

Índex

0. Introducció	2
1. Planificació del treball	5
2. Part teòrica.....	7
2.1. Els microorganismes	8
2.2. Classificació.....	10
2.2.1. Bacteris	10
2.2.2. Fongs.....	21
3. Experimentació.....	25
3.1. Preguntes inicials, objectius i hipòtesis.....	26
3.2. Mètode d'estudi o recerca.....	28
3.2.1. Recompte.....	30
3.2.1.1. Medis de cultiu.....	30
3.2.1.2. Utilització de laminocultius i sembra per contacte.....	32
3.2.1.3. Utilització de medis generals, diferencials i selectius.....	33
3.2.2. Tipificació.....	36
3.2.2.1. Obtenció de cultius purs.....	36
3.2.2.2. Extensió i tinció de Gram.....	37
3.2.2.3. Proves bioquímiques per a identificar els microorganismes.....	40
3.3. Superfície estudiada.....	48
4. Resultats.....	52
4.1. Recompte de colònies.....	53
4.2. Prova morfològica de Gram.....	59
4.3. Proves bioquímiques.....	61
5. Conclusions.....	66
6. Bibliografia.....	70
7. Agraïments.....	72

0. Introducció

“Sorprendre’ns per alguna cosa és el primer pas de la ment cap al descobriment”.

Luis Pasteur

Situem-nos en una cafeteria o bar on es paga la consumició al moment de demanar-la, com en un restaurant de menjar ràpid. Acostumes a menjar sense rentar-te les mans després d'haver pagat? El cambrer es dirigeix a preparar l'encàrrec tocant l'aliment també sense rentar-se les mans?

Formes part de la població que, en cas de tenir les mans ocupades, no dubta a sostenir els bitllets amb la boca?

T'has plantejat mai que gestos com aquests, totalment habituals i rutinaris, podrien posar en perill la teva salut? T'havies parat a pensar mai que, de la mateixa manera que nosaltres habitem la Terra, els bitllets poden significar un hàbitat ideal per a molts microorganismes?

En tot cas, aquesta idea m'inquietava i és per això que vaig escollir aquest tema pel meu Treball de Recerca.

Sóc una alumna que cursa la modalitat científica de Batxillerat i voldria estudiar Medicina. He realitzat aquest Treball de Recerca, enfocat més en l'àmbit de la Microbiologia, per ser un tema que m'atrau, doncs sempre m'ha fascinat la vida microscòpica, aquella que s'amaga davant dels nostres ulls.

La gent està acostumada a comptar només amb allò que els seus ulls veuen, sense recordar que compartim la vida amb microorganismes que, tot i ser invisibles a ull nu, poden resultar de vital importància o perillosament nocius per a nosaltres. De fet, dins del nostre propi cos habiten quantitat de microorganismes simbiòtics sense els quals la nostra vida no seria igual. Pren com exemple un estri d'ús ja quotidià: un ordinador. L'individu que el posseeix solament està pendent del que apareix en pantalla, quan en realitat el que no es veu a simple vista és fins i tot més important que el que si es veu. De la mateixa manera que si s'espantlen els processadors de l'ordinador, aquest deixarà de funcionar correctament, si desapareguessin bacteris com els de la flora intestinal del nostre cos, el nostre ritme de vida també es veuria afectat.

Mitjançant aquest Treball de Recerca volia buscar la manera de conscienciar la gent sobre els seus hàbits higiènics, demostrant que poden existir microorganismes patògens en objectes d'ús habitual. Vaig creure que seria una bona idea prendre com a objecte d'estudi un dels béns més preuats en una societat dominada pel consumisme: els bitllets. Així doncs, una bona higiene de les mans després d'haver tocat el paper moneda serà suficient per evitar que arribin microorganismes indesitjats al nostre menjar.

Aquest Treball de Recerca s'ha centrat en l'estudi de la qualitat microbiològica del paper moneda mitjançant contactes amb laminocultius de la casa Microkit. Aquests medis de cultiu posseïen tan làmines generals, com selectives i diferencials per a microorganismes concrets.

S'ha estudiat la qualitat microbiològica del bitllet d'euro, modificant algunes variables, com són el valor del bitllet i l'estat de desgast d'aquest. Els cultius s'han realitzat a una temperatura pròxima als 36°C, aconseguint així únicament el creixement de microorganismes potencials patògens. Posteriorment, s'han realitzat cultius a temperatura ambient per comparar la població de microorganismes patògens amb la població total.

També s'ha realitzat un estudi comparatiu entre la població dels bitllets d'euro amb la de bitllets procedents d'altres països, concretament de Shangai.

S'han obtingut cultius purs de les espècies microbianes patògenes en medis de cultiu CLED (general i diferencial per fermentadors de la lactosa). Més endavant, s'ha procedit a utilitzar medis selectius, com agar McConckey i Manitol, per a facilitar la identificació d'aquestes. No s'han cultivat virus ni protozous, doncs precisen d'altres medis de cultiu més complexos. Per tant, només s'han cultivat fongs i bacteris.

S'ha realitzat un recompte total de microorganismes en cada bitllet i s'han comparat els resultats de les dues variables independents. S'ha acabat suprimint una de les dues variables independents, la de l'estat de desgast, per no donar diferències significatives.

Posteriorment, s'ha realitzat l'estudi morfològic de les colònies bacterianes. Després de realitzar la tinció de Gram i agrupar aquells individus d'aspecte idèntic sota un mateix grup, s'han obtingut nou mostres diferents; 4 cocs grampositius, 2 bacils gramnegatius i 3 bacils grampositius. A partir d'aquesta informació, s'han realitzat les proves bioquímiques adients per a la seva identificació fins a gènere i espècie. Malauradament, no es disposaven de recursos suficients per dur a terme la identificació dels bacils grampositius. Tot i així, s'ha dut a terme la identificació d'un grup de bacils grampositius: les listèries. La identificació d'aquest gènere, obtingut a partir del creixement en un medi selectiu dels laminocultius, s'ha realitzat a càrrec dels laboratoris SIGMA per evitar-me un possible contagi que podria tenir conseqüències greus.

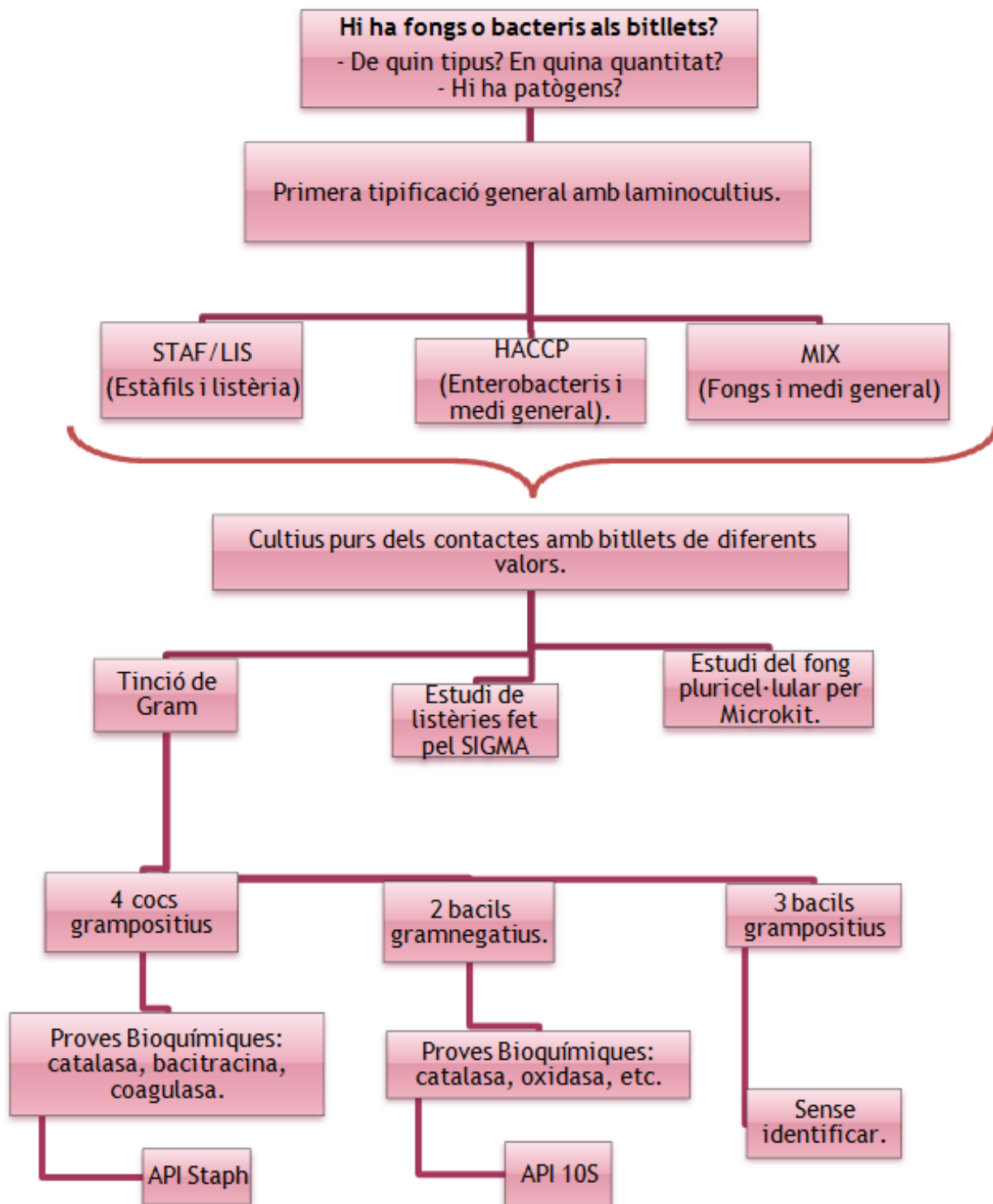
Al llarg del treball, s'ha obtingut una única mostra de fong, concretament un fong pluricel·lular. Per a la seva identificació s'han realitzat fotos a nivell macroscòpic i microscòpic i s'han enviat a un especialista, també de Microkit, perquè determinin gènere i espècie.

Finalment, s'ha buscat informació sobre les espècies identificades.

1. Planificació del treball

“Si busques resultats diferents, no facis sempre el mateix”.

Albert Einstein



2. Part teòrica

“Els que s’enamoren de la pràctica sense la teoria són com pilots sense timó ni brúixola, mai sabran on van”.

Leonardo DaVinci

2.1 - ELS MICROORGANISMES:

No estem sols en el món que vivim; res del que ens envolta és estèril i per tant, encara que no els podem percebre a ull nu, vivim acompanyats de gran quantitat de microorganismes.

De segur que tothom ha sentit a parlar de microorganismes, microbis o gèrmens; termes que popularment s'associen a perill i malalties. No obstant, aquests termes sols es refereixen a aquells éssers vius que no poden ser vistos a ull nu, a no ser que estiguin formant colònies, per la seva petita mida (inferior a 1 mm) i que per veure'ls s'ha d'emprar el microscopi. Per tant, aquests termes no tenen valor taxonòmic, doncs no fan referència a cap regne de classificació dels sers vius.

Com ja s'ha dit, no tots els microorganismes són patògens. Els microorganismes patògens són aquells que viuen a costa d'altres éssers vius, és a dir, s'alimenten d'ells i els ocasionen una infecció o malaltia. Són el grup més famós, i engloba microorganismes com els virus, viroides, prions i alguns bacteris, fongs i protoctists. Trobem també microorganismes simbiòtics als humans i per tant, lluny d'ocasionar malalties ni infeccions, ajuden a regular l'organisme. Un exemple d'aquests microorganismes beneficiosos són els de la flora intestinal. També trobem microorganismes sapròfits, anomenats oportunistes, que aprofiten la immunodepressió de l'hoste per produir una infecció. Un exemple d'aquests microorganismes és *Candida albicans*, present a la boca d'alguns individus als quals, ocasionalment, produeix candidiasi bucal.

Malgrat que els microorganismes constitueixen un alt percentatge dels éssers vius a la Terra, no es troben en tots els regnes. Analitzem la situació:

- Tots els éssers vius del regne de les Moneres són microorganismes, concretament bacteris.
- El regne dels Protoctists està dividit en dos subregnes: els protozous i les algues unicel·lulars i pluricel·lulars. Tots els protozous són considerats microorganismes, però en el cas de les algues, només són microorganismes les unicel·lulars.
- En el regne dels Fongs hi trobem els llevats i els fongs pluricel·lulars. La gran majoria d'aquest segon grup no són microorganismes.
- En el regne de les Metafites i els Metazous no hi trobem cap microorganisme, és a dir, tots els animals i vegetals es poden veure a ull nu.

Actualment, els microorganismes s'utilitzen en diversos camps, per exemple en indústries alimentàries, produint iogurts, o farmacèutiques en l'obtenció d'insulina.

La majoria dels microorganismes són unicel·lulars, tot i que també poden ser pluricel·lulars i acel·lulars.

- **Acel·lulars:** microorganismes supramol·leculars però infracel·lulars que necessiten una cèl·lula hoste per a dur a terme les seves funcions vitals; per tant, són paràsits intracel·lulars obligats.
Són ultraestructures, doncs només són visibles amb el microscopi electrònic ja que mesuren pocs nanòmetres.
En són un exemple els virus, viroides i prions.

- **Unicel·lulars:** microorganismes formats per només una cèl·lula. Es poden observar mitjançant un microscopi òptic, doncs mesuren micròmetres.
Existeixen dos tipus de microorganisme unicel·lular segons el tipus de cèl·lula que els forma:
 - **Unicel·lulars procariotes:** formats per una cèl·lula procariota, és a dir, més primitiva. Es caracteritzen per no tenir orgànuls de membrana i el material genètic lliure al citoplasma en forma de nucleoide. Poden presentar plasmidis.
En són exemples tots els éssers vius del regne de les Moneres.
 - **Unicel·lulars eucariotes:** formats per una cèl·lula eucariota, caracteritzada per tenir orgànuls de membrana i un autèntic nucli on es conté la informació genètica. Són exemples d'aquest grup individus com els llevats, protozous i algues unicel·lulars.

- **Pluricel·lulars:** microorganismes formats per diverses cèl·lules eucariotes, doncs no existeix cap organisme pluricel·lular constituït per cèl·lules procariotes. En el cas dels microorganismes, formen estructures tal·lofítiques (tal·lus), més senzilles que les tissulars (teixits). No tenen una estructura tan complexa com la dels animals o vegetals, doncs si sobrepassen la mida de 0.1mm deixen de ser considerats microorganismes.
En són exemples les algues i fongs pluricel·lulars.

2.2 - CLASSIFICACIÓ:

La classificació dels microorganismes és complexa i, com ja s'ha detallat a l'apartat anterior, solament hi ha dos dels cinc regnes que no continguin cap microorganisme: el regne de les Metafites i el regne dels Metazous, constituïts majoritàriament per éssers pluricel·lulars tissulars.

Com ja s'ha vist també anteriorment, totes les moneres són microorganismes, mentre que del regne dels Protoctists només es pot comptar amb els protozous i una petita part de les algues, les unicel·lulars. En quant als fongs, tan sols podem considerar els llevats i floridures.

Cal tenir en compte que la classificació anterior s'ha efectuat sense considerar les estructures infracel·lulars, com són els virus, viroides i prions.

***Anotació:** al llarg de la part pràctica d'aquest treball només s'ha experimentat amb colònies bacterianes i fongs. Per tant, només es desenvoluparan aquests microorganismes a la part teòrica.*

2.2.1 - BACTERIS:

Els bacteris són estructures unicel·lulars formats per cèl·lules procariotes. Les cèl·lules procariotes difereixen de les eucariotes pels següents punts:

- El seu DNA és bicatenari, circular i no condensat amb proteïnes.
- No posseeixen orgànuls de membrana, com ara mitocondris o cloroplasts.
- El seu DNA queda lliure al citoplasma, en una regió anomenada nucleoide, doncs no disposen de membrana nuclear.
- Són d'una mida molt més reduïda que les cèl·lules eucariotes (aprox. 1-3 micròmetres).
- Constitueixen exclusivament un dels cinc regnes animals: el regne de les Moneres.

El regne de les Moneres és el més primitiu, doncs els bacteris van evolucionar a partir dels protobionts fa uns 3.800 milions d'anys. Malgrat que disposaven d'un embolcall de polímers i d'alguns enzims, els protobionts no es poden considerar éssers vius pel fet que no contenien informació genètica, ni disposaven d'una autèntica membrana cel·lular, ni eren capaços de realitzar metabolisme.

Els bacteris que van evolucionar dels protobionts van créixer en una atmosfera

reductora, és a dir, sense oxigen, de manera que els primers bacteris que van existir foren heteròtrofs anaerobis o fermentadors, que obtenien els seus nutrients del brou primitiu.

Més endavant, aproximadament fa uns 3.000 milions d'anys, per mutació van aparèixer els primers bacteris autòtrofs, capaços de realitzar la fotosíntesis desprenent oxigen a l'atmosfera, que amb els anys esdevingué oxidant. Va ser llavors, fa 2.500 milions d'anys, quan una nova mutació es produí i van començar a aparèixer bacteris heteròtrofs o autòtrofs aerobis, que gràcies a la respiració cel·lular mitjançant l'oxigen alliberat a l'atmosfera pels bacteris autòtrofs, obtenien molta més energia en comparació amb els primogènits bacteris heteròtrofs anaerobis o fermentadors.

Fins l'actualitat, el regne de les Moneres ha aconseguit gran diversitat metabòlica, doncs abarca des d'autòtrofs fotosintètics fins a heteròtrofs aerobis, passant pels quimioautòtrofs, anaerobis i fermentadors, entre molts d'altres. Per tant, podem dir que el regne de les Moneres es caracteritza per tenir una gran varietat fisiològica.

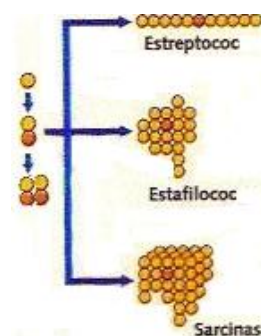
Morfologia:

Malgrat ser fisiològicament molt diversos, tal i com s'ha pogut observar anteriorment, els bacteris es caracteritzen per tenir una morfologia externa molt poc diversa, doncs només es coneixen quatre formes diferents:

- **Coc:** té forma esfèrica. Vist en pla, recorda un punt ortogràfic.

Al reproduir-se es poden agrupar formant cadenes o ramificacions:

- **Diplococ:** unió de dos cocs.
- **Tètrada:** unió de quatre cocs en forma de quadrat.
- **Estreptococ:** cadena de cocs.
- **Estafilococ:** cocs agrupats en forma de raïm.
- **Sarcines:** s'agrupen seguint les arestes d'un vèrtex.



- **Bacil:** té forma allargada, com de bastonet curt.

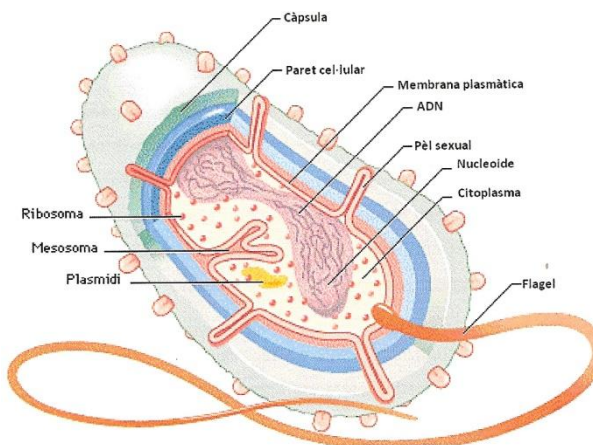
Es poden agrupar de diferents maneres:

- **Coccobacils:** no és una agrupació de bacils, sinó que és un bacil que tendeix a ser ovalat. En ocasions es pot confondre amb cocs.
- **Diplobacils:** unió de dos bacils.
- **Estreptobacils:** unió de bacils en forma de cadena.

- **Vibri:** té forma allargada i corba. Recorda una coma ortogràfica. Acostumen a tenir un flagel.

- **Espiril:** té forma de tirabuixó. Són molt sensibles a les condicions ambientals. Totes les espiroquetes són d'aquest grup, com per exemple *Treponema pallidum*.

Una vegada vista la morfologia externa, es procedeix a analitzar la morfologia interna d'un bacteri.

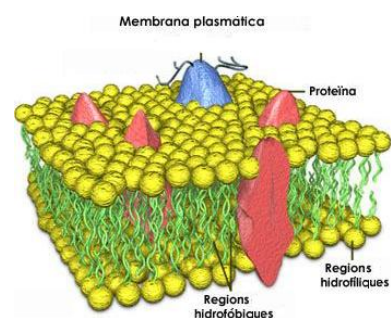


Estructures superficials:

- **Càpsula:** capa externa present només a alguns bacteris. Regula els intercanvis amb el medi i ofereix resistència enfront les inclemències del medi (altes temperatures o canvis en el pH) o d'un atac fagòcit, entre altres.
- **Paret cel·lular:** coberta que dóna forma a la cèl·lula. De la seva composició en depenen dos tipus de bacteris: els grampositius i els gramnegatius.
 - **Bacteris grampositius:** disposen d'una paret gruixuda i monoestratificada de peptidoglicà.
 - **Bacteris gramnegatius:** disposen d'una paret biestratificada; concretament l'interna és de peptidoglicà i l'externa de lípids amb enzims que impedeixen la fixació del cristall violeta.

(Per més informació sobre la tinció de Gram, consultar l'apartat 3.2.2.2 – Extensió i tinció de Gram).

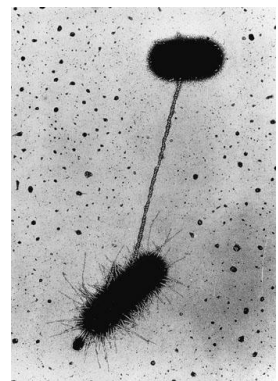
- **Membrana plasmàtica:** coberta que engloba el citoplasma. Està constituïda per una bicapa de fosfolípids amb proteïnes i oligosacàrids. La membrana dels bacteris es caracteritza per tenir uns replecs interns, anomenats mesosomes, que



contenen enzims importants pel seu metabolisme, doncs com ja s'ha explicat anteriorment, no disposen d'òrgànuls citoplasmàtics.

- **Undulipodis:** prolongacions senzilles amb funció locomotora. Depenent de la mida reben el nom de cilis (longitud més curta) o flagels.
- **Pèls sexuals i fímbries:** estructures similars als undulipodis, però constituïdes per proteïnes i sense funció locomotora. Els pèls sexuals permeten l'intercanvi de plasmidis mitjançant la conjugació, mentre que les fímbries fan possible la fixació del bacteri al substrat.

Cal afegir que la conjugació és un procés molt important, doncs els bacteris es reproduïxen de forma asexual per bipartició i per tant, no s'origina variabilitat. Aquesta s'aconsegueix únicament mitjançant la conjugació o la mutació. Continguda en els plasmidis que es transmeten mitjançant la conjugació, pot trobar-se la informació sobre com fabricar una càpsula i ser transmesa a un bacteri que immediatament fabricarà càpsula, igualment que tots els seus descendents. En aquest fenomen podem comprovar que la sexualitat existeix de manera independent a la reproducció.



Estructures internes:

- **Citoplasma:** conjunt cel·lular format pel hialoplasma i altres estructures. El hialoplasma està compost, en la seva major part, per aigua i substàncies dissoltes. Cal recordar que al ser cèl·lules procariotes no tenen òrgànuls de membrana, per tant, les estructures restants solament poden ser les següents:
 - **Vesícules:** permeten el desplaçament del bacteri mitjançant un sistema de captació i buidatge d'aigua o gas.
 - **Ribosomes:** estructures formades per RNAr encarregades de sintetitzar proteïnes a partir de l'RNAm.
 - **Inclusions:** grànuls sense membrana utilitzades com a reserva de substàncies de rebuig o de nutrients sintetitzats pel bacteri.
- **Nucleoide:** zona del citoplasma on es troba el DNA bacterià, doncs aquests no disposen d'una membrana nuclear que el contingui. El seu material genètic consisteix en una molècula de DNA bicatenària i circular.

Fisiologia:

Tot i que ja s'ha citat anteriorment que el regne de les Moneres és el més divers fisiològicament parlant, s'ampliaran els coneixements sobre aquest aspecte.

Cal destacar que gràcies a aquesta elevada varietat, es fa possible identificar els bacteris mitjançant proves bioquímiques. S'ampliarà més sobre aquest aspecte a la part experimental.

En la fisiologia es comprenen les tres funcions bàsiques dels éssers vius, que són nutrició, relació i reproducció. Així doncs, es procedeix a conèixer les característiques d'aquests tres àmbits.

- **Nutrició:** s'entén per nutrició a l'acció de captar molècules del medi i utilitzar-les en benefici propi per obtenir l'energia necessària per a realitzar les funcions vitals, així com per créixer i renovar estructures.

Fins al moment, els bacteris poden dur a terme tots els tipus de metabolisme coneguts, alguns dels quals són exclusius del regne de les Moneres.

Per exposar la seva diversitat metabòlica, cal dir que hi ha bacteris autòtrofs, és a dir, capaços de sintetitzar matèria orgànica a partir d'inorgànica. Dins aquest grup, depenent de la font energètica que utilitzin, es diferencien dos tipus: fotoautòtrofs (energia a partir de la llum solar i per tant, són fotosintètics) i quimioautòtrofs (energia a partir de reaccions químiques).

També trobem bacteris heteròtrofs, és a dir, produeixen matèria inorgànica residual a partir de matèria orgànica. Aquests precisen captar matèria orgànica de l'exterior, doncs no són autosuficients, i ho fan agafant-la directament del medi o d'un individu, provocant-li un benefici (simbiòtics) o un perjudici (paràsits). Per altra banda, depenent del seu catabolisme energètic, es diferencien tres grups, nomenats de majors a menors productors d'energia: aerobis (respiració cel·lular amb oxigen), anaerobis i fermentadors (degraden molècules orgàniques formant altres més simples). Cal recordar que els primers bacteris existents foren anaerobis, doncs l'atmosfera era reductora.

- **Reproducció:** és asexual per bipartició, és a dir, un bacteri n'origina un altre idèntic havent duplicat prèviament la molècula de DNA bicatenari circular amb l'ajut dels mesosomes. Aquest tipus de reproducció origina dos individus idèntics entre ells i al progenitor, i per tant, pot ser considerada una clonació. Aquest tipus de reproducció no origina variabilitat, que solament es pot aconseguir mitjançant mutacions (canvis a l'atzar de la informació genètica d'un individu) o mitjançant la conjugació (intercanvi de plasmidis mitjançant els pèls sexuals), la transformació (captació de fragments del DNA del medi mitjançant

els pèls sexuals) o la transducció (infecció per un bacteriòfag lisògen). Per tant, la sexualitat bacteriana no és un mecanisme de reproducció.

Cal recordar que en la reproducció bacteriana no es produeixen divisions mitòtiques ni meiótiques, doncs no existeixen els cromosomes.

- **Relació:** capacitat de captar estímuls del medi i respondre en conseqüència. Es pot considerar que està força desenvolupada en bacteris; un clar exemple és la capacitat que tenen alguns, majoritàriament patògens, per originar endòspores. Aquestes espores no són cèl·lules de reproducció, sinó recursos per resistir les condicions adverses del medi, com ara les altes temperatures. Malgrat l'existència d'individus immòbils, un altre exemple de relació podria ser la mobilitat que obtenen alguns bacteris gràcies a undulipodis (cilis i flagels) i una minoria d'ells, per pseudopodis (prolongacions del citoplasma) o per moviments de contracció. No obstant, aquests dos últims mecanismes són molt rars per la presència de la paret cel·lular.

Classificació de les Moneres:

Una vegada estudiades les característiques generals del regne, cal conèixer-ne la seva classificació segons els criteris evolutius.

El regne de les Moneres engloba dos subregnes, segons el tipus de paret cel·lular de la qual disposen els individus:

- **Arqueobacteris:** són els bacteris primitius, que es van evolucionar dels protobionts. La seva paret cel·lular no està composta per peptidoglicà. Avui en dia perduren algunes espècies, com ara els bacteris metanògens i els bacteris halòfils.
- **Eubacteris:** són coneguts com a "bacteris vertaders". Tenen la paret de peptidoglicà i constitueixen el grup més ampli dels bacteris, doncs engloba molts grups diferents, com per exemple:
 - **Bacteris fermentadors:** realitzen la fermentació. En són un exemple els enterobacteris de la flora inestinal, com *Escherichia coli*. També en són un bon exemple els bacils de Döderlein de la flora vaginal i els bacteris utilitzats en la fermentació del iogurt, ambdós fermentadors de la lactosa, que per tant, generen àcid làctic com a producte.
 - **Espiroquetes:** d'aspecte prim, llarg i ondulat. Engloba tots els espirils, com el *Treponema pallidum*, causant de sífilis.
 - **Bacteris fixadors de nitrogen:** fixen el nitrogen de l'atmosfera al terra.

Són de gran importància en els cicles biogeoquímics, doncs generen formes moleculars de nitrogen aprofitables pels metàfits.

- **Bacteris quimioautòtrofs:** produeixen matèria orgànica a partir de la inorgànica, obtenint energia a partir de reaccions químiques. Es diferencia de la fotosíntesi perquè aquesta última obté l'energia del sol.
- **Cianobacteris:** realitzen la fotosíntesi de manera molt similar a les algues i metàfits. Foren els encarregats de convertir l'atmosfera reductora en oxidant.

Classificació de les Moneres segons la prova de Gram:


Un altre mètode molt útil a l'hora de classificar els microorganismes és a partir de la prova de Gram. Mitjançant aquesta tinció s'obté informació sobre la seva morfologia, així com de les seves característiques de Gram.

Com ja s'ha explicat, els bacteris poden presentar quatre estructures morfològiques diferents: cocs, bacils, vibris i espirils. Tot i així, per a pautar més el treball, solament s'explicaran les característiques d'aquells gèneres aïllats a la part experimental.

Es començarà la recerca pels cocs, dels quals només se n'han obtingut exemplars grampositius. Els tres gèneres més importants dins el grup dels cocs grampositius són els Estafilococs, els Estreptococs i els Micrococs.

- **Gènere Estreptococs:** aquest gènere, conegut també com a *Streptococcus*, està format per cocs grampositius que mesuren entre 1 i 1.5 micròmetres i solen créixer formant diplococs o cadenes. Són de fàcil identificació bioquímica, doncs no produeixen catalasa ni oxidasa i per tant, el resultat és negatiu en ambdues proves.

Constitueixen un grup molt ampli i heterogeni, i es poden trobar des d'individus sapròfits, d'altres que formen part de la flora normal del cos i es comporten com a patògens oportunistes, així com d'altres patògens que poden causar infeccions diverses.

Regne	Moneres
Subregne	Eubacteris
Fílum	Firmicuts
Classe	Bacilli
Ordre	Lactobacillals
Família	Streptococcaceae
Gènere	Streptococcus
Agrupació	

Alguns dels potencials patògens són els següents:

- *Streptococcus pyogenes:* eubacteri que pot produir amigdalitis.
- *Streptococcus agalactiae:* pot produir meningitis.
- *Streptococcus pneumoniae:* pot originar malalties com pneumònia, així com malalties més greus o fins i tot mortals, com ara septicèmies.

Els dos gèneres restants, Estafilococs i Micrococcs, són catalasa positius.

- Gènere Estafilococs:** aquest gènere, conegut també com a *Staphylococcus*, està format per cocs grampositius que mesuren entre 0.5 i 1 micròmetres, i solen créixer formant una estructura similar al raïm. Totes les espècies d'aquest gènere són immòbils, per tant, no presenten undulipodis. Són habituals en la flora dèrmica humana i en les mucoses. Aquest pot ser un fet que condiciona indirectament la presència d'estafilococs a les superfícies i per tant, també al paper moneda.


Regne	Moneres
Subregne	Eubacteris
Fílum	Firmicuts
Classe	Cocci
Ordre	Bacillales
Família	Staphylococcaceae
Gènere	Staphylococcus
Agrupació	

Les espècies d'estafilococs a remarcar són les següents:

- Staphylococcus epidermidis*: molt abundant en la flora dèrmica. Pot produir malalties com ara cistitis, és a dir, infecció de les vies urinàries.
- Staphylococcus aureus*: és un dels estafilococs més coneguts. Pot produir un ampli ventall d'infeccions, com pneumònies, meningitis i sèpsies, doncs produeix una sèrie de toxines perjudicials per l'ésser humà.

Es caracteritza per resistir salinitats elevades (pot créixer en aigua de mar), així com molts antibiòtics, com ara la penicil·lina.
- Staphylococcus haemolyticus*: eubacteri de la flora normal de la pell d'humans i animals. És molt resistent a agents antimicrobians.

- Gènere Micrococcs:** aquest gènere, també conegut com a *Micrococcus*, està format per cocs grampositius que mesuren entre 0.5 i 3 micròmetres. Acostumen a agrupar-se en forma de tètades, o bé de raïm. Malgrat que pot aparèixer alguna excepció, no solen ser patògens. S'aïllen en ambients molt diversos, especialment a l'aigua i la terra, tot i que també se'n poden trobar a la flora dèrmica humana. Algunes espècies de micrococcs poden créixer en medis gairebé deshidratats i són molt resistents a les condicions ambientals extremes.

Regne	Moneres
Fílum	Actinobacteria
Classe	Actinobacteria
Subclasse	Actinobacteridae
Ordre	Actinomycetales
Subordre	Micrococccineae
Família	Micrococccineae
Gènere	Micrococcus
Agrupació	

Alguns espècimens de micrococcs a destacar són:

- *Micrococcus luteus*: es troba a la flora normal de la pell humana. Transforma la suor en compostos d'olor desagradable.
- *Micrococcus antarcticus*: destaca per la seva gran resistència a temperatures baixes. S'ha aïllat, com el seu nom indica, a l'Antàrtic.

Una vegada conclusa l'explicació dels cocs, es prosseguirà amb l'altre gran grup de bacteris, morfològicament parlant, aïllats mitjançant contactes a la part experimental. En aquesta ocasió s'han obtingut tant bacils grampositius, com gramnegatius. Malauradament, per falta de recursos al laboratori, no ha estat possible identificar els bacils grampositius i sols es disposa de la identificació de les listèries duta a terme als laboratoris SIGMA. En canvi, en bacils gramnegatius s'han obtingut resultats diversos. En primer lloc s'ampliarà la informació sobre els bacils grampositius identificats, que com ja s'ha dit, es redueix a la listèria.

- **Listeria**: aquest gènere comprèn quatre espècies diferents: *L.monocytogenes*, *L.dentrificans*, *L.grayi* i *L.murrayi*. Solament *L.monocytogenes* té importància en clínica humana i és l'agent responsable de les listeriosis.

L.monocytogenes és un bacil grampositiu curt, recte o lleugerament corbat. Acostuma a aparèixer

aïllat o en petits grups, formant cadenes curtes o adoptant formes similars a V o L. Posseeix quatre flagels que li atorguen mobilitat.

Hi ha diversos quadres de listeriosis, tant en l'home com en animals, que poden ser des de lleus fins a molt greus. El seu efecte està directament relacionat amb la virulència del bacteri i amb l'estat de salut de l'hoste. Gran part la seva virulència ve donada pel seu poder hemolític i lipolític.

A continuació es citen els riscos més greus que suposa entrar en contacte amb *L.monocytogenes*:

- **Listeriosis neonatal**: el microorganisme pot infectar el nadó mitjançant dos mecanismes. En ambdós casos ocorre durant el procés de gestació. Una via d'entrada del microorganisme al fetus pot produir-se a partir d'una bacterièmia de la mare i acabar arribant al fetus mitjançant els vasos umbilicals. En un segon cas, el nadó podria infectar-se durant el part a l'entrar en contacte amb les secrecions de la mare.

La listeriosis neonatal és la forma més freqüent, i pot manifestar-se de dues maneres diferents. Trobem la listeriosis neonatal precoç, que

Regne	Moneres
Fílum	Firmicutes
Classe	Bacilli
Ordre	Bacillales
Família	Listeriaceae
Gènere	Listeria

s'observa durant els primers quatre dies de vida i sovint en prematurs. En aquests casos, el nadó neix en estat aparent de mort.

En la manifestació més tardana, els símptomes apareixen a partir de la tercera setmana, ocasionant eventualment meningitis.

La listeriosis neonatal acostuma a aparèixer també conjuntivitis a causa de la sembra efectuada a partir dels microorganismes presents al líquid amniòtic o a la vagina durant el moment del part.

- **Listeriosis en l'embaràs:** si la infecció té lloc a l'inici de l'embaràs, ocasiona l'avortament durant el cinquè o sisè mes de gestació. Si la infecció es produeix més tard, el part pot ser normal, malgrat que normalment sorgeixen parts prematurs.
- **Listeriosis meningoencefàlica:** és la segona més freqüent després de la listeriosis neonatal. Es tracta d'una meningitis supurada aguda, tot i que pels signes clínics pot simular una meningitis tuberculosa. Afecta per igual en joves, adults i ancians, tot i que l'edat mitja és entre 50 i 60 anys. El pronòstic és variable segons l'edat, però la mortalitat global és del 40%. Com en totes les meningitis, pot deixar seqüeles neurològiques greus.

Existeixen tres mecanismes de transmissió diferents per a *L.monocytogenes*, explicats a continuació:

- **Directe d'animal a humà:** aquest tipus de contaminació es produeix per contacte amb animals malalts o portadors del microorganisme. Les persones que pateixen aquest contagi són aquelles que estan professionalment exposades, com ara: obrers agrícoles que manipulen restes d'animals malalts, veterinaris, empleats d'escorxadors, etc.
- **Indirecte d'animal a humà per aliments:** mitjançant la ingesta de carn infectada, llet mal pasteuritzada, ous procedents d'animals malalts, etc.
- **Indirecte per inhalació:** la via respiratòria n'és la via d'entrada per inhalació de pols contaminada.
- **Contagi interhumà:** és poc freqüent, però existeix. Pot ser directe, per formes congènites de transmissió del fetus per part de la mare (com ja s'ha explicat) o per contacte amb una persona portadora. També es contempla la hipòtesis de transmissió mitjançant relacions sexuals amb penetració, doncs s'ha trobat *L.monocytogenes* a mostres obtingudes de la uretra masculina i la vagina femenina.

Una vegada explicat el gènere i l'espècie de bacils grampositius més representatius, es procedirà a ampliar els coneixements sobre els bacils gramnegatius.

Malgrat que a la part experimental s'han obtingut molts gèneres diferents, per a pautar el treball sols es detallaran les característiques dels bacils gramnegatius més significatius per excel·lència: els enterobacteris.

- **Enterobacteris:** aquest grup comprèn bacils gramnegatius, aerobis i anaerobis facultatius. Molts presenten flagel, però no formen espores. Presenten una àmplia diversitat metabòlica, per exemple, una part dels enterobacteris és capaç de fermentar la lactosa; un exemplar d'aquests individus és *Escherichia coli* i per aquest motiu, els enterobacteris que fermenten la lactosa s'anomenen coliforms.

Hi ha més de 30 gèneres i 100 espècies d'enterobacteris diferents. Malgrat que una petita part es comporta com sapròfit del medi ambient (a l'aigua, sòl o plantes), la immensa majoria habituen a ser hostes habituals del tub digestiu, tant humà com animal i constitueixen la major part de la flora que colonitza el tub digestiu i poden esdevenir sapròfits oportunistes. En ocasions, també poden intervenir en processos patògens intra o extraintestinals.

Dins d'aquest grup, trobem també la particularitat que diferents soques d'una mateixa espècie es poden comportar unes com a simbiòtiques i altres com a patògenes. Una espècie ja esmentada i de molt renom als mitjans de comunicació aquest any, *E.coli*, és un exemplar clar d'aquesta diversitat dins les soques, doncs forma part de la flora normal bacteriana, però tal i com s'ha vist a Alemanya amb el suposat cas dels cogombres (que finalment va resultar provenir de la soja germinada), presenta algunes soques enteropatògenes que poden esdevenir fins i tot mortals.

Un dels gèneres més coneguts d'enterobacteris patògens és *Salmonella*, que inclou l'espècie *Salmonella tify* que causa el tifus.

Un altre factor important dels enterobacteris és que tenen un gran interès en analítica i control de qualitat microbiana ja que són indicadors de contaminació fecal al producte estudiat, doncs habitualment es troben al tracte intestinal dels animals i humans. Per tant, aplicant el coneixement al meu treball, l'aïllament d'enterobacteris com *Enterobacter cloacae* o *Enterobacter amnigenus* pot implicar contaminació fecal del paper moneda.

Al comentari dels resultats es donarà informació individual i detallada sobre cada espècie aïllada durant l'estudi de la superfície del paper moneda.

2.2.2 - FONGS:

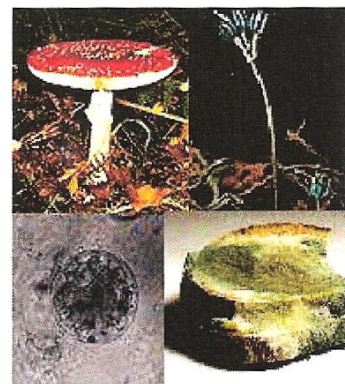
Els fongs constitueixen també un dels cinc regnes dels éssers vius. A diferència dels bacteris, els fongs estan constituïts per cèl·lules eucariotes, de major complexitat que les procariotes. Les cèl·lules eucariotes difereixen de les procariotes per les següents característiques:

- Les cèl·lules eucariotes componen quatre dels cinc regnes.
- Són morfològicament molt diverses.
- El seu material genètic és el DNA en forma de dobles hèlix lineals i llargues (poden arribar a mesurar centímetres) i està compost per tantes dobles hèlix de DNA com cromosomes té l'espècie.
- El DNA està empaquetat en proteïnes, anomenades histones, formant cromatina.
- Té membrana nuclear que protegeix el material genètic del citoplasma.
- En les divisions cel·lulars, a diferència dels bacteris, les cèl·lules eucariotes organitzen el seu material genètic en forma de cromosomes i fan processos de mitosi o meiosi.
- Les cèl·lules eucariotes solen ser d'una mida més gran (uns 10 micròmetres, aproximadament), tot i que alguna cèl·lula en concret pot ser més petita o arribar a mesurar centímetres.

El regne dels Fongs aparegué molt posteriorment que el regne de les Moneres. Es calcula que farà uns 1500 milions d'anys van aparèixer els primers fongs unicel·lulars (llevats) i posteriorment, van aparèixer els fongs pluricel·lulars.

Com s'acaba de veure, el regne dels fongs està format tant per organismes unicel·lulars com pluricel·lulars i per tant, és un regne molt heterogeni morfològicament parlant.

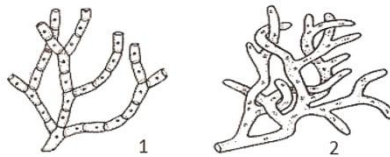
Actualment, es coneixen al voltant d'unes 100.000 espècies de fongs i entre elles es troben individus que tenen una elevada importància en la indústria alimentària, com és el cas de *Penicillium roqueforti*. Seguint en el mateix gènere, trobem *Penicillium notatum*, que ha jugat un paper fonamental en la medicina, doncs és el productor de penicil·lina.



Morfologia:

Una característica distintiva dels fongs és que, igual que els bacteris, també tenen paret cel·lular, però aquesta no està constituïda per peptidoglicà, sinó per un polisacàrid anomenat quitina. Aquest polisacàrid també és conegut per formar part de l'exosquelet d'alguns artròpodes, com els insectes, aràcnids i crustacis.

Els fongs pluricel·lulars, a diferència dels animals i algunes plantes, només tenen estructura de tal·lus i per tant, de cèl·lules no especialitzades. L'estructura tal·lofítica està composta per uns filaments prims, anomenats hifes, que formen un conjunt, anomenat miceli i que forma la part vegetativa d'un fong. Les cèl·lules de l'hifa poden formar un citoplasma continu (hifes sifonals, dibuix 2) o separades per septes (hifes septades, dibuix 1).



Cal remarcar que els llevats no presenten hifes ni miceli, sinó que són de forma ovalada al mirar-los pel microscopi i es divideixen per gemmació.

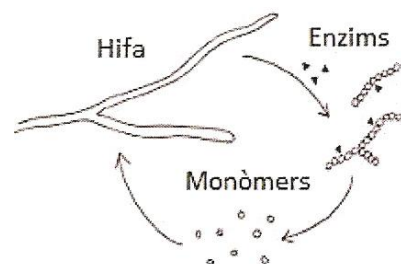
Els fongs microscòpics són llevats (unicel·lulars) o floridures (pluricel·lulars tal·lofítics però microscòpics). Malgrat que el fet de ser microscòpic condiona que és necessari un microscopi per a la seva observació, són visibles a ull nu quan formen colònies en medis sòlids. Un exemple n'és la floridura del pa o fruita.

Mentre que les colònies de llevats són fàcilment confusibles amb les colònies bacterianes, les colònies de floridures solen ser bastant més grans en comparació amb aquestes. A més, el seu miceli acostuma a recordar la textura del cotó fluix.

Fisiologia:

A diferència de les Moneres, que hem vist anteriorment, el regne dels Fongs no és tan divers fisiològicament parlant.

- **Nutrició:** són tots heteròtrofs per absorció i digestió externa, per tant, metabolitzen matèria orgànica captada de l'exterior, obtenint energia i produint molècules inorgàniques residuals. Ho fan de manera que les hifes del fong alliberen enzims que degraden la matèria orgànica, separant llargues cadenes de polímers en monòmers. Posteriorment, aquests monòmers són absorbits per les hifes i guardats a la reserva en forma de



glicogen.

Acostumen a alimentar-se de matèria orgànica morta, doncs en la gran majoria són sapròfits, tot i que existeixen de simbiòtics (com els líquens que s'explicaran més endavant) i paràsits.

En quant a catabolisme energètic, la majoria de fongs realitzen respiració cel·lular aeròbia, tot i que s'ha de tenir en compte l'existència dels llevats, que realitzen la fermentació, jugant un paper molt important en indústries alimentàries per la producció de vi, pa, etc.

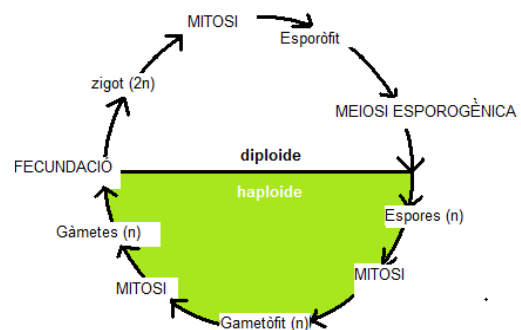
Cal recordar que la fermentació produeix menor energia que la respiració cel·lular aeròbia.

- **Relació:** és la capacitat de captar estímuls del medi i respondre en conseqüència, i es troba poc desenvolupada en fongs, doncs són immòbils.
- **Reproducció:** pot ser asexual o sexual, és a dir, mitjançant un canvi en la informació genètica o no.

Cal recordar que el miceli, format per hifes, és la part vegetativa i no reproductora. La part reproductora d'un fong és l'espangí, on es fabriquen les espores, entenent com a espora una cèl·lula de reproducció que per si sola és capaç de donar un nou individu.

En fongs predomina la reproducció sexual mitjançant meïospores, obtingudes per meïosi, tot i que també és important la reproducció asexual. La bipartició dels llevats, o la gemmació, són formes de reproducció asexual. També és asexual la reproducció dels fongs que utilitzen mitòspores, obtingudes per mitosi.

Molts fongs segueixen un cicle biològic similar al diplohaplont, consistent en fabricar espores de n cromosomes als esporangis per meïosi. Per tant, són meïospores. Les meïospores germinen i originen el gametòfit, que fabricarà gàmetes n per mitosi. La fecundació d'aquests gàmetes donarà un zigot $2n$ a partir del qual es desenvoluparà l'esperòfit.



Gràcies a la reproducció sexual s'origina variabilitat en la descendència.

També hi ha fongs que poden produir espores per mitosi (mitòspores); en aquest cas, es tracta de reproducció asexual, doncs es manté el nombre de

cromosomes i no es modifica la informació genètica, tret que es produeixi mutació.

Els llevats es reproduïxen per gemmació, reproducció asexual que consisteix en una divisió del nucli per mitosi i dóna lloc a dues cèl·lules filles de diferent mida, però igual dotació cromosòmica.

Classificació dels fongs:

La classificació dels fongs es basa en la forma del seu esporangi. Així doncs, diferenciem els següents grups:

- **Zigomicets:** viuen sobre la matèria vegetal en descomposició i per tant, solen trobar-se en subsòls. Tenen hifes sifonals. Són florits o floridures, unicel·lulars, i per tant, són microorganismes.

Un exemplar de zigomicet seria el florit del pa.

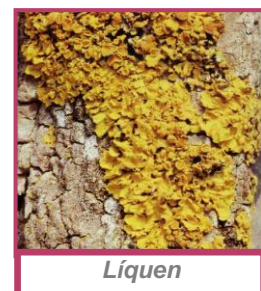
- **Ascomicets:** formen les espores en uns esporangis anomenats asques. Viuen al sòl sobre matèria orgànica en descomposició. Inclou els llevats, com *Sacharomyces cerevisiae*, i fongs pluricel·lulars. Els ascomicets pluricel·lulars no tenen forma de barret, tal i com s'observa clarament en les múrgoles, tòfones, pets de llop, etc.



Múrgoles (ascomicets)

- **Basidiomicets:** formen les espores en uns esporangis anomenats basidis. Viuen al sòl sobre la matèria orgànica en descomposició. Són els típics bolets en forma de barret, com ara els rovellons, xampinyons, etc.
- **Deuteromicets:** formen les espores en uns esporangis anomenats conidis. Viuen al sòl, sobre vegetals en descomposició o sobre la pell dels animals. Generalment són sapròfits oportunistes, com el que produeix peu d'atleta. Fan floridura, com el gènere més exemplar dels deuteromicets, *Penicillium*, que té un gran interès mèdic (*Penicillium notatum*) i alimentari (*Penicillium roqueforte*, *Penicillium camembartii*, *Penicillium sojiae*, etc).

Un altre tipus molt característic de fong són els líquens o micòfits, que són el resultat de la unió simbiòtica entre un fong i una alga unicel·lular. El fong aporta protecció envers la dessecació i radiació solar, mentre que l'alga aporta la capacitat de realitzar la fotosíntesis. Gràcies a això, aquest simbiot tal·lofític és molt resistent a les condicions ambientals adverses i per tant, és capaç de colonitzar una gran diversitat d'ecosistemes.



Líquens

3. Experimentació

“Són vanes i estan plagades d’errors les ciències que no han nascut de l’experiment, mare de tota certesa”.

Leonardo DaVinci

3.1 - PREGUNTES INICIALS, OBJECTIUS I HIPÒTESIS:

Aquest treball de recerca es basa en l'estudi dels microorganismes presents al paper moneda. Per tal de desenvolupar-lo seguint una pauta lògica, s'han fixat els següents objectius:

- Realitzar sèmbras per contacte de la superfície de varis bitllets mitjançant diferents laminocultius.
- Fer l'estudi quantitatiu i qualificatiu dels resultats obtinguts a partir de la primera sembra.
- Aprendre a aplicar proves morfològiques i bioquímiques per a identificar els diferents microorganismes obtinguts fins a gènere o espècie, si és possible.
- Obtenir informació de les espècies identificades i determinar-ne la patogenicitat.
- Descobrir si hi ha algun tipus de relació entre l'estat del bitllet (més o menys utilitzat) i el nombre de colònies que hi creixeran.
- Descobrir si hi ha algun tipus de relació entre el país de procedència del bitllet, i per tant la seva composició, amb el nombre de colònies que hi creixeran.

Les preguntes que em vaig formular inicialment, i que s'han intentat resoldre al llarg del treball, són les següents:

- Quin mètode de cultiu és el més adequat per a realitzar l'estudi microbiològic del paper moneda?
- Hi ha microorganismes al paper moneda?
- Quin tipus i quina quantitat de microorganismes s'hi poden trobar?
- En el cas d'aïllar bacteris, n'hi ha de patògens?
- És possible identificar fins a gènere i espècie els microorganismes trobats?
- La qualitat microbiològica és la mateixa en els bitllets de major ús (i per tant, menor valor) que en els de menor ús (i per tant, major valor)?
- Hi ha diferències significatives entre els bitllets nous i els bitllets usats?
- Hi ha diferències entre el bitllet europeu i el d'altres països?

Per tal de respondre a priori les preguntes plantejades, es van formular les següents hipòtesis:

- El millor mètode de cultiu a emprar serà aquell que em permeti la sembra per contacte.
- Al treballar sobre una superfície petita com els bitllets, el millor mitjà per

aconseguir bons resultats serà el laminocultiu.

- Els laboratoris MICROKIT subministren laminocultius que em seran de gran utilitat.
- Els microorganismes trobats seran majoritàriament bacteris i fongs.
- Els bitllets més utilitzats seran més rics en microorganismes.
- Els bitllets nous seran més pobres en microorganismes que els bitllets usats, però no estèrils.
- Els bitllets constituïts per fibres vegetals presentaran una quantitat major de microorganismes.
- Alguns bacteris presents als bitllets correspondran a la família dels enterobacteris.
- La presència de cocs grampositius serà habitual.
- S'espera detectar la presència de *Staphylococcus epidermidis* i també d'espècies patògenes, com *Staphylococcus aureus*.

Un esdeveniment que va influenciar en la trajectòria del meu treball fou el gran escàndol, tan social com mediàtic, que produí l'incident amb *Escherichia coli* a Alemanya. Aquest bacteri, poblador habitual de la flora natural intestinal que en ocasions pot esdevenir oportunista, va mutar produint la mort de 10 persones i més de 270 infectats. Tot i la seva gran patogenicitat, es van tenir severos problemes a l'hora d'aïllar el focus contaminant. Per aquest motiu, vàries empreses agrícoles en sortiren perjudicades sense motiu.

El que es va fer, doncs, va ser buscar també la presència de *E. coli* als bitllets. Per tant, sorgí una nova pregunta inicial:

- És habitual la presència d'enterobacteris al paper moneda?
- Entre aquests enterobacteris, és possible aïllar *Escherichia coli*?

3.2 - MÈTODE D'ESTUDI:

Després de considerar la poca superfície de contacte de la que es disposava estudiant la superfície dels bitllets, i de fer una consulta a la casa comercial Microkit S.L., es va decidir que el millor mitjà per obtenir les mostres d'aquest treball seria utilitzar laminocultius, adquirits també a Microkit S.L.

Els laminocultius són una alternativa a les plaques de contacte. Consten d'una làmina flexible que facilita el contacte total entre el medi de cultiu i la superfície a analitzar, aconseguint una major comoditat en la seva manipulació que en la de plaques de contacte. És un mètode senzill, ràpid i eficaç que permet fer el mostreig en un temps relativament curt.

En el meu treball de recerca s'utilitzaran els laminocultius MIX, D-HACCP i STAF/LIS de la casa Microkit. Les característiques de cada un es troben explicades més endavant, englobades a l'apartat 3.2.1 – *Recompte*.

Una vegada es van haver adquirit els laminocultius, es va fer un tempteig inicial per veure si realment la superfície del bitllet era una bona base a estudiar, o si s'hauria de canviar la trajectòria del treball. Per tant, es va realitzar un contacte amb un bitllet de 20€. Els resultats, com es veurà al corresponent apartat, van ser molt favorables i es va decidir continuar en la mateixa línia de recerca.

Amb el primer contacte, es va determinar la nomenclatura que s'utilitzaria al llarg de tot el treball. Aquesta consisteix en, primerament, indicar numèricament el valor del bitllet, seguidament, amb una lletra pre-assignada segons el medi on havia crescut la colònia (G pel general, E per selectiu per enterobacteris, F per selectiu per fongs i llevats, S per estafilococs i L per listèries), indicar de quina làmina dels laminocultius ha crescut la colònia i per finalitzar, l'estat d'utilització del bitllet, és a dir, si era nou (N) o usat (U), o en el cas del primer contacte, semi nou (SN).

Durant el primer tempteig també es va decidir que els laminocultius es cultivarien a una temperatura d'entre 34 i 37°C, per afavorir només el creixement de potencials patògens.

Quan es va comprovar que tant el mètode d'obtenció de mostres, com la temperatura de cultiu donaven bons resultats, es va prosseguir amb l'experiment, repetint els contactes amb bitllets de diferents valors i estats d'utilització.

Es van seleccionar les colònies més representatives i se'n van obtenir cultius purs, els quals es van tenyir mitjançant la tinció de Gram, que va permetre identificar la morfologia i Gram dels bacteris. Aquesta nova informació va permetre agrupar soques, fet que va reduir molt el nombre de mostres problema, facilitant-ne la manipulació i

tractament.

A partir d'aquí, es van realitzar proves bioquímiques per a la identificació dels bacteris, específiques segons fossin cocs o bacils i el signe del Gram amb l'ajuda de Lluïsa Bartrina. La identificació de les listèries, degut al seu alt risc patològic, va ser duta a terme als laboratoris del SIGMA d'Olot, per la especialista Dolors Herrero.

Per a la identificació de l'únic fong pluricel·lular que va créixer a una temperatura de 36°C es va recórrer de nou als laboratoris MICROKIT, els quals disposen d'una secció de consultes tècniques que pot resultar molt útil. Malauradament, no en va ser possible la identificació.

Una vegada identificats els microorganismes i haver comprovat que alguns d'ells eren patògens, es van realitzar nous contactes per a comparar quantitativament la flora present a bitllets xinesos, constituïts completament per fibra vegetal. No es van observar diferències significatives, de la mateixa manera que tampoc no se'n van trobar entre bitllets de major i menor ús, tal i com es pot comprovar més endavant a l'apartat 4 – *Resultats*.

Per concloure ja la part experimental d'aquest treball, es va realitzar una rèplica del segon contacte, és a dir, el que es va realitzar amb bitllets de valor 5, 10 i 100€, tot i que es va suprimir la variable de nou/usat, doncs com ja s'ha dit, no s'havia observat cap mena de diferència significativa entre uns i altres. Aquests nous contactes es van cultivar a temperatura ambient amb l'objectiu que hi creixés el major nombre de colònies possible i per tant, tenir una visió general de la població on es troben els patògens aïllats.

3.2.1 - RECOMPTE:

En aquest apartat del treball s'aprofundirà en els coneixements necessaris per a entendre tot el procés de sembra i recompte de colònies.

Com ja s'ha especificat a l'apartat anterior, en aquest treball s'han utilitzat laminocultius amb qualitats diferents per obtenir les mostres. Tot i així, abans de concretar les característiques d'aquests, cal explicar què és un medi de cultiu i quins tipus n'hi ha.

3.2.1.1 - MEDIS DE CULTIU:

Un medi de cultiu és una solució o substrat de nutrients preparat per al creixement i multiplicació dels microorganismes al laboratori. Estan pensats per a fer possible l'aïllament de diferents espècies, tant bacterianes com micòtiques i així facilitar-ne la identificació i estudi.

Els medis de cultiu han de seguir una sèrie de requisits, especificats a continuació, per a complir bé la seva funció:

1. Contenir els productes necessaris per al creixement del microorganisme sembrat, així com les substàncies de suport en la proporció adequada per no inhibir el seu desenvolupament.
2. Ser estèril i trobar-se envasat en recipients (tubs, plaques, etc.) que contribueixin a mantenir l'estat d'esterilitat i facilitin el seu maneig.
3. Posseir els factors clau per al desenvolupament dels microorganismes: pH, pressió osmòtica, etc.

Hi ha molts tipus de medis de cultiu, segons la utilitat que se'ls vulgui donar. Així doncs, els podem classificar segons la seva consistència o utilització.

Segons la seva consistència, trobem tres tipus diferents:

- **Líquids o caldos**, els quals no contenen cap substància gelificant. Acostumen a trobar-se continguts en tubs d'assaig, tot i que també poden trobar-se embotellats. S'utilitzen generalment per l'enriquiment o la identificació.
- **Semisòlids o fluids**.
- **Sòlids**, sovint continguts en plaques o laminocultius, així com en tubs, tot i que també rarament se'n troben embotellats. Es divideixen en dos grans grups:
 - Inicialment líquids, classificats segons la seva reversibilitat d'estat:
 - **Reversibles**: es poden liquar després de la seva solidificació. Són de fàcil conservació.
 - **Irreversibles**: no es poden tornar a liquar. Inicialment sòlids, distingits en dos grans grups segons la naturalesa química de l'agent solidificant,

que pot ser orgànic o inorgànic.

Segons la seva utilització, sorgeix una nova classificació:

- **Medis generals:** permeten el creixement d'una àmplia varietat de microorganismes sense exigències nutritives especials. Un exemple d'aquest tipus de medi, el qual s'ha utilitzat al llarg del treball, és l'agar CLED.
- **Medis enriquits:** són medis generals als quals s'han addicionat substàncies altament nutritives, com ara sang o sèrum, que estimulen el creixement de determinats microbis. Un exemple d'aquest tipus de medi, el qual s'ha utilitzat al llarg del treball, és l'agar sang, també anomenat COLUMBIA.
- **Medis d'enriquiment:** medis de cultiu que afavoreixen el creixement d'un determinat microbi i inhibeixen el d'altres.
- **Medis diferencials:** permeten la distinció entre dos espècies pròximes. Un exemple d'aquest tipus de medi, el qual s'ha utilitzat al llarg del treball, és l'agar McConkey, el qual és selectiu per enterobacteris i diferencial per als fermentadors de la lactosa.
- **Medis selectius:** aconseguen la selectivitat alterant les condicions físiques del medi, és a dir, amb canvis de pH o pressió osmòtica, o afegint compostos químics, com ara antibiòtics. Un exemple d'aquest tipus de medi, el qual s'ha utilitzat al llarg del treball, és l'agar Chapman.
- **Medis diferencials:** inclouen alguna substància, ja siguin indicadors de pH, fonts nutritives, etc., que posen en manifest les característiques metabòliques d'un microorganisme i el diferencien d'altres microorganismes que creixen en el mateix medi. Per posar un exemple d'aquest tipus de medi, trobem l'agar CLED i l'agar McConkey, els quals són diferencials per als fermentadors de lactosa.
- **Medis especials:** són els medis utilitzats per al cultiu de microorganismes molt particulars, o per a dur a terme una determinada prova bioquímica.

En aquest treball de recerca s'ha utilitzat el mètode de cultiu amb medi sòlid, concretament, com ja s'ha dit, per mitjà de laminocultius.

Al següent apartat trobarem l'explicació sobre què és un laminocultiu i quins avantatges comporta.

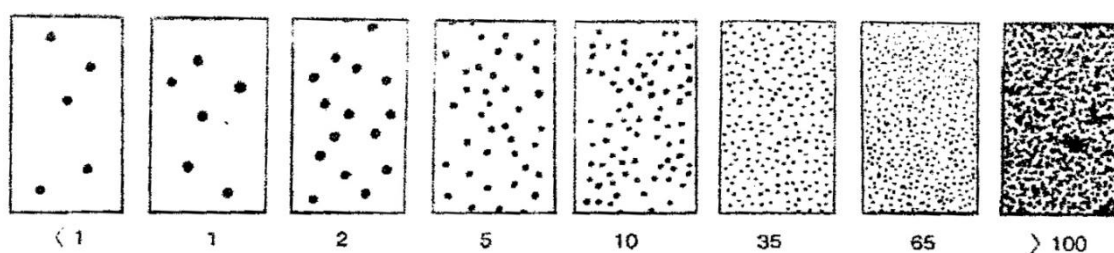
3.2.1.2 - UTILITZACIÓ DE LAMINOCULTIUS I SEMBRA PER CONTACTE:

Un laminocultiu és un tipus de medi que es presenta a mode d'una làmina adherida al tap que tanca hermèticament un tub de plàstic transparent. La làmina està revestida, per ambdós costats, amb un medi de cultiu convex. Aquesta làmina és flexible, fet que contribueix a que els anàlisis de superfícies es realitzin amb major comoditat.

Cada model de laminocultiu està constituït per dos medis de cultiu diferents, un a cada costat de la làmina, específics per a un tipus d'anàlisi. Aquests cultius poden ser tant generals com selectius.

El mètode d'utilització dels laminocultius és senzill. Tan sols precisa seguir els següents passos:

1. Desenroscar el tap vigilat no tocar els medis de cultiu amb els dits.
2. Tocar la superfície a analitzar (en aquest cas, el bitllet) exercint una lleu pressió i sense desplaçar-lo durant 10 segons.
3. Repetir el procés amb l'altra medi de la làmina en una superfície molt pròxima, tot i que mai exactament la mateixa.
4. Tornar a enroscar el laminocultiu al tub sense forçar al màxim.
5. Etiquetar el pot.
6. Incubar en posició vertical, preferiblement amb el tap a dalt, durant el temps i temperatura que es requereixi.
7. Passat el període d'incubació, es compara visualment la concentració de colònies de cada medi amb les taules de resultats incloses a continuació:



Aquests valors indiquen, per a contactes, els resultats donats en UFC o microorganismes/cm².

Amb aquest sistema de recompte s'obté un resultat quantitatiu basat en que cada colònia ha crescut a partir d'un microorganisme inicial. Per tant, el nombre de colònies de cada cara indica el nombre de microorganismes que es trobaven en els 8 cm² de superfície analitzats amb cada medi, però, per comparació amb els dibuixos anteriors, podem determinar el nombre d'UFC/cm².

3.2.1.3 - UTILITZACIÓ DE MEDIS GENERALS, DIFERENCIALS I SELECTIUS:

La identificació d'una colònia no es basa en una valoració quantitativa, que hem conegut a l'apartat anterior, sinó en el creixement en medis selectius per obtenir més informació. Tot i així, abans d'acceptar per bona una identificació, s'haurà de recolzar el resultat amb proves bioquímiques o immunològiques.

En aquest treball s'han utilitzat tres tipus diferents de medis, en quant a presentació: laminocultius, plaques d'agar i tubs. Trobem medis diferencials i selectius en laminocultius i en plaques.

Com ja s'ha explicat anteriorment, s'han utilitzat tres laminocultius diferents de la casa DESINFECTEST®, distribuïts per l'empresa Microkit. Analitzats amb detall, trobem que tenen les següents característiques:

- **MIX:** com tots els laminocultius, conté dos medis, un a cada costat de la làmina. Per una banda, trobem el medi TTC, el qual és un medi de recompte total i com a tal, permet el creixement de bacteris i fongs.

Per l'altra banda, trobem el medi Rosa de Bengala, el qual és un medi selectiu, doncs inhibeix el creixement de colònies bacterianes i només deixa créixer colònies de llevats o floridures.

LABORATORIOS MICROKIT, S.L.
TF:91-8974616 Fax:91-8974641
28210-Valdemorillo (Madrid)

CERTIFICADO DE CONTROL DE CALIDAD

PRODUCTO: DESINFECTEST MIX

MEDIOS: NEUTRALIZING TTC/ROSA BENGALA CAF. CONTROL FISICO PREPARADO: Estéril, Incoloro/Rosa
pH FINAL ANTES ESTERILIZACION: 7,8/7,2

El pH (la conductividad máxima recomendada en el agua para elaborar medios de cultivo preparados es de 5 µS; la muestra tiene: 0,7 µS) certificado con tolerancia ± 0,2, corresponde al día de fabricación y antes de la esterilización. Una atmósfera rica en CO₂ y el autoclavado suelen bajar el pH hasta 0,1-0,4, pero sin llegar a afectar la calidad del medio.

Control realizado en las instalaciones de MICROKIT. Para evitar amplificar problemas, es prudente repetirlo en su laboratorio tras el transporte, tras almacenamientos prolongados, tras desinfecciones del laboratorio, tras fallos en la T° u oscuridad de almacenamiento, tras adquirir aspectos extraños u otras eventualidades, aunque no haya llegado la fecha de caducidad óptima. Los resultados de este informe son aplicables directamente a la muestra que se ha analizado del producto que se certifica; y, estadísticamente, al resto del medio.
LIBRE de materias primas sospechosas de portar el agente infeccioso BSE.

CRECIMIENTO/INHIBICION DE CEPAS (Temperatura y Tiempo: Ver Manual)

Staphylococcus aureus MKTA 6538P: Colonias rojas en 48 h en cara incolora, inhibido en cara rosa.

Pseudomonas fluorescens MKTA 13525: Colonias rojas en cara incolora, inhibido en cara rosa.

Escherichia coli MKTA 10536: Colonias rojas en cara incolora, inhibido en cara rosa.

Candida albicans MKTA 10231: Colonias típicas enormes en ambos medios.

Aspergillus niger MKTA 1015: Colonias filamentosas, amarillas con centro negro en ambos medios.

No hermético: Tras 1 mes de control de esterilidad sale perfecto, pero el transporte podría alterarlo.

Las colecciones TIPO prohíben el uso de su referencia por lo que indicamos la muestra, directamente trazable a la colección TIPO.

LOTE: 110210018 2 61 CADUCIDAD: 30/07/2011

La caducidad marcada indica la fecha de consumo PREFERENTE siempre que se sigan las instrucciones de conservación y uso indicadas en la etiqueta.

Declaración de conformidad: CUMPLE con los requisitos de calidad expuestos.

Observaciones (si hay desviaciones que no afectan la conformidad del producto)://

FECHA DEL MUESTREO Y FIRMA DEL RESPONSABLE DE CONTROL DE CALIDAD QUE AUTORIZA SU VENTA: 11/03/2011

PRT PR0301 Formato creado en 1992. Actualizado el 27/05/2005

- **STAF/LIS:** conté també dos medis. El medi de color crema és el Medi Baird Parker, selectiu per a cocs grampositius, ja siguin estafilococs o micrococs. A més, és diferencial gràcies a la inclusió de lécitina d'ou i tel·luri potàssic que

provoquen que les colònies de *Staphylococcus aureus* creixin de color negre i envoltats per un halo transparent, tirant a blanquinós.

El medi de color vermellós és agar Palcam, selectiu i diferencial per a listèries, on *Listeria monocytogenes*, potencial patògen, creix en forma de colònies verdoses envoltades per un halo marró-negrós. L'ennegrimment del medi també és indicador de la seva presència.

LABORATORIOS MICROKIT, S.L.
TF:91-8974616 Fax:91-8974641
28210-Valdemorillo (Madrid)

CERTIFICADO DE CONTROL DE CALIDAD

PRODUCTO: DESINFECTEST STAF/LIS

MEDIOS: Baird Parker/Palcam CONTROL FISICO PREPARADO: Estéril, Crema/Rojizo
pH FINAL ANTES ESTERILIZACION: 6,8/7,2

El pH (la conductividad máxima recomendada en el agua para elaborar medios de cultivo preparados es de 5 µS; la nuestra tiene: 0,7 µS) certificado con tolerancia ± 0,2, corresponde al día de fabricación y antes de la esterilización. Una atmósfera rica en CO₂ y el autoclavado suelen bajar el pH hasta 0,1-0,4, pero sin llegar a afectar la calidad del medio.
Control realizado en las instalaciones de MICROKIT. Para evitar amplificar problemas, es prudente repetirlo en su laboratorio tras el transporte, tras almacenamientos prolongados, tras desinfecciones del laboratorio, tras fallos en la T° u oscuridad de almacenamiento, tras adquirir aspectos extraños u otras eventualidades, aunque no haya llegado la fecha de caducidad óptima. Los resultados de este informe son aplicables directamente a la muestra que se ha analizado del producto que se certifica; y, estadísticamente, al resto del medio.
LIBRE de materias primas sospechosas de portar el agente infeccioso BSE.

CRECIMIENTO/INHIBICION DE CEPAS (Temperatura y Tiempo: Ver Manual)
Staphylococcus aureus MKTA 6538P: Colonias negras halo transparente en B. Parker. Inhibidas en Palcam.
Listeria monocytogenes MKTA 7644: Colonias verdes, viran a negro Palcam. Inhibidas en Baird Parker.
No hermético: Tras 1 mes de control de esterilidad sale perfecto, pero el transporte podría alterarlo.
Las colecciones TIPO prohíben el uso de su referencia por lo que indicamos la nuestra, directamente trazable a la colección TIPO.

LOTE: 1102 2 1737 9 CADUCIDAD: 17/06/2011
La caducidad marcada indica la fecha de consumo PREFERENTE siempre que se sigan las instrucciones de conservación y uso indicadas en la etiqueta.
Declaración de conformidad: CUMPLE con los requisitos de calidad expuestos.
Observaciones (si hay desviaciones que no afectan la conformidad del producto)://
FECHA DEL MUESTREO Y FIRMA DEL RESPONSABLE DE CONTROL DE CALIDAD QUE AUTORIZA SU VENTA: 17/02/2011
PRT PR0301 Formato creado en 1992. Actualizado el 27/05/2005

- **HACCP:** disposa d'una làmina de TTC i per tant, el podem considerar una rèplica del recompte total que es duu a terme amb el laminocultiu MIX. L'altre medi és el VRBG (Violet Red Bile Glucose), que conté sals biliars i per tant, és selectiu per enterobacteris.

LABORATORIOS MICROKIT, S.L.
TF:91-8974616 Fax:91-8974641
28210-Valdemorillo (Madrid)

CERTIFICADO DE CONTROL DE CALIDAD

PRODUCTO: DESINFECTEST ARICPC/HACCP/APPCC

MEDIOS: NEUTRALIZING TTC/VRBG CONTROL FISICO PREPARADO: Estéril, Incoloro/Púrpura
pH FINAL ANTES ESTERILIZACION: 7,8/7,4

El pH (la conductividad máxima recomendada en el agua para elaborar medios de cultivo preparados es de 5 µS; la nuestra tiene: 0,7 µS) certificado con tolerancia ± 0,2, corresponde al día de fabricación y antes de la esterilización. Una atmósfera rica en CO₂ y el autoclavado suelen bajar el pH hasta 0,1-0,4, pero sin llegar a afectar la calidad del medio.
Control realizado en las instalaciones de MICROKIT. Para evitar amplificar problemas, es prudente repetirlo en su laboratorio tras el transporte, tras almacenamientos prolongados, tras desinfecciones del laboratorio, tras fallos en la T° u oscuridad de almacenamiento, tras adquirir aspectos extraños u otras eventualidades, aunque no haya llegado la fecha de caducidad óptima. Los resultados de este informe son aplicables directamente a la muestra que se ha analizado del producto que se certifica; y, estadísticamente, al resto del medio.
LIBRE de materias primas sospechosas de portar el agente infeccioso BSE.

CRECIMIENTO/INHIBICION DE CEPAS (Temperatura y Tiempo: Ver Manual)
Staphylococcus aureus MKTA 6538P: Colonias rojas en 48 h en cara incolora.
Pseudomonas fluorescens MKTA 13525: Colonias rojas en cara incolora.
Escherichia coli MKTA 10536: Colonias rojas en ambos medios.
Salmonella abony NCTC 6017: Colonias rojas en ambos medios.
No hermético: Tras 1 mes de control de esterilidad sale perfecto, pero el transporte podría alterarlo.
Las colecciones TIPO prohíben el uso de su referencia por lo que indicamos la nuestra, directamente trazable a la colección TIPO.

LOTE: 012111005 2 61 CADUCIDAD: 18/10/2011
La caducidad marcada indica la fecha de consumo PREFERENTE siempre que se sigan las instrucciones de conservación y uso indicadas en la etiqueta.
Declaración de conformidad: CUMPLE con los requisitos de calidad expuestos.
Observaciones (si hay desviaciones que no afectan la conformidad del producto)://
FECHA DEL MUESTREO Y FIRMA DEL RESPONSABLE DE CONTROL DE CALIDAD QUE AUTORIZA SU VENTA: 04/03/2011
PRT PR0301 Formato creado en 1992. Actualizado el 27/05/2005

Al llarg del treball s'han requerit també plaques d'agar per a motius diversos, ja fos per obtenir cultius purs d'una determinada colònia (en medi general), com per obtenir més informació del tipus de microorganisme que es tractava (selectiu i diferencial).

Així doncs, trobem que dins els medis de cultiu utilitzats presentats en forma de placa, trobem:

- **COLUMBIA:** és un agar que conté sang, normalment de conill, i per tant és considerat un agar ric en quant a qualitats nutricionals. Permet el creixement de la gran majoria de bacteris aerobis, inclosos aquells més exigents i per aquest motiu és ideal per a obtenir cultius purs. A més, permet estudiar les reaccions hemolítiques de les diferents colònies bacterianes. Tot i així, en aquest treball només s'utilitzarà com a base per a realitzar les proves de la bacitracina i altres antibiòtics.
- **CLED:** és un medi de cultiu no inhibidor, és a dir, és un medi general. Conté lactosa i un indicador de pH. Per aquest motiu ens permet diferenciar aquells microorganismes que són fermentadors de la lactosa. Aquestes espècies formen colònies grogues i també engroguixen el medi.
- **McConckey:** és un medi selectiu i diferencial. Conté el colorant Cristall Violeta, el qual inhibeix el creixement de bacteris grampositius i fongs i per tant, permet que els bacils gramnegatius, normalment enterobacteris, creixin amb facilitat. La propietat diferencial li ve donada per l'indicador de pH, vermell neutre, que el fa virar de rosat a vermell quan es troba amb la presència d'un bacteri fermentador de la lactosa.
- **Manitol:** és un medi selectiu i diferencial que sols permet el creixement de cocs grampositius, com poden ser els estafilococs i micrococs. Aconsegueix l'especificitat gràcies al seu alt contingut en clorur de sodi. A més, també conté manitol i vermell de fenol com a indicador de pH. Si un organisme és capaç de fermentar el manitol, el vermell de fenol fa virar el medi a groc i per tant, és un medi diferencial per a fermentadors del manitol.
- **Chromocytogenes:** és un medi selectiu per a listèries i diferencial per a *Listeria monocytogenes*, entre d'altres. Per aquest motiu és útil per a determinar, a simple vista, gènere i espècie d'alguns microorganismes. Tot seguit s'adjunta una part de la fitxa tècnica del medi perquè quedi constància de l'aparença que adopten les diferents espècies.

Listeria monocytogenes MKTN 7644, Correcto, colònias verde-azuladas rodeadas de un halo opaco. Con respecto a PCA estandarizado, recuento medio 277-424 %, pero de forma selectiva. Incertidumbre debida a la cepa y a las diferentes proporciones de flora acompañante.
Listeria innocua MKTA 33090, Correcto, Colonias verde-azuladas sin halo opaco.
Enterococcus faecalis MKTA 29212, colonias incoloras.
Staph. aureus MKTA6538P, colonias incoloras.
E. coli MKTA 25922, inhibido.

3.2.2 - TIPIFICACIÓ:

En aquest apartat del treball s'aprofundiran en els coneixements necessaris per entendre tot el procés d'aïllament de microorganismes i els passos posteriors per arribar a identificar-los fins a gènere i espècie.

A partir dels contactes realitzats amb els laminocultius explicats anteriorment, s'obtenen cultius purs per ampliar el nombre d'individus d'una espècie determinada i se'n realitza una extensió i tinció de Gram per acotar les proves bioquímiques convenients.

A continuació s'ampliarà la tècnica i característiques de tots els passos previs a la identificació d'un microorganisme.

3.2.2.1 - OBTENCIÓ DE CULTIUS PURS:

Conceptes previs:

Un cultiu pur és un cultiu, ja sigui bacterià o micòtic, on només es troben individus d'una mateixa espècie.

Objectius:

- Obtenir colònies aïllades i pures dels microorganismes a estudiar.

Material:

- Guants i bata.
- Ansa de Kolle.
- Plaques de cultiu pur (en aquest treball, medi CLED).
- Laminocultius per obtenir la colònia a sembrar.
- Retolador resistent a l'aigua.

Tècnica:



1. Tocar la colònia a estudiar amb l'ansa de Kolle.
2. Destapar un dels medis de cultiu.
3. Sembrar el microorganisme per esgotament d'ansa.

4. Retolar la placa de cultiu amb el codi prèviament explicat.
5. Repetir el procés amb totes les colònies desitjades.
6. Incubar les sèmbrs a l'estufa de cultiu a una mitjana de 36°C.

Discussió:

El primer cultiu pur de l'estudi es va realitzar amb agar sang, però després de comprovar que el medi CLED també donava bon resultat, permetent el creixement de totes les colònies sembrades, es va decidir substituir COLUMBIA per CLED, doncs es disposava de més unitats d'aquest segon medi.

3.2.2.2 - EXTENSIÓ I TINCIÓ DE GRAM:

Conceptes previs:

Abans de realitzar la tinció de Gram, és necessari haver dut a terme una extensió per tal d'obtenir una pel·lícula fina i homogènia de la mostra sobre un portaobjectes, de manera que al observar posteriorment al microscopi, qualsevol zona d'observació sigui adequada.

La tinció de Gram, una prova morfològica, és una de les primeres proves que s'acostuma a practicar quan es vol fer una identificació bacteriana. Es basa en l'acció de quatre reactius, com es veurà més endavant, dins d'aquest mateix apartat, a *Material*. Les seves funcions són classificar els bacteris segons el seu Gram (positiu o negatiu) i permetre estudiar la seva morfologia (cocs, vibris, bacils o espirils), així com les agrupacions que formen.

La diferència principal entre bacteris grampositius i els bacteris gramnegatius és que, en el primer cas, consten d'una paret de peptidoglicà gruixuda que absorbeix fàcilment el cristall violeta de la tinció i per tant, s'observen de color violeta al microscopi. En canvi, els gramnegatius tenen una paret de peptidoglicà més fina i recoberta per una capa de lípids que impedeixen l'absorció del cristall violeta i per tant, es mostren colorats de vermell per l'acció de la safranina. Aquest procés s'entendrà millor a *Material*, on s'expliquen les característiques de cada reactiu i la seva funció.

Objectius:

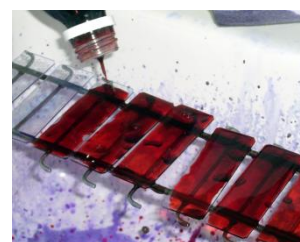
- Obtenir extensions de cada mostra bacteriana, adequades per a l'observació microscòpica, per a preparar la tinció de Gram.
- Determinar mitjançant el microscopi òptic la morfologia i el Gram de les mostres bacterianes.

Material:

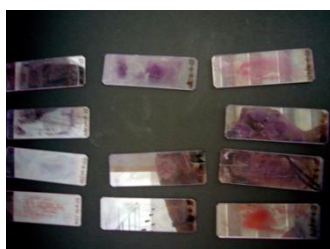
- Guants i bata.
- Plaques de cultiu pur sembrades recentment, doncs és necessari que les colònies siguin joves degut a que alguns microorganismes són grampositius només durant la fase de creixement.
- Anses de Kolle (una per colònia bacteriana a estendre).
- Sèrum fisiològic estèril.
- Portaobjectes (sense diferències entre esmerilats i no esmerilats).
- Paper de laboratori.
- Renglera de portaobjectes.
- Aigua de l'aixeta.
- Retolador resistent a l'aigua.
- Cinta adhesiva.
- Reactius de la tinció de Gram:
 - **Reactiu 1 (Cristall violeta):** colorant lila que tenyeix tots els bacteris.
 - **Reactiu 2 (Lugol):** actua com a mordent fent penetrar el cristall violeta a la paret cel·lular dels bacteris.
 - **Reactiu 3 (Alcohol):** decolora els bacteris gramnegatius, degut a que dissol la típica capa externa de lípids, que és la que havia quedat tenyida. Per tant, els bacteris grampositiu queden tenyits de violeta, mentre els gramnegatius queden decolorats.
 - **Reactiu 4 (Safranina):** colorant vermell que tenyeix els dos tipus de bacteris (tant positius com negatius) i per tant, els grampositiu queden d'un color lila fosc degut a la superposició dels dos colorants, mentre els gramnegatius queden tenyits de vermell, doncs havien estat decolorats anteriorment.
- Adhesiu DPX.
- Cobreobjectes.
- Capil·lar no heparinitzat.



Tècnica:



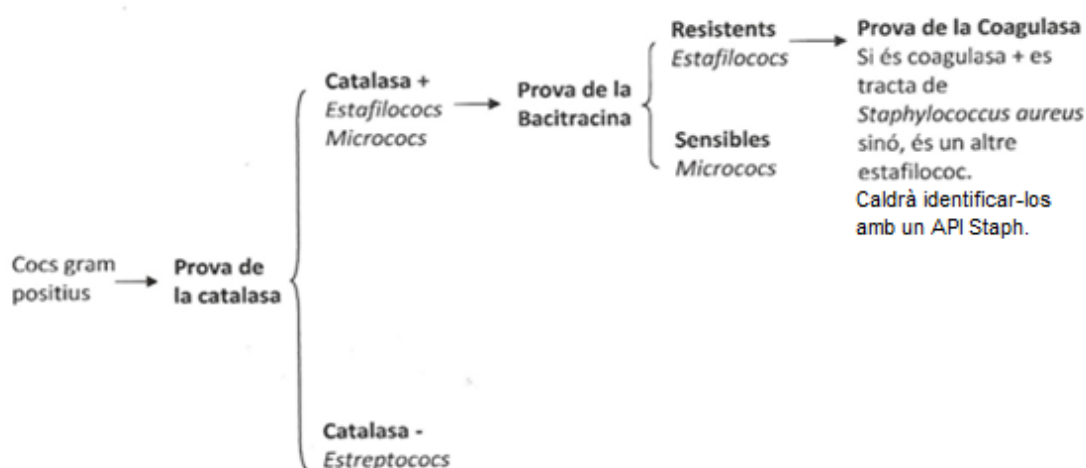
1. Netejar un portaobjectes amb paper de laboratori.
2. Aplicar-hi una gota de sèrum fisiològic.
3. Prendre un parell de colònies bacterianes amb l'ansa de Kolle d'una placa de cultiu pur.
4. Submergir l'extrem de l'ansa de Kolle que conté els bacteris en la gota de sèrum fisiològic.
5. Dispersar les colònies bacterianes en el sèrum de manera que no se'n pugui diferenciar cap.
6. Retolar el portaobjectes i cobrir-ho amb cinta adhesiva per evitar que s'esborri més endavant, durant la tinció de Gram.
7. Deixar assecar la preparació de manera que no es formin gotes de sèrum.
8. Col·locar les extensions, ja seques, a la renglera de la pica.
9. Cobrir per complet tots els portaobjectes amb el primer reactiu, Cristall violeta.
10. Deixar actuar un minut el reactiu 1.
11. Obrir l'aixeta i treure l'excés de colorant de cada portaobjectes, inclinant quasi verticalment de manera que l'aigua llisqui per tot el vidre.
12. Repetir els punts 9, 10 i 11 per a la resta de reactius.
13. Deixar assecar la preparació i retirar la cinta adhesiva.
14. Aplicar tres gotes de DPX mitjançant el capil·lar no heparinitzat i col·locar el cobreobjectes.
15. Deixar assecar 24 hores en posició totalment horitzontal.
16. Observar les preparacions amb el microscopi òptic, preferiblement amb l'objectiu d'immersió i classificar els microorganismes segons morfologia i gram (veure a 4 – Resultats).



3.2.2.3 - PROVES BIOQUÍMIQUES PER A IDENTIFICAR ELS MICROORGANISMES:

Les proves bioquímiques a realitzar venen donades per la morfologia i Gram dels microorganismes. Així doncs, abans d'explicar amb detall en què consisteix cada prova, cal tenir clar l'itinerari a seguir per tal d'arribar a la identificació completa d'un microorganisme.

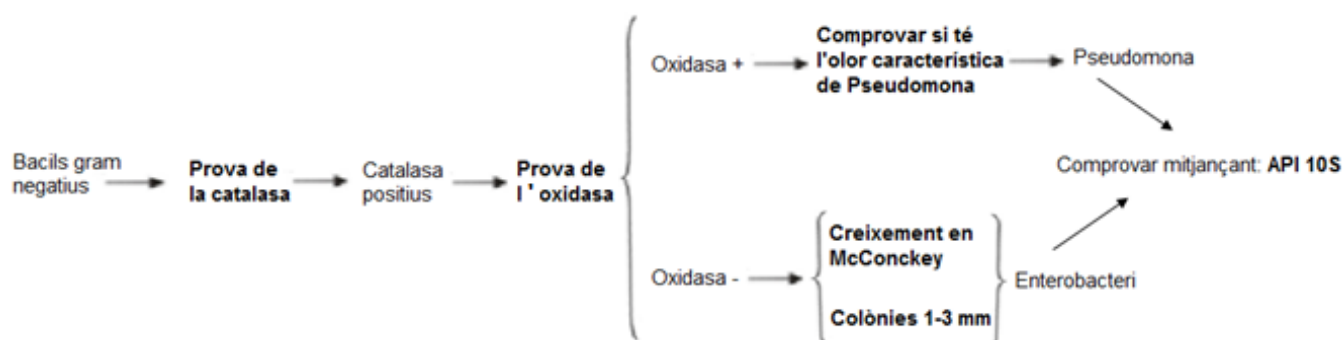
Comencem pel grup més comú, els cocs grampositius, que poden pertànyer al gènere *Staphylococcus*, *Streptococcus* o *Micrococcus*. Diferenciarem entre els tres gèneres gràcies a unes proves bioquímiques concretes, pautades a l'esquema següent, i explicades més endavant. Per a comprovar la seva naturalesa de coc grampositiu, a la vegada que per obtenir colònies recents per a les proves, s'ha sembrat cada microorganisme en el medi agar Manitol, explicat anteriorment.



Durant l'estudi realitzat no s'han aïllat cocs gramnegatius i per tant, no és necessari explicar el mètode d'identificació d'aquests.

Així doncs, seguirem amb el segon gènere més freqüent als estudis de superfícies: els bacils gramnegatius. Aquest grup de microorganismes està compost bàsicament per enterobacteris, tot i que també engloba altres microorganismes de gèneres diferents.

Per tant, el primer pas per a la seva identificació, a part de realitzar les proves de la catalasa i oxidasa, és sembrar les colònies en medi McConckey per a saber si es tracten d'enterobacteris o no. Finalment, es procedeix a identificar fins a gènere i espècie mitjançant un API 10S. Aquest procés queda detallat a l'esquema següent:



La identificació de bacils grampositius és molt més complexa i requereix material del qual no es pot disposar al laboratori de l'institut. Per tant, no es podrà realitzar la seva identificació i només es disposa de la identificació de listèries, també bacils grampositius, realitzada als laboratoris SIGMA.

Ara que ja s'ha pautat el tipus de proves necessàries en cada cas, s'explicarà amb detall les característiques de cada una.

Començarem amb les proves generals que s'han aplicat, com són la prova de la catalasa i la de l'oxidasa.

Prova de la catalasa:

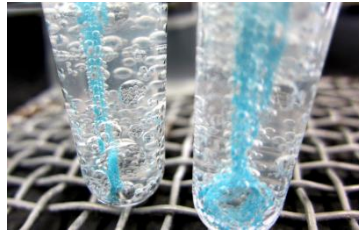
- **Objectius:** detectar la presència de l'enzim catalasa al bacteri estudiat.
Diferenciar, entre les espècies a estudiar, quines colònies pertanyen al gènere *Streptococcus* i quines no.

- **Conceptes previs:**
La catalasa és un enzim que actua sobre el peròxid d'hidrogen provocant la reacció següent: $2\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{catalasa}} 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2\uparrow$.
L'oxigen que es desprèn produeix un bombolleig en la prova de la catalasa, indicant un resultat positiu (catalasa +). Si no s'observa cap tipus de bombolleig immediat, direm que l'espècie és catalasa - .
El peròxid d'hidrogen es forma, de manera natural, com a producte terminal oxidatiu de la degradació aeròbica dels hidrats de carboni. Si s'acumula, resulta tòxic pels microorganismes i provoca la seva mort. Per tant, la catalasa és imprescindible per al seu desenvolupament i per aquest motiu, l'enzim forma part de la majoria de microorganismes aerobis i anaerobis facultatius.
Així doncs, permet la diferenciació entre:
 - Estreptococs (-) i micrococcs i/o estafilococs (+).
 - Bacils del gènere *Bacillus* (+) de *Clostridium* (-).

- **Material:**
 - Plaques de cultiu pur sembrades recentment.
 - Anses de Kolle.
 - Tubs d'assaig.
 - Peròxid d'hidrogen (H_2O_2), conegut popularment com aigua oxigenada.

- **Tècnica:**
 1. Omplir nou tubs d'assaig amb aigua oxigenada fins la meitat.
 2. Agafar una ansa de Kolle per a cada una de les nou mostres.

3. Amb l'ansa de Kolle s'agafen dues o tres colònies bacterianes de les plaques del cultiu pur.
4. Submergir l'ansa al tub d'assaig amb aigua oxigenada.
5. Observar si apareix o no bombolleig a la punta de l'ansa submergida.



- **Discussió:** és important no emprar colònies que hagin crescut en agar sang per a realitzar aquesta prova, doncs els hemòcits contenen catalasa i poden derivar en un fals positiu.

Prova de la oxidasa:

- **Objectiu:** determinar la presència de l'enzim citocrom oxidasa al microorganisme estudiat. Determinar si l'espècie problema és aeròbia o anaeròbia facultativa, o pel contrari, anaeròbia estricta.

- **Conceptes previs:**

Els microorganismes aerobis obtenen la seva energia mitjançant la respiració, procés pel qual l'oxigen molecular és reduït a partir d'un substrat orgànic procedent de la nutrició. L'enzim citocrom oxidasa fa possible aquest procés. Per aquest motiu, es detecta oxidasa als microorganismes aerobis o anaerobis facultatius.

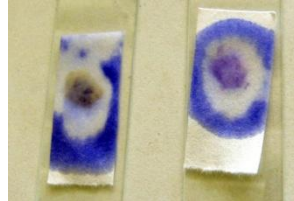
La prova de la oxidasa empra indicadors susceptibles de ser oxidats per l'oxidasa. Aquests, en estat reduït, són incoloros i al ser oxidats es pigmenten.

Aquesta prova s'empra per a la identificació de bacils gramnegatius.

- **Material:**
 - Plaques de cultiu pur sembrades recentment.
 - Pipeta Pasteur.
 - Ansa de Kolle.
 - Paper de filtre.
 - Portaobjectes.
 - Reactiu oxidasa.

- **Tècnica:**

1. Preparar 2 portaobjectes amb un tros de paper de filtre.
2. Dipositar 2-3 gotes de reactiu oxidasa al centre del paper de filtre.
3. Amb una ansa de Kolle, prendre 1-2 colònies de la placa de cultiu pur i estendre-les sobre el paper impregnat.
4. Observar si es produeix un canvi de color. Si aquest esdevé passats 10 segons aproximadament, s'aconsella repetir la prova.
Si canvia de color, és oxidasa +, i si no, oxidasa -.



- **Discussió:** es pot afegir el reactiu directament sobre la placa quan s'obté un resultat dubtós. Aquest mètode consisteix en aplicar directament 2-3 gotes del reactiu sobre algunes colònies i observar si es produeix algun canvi de color.



Una vegada concloes les explicacions de les proves generals, procedeixo a explicar les proves més específiques depenent de la naturalesa morfològica i el resultat de la prova de l'oxidasa.

Així doncs, procedim a explicar la prova de la Bacitracina, Novobiocina i de la coagulasa, totes elles per a la diferenciació dels cocs grampositius i catalasa+.

Prova de la Bacitracina i Novobiocina:

- **Objectius:** diferenciar els bacteris del gènere *Micrococcus* dels bacteris del gènere *Staphylococcus* mitjançant la Bacitracina.
Intentar identificar els cocs grampositius, coagulasa negatius, mitjançant la prova de la Novobiocina.
- **Conceptes previs:**
Els estafilococs són resistents a la bacitracina, mentre que els micrococcs són sensibles a aquesta. Aquest antibiòtic, produït per *Bacillus subtilis*, inhibeix la

formació de la paret cel·lular dels bacteris grampositius.

La Novobiocina és un antibiòtic produït per *Streptomyces niveus*, i és útil per a diferenciar *Staphylococcus epidermis* (sensibile a l'antibiòtic) d'altres cocs coagulasa negatius, que en són resistents.

- **Material:**

- Plaques de cultiu pur sembrades recentment.
- Anses de Kolle.
- Sèrum fisiològic estèril.
- Hisop estèril.
- Agitador de tubs.
- Plaques d'agar sang (Columbia).
- Disquets d'antibiòtic (Bacitracina i Novobiocina).
- Pinceres estèrils.
- Bata i guants.

- **Tècnica:**

1. Agafar amb una ansa de Kolle dues o tres colònies bacterianes de cada una de les plaques de cultiu pur.
2. Col·locar-les dins d'un tub amb sèrum fisiològic estèril.
3. Tapar el tub i agitar-lo amb l'agitador de tubs per dispersar els bacteris de les colònies i aconseguir un inòcul.
4. Sucar l'hisop amb l'inòcul del cultiu.
5. Passar l'hisop per tota la superfície del medi diverses vegades, procurant no deixar espais buits. S'aconsella resseguir també el contorn de la placa.
6. Prendre un disquet d'antibiòtic Bacitracina amb les pinceres i col·locar-lo. Posteriorment, prendre un disquet d'antibiòtic Novobiocina amb les pinceres i col·locar-lo també a la placa sembrada amb l'inòcul.
7. Incubar la placa sembrada a 37°C durant 24 hores.
8. Observar els resultats. Si la placa presenta halos d'inhibició superior a 12mm de diàmetre, el bacteri serà sensible a l'antibiòtic. Del contrari, seran resistents.



Prova de la coagulasa:

- **Objectius:** diferenciar, entre els estafilococs, l'espècie *Staphylococcus aureus*.

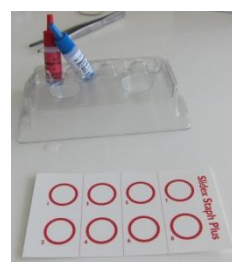
- **Conceptes previs:**

Aquesta prova s'utilitza únicament per diferenciar *Staphylococcus aureus* d'altres espècies del mateix gènere.

Staphylococcus aureus produeix coagulasa, que reacciona amb el fibrinogen. El mecanisme de coagulació involucra l'activació d'un factor plasmàtic, CRF, que reacciona amb la coagulasa formant un complex coagulasa-CRF. Aquest complex, en reaccionar amb el fibrinogen, produeix un coàgul.

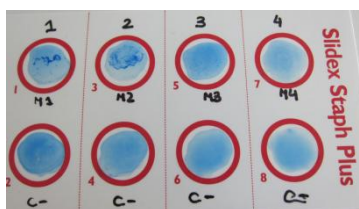
- **Material:**

- Plaques de cultiu pur sembrades.
- Cartró especial amb zones per a la reacció química.
- Vara o escuradents per mesclar.
- Reactiu (plasma de conill).



- **Tècnica:**

1. Omplir amb reactiu cada una de les zones marcades en el cartró.
2. Prendre una o dues colònies amb la vara i mesclar-les amb el reactiu.
3. Si no es produeix aglutinació instantània, mesclar durant 5-10 segons. Si apareix aglutinació passat aquest temps, es considerarà un resultat negatiu.
4. Observar el resultat; si ha aparegut aglutinació, ens trobem davant un exemplar de *Staphylococcus aureus*. Si no aglutina, és un altre tipus d'estafilococ.



Finalment, per a fer possible la identificació fins a espècie, es fa necessària un altre tipus de prova: el sistema de tira. Concretament, s'ha emprat dos models de tira diferents de la casa Biomerieux: API Staph i API 10s. El primer s'ha utilitzat per a la identificació d'estafilococs, mentre que la funció del segon és la identificació d'enterobacteris.

S'explicarà la pràctica d'ambdós sistemes en el mateix apartat, doncs el seu funcionament és el mateix.

Sistema de tira:

- **Objectiu:** arribar a poder conèixer l'espècie de les mostres bacterianes obtingudes.

- **Conceptes previs:**

La galeria API està formada per càpsules que contenen substrats deshidratats. Aquestes es cultiven amb un inòcul del bacteri que les rehidrata.

Cada càpsula representa una prova bioquímica, i la combinació de totes ens permetrà determinar el bacteri que estem intentant identificar, doncs al afegir algun reactiu o durant la incubació de la galeria, el metabolisme del microorganisme genera canvis en el color del medi. La interpretació d'aquests canvis es duu a terme mitjançant taules de lectura.

- **Material:**

- Plaques de cultiu pur sembrades recentment.
- Ansa de Kolle.
- Sèrum fisiològic estèril.
- Agitador de tubs.
- Pipeta Pasteur.
- Aigua.
- Galeries: API Staph i API 10s.
- Reactius específics per a cada galeria.
- Oli de Parafina.
- Guants i bata.
- Taules d'identificació.
- Retolador permanent.
- Estufa de cultiu.
- Guia d'API.

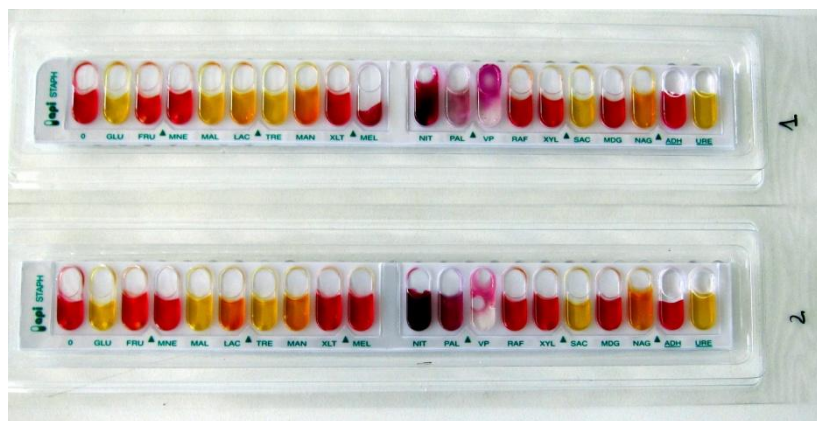
- **Tècnica:**


1. Preparació de l'inòcul:

- I. Prendre dues o tres colònies bacterianes del cultiu pur amb l'ansa de Kolle.
- II. Dipositar-les en un tub de sèrum fisiològic estèril.
- III. Agitar les mostres amb l'agitador de tubs per homogeneïtzar-les.
- IV. Retolar l'inòcul.

2. Preparació de la galeria:

- I. Omplir amb aigua la càmera humida de la galeria per evitar la deshidratació dels medis al incubar-los a l'estufa.
- II. Mitjançant una pipeta Pasteur, omplir cada una de les càpsules de la galeria amb l'inòcul del bacteri, més o menys fins a la meitat.
- III. Segellar amb una gota de parafina les reaccions que requereixen fer-se en anaerobiosi. Es diferencien perquè, a diferència de la resta, tenen el seu nom subratllat.
- IV. Tancar la galeria.
- V. Incubar la galeria a l'estufa durant 24 hores a 37°C.
- VI. Aplicar 1-2 gotes dels reactius corresponents, segons la guia, a la càpsula que ho precisi.
- VII. Llegir els resultats, seguint els canvis de color d'acord amb la guia, i omplir les taules d'identificació, de manera que s'obtingui una xifra de 7 dígits en el cas de l'API Staph, o de 4 en el cas de l'API 10s.
- VIII. Consultar la guia, o trucar a Biomerieux, per a identificar l'espècie bacteriana a partir del número obtingut.



API Staph	CE 07222 B REF.: <u>HOSTRA 1</u> <u>120111/16/129</u> Origine / Source / Herkunft / Origen / Origen / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :																																																																									
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">-</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td><td style="text-align: center;">2</td><td style="text-align: center;">4</td><td style="text-align: center;">1</td><td style="text-align: center;">2</td><td style="text-align: center;">4</td><td style="text-align: center;">1</td><td style="text-align: center;">2</td><td style="text-align: center;">4</td><td style="text-align: center;">1</td><td style="text-align: center;">2</td><td style="text-align: center;">4</td><td style="text-align: center;">1</td><td style="text-align: center;">2</td><td style="text-align: center;">4</td><td style="text-align: center;">1</td><td style="text-align: center;">2</td><td style="text-align: center;">4</td><td style="text-align: center;">1</td><td style="text-align: center;">2</td><td style="text-align: center;">4</td><td style="text-align: center;">1</td><td style="text-align: center;">2</td><td style="text-align: center;">4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">O</td><td style="text-align: center;">GLU</td><td style="text-align: center;">FRU</td><td style="text-align: center;">MNE</td><td style="text-align: center;">MAL</td><td style="text-align: center;">LAC</td><td style="text-align: center;">TRE</td><td style="text-align: center;">MAN</td><td style="text-align: center;">XLT</td><td style="text-align: center;">MEL</td><td style="text-align: center;">NIT</td><td style="text-align: center;">PAL</td><td style="text-align: center;">VP</td><td style="text-align: center;">RAF</td><td style="text-align: center;">XYL</td><td style="text-align: center;">SAC</td><td style="text-align: center;">MDG</td><td style="text-align: center;">NAG</td><td style="text-align: center;">ADH</td><td style="text-align: center;">URE</td><td style="text-align: center;">LSTR</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">2</td><td style="text-align: center;">6</td><td style="text-align: center;">3</td><td style="text-align: center;">6</td><td style="text-align: center;">4</td><td style="text-align: center;">5</td><td style="text-align: center;">1</td> </tr> </table>	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	O	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR	2	6	3	6	4	5	1	Imprimé en France / Printed in France
-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-																																																						
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4																																																			
O	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR																																																						
2	6	3	6	4	5	1																																																																				
Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy :	Ident. / Ταυτοποίηση :																																																																									

3.3 - SUPERFÍCIE ESTUDIADA:

Aquest treball de recerca, com ja s'ha explicat, es basa en l'estudi dels microorganismes presents al paper moneda. Per tant, s'ha treballat bàsicament amb bitllets d'euro.

Abans d'endinsar-nos en les característiques del bitllet europeu, recordarem una mica la seva història. El dia 1 de gener de 2002, l'euro es convertí en la moneda d'ús i circulació de dotze dels quinze Estats membres que en aquell moment formaven la Unió Europea. Fins el dia d'avui s'han anat sumant nous Estats a la Unió Europea, que també s'han afegit a l'eurozona, fins arribar a constituir disset dels vint-i-set Estats de la UE que funcionen amb l'euro.

La sèrie de bitllets en euros està format per bitllets de set valors diferents: 5€, 10€, 20€, 50€, 100€, 200€ i 500€. També existeixen monedes per valors 0.01€, 0.02€, 0.05€, 0.1€, 0.2€, 0.5€, 1€ i 2€.

Els bitllets, dissenyats per Robert Kalina, del banc central d'Àustria, tenen un rerefons molt simbòlic. Cada bitllet de valor diferent representa un estil arquitectònic europeu. Així doncs, trobem que el bitllet de menys valor (5€) representa l'estil clàssic, i el prossegueixen el romànic (10€), gòtic (20€), renaixentista (50€), barroc i rococó (100€), l'era del ferro i cristall (200€) i finalment, al bitllet de 500€, l'arquitectura moderna del segle XX. A l'anvers dels bitllets figuren finestres i portes, com a símbol de l'esperit d'obertura i cooperació europeus i les dotze estrelles de la UE que representen el dinamisme i harmonia de l'Europa contemporània. En el revers s'han representat ponts, símbol de la comunicació entre els pobles europeus i amb la resta del món.

Per a garantir l'autenticitat del bitllet, l'euro incorpora diferents elements de seguretat. Els més comuns són els que es comentaran a continuació:



1. Banda hologràfica: situada al marge dret de l'anvers de tots els bitllets. A l'inclinar el paper moneda, s'aprecia la xifra que indica el seu valor, així com el símbol de l'euro.



2. Línia de seguretat: situada en una zona pròxima al centre, és visible des de les dues cares. Al mirar el bitllet a contrallum s'observa una línia fosca.



3. Marca d'aigua: situada al marge esquerra de l'anvers de tots els bitllets. Al mirar el bitllet a contrallum, es pot apreciar una imatge que correspon amb l'art arquitectònic representat al bitllet, així com la xifra que indica el seu valor.



4. Banda iridiscent: visible al revers dels bitllets. Al inclinar el paper moneda, la banda iridiscent brilla sota una llum intensa.



En els bitllets de major valor, concretament a partir de 50€, trobem que s'han addicionat nous elements de seguretat:



5. Tinta de color variable: visible al revers del bitllet. Al inclinar el paper moneda, la xifra que indica el seu valor varia de morat a un color verd oliva.



Per finalitzar, només resta parlar de la composició material dels bitllets. Els bitllets d'euro s'imprimeixen sobre un paper fet a base de fibres de cotó. Aquestes fibres s'entreteixeixen de tal manera que donen lloc a un paper moneda absorbent. L'absorció fou pensada per evitar que els bitllets esdevinguessin greixosos amb el seu de les mans, o amb qualsevol fluid que els pogués caure, absorbint-lo cap a l'interior, doncs la circulació dels bitllets és constant i estan exposats a molts focus de brutícia, doncs ningú es renta les mans abans de tocar els diners.

Degut a aquest fet, s'ha deduït que la funció d'absorció no fa més que afavorir el creixement de microorganismes en la seva superfície, doncs hi troben fàcilment aliment i es creen unes condicions òptimes per a la seva existència.

Així doncs, una vegada introduït el bitllet de l'euro, s'explicarà sobre quin perfil de bitllet s'ha realitzat l'estudi.

Inicialment, l'estudi va començar amb tres variables independents diferents: bitllets de diferent valor, diferent estat d'utilització i/o desgast i finalment, comparativa amb bitllets d'altres països, concretament de Shangai.

Tot seguit, s'explicarà la raó per la qual es van escollir aquestes variables independents.

- **Variable Independent 1, bitllets de diferent valor:**

Considerant els bitllets de 5€ i 10€, deixant els de 20€ i 50€ com a intermedis, i la resta de valor elevat, salta a la vista d'immediat que no tots interpreten el mateix paper en la nostra vida quotidiana.

Així doncs, de la mateixa manera que els de valor més baix circulen constantment de mà en mà, d'altres com els de valor més elevat rarament veuen més enllà del caixer automàtic del banc, viatgen en sobres fins efectuar el pagament, i tornen a ingressar-se al banc.

Aquesta petita observació em va portar a pensar que es podien detectar canvis notoris entre els dos tipus de bitllet; concretament, de manera inicial pensava que els de menor valor, i que per tant tenen una major circulació, tindrien una comunitat bacteriana considerablement més important que els de major valor. Tot i així, l'alta temperatura a la qual estan sotmesos els bitllets de gran valor a l'interior del caixer automàtic podria considerar-se també un detonant a la proliferació de la vida microbiana.

Resumint, tot i que la meva hipòtesi inicial és que els bitllets de menor valor tindran una comunitat microbiològica major degut a que estan sotmesos a més agents contaminants, s'haurà de comprovar empíricament.

- **Variable Independent 2, bitllets en diferent grau d'utilització i/o desgast:**

En aquest apartat, el més difícil és determinar quin bitllet es considera nou i quin usat. Així doncs, s'han establert tres grups diferents: nou (N), seminou (SN) i usat (U).

El perfil del bitllet nou han estat bitllets que s'han anat a buscar expressament al banc i per tant, són llisos i nets.

El perfil del bitllet usat han estat bitllets que s'han buscat entre les caixes del bar de l'institut o de la papereria BUC, també de l'institut. S'ha determinat que per a considerar un bitllet com a usat, ha d'estar molt desgastat (rebregat, trencat...) i brut, com per exemple amb restes de menjar.

Aquesta diferència en la higiene del paper moneda pot afectar directament a la seva comunitat microbiològica, i per aquest motiu s'ha decidit fer l'estudi comparatiu.

A priori es creu que els bitllets en un estat higiènic més precari tindran una comunitat microbiològica més elevada.

- **Variable independent 3, bitllets de diferents països (Shangai):**

Aquest apartat va sorgir després de sentir en una tertúlia radiofònica que els bitllets europeus, concretament l'euro espanyol, destaca pel seu alt contingut en cocaïna, mentre que d'altres com els xinesos, pel seu alt contingut en microorganismes, i uns tercers, el bitllet australià, per ser pràcticament estèrils al estar constituïts per fibres sintètiques.

Així doncs, deixant de banda el tema de la cocaïna que no és l'eix d'aquest treball, es va decidir investigar també aquests camps. Malauradament no es van aconseguir bitllets australians i per tant l'estudi es va limitar a comparar el paper moneda xinès amb l'europeu.

4. Resultats

“Si busques resultats diferents, no facis sempre el mateix”.

Albert Einstein

4.1 - RECOMPTE DE COLÒNIES:

En aquest apartat és on es donaran els resultats numèrics de les colònies obtingudes amb els contactes que s'han realitzat amb laminocultius sobre bitllets.

Així doncs, es podrà comparar la diferència existent entre els bitllets de diferent valor, grau de desgast o procedència de país.

També s'han inclòs els resultats del primer tempteig inicial, amb un bitllet de 20€ seminou (20€/SN) l'objectiu del qual era només descobrir si la superfície dels bitllets era un bon lloc on realitzar contactes.

Cal recordar que tots els cultius s'han realitzat a una temperatura de 35-37°C, a no ser que s'indiqui el contrari i per tant, tota colònia aïllada és un possible potencial patògen.

Es procedeix a donar els resultats:

Tempteig inicial (20€/SN):			
Medis		Recompte	UFC/cm ²
STAF/LIS	STAF	4	<1
	LIS	4	<1
MIX	TTC	14	2
	Rosa de Bengala	0	0
HACCP	TTC	7	1
	VRBG	0	0

A continuació s'adjunten algunes imatges dels laminocultius resultants d'aquesta primera sembra:



Laminocultiu HACCP, medi TTC



Laminocultiu HACCP, medi VRBG



Laminocultiu MIX, medi TTC



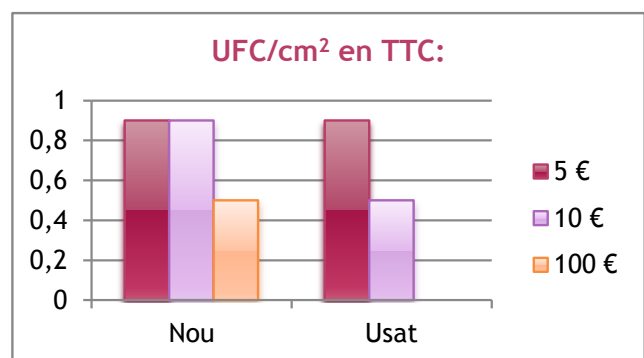
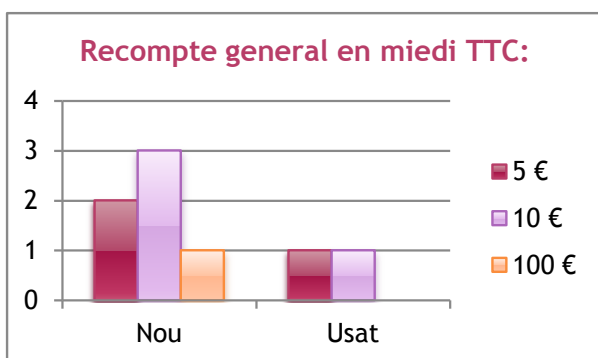
Laminocultiu MIX, medi Rosa de Bengala

Comparació de la comunitat en bitllets de diferents valors i graus d'utilització:

Valor (€)	Grau d'utilització	Medis		Recompte	UFC
5	U	STAF/LIS	STAF	0	0
			LIS	0	0
		MIX	TTC	1	<1
			Rosa de Bengala	1	<1
		HACCP	TTC	1	<1
			VRBG	0	0
	N	STAF/LIS	STAF	0	0
			LIS	0	0
		MIX	TTC	2	<1
			Rosa de Bengala	0	0
		HACCP	TTC	1	<1
			VRBG	0	0
10	U	STAF/LIS	STAF	1	<1
			LIS	2	<1
		MIX	TTC	0	0
			Rosa de Bengala	0	0
		HACCP	TTC	2	<1
			VRBG	0	0
	N	STAF/LIS	STAF	0	0
			LIS	1	<1
		MIX	TTC	2	<1
			Rosa de Bengala	0	0
		HACCP	TTC	3	<1
			VRBG	0	0
100	N	STAF/LIS	STAF	2	<1
			LIS	3	<1
		MIX	TTC	2	<1
			Rosa de Bengala	0	0
		HACCP	TTC	0	0
			VRBG	0	0

Com es pot observar a la taula, no ha estat possible trobar bitllets de 100€ usats, doncs no tenen una gran circulació i per tant, tenen menys risc a ser malmesos.

S'han buidat les dades de la taula en gràfics perquè resulti més fàcil d'interpretar:



Si es fan gràfics amb el nombre de colònies de laminocultiu TTC (fent prèviament la mitjana aritmètica dels resultats de la rèplica) veiem diferències poc significatives, tant en funció del valor, com si es comparen bitllets nous i usats. En general, la presència de microorganismes és baixa.

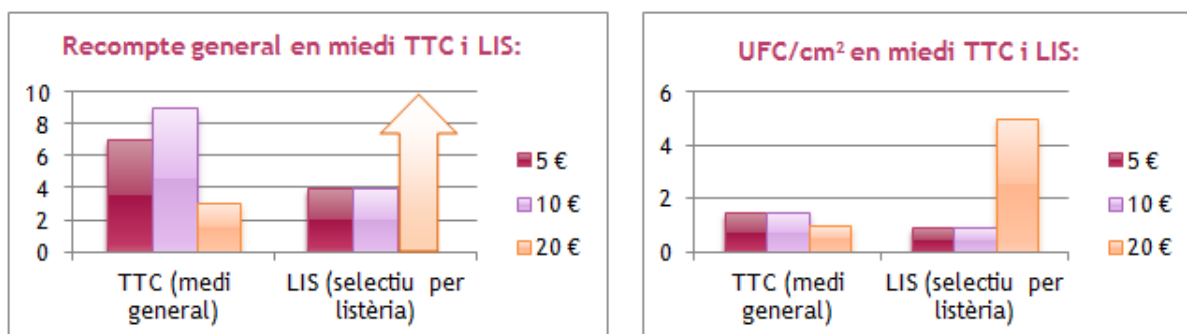
Utilitzant les taules de resultats de referència per donar les dades en UFC/cm², s'observa que no hi ha cap diferència significativa. Com a molt, es pot dir que els bitllets de major valor, és a dir, de 100€ contenen menys microorganismes.

Per tant, s'ha decidit excloure la variable independent nou/usat per la resta de l'experiment. A partir d'aquest moment, els contactes es realitzaran amb bitllets classificats com a seminous (SN), que s'han obtingut prestats de personal de l'institut.

Al ser bitllets corrents, que els individus portaven a la cartera, no ha estat possible obtenir bitllets de 100€. Per tant, els últims contactes amb euro es van realitzar amb bitllets de 5€, 10€ i 20€.

Comparació de la comunitat en bitllets de diferents valors:				
Valor (€)	Medis		Recompte	UFC/cm ²
5	STAF/LIS	STAF	2	<1
		LIS	4	<1
	MIX	TTC	3	<1
		Rosa de Bengala	0	0
	HACCP	TTC	10	2
		VRBG	0	0
10	STAF/LIS	STAF	5	<1
		LIS	4	<1
	MIX	TTC	13	2
		Rosa de Bengala	0	0
	HACCP	TTC	4	<1
		VRBG	0	0
20	STAF/LIS	STAF	1	<1
		LIS	incomptables	5
	MIX	TTC	2	<1
		Rosa de Bengala	0	0
	HACCP	TTC	4	<1
		VRBG	0	0

Es repeteix el buidatge de la taula en un gràfic de barres dels camps més interessants a comentar:



Els recomptes són lleugerament més elevats en els bitllets de valor inferior.

S'ha de remarcar l'elevada presència de listèries al bitllet de 20€. Cal considerar que els recomptes amb TTC d'aquest bitllet, que donen valors més baixos que en LIS, s'han fet per contacte en zones diferents del mateix paper moneda. De no ser així, el resultat seria contradictori, doncs és d'esperar un recompte més elevat en un medi general, com el TTC, que en un medi selectiu com LIS.

Donats aquests resultats tan sorprenents en quant a la quantitat de colònies patògenes aïllades al llarg dels contactes, i sobretot de listèries en aquests darrers, s'ha decidit realitzar una rèplica del primer experiment, suprimint igualment la variable independent de l'estat de desgast, però afegint un nou canvi: aquesta vegada es cultivarà a temperatura ambient per tal d'aconseguir el creixement del major nombre possible de microorganismes diferents.

Així doncs, els resultats revelats a la taula de a continuació no inclouen només potencials patògens, sinó tots aquells microorganismes capaços de viure a temperatura ambient i, per tant, la flora normal de la superfície dels bitllets.

La informació que s'obtindrà a continuació és molt important, doncs explicat amb un exemple numèric, si ens trobem davant d'una colònia patògena per cada 10 presents a la superfície del bitllet, podem dir que la situació és greu, fet que no s'originaria si ens trobéssim amb una patògena de cada 100.

Per posar un exemple a l'abast de tothom, prenem la ciutat d'Olot de 35.000 habitants. Si imaginem que entre aquesta població habiten 35 lladres (1‰ de la població), seria mala sort que ens creuéssim amb un d'ells i ens robés, doncs la immensa majoria de la població no suposa cap risc per a la nostra seguretat i benestar. En canvi, si entre aquests 35.000 habitants ens trobem que hi ha 350 lladres (105 de la població), la situació es converteix en alarmant, doncs la probabilitat de trobar-nos amb un delinqüent i sortir-ne perjudicats és molt més elevada que la de trobar-nos amb un

habitant que no suposi cap risc per a nosaltres.

S'adjunta la taula a continuació:

Comparació de la comunitat en bitllets de diferents valors a temperatura ambient:				
Valor (€)	Medis		Recompte	UFC/cm ²
5	STAF/LIS	STAF	2	<1
		LIS	2	<1
	MIX	TTC	4	<1
		Rosa de Bengala	1	<1
	HACCP	TTC	4	<1
		VRBG	4	<1
10	STAF/LIS	STAF	2	<1
		LIS	4	<1
	MIX	TTC	14	2
		Rosa de Bengala	1	<1
	HACCP	TTC	14	2
		VRBG	0	0
100	STAF/LIS	STAF	Incomptables	5
		LIS	Incomptables	5
	MIX	TTC	5	1
		Rosa de Bengala	0	0
	HACCP	TTC	9	2
		VRBG	0	0

Analitzant i comparant el creixement en TTC (medi general) de les tres últimes taules, es veu que la comunitat general no ha experimentat cap augment significatiu, ans al contrari, ha disminuït. Això es pot explicar perquè al cultivar a temperatura ambient han crescut gran quantitat de fongs pluricel·lulars que han envaït els medis i per tant, no ha deixat espai per al creixement de res més. Tot i així, per a considerar que la situació general del nombre de patògens enfront el creixement total no és alarmant, s'haurien d'haver obtingut uns creixements similars al creixement continu, i no ha estat el cas. Per tant, es pot dir que el paper moneda podria representar un medi de transmissió de malalties bacterianes, doncs hi predominen els microorganismes patògens.

Finalitzant ja l'apartat de recomptes, només cal detallar els resultats dels contactes

amb els bitllets de Shangai. Els laminocultius s'han cultivat també a una temperatura de 35-37°C i per tant, només ens trobem davant de microorganismes patògens. Com que ja s'ha explicat anteriorment l'objectiu d'aquests últims contactes, concretament a l'apartat 3.3 – *Bitllets estudiats*, es procedeix a adjuntar la taula.

Estudi de la comunitat en bitllets xinesos:

Valor	Medis		Recompte	UFC
	STAF/LIS	STAF	1	<1
		LIS	1	<1
	MIX	TTC	2	<1
		Rosa de Bengala	0	0
	HACCP	TTC	2	<1
		VRBG	0	0
	STAF/LIS	STAF	9	2
		LIS	3	<1
	MIX	TTC	4	<1
		Rosa de Bengala	0	0
	HACCP	TTC	0	0
		VRBG	0	0
	STAF/LIS	STAF	0	0
		LIS	0	0
	MIX	TTC	1	<1
		Rosa de Bengala	0	0
	HACCP	TTC	0	0
		VRBG	0	0
	STAF/LIS	STAF	0	0
		LIS	1	<1
	MIX	TTC	1	<1
		Rosa de Bengala	0	0
	HACCP	TTC	0	0
		VRBG	0	0

Tal i com es pot comprovar sense necessitat de gràfics, contràriament al que es pensava inicialment, la comunitat bacteriana d'aquests bitllets no és superior a la dels bitllets europeus. A més, en general, la presència de possibles patògens és més baixa.

4.2 - PROVA MORFOLÒGICA DE GRAM:

En aquest apartat es recollirà la informació que s'ha obtingut a partir de l'observació de les extensions tenyides amb els colorants del Gram.

Com ja s'ha explicat, aquest tipus de prova permet saber la morfologia i Gram dels bacteris. Per tant, també permet fer una classificació i agrupar alguns individus d'aspecte similar sota una mateixa mostra per a reduir espècies problema a l'hora de realitzar les proves bioquímiques i per tant, reduir hores de treball i material emprat.

S'han agafat algunes de les espècies més exemplars i/o abundants obtingudes a partir dels contactes amb bitllets d'euro i cultivats a una temperatura de 35-37°C. Per tant, el que s'identificarà seran només aquelles espècies amb probabilitats d'ésser patògenes.

S'han suprimit les listèries de la llista, doncs com ja s'ha explicat anteriorment, degut al risc que em suposaria un possible contagi, la seva identificació es durà a terme per professionals als laboratoris SIGMA.

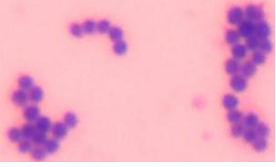
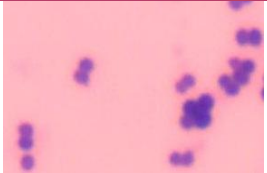
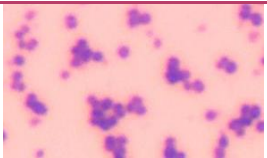






Així doncs, es prossegueix a adjuntar una taula amb els resultats obtinguts. Les colònies estan nomenades mitjançant la pauta preestablerta, especificada a l'apartat 3.2 – *Mètode d'estudi*.

Com fàcilment es pot observar, també s'han classificat dins la taula depenent del seu comportament enfront a la lactosa. Aquesta informació s'ha aconseguit degut a que els cultius purs s'han realitzat sobre medi CLED, diferencial per a fermentadors de la lactosa.

Morfologia i Gram dels microorganismes problema:				
	Gram +		Gram -	
	Fermentadors	No fermentadors	Fermentadors	No fermentadors
Cocs	G2, G3, S4, 100G1, 100G2	S1, 10G2/N, 100S	-	-
Bacils	5G2/U, 10G2/U	S2, 5G1/U, 5G2/N, 5G3/N, 10G1/U, 10G1/N, 10G3/N	G1, G4	10G4/N

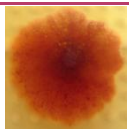


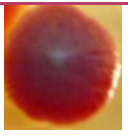


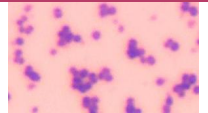

A partir d'aquestes dades, i observant la morfologia, s'han realitzat diverses agrupacions fins a reduir el nombre de mostres a 9.

Els grups obtinguts són els següents:

Cocs grampositius:			
Mostra	Individus	Lactosa	Aspecte
1	G2, G3, S4, 100G1, 100G2	Fermentadors	
2	S1	No fermentadors	
3	10G2/N, 100S	No fermentadors	
4	10G2/U	Fermentadors	
Bacils gramnegatiu:			
5	G1, G4	Fermentadors	
6	10G4/N	No fermentadors	
Bacils grampositius:			
7	5G2/U	Fermentadors	
8	S2, 5G2/N, 10G1/N	No fermentadors	
9	5G1/U, 5G3/N, 10G1/U, 10G3/N	No fermentadors	

4.3 - PROVES BIOQUÍMIQUES:

En aquest apartat es detallaran els resultats obtinguts després de cultivar les 9 mostres problema en medis selectius i diferencials, ja detallats a l'apartat 3.2.1 – *Recompte*, i sotmetre'ls a les proves bioquímiques especificades a 3.2.2 – *Tipificació*. Primerament, es donarà el resultat dels cocs grampositius. La identificació fins a espècie en aquestes mostres ha estat possible gràcies als sistemes de tira API Staph, dels quals s'ha obtingut un número i s'ha recorregut a Biomerieux per a la posterior identificació.

Identificació dels cocs grampositius:				
Mostra	1	2	3	4
Imatge macroscòpica				
Imatge microscòpica				
Morfologia	Coc	Coc	Coc	Coc
Gram	Positiu	Positiu	Positiu	Positiu
Creix. agar Chapman	Positiu	Positiu	Positiu	Positiu
Fermentació Lactosa	Positiu	Negatiu	Negatiu	Positiu
Fermentació Manitol	Positiu	Positiu	Negatiu	Positiu
Catalasa	Positiu	Positiu	Positiu	Positiu
Coagulasa	Positiu (?)	Positiu	Negatiu	Negatiu
Bacitracina	Resistent	Resistent	Resistent	Resistent
Novobiocina	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
Gènere	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>
Espècie i probabilitat (API Staph)	<i>St. haemolyticus</i> (90.1%) <i>St. aureus</i> (3%)	<i>St. aureus</i>	<i>St. epidermidis</i> (66%) <i>St. capitis</i> (32%)	<i>St. haemolyticus</i>

El resultat és obvi en les mostres 2 i 4, mentre que en les mostres 1 i 3 es plantegen dues possibles solucions a la incògnita. Com ja s'ha indicat a la taula, el fet que la mostra 1 sigui coagulasa positiu es contradiu amb el fet que tingui com a resultat més probable *St. haemolyticus*. Per aquest motiu, encara que percentualment sigui poc

important, s'ha considerat necessària la inclusió de *St. aureus* al ventall de resultats. En la mostra 3 també hi ha divergències de resultats, ocasionats perquè el nombre de l'API obtingut no s'ajusta amb exactitud a cap espècie concreta. Aquestes diferències en el nombre poden ser resultat de petites mutacions en el microorganisme. Ara que ja coneixem amb exactitud davant de quines espècies ens trobem, es farà un breu resum sobre el seu hàbitat habitual i s'explicarà si poden ser paràsits humans, produint malalties.

- ***Staphylococcus epidermidis***: forma part de la flora normal de la pell i mucoses humanes i es troba distribuït, de manera àmplia i en gran quantitat, sobre tota la superfície corporal.

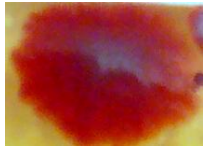
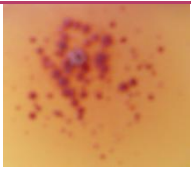
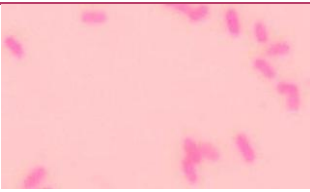

La seva predisposició a adquirir resistència contra antibiòtics permet que sobrevisqui a l'àmbit hospitalari, on pot esdevenir un paràsit oportunista i provocar algunes infeccions. Les infeccions més freqüents que ocasiona són, com ja s'ha dit, hospitalàries i per tant poden ser en línia dels exemples següents: endocarditis en vàlvules protèsiques (rarament en naturals), infecció en llocs d'entrada de catèters intravasculars...

- ***Staphylococcus haemolyticus***: es troba de la mateixa manera que *St. epidermidis*, tot i que sovint en menor quantitat. També causa el mateix tipus d'infeccions.
- ***Staphylococcus capitis***: forma part de la flora normal del cuir cabellut, cara, coll i orelles dels humans. Pot produir infeccions com pneumonia, cistitis, endocarditis i cel·lulitis.
- ***Staphylococcus aureus***: és una de les espècies més virulentes d'estafilococs que es coneixen. Forma part de la flora normal de la narius, nasofaringe, regió perineal i pell humana. És el causant de la majoria d'infeccions cutànies, així com de ferides i teixits profunds. Moltes d'aquestes infeccions poden esdevenir fatals si no es tracten i guareixen de forma adequada, doncs la majoria involucren una intensa supuració i necrosi del teixit.

Aquestes infeccions poden agrupar-se, de manera general, en infeccions cutànies localitzades, com per exemple fol·liculitis i furúncols, infeccions de ferides, infeccions profundes que acaben ocasionant bacterièmia. També són els principals causants d'osteomielitis que afecta, en la seva prolongació, a les articulacions. També és causant habitual de les intoxicacions alimentàries.

Se li atribueixen diferents síndromes, com ara el Síndrome de Liell en nens i Síndrome del Xoc Tòxic (SST), sobretot en dones joves que utilitzen tampons per un temps prolongat durant la menstruació.

A continuació es donarà el resultat dels bacils gramnegatius. La identificació fins a espècie en aquestes mostres ha estat possible gràcies als sistemes de tira API 10S, dels quals s'ha obtingut un número i s'ha recorregut a Biomerieux per a la posterior identificació.

Identificació dels bacils gramnegatius:		
Mostra	5	6
Imatge macroscòpica		
Imatge microscòpica		
Morfologia	Bacil	Bacil
Gram	Negatiu	Negatiu
Creix. agar McConckey	Positiu	Negatiu
Fermentació Lactosa	Positiu	Negatiu
Catalasa	Positiu	Positiu
Oxidasa	Negatiu	Positiu
Gènere	<i>Enterobacter</i> <i>Serratia</i>	<i>Chryseobacterium</i> <i>Sphingobacterium</i> <i>Stenotrophomonas</i> <i>Pseudomonas</i>
Espècie i probabilitat (API 10S)	<i>Enterobacter cloacae</i> (48%) <i>Enterobacter amnigenus</i> (29%) <i>Serratia liquefaciens</i> (13%)	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i> (54.7%) <i>Sphingobacterium multivorum</i> (23%) <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (14.9%) <i>Pseudomonas sp.</i> (5%)




En aquesta ocasió els resultats no han estat tan específics com en el cas dels cocs grampositius. Tot i que tenim un ampli ventall de resultats, es procedeix a explicar les característiques de cada espècie, o gènere en el cas de *Pseudomonas*.

- ***Enterobacter cloacae***: és un bacteri present al tracte digestiu humà, i per tant la seva transmissió és fecal-oral, tot i que sovint viatja des del recte fins a la uretra o bufeta urinària produint cistitis. Ocasionalment causa bacterièmia.
- ***Enterobacter amnigenus***: el seu comportament és similar a *E. cloacae*, essent responsable de diverses infeccions en humans.

- **Serratia liquefaciens:** es troba en plantes i al tracte digestiu dels rosegadors. No és patògen, tot i que la seva presència indica falta d'higiene.
- **Chryseobacterium meningosepticum:** és un bacteri que es troba distribuït de manera àmplia a la terra (plantes, terra, fonts d'aigua, etc.) però malgrat la seva elevada presència, no forma part de la flora normal dels humans.
Pot colonitzar el tracte respiratori, originant meningitis en nounats i pneumònia, endocarditis i bacterièmia en adults. Malauradament, pot deixar seqüeles com sordesa, hidrocefàlia i retard motor quan infecta nounats, i té un índex de mortalitat alta en aquests pacients.
Es transmet de persona a persona o, ocasionalment, a través del canal de part.
- **Sphingobacterium multivorum:** malgrat que no és considerat un bacteri patogènic pels humans, pot produir alguna infecció nosocomial, és a dir, que els pacients adquireixen a l'hospital independentment del motiu d'ingrés.
- **Stenotrophomonas maltophilia:** es troba àmpliament difosa al medi ambient. És un patògen intrahospitalari que afecta principalment a persones immunodeprimides produint cel·lulitis, abscessos cutanis, cistitis, meningitis o endocarditis bacteriana. També pot colonitzar catèters produint bacterièmia.
- **Pseudomonas sp.:** és un gènere molt ampli que engloba des de bacteris inofensius fins a soques oportunistes o paràsites. No es pot concretar més la informació degut a que no en coneixem l'espècie.

Una vegada identificats els bacils gramnegatius s'hauria de procedir a la identificació de les mostres 7, 8 i 9, els bacils grampositius. Malauradament al laboratori escolar no es disposava dels suficients mitjans per dur a terme aquesta tasca i han quedat per identificar. Per tant, es prosseguirà amb la identificació dels bacils grampositius restants: les listèries.

Després de la sembra realitzada als laboratoris SIGMA en agar Chromocytogenes de les colònies crescudes únicament al medi selectiu per a listèries, s'han obtingut tres resultats diferents, detallats a la següent taula.

Identificació de listèries:			
Aparença de la colònia			
Descripció	Colònies verd-blau sense halos opac.	Colònies incolores.	Sense creixement.
Interpretació	<i>Listeria innocua</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>St. aureus</i>	No és una listèria.

Afortunadament no s'ha aïllat *Listeria monocytogenes*, l'espècie més patògena d'aquest gènere.

Prosseguim a veure algunes característiques de les espècies identificades:

- ***Listeria innocua***: tal i com el seu nom suggereix, és innòcua per a l'espècie humana. De fet, *L. monocytogenes* és la única espècie capaç d'ocasionar listeriosis d'entre les 6 diferents que conformen en gènere.
- ***Enterococcus faecalis***: és un bacteri comensal que habita en el tracte gastrointestinal humà. Són indicadors de contaminació fecal, pel que la seva presència indica falta d'higiene.

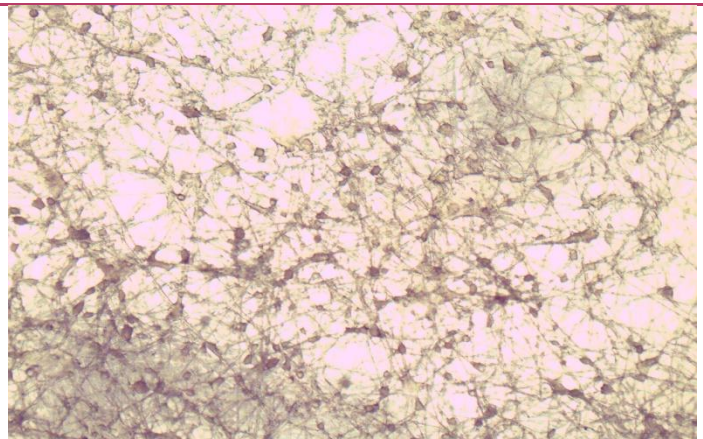
Finalment, només resta la identificació de l'únic fong aïllat al llarg del treball de recerca. Per aquesta tasca s'ha recorregut a Consultes Tècniques dels laboratoris MICROKIT. Malauradament, la identificació no ha estat possible i ens proposen que enviem la placa als laboratoris per a la seva identificació per PCR, servei que val 205.26€.

Identificació del fong pluricel·lular:

Imatge macroscòpica:
similar al cotó fluix



Imatge microscòpica:



5. Conclusions

“Saltar directament a les conclusions rarament condueix a aterratges feliços”.

S. Siporin

Aquesta recerca s'ha centrat en l'estudi de les comunitats microbianes de la superfície del paper moneda. L'estudi microbiològic s'ha limitat a l'estudi de bacteris i fongs, doncs era el que permetien els medis de cultiu utilitzats.

D'aquesta recerca, complementada amb tots els coneixements obtinguts a la part teòrica, s'han pogut extreure les següents conclusions:

- El paper moneda no és estèril, és a dir, conté microorganismes.
- Un microorganisme és un ésser viu que, degut a la seva mida microscòpica, no és visible a ull nu. Sobre la superfície dels bitllets es poden trobar microorganismes com bacteris i fongs.
- El regne dels bacteris és un regne poc divers en quant a morfologia, però presenta una gran diversitat fisiològica. Aquest fet explica la impossibilitat d'identificar espècies bacterianes només amb l'observació microscòpica. En canvi, és fàcil fer-ho mitjançant proves bioquímiques.
- El regne dels fongs és morfològicament molt divers, però tan sols alguns dels seus individus poden ser considerats microorganismes: els florits i els llevats. Els llevats són unicel·lulars i formen colònies molt similars a les bacterianes. Les floridures solen formar colònies molt extenses, irregulars i de textura similar al cotó fluix.
- En l'estudi de la qualitat microbiològica de la superfície dels bitllets realitzada en aquest treball no s'han valorat tan els aspectes quantitius, sinó els qualitius, doncs només s'han realitzat cultius a temperatura ambient una vegada per a valorar la població general. En canvi, s'ha realitzat una identificació acurada d'aquests per a comprovar la presència de patògens.
- La tinció de Gram, amb la posterior observació microscòpica, permet determinar la morfologia del bacteri i el seu gram; a partir d'aquesta informació inicial ens podem orientar respecte quines proves bioquímiques convé fer.
- Mitjançant les proves bioquímiques es pot especificar fins a gènere i espècie del bacteri.
- La identificació dels fongs és complexa i sovint, a més de proves morfològiques i bioquímiques, precisa estudis de genètica molecular. La seva observació amb un microscopi pot orientar, però cal l'ajuda d'especialistes. Per aquest motiu s'ha enviat a Microkit les fotografies de la colònia i també les obtingues amb l'ajuda del microscopi. Malauradament, sense estudi genètic la identificació no era possible.
- La presència d'enterobacteris, així com de fongs, no és habitual al paper moneda cultivat a una temperatura d'aproximadament 36°C.

- No s'ha trobat diferència significativa entre el nombre de colònies crescudes en bitllets nous i usats. Possiblement és degut a que no és necessari que hi hagi molt de contacte humà amb el paper moneda, doncs el mínim és suficient perquè hi quedin sembrats els microorganismes.
- Els resultats després de l'experimentació contradiuen la hipòtesi que els bitllets de major valor serien més estèrils que els de menor. Possiblement és degut a que aquests passen la major part del temps a l'interior de la caixa forta del banc, on romanen a una temperatura pròxima als 36°C, ideal pel desenvolupament dels bacteris patògens.
- El creixement de microorganismes potencials patògens ha estat similar als resultats dels cultius a temperatura ambient, on hauria de créixer la comunitat total de microorganismes. Això fa pensar que la majoria de bacteris que habiten al paper moneda són potencials patògens, fet explicable perquè provenen del contacte humà.
- La identificació dels microorganismes potencials patògens ens ha portat a resultats diversos. S'han trobat cocs grampositius, bacils grampositius i bacils gramnegatius, així com un fong pluricel·lular.
- S'ha pogut comprovar que la presència de fongs és quasi nul·la quan s'incuba a 36°C, i una mica més significativa a temperatura ambient. Per aquest motiu es pot afirmar que el paper moneda no habitua a contenir fongs patògens.
- La identificació taxonòmica dels bacils grampositius no ha estat possible.
- Tots els cocs grampositius estudiats són del gènere *Staphylococcus*. S'ha obtingut des de *S.epidermidis* i *S.haemolyticus*, resultats esperats tenint en compte que pertanyen a la flora normal de la pell humana i que, tret d'alguns casos esporàdics, no representen cap amenaça pels humans, fins a *Staphylococcus aureus*, patògen perillós. També s'han identificat altres espècies del mateix gènere, com *S.capitis*, també patògen potencial.
- La identificació dels bacils gramnegatius aïllats ha donat resultats amb un percentatge de fiabilitat baix, quasi sempre inferior al 50%. Les espècies identificades són: *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter amnigenus*, *Serratia liquefaciens*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Sphingobacterium multivorum*, *Stenotrophomonas maltophilia* i *Pseudomonas sp.*
La presència d'espècies com *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter amnigenus* o *Enterobacter cloacae* indica una falta d'higiene important en el paper moneda europeu, doncs són d'origen fecal.
Chryseobacterium meningosepticum és un bacteri d'àmplia distribució en el

medi, però no forma part de la flora bacteriana humana normal i pot causar malalties greus, com pneumònies, meningitis o endocarditis, així com deixar seqüeles greus.

Altres bacils gramnegatius aïllats, com és el cas de *Sphingobacterium multivorum* i *Stenotrophomonas maltophilia*, poden ser patògens en persones immunodeprimides.

- L'estudi taxonòmic permet afirmar que la majoria dels bacteris presents al paper moneda poden ser potencialment patògens, o com a mínim oportunistes.
- Per tant, com a última conclusió, es pot afirmar que el paper moneda no conté gran quantitat de microorganismes, però molts dels que hi ha poden ser patògens o oportunistes. Per aquest motiu cal agafar uns bons hàbits higiènics a l'hora de tractar amb els bitllets.

6. Bibliografia

“Dels diversos objectes inventats per l’home, el llibre és el més sorprenent; tots els altres són extensions del seu cos... tan sols el llibre és una extensió de la imaginació i la memòria”.

Jorge Luis Borges

Llibres i enciclopèdies:

- PUMAROLA BUSQUETS, A. [et al.]. (1999). *Microbiología y parasitología médica*. Barcelona: Salvat editores, S.A.
- FERRÉS GURT, Concepció. (2005). *Biología condensada: Más de 100 resums de biología*. Girona: CCG Editors.
- PRATS, Guillem. (2005). *Microbiología clínica*. Buenos Aires i Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- KONEMAN, E. W. [et al.]. (2008). *Diagnostico microbiológico*. Buenos Aires i Madrid: Editorial Panamericana.
- ÁLVAREZ, M. V., BOQUET, E. i DE FEZ, I. (1990). *Manual de técnicas en microbiología clínica*. Madrid: publicaciones AEFA.

Enciclopèdies virtuals:

- BIBLIOTECA DE CONSULTA MICROSOFT® ENCARTA® 2003. © 1993-2002. MICROSOFT CORPORACIÓN.

Pàgines web:

- EUROPEAL CENTRAL BANK. *Los billetes y monedas en euros*. [Consultat: 15 de juliol de 2011].
Disponibilitat a internet: <http://www.ecb.int/pub/pdf/other/euroleafletes.pdf>
- DRA. ELISABETH CASTAÑO [et. al]. (2008) *Sepsis por Chryseobacterium meningosepticum: Reporte de un caso*. [Consultat: 1 de setembre de 2011].
Disponibilitat a internet:
<http://www.hden.sld.pa/pdf/Sepsis-Chryseobacter%20um-meningosepticus.pdf>
- MICROBE WIKI. *Listeria innocua*. [Consultat: 1 de setembre de 2011].
Disponibilitat a internet:
http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Listeria_innocua

Altres fonts:

- consultatecnicas@microkit.es

7. Agraïments

“Agafa’t el teu temps a l’hora d’escollir un amic, però sigues més lent encara a l’hora de canviar-lo”.

Benjamin Franklin

No voldria donar el treball per finalitzat sense recordar abans una sèrie de persones i institucions que m'han ajudat en la realització d'aquest, facilitant-me informació o simplement donant-me seguretat i mostrant interès.

En primer lloc, a la catedràtica en Biologia i assessora del meu Treball de Recerca, qui m'ha anat guiant durant el transcurs d'aquest.

Al Concorci de Medi Ambient i Salut Pública de la Garrotxa (SIGMA), que realitzà la identificació de les mostres que corresponien a possibles bacils del gènere *Listeria*.

A totes aquelles persones que, sense conèixer-me, han dipositat la seva confiança en mi per deixar-me durant uns minuts bitllets de la seva pròpia butxaca.

Al bar de l'institut, així com al BUC, per permetre'm agafar diners prestats de la seva caixa enregistradora.

Al meu pare, i a La Caixa en general, per proporcionar-me bitllets nous i tenir paciència davant les meves exigències enfront el perfil de bitllet desitjat.

Finalment, m'agradaria donar les gràcies als meus pares i a la meva germana, els quals han mostrat interès pel meu treball i m'han animat a donar sempre el millor de mi.

Octubre 2011