

Cultiu in vitro de nàiade allargada (*Unio mancus* Lamarck 1819) en condicions de laboratori

Estudiant: Marc Bagaria Osuna
Correu electrònic: marcbagaria@hotmail.com

Grau en Biologia

Tutor: Crisanto Gómez López
Cotutor: Miquel Campos Llach
Empresa / institució: Consorci de l'Estany, Banyoles

Vistiplau tutor i cotutor:

Nom del tutor: Crisanto Gómez López
Nom del cotutor: Miquel Campos Llach
Empresa / institució: Consorci de l'Estany
Correu(s) electrònic(s): crisanto.gomez@udg.edu;
mcampos@consorcidelestany.org

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació:

RESUM

Les nàiades d'aigua dolça (Mollusca, Bivalvia, Unionoidea) són un dels grups animals més amenaçats a Catalunya, de manera que la seva cria en captivitat s'ha establert com la principal eina de conservació. El projecte LIFE Potamo Fauna treballa en la conservació de les poblacions de *Unio mancus* Lamarck, 1819 i *Unio ravoisieri* als rius de Girona a partir d'un procediment in vivo de cria en captivitat en la qual s'utilitzen gloquidis per infectar peixos hoste en condicions de laboratori.

En aquest treball es vol aplicar el mètode de cultiu in vitro per a la cria en captivitat de *Unio mancus*, el qual permet als gloquidis experimentar la metamorfosi sense la necessitat d'infectar un peix hoste. Aquest mètode consisteix a cultivar els gloquidis en una incubadora sota unes condicions de temperatura i CO₂ determinades en un medi de cultiu format per un medi M199, sèrum de carpa o conill i una barreja d'antibiòtics i un antimicòtic. Els objectius d'aquest treball són determinar quin dels dos tipus de sèrum —carpa o conill— és millor per al medi de cultiu, i també si un tractament previ dels gloquidis amb verd de malaquita té efectes en l'èxit de metamorfosi o contaminació fúngica del cultiu. Prèviament, es determinarà la dosi de verd de malaquita que s'aplicarà al tractament, així com les condicions idònies de pH, CO₂ i temperatura per al cultiu.

Es va fer un seguiment dels gloquidis i, un cop van experimentar la metamorfosi a juvenils, es va calcular el seu èxit de metamorfosi. Amb els resultats obtinguts un cop fet el cultiu, s'ha determinat que el millor tipus de sèrum per al cultiu in vitro és el de carpa, ja que permet un major èxit de metamorfosi dels gloquidis durant el cultiu, a més de presentar una menor contaminació fúngica que el sèrum de conill. També s'ha demostrat que el tractament amb verd de malaquita no té efecte sobre l'èxit de metamorfosi dels gloquidis o la contaminació del medi de cultiu. Finalment, cal destacar que és la primera vegada que s'aconsegueixen juvenils de l'espècie *Unio mancus* utilitzant el mètode de cultiu in vitro.

RESUMEN

Las náyades de agua dulce (Mollusca, Bivalvia, Unionoidea) son uno de los grupos animales más amenazados de Cataluña, de modo que su cría en cautividad se ha establecido como la principal herramienta de conservación. El proyecto LIFE Potamo Fauna trabaja en la conservación de las poblaciones de *Unio mancus* Lamark, 1819 y *Unio ravoisieri* en los ríos de Gerona a partir de un procedimiento in vivo de cría en cautividad en la que se utilizan gloquidios para infectar peces hospedadores en condiciones de laboratorio.

En este trabajo se quiere poner en práctica el método de cultivo in vitro para la cría en cautividad de *Unio mancus*, que permite a los gloquidios experimentar la metamorfosis sin la necesidad de infectar un pez hospedador. Este método consiste en cultivar los gloquidios en una incubadora bajo unas condiciones de temperatura y CO₂ determinadas en un medio de cultivo formado por un medio M199, suero de carpa o conejo y una mezcla de antibióticos y un antimicótico. Los objetivos de este trabajo son determinar cuál de los dos tipos de suero —carpa o conejo— es mejor para el medio de cultivo, y también comprobar si un tratamiento previo de los gloquidios con verde de malaquita tiene efectos en el éxito de metamorfosis o contaminación fúngica del cultivo. Previamente, se determinará la dosis de verde de malaquita que se aplicará al tratamiento, así como las condiciones idóneas de pH, CO₂ y temperatura para el cultivo.

Se hizo un seguimiento de los gloquidios y, al experimentar la metamorfosis a juveniles, se calculó su éxito de metamorfosis. Con los resultados obtenidos una vez hecho el cultivo, se ha determinado que el mejor tipo de suero para el cultivo *in vitro* es el de carpa, ya que permite un mayor éxito de metamorfosis de los gloquidios durante el cultivo, además de presentar una menor contaminación fúngica que el suero de conejo. También se ha demostrado que el tratamiento con verde de malaquita no tiene efectos en el éxito de metamorfosis de los gloquidios o la contaminación del medio de cultivo. Por último, cabe destacar que es la primera vez que se consiguen juveniles de la especie *Unio mancus* utilizando el método de cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

Freshwater mussels (Mollusca, Bivalvia, Unionoidea) are one of the most threatened animal group in Catalonia. Therefore, artificial culture has been established as the main measure for their conservation. LIFE project Potamo Fauna is working on the population's conservation of *Unio mancus* Lamark, 1819 and *Unio ravoisieri* in Girona's rivers based on an in vivo culture method in which it is used glochidia to infest host fish under controlled laboratory conditions.

The aim of this paper is to put into practice the in vitro method to culture *Unio mancus* artificially, which allows glochidia to undergo their metamorphosis without the use of a host fish. This method consists on culturing glochidia in an incubator under controlled temperature and CO₂ conditions, in an artificial culture medium containing M199, carp or rabbit serum, and a mixture of antibiotics and an antifungal. The objectives of this work are to determinate which of the two types of serum (carp or rabbit) is better for the culture medium, and also to determinate if a previous treatment of glochidia with malachite green has an effect on the survival or fungal contamination of the culture. Previously, the dose of malachite green used in the treatment will be defined, as well as the appropriate pH, CO₂ and temperature conditions for the culture.

Glochidia were tracked, and when they metamorphosed into juveniles, their metamorphosis success was calculated. With the obtained results once the culture is done, it has been determined that the best type of serum for the in vitro culture is the one from carp, because it allows a greater metamorphosis success for the glochidia during the culture, as well as presenting less fungal contamination in comparison with rabbit serum. It has also been determined that a treatment with malachite green has not any effect on the metamorphosis success of glochidia or fungal contamination of the culture medium. Finally, it is important to highlight the fact that it is the first time that juveniles of the species *Unio mancus* are obtained through an in vitro culture method.

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	2
2. OBJECTIVES	4
3. METODOLOGIA.....	4
3.1. Experiment amb verd de malaquita.....	4
3.2. Cultiu in vitro.....	6
<i>Calibratges a la incubadora.....</i>	<i>6</i>
<i>Preparació dels antibiòtics i antimicòtic</i>	<i>7</i>
<i>Extracció de sèrum de carpa.....</i>	<i>7</i>
<i>Selecció i neteja dels gloquidis.....</i>	<i>8</i>
<i>Preparació del medi de cultiu</i>	<i>9</i>
3.3. Seguiment dels gloquidis	11
3.4. Èxit de la metamorfosi	11
4. RESULTATS	12
4.1. Experiment amb verd de malaquita.....	12
4.2. Cultiu in vitro.....	16
4.3. Seguiment dels gloquidis	18
4.4. Èxit de la metamorfosi	20
5. DISCUSSIÓ.....	22
5.1. Experiment amb verd de malaquita.....	22
5.2. Cultiu in vitro.....	23
5.3. Seguiment dels gloquidis	24
5.4. Èxit de la metamorfosi	25
6. CONCLUSIONS	27
7. CRITERIS ÈTICS I DE SOSTENIBILITAT	27
Agraïments.....	29
Bibliografia	29

1. INTRODUCCIÓ

Les nàiades o musclos de riu són mol·luscs bivalves de la família *Unionoidae*. La seva distribució és mundial, ja que es troben en tot tipus d'aigües interiors, a excepció del continent antàrtic. Actualment, a la península Ibèrica, se'n troben deu espècies que pertanyen a dues famílies diferents (*Margaritiferidae* i *Unionidae*) (Araujo et al., 2009). El nostre estudi se centrarà en l'espècie *Unio mancus* Lamarck, 1819 o nàiade allargada, que viu als rius de la conca mediterrània amb un límit meridional situat entre les conques del Júcar i el Segura. És l'única espècie del gènere *Unio* present a la conca del riu Ter, amb poblacions al riu Llémena, Brugent i en canals del Baix Ter. Al llac de Banyoles s'ha detectat convivint amb *Unio ravoisieri* (Araujo, 2012) i fins fa poc, es creia que aquestes dues espècies que es troben al nord-est de la península Ibèrica eren una mateixa espècie anomenada *Unio elongatulus*, però estudis moleculars recents han confirmat que són dues espècies diferents (Araujo et al., 2004).

A la península Ibèrica, les nàiades són actualment uns dels animals més amenaçats. A Catalunya, l'any 2010 hi havia menys de 5.000 exemplars lliures de *Unio mancus*, un 8% dels individus de tot l'estat. La disminució de les seves poblacions és causada per efectes antropogènics directes i indirectes, com la fragmentació i desaparició dels seus hàbitats provocat per la contaminació, la construcció de reservoris d'aigua, la canalització, la desforestació, l'alteració dels cursos d'aigua i dels seus règims i també la introducció d'espècies exòtiques invasores de mol·luscs i peixos. Pel seu mal estat de conservació i la seva vulnerabilitat, aquesta espècie es troba protegida dins la Directiva hàbitats (Annex V), Conveni de Berna (Annex III), Catàleg Valencià d'espècies de fauna amenaçades (Annex I), catalogada en el text de la Llei de Protecció dels animals de la Generalitat de Catalunya en la categoria d'espècies protegides de la fauna salvatge autòctona b. Invertebrats (Decret legislatiu 2/2008) i al Llibre Vermell dels invertebrats d'Espanya en la categoria de quasi amenaçat (Araujo, 2012).

L'espècie *Unio mancus* presenta una forma molt variable depenent del seu hàbitat, amb exemplars de closca petita, fina i delicada fins a altres de closca robusta. Presenta l'aspecte típic del musclo de riu, amb una closca generalment bombada i allargada de coloració marronosa negra o groguenca, amb zones més verdoses i d'una longitud menor de 10 cm. Es tracta d'una espècie típicament fluvial, tot i que també es pot trobar en grans embassaments i llacs. Viu generalment semienterrada en fons de graves ben assentades amb poca corrent, a l'ombra de la vegetació de riera, tot i que també s'han localitzat exemplars en zones de substrat gruixut entre pedres i roques, en fons de fang i matèria orgànica i en platges de sorra.

Una de les característiques d'aquests bivalves d'aigua dolça és el seu cicle de vida atípic, que inclou un adult de vida lliure i una larva ectoparàsita de vida curta (entre 10 i 30 dies) anomenada gloquidi. Els gloquidis són paràsits obligats que han de parasitar les brànquies (90%) o les aletes (10%) d'un peix hoste per tal de metamorfitzar-se en la forma de juvenil. Un cop es completa la metamorfosi, els juvenils joves, anomenats pedivelígers, se separen del peix hoste i cauen en un substrat apropiat, on comencen l'alimentació pedal per tal de sobreviure fins a ser un adult. Aquests animals solen tenir una gran especificitat entre ells i els peixos hoste, essent el barb de muntanya (*Barbus meridionalis*), el barb de l'Ebre (*Luciobarbus graellsii*), la bagra (*Squalius cephalus*) i la bavosa de riu (*Salaria fluviatilis*) les principals espècies

de peixos hoste. Aquesta gran especificitat és una de les raons que poden explicar per què les nàiades estan considerades actualment un dels grups animals més amenaçats del planeta (Campos et al., 2013).

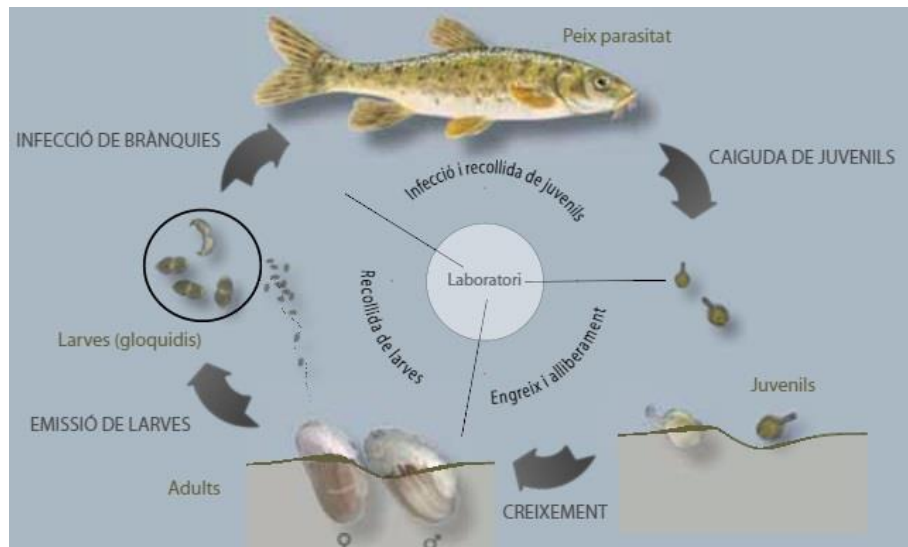


Figura 1. Cicle de vida de la nàiada a la natura comparat amb el cicle de cria al laboratori (Campos et al., 2013)

Una altra característica important de les nàiades és el paper que juguen en els ecosistemes d'aigua dolça on viuen, ja que intervenen en la dinàmica dels nutrients d'aquests ecosistemes removent el fitoplàncton, les bacteries i la matèria orgànica de l'aigua i el sediment, i col·laborant en la bioturbació dels fons, fent augmentar el seu contingut d'oxigen. A més, són espècies amb un alt poder bioindicador (Araujo et al., 2009; Araujo, 2012).

El Projecte LIFE 08 NAT/ES/ 000078 gestionat pel Consorci de l'Estany es va dedicar a restaurar la fauna nativa del llac de Banyoles (Girona, Espanya). Amb l'objectiu de fer actuacions per a la conservació de les nàiades, aquest projecte va crear un laboratori de cria de nàiades que permet la cria en captivitat de *Unio manicus* i *Unio ravoisieri* amb el seu posterior engreix. (Feo et al., 2014). Aquest projecte ha permès un augment del 40% de la població natural de *Unio manicus* d'un 200% de la de *Unio ravoisieri*, a més de la notable disminució del nombre d'individus d'espècies de peixos exòtics i de l'augment de les espècies autòctones hostes dels gloquidis dels musclos de riu. Tot això ha consolidat les poblacions de nàiades i ha permès l'autoregeneració d'aquestes poblacions (Feo et al., 2013). Actualment, el projecte LIFE Potamo Fauna té com a un dels objectius principals la millora i recuperació de les poblacions de *Unio manicus* i *Unio ravoisieri* a les conques del Fluvià i del Ter mitjançant mètodes de reproducció *ex situ* i la posterior sembra de juvenils per reforçar les poblacions existents. També cal dir que la conservació de les nàiades inclou la conservació dels potencials peixos autòctons hostes dels gloquidis, incloent el barb de muntanya (*Barbus meridionalis*), espècie d'interès comunitari que també és objectiu directe d'aquest projecte (Pou et al., 2014).

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 de *Unio manicus*.

En canvi, l'altre mètode és una alternativa nova que permet als gloquidis experimentar la metamorfosi sense parasitar un peix hoste, cosa que permet obtenir un major nombre de juvenils i reduir el cost total de la reproducció. Fins ara, s'han aconseguit metamorfitzar in vitro un total de 42 espècies diferents de musclos d'aigua dolça, però a l'espècie *Unio mancus* no se li ha aplicat mai aquesta tècnica (Lima et al., 2012).

En aquest treball es pretén posar en pràctica una metodologia preestablerta per cultivar in vitro l'espècie *Unio mancus*. Per aconseguir-ho, es necessita un medi que compleixi totes les necessitats nutricionals dels gloquidis i que eviti la contaminació microbiana i fúngica. En aquest experiment es treballarà amb un medi de cultiu que contingui M199 com a font de sals, aminoàcids i vitamines; sèrum de carpa i conill com a font de proteïnes; i una barreja de tres antibiòtics (carbenicilina, gentamicina sulfat i rifampicina) i un antimicòtic (amfotericina B). El medi de cultiu amb els gloquidis serà incubat en una incubadora a una temperatura de 23°C i amb un pH de 7.3-7.4, que es controlarà amb una aportació de CO₂ determinada a la incubadora (Owen et al., 2010). A més del procés de selecció i neteja dels gloquidis que es farà abans del cultiu, s'incorporarà al mètode un tractament dels gloquidis amb verd de malaquita, un antifúngic la dosi de la qual es determinarà mitjançant un experiment previ.

2. OBJECTIVES

The main objective of this study is to put into practice the in vitro method to culture *Unio mancus* artificially so as to determinate if glochidia are able to successfully undergo their metamorphosis into juveniles and, if that is the case, to count their metamorphosis success. Which serum (carp or rabbit) as the protein source allows a better glochidia survival rate will also be determined, as well as if a previous glochidia cleaning with malachite green has or has not an effect on their metamorphosis success or fungal contamination of the culture medium.

In order to achieve these objectives, some previous tests were performed. The objective of the malachite green test is to find an appropriate dose of malachite green to employ afterwards during the glochidia cleaning. Another test was also done to determinate the glochidia survival rate and activity without employing any treatment. Besides, some tests will be done in the incubator to calibrate it with the optimal conditions of temperature, pH and CO₂.

3. METODOLOGIA

3.1. Experiment amb verd de malaquita

Un dels principals problemes que té el cultiu in vitro és la contaminació per bacteris i fongs que pateix el medi de cultiu (Owen et al., 2010). Per evitar aquestes contaminació, a més d'alguns antibiòtics i antimicòtics, utilitzarem una dosi de verd de malaquita, un colorant molt utilitzat en piscicultura i també utilitzat pels tècnics del Consorci de l'Estany per combatre malalties provocades per fongs que afecten els peixos. El verd de malaquita és eficaç per combatre un tipus concret de pseudofongs, els oomicots, un dels principals causants de la infecció dels cultius in vitro dels gloquidis. En aquest experiment s'estudiarà l'activitat i la supervivència dels gloquidis de *Unio mancus* al llarg de diversos dies aplicant dosis varies de verd de malaquita. Per calcular el percentatge d'activitat, primer es va aplicar plasma de carpa, ja que indueix el tancament dels gloquidis, i es va comptabilitzar tant el nombre de gloquidis que quedaven

oberts (sense activitat) com el nombre de tancats (amb activitat). El valor del percentatge d'activitat es va calcular dividint el nombre de gloquidis tancats entre el total de gloquidis comptabilitzats.

Es va fer un experiment amb 10 tractaments que constava de 9 dosis diferents de verd de malaquita el valor de les quals augmenta exponencialment i la dosi 0 sense verd de malaquita. Aquestes dosis es van observar en diferents temps: T0 a les 0 hores, A a les 20 hores, B a les 43 hores i C a les 67 hores. A més, la dosi 0 es va observar durant sis dies per fer un seguiment de l'activitat i la supervivència dels gloquidis sense cap tractament.

Per fer-ho, primer es van recollir exemplars de nàiade allargada (*Unio mancus*) al Molinot de Sant Esteve, del riu Llàmena el dia 4 d'abril de 2016. Aquests exemplars es van posar en un cubell d'aigua i es van portar al laboratori de cria de nàiades del Consorci de l'Estany. Un cop al laboratori, es van seleccionar les nàiades que eren gràvides (femelles amb bosses d'ous), que es van separar dels mascles i les femelles no gràvides, i es van posar en dos aquaris diferents de 100 L plens d'aigua de l'estany de Banyoles. Cada dia es va fer una neteja del fons de l'aquari amb un sífó de succió, renovant $\frac{3}{4}$ parts de l'aigua total. Els dies que es va observar la presència de gloquidis, es van extreure directament de la peixera per pipetació simple amb una pipeta Pasteur, intentant agafar els gloquidis tan nets com fos possible, i es van posar en una placa de Petri de vidre amb aigua de l'estany (Campos et al., 2013).

Un cop obtinguts els gloquidis, es va procedir a la seva neteja i selecció. Primer es va observar si els gloquidis estaven en bon estat i es van seleccionar els exemplars més nets i sols (sense grumolls), que es van posar en una altra placa de Petri amb aigua de l'estany. Aquests gloquidis seleccionats van ser separats en lots d'aproximadament cinc-cents individus i van ser transferits a uns vials de vidre de 20 mL amb aigua de l'estany. Vam preparar 30 vials, tres per cada dosi (dosis de D0 a D9).

Un cop seleccionats els gloquidis, es va preparar la dissolució de verd de malaquita per poder-ne fer les diferents dosis. Per fer-ho, es va posar 0,1 g de verd de malaquita en 2 L d'aigua per tal de tenir la dosi mare. A partir d'aquesta dosi se'n van preparar les nou dosis corresponents, cada una amb el volum de verd de malaquita anteriorment calculat. Per preparar les 9 dosis, es disposava de 9 galledes plenes amb 2 L d'aigua de l'estany. A cada una es va afegir el volum corresponent de verd de malaquita que procedia de la dosi mare. Un cop preparades les 9 dosis a les galledes, es va decantar l'aigua de cada vial, que contenia els gloquidis, i es van reomplir amb la dosi corresponent de verd de malaquita. Després es va esperar 30 minuts i es va netejar dos cops cada vial decantant-lo i tornant-lo a omplir amb aigua de l'estany.

Un cop aplicades les dosis, es va repartir els gloquidis de cada vial en tres vials diferents i vam obtenir 9 vials per cada dosi, tres rèpliques per cada temps (A, B i C). Per fer-ho, es va abocar el contingut dels vials en una placa de Petri de vidre i es van repartir els gloquidis en els 3 vials amb una pipeta Pasteur. Els vials es van deixar a 20°C a la incubadora.

Llavors, als diferents temps, es van fer les observacions dels gloquidis a la lupa. Primer es va buidar la meitat de l'aigua i es va posar la resta en una placa de Petri de vidre, esbandint-lo amb aigua per fer caure tots els gloquidis. L'observació a la lupa es va fer a 1,6 augments, fent moviments en cercle per agrupar els gloquidis al centre de la placa i fent l'observació dins un

quadrat de 1x1 cm amb aproximadament 100 gloquidis. L'observació inicial va consistir en avaluar l'estat dels gloquidis (si hi ha creixements fúngics i bacterians) i en comptabilitzar els buits, els trencats i els tancats. Un cop feta l'observació inicial, es van afegir 2 o 3 gotes de sèrum de carpa sobre els gloquidis i se'n va observar l'activitat. Després d'uns 15 segons, es van comptabilitzar els tancats (vius i actius), els semi-tancats (poc actius) i els oberts (morts). Es van fer aquestes observacions per a totes les rèpliques de les dosis i per a tots els temps (a les 0, 20, 43 i 67 hores). Es van canviar unes tres quartes parts de l'aigua dels vials que no s'havien de revisar el mateix dia per tal d'oxigenar-la, i es van tornar a la incubadora a 20°C fins que van ser observats.

3.2. Cultiu in vitro

Calibratges a la incubadora

Els paràmetres a tenir en compte per al cultiu in vitro són el pH, el CO₂ i la temperatura. Idealment, el pH hauria de ser de 7.3-7.4, la temperatura de 23°C i l'aportació de CO₂ varia depenent del tipus de sèrum, essent un 1.5-1.8 % quan s'utilitza sèrum de carpa i un 3-3.6 % pel de conill (Owen et al., 2010). Per tal de controlar aquests paràmetres, es van fer diverses proves a la incubadora per tal de calibrar-la.

La temperatura del cultiu havia de ser de 23°C. Per comprovar-ho es va engegar la incubadora, es va regular a aquesta temperatura i, tot seguit, es va posar un sensor de temperatura data logger tipus botó a l'interior de la incubadora que va enregistrar la temperatura durant cent minuts. Posteriorment, es van obtenir les dades amb el programa informàtic Thermo lmb. Es va fer el mateix posant una safata amb aigua dins la incubadora, per comprovar si d'aquesta manera la temperatura dins la incubadora era més estable (ja que l'aigua fa de tampó).

A més de la temperatura, també es va fer un seguiment del CO₂, ja que la seva variació permet establir el pH fisiològic del medi de cultiu i evitar que pateixi variacions. Donada la disponibilitat d'una sola incubadora per al cultiu, l'aportació de CO₂ havia de ser la mateixa per als dos tipus de sèrum i, per tant, es va buscar l'aportació de CO₂ adequada per tal que el pH dels dos medis fos l'adient i es mantingués estable al llarg del temps. Es van fer dos seguiments del CO₂ al 5% i al 2%, engegant la incubadora i anotant la variació al llarg de dues hores. Per últim, es va fer una prova amb el medi de cultiu sense gloquidis per tal de comprovar si hi havia canvis de pH en el medi de cultiu o si aquest es mantenia estable al llarg de dos dies, i si el canvi diari del medi tenia un efecte en aquestes variacions. Per fer-ho, es van preparar 6 vials amb medi de cultiu: amb tres es va fer un canvi diari del medi del 50%, i amb els altres tres no. A més, es va preparar un vial extra per mesurar el pH del medi el primer dia de la prova. Aquest experiment es va repetir dues vegades, un amb una incubadora al 5% de CO₂ i una altra al 2%. Es va mesurar el pH amb una sonda de pH cònica a tres temps, al cap de 0 hores, al cap de 24 hores i al cap de 48 hores.

Preparació dels antibiòtics i antimicòtics

La contaminació del medi causada per fongs i bacteris és un dels principals problemes en els cultius d'aquest tipus. Per evitar-ho, es va preparar una barreja d'antibiòtics i antimicòtics que es va aplicar al medi. Aquesta barreja constava de tres antibiòtics (Rifampicina, Gentamicina i Carbenicilina) i d'un antimicòtic (Amphotericina B). La dosi dels antibiòtics va ser de 100 µg/mL, i per obtenir-la es van pesar 25 mg de cadascun en una bàscula de precisió i es van posar en tubs de plàstic de 15 mL amb 10 mL d'aigua destil·lada estèril, obtenint una dosi de 2,5 mg/mL. La dosi de l'antimicòtic és de 1 µg/mL, i es va preparar pesant-ne 1 mg i posant-lo en un tub de plàstic de 15 mL amb 10 mL d'aigua destil·lada estèril portada a pH 2 amb HCl 1M, ja que aquest antimicòtic és soluble en àcid, obtenint una dilució de 0,1 mg/mL. Un cop vam tenir les quatre dilucions, es va tornar a diluir en un pot de vidre estèril de 100 mL, que es va omplir amb 87 mL d'aigua destil·lada estèril, i es van afegir 4 mL de cadascun dels tubs amb els antibiòtics i 1 mL de l'antimicòtic, utilitzant una pipeta de vidre de 10mL. Aquest procés es va repetir dues vegades, obtenint d'aquesta manera un volum total de 200 mL de la barreja d'antibiòtics i antimicòtics (Rifampicina, Gentamicina i Carbenicilina a 100 µg/mL i Amphotericina B a 1 µg/mL). Aquesta barreja es va repartir en tubs de plàstic estèrils de 15 mL i es va guardar al congelador a una temperatura de -20°C (Lima et al., 2012).

Extracció de sèrum de carpa

Per tal de tenir una font de proteïnes al medi per als gloquidis, s'hi havia d'afegir sèrum, que és la sang sense glòbuls vermells, blancs, plaquetes ni factors de coagulació. El sèrum que es va utilitzar va ser de carpa i de conill. El sèrum de conill es va comprar, i el sèrum de carpa, que no es va trobar al mercat, va ser extret per nosaltres al laboratori. Per fer-ho, es van pescar carpes (*Cyprinus carpio*) salvatges de l'estany, es van posar en una piscina al laboratori i es van alimentar artificialment. El primer pas per a l'extracció de sèrum va ser anestesiar les carpes, i per fer-ho es van agafar de la piscina i es van posar en un bidó d'aigua de 100 L. Les carpes del bidó es van anestesiar amb Oli de clau en una dosi de 7,5 mL per cada 100 L d'aigua, obtenint un grau alt d'anestèsia en un temps d'aproximadament 4 min, cosa que va provocar que les carpes quedessin completament immòbils (García-Gómez et al., 2011). Un cop adormides, es va procedir a l'extracció de sang. Es van treure les carpes d'una en una i es van col·locar sobre una fusta, es van netejar amb aigua de l'estany i es van eixugar bé amb un drap. Es van embolicar les carpes amb un drap per la zona abdominal i es van posar de panxa enlaire. Mentre una persona aguantava la carpa, una altra feia un tall sec per sota l'aleta caudal amb un ganivet esmolat, i tallava la cua. A continuació, s'aguantava la carpa en vertical sobre un vas de precipitats de 50 mL, que recollia el rajolí de sang, procurant que la sang entrés al vas de manera suau per evitar xarbotar-la i que es trenquessin els glòbuls vermells. Un cop obtinguda tota la sang, es va repartir en tubs de centrífuga estèrils de 50 mL. Per obtenir el sèrum, es va deixar coagular la sang durant aproximadament 1 hora i 30 minuts a temperatura ambient, i després unes 20 hores a la nevera a 4 °C. Un cop passades aquestes hores, es van separar els diferents components de la sang centrifugant els tubs de centrífuga a 1000 rpm durant 5 min, i després a 3000 rpm durant 10 min. Un cop centrifugats, va quedar una porció coagulada al fons i una porció a sobre de color d'or, que és el sèrum. Aquesta part es va agafar utilitzant una xeringa estèril de 5 mL i una agulla gran. Es va posar la porció de sèrum en tubs de plàstic de 15 mL estèrils i es van guardar al congelador a -20 °C. En total, van ser sacrificades 11

carpes i es van obtenir 300 mL de sèrum. Aquest mètode és agressiu, ja que les carpes han de ser sacrificades. (Owen, 2009; Uthaiwan et al., 2001).

Selecció i neteja dels gloquidis

Un cop preparat tot el material necessari, es va seleccionar i netejar els gloquidis per tal de posar-los al medi de cultiu i procedir al cultiu in vitro. Primer es van recollir exemplars de nàiade allargada (*Unio mancus*) a la Bassa Mort-Teixidor el dia 7 de juliol de 2016. Els exemplars es van posar en un cubell d'aigua i es van portar al laboratori de cria de nàiades del Consorci de l'Estany, on es va seguir el mateix procés de tria de femelles gràvides i de manteniment als aquaris que en l'experiment amb verd de malaquita (Campos et al., 2013).

El dia que es va observar la presència de gloquidis als aquaris, van ser extrets directament de la peixera per pipetació simple amb una pipeta Pasteur, intentant agafar els gloquidis tan nets com fos possible i es van posar en una placa de Petri de vidre amb aigua de l'estany. Un cop obtinguts els gloquidis, es va procedir a la seva selecció. Primer es va observar a la lupa binocular si els gloquidis eren actius i es va disgregar els grumolls amb unes pinces fines per tal de seleccionar els gloquidis més nets i sols (sense grumolls). Amb una pipeta Pasteur els vam transferir en una altre placa de Petri amb aigua de l'estany. En total, es van seleccionar uns 5.000 gloquidis (aproximadament 200 per cadascun dels 24 vials).

Un cop feta la selecció dels gloquidis, es van filtrar. Primer, es va filtrar el contingut de la placa de Petri amb els gloquidis per tres malles diferents, una a sobre l'altre. La de dalt era de 100 µm per tal de filtrar les partícules de l'aigua de l'estany, la del mig era de 200 µm perquè s'hi quedessin els gloquidis i la de sota era de 100 µm per evitar la possible pèrdua de gloquidis si travessaven la malla de 200 µm. Aquest conjunt de malles es va esbandir amb aigua de l'estany, i la del mig i la de sota es van esbandir en una placa de Petri amb aigua de l'estany estèril utilitzant un ruixador. Els gloquidis filtrats d'aquesta placa es van observar a la lupa binocular i, amb una pipeta Pasteur, es van traspasar a dos vasos de precipitats de 250 mL estèrils, posant la meitat dels gloquidis a cada vas de precipitats, aproximadament 2.500 gloquidis a cadascun.

En un d'aquests vials es va fer un tractament amb verd de malaquita, que correspondrà als 12 vials de cultiu amb aquest tractament. La dosi utilitzada va ser de 0,1 mg/mL de verd de malaquita. Per fer el tractament es van posar 0,1 g de verd de malaquita en 2 L d'aigua d'estany per tal d'obtenir la dosi mare. A partir d'aquesta dosi se'n va preparar la dosi corresponent, posant 500 µL de la dosi mare en 250 mL d'aigua amb una micropipeta. Un cop preparada la dosi, es va decantar l'aigua d'estany estèril del vas de precipitats amb la meitat dels gloquidis i es va omplir amb la dosi de verd de malaquita preparada. Es va esperar 30 minuts, es va decantar el contingut del vas de precipitats i es va netejar dos cops decantant-lo i reomplint-lo amb aigua de l'estany estèril.

Un cop fet el tractament de verd de malaquita en un dels dos vasos de precipitats, es va fer la neteja de tots els gloquidis amb aigua de l'estany estèril en els dos vasos. A partir d'aquí, el procés es va fer sota la campana i amb la flama encesa per tal de treballar en unes condicions tan estèrils com fos possible. Per fer la neteja, es van omplir els dos vasos amb aigua de l'estany estèril, es van agitar suaument, es van deixar precipitar els gloquidis durant uns 30

segons i es va decantar l'aigua. Després es van tornar a omplir els vasos de precipitats amb l'aigua de l'estany estèril i es va repetir el procés 3 vegades. Un cop feta aquesta neteja, els gloquidis es van transferir a dos vials de vidre estèrils de 20 mL, un pels gloquidis tractats amb verd de malaquita i un altre pels no tractats. Un cop transferits, es va decantar l'aigua dels vials i amb una pipeta Pasteur de vidre estèril se'n va extreure tota l'aigua possible, anant amb cura de no emportar-se cap gloquidi (Owen et al., 2010).

Un cop els gloquidis es van trobar als vials de vidre estèrils sense aigua, es va procedir a la seva neteja amb medi MEM (Eagles Minimal Essential Medium). Per fer-ho, es van omplir amb medi MEM i, un cop els gloquidis van precipitar i els contaminants van quedar suspesos al vial, es van treure dues terceres parts del medi MEM per decantació. Llavors es va tornar a omplir els vials amb medi MEM i es va repetir el procés tres vegades (Owen et al., 2010).

Un cop feta la neteja dels gloquidis, es van separar en els diferents vials de cultiu. El contingut dels dos vials amb medi MEM i gloquidis es va abocar a una placa de Petri estèril i es va tancar. Aquesta placa de Petri va ser tretada de la campana amb la flama i observada sota la lupa binocular. Es van contar i es van posar aproximadament 200 gloquidis a cada vial de vidre estèril de 20 mL amb una micropipeta i puntes estèrils, i els vials es van tancar amb els tacs d'alumini. Es van repartir els gloquidis de 200 en 200 a un total de 24 vials, tenint en compte que a 12 vials hi havia gloquidis tractats amb verd de malaquita i als altres 12 vials sense el tractament.

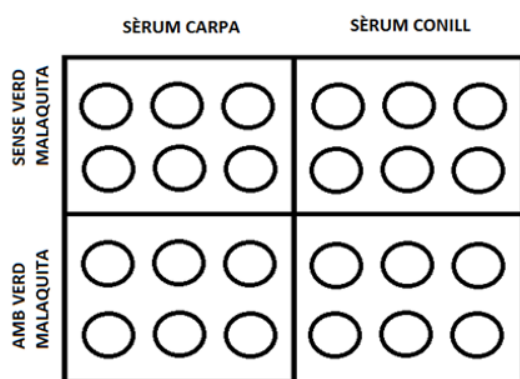


Figura 2. Esquema del cultiu *in vitro*, que consta de 24 vials amb quatre tractaments diferents; carpa amb verd de malaquita, carpa sense verd de malaquita, conill amb verd de malaquita i conill sense verd de malaquita. Cada tractament consta de sis rèpliques.

Un cop es van tenir tots els vials amb els gloquidis, es va tornar a treballar sota la campana amb la flama. Es va extreure tant medi MEM com va ser possible amb una pipeta Pasteur de vidre estèril, procurant no extreure cap gloquidi. Llavors es van agafar 5 mL del medi de cultiu corresponent (12 vials amb sèrum de carpa i 12 amb sèrum de conill) i es van omplir els 24 vials del cultiu més 2 vials de cada tipus de sèrum per mesurar el pH inicial del medi de cultiu.

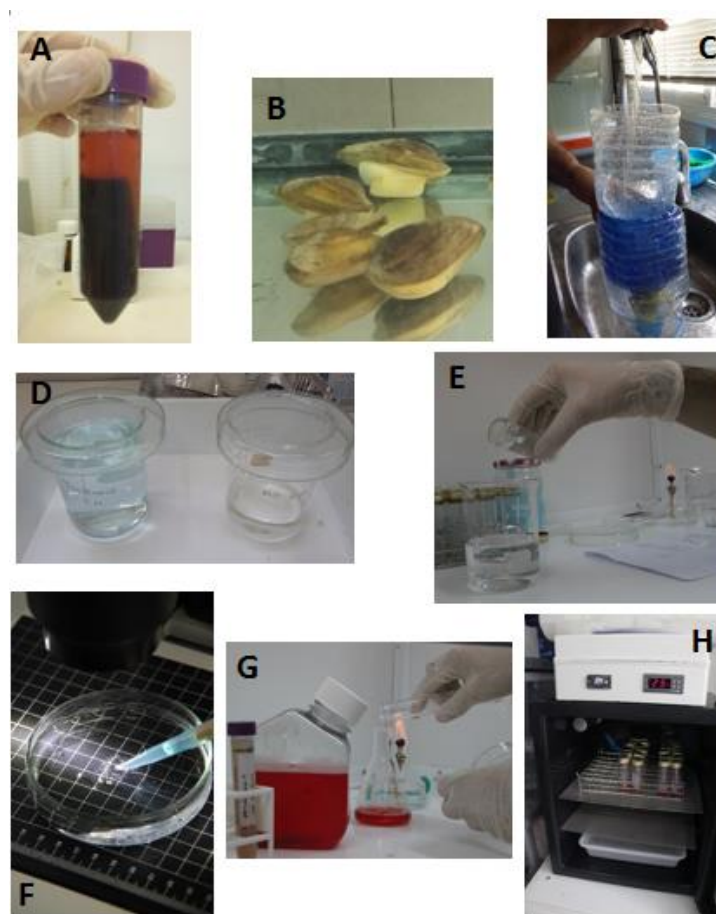
Els 24 vials del cultiu van ser rotulats, tapats i posats dins la incubadora, on es van incubar a 22,5 °C amb un aportació constant del 2% de CO₂. Un 50 % del medi de cultiu va ser canviat cada 24 hores (Owen et al., 2010).

Preparació del medi de cultiu

El medi de cultiu conté sèrum de carpa o de conill i medi M199 en una ràtio de M199: sèrum de carpa/conill de 3:1. Per prevenir la contaminació es van afegir al medi antibiòtics (100

$\mu\text{g/mL}$ de Carbenicilina, $100 \mu\text{g/mL}$ de Gentamicina sulfat i $100 \mu\text{g/mL}$ de Rifmapina) i un antimicòtic ($1 \mu\text{g/mL}$ d'Amphotericina B) (Lima et al., 2012).

Per preparar i transferir el medi de cultiu als vials es va treballar sota la campana i amb flama. El medi de cultiu M199 es va guardar a la nevera a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, i el sèrum de carpa i de conill i la barreja d'antibiòtics i antimicòtic es van guardar al congelador a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Es van descongelar a la nevera 24 hores abans d'utilitzar-los. Per preparar el medi de cultiu, primer es va extreure el medi M199 i es va posar en un vial de 20 mL amb una agulla i una xeringa estèrils. Amb una micropipeta amb puntes estèrils es va transferir la quantitat requerida de medi en dos metrassos erlenmeyer de 100 mL estèrils, un per al medi amb sèrum de conill i l'altre pel de sèrum de carpa. El sèrum de carpa i de conill es van transferir directament dels tubs de 15 mL on estaven guardats els metrassos erlenmeyers corresponents, afegint el volum adequat amb una micropipeta amb puntes estèrils. Per últim, es va fer el mateix amb la barreja de antibiòtics i antimicòtic també guardats en tubs de 15 mL. Es va tancar els metrassos erlenmeyer amb la barreja del medi de cultiu amb una placa de Petri de vidre petita estèril i es van posar a la incubadora a $22,5 \text{ }^\circ\text{C}$ per tal d'evitar un xoc tèrmic al moment de posar els gloquidis. Un cop el medi de cultiu és a punt, es van transferir 5 mL del medi a cadascun dels vials, 12 amb el medi amb sèrum de conill i 12 amb el de sèrum de carpa utilitzant una micropipeta amb puntes estèrils.



Làmina 1. Representació de la metodologia utilitzada per al cultiu in vitro. A: tub en el qual s'observa una porció coagulada de sang al fons i una porció de sèrum de carpa a sobre. B: nàïades adultes a partir de les quals es van extreure els gloquidis. C: neteja dels gloquidis per filtració amb dues malles de $100 \mu\text{m}$ i una de $200 \mu\text{m}$. D: tractament de la meitat dels gloquidis amb verd de malaquita. E: neteja dels gloquidis amb medi MEM. F: recompte dels gloquidis per a la transferència als vials. G: preparació del medi de cultiu. H: incubació del cultiu a la incubadora. 10

Per fer el 50 % del canvi diari del medi de cultiu es va utilitzar el mateix mètode, preparant el medi de cultiu diàriament amb el volum adequat de cadascun dels seus components. Abans d'afegir el medi de cultiu es van haver de treure 2,5 mL del medi de cultiu dels vials amb una micropipeta amb puntes estèrils procurant no perdre cap gloquidi i utilitzant una punta diferent per cada canvi per tal d'evitar contaminacions. Quan es feien els canvis de medi diaris, també s'observava a simple vista si hi havia contaminació fúngica a cadascun dels vials, i s'avaluava segons els paràmetres de gens, poca, molta o total contaminació. En els vials en què 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, mesurant el pH del medi de cultiu extret diàriament per cada vial del cultiu amb una sonda de pH cònica.

3.3. Seguiment dels gloquidis

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. Aquest seguiment es va fer extraient una part dels gloquidis dels vials escollits a l'atzar de cada tractament per tal d'observar-los al microscopi òptic i veure'n els canvis morfològics. Els gloquidis extrets van ser descartats del cultiu. Es van observar diferents aspectes de la morfologia dels gloquidis: el color, la forma, l'estructura i la compartimentació interior, el marge de la closca, els múscles i també la presència o absència de les brànquies, els cilis, el mantell o el peu. La presència del mantell, les brànquies, els cilis i el peu indica l'inici de la metamorfosi de gloquidis a juvenils.

Aquestes observacions al microscopi es van fer els dies 8, 10, 12 i 13 fins a observar els canvis descrits i, un cop observats, es va induir la seva metamorfosi. Per fer-ho, el dia que es va observar que una gran proporció de les mostres observades tenien les característiques que indiquen l'inici de la metamorfosi, es va afegir al medi de cultiu un 50% d'aigua de l'estany estèril (5 mL d'aigua de l'estany afegits als 5 mL del medi de cultiu) i es va incubar en les mateixes condicions que el medi de cultiu durant 20 hores per tal d'induir a la metamorfosi dels gloquidis a juvenils. Un cop passades les 20 hores, es va fer un canvi progressiu del medi, afegint cada mitja hora durant 2 hores aigua de l'estany sense esterilitzar en el mateix volum que l'aigua estèril afegida anteriorment, en el nostre cas 5 mL. Un cop passades les dues hores, es va buidar el medi de cultiu en una placa de Petri i es va observar a la lupa binocular per tal de comptabilitzar l'èxit de la metamorfosi dels individus.

3.4. Èxit de la metamorfosi

A la lupa binocular, es van comptabilitzar els juvenils actius (gloquidis metamorfitzats amb èxit), els juvenils no actius (indeterminat) i els morts (gloquidis no metamorfitzats). L'èxit de metamorfosi es va calcular en tant per cent dividint els juvenils actius entre el total d'individus observats, i es va fer de dues maneres diferents. L'èxit de metamorfosi 1 es va calcular dividint el total de juvenils actius sobre el total d'individus comptabilitzats l'últim dia de cultiu (vius, morts i no actius), essent aquest èxit de metamorfosi el percentatge de gloquidis transformats en juvenils del total d'individus presents al medi l'últim dia de cultiu. L'èxit de metamorfosi 2

es va calcular dividint el total de juvenils actius sobre el total de gloquidis comptabilitzats el primer dia de cultiu, essent aquest èxit de metamorfosi el percentatge de gloquidis metamorfitzats en juvenil del total de gloquidis afegits inicialment al medi de cultiu. Aquests càlculs es van realitzar per a cada rèplica. Això es va fer perquè l'èxit de metamorfosi 1 només té en compte l'èxit de metamorfosi dels individus presents al vial l'últim dia, sabent que els morts durant el cultiu es poden comptabilitzar. En canvi, l'èxit de metamorfosi 2 té en compte tots els individus que hi havia al cultiu el primer dia i, per tant, també té en compte els individus perduts per l'extracció de fongs i les observacions al microscopi (Owen et al., 2010; Kovitvadhi et al., 2012).

Amb les dades de l'èxit de metamorfosi del cultiu in vitro, s'ha fet una anàlisi estadística amb el programa informàtic SPSS Statistics. Els tres factors a analitzar han estat: el tractament (sense verd de malaquita i amb verd de malaquita), el tipus de sèrum (carpa i conill) i la infecció màxima (màxim grau d'infecció fúngica durant els dies de cultiu que s'avaluava segons els paràmetres de gens, poca, molta o total). Les dues variables a analitzar han estat l'èxit de metamorfosi 1 i l'èxit de metamorfosi 2. També s'ha analitzat una covariable: els dies de neteja, que són el total de dies en què es van extreure fongs del medi de cultiu durant els dies de cultiu. S'ha fet un estudi d'anàlisi de covariància o ANCOVA, en què s'ha estudiat la relació entre els tres factors (tractament, sèrum i infecció màxima) i la covariable (dies neteja) amb cadascuna de les dues variables per separat (èxit de metamorfosi 1 i èxit de metamorfosi 2). Per fer l'anàlisi estadística, les dades dels èxits de metamorfosi 1 i 2 s'han normalitzat transformant-les mitjançant una arrel quadrada, i les dades de dies de neteja també s'han normalitzat aplicant un logaritme en base 10 a les dades.

4. RESULTATS

4.1. Experiment amb verd de malaquita

Es vol determinar la dosi adequada de verd de malaquita per aplicar als gloquidis, un cop fet un seguiment de la seva activitat al llarg del temps durant aproximadament tres dies en diferents dosis. Per fer-ho, es va calcular el percentatge d'activitat a les 0, 20, 43 i 67 hores per a cadascuna de les diferents dosis. De cada percentatge d'activitat hi havia tres rèpliques, de les quals es va calcular la mitjana i la seva desviació estàndard. Es van representar els resultats en un conjunt de gràfiques (Figura 2). A més, també es va fer una representació gràfica de l'activitat dels gloquidis a les 67 hores de l'experiment en relació a la dosi de verd de malaquita aplicada en mg/mL. Aquesta representació es va fer amb les dades de les dosis a escala normal (Figura 3) i amb les dades de les dosis a escala logarítmica (Figura 4). A les dues figures hi ha representada una regressió lineal junt amb l'equació de la recta i el valor de la R^2 . També es va calcular el valor de p , que va ser $p=6.05E-06$ ($p < 0.001$).

També s'ha volgut estudiar la supervivència dels gloquidis al llarg de set dies sense aplicar cap dosi de verd de malaquita. Per fer-ho, s'ha fet un seguiment de l'activitat dels gloquidis al llarg de set dies utilitzant els mateixos criteris i metodologia que en l'experiment anterior. Els resultats s'han representat amb una gràfica que relaciona el percentatge d'activitat dels gloquidis amb els dies de la prova (Figura 5).

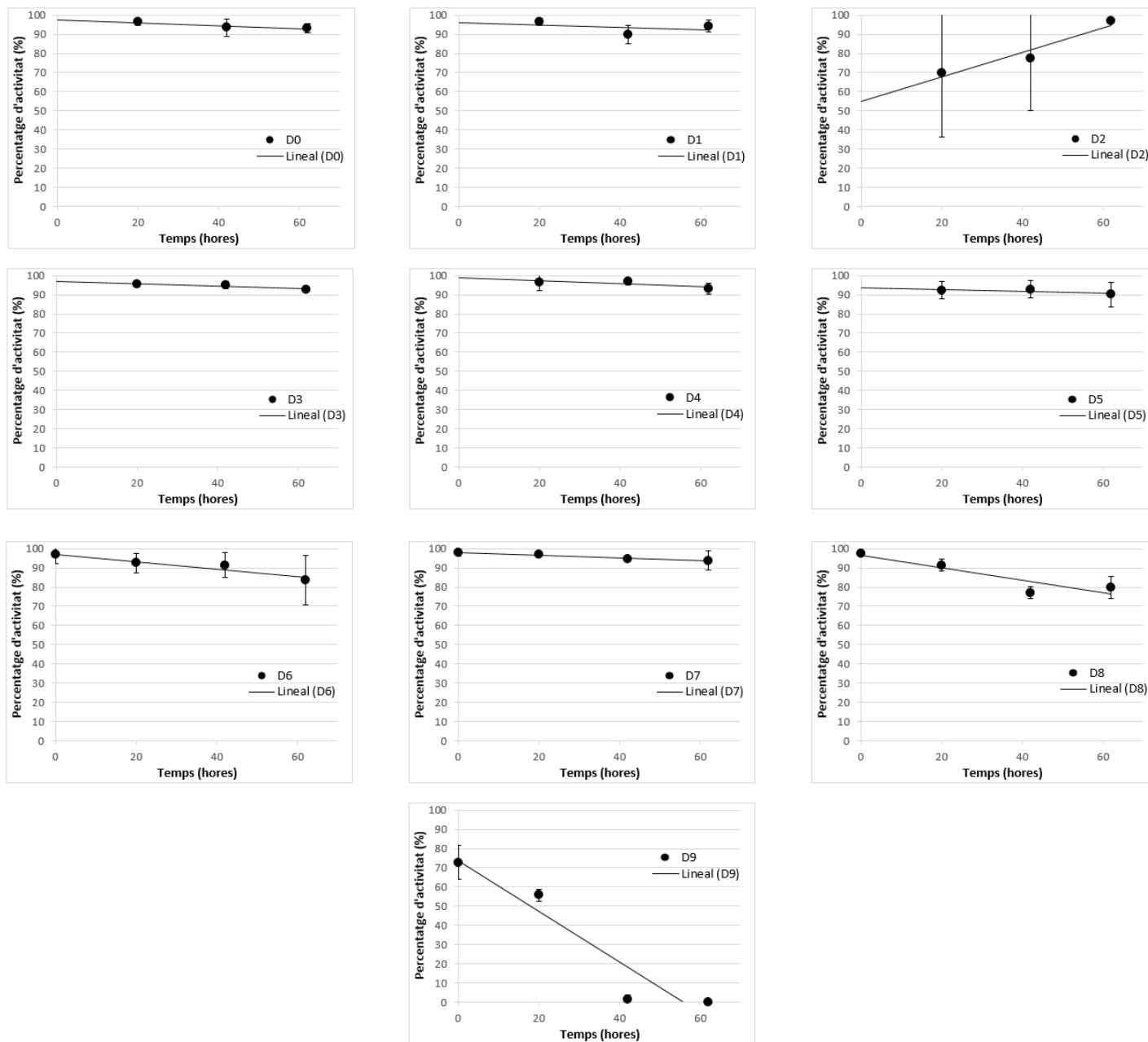


Figura 2. Percentatge d'activitat dels gloquidis al llarg dels diferents temps (0, 20, 43 i 67 hores) un cop se'ls ha aplicat les diferents dosis de verd de malaquita (D0 sense verd de malaquita i de D1 a D9 amb una dosi que augmenta exponencialment). El percentatge d'activitat s'ha calculat amb la mitjana de tres rèpliques i també s'ha calculat la seva desviació estàndard a partir del nombre de rèpliques.

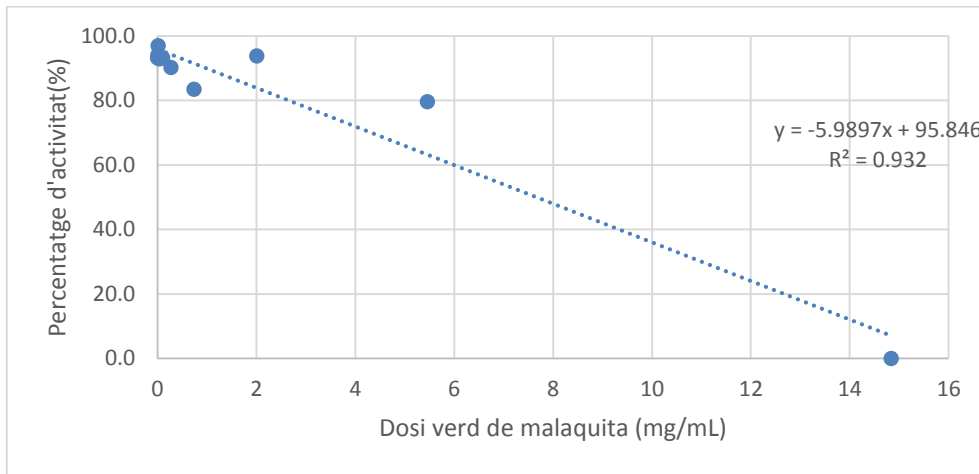


Figura 3. Activitat dels gloquidis a les 67 hores en relació amb la dosi de verd de malaquita aplicada en mg/mL a escala normal. Hi ha representada la recta de regressió amb la seva equació de la recta i el valor de la R^2 .

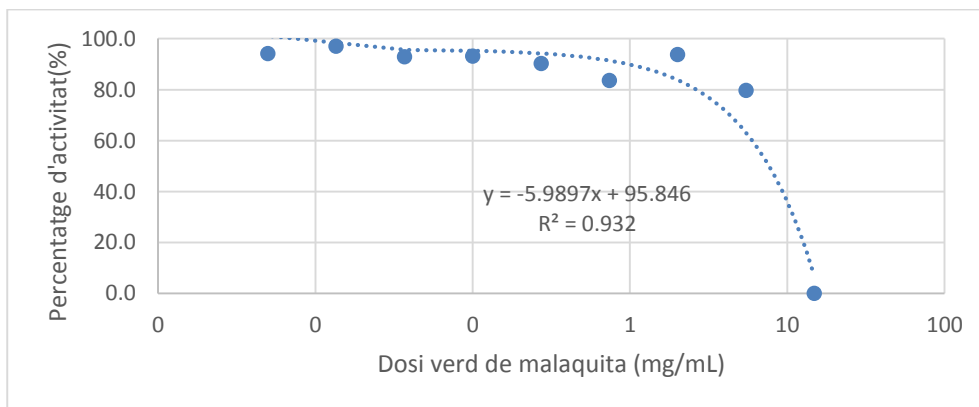


Figura 4. Activitat dels gloquidis a les 67 hores en relació amb la dosi de verd de malaquita aplicada en mg/mL a escala logarítmica. Hi ha representada la recta de regressió amb la dosi de verd de malaquita amb la seva equació de la recta i el valor de la R^2 .

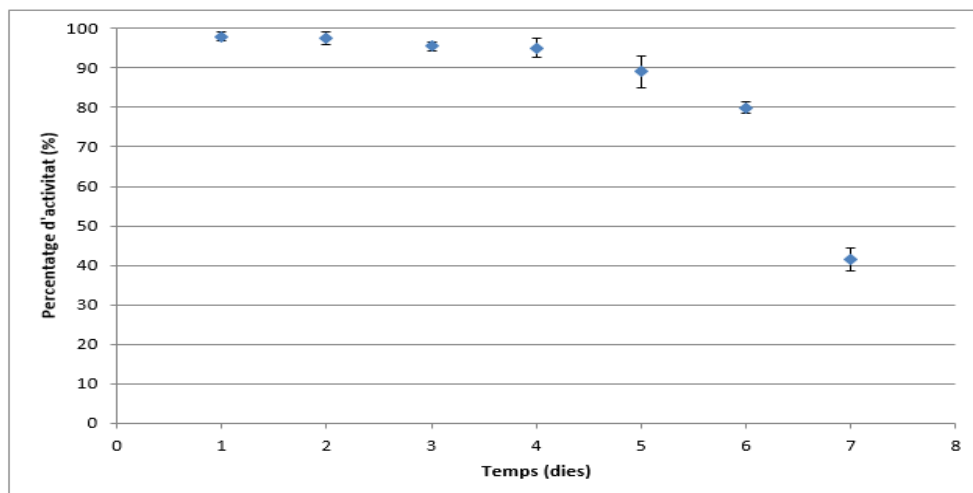


Figura 5. Percentatge d'activitat al llarg dels diferents temps (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 7 dies) sense aplicar cap tractament. El percentatge d'activitat s'ha calculat amb la mitjana de tres rèpliques i també s'ha calculat la seva desviació estàndard a partir del nombre de rèpliques.

4.2. Cultiu in vitro

Es va fer un seguiment de la temperatura a la incubadora durant 100 min (Figura 6), i amb les dades obtingudes es va calcular mitjana, així com el seu valor màxim i mínim, d'on es va extreure que la temperatura de la incubadora era de $22,8 \pm 0,3$ °C. El seguiment de la temperatura dins la incubadora un cop es va posar la safata d'aigua va mostrar que aquesta es mantenia estable a 22,5 °C. Es va fer el mateix pel seguiment del CO₂ a la incubadora amb unes aportacions de CO₂ del 5% i del 2% (Figura 7). Pel 5% de CO₂, al principi hi havia una forta fluctuació i l'estabilització es va produir a partir del minut 30, el temps a partir del qual es va calcular la mitjana i el valor màxim i el mínim que va donar com a resultat un $4,9 \pm 0,3$ % CO₂. Pel que fa al 2% de CO₂, l'estabilització es va produir a partir del minut 40, i la mitjana i el valor màxim i el mínim a partir d'aquest temps va ser de $2,1 \pm 0,2$ % de CO₂.

També es va fer una prova de pH per veure si el pH del medi de cultiu s'estabilitzava amb la incubadora al 5% i al 2% de CO₂, i si el canvi diari del medi del 50% afectava aquesta estabilització. Es van obtenir els valors de tres rèpliques per cada tractament i per cada temps i, per tant, es van obtenir tres valors a partir dels quals es va fer una mitjana i es va calcular la desviació estàndard. Els resultats obtinguts de la prova de pH amb la incubadora al 5% (Figura 8) i al 2% (Figura 9) de CO₂ s'han representat gràficament relacionant el pH amb el temps del cultiu en hores.

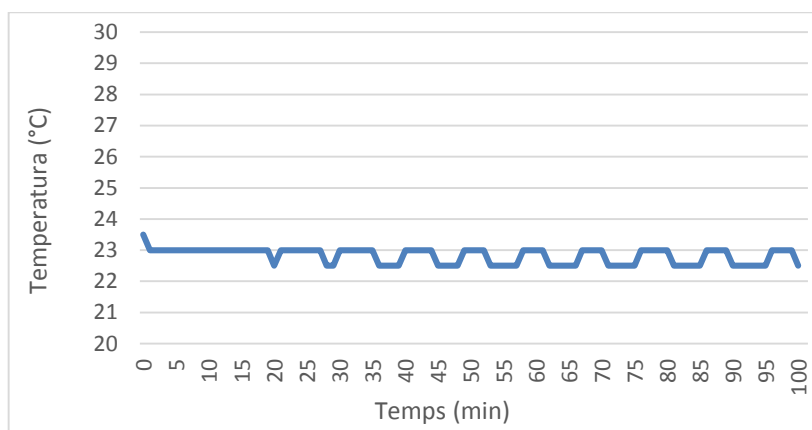


Figura 6. Variació de la temperatura dins la incubadora al llarg de 100 min

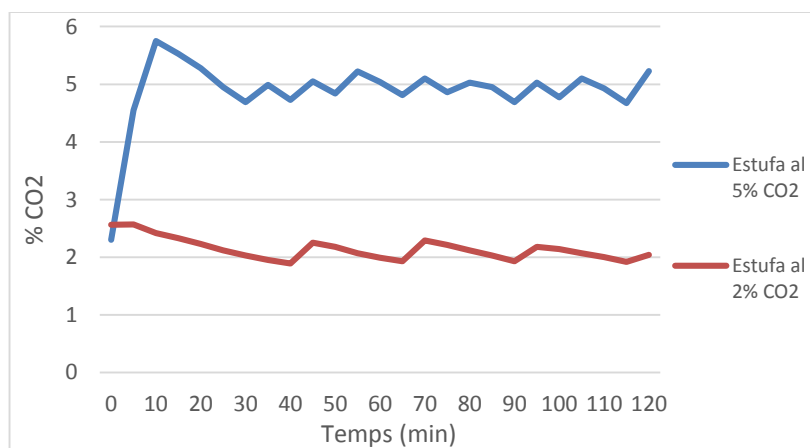


Figura 7. Variació del percentatge de CO₂ dins la incubadora al 5% i al 2% de CO₂ al llarg de 120 min.

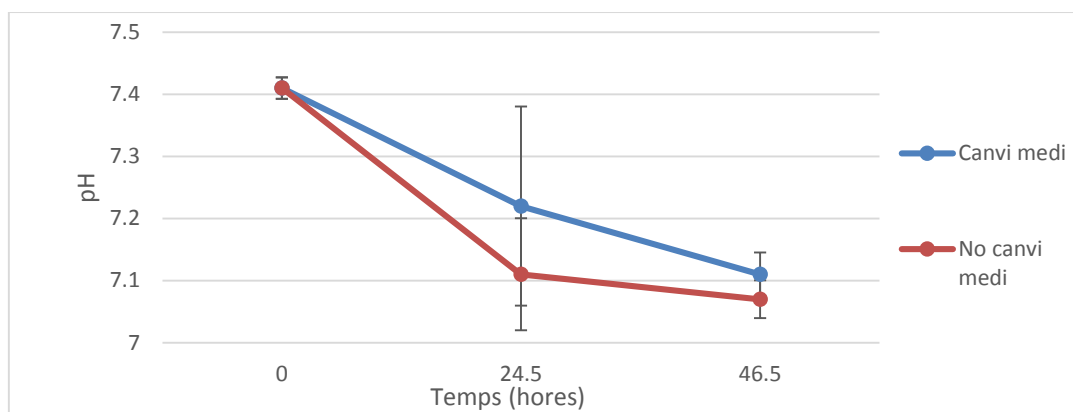


Figura 8. Variació del pH del medi a la incubadora al 5% de CO₂ en funció del temps dels dos tractaments, amb canvi de medi i sense canvi de medi. Per cada mesura de pH es van fer tres rèpliques a partir de les quals es va fer una mitjana i es va calcular la desviació estàndard.

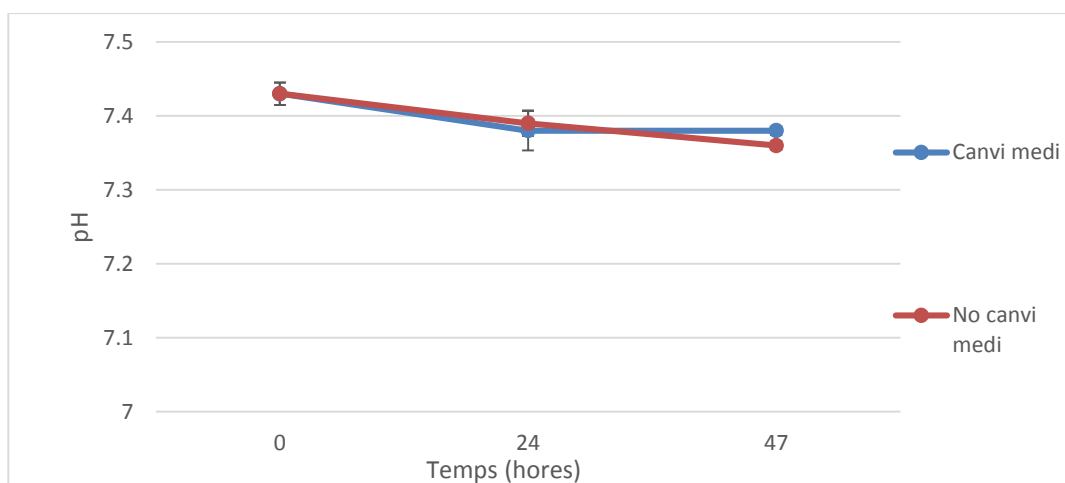


Figura 9. Variació del pH del medi a la incubadora al 2% de CO₂ en funció del temps dels dos tractaments, amb canvi de medi i sense canvi de medi. Per cada mesura de pH es van fer tres rèpliques a partir de les quals es va fer una mitjana i es va calcular la desviació estàndard.

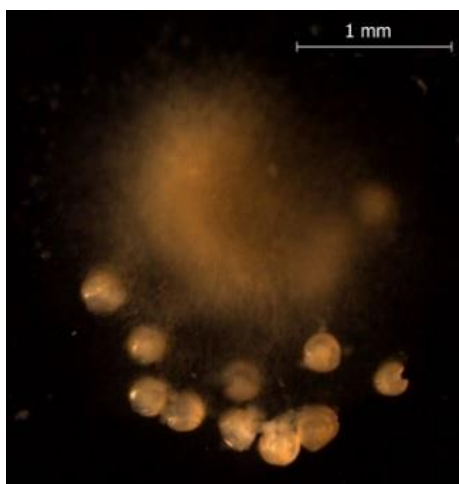


Figura 10. Observació d'un fong amb gloquidis enganxats. Foto feta a 2 augments a la lupa binocular.

En fer el canvi diari de medi, es va observar i anotar si hi havia contaminació fúngica o no a cada vial del cultiu (Figura 10). Amb aquestes dades es va calcular per cada vial de cultiu el número total de dies en què es va observar contaminació, i per tant el número de dies de neteja, i també el màxim grau de contaminació segons els paràmetres avaluats. També es va calcular per cada tractament el número de vials contaminats cada dia del cultiu (Figura 11).

Les mesures de pH del medi de cultiu es van prendre diàriament per cada vial i després es van fer les mitjanes i desviacions estàndard de les mesures del medi de cultiu amb el sèrum de carpa i el sèrum de conill (Figura 12), ja que és el tipus de sèrum el que

pot fer variar el pH del medi (Owen et al., 2010). Les mesures de pH dels tres primers dies van ser errònies i, per tant, no es van tenir en compte, ja que aquestes mesures havien de ser fetes just després del canvi del medi i es van fer una estona després. La mitjana de les mesures del dia 4 al 13 per al sèrum de conill va ser de $7,55 \pm 0,05$ i dels dies 4 al 14 pel sèrum de carpa de $7,52 \pm 0,15$.

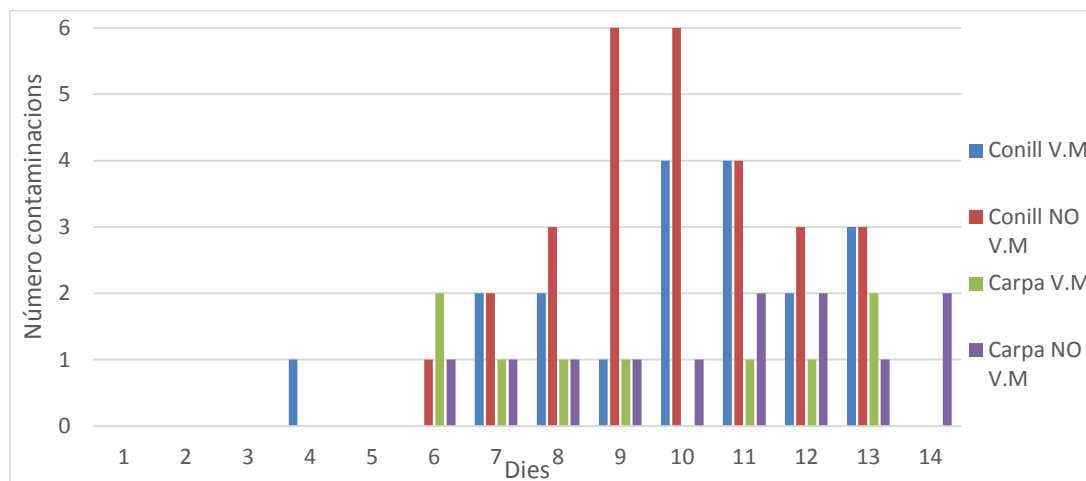


Figura 11. Evolució de la contaminació fúngica pels diferents dies de cultiu in vitro. La contaminació fúngica es va determinar visualment en cada vial del cultiu per la presència de fongs al seu interior. El número de contaminacions és el total de vials de cada tractament (en total 6) on es va observar contaminació fúngica, sense tenir en compte la quantitat d'aquesta.

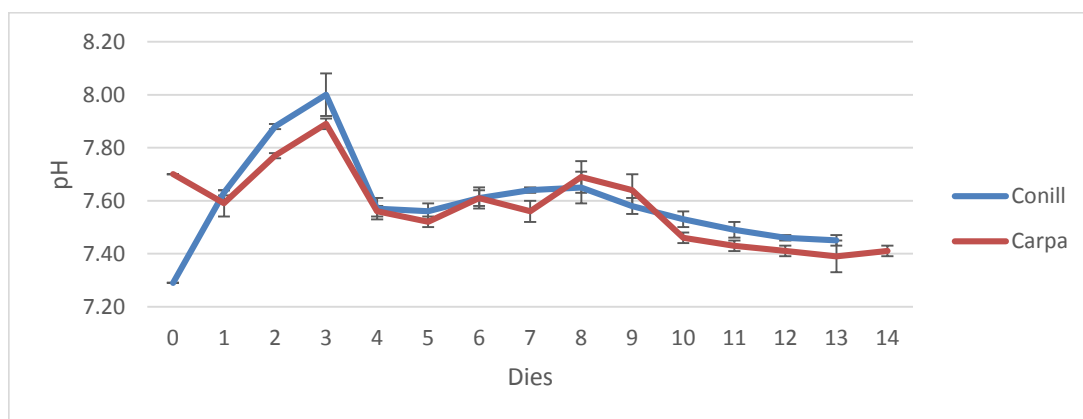


Figura 12. Mesures de pH durant els diferents dies de cultiu. El pH va estar mesurat per cada vial amb el medi de cultiu sobrant del canvi diari. Les dades són la mitjana dels dotze vials per cada tipus de sèrum (carpa i conill). També es van calcular les seves desviacions estàndard.

4.3. Seguiment dels gloquidis

A partir del dia 8 de cultiu in vitro, es van fer observacions al microscopi òptic de diferents vials per tal de fer un seguiment dels gloquidis i detectar el moment en què s'havia de canviar el medi de cultiu per tal d'induir la metamorfosi. Les observacions fetes durant els diferents dies es poden veure resumides a la Taula 1. A més, les observacions fetes amb el microscopi òptic van ser fotografiades per tal de poder veure i comparar el procés de metamorfosi dels juvenils al llarg dels dies de cultiu (Làmina 2).

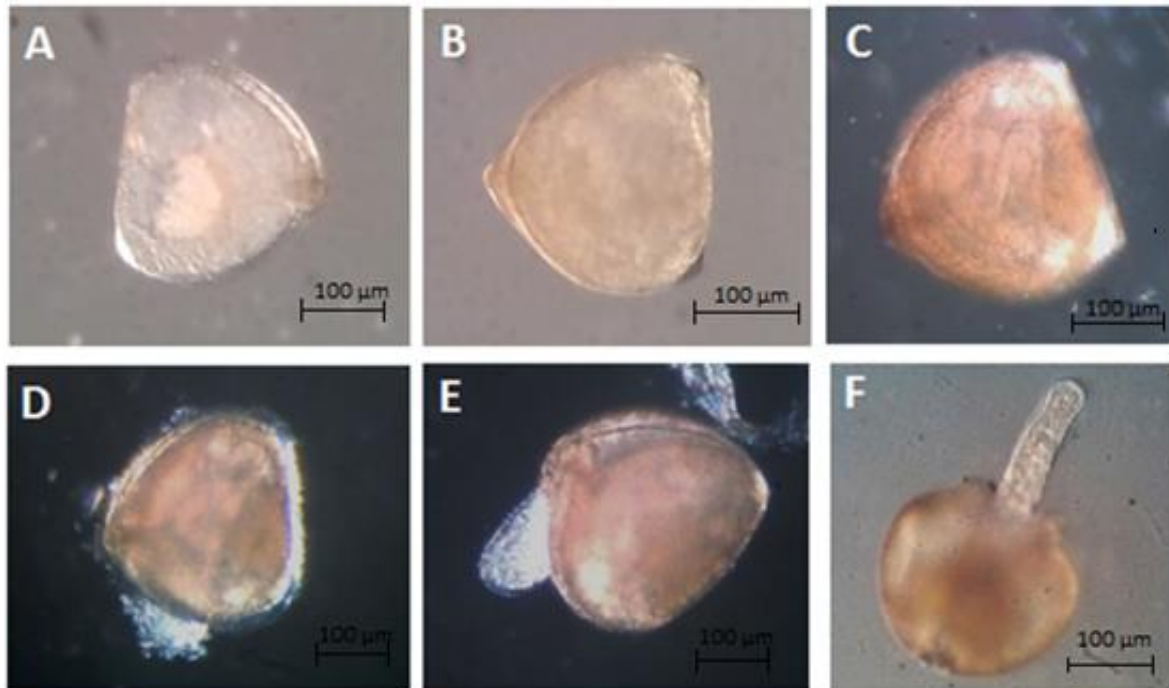
Taula 1. Observacions morfològiques dels gloquidis fetes durant diferents dies del cultiu in vitro. Cada dia d'observació es va escollir una rèplica a l'atzar de cada tipus de tractament de la qual es van extreure gloquidis per fer les observacions al microscopi òptic. El "si" mostra la presència d'una característica a tots els individus observats i el "no", l'absència de la característica a tots els individus observats. Els percentatges es van calcular amb la proporció d'individus que mostraven o no la característica sobre el total d'individus observats.

Carpa

OBSERVACIONS	Dia 0	Dia 8	Dia 10	Dia 12	Dia 13
Coloració	blanca, transparent	bruna clara	bruna	bruna fosca	bruna fosca
Forma	triangular	lleugerament arrodonida	arrodonida	arrodonida	arrodonida
Interior	homogeni	75% glomerular, 25% homogeni	75% glomerular, 25% homogeni	compartimentat	compartimentat
Marge closca	no marge	poc engruixit	engruixit	17% molt engruixit, 83% engruixit	25% molt engruixit, 75% engruixit
Muscles	un central	no	no	no	25% no, 75% si, dos laterals
Brànquies	no	no	25% si	si	si
Cilis	no	no	25% si	si	si
Mantell	no	no	no	no	no
Peu	no	no	no	no	no

Conill

OBSERVACIONS	Dia 0	Dia 8	Dia 10	Dia 12	Dia 13
Coloració	blanca, transparent	bruna clara	bruna	bruna fosca	bruna fosca
Forma	triangular	lleugerament arrodonida	arrodonida	arrodonida	arrodonida
Interior	homogeni	glomerular	50% homogeni, 50% glomerular	compartimentat	compartimentat
Marge closca	no marge	poc engruixit	50% poc engruixit, 50% engruixit	molt engruixit	molt engruixit
Muscles	un central	no	no	no	no
Brànquies	no	no	no	si	si
Cilis	no	no	no	si	si
Mantell	no	no	no	no	no
Peu	no	no	no	66% si	si



Làmina 2. Observació al microscopi òptic a 50 augments del procés de metamorfosi dels gloquidis a juvenils durant diferents dies del cultiu in vitro: A (dia 0, gloquidi), B (dia 8), C (dia 10), D (dia 12), E (dia 13) i F (dia del comptatge, juvenil).

4.4. Èxit de la metamorfosi

Un cop fet el canvi de medi per induir la metamorfosi, es van observar els juvenils a la lupa binocular i es va fer un recompte dels juvenils actius (gloquidis transformats amb èxit), els juvenils no actius (indeterminat) i els morts (gloquidis no transformats). Es va fer el recompte i, amb els resultats obtinguts, es van fer els càlculs de l'èxit de metamorfosi 1 i 2. Aquests càlculs es van fer per cada vial, i es va calcular la mitjana de les sis rèpliques de cadascun dels quatre tractament amb les seves desviacions estàndard. Amb les dades obtingudes del recompte del primer dia i de l'últim dia de cultiu i amb els càlculs d'èxit de metamorfosi, es van obtenir els resultats següents (Taula 2 i Figura 13).

Taula 2. Recompte del número inicial de gloquidis el primer dia de cultiu, recompte del nombre de juvenils actius, morts i no actius l'últim dia de cultiu i total d'individus l'últim dia de cultiu. Càlculs de l'èxit de metamorfosi 1 i 2 en tant per cent. Aquests valors han estat s'han calculat per cada tipus de tractament.

Tractament	Núm inicial	Actius final	Morts final	No actius final	Perduts contaminació	Total final	Èxit metamorfosi 1	Èxit metamorfosi 2
Carpa sense V.M	1334	973	129	104	128	1206	80,50	73,21
Conill sense V.M	1418	745	70	0	144	815	92,67	51,79
Carpa amb V.M	1271	920	87	120	565	1127	74,13	71,77
Conill amb V.M	1324	571	281	161	311	1013	57,40	42,57

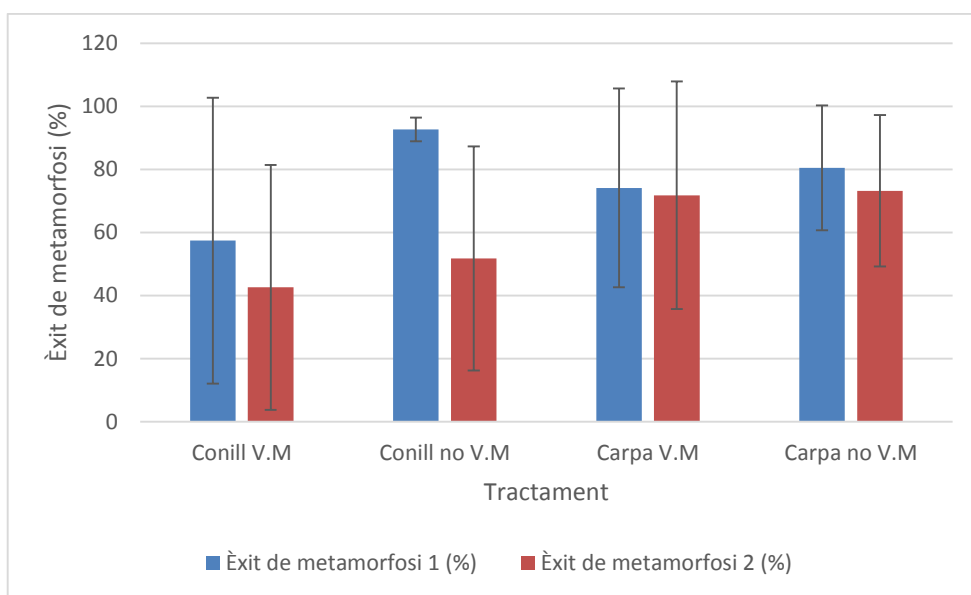


Figura 13. Èxit de metamorfosi 1 i 2 en tant per cent dels diferents tractaments del cultiu in vitro amb les desviacions estàndards corresponents a les mitjanes de cadascuna de les sis rèpliques per tractament.

En relació a l'anàlisi estadístic, s'ha fet una ANCOVA per cadascuna de les dues variables (èxit de metamorfosi 1 i 2) relacionant-les amb els tres factors i la covariable. Un cop feta una primera anàlisi, s'han tret les interaccions no significatives, que són les tres interaccions del tipus de tractament. Un cop tretes aquestes interaccions, s'ha fet l'anàlisi estadística. Els resultats obtinguts es mostren a les Taules 3 i 4.

Taula 3. Resultats del test estadístic ANCOVA que relaciona tres factors (tractament, sèrum i infecció màxima) i una covariable (dies de neteja) amb la variable èxit metamorfosi 1. *** = $p < 0.001$ (molt significatiu), ** = $p < 0.05$ (significatiu), * = $p < 0.1$ (lleugerament significatiu) i ns = $p > 0.1$ (no significatiu).

Variable dependent: Exitmeta1_T					
Font	Suma de quadrats tipus III	gl	F	Significació	
Model corregit	156,282979	9	7,859814789	0,0004	
Intersecció	79,91713703	1	36,17287753	0	
Tractament	2,075190561	1	0,939293083	0,3489	ns
Sèrum	60,20470967	1	27,25044553	0,0001	***
Infecció_max	31,36487402	2	7,098338284	0,0074	*
Dies_neteja_T	3,087609404	1	1,397544018	0,2568	ns
Sèrum * Infec_max	26,07404008	2	5,900943737	0,0138	ns
Sèrum * Dies_netej_T	48,14091903	1	21,79001442	0,0004	***
Infec_max * Dies_netej_T	27,91064447	1	12,63318935	0,0032	**
Error	30,93035431	14			
Total	1827,32	24			
Total corregida	187,2133333	23			
a	R quadrat = ,835 (R quadrat corregida = ,729)				

Taula 4. Resultats del test estadístic ANCOVA que relaciona tres factors (tractament, sèrum i infecció màxima) i una covariable (dies de neteja) amb la variable èxit metamorfosi 2. *** = $p < 0.001$ (molt significatiu), ** = $p < 0.05$ (significatiu), * = $p < 0.1$ (lleugerament significatiu) i ns = $p > 0.1$ (no significatiu).

Variable dependent: Exitmeta2_T					
Font	Suma de quadrats tipus III	gl	F	Significació	
Model corregit	174,0665647	9	5,929261466	0,001689715	
Intersecció	134,2822692	1	41,16673511	1,61E-05	
Tractament	0,028653829	1	0,008784366	0,926655784	ns
Sèrum	77,06770236	1	23,62654211	0,000252152	***
Infecció_max	71,1195936	2	10,9015192	0,001397839	**
Dies_neteja_T	32,03648078	1	9,821380932	0,007322114	**
Sèrum * Infec_max	35,60500916	2	5,457689944	0,017685757	**
Sèrum * Dies_netej_T	65,73899463	1	20,15351538	0,000509556	***
Infec_max * Dies_netej_T	56,91100031	1	17,44712901	0,000931333	***
Error	45,66676867	14			
Total	1435,26	24			
Total corregida	219,7333333	23			
a	R quadrat = ,792 (R quadrat corregida = ,659)				

Els resultats obtinguts de l'èxit de metamorfosi 1 indiquen que el tipus de tractament i els dies de neteja tenen un valor de $p > 0,1$ i per tant, no són significatius, cosa que mostra que tant el tipus de tractament com els dies de neteja no tenen relació amb l'èxit de metamorfosi 1 dels individus. La infecció màxima té un valor de $p=0,0074$ ($<0,1$) i per tant, és lleugerament

significatiu, cosa que mostra que hi ha una relació entre la infecció màxima i l'èxit de metamorfosi 1, però que aquesta relació és baixa. Les mitjanes d'infecció màxima indiquen que aquesta relació és positiva, és a dir, a major nombre d'infecció major és l'èxit de metamorfosi. Pel que fa al sèrum, té un valor de $p=0,0001$ ($<0,001$), cosa que indica que és molt significatiu, és a dir, hi ha una clara relació entre el tipus de sèrum i l'èxit de metamorfosi 1, i és positiva, hi ha un major èxit de metamorfosi 1 amb el sèrum de carpa i aquesta és menor amb el de conill.

Els resultats obtinguts de l'èxit de metamorfosi 2 indiquen que el tipus de tractament té un valor de $p > 0,1$, i per tant no és significatiu, cosa que mostra que el tipus de tractament no té relació amb l'èxit de metamorfosi 2 dels individus. La infecció màxima té un valor de $p=0,0013$ i els dies de neteja de $p=0,0073$, els dos amb un valor de $p < 0,005$, cosa que mostra que hi ha diferències significatives. Observant les mitjanes, es pot dir que hi ha una relació entre l'èxit de metamorfosi 2 i la infecció màxima i que aquesta és negativa, a major èxit de metamorfosi menor infecció màxima. Entre l'èxit de metamorfosi 2 i els dies de neteja també hi ha una relació i aquesta també és negativa, a més dies de neteja menor és l'èxit de metamorfosi 2. Finalment, el sèrum té un valor de $p=0,0002$ ($<0,001$), cosa que indica que hi ha diferències molt significatives, i per tant, que hi ha una relació molt clara entre el tipus de sèrum i l'èxit de metamorfosi 2. Les mitjanes mostren que l'èxit de metamorfosi 2 és major amb el sèrum de carpa que amb el de conill.

5. DISCUSSIÓ

5.1. Experiment amb verd de malaquita

L'experiment per calcular la dosi de verd de malaquita per aplicar als gloquidis (Figura 2) ha mostrat que de la dosi 1 a la dosi 7, l'activitat dels gloquidis segueix aproximadament el mateix patró que la dosi 0 (sense aplicar verd de malaquita). En aquests tractaments l'activitat dels gloquidis disminueix de manera molt poc accentuada al llarg dels tres dies, mostrant que aquestes dosis de verd de malaquita no tenen efectes negatius sobre els gloquidis, ja que sobreviuen i mantenen la seva activitat. A la dosi 2 es veu un patró contrari, ja que l'activitat augmenta però ho podem explicar per una dada atípica en una de les tres rèpliques, ja que la desviació estàndard és molt elevada. A partir de la dosi 8, s'observa una clara disminució de l'activitat dels gloquidis al llarg del temps, i aquesta disminució és molt més accentuada en la dosi 9, arribant a una activitat zero al segon dia. Això vol dir que, a partir de la dosi 8, el verd de malaquita té un efecte negatiu sobre els gloquidis, disminuint la seva activitat i causant la seva mort. Relacionant l'activitat dels gloquidis al tercer dia amb dosi de verd de malaquita (Figures 3 i 4) i amb el valor de $p=6,05E-06$ ($p < 0,001$) s'ha vist que el pendent de la recta és molt significatiu, i per tant, hi ha una relació clara entre la dosi de verd de malaquita i el percentatge d'activitat dels gloquidis al tercer dia, essent aquesta relació negativa, a major dosi de verd de malaquita menor és el percentatge d'activitat dels gloquidis al tercer dia. A més, les figures ens mostren que les dosis de verd de malaquita menors de 1 mg/mL permeten la supervivència i activitat dels gloquidis fins al tercer dia, mentre que a partir d'aquesta dosi la supervivència i activitat dels gloquidis disminueix dràsticament. Per tot això, es dedueix que la dosi adequada per aplicar al tractament de verd de malaquita és la dosi 4 (0,1 mg/ml), ja que és una dosi intermèdia dins les dosis que no causen alteracions als gloquidis, es troba per sota

de la dosi que els causa la mort i és pròxima a la dosi que els tècnics del Consorci de l'Estany apliquen als peixos quan pateixen malalties causades per fongs. Aquesta dosi s'aplicarà a la meitat dels gloquidis del cultiu in vitro, fent una neteja prèvia utilitzant la mateixa metodologia que en aquesta prova.

L'experiment per calcular la supervivència dels gloquidis al llarg dels dies sense aplicar cap tractament (Figura 5) ha permès observar que l'activitat dels gloquidis no varia fins al quart dia, mostrant que durant aquests quatre primers dies els gloquidis són completament actius. A partir del quart dia es veu una disminució pronunciada de la seva activitat, mostrant que a partir d'aquest dia la seva mortalitat augmenta i, per tant, no són adients per la seva infecció en peixos ni per al seu cultiu in vitro.

5.2. Cultiu in vitro

S'ha vist que el valor de la temperatura es mantenia al voltant del valor utilitzat per Owen et al., 2010 de 23 °C (Figura 6). Sense la safata d'aigua, la temperatura patia petites variacions i, en canvi, amb la safata d'aigua es mantenia estable a 22,5 °C, ja que l'aigua fa de tampó dins la incubadora i estabilitza la temperatura, evitant variacions. Per tant, es va decidir fer el cultiu a 22,5 °C amb la safata d'aigua a dins la incubadora, ja que es va considerar que és millor per al cultiu que no hi hagi variacions de temperatura. Pel que fa a l'aportació de CO₂ a la incubadora, es va veure que tan al 5% com al 2% de CO₂ els valors es mantien bastant constants, fent petites variacions. També es va veure que quan s'obria la incubadora el CO₂ disminuïa dràsticament, i al tornar-la a tancar tardava un temps de 30-40 minuts a tornar-se a estabilitzar al voltant dels valors desitjats (Figura 7).

Amb les dades obtingudes de la prova de pH a la incubadora (Figura 8 i 9) es va veure que al 5% de CO₂ el pH tenia una variació al llarg dels dies, es va acidificar. També es va veure que l'acidificació va ser més accentuada en els vials en què no es canviava el medi diàriament, pel que es pot dir que el canvi diari del 50% del medi de cultiu ajuda a l'estabilització del pH. Per altre banda, amb la incubadora al 2% de CO₂ es va veure que el pH era molt més estable, i que gairebé no patia variacions al llarg dels dos dies tan pels vials amb canvi de medi com pels sense canvi. Per tant, davant l'impossibilitat de fer dos cultius diferents amb diferents aportacions de CO₂ per cada tipus de sèrum com fa Owen et al., 2012, es va decidir fer tot el cultiu in vitro a la incubadora amb una aportació del 2% de CO₂ ja que aquest permetia que el pH s'estabilitzés al llarg dels dos dies i es mantingués dintre dels valors desitjats. A més, el canvi diari del medi de cultiu afavorirà aquesta estabilització del pH.

Pel que fa a la contaminació fúngica (Figura 11), es va veure que a partir del quart dia va aparèixer contaminació en alguns vials, i que va anar augmentant de quantitat dins els vials i també en el nombre de vials on s'observava contaminació. El màxim de contaminació, tant en quantitat com en nombre de vials contaminats va ser entre els dies 9 i 10, i llavors va disminuir lleugerament en els últims dies de cultiu. L'extracció de la contaminació feia que aquesta disminuís o no augmentés al llarg dels dies, però en la majoria dels casos no l'eliminava completament, ja que tornava a aparèixer. A més, amb les extraccions de contaminació també s'extreien gloquidis, ja que aquests quedaven enganxats als fongs. Malgrat això, amb les observacions fetes a la lupa (Figura 10) es va veure que la presència de fongs no afectava l'èxit de metamorfosi dels gloquidis, ja que no tenia un efecte negatiu sobre el seu correcte

desenvolupament o la seva activitat o, però sí tenia un efecte negatiu ja que causava una pèrdua de gloquidis del medi de cultiu per la seva extracció accidental amb els fongs. Tot i així, és necessària l'extracció de la contaminació quan s'observa, ja que si no, aquesta aniria augmentant fins a fer inviable la mostra. Malgrat la contaminació durant els diferents dies de cultiu, cap vial va arribar al nivell de màxima contaminació i, a partir dels dies de màxima contaminació, aquesta es va estabilitzar o fins i tot va disminuir. Per tant, es pot dir que la barreja d'antibiòtics i de l'antifúngic juntament amb el canvi diari del medi i l'extracció de la contaminació permet un control dels creixements fúngics, evitant arribar a uns nivells de contaminació màxima. També podem veure que el medi amb sèrum de conill pateix més contaminació que el de carpa, però això serà comprovat estadísticament.

Pel que fa al seguiment del pH dins el medi de cultiu (Figura 12), només es va tenir en compte el pH dels dies 4 al 14, ja que els tres primers dies es van fer errors en la mesura del pH perquè es va mesurar al final de fer tots els canvis de medi, provocant que al deixar-se molta estona a l'aire lliure es basifiqués. Per tant, només es té en compte les mesures dels dies 4 al 13 per al sèrum de conill i 4 al 14 per al de carpa, ja que es van cultivar els vials amb sèrum de carpa un dia més que els de conill. La mitjana de les mesures per al sèrum de conill és de $7,55 \pm 0,05$ i per al sèrum de carpa de $7,52 \pm 0,15$, cosa que mostra que el pH està molt proper a l'interval de pH ideal de 7,3-7,4 descrit per Owen et al., 2010. També es pot dir que les variacions de pH durant els diferents dies de cultiu per als dos tipus de sèrum són força baixos. Això ens mostra que l'aportació de CO₂ del 2% a la incubadora i el canvi diari de medi permet l'estabilització del pH, ja que aquest no pateix grans fluctuacions. A més, aquesta aportació de CO₂ és adient tan pel sèrum de conill com pel de carpa, ja que el pH dels medis amb els dos tipus de sèrum és similar i no pateixen grans variacions. Per tant, no hi ha cap necessitat de cultivar els medis amb els dos tipus de sèrum en diferents aportacions de CO₂ a la incubadora.

5.3. Seguiment dels gloquidis

Es va fer un seguiment al microscopi òptic de la metamorfosi dels gloquidis durant els diferents dies de cultiu (Taula 1 i Làmina 2). Els gloquidis del dia 0 tenien una coloració blanca gairebé transparent, una forma triangular, un interior homogeni i es podia observar un múscle a la part central. Llavors es van deixar 8 dies al medi de cultiu i es van tornar a observar. El dia 8 del cultiu, els gloquidis es veien força diferents als del primer dia, ja que tenien una coloració bruna clara, una forma lleugerament arrodonida i es podia observar que el marge de la closca estava una mica engruixit. A més, l'interior d'alguns dels gloquidis es veia homogeni, però en la majoria es veia glomerular, amb uns petits punts, cosa que podria indicar el desenvolupament d'algunes estructures internes. Aquestes diferències morfològiques indicaven que els gloquidis havien evolucionat durant els primers vuit dies de cultiu, però que encara no mostraven cap senyal que indiqués l'inici de la metamorfosi. El dia 10 de cultiu, es va fer una altra observació dels gloquidis i es va veure que tenien una coloració bruna, una forma arrodonida, el marge estava engruixit i l'interior seguia sent homogeni en alguns individus i glomerular en la majoria. Les tres primeres característiques indicaven que l'evolució dels gloquidis cap a juvenils seguia, ja que aquests caràcters eren més evidents que en l'observació del dia 8. A més, en alguns individus del medi amb sèrum de carpa també es van observar brànquies a l'interior dels gloquidis, que es detectaven perquè s'observaven tres ratlles paral·leles i un cert moviment cilial. La presència de brànquies i cilis indica el primer pas de la metamorfosi cap a juvenils. El

dia 12 d'observació, la coloració era bruna fosca, la forma arrodonida, l'interior compartimentat (es veien estructures internes dins la closca) i el marge de la closca molt engruixit en la majoria dels individus. En tots els individus es va observar la presència de brànquies i de cilis i, a més, en alguns individus del sèrum de conill es va observar el peu dels individus, que era un peu poc definit i amb moviments ciliars. L'observació del peu és un dels caràcters més clars de l'inici de la metamorfosi de gloquidis a juvenils, i marca el moment en què els individus han de ser canviats de medi per induir aquesta metamorfosi. Malgrat això, es va decidir esperar un dia més, ja que els individus que presentaven el peu eren pocs. El dia 13 d'observació es va veure que la coloració era bruna fosca, la forma arrodonida, l'interior compartimentat i el marge molt engruixit. També es van observar dos múscles laterals en alguns individus. En els individus de sèrum de carpa es van observar les brànquies i els cilis, i en cap es va observar el peu. En canvi, en tots els individus del medi amb sèrum de conill es van observar brànquies, cilis i el peu. Per tant, es va decidir que tots els individus del medi amb sèrum de conill estaven llestos per al canvi de medi, ja que tots presentaven el peu; en canvi, es va esperar un dia més per induir la metamorfosi als individus del medi amb sèrum de carpa, ja que no presentaven el peu. A més d'aquestes observacions, també es va observar un juvenil el dia del comptatge i es va veure que eren molt actius, la seva coloració era bruna fosca, la forma arrodonida, l'interior compartimentat i que el peu es veia definit i amb cilis a tot el seu voltant.

Per tant, es pot dir que a mida que passen els dies de cultiu, la coloració dels gloquidis es va tornant més bruna, la forma es va arrodonint, el marge de la closca es va engruixint i l'interior passa de ser homogeni a glomerular, la qual cosa indica una formació d'estructures internes, i llavors passa a compartimentat. A més, a partir del dia 10 apareixen les brànquies i els seus cilis, i a partir del dia 12 en medi amb sèrum de conill apareix el peu que es va definint a mida que passen els dies. Per tant, es pot dir que la metamorfosi de gloquidis en juvenils de l'espècie *Unio mancus* tarda 13 dies a una temperatura de 22,5 °C, uns 292,5 °C /dia. Aquest temps és menor en medi amb sèrum de conill que de carpa, ja que la metamorfosi es va produir un dia abans.

5.4. Èxit de la metamorfosi

Amb els resultats obtinguts (Taula 2 i Figura 13) podem veure que l'èxit de metamorfosi 1 per tots els tractaments és major que la èxit de metamorfosi 2. Això és així ja que l'èxit de metamorfosi 1 no té en compte els individus extrets accidentalment del medi durant el cultiu per l'extracció de fongs, ni l'extracció d'individus per l'observació al microscopi. Per tant, la diferència entre l'èxit de metamorfosi 1 i 2 ens mostra els individus extrets accidentalment durant el cultiu per extracció de fongs. A més, també es veu que hi ha un major nombre de juvenils actius finals, i per tant, una major èxit de metamorfosi 1 i 2 en el medi amb sèrum de carpa, i no es veu una diferència entre el tractament de verd de malaquita i sense. Malgrat això, s'analitzaran aquestes dades estadísticament per comprovar si hi ha diferències significatives d'èxit de metamorfosi en els diferents tractaments. També cal dir que hi ha una gran desviació estàndard en l'èxit de metamorfosi de tots els tractaments, cosa que indica que hi ha una gran variació entre les rèpliques, a més d'haver-hi valors estranys en alguna rèplica, com per exemple en el tractament de conill amb verd de malaquita on hi havia dues rèpliques on no hi havia cap individu juvenil actiu. Es va suposar que aquests valors eren causats per errors en la metodologia o en la manipulació de les rèpliques.

Si ens fixem en el nombre total d'individus, podem veure que el primer dia es van seleccionar un total de 5.347 gloquidis que van ser transferits al medi de cultiu, i d'aquests 1.148 van ser perduts durant el cultiu per l'extracció de la contaminació fúngica. Un cop induïda la metamorfosi, vam obtenir un total de 3.209 juvenils. Podem dir que aquest nombre és relativament elevat tenint en compte el total de gloquidis a l'inici de l'experiment, però malgrat això el principal motiu de pèrdua d'individus és l'extracció fúngica, ja que el nombre d'individus perduts per aquest motiu és més elevat que el nombre d'individus morts durant el cultiu. També caldria determinar si els individus no actius són gloquidis no metamorfitzats, gloquidis morts o juvenils, i si aquests són vius. Cal dir que a partir d'aquest punt, s'hauria de fer un seguiment dels juvenils sembrats per cada tractament, per veure la supervivència i el creixement d'aquests, i comparar-la entre els diferents tractaments utilitzats. També seria molt interessant comparar la supervivència i creixement d'aquests juvenils cultivats *in vitro* amb els juvenils cultivats *in vivo*, per veure si hi ha diferències entre els dos mètodes.

Utilitzant el programa informàtic SPSS Statistics, es van fer dues anàlisis de covariància o ANCOVA. En el primer es va estudiar la relació entre els tres factors (tractament, sèrum i infecció màxima) i la covariable (dies de neteja) amb la variable èxit de metamorfosi 1. Aquest estudi va mostrar que el tipus de tractament i els dies de neteja no són significatius en relació a l'èxit de metamorfosi 1. Pel que fa als dies de neteja, és lògic que no tingui relació amb l'èxit de metamorfosi 1, ja que aquesta està calculada a partir del total d'individus l'últim dia de cultiu, i per tant no té en compte els individus perduts durant la neteja per contaminació dels vials de cultiu. Pel que fa al tipus de tractament, no hi ha diferències significatives, és a dir, no hi ha relació entre el tipus de tractament i l'èxit de metamorfosi 1, i per tant podem dir que la neteja prèvia dels gloquidis amb verd de malaquita no afecta el seu èxit de metamorfosi. La infecció màxima en relació a l'èxit de metamorfosi 1 és lleugerament significatiu, la qual cosa mostra una relació i aquesta és positiva, és a dir, a major infecció major és l'èxit de metamorfosi. Aquests resultats són contraris als supòsits inicials que es tenien, ja que es creia que a major infecció menor seria l'èxit de metamorfosi. Tal com s'ha vist en les observacions a la lupa, però, els fongs no maten els individus, ja que aquests eren vius i actius, sinó que provoquen pèrdues d'individus per culpa de l'extracció d'aquests fongs. Per tant, una possible explicació dels resultats és que la contaminació fúngica és provocada pels individus morts, i aquests individus morts són extrets al extreure la contaminació. Així doncs, a major contaminació (i per tant, neteja), major serà l'èxit de metamorfosi, ja que s'extreuen els individus morts enganxats als fongs que són els causants de la contaminació. Per acabar, si s'observa la relació entre el sèrum i l'èxit de metamorfosi 1 es veu que és molt significativa, cosa que mostra que tenen una relació clara. Observant les mitjanes, es veu que l'èxit de metamorfosi 1 del medi amb sèrum de carpa és major que la del medi amb sèrum de conill, cosa que concorda amb els resultats obtinguts per Owen et al., 2010. Una possible explicació del resultat és que la carpa és un peix, igual que els hostes naturals dels gloquidis d'*Unio mancus*, i en canvi el conill és un mamífer, cosa que podria fer pensar que el sèrum de carpa té una composició més similar a l'hoste natural i, per tant, més adequada per als requeriments nutricionals dels gloquidis d'aquesta espècie.

La segon anàlisi estadística va estudiar la relació entre els tres factors (tractament, sèrum i infecció màxima) i la covariable (dies de neteja) amb la variable èxit de metamorfosi 2. Aquesta anàlisi va mostrar que el tipus de tractament no és significatiu i, per tant, que la neteja prèvia

dels gloquidis amb verd de malaquita no té efecte sobre l'èxit de metamorfosi 2 dels gloquidis. La infecció màxima i els dies de neteja tenen una relació significativa amb l'èxit de metamorfosi 2 i en les dues és negativa, a major infecció màxima i dies de neteja menor èxit de metamorfosi. Això s'explica perquè, a diferència de l'èxit de metamorfosi 1, l'èxit de metamorfosi 2 té en compte el nombre d'individus extrets per la neteja de la contaminació fúngica durant els dies de cultiu. Per tant, a més dies de neteja per contaminació i a major infecció màxima, major ha estat la pèrdua de gloquidis del cultiu per extracció accidental durant la neteja i menor l'èxit de metamorfosi 2. Per últim, el tipus de sèrum, igual que en l'èxit de metamorfosi 1, és molt significatiu en relació a l'èxit de metamorfosi 2, cosa que indica que hi ha una clara relació entre el tipus de sèrum i l'èxit de metamorfosi, essent aquesta major amb el medi amb sèrum de carpa que de conill.

6. CONCLUSIONS

- This study has proved that the *in vitro* method to culture glochidia from species *Unio mancus* is effective, because glochidia have been able to undergo their metamorphosis into juveniles and their metamorphosis success was relatively high. Hence, and given the fact that it is the first time that glochidia from species *Unio mancus* metamorphose into juveniles in an *in vitro* culture, it can be concluded that the experiment was a success.
- This study has proved that carp serum is better for the culture medium rather than rabbit serum, because individuals cultured with carp serum have had a higher metamorphosis success of juveniles, and the medium was less contaminated. Therefore, subsequent *in vitro* cultures should use a medium with carp serum.
- This study has also proved that a previous glochidia cleaning with malachite green has no effect on the metamorphosis success, and it does not prevent fungal contamination of the culture medium either. Subsequent studies should determine some improvements of the method to control such contamination, for example, employing a daily dose of malachite green to the culture medium and observe if it prevents fungal contamination.
- During the culture, some fungal has appeared, which has caused a small loss of individuals. The cleaning of such contamination causes a loss of individuals in the culture medium, which affects the metamorphosis success. Still, this contamination has been controlled, so the mixture of antibiotics and antifungal, the change of the medium and the daily removal of the fungus allows controlling this contamination.
- It can be stated that glochidia from the species *Unio mancus* undergo their metamorphosis into juveniles in 13 days at 22,5 °C or 292,5 °C/day.
- In addition, juveniles should be tracked to observe if their growth and survival rate are equal in all treatments, as *in vivo* cultured individuals.

7. CRITERIS ÈTICS I DE SOSTENIBILITAT

L'ètica i la sostenibilitat són dues parts fonamentals de la biologia que s'han de tenir en compte a l'hora d'elaborar qualsevol experiment. En aquest treball, i al Consorci de l'Estany en general, també es tenen en compte aquests criteris a l'hora de treballar.

Al Consorci de l'Estany, sota el projecte Life Potamo Fauna, s'utilitza el cultiu in vivo per a la reproducció de *Unio mancus* i *Unio raivoseri*, dues espècies amenaçades a Catalunya. Aquest treball es basa en la reproducció in vitro de l'espècie *Unio mancus*, per tal de posar en pràctica un mètode millor per dur a terme la cria d'aquests animals. L'objectiu d'aquesta cria en captivitat és la recuperació de les poblacions d'aquestes dues espècies a les conques del Fluvià i del Ter mitjançant la sembra de juvenils criats al laboratori per tal de reforçar les poblacions existents (Pou et al., 2014). L'assoliment d'aquest objectiu és molt beneficiós per als ecosistemes d'aigua dolça on viuen, ja que intervenen en la dinàmica dels nutrients d'aquests ecosistemes remonent el fitoplàncton, les bacteries i la matèria orgànica de l'aigua i el sediment, i també col·laborant en la bioturbació dels fons, fent augmentar el seu contingut d'oxigen (Araujo, 2012). A més, pot invertir la tendència de les seves poblacions, ja que en les últimes dècades han disminuït notablement, fins a arribar a un punt crític que podria acabar en la seva extinció si no s'actués al respecte. Per tant, l'objectiu d'aquest treball és d'un gran interès i benefici ecològic i ambiental, ja que permetrà augmentar les poblacions d'aquests animals tan beneficiosos pels ecosistemes i evitar el perill d'extinció que pateixen.

El mètode de cria in vivo utilitzat actualment al laboratori del Consorci de l'Estany consisteix a infectar peixos hostes amb els gloquidis simulant les condicions naturals. Per aconseguir-ho, es necessiten exemplars de barb de muntanya (*Barbus meridionalis*) al laboratori, que són pescats amb pesca elèctrica i portats al laboratori. Aquesta espècie és autòctona i també està amenaçada. Per tal de dur a terme la cria de nàiade allargada, s'agafen aquests peixos del seu medi natural, es porten al laboratori i s'infecten amb gloquidis fins que aquests metamorfitzen en juvenils, i llavors es tornen a alliberar al seu medi natural. Aquest procés suposa un gran estrès per als peixos, ja que són salvatges i no viuen bé en captivitat, i a més, són manipulats per al procés d'infecció. Tot això porta al fet que alguns dels individus pateixin malalties i que alguns arribin a morir durant el procés. Per tot això, el mètode de cultiu in vitro proposat en aquest treball és molt interessant, ja que no requereix el pas per un peix hoste. Per tant, s'evitaria que el barb de muntanya hagués de ser extret del seu hàbitat natural, que patís problemes al laboratori i també que alguns individus morissin. A més d'això, el Consorci de l'Estany també duu a terme accions de conservació d'espècies autòctones com el barb de muntanya, ja que la conservació de les nàiades inclou la conservació de les espècies de peixos autòctons hostes dels gloquidis.

Malgrat els avantatges anteriorment explicats que presenta el cultiu in vitro, per aquest cultiu també es requereix la utilització d'animals per obtenir el sèrum. El sèrum de conill va ser comprat, i el sèrum de carpa (*Cyprinus carpio*) va ser obtingut a partir d'animals vius. La metodologia per obtenir sèrum de carpa passa per la pesca de les carpes a l'estany, el seu transport al laboratori i el seu manteniment en tancs. Abans d'obtenir la sang de carpa, van ser anestesiades utilitzant Oli de clau per evitar que l'animal patís. Un cop adormides, se'ls va tallar la cua i es va recollir tanta sang com va ser possible, amb la qual es va fer el procés per obtenir el sèrum. Aquesta metodologia necessita que se sacrificuin les carpes. En aquest treball, es requeria un total de 300 mL de sèrum de carpa, per la qual cosa va ser necessari sacrificar 11 carpes. Per tant, aquest mètode exigeix el sacrifici de les carpes. No obstant això, aquesta espècie és invasora a l'estany de Banyoles, i amb el sacrifici de pocs individus es pot obtenir un gran nombre de juvenils de nàiade. En canvi, pel mètode in vivo es requereixen molts exemplars de barb de muntanya per produir poca quantitat de juvenils, una espècie

autòctona amenaçada però que, en aquest cas, no ha de ser sacrificada i, a més, els exemplars són retornats al seu medi natural. Per tot això, es pot dir que el mètode in vitro és menys perjudicial per la fauna autòctona, tot i que s'ha de fer el sacrifici de carpes, una espècie invasora, per a l'extracció de sang.

Un altre aspecte a tenir en compte és la utilització de verd de malaquita que s'ha fet servir tant per l'experiment amb verd de malaquita com per la neteja dels gloquidis pel cultiu in vitro. Aquest producte és eficaç contra els fongs, però també pot perjudicar els gloquidis. El verd de malaquita pot produir alteracions en la informació genètica dels individus que es pot transmetre o ser heretada per la descendència. Això pot ser perjudicial per les poblacions de nàiade, ja que aquests individus possiblement alterats passaran aquestes alteracions a la descendència. A més d'això, el verd de malaquita és cancerigen si es consumeix o s'està exposat al producte. Per tot això, el verd de malaquita només hauria de ser utilitzat en el cultiu in vitro en cas de ser necessari, i el seu rebuig hauria de ser triat adequadament com a rebuig químic (Alderman, 1985).

Per tot això, es pot concloure que des del punt de vista ètic, el mètode de cultiu in vitro és millor que el mètode in vivo utilitzat actualment, ja que evita la utilització de barbs de muntanya, una espècie autòctona amenaçada. Malgrat això, el mètode in vitro utilitza sèrum de carpa d'alguns individus sacrificats, cosa èticament qüestionable, però de totes maneres és millor que la utilització de barb de muntanya. Un altre aspecte a millorar seria la gestió dels residus de l'experiment, especialment el verd de malaquita, que és un component cancerigen, a més dels residus del medi que contenen antibiòtics i antifúngics. Finalment, cal destacar que el treball es basa en la cria en captivitat de nàiada per al posterior alliberament, un objectiu que permetrà als ecosistemes d'aigua dolça una millor qualitat, i que ajudarà al reforçament d'aquestes poblacions.

AGRAÏMENTS

En primer lloc, m'agradaria agrair al Consorci de l'Estany per haver-me donat l'oportunitat de realitzar les pràctiques del meu treball de final de grau amb ells, cosa que m'ha servit per conèixer de primera mà com funciona un projecte LIFE. També m'agradaria agrair a tot el personal del Consorci de l'Estany per la seva ajuda durant les pràctiques, especialment al meu tutor Miquel Campos, el qual m'ha ajudat i guiat en tot moment durant les pràctiques i m'ha ensenyat tots els coneixements necessaris per poder redactar aquesta memòria. Finalment, també voldria agrair al meu tutor, Crisanto Gómez, per haver revisat la memòria, i a en Guillem Cunill per haver-me ajudat a redactar-la.

BIBLIOGRAFIA

Alderman, D. J. (1985). Malachite green: a review. *Journal of Fish Diseases*,8(3), 289-298.

Araujo, R. *Unio elongatulus*. (2012). En: VV.AA., Bases ecológicas para la conservación de las especies de interés comunitario en España: Invertebrados. *Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente*. Madrid. 62 pp

- Araujo, R., Gómez, I., Machordom, A. (2004). The identity and biology of *Unio mancus* Lamarck, 1819 (= *U. elongatulus*) (Bivalvia:Unionidae) in the Iberian peninsula. *Journal of Molluscan Studies* **71**: 25-31
- Araujo, R., Reis, J., Machordom, A., Toledo, C., Madeira, MJ., Gómez, I., Velasco, JC., Morales, J., Barea, JM., Ondina, P., Ayala, I. (2009). La náyades de la península Ibérica. *Iberus*, 27 (2)
- Campos, M., Araujo, R., Feo, C. (2013). Informe de los resultados de la cría en cautividad y reproducción de *Unio elongatulus*. LIFE08 NAT/E/000078 "Mejora de los hábitats y especies de la Red Natura 2000 en Banyoles: Un proyecto demostrativo".
- Campos, M., Feo, C., Pou, Q., Araujo, R., Carrillo, I. (2013). Informe Layman 2010-2013. Consorci de l'Estany. DL: GI.1727-2013
- Feo, C., Araujo, R., Campos, M., Pou, Q. (2014). Protocolo de reproducción en cautividad de *Unio elongatulus*. LIFE12 NAT/ES/001091. "Conservación de fauna fluvial de interés europeo en red Natura 2000 de las cuencas de los ríos Ter, Fluviá y Muga"
- Feo, C., Pou, Q., Campos, M. (2013). Plan de conservación y continuidad. Plan de conservación After-LIFE. LIFE08 NAT/E/000078. "Mejora de los hábitats y especies de la red Natura 2000: un proyecto demostrativo"
- García-Gómez, A., De la Gándara, F., & Raja, T. (2011). Utilización del aceite de clavo, *Syzygium aromaticum* L.(Merr. & Perry), como anestésico eficaz y económico para labores rutinarias de manipulación de peces marinos cultivados. *Boletín. Instituto Español de Oceanografía*, 18(1-4).
- Kovitvadhi, S., & Kovitvadhi, U. (2012). *In Vitro Culture of Freshwater Pearl Mussel from Glochidia to Adult*. INTECH Open Access Publisher.
- 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.
- 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.
- Quim, P., Feo, C., Campos, M., Araujo, R., Puigvert, T., Bassols, E. (2014). Protocolo para seguimiento de las poblaciones de *Unio elongatus* y otras náyades autóctonas. LIFE12 NAT/ES/001091. "Conservación de fauna fluvial de interés europeo en red Natura 2000 de las cuencas de los ríos Ter, Fluviá y Muga"
- 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.