the Terri Stream. The Lake of Banyoles is located in the town of Banyoles and it is the largest natural lake in Catalonia, with a length of more than 2,000 meters, covering an area of approximately 112 ha.

The naiads used as sentinels came from the breeding center of the *Consorti de l'Estany*, supported by *LIFE Projecte Estany [LIFE08 NAT/E/000067]*, whose ultimate goal is to promote the conservation of native freshwater mussels and their host fishes and habitat by improving the knowledge of their reproductive biology and breeding stocks destined to reintroduction and restocking, having become thus a reference center at both national and European level.

From July 2018 to June 2019, six two-week exposure periods on the field were carried out, one every two months. For every period, 2 underwater cages, containing 3 naiads each, were placed at each of 7 sampling sites (in total, 42 naiads per period, captive-bred at the *Consorti de l'Estany*). Sites 1 and 2 (“Pesquera Mates” and “Pesquera Prat”) were located on the Lake of Banyoles, which shows an elevated biological water quality and should act as control sites; Site 3 (“Rec d'en Teixidor”) was located on one of the emissaries at short distance from the Lake; Site 4 (“Bassa de la Farga”) is a small impoundment along another emissary; Site 5 (“Pont de Canaleta”) is found on the urban course of the Terri Stream: it receives directly some urban wastewaters and is located next to a cold-cut factory; Site 6 (“Pont de Pujals”) is found about 5 km downstream of the town of Banyoles and is potentially affected by some livestock farms found on the stream course; Site 7 (“WWTP”) is found shortly downstream of Site 6 and receives the effluents of a wastewater treatment plant (WWTP).

After the exposure time, one naiad from each cage was collected (2 per sampling site), placed into 50mL Falcon™ tubes and transported in a portable fridge to the *Universitat Autònoma de Barcelona* for analyses. The naiads that were not sacrificed were used for repopulating the Terri Stream, under the supervision of the *Consorti de l'Estany*.

Once in the laboratory, naiads were dissected avoiding cross-contamination and immediately after, the whole organisms were individually ground with 1 mL phosphate-buffered saline solution (PBS) and vortexed to resuspend the pellet (Figure 11 and 12).

For the detection of Gram-negative and enteric bacteria, a tissue resuspension from each individual was used to perform three quadrant-streakings of Petri dishes containing respectively blood agar (Figure 13), McConkey and McConkey agar supplemented with ceftriaxone (2mg/mL). Plates were incubated at 37°C for 24 hours. Following incubation, isolated colonies were re-streaked on the same agar-medium and were incubated for 24 hours to obtain a pure culture. Finally, isolated colonies were ground individually with 1 mL of a solution containing 80% of brain-heart infusion (BHI) and 20% of glycerol. These suspensions were stored at -80°C for later identification.

For *Salmonella* detection, 100µl of each naiad's tissue suspension were mixed with 900µl of buffered peptone water (BPW) and were incubated for 24 hours at 42°C. After the incubation period, 100µl of this BPW suspension were inoculated in a semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium (RV) and incubated for 24 hours at 42°C. Results from the RV incubation was observed at 24 hours and if no color change occurred, 24 more hours of incubation was implemented. RV plates with no color change (staying malachite green) at 48 hours were classified as negative for *Salmonella* growing, whereas those plates turned white were classified as positive and a later re-streaking on XLT4-agar medium was performed. Black or black-centred colonies from the XLT4-agar were ground with 1 mL of a solution containing 80% BHI and 20% of glycerol, and stored at -80°C for a future typification.

All bacterial isolates were tested on VITEK®2 system with Gram-negative identification cards. Suspensions were prepared by emulsifying bacterial isolates, previously stored at -80°C and re-streaked in blood agar medium 24 hours before, in 0.45% sodium chloride solution and a 0.6 McFarland turbidity standard was adjusted for each one. Suspensions and Gram-negative identification cards were loaded into the VITEK®2 system according to the manufacturer's recommendations and results were automatically reported by its software in less than 24 hours.

To determine MICs of relevant isolates, inoculums with a turbidity of 0.5 McFarland in a 0.85% sodium chloride solution were prepared (Figure 14). For that purpose, it was necessary to previously re-streak these bacterial isolates in blood agar and incubate them for 24 hours. Once 0.5 McFarland solutions were prepared, 10 µl were inoculated in 10 mL of Mueller-Hinton Broth (MHB) respectively. For the control, the *E. coli* ATCC -25922 was also prepared using the same procedure. Afterward, using a multichannel pipette, 50 µl of each inoculated MHB solution was placed in Thermo Scientific™ Sensititre™ Gram-negative MIC plate (Figure 15) and brought to incubation at 37°C for 24 hours. Antimicrobials tested were: gentamicin (0.5-32µg/mL), ampicillin (1-64µg/mL), cefotaxime (0.25-4µg/mL), ceftazidime (0.5-8µg/mL), meropenem (0.03-16µg/mL), chloramphenicol (8-128µg/mL), azithromycin (2-64µg/mL), ciprofloxacin (0.015-8µg/mL), nalidixic acid (4-128µg/mL), sulfamethoxazole (8-1024µg/mL), trimethoprim (0.25-32 µg/mL), tetracycline (2-64 µg/mL), tigecycline (0.25-8µg/mL) and colistin (1-16µg/mL).

Plate reading was performed after the incubation period, using a mirror (Figure 16). Epidemiological cut-off (ECOFF) values were interpreted according to the European Committee in Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). In this study, the term “resistant” referred to presence of acquired and mutational mechanisms of resistance in bacteria, not from a clinical but from an epidemiological point of view. In that respect, “non-wildtype” term was replaced on the results by “resistant”.

3. RESULTS

3.1. Experimental exposure

An initial concentration of $1.5 \cdot 10^5$ CFUs/mL of ceftriaxone-resistant *E. coli* was inoculated on naiads. Negative control samples were two naiads which were not inoculated and a water sample from the tank and algae for feed were also analysed. All four negative control samples showed no bacterial growth.

Bacterial load on naiad's tissue was detected up to the 4th day of sampling (96 hours post-inoculation) and water samples from the tank were positive until the 3rd experimental day. Two consecutive negative samplings were obtained after the 4th day.

For every sampling time, no correlation was observed between soft body weight and CFU/mL detected on naiad's tissue. However, all naiads with the smaller soft body weight retained a maximum of $1.65 \cdot 10^2$ UFC/mL (in the first sampling time), whereas medium sized and large naiads achieved maximum *E. coli* counts about $2.46 \cdot 10^3$ and $2.32 \cdot 10^3$ UFC/mL respectively in the second sampling time.

The mean whole-body weight of the used naiads was about 2.3g; mean shell weight was about 1.2g and mean shell length was 26.5mm.

3.2. Sentinel exposure

The preliminary study revealed the capability of *U. mancus* to filter and retain inoculated *E. coli* in freshwater under a controlled environment in the laboratory. To verify this ability on the field, six exposure period from July 2018 to June 2019 were carried out at 7 sampling sites: 2 located on the Lake o

naiads from the breeding centre *Consorti de l'Estany* were tested along the *L'Estany de Banyoles* lake and its scrapping irrigations (*Canaleta* stream and *Terri* River) from July 2018 to April 2019. Collectively, eleven different *genera* of bacteria were identified with *VITEK*[®]2 *system*. All different microorganisms identified, listed in alphabetical order, were the next: *Aeromonas hydrophila/caviae* (low discrimination obtained by *VITEK*[®]2 *system*), *A. sobria*, *A. veronii* (Figure 18; see on *Annexes*), *Citrobacter braakii*, *C. freundii*, *E. coli* (Figure 18 and 19; see on *Annexes*), *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae* (Figure 19; see on *Annexes*), *Leclercia adecarboxylata*, *Pantoea* spp., *Pseudomonas mendocina*, *P. stutzeri*, *Raoultella planticola*, *Salmonella* spp., *Serratia plymuthica* and *Vibrio fluvialis*.

E. coli dominated all samples analysed, represented by 25.3% of the total sampled, followed by *Klebsiella* spp. with 23.9% (*K. oxytoca* 12.67% and *K. pneumoniae* 11.27%). Although specific procedures were executed to culture *Salmonella* spp., only one sample was found positive. Punctual isolation of *Serratia plymuthica*, *Pantoea* spp., *L. adecarboxylata* and *E. colacae* were found along all exposure periods. Two different *Pseudomona* genus were identified: *P. mendocina* (three positive samples during the same exposure time in two different locations) and *P. stutzeri* (punctual isolation). Two samples resulted positive for *V. fluvialis* during the same exposure time but at different sites (close to sites 5 and 7). *R. planticola* was isolated during the third and fourth exposure periods, between November and late January.

From late September 2018 to early February 2019 (three consecutive study-periods), bacterial growing and diversity was significantly greater than during any other time of the year (Table 2). Rainfall was identified as the determining factor of larger quantity and diversity of bacterial isolates. On November 15th, 2019 a strong precipitation of 37 mm was registered in Banyoles, where direct damage to river basins occurred, causing floods and strong water turbulences along the Lake's emissaries. During this period, 11 different bacterial isolates were identified.

To assess the effect of different levels of anthropogenic pressure (AP) on the diversity and abundance of bacterial isolates, results from all exposure periods were classified by sampling site. Ceftriaxone-resistant strains were also indicated to give a better understanding of the nature of isolates. Location points were classified according to the following: A. Low anthropogenic pressure (fairly natural environment with an insignificant contact with human activities); B.

Medium anthropogenic pressure (in close contact with human settlement and activity); C. High anthropogenic pressure (water collection of polluted irrigations from the city and/or proximity to an animal food industry). Results are reflected on Table 3.

Sites with the strongest anthropogenic pressure showed the highest number of bacterial isolates and the highest diversity of bacterial species. Furthermore, the presence of ceftriaxone-resistant strains was observed at all these three locations, whereas resistant strains were not identified on locations with lower anthropogenic pressure.

A total of 24 bacterial isolates, from 11 different species, were obtained from samples coming from the WWTP (Site 7). Seven out of twenty-four isolates (30%) exhibited resistance to ceftriaxone. From Site 5, eight different bacterial species were obtained during the whole study period, with a total of 13 isolates. Seven of these bacterial isolates (54% of the total sampling) resulted resistant to ceftriaxone. Additionally, 15% of the 13 total isolates from *Pujals Road* also exhibited resistance to ceftriaxone. Both samplings from the lake showed scarce amount and diversity of bacterial isolates, reflecting minimal water pollution.

From all identified bacteria obtained by *VITEK*[®]2 system, 54 were selected to study their respective MICs. A total of 14 different species were analysed (Table 4). However, conclusive results were obtained for six bacterial species (Tables 5-10; see on *Annexes*), since ECOFF values have not been described for the rest of the species of the present dataset.

Four resistant strains of *C. freundii* were found for ampicillin, whereas one was for cefotaxime and ceftazidime antimicrobials respectively (Table 6; see on *Annexes*). The only *E. cloacae* tested was pansusceptible (Table 6; see on *Annexes*). *E. coli* resistance was detected for azithromycin (n=6), followed by ciprofloxacin (n=5), cefotaxime (n=5), nalidix acid (n=5) and trimethoprim (n=5) (Table 7; see on *Annexes*). Six *K. oxytoca* strains from nine tested exhibited resistance to ampicillin and only one to ciprofloxacin (Table 7; see on *Annexes*). *K. pneumoniae* resistance was detected for ampicillin (n=6), cefotaxime (n=1), ceftazidime (n=1), ciprofloxacin (n=1) and tetracycline (n=1) (Table 9; see on *Annexes*). The *Salmonella* spp. showed phenotypic resistance to ampicillin (Table 10; see on *Annexes*).

From the 18 *E. coli* tested, 10 were resistant to at least one antimicrobial and 5 were multi-drug resistant (MDR): resistant to three or more antimicrobial. One *K. pneumoniae* was also MDR, exhibiting resistance to ampicillin, ceftazidime, cefotaxime, and ciprofloxacin.

Of the total isolates, the AMR to ampicillin was the highest (40%) amongst the tested antibiotics, followed by ciprofloxacin (12.3%) and cefotaxime (10.8%). All isolates were susceptible to azithromizin, tigecycline and colistin.

4. DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The present study assesses the capability of *Unio mancus* to act as a sentinel of pathogens of Public Health (PH) concern; in particular, antimicrobial-resistant Enterobacteriaceae. Overall, results revealed that naiads were able to filter and retain bacterial loads under experimental and natural conditions and thus, confirm that naiads can be used as indicators of anthropogenic AMR contamination in freshwater systems.

Isolated bacteria from the *L'Estany de Banyoles* and its emissaries were mainly *E. coli* and *Klebsiella* spp., although other genera were present in smaller number of samples: *C. braakii* and *C. freundii*, *P. mendocina* and *P. stutzeri*, *Raoultella planticola*, *Salmonella* spp., *Serratia plymuthica* and *Vibrio fluvialis*. These Enterobacteriaceae species are widely distributed in the

environment (soil and water) and can be found in the intestinal microbiota of animals and humans. They often appear as opportunistic pathogens causing nosocomial infections, such as skin secondary infections (surgical wounds), urinary and intestinal tract infections, septicemia and meningitis among others, but they are more representative of immune-compromised and elderly patients with underlying diseases (Atıcı *et al.*, 2018; Bisharat, 2012; Del Rosario Aragone *et al.*, 1992; Gani *et al.*, 2019; Manganello *et al.*, 2001; Mehmood *et al.*, 2018).

Vibrio fluvialis -reported in a wide range of coastal environments, seas, estuaries and brackish waters- is considered an emerging pathogen involved in diarrheal outbreaks mainly due to water and/or seafood consumption. Moreover, *V. fluvialis* appears to exhibit AMR phenotype more frequently than other *Vibrio* species. In the Mediterranean basin, *V. fluvialis* resistant to several antimicrobials have been found on fish farms (Ramamurthy *et al.*, 2014). Although *V. fluvialis* is currently considered an important emerging pathogen, Epidemiological cut-off (ECOFF) values for antimicrobial resistance are not available on EUCAST for this species. Efforts to study this pathogen should be made to rapidly identify resistance phenotypes and implement control strategies.

Six MDR-*E. coli* and one MDR-*K. pneumoniae* were identified by MIC determination. Particularly, *K. pneumoniae* is often the cause of assisted-ventilation intra-hospital infection and tends to display MDR (Cella *et al.*, 2017; Ostria-Hernandez *et al.*, 2018). On the other hand, *E. coli* is a waterborne pollutant generally associated with the waste and it is usually investigated as indicator of water quality. Also, *E. coli* often causes nosocomial infections (Oteo, J. and Lázaro, E., 2005). Additionally, from all isolated MDR-*E. coli* in this study, 80% were resistant to 3rd generation cephalosporins, quinolones and sulfonamides; and all of them resulted resistant to ampicillin. These results match research findings starting in the early 2000, with increasing numbers of resistance to fluoroquinolones and 3rd generation cephalosporins in *E. coli* -and *K. pneumoniae* (Eckert *et al.*, 2004)- along hospital settings and community-associated outbreaks (Oteo *et al.*, 2006).

In the present field study, all MDR bacteria were isolated from locations that can be considered with a higher anthropogenic influence, such as being near to meat industry or under the drainage of a water treatment plant. Animal food production has demonstrated to play an important role in the emergence of resistant bacteria, having a positive and direct association with the use of antimicrobials in farms (Chantziaras *et al.*, 2014; Österberg *et al.*, 2016). Resistant bacteria can be transmitted by several routes, including direct contact with animals, along the food-production chain and by contamination of water and soil surfaces with waste (Marshall and Levy, 2011).

Bivalve shellfish, especially those for human consumption, haven been long investigated for the bacterial and chemical accumulation and elimination processes. These processes differ slightly between bivalve species, but a common mechanism to capture suspended particles in water and digest and/or eliminate them have been proposed (Perkins *et al.*, 2016). Several researchers have claimed that factors such as body size -weight and length- (Reeders and Bij de Vaate, 1990), algae concentration in water (Riisgård, Egede and Barreiro Saavedra, 2011) and water temperature (Pestana *et al.*, 2009) may interfere with filtering rates and even filtering saturation. In comparison with these studies, in the present laboratory study no correlations were observed between allometric data and filtration rate, although a bigger sample size would be recommended to achieve a more reliable outcome.

In the experimental study, temperature was set in accordance with optimal temperature range for freshwater naiads. However, other intrinsic factors like individual filtration rates during the exposure to the inoculum may have introduced some variability in the results.

Furthermore, in the present laboratory study we observed *Aeromonas* spp. growing in control samples from all exposure periods and other genera were not identified by *VITEK*[®]2 system. All samples, including negative control samples, corresponded to naiads coming from the captive breeding program from the *Consorci de l'Estany*, carried out under controlled conditions and in which no health problems or mortality events are identified. *Aeromonas* spp. was also found in sentinel naiads from the field sampling. In that sense, previous studies have investigated indigenous microbiota of bivalves. For example, *Aeromonas* and *Pseudomonas* seemed to be opportunistic pathogens being present in the tissue of zebra mussels subjected to thermal stress (Gu and Mitchell, 2002). Our data suggests that *Aeromonas* spp. found in control and sentinel naiads could belong to indigenous bacteria.

The present study indicates that freshwater naiads (*Unio mancus*) may be a good model for the bio-monitoring of AMR-Enterobacteriaceae in freshwater systems and thus, be used as sentinels of anthropogenic pressure. Efforts on calculating filtration rates for this species and minimally required density of naiad's population for this purpose could provide a better assessment of the cost-benefit analyses and its suitability to control AMR environmental contamination.

ACKNOWLEDGMENTS

The present study was funded by Diputació de Girona.

REFERENCES

- A. Fox, G. (2001) 'Wildlife as sentinels for human health', *Environmental Health Perspectives*, 109(April), pp. 853–861.
- Aceves, A. K. *et al.* (2018) 'Description and characterization of the digestive gland microbiome in the freshwater mussel *Villosa nebulosa* (Bivalvia: Unionidae)', *Journal of Molluscan Studies*, 84(3), pp. 240–246. doi: 10.1093/mollus/eyy014.
- Aslam, B. *et al.* (2018) 'Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis', *Infection and Drug Resistance*, 11, pp. 1645–1658. doi: 10.2147/IDR.S173867.
- Atıcı, S. *et al.* (2018) 'A rare and emerging pathogen: *Raoultella planticola* identification based on 16S rRNA in an infant', *Journal of Infection and Public Health*, 11(1), pp. 130–132. doi: 10.1016/j.jiph.2017.03.006.
- Bisharat, N. (2012) '10-Years hospital experience in *Pseudomonas stutzeri* and literature review', *The Open Infectious Diseases Journal*, 6(1), pp. 21–24. doi: 10.2174/1874279301206010021.
- Burket, S. R. *et al.* (2019) '*Corbicula fluminea* rapidly accumulate pharmaceuticals from an effluent dependent urban stream', *Chemosphere*, 224, pp. 873–883. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.03.014.
- Burkhardt, W. and R. Calci, K. (2000) 'Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness', *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), pp. 1375–1378. doi: 10.1128/AEM.66.4.1375-1378.2000.
- Cella, E. *et al.* (2017) 'Multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* strains circulating in hospital setting: Whole-genome sequencing and Bayesian phylogenetic analysis for outbreak investigations', *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41598-017-03581-4.
- Chantziaras, I. *et al.* (2014) 'Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: A report on seven countries', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(3), pp. 827–834. doi: 10.1093/jac/dkt443.
- Del Rosario Aragone, M. *et al.* (1992) '*Pseudomonas mendocina*, an environmental bacterium isolated from a patient with human infective endocarditis', *Journal of Clinical Microbiology*, 30(6), pp. 1583–1584.
- Eckert, C. *et al.* (2004) 'Dissemination of CTX-M-Type beta-Lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Paris, France', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(4), pp. 1249–1255. doi: 10.1128/AAC.48.4.1249.
- Gani, M. *et al.* (2019) '*Pseudomonas mendocina* Bacteremia: A Case Study and Review of Literature', *The American journal of case reports*, 20, pp. 453–458. doi: 10.12659/AJCR.914360.
- Gu, J. D. and Mitchell, R. (2002) 'Indigenous microflora and opportunistic pathogens of the freshwater zebra mussel, *Dreissena polymorpha*', *Hydrobiologia*, 474, pp. 81–90. doi: 10.1023/A:1016517107473.
- Hazen, T. *et al.* (2017) 'Characterization of a large antibiotic resistance plasmid found in enteropathogenic *Escherichia coli* strain B171 and its relatedness to plasmids of diverse *E. coli*

and *Shigella* strains’, *American Society for Microbiology*, 61(9). doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.00995-17>.

Huyvaert, K. P. *et al.* (2012) ‘Freshwater Clams As Bioconcentrators of Avian Influenza Virus in Water’, *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(10), pp. 904–906. doi: 10.1089/vbz.2012.0993.

Le Guyader, F. S. *et al.* (2006) ‘Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues’, *Emerging Infectious Diseases*, 12(6), pp. 931–936. doi: 10.3201/eid1206.051519.

LifeUNIO (2019) ‘Reproduction cycle of the freshwater mussel’. Available at: <https://www.unio.lu/freshwater-mussel/biology/reproduction-cycle/>.

Lopes-Lima, M. & S. (2014) ‘Unio mancus. The IUCN Red List of Threatened Species’. Available at: <https://www.iucnredlist.org/species/22737/42466471>.

Manganello, S. *et al.* (2001) ‘Caracterización y distribución de especies de *Citrobacter* en un hospital universitario’, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 19(1), pp. 11–14. doi: 10.1016/S0213-005X(01)72541-4.

Marshall, B. M. and Levy, S. B. (2011) ‘Food animals and antimicrobials: Impacts on human health’, *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), pp. 718–733. doi: 10.1128/CMR.00002-11.

Mehmood, H. *et al.* (2018) ‘A Rare Case of *Raoultella planticola* Urinary Tract Infection in a Patient With Immunoglobulin A Nephropathy’, *Journal of Investigative Medicine High Impact Case Reports*, 6, pp. 10–12. doi: 10.1177/2324709618780422.

Mezzanotte, V. *et al.* (2016) ‘Removal of enteric viruses and *Escherichia coli* from municipal treated effluent by zebra mussels’, *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 539, pp. 395–400. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.09.007.

Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (2016) *Vigilancia de resistencias antimicrobianas*. Available at: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/zoonosis-resistencias-antimicrobianas/resistencias_antimicrobianas.aspx.

Österberg, J. *et al.* (2016) ‘Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from pigs in organic and conventional farming in four european countries’, *PLoS ONE*, 11(6), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0157049.

Ostria-Hernandez, M. L. *et al.* (2018) ‘Nosocomial, multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from Mexico City produce robust biofilms on abiotic surfaces but not on human lung cells’, *Microbial Drug Resistance*, 24(4), pp. 422–433. doi: 10.1089/mdr.2017.0073.

Ostrovsky, I., Gophen, M. and Kalikhman, I. (1993) ‘Distribution, growth, production, and ecological significance of the clam *Unio terminalis* in Lake Kinneret, Israel’, *Hydrobiologia*, 271(1), pp. 49–63. doi: 10.1007/BF00005695.

Oteo, J. and Lázaro, E. (2005) ‘Antimicrobial-resistant invasive *Escherichia coli*, Spain’, *Emerging Infectious Diseases CDC*, 11(4), pp. 1–8.

Oteo, J. *et al.* (2006) ‘Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions’, *Journal of Clinical Microbiology*, 44(7), pp. 2359–2366. doi:

10.1128/JCM.00447-06.

Overdeest, I. *et al.* (2011) 'Extended-spectrum β -lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, the Netherlands', *Emerging Infectious Diseases*, 17(7), pp. 1216–1222. doi: 10.3201/eid1707.110209.

Palos Ladeiro, M. *et al.* (2014) 'Bioaccumulation of human waterborne protozoa by zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): Interest for water biomonitoring', *Water Research*. Elsevier Ltd, 48(1), pp. 148–155. doi: 10.1016/j.watres.2013.09.017.

Palos Ladeiro, M. *et al.* (2015) 'Assessment of *Toxoplasma gondii* levels in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) by real-time PCR: an organotropism study', *Environmental Science and Pollution Research*, 22(18), pp. 13693–13701. doi: 10.1007/s11356-015-4296-y.

Perkins, F. O. *et al.* (2016) 'Uptake and Elimination of Bacteria in Shellfish*', *Journal of Food Protection*, 43(2), pp. 124–126. doi: 10.4315/0362-028x-43.2.124.

Pestana, D. *et al.* (2009) 'The effect of temperature and body size on filtration rates of *Limnoperna fortunei* (Bivalvia, Mytilidae) under laboratory conditions', *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(1), pp. 135–144. doi: 10.1590/S1516-89132009000100018.

PN Resistencia Antibioticos (2016) 'Informe JIACRA España 2016', pp. 1–165. Available at: http://www.resistenciaantibioticos.es/es/system/files/field/files/informe_jiacra-espana.pdf?file=1&type=node&id=410&force=0.

Ramamurthy, T. *et al.* (2014) '*Vibrio fluvialis*: An emerging human pathogen', *Frontiers in Microbiology*, 5(MAR), pp. 1–8. doi: 10.3389/fmicb.2014.00091.

Reeders, H. H. and Bij de Vaate, A. (1990) 'Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): a new perspective for water quality management', *Hydrobiologia*, 200–201(1), pp. 437–450. doi: 10.1007/BF02530361.

Ricciardi, A. and Rasmussen, J. B. (1999) 'Extinction rates of North American freshwater fauna', *Conservation Biology*, 13(5), pp. 1220–1222. doi: 10.1046/j.1523-1739.1999.98380.x.

Riisgård, H. U., Egede, P. P. and Barreiro Saavedra, I. (2011) 'Feeding behaviour of the mussel *Mytilus edulis*: new observations, with a minireview of current knowledge', *Journal of Marine Biology*, 2011, pp. 1–13. doi: 10.1155/2011/312459.

Walsh, T. R. (2018) 'A one-health approach to antimicrobial resistance', *Nature Microbiology*. Springer US, 3(8), pp. 854–855. doi: 10.1038/s41564-018-0208-5.

World Health Organization (2016) *FAO/OIE/WHO Tripartite*. Available at: https://www.who.int/foodsafety/areas_work/antimicrobial-resistance/tripartite/en/.

Ismail, N. S., Tommerdahl, J. P., Boehm, A. B. & Luthy, R. G. 2016. *Escherichia coli* Reduction by Bivalves in an Impaired River Impacted by Agricultural Land Use. *Environmental Science & Technology*, 50: 11025-11033.

Burge, C. A. *et al.* 2016. The Use of Filter-feeders to Manage Disease in a Changing World. *Integrative and Comparative Biology*, doi:10.1093/icb/icw048

Ismail, N. S. *et al.* 2015. Improvement of Urban Lake Water Quality by Removal of *Escherichia coli* through the Action of the Bivalve *Anodonta californiensis*. *Environmental Science and*

Technology, 49: 1664-1672.

Araujo, R., Feo, C., Pou, Q. & Campos, M. 2015. Conservation of two endangered European freshwater mussels. A three year semi-natural breeding experiment. *The Nautilus*, 129(3): 126-135.

Araujo, R., Gómez, I. & Machordom, A. 2005. The identity and biology of *Unio mancus* (= *U. elongatulus*) (Bivalvia: Unionidae) in the Iberian Peninsula. *Journal of Molluscan Studies* 71(1): 25-31.

Figure 1. Geographical distribution of *Unio mancus* in dark green color (*IUCN*).



Figure 2. Study area. Sites 1 and 2 are located on the lake; sites 3 to 5 are located on the emissaries, whereas sites 6 and 7 are found along the Terri Stream.

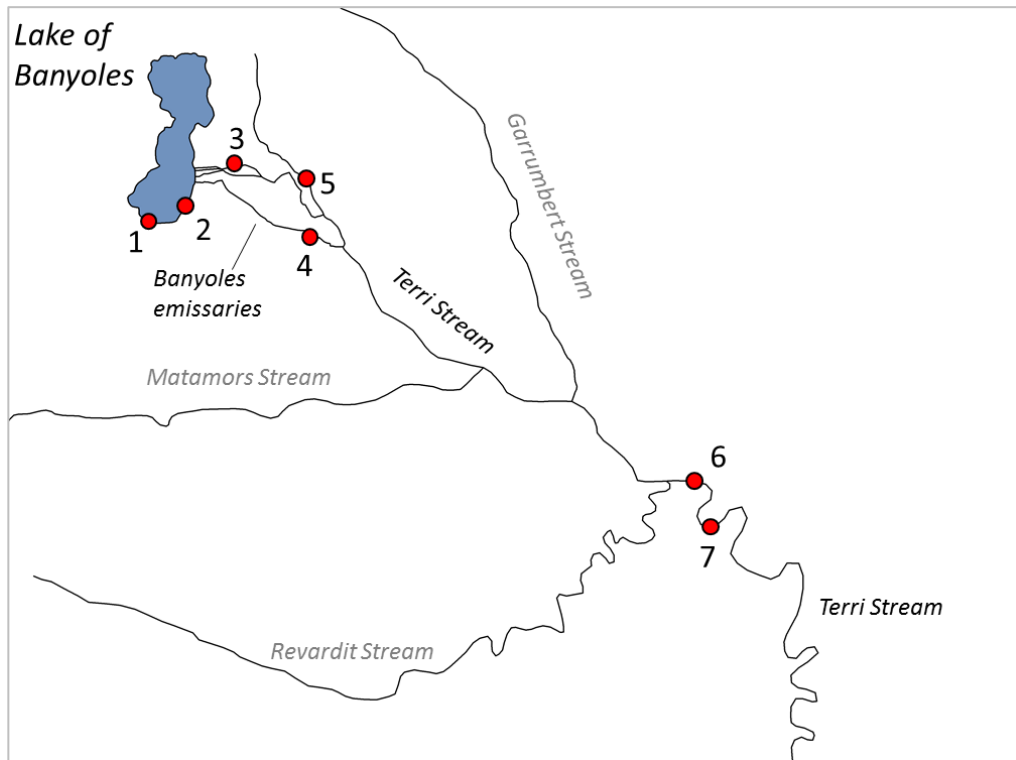


Figure 3. Evolution on *E. coli* counts (CFU/mL) in naiad tissues along time (sampling time points) and classified by body weight (BW1=small; BW2=medium; BW3=large).

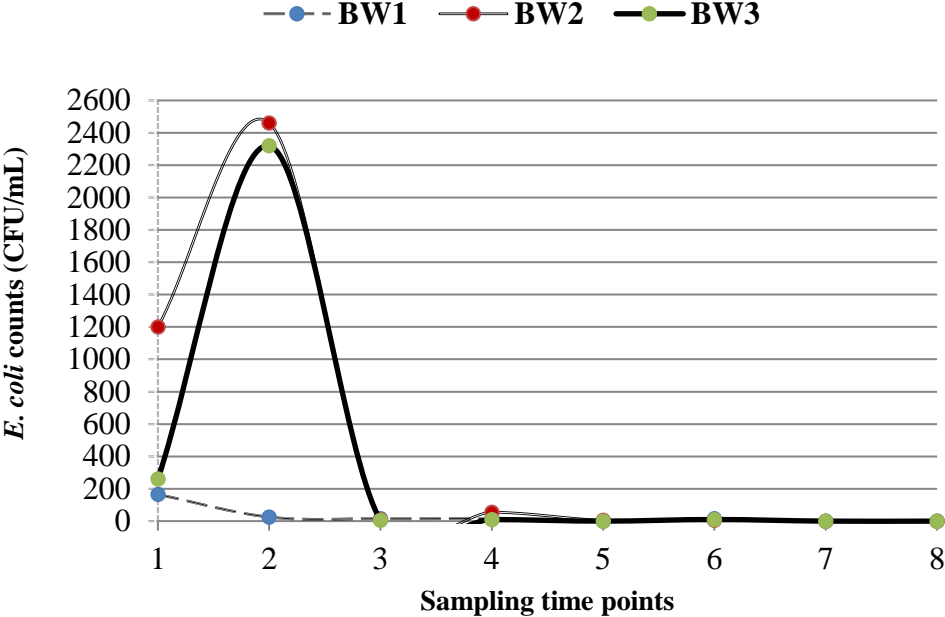


Table 1. Calculated ceftriaxone-resistant *E. coli* UFC/mL found along the experiment. Results are classified by sampling times, where T1=1h post-exposure; T2=8h post-exposure; T3=24h post-exposure (1 day); T4=48h post-exposure (2 days); T5=72h post-exposure (3 days); T6=96h post-exposure (4 days); T7=120h post-exposure (5 days); T8=144h post-exposure (6 days). ¹Naiad size visually classified as small before soft body weight calculated. ²Naiad size visually classified as medium before soft body weight calculated. ³Naiad size visually classified as large before soft body weight calculated. Overall, no significant correlations were observed between soft body size and CFU/mL calculated per sampling time.

		SAMPLING TIME							
		T1	T2	T3*	T4	T5	T6	T7	T8
BW¹ 1	Soft body weight (g)	0.2	0.1	0.3	0.3	0.2	0.2	0.4	0.3
	<i>E.coli</i> CFU/mL	1.65·10 ²	25	15	15	0	15	0	0
BW² 2	Soft body weight (g)	0.5	0.3	0.4	0.5	0.6	0.5	0.7	0.5
	<i>E.coli</i> CFU/mL	1.2·10 ³	2.46·10 ³	10	55	5	5	0	0
BW³ 3	Soft body weight (g)	0.9	0.9	0.7	1.1	0.9	0.8	0.7	0.7
	<i>E.coli</i> CFU/mL	2.6·10 ²	2.32·10 ³	5	10	0	10	0	0

Table 2. Distribution of identified bacteria (diversity and abundance) obtained by *VITEK*[®]2 *system* classified by exposure time. Precipitation details are also indicated.

¹Microorganisms obtained from different colony morphologies growing on the plate.

DATE		MICROORGANISMS ¹ (number)	TOTAL	RAINFALL
Exposition	Collection			
20.07.2018	06.08.2019	<i>A. veronii</i> (1) <i>E. coli</i> (4) <i>K. pneumoniae</i> (4) <i>K. oxytoca</i> (1)	10	5 days of rain (maximum 6.5 mm)
21.09.2018	08.10.2018	<i>A. hydrophila/caviae</i> (2) <i>A. sobria</i> (1) <i>C. freundii</i> (2) <i>E. coli</i> (6) <i>K. pneumoniae</i> (2) <i>Salmonella spp.</i> (1) <i>S. plymuthica</i> (1)	15	6 days of rain (maximum 11 mm)
09.11.2018	26.11.2018	<i>A. hydrophila/caviae</i> (2) <i>A. sobria</i> (1) <i>C. braakii</i> (1) <i>C. freundii</i> (2) <i>E. coli</i> (5) <i>K. oxytoca</i> (6) <i>K. pneumoniae</i> (1) <i>L. adecarboxylata</i> (1) <i>Pantoea spp.</i> (1) <i>P. mendocina</i> (3) <i>R. planticola</i> (1)	24	10 days of rain, concentrated by the middle of the exposure time. On Nov. 15 th , 37 mm of rainfall and floods were registered.
25.01.2019	11.02.2019	<i>A. hydrophila/caviae</i> (1) <i>A. sobria</i> (4) <i>C. braakii</i> (1)	14	8 days of rain (maximum 3 mm)

		<i>E. coli</i> (2) <i>P. stutzeri</i> (1) <i>R. planticola</i> (3) <i>V. fluvialis</i> (2)		
22.03.2019	08.04.2019	<i>C. braakii</i> (1) <i>C. freundii</i> (1) <i>E. cloacae</i> (1) <i>E. coli</i> (1) <i>K. oxytoca</i> (2) <i>K. pneumoniae</i> (1) <i>S. plymuthica</i> (1)	8	7 days of rain (maximum 11 mm)

Table 3. Distribution of identified microorganisms using *VITEK*[®]2 *system* by location point. ¹For the anthropogenic pressure classification, environmental and human factors have not been considered (see previous explanation).

IDENTIFIED MICROORGANISMS				
Location Point	Anthropogenic Pressure¹	Susceptible (number)	Resistant to ceftriaxone (number)	TOTAL (wildtype; resistant)
1	A	<i>A. veronii</i> (1) <i>R. planticola</i> (1)		2
2	B	<i>C. freundii</i> (1) <i>K. pneumoniae</i> (1) <i>S. plymuthica</i> (1)		3
3	B	<i>C. braakii</i> (1) <i>E. coli</i> (2) <i>K. oxytoca</i> (1) <i>K. pneumoniae</i> (1) <i>Pantoea</i> spp. (1)		6
4	B	<i>A. hydrophila/caviae</i> (1) <i>K. oxytoca</i> (3) <i>K. pneumoniae</i> (2) <i>L. adecarboxylata</i> (1) <i>R. planticola</i> (1)		8
5	C	<i>C. freundii</i> (1) <i>E. coli</i> (2) <i>K. oxytoca</i> (1) <i>K. pneumoniae</i> (1) <i>Salmonella</i> spp. (1)	<i>A. hydrophila/caviae</i> (2) <i>A. sobria</i> (1) <i>E. coli</i> (2) <i>K. oxytoca</i> (1) <i>V. fluvialis</i> (1)	13 (6; 7)

6	C	<i>A. hydrophila/caviae</i> (1)	<i>A. hydrophila/caviae</i> (1) <i>P. mendocina</i> (1)	13 (11; 2)
		<i>A. sobria</i> (3)		
		<i>C. braakii</i> (1)		
		<i>C. freundii</i> (1)		
		<i>E. cloacae</i> (1)		
		<i>E. coli</i> (4)		
7	C	<i>C. braakii</i> (1)	<i>A. sobria</i> (1) <i>E. coli</i> (2) <i>P. mendocina</i> (2) <i>P. stutzeri</i> (1) <i>V. fluvialis</i> (1)	24 (17; 7)
		<i>C. freundii</i> (2)		
		<i>E. coli</i> (5)		
		<i>K. oxytoca</i> (3)		
		<i>K. pneumoniae</i> (3)		
		<i>R. planticola</i> (2)		
		<i>S. plymuthica</i> (1)		

Table 4. Isolated bacteria (n=50) obtained by VITEK®2 system and tested for MIC with Thermo Scientific™ Sensititre™ Gram-negative MIC. *Bacterial species with ECOFF values available on EUCAST.

STRAIN	TESTED SAMPLES	STRAIN	TESTED SAMPLES
<i>Citrobacter braakii</i>	3	<i>Pseudomonas mendocina</i>	1
* <i>Citrobacter freundii</i>	6	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1
* <i>Enterobacter cloacae</i>	1	<i>Raoultella planticola</i>	1
* <i>Escherichia coli</i>	18	* <i>Salmonella sp.</i>	1
* <i>Klebsiella oxytoca</i>	9	<i>Serratia plymuthica</i>	1
* <i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	<i>Vibrio fluvialis</i>	2
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1	<i>E. coli</i> ACTT	1
<i>Pantoea spp.</i>	1		
TOTAL TESTED SAMPLES: 54			

Table 5-10. Minimal inhibitory concentrations of bacterial isolates of sentinel naiads from the Lake of Banyoles and its emissaries. Tested concentrations for each antimicrobial are painted in white. Blue colour boxes indicate ECOFF values non-determined by EUCAST. Note that samples classified as “larger than a specific concentration” are indicated in red in the same box than samples with the specific concentration.

¹ECOFF non determined by EUCAST. ²Total resistant.

<i>Citrobacter freundii</i> (n=6)																				
Antimicrobial	ECOFF (µg/mL)	Concentrations (µg/mL)																	Total R ²	
		<0.015	0.015	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	>8	16	32	>64	>128	256	512		1024
Gentamicin	≤2						6			1										0
Ampicillin	≤8							2							4					4
Cefotaxime	≤0.5					4		1		1										1
Ceftazidime	≤1						4		1			1								1
Meropenem	≤0.25		5	1																0
Chloramphenicol	ND ¹										6									
Azithromycin	ND ¹											3								
Ciprofloxacin	ND ¹	2			1	1						1; 1								
Nalidixic Acid	ND ¹									4						1; 1				
Sulfamethoxazole	ND ¹										4		2							
Trimethoprim	ND ¹					4		1		1										
Tetracycline	ND ¹								6											
Tigecycline	≤1					6														0
Colistin	ND ¹							6												

Enterobacter cloacae (n=1)

Antimicrobial	ECOFF (µg/mL)	Concentrations (µg/mL)																	Total R ²	
		<0.015	0.015	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	>64	128	256	512		1024
Gentamicin	≤2						1													0
Ampicillin	ND ¹												1							0
Cefotaxime	≤0.5					1														0
Ceftazidime	≤1						1													0
Meropenem	≤0.125		1																	0
Chloramphenicol	ND ¹									1										0
Azithromycin	ND ¹								1					1						0
Ciprofloxacin	≤0.125	1																		0
Nalidixic Acid	ND ¹									1										0
Sulfamethoxazole	ND ¹										1									0
Trimethoprim	ND ¹					1														0
Tetracycline	≤16								1											0
Tigecycline	≤2					1														0
Colistin	≤2								1											0

Escherichia coli (n=18)

Antimicrobial	ECOFF (µg/mL)	Concentrations (µg/mL)																	Total NWT ²	
		<0.015	0.015	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	>4	>8	16	>32	>64	>128	256	512		>1024
Gentamicin	≤2						17			1					1					1
Ampicillin	≤8							2		6	2					8				8
Cefotaxime	≤0.25					13				1	2;2									5
Ceftazidime	≤0.5						15						2;1							3
Meropenem	≤0.125		15		1	1	1													1
Chloramphenicol	≤16										16				1	1				2
Azithromycin	ND ¹								11		4	3								0
Ciprofloxacin	≤0.064	9		2	1		2	2				2								6
Nalidixic Acid	≤16									13				1		2;2				5
Sulfamethoxazole	≤64										6		2	7						3
Trimethoprim	≤2					11			2			2		3						5
Tetracycline	≤8								15	1						1;1				2
Tigecycline	≤0.5					18														0
Colistin	≤2								18											0

Klebsiella oxytoca (n=9)

Antimicrobial	ECOFF (µg/mL)	Concentrations (µg/mL)																	Total R ²	
		<0.015	0.015	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	>32	64	128	256	512		1024
Gentamicin	≤2						9													0
Ampicillin	≤8											3	2	3	1					6
Cefotaxime	≤0.5					9													0	
Ceftazidime	≤1						9												0	
Meropenem	≤0.25			9															0	
Chloramphenicol	ND ¹										9									
Azithromycin	ND ¹								2			2	5							
Ciprofloxacin	ND ¹	6			2			1											1	
Nalidixic Acid	ND ¹									8						1				
Sulfamethoxazole	ND ¹												1	5	3					
Trimethoprim	ND ¹					6		2						1						
Tetracycline	ND ¹								9											0
Tigecycline	≤1					9														0
Colistin	ND ¹							9												0

Klebsiella pneumoniae (n=8)

Antimicrobial	ECOFF (µg/mL)	Concentrations (µg/mL)																	Total R ²		
		<0.015	0.015	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	>4	>8	16	32	64	128	256	512		>1024	
Gentamicin	≤2						9													0	
Ampicillin	≤8											1	2	2	1;2						6
Cefotaxime	≤0.25					7					1									0	
Ceftazidime	≤0.5						6	1				1								0	
Meropenem	≤0.125			8																0	
Chloramphenicol	ND ¹										8										
Azithromycin	ND ¹								1			4	3								
Ciprofloxacin	≤0.125	1	1	5				1												1	
Nalidixic Acid	≤ND ¹									8					1						
Sulfamethoxazole	≤ND ¹												1	4	1						
Trimethoprim	≤ND ¹					1		5	1	1											
Tetracycline	≤8								6	1							1				0
Tigecycline	≤2					8														0	
Colistin	≤2							8												0	

Salmonella spp. (n=1)

Antimicrobial	ECOFF ($\mu\text{g/mL}$)	Concentrations ($\mu\text{g/mL}$)																	Total R^2	
		<0.015	0.015	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	>64	128	256	512		1024
Gentamicin	≤ 2						1													1
Ampicillin	≤ 8														1					0
Cefotaxime	≤ 0.5					1														0
Ceftazidime	≤ 2						1													0
Meropenem	≤ 0.125		1																	0
Chloramphenicol	16									1										0
Azithromycin	ND ¹									1										0
Ciprofloxacin	≤ 0.064	1																		0
Nalidixic Acid	≤ 16								1											0
Sulfamethoxazole	ND ¹																	1		0
Trimethoprim	≤ 2									1										0
Tetracycline	≤ 8								1											0
Tigecycline	ND ¹							1												0
Colistin	≤ 16							1												0