



**Mineral, natural i  
amb microorganismes**



## AGRAÏMENTS

L'elaboració d'un treball de recerca requereix, igual que la construcció d'un edifici o la cadena de muntatge d'una fàbrica, la col·laboració d'un col·lectiu. Per això m'agradaria donar les gràcies a les següents persones:

En primer lloc, a la meva assessora, que em va ajudar a decidir-me per aquest tema d'entre les moltes idees que em vaig plantejar i que m'ha suggerit qualsevol cosa que fes millorar la qualitat d'aquest treball de recerca a més de ser la meva guia en el laboratori i d'accedir a concedir-me temps per resoldre els meus dubtes en qualsevol moment.

A en Lluís i a l'Olga, microbiòleg i enginyera tècnica industrial respectivament, per dedicar temps a atendre les meves trucades i correus electrònics amb diferents dubtes sobre els microorganismes i les ampolles de plàstic.

Als responsables dels Departaments de Qualitat de les diverses empreses comercialitzadores d'aigua embotellada amb els qui he mantingut contacte per mitjà del correu electrònic i que han atès amablement les meves consultes.

Als amics que m'han recolzat en l'elaboració del present treball de recerca i als professors que m'han resolt els dubtes relacionats amb les seves matèries.

I per últim, però no per això menys important, a la meva família que m'ha ajudat en molts aspectes. Han anat a buscar material que necessitava per l'experiment a Barcelona quan jo era a l'escola o m'hi han acompanyat, han anat a comprar algunes ampolles d'aigua quan jo no podia i van col·laborar en la realització de les fotografies. Tanmateix, també han comprès l'esforç que requereix un estudi d'aquestes dimensions.

A tots vosaltres, una vegada més, gràcies.

# ÍNDEX GENERAL

0	INTRODUCCIÓ .....	7
---	-------------------	---

## MARC TEÒRIC

1	MICROORGANISMES .....	10
1.1.	Bacteris .....	11
1.1.1.	Estructura cel·lular .....	12
1.1.2.	Nutrició .....	14
1.1.3.	Reproducció i creixement .....	15
1.1.4.	Classificació .....	16
1.2.	Fongs .....	18
1.2.1.	Estructura cel·lular .....	18
1.2.2.	Nutrició .....	19
1.2.3.	Reproducció .....	19
1.2.4.	Classificació .....	20
2	LA COLONITZACIÓ DE L'HOME .....	21
2.1.	L'home i els microorganismes .....	22
2.1.1.	Les relacions simbiòtiques .....	22
2.1.2.	La microbiota normal a les diferents zones anatòmiques .....	22
2.2.	La cavitat oral .....	24
2.2.1.	Flora bacteriana bucal .....	24
2.2.2.	Placa dental .....	25
3	L'AIGUA EMBOTELLADA .....	26
3.1.	L'aigua .....	26
3.1.1.	Aigua mineral natural .....	26
3.1.2.	Aigua de la xarxa de proveïment urbà .....	28
3.2.	Les ampolles de plàstic .....	28
3.2.1.	Les ampolles de plàstic i l'espectre electromagnètic .....	29

## **PART PRÀCTICA**

4	INTRODUCCIÓ .....	33
5	MATERIAL I MÈTODE .....	34
6	PROCEDIMENT .....	39
	6.1. Assaig .....	47
	6.2. Experiència 1 .....	49
	6.3. Experiència 2 .....	50
	6.4. Tinció de Gram .....	50
	6.5. Esquemes dels dissenys experimentals .....	53
7	RESULTATS .....	56
	7.1. Assaig .....	56
	7.2. Experiència 1 .....	57
	7.3. Experiència 2 .....	57
	7.4. Tinció de Gram .....	60

## **CONCLUSIONS I REFERÈNCIES**

8	CONCLUSIONS .....	62
9	PROPOSTES DE MILLORA .....	65
10	NOVES VIES DE RECERCA .....	66
11	REFERÈNCIES .....	67
	<b>ANNEX</b> .....	<b>69</b>

## ÍNDIX D'IL·LUSTRACIONS

FIGURA 1. Arbre filogenètic de la vida. En ell es classifiquen els éssers vius en els dominis Archea, Bacteria i Eukarya .....	11
FIGURA 2. Estructura interna d'una cèl·lula procariota (a) i d'una cèl·lula eucariota (b) .....	12
FIGURA 3. Estructura de la paret cel·lular d'un bacteri grampositiu (a) i d'un bacteri gramnegatiu (b). La principal diferència que s'observa és la presència d'una membrana externa a la paret gramnegativa .....	13
FIGURA 4. Corba de creixement d'una població bacteriana en un sistema tancat. Com podem veure, el creixement bacterià té diverses fases. En la fase de latència la soca s'adapta al nou medi de cultiu però seguidament creix a un gran ritme fins que els nutrients s'exhaureixen o els productes metabòlics tòxics s'acumulen (fase estacionària) i pot arribar a la mort .....	15
FIGURA 5. Les diferents tipus de formes d'un bacteri .....	16
FIGURA 6. Cocs grampositius .....	17
FIGURA 7. Bacils gramnegatius .....	17
FIGURA 8. D'esquerra a dreta: llevat, floridura en una taronja i bolets.....	20
FIGURA 9. Lactobacillus casei .....	23
FIGURA 10. Presència dels diferents microorganismes al paladar humà. Indicat en tant per cent.....	25
FIGURA 11. Superfície ocupada pels bacteris a les dents netes (a dalt) i després de 10 dies sense rentar-se-les (a baix) .....	25
FIGURA 12. Planta embotelladora .....	27
FIGURA 13. Els símbols del reciclatge que es poden trobar als envasos de PET i als de PVC així com també als altres plàstics, sovint ajuden a identificar el material amb el que està fet un envàs plàstic .....	29
FIGURA 14. Representació gràfica d'una ona electromagnètica.....	29
FIGURA 15. Les variables experimentals.....	40
FIGURA 16. Diferents dilucions d'una mateixa suspensió cel·lular .....	44
FIGURA 17. Taula d'identificació dels tipus d'ampolles utilitzats en aquest estudi.....	46
FIGURA 18. Planificació en el temps de cada una de les experiències.....	47
FIGURA 19. Disseny experimental de l'assaig.....	53

FIGURA 20. Disseny experimental de l'experiència 1 .....	54
FIGURA 21. Disseny experimental de l'experiència 2 .....	55
FIGURA 22. Taula de resultats de l'assaig .....	56
FIGURA 23. Algunes de les plaques obtingudes a l'experiència 1 .....	57
FIGURA 24. Taula de resultats de les mostres de les ampolles-control de l'experiència 2 .....	59
FIGURA 25. Taula de resultats de les mostres de les ampolles reutilitzades del dia 3 de l'experiència 2 .....	59
FIGURA 26. Taula de resultats de les mostres de les ampolles reutilitzades del dia 5 de l'experiència 2 .....	60
FIGURA 27. Fongs (esquerra) i multitud de colònies (a la dreta). Plaques obtingudes a l'experiència 2 .....	60
FIGURA 28. Estafilococs gramnegatius .....	60

## 0 INTRODUCCIÓ

Des dels inicis de la seva història, l'ésser humà ha sentit curiositat per conèixer què passa al seu entorn, per què passa i com passa. En el cas del científic, aquesta curiositat sol ser més forta i el mou a actuar, a experimentar, per satisfer el seu desig de saber.

Antoni van Leeuwenhoek (1632 – 1723) fou un comerciant holandès que, malgrat els seus pocs coneixements, estava interessat per la ciència i va decidir aprendre alguna de les seves branques com la biologia o les matemàtiques tot sol, mitjançant la lectura de llibres. Una de les obres que va llegir fou *Micrographia*<sup>1</sup>, a partir de la qual va començar a sentir curiositat pel món microscòpic i a construir microscopis amb els que va confirmar l'existència dels glòbuls vermells de la sang i va descobrir els espermatozous. A més a més, el seu esperit científic l'impulsà a analitzar mostres d'aigua estancada, d'aigua de la pluja i de saliva humana. En aquesta última mostra va descobrir els bacteris, als qui ell va anomenar *animaculus*.

Quasi tres segles i mig més tard, l'esperit científic continua vigent en la nostra societat i és el que em va moure a mi a realitzar el procés previ a l'experiment que s'explica a continuació. Igual que Leeuwenhoek, però a un nivell molt inferior, m'he disposat a estudiar els bacteris. Concretament, l'efecte que té la reutilització d'ampolles en l'aparició de bacteris en aquests envasos.

En un primer moment em vaig preguntar per què a les etiquetes de les ampolles d'aigua mineral diu que no es pot reutilitzar l'ampolla i si això té relació amb el mal gust que té l'aigua després de deixar-la uns dies al cotxe, on li pot tocar la llum solar, i amb la forma i el color de l'ampolla. Calia, doncs, crear una possible resposta per aquesta qüestió: *potser les ampolles no s'han de reutilitzar perquè hi creixen microorganismes i encara en creixen més si l'ampolla és transparent i amb molts replecs perquè la transparència deixar passar millor la llum que no pas el color blau i els replecs suposen un lloc de creixement ideal per als microorganismes*. Vaig deduir

---

<sup>1</sup> Escrit per Robert Hooke, un científic anglès, i publicat per *The Royal Society* de Londres l'any 1665. Fou el primer *best-seller* científic. Tracta la nova ciència de l'època: la microscòpia.



que, suposant que el fet de reomplir les ampolles de plàstic d'aigua mineral provoca el creixement de microorganismes (provinents de la boca del bevedor i molt probablement causants del mal gust de l'aigua de les ampolles oblidades al cotxe o a qualsevol altre lloc on hi toquin els rajos solars); si reutilitzava ampolles de colors i formes diferents durant un temps, aleshores apareixerien més microbis a les ampolles transparents i amb molts replecs que a les blaves i amb pocs replecs.

Així doncs la meva hipòtesi és la següent:

*El fet de reutilitzar les ampolles de plàstic d'aigua mineral natural provoca un augment en el nombre de microorganismes de l'aigua i aquest augment és major a les ampolles de plàstic transparent amb molts replecs que no pas a les ampolles de plàstic blau amb pocs o gens replecs.*

# MARC TEÒRIC

# 1 MICROORGANISMES

Al nostre planeta hi ha un gran nombre d'espècies d'éssers vius. Segons un informe recent del govern australià<sup>2</sup>, publicat el setembre de 2009, es coneixen prop de 2 milions d'espècies però s'estima que n'existeixen uns 11 milions. Els números s'eleven tant que és necessari fer una bona classificació.

Els éssers vius es poden agrupar tenint en compte diversos aspectes, els dos més importants són la filogènia i la fisiologia. El primer es basa en les relacions evolutives que hi ha entre les espècies. Per fer-ho, s'usa l'ARN ribosòmic. A partir d'aquesta classificació s'han deduït tres dominis: *Archea*, *Bacteria* i *Eukarya*. El segon aspecte que podem tenir en compte, la fisiologia, es fixa en l'estructura interna, l'embriologia, el tipus de proteïnes que té, l'estructura dels cromosomes, etc. Aquest sistema de classificació s'organitza en cinc grans regnes (Moneres, Protists, Fongs, Plantes i Animals) dels quals es distingeixen diferents subgrups.

Una de les teories sobre l'origen de la vida explica que els primers colonitzadors de la Terra van ser els bacteris, alguns dels quals feien la fotosíntesi i van produir l'oxigen necessari per afavorir l'evolució dels petits organismes que podien respirar oxigen i que posteriorment originarien els éssers pluricel·lulars. Lynn Margulis, una biòloga americana molt reconeguda per diverses institucions, en la seva teoria endosimbiòtica, explica que les cèl·lules eucariotes van aparèixer a partir de la simbiosi<sup>3</sup> entre diverses cèl·lules procariotes, és a dir, entre bacteris. Així doncs, els microbis, han tingut i tenen un paper molt important en el nostre planeta i, en definitiva, en la vida dels éssers humans.

A més dels bacteris hi ha altres microorganismes com els protozous, les algues i alguns fongs. Aquests últims, junt amb els bacteris, es tractaran a continuació.

---

<sup>2</sup> AUSTRALIAN GOVERNMENT. DEPARTMENT OF THE ENVIRONMENT, WATER, HERITAGE AND THE ARTS. Numbers of Living Species in Australia and the World. Second edition. Canberra: Australian Biological Resources Study, 2009 [en línea]

<sup>3</sup> Associació física prolongada de dos o més individus de diferents espècies en la que tots obtenen un benefici.

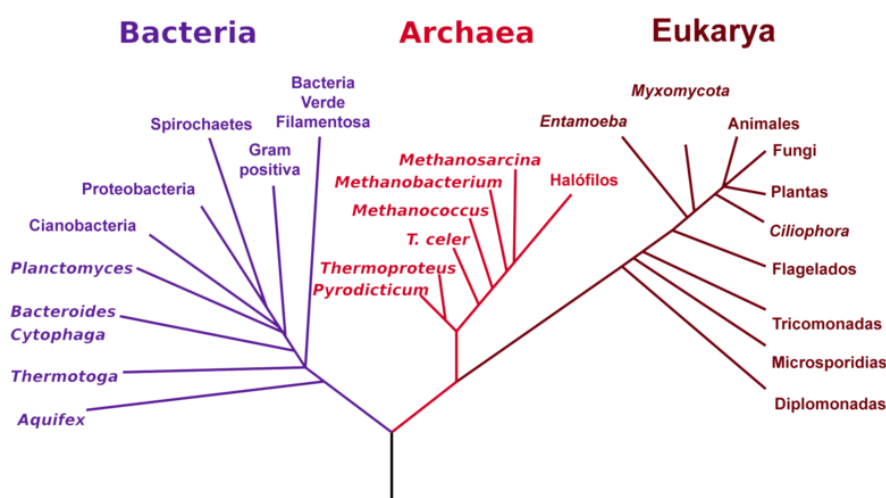
## 1.1 BACTERIS

Els bacteris són éssers vius microscòpics, unicel·lulars i procariotes que tenen una gran varietat de vies metabòliques, formes i maneres de viure. Aquesta gran diversitat és producte de l'evolució que han patit durant els seus milers de milions d'anys de vida.

Dintre del regne de les Moneres, del qual pertanyen aquests petits organismes, es diferencien dos grans grups que, a la vegada, són dos dels tres dominis evolutius esmentats anteriorment: els arqueobacteris (*Archea*) i els eubacteris (*Bacteria*).

Els arqueobacteris van aparèixer fa uns 3000 milions d'anys. Es creu que és la forma de vida més antiga. La majoria d'espècies són extremòfiles, és a dir, viuen en condicions extremes de temperatura, acidesa, salinitat o radiació entre altres. Alguns, però, viuen en hàbitats normals com és el cas dels arqueobacteris metanògens que viuen al nostre intestí obtenint energia a partir de la producció de metà.

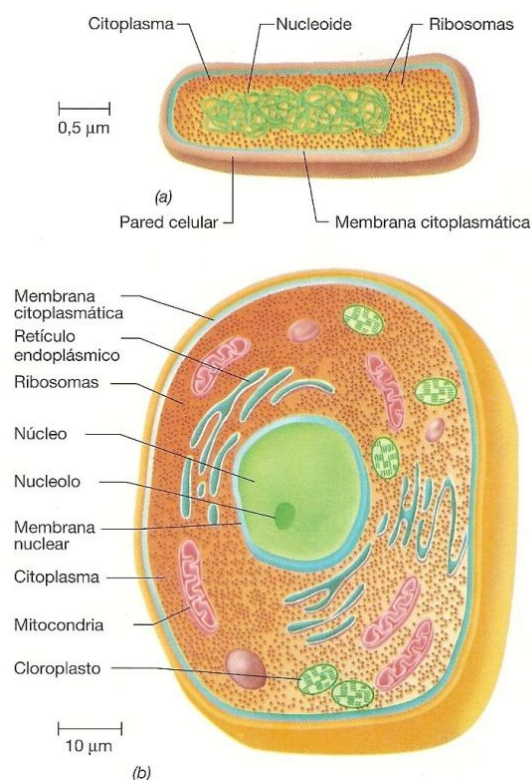
Els eubacteris són anomenats els «bacteris veritables». Són més complexes que els arqueobacteris. Els cianobacteris, un tipus d'eubacteris, van ser els primers organismes fotosintetitzadors coneguts i molt possiblement van participar en la producció d'oxigen a la Terra ara fa uns 2000 milions d'anys. Tots els procariotes coneguts que causen alguna malaltia són eubacteris. Els bacteris que es tracten en aquest treball de recerca pertanyen a aquest domini.



**FIGURA 1.** Arbre filogenètic de la vida. En ell es classifiquen els éssers vius en els dominis Archea, Bacteria i Eukarya

### 1.1.1 Estructura cel·lular

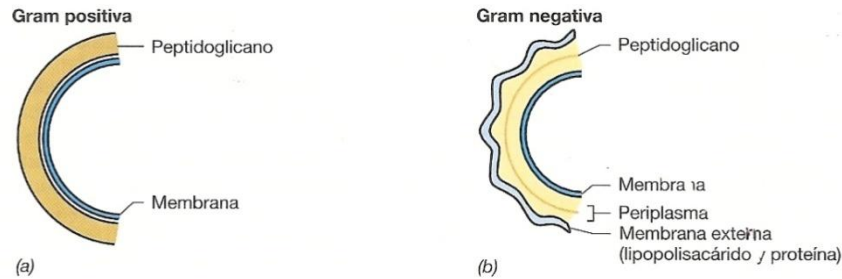
Hi ha dos tipus d'estructura cel·lular: la procariota i l'eucariota. Com es pot veure a la figura 2, les cèl·lules procariotes són més petites i simples que les eucariotes ja que no tenen el material genètic reclòs en una membrana nuclear, és a dir, no tenen nucli i tampoc tenen orgànuls cel·lulars, estructures rodejades per una membrana que tenen una funció específica, com per exemple els mitocondris o els cloroplasts (només a les cèl·lules vegetals) que s'encarreguen de produir l'energia necessària per portar a terme altres funcions de la cèl·lula i de l'organisme.



**FIGURA 2.** Estructura interna d'una cèl·lula procariota (a) i d'una cèl·lula eucariota (b)

La cèl·lula bacteriana es compon de les següents estructures:

- **Paret cel·lular.** Dóna forma i rigidesa a la cèl·lula. Està constituïda principalment per peptidoglicà o mureïna, una macromolècula formada per cadenes de glúcids i oligopèptids que és responsable de la resistència de la paret cel·lular. La paret cel·lular diferencia els eubacteris en grampositius i gramnegatius a partir de la tinció de Gram (*vegeu l'apartat 1.1.4*). Els bacteris grampositius tenen una paret cel·lular únicament formada per peptidoglicà però els bacteris gramnegatius, a més de disposar d'una fina capa d'aquesta biomolècula, tenen una **membrana externa** constituïda per lipopolisacàrids i proteïnes que actua més o menys com la membrana plasmàtica.



**FIGURA 3.** Estructura de la paret cel·lular d'un bacteri grampositiu (a) i d'un bacteri gramnegatiu (b). La principal diferència que s'observa és la presència d'una membrana externa a la paret gramnegativa

- **Membrana plasmàtica.** Separa l'interior de la cèl·lula amb l'exterior. Està formada per una bicapa lipídica en la que es distingeix una part hidrofílica (a l'interior de la cèl·lula) i una part hidrofòbica (a l'exterior de la cèl·lula). Aquesta composició afavoreix molt el transport de substàncies, la funció essencial de la membrana plasmàtica.
- **Nucleoide.** És la regió de la cèl·lula on es troba el material genètic. L'ADN bacterià és circular i bicatenari i consta d'un sol cromosoma.
- **Plasmidi.** ADN bicatenari majoritàriament circular que es duplica independentment del cromosoma i es transmet a les cèl·lules filles quan el bacteri es divideix i a altres bacteris per conjugació. Durant la conjugació s'estableix una relació entre dues cèl·lules i es transmet una còpia del plasmidi però mai amb una finalitat reproductiva. El plasmidi no porta gens<sup>4</sup> imprescindibles per a l'individu en totes les condicions, és a dir, que la informació que porta pot ser útil per sobreviure a l'acció d'algun antibiòtic o per produir una proteïna determinada. En els últims 20 anys, el descobriment dels plasmidis ha permès a la biotecnologia avançar a un ritme formidable ja que s'ha pogut crear els bacteris recombinants, útils en la producció exògena de proteïnes com per exemple la insulina.

<sup>4</sup> Cadascuna de les unitats hereditàries elementals de funció fisiològica.

- **Ribosomes.** Estructura constituïda per dues subunitats formades d'ARN ribosòmic i proteïnes. La seva funció és sintetitzar proteïnes a partir del material genètic.
- **Citoplasma.** Cavitat de la cèl·lula de naturalesa aquosa rica en nutrients, enzims i altres molècules. És on té lloc la major part de les reaccions químiques del metabolisme bacterià.
- **Pili.** Evaginació de la membrana plasmàtica que entra en contacte amb un altre bacteri travessant els porus de la paret cel·lular a partir de la qual s'intercanvia material genètic (plasmidis) sense finalitats reproductives.

### 1.1.2 Nutrició

Els bacteris, com tots els éssers vius, necessiten nutrients per sobreviure però no tots els nutrients els necessiten en les mateixes quantitats. Els que necessiten en més quantitat (macronutrients) són el carboni, el nitrogen, el fòsfor, el sofre, el potassi, el magnesi, el calci i el sodi i els que es necessiten en menys quantitat (micronutrients) són el ferro, el zinc i el coure entre d'altres.

Tots els nutrients són imprescindibles per al bon funcionament de la cèl·lula independentment de la quantitat que sigui necessària.

Com s'ha esmentat anteriorment, els bacteris tenen una gran varietat de vies metabòliques. Depenent de la font d'energia i la font de carboni poden ser:

- **Fotoautòtrofs.** Produeixen matèria orgànica a partir de matèria inorgànica i de l'energia de la llum.
- **Fotoheteròtrofs.** Obtenen energia de la llum però, al contrari que els fotoautòtrofs, la seva font de carboni és la matèria orgànica.
- **Quimioautòtrofs.** Aprofiten l'energia alliberada per l'oxidació d'un compost inorgànic per obtenir matèria orgànica a partir de  $\text{CO}_2$ .
- **Quimioheteròtrofs.** Obtenen energia a partir de l'oxidació de matèria orgànica.

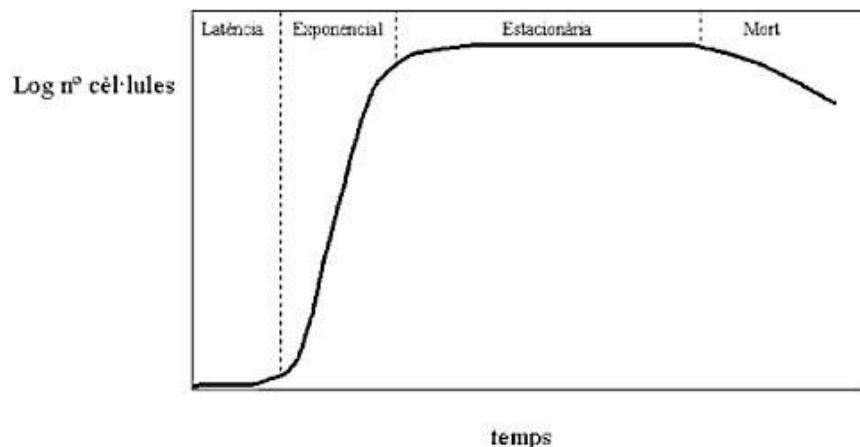
Alguns bacteris necessiten oxigen per poder produir energia: són els bacteris aeròbics. Els bacteris que no precisen oxigen s'anomenen anaeròbics. N'hi ha de dos tipus: els anaeròbics facultatius, que tot i que habitualment no els cal oxigen, l'aprofiten quan és present en el medi i els anaeròbics estrictes, que els pot arribar a resultar tòxic.

### 1.1.3 Reproducció i creixement

La reproducció bacteriana és asexual. Concretament ho fan per divisió binària o bipartició, o sigui que una cèl·lula es divideix en dues cèl·lules genèticament idèntiques.

Les cèl·lules procariotes, per dividir-se, primer cal que dupliquin el seu ADN i mentre els dos cromosomes es separen, es crea una prolongació de la membrana cel·lular i la paret cel·lular que separarà les dues noves cèl·lules.

Aquest tipus de reproducció provoca que el creixement bacterià sigui exponencial. A més, com que els bacteris tenen un cicle vital molt curt (entre quinze minuts i una hora), en un curt període de temps, d'una cèl·lula inicial en neixen moltes més.



**FIGURA 4.** Corba de creixement d'una població bacteriana en un sistema tancat. Com podem veure, el creixement bacterià té diverses fases. En la fase de latència la soca s'adapta al nou medi de cultiu però seguidament creix a un gran ritme fins que els nutrients s'exhaureixen o els productes metabòlics tòxics s'acumulen (fase estacionària) i pot arribar a la mort



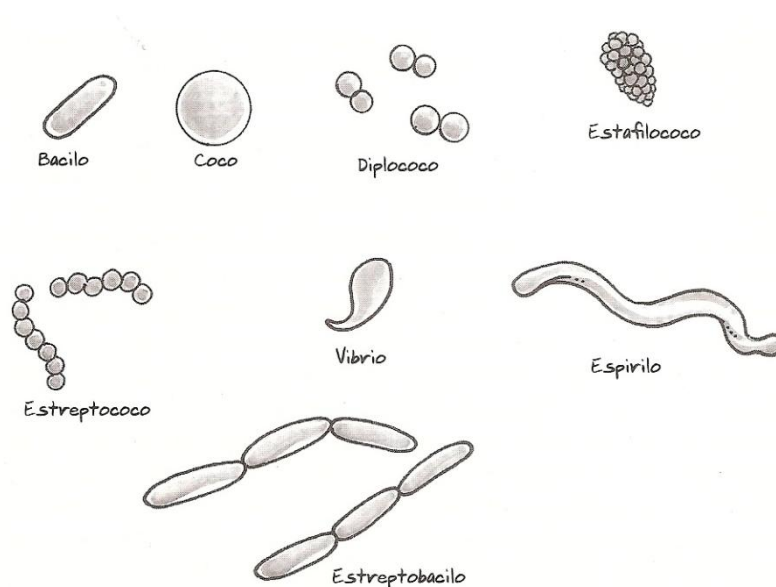
Els bacteris acostumen a créixer en colònies, és a dir, en conjunt. D'aquesta manera s'afavoreix la conjugació genètica, un mètode d'intercanvi de material genètic addicional explicat anteriorment que no té finalitats reproductives però, com hem vist anteriorment, augmenta la variabilitat genètica dels individus, això és, per exemple, que alguns bacteris d'una mateixa espècie seran resistents a un determinat antibiòtic mentre alguns altres no.

#### 1.1.4 Classificació

Existeixen diverses maneres de classificació de bacteris, algunes ja s'han esmentat abans (segons la font d'energia i la font de carboni i segons la necessitat d'oxigen), però les més importants per entendre aquest treball de recerca són:

- **Segons la morfologia**

La gran diversitat dels bacteris i les seves colònies també afecta a la forma. Una cèl·lula bacteriana pot ser un bacil, un coc, un espiril o un vibri i les colònies poden formar grups *stafilo-* (en forma de raïm) en el cas dels cocs o *strepto-* (en línia recta) tant en cocs com en bacils. En alguns casos els cocs i els bacils també s'associen en parelles.



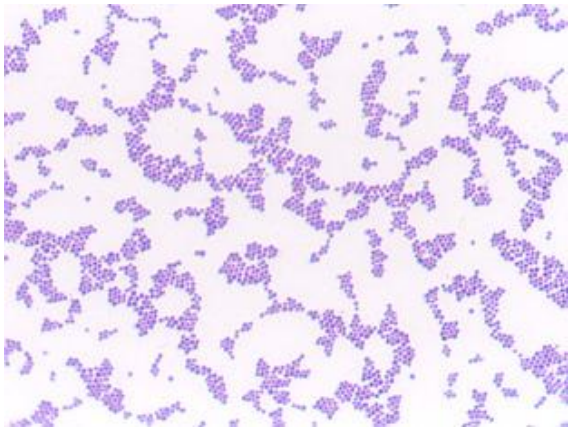
**FIGURA 5.** Les diferents tipus de formes d'un bacteri

– **Segons la constitució de la paret cel·lular**

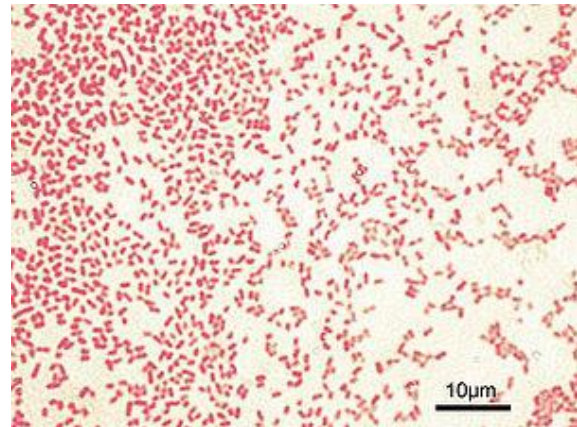
Ja s'ha dit al principi d'aquest bloc (a l'apartat 1.1.1) que els bacteris, segons la constitució de la paret cel·lular poden ser grampositius o gramnegatius. Cal recordar que els primers tenen una paret cel·lular únicament formada per peptidoglicà o mureïna i els segons, a més a més, tenen una membrana externa que cobreix la fina capa de peptidoglicà que disposen.

Per identificar cada tipus de bacteri cal dur a terme la tinció de Gram, un procediment en el que s'apliquen una sèrie de colorants que tenyeixen de color violeta els bacteris grampositius i de rosa o vermell els bacteris gramnegatius.

Més endavant es tractarà com es porta a terme aquesta tinció i com actua envers la paret cel·lular bacteriana.



**FIGURA 6.** *Cocs grampositius*



**FIGURA 7.** *Bacils gramnegatius*

## 1.2 FONGS

Habitualment associem els fongs únicament amb els bolets que podem collir als boscos a la tardor, l'època de l'any en la que la humitat ambiental és més alta, que és un factor essencial en el creixement d'aquests éssers vius. Però els bolets no són els únics fongs que existeixen. Les floridures que ens trobem a la fruita o el llevat amb el que elaborem el pa o la cervesa també ho són.

Els fongs són éssers vius eucariotes que poden ser unicel·lulars o pluricel·lulars i per tant poden ser microscòpics o macroscòpics respectivament. No fan la fotosíntesi ni qualsevol altre procés d'obtenció d'energia autòtrof, són heteròtrofs de digestió externa.

### 1.2.1 Estructura cel·lular

La cèl·lula fúngica consta de les següents parts:

- **Paret cel·lular.** Dóna forma a la cèl·lula i li proporciona consistència i resistència als canvis de pressió osmòtica. Està constituïda per quitina i polisacàrids.
- **Membrana plasmàtica.** Està constituïda per una bicapa lipídica com totes les membranes biològiques dels éssers vius però amb alguns trets que la diferencien de les cèl·lules animals i vegetals.
- **Citoplasma.** Conté els orgànuls característics de les cèl·lules eucariotes: mitocondris, reticle endoplasmàtic, etc.
- **Nucli.** Conté el material genètic. Són haploides, és a dir, només tenen una còpia de cada cromosoma.

Distingim dos tipus diferents d'estructures cel·lulars en els fongs: l'estructura miceliar i l'estructura levuriforme.

En la primera, les cèl·lules s'agrupen en filaments allargats anomenats hifes sense formar teixits vertaders. Així doncs, les hifes tenen l'estructura d'una cèl·lula fúngica però amb més d'un nucli. El conjunt d'hifes s'anomena miceli. Les hifes estan contínuament creixent i explorant el substrat per trobar aliment.

La segona estructura, la levuriforme, és pròpia dels llevats, que són unicel·lulars. La cèl·lula té forma ovalada i pot ser haploide o diploide. Les seves parts s'han esmentat abans.

### **1.2.2 Nutrició**

Els fongs obtenen l'energia a partir de la matèria orgànica del seu entorn: són heteròtrofs. Aquells els quals la seva font de matèria orgànica són les restes vegetals o animals de l'ambient s'anomenen sapròfits i tenen un paper molt important en la cadena alimentària ja que reciclen la matèria procedent d'altres éssers vius. Hi ha altres fongs que viuen dins d'altres organismes vius utilitzant la seva matèria orgànica, són els paràsits.

En ambdós casos, com que els manca algun mecanisme que els permeti digerir l'aliment al seu interior (no disposen de boca com els animals), capten els nutrients mitjançant la digestió externa. En aquest tipus de digestió, les hifes aboquen enzims<sup>5</sup> que degraden la matèria i, posteriorment, absorbeixen els productes obtinguts. Després, les hifes creixen fins a trobar una nova font d'aliment.

Els llevats es nodreixen d'una manera diferent: ho fan mitjançant fermentacions. La fermentació es porta a terme a l'interior de les cèl·lules, per això utilitzen substrats que puguin ser absorbits per aquestes com ara el piruvat<sup>6</sup> que utilitza el llevat *Saccharomyces cerevisiae* per produir etanol i diòxid de carboni en la producció de la cervesa.

### **1.2.3 Reproducció**

La reproducció dels fongs pot ser asexual o sexual. Hi ha espècies que només poden realitzar una de les dues però n'hi ha d'altres que realitzen les dues.

La reproducció asexual s'efectua per gemmació o per espores. El primer procediment consisteix en la divisió de l'individu que dona lloc a dos individus fills genèticament

---

<sup>5</sup> Proteïnes que afavoreixen i regulen les reaccions químiques de tots els éssers vius.

<sup>6</sup> Glúcid de tres carbonis.

idèntics. Aquest tipus de reproducció la porten a terme els llevats, que són unicel·lulars. En la reproducció per espores, aquestes s'originen per mitosi<sup>7</sup> i són alliberades a l'ambient per germinar.

La reproducció sexual és la unió dels gàmetes haploides produïts per meiosi en individus diploides.

#### 1.2.4 Classificació

Ens els apartats següents podrem observar diferents tipus de classificació segons l'estructura cel·lular, el tipus de nutrició i el tipus de reproducció però a continuació dividirem els fongs en tres grans grups: llevats, floridures i bolets.

Els llevats són unicel·lulars i, per tant, microscòpics. Les floridures i els bolets són pluricel·lulars i macroscòpics.



**FIGURA 8.** D'esquerra a dreta: llevat, floridura en una taronja i bolets

---

<sup>7</sup> Procés de divisió cel·lular en què una cèl·lula dona lloc a dues cèl·lules amb els mateixos cromosomes.

## 2 LA COLONITZACIÓ DE L'HOME

Tot i que pugui semblar estrany, el cos humà està ple de microorganismes, generalment bacteris, que són beneficiosos i ajuden a mantenir el cos sà. A més a més, l'home està exposat contínuament a l'acció de microbis que tracten d'envair el seu organisme de manera que li pot produir una infecció o una malaltia.

La colonització de les diferents parts del cos depèn de factors com el pH<sup>8</sup>, la temperatura, la humitat, els nivells d'oxigen, i la presència d'enzims o immunoglobulines<sup>9</sup> que poden neutralitzar l'acció microbiana.

La microbiota normal, o el que és el mateix, el conjunt de microorganismes que s'hostatgen al cos humà, es concentra en aquelles zones exposades a l'exterior. És a dir, en unes condicions de salut normals, es troben bacteris i/o fongs majoritàriament al tub digestiu però també a la pell, al tracte respiratori, al sistema urogenital i a la mucosa conjuntival<sup>10</sup>. Es pot fer referència a aquest conjunt de microorganismes amb el nom de biota (microbiota) resident. Si es troben als òrgans o medis interns com el cervell, el cor, els músculs o la sang en quantitats significants, segurament es pateix alguna malaltia.

En alguns casos també es poden trobar microbis associats amb el cos durant un curt període de temps (ja que no estan adaptats a viure-hi) que arriben a nosaltres accidentalment. En general són benignes però algunes espècies poden arribar a ser patògenes<sup>11</sup>. Reben el nom de biota transeünt.

A continuació es descriurà breument la biota normal de cada una de les zones anatòmiques citades i les possibles relacions que pot haver entre l'home i el microbi i més endavant s'aprofundirà en la microbiota de la cavitat oral.

---

<sup>8</sup> Concentració de ions d'hidrogen [H<sup>+</sup>] presents en un medi determinat.

<sup>9</sup> Proteïnes sintetitzades pels limfòcits B i les cèl·lules plasmàtiques, que són presents en el sèrum i en altres fluids corporals i participen en la resposta immunitària humoral.

<sup>10</sup> Mucosa de la fina membrana que cobreix la superfície de l'interior de la parpella i part del globus ocular.

<sup>11</sup> Que perjudica l'hoste.

## 2.1 L'HOME I ELS MICROORGANISMES

### 2.1.1 Les relacions simbiòtiques

Existeixen tres tipus de relacions simbiòtiques: el mutualisme, el comensalisme i el parasitisme<sup>12</sup>. Les dues primeres interaccions no provoquen cap perjudici a l'hoste (en aquest cas, l'home), però el parasitisme sí.

En el mutualisme ambdós individus es beneficien i en el comensalisme un dels individus es beneficia sense tenir cap efecte positiu o negatiu en l'altre individu. En aquest última ocasió, l'ésser humà és l'individu que no es beneficia ni és perjudicat i el microbi, l'organisme que es beneficia. Tant el mutualisme com el comensalisme són relacions estables. La majoria de la biota normal humana la componen microorganismes comensals com ara el bacteri *Escherichia coli* que es troba a l'intestí gros.

El parasitisme és la relació en què el paràsit és l'organisme que viu sobre o dins de l'hoste causant-li un dany i ell obtenint un guany.

### 2.1.2 La microbiota normal a les diferents zones anatòmiques

#### a) Pell

És el primer obstacle que es troben els microbis forans<sup>13</sup> en el seu intent de colonitzar el nostre ésser, ja s'ha dit. Per aquest motiu és una zona amb un gran nombre de cèl·lules bacterianes transeünts que moren després d'una curta estada. Però a la pell també hi ha biota resident generalment concentrada al voltant de les glàndules apocrines<sup>14</sup>, localitzades en punts molt concrets: a les zones axil·lars i genitals, al conducte auditiu extern i al pit. Aquests són indrets humits i calents a diferència de la resta de la superfície cutània que està exposada a un dessecament periòdic molt

---

<sup>12</sup> Classificació extreta de: MADIGAN, Michael T.; MARTINKO, John M.; PARKER Jack. *Brock. Biología de los microorganismos*. Desena edició. Madrid: Pearson Educación, 2004.

<sup>13</sup> De fora, externs.

<sup>14</sup> Un tipus de glàndules sudorípares, productores de suor.

desfavorable per al creixement bacterià. L'olor corporal és el resultat de l'activitat dels bacteris a les secrecions de les glàndules apocrines.

#### b) Tracte respiratori

Les vies respiratòries superiors (nas, boca, faringe i laringe) són les que més microorganismes tenen. La majoria viuen al voltant de les secrecions de les membranes mucoses.

Les vies respiratòries inferiors (tràquea i pulmons), en canvi, són estèrils ja que la majoria dels éssers microscòpics han estat retingudes pels mecanismes de defensa del tracte respiratori superior. Només les partícules amb un diàmetre inferior a 10 µm (una mil·lèsima part d'un mil·límetre) poden penetrar als pulmons.

#### c) Tracte gastrointestinal

Està compost per estómac, intestí prim i intestí gros. El primer té un pH molt baix (pH 2), és a dir, és àcid i això no és gens convenient per la majoria dels microorganismes. Per tant, l'estómac es considera una barrera contra els microbis estranys al tracte intestinal. Tot i així, a



**FIGURA 9.** *Lactobacillus casei*

mesura que el tub digestiu s'allunya de l'estómac, el medi es va fent menys àcid i la microbiota normal augmenta. Alguns d'ells són popularment coneguts: el *Lactobacillus casei* i els bífidus, presents també a la boca i a molts productes làctics.

#### d) Sistema urogenital

Tant la bufeta urinària dels homes com la de les dones són estèrils, és a dir, no hi ha microbis. A les cèl·lules epitelials dels voltants de la uretra, però, hi ha cocs i bacils gramnegatius que si es multipliquen poden arribar a ser patògens i, consegüentment, poden provocar infeccions del tracte urinari, sobretot en dones.



A la vagina femenina adulta, a més, en condicions normals, hi ha glicogen<sup>15</sup> que és fermentat pel bacteri *Lactobacillus acidophilus* produint àcid làctic per defensar-se d'algun microorganisme patogen. També hi podem trobar el llevat *Candida albicans*.

En l'home, en canvi, la biota normal és escassa i hi predominen *Staphylococcus epidermis* i *Streptococcus viridans*.

#### e) Mucosa conjuntival

En aquesta zona la microbiota és gairebé escassa en part degut a la presència de lizozims, un tipus d'enzims que hi ha a les llàgrimes (també a la saliva, els pulmons i als leucòcits<sup>16</sup> entre altres) que hidrolitza<sup>17</sup> els enllaços de les molècules de peptidoglicà, el component principal de la paret cel·lular dels bacteris (*vegeu l'apartat 1.1.1*), i que per tant provoca la mort dels bacteris. De tota manera, hi podem trobar alguns estafilococs i estreptococs.

## 2.2 CAVITAT ORAL

La cavitat oral és un hàbitat microbià molt favorable ja que hi ha moltes restes de menjar i restes epitelials sobretot al voltant de les dents, la temperatura està entre els 35°C i els 36°C i el pH sol estar al voltant de 7 (pH neutre, ni àcid ni bàsic). Tot i així, la saliva pot fer perillar la vida dels microorganismes (majoritàriament bacteris). Aquest fluid conté lizozims, els enzims que també es troben a les llàgrimes i que hidrolitzen els enllaços de la mureïna de la paret cel·lular bacteriana, i lactoperoxidasa, un altre enzim que també destrueix els bacteris.

### 2.2.1 Flora bacteriana bucal

La microbiota normal de la boca (o flora bacteriana bucal) varia al llarg de la vida humana. El principal factor causant d'aquesta variació és la presència de les dents.

---

<sup>15</sup> Polisacàrid (glúcid).

<sup>16</sup> Glòbuls blancs. Cèl·lules sanguínies que intervenen en la defensa de l'organisme contra agents o substàncies estranyes.

<sup>17</sup> Trenca, talla.

Durant el primer any de vida no hi ha dents i hi predominen els bacteris anaeròbics facultatius, els estreptococs i els bacteris del gènere *Lactobacillus*. A l'edat adulta la biota és més aviat anaeròbica tot i que a la boca l'oxigen és molt present. Aquesta falta d'oxigen segurament sigui causa de l'activitat que porten a terme els bacteris anaeròbics facultatius i que dificulta la difusió de l'oxigen a la superfície dental.

Microorganisme	%
<i>Streptococcus</i>	52
<i>Actinomyces</i>	15
<i>Lactobacillus</i>	1
<i>Neisseria</i>	2
<i>Veillonella</i>	1
<i>Prevotella</i>	4
<i>Candida</i>	<1

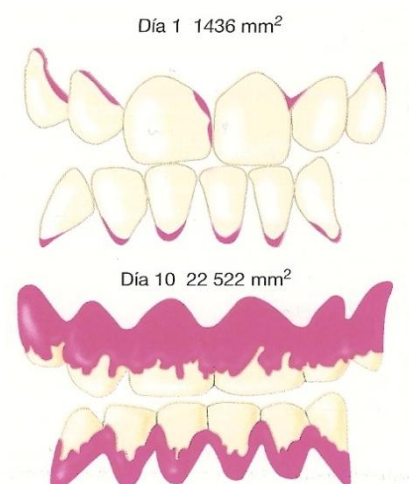
**FIGURA 10.** Presència dels diferents microorganismes al paladar humà. Indicat en tant per cent

### 2.2.2 Placa dental

Les dents són molt importants en el creixement microbià perquè permeten als microorganismes tenir un substrat on viure.

Una vegada les dents són netes, aquestes s'impregnen de les glicoproteïnes que hi ha a la saliva de manera que es forma un microfilm en el qual es fixen cèl·lules bacterianes que formaran microcolònies. Com a conseqüència del desenvolupament d'aquestes microcolònies es forma una zona de bacteris espessa anomenada placa dental.

La colonització del microfilm glucoproteïc de les dents es limita a unes quantes espècies del gènere *Streptococcus* entre les que destaca *S. mutans*, el bacteri causant de la caries dental.



**FIGURA 11.** Superfície ocupada pels bacteris a les dents netes (a dalt) i després de 10 dies sense rentar-se-les (a baix)

### **3 L'AIGUA EMBOTELLADA**

En vuit anys, de 1998 a 2005, la producció d'aigua embotellada es va duplicar. Així ho anunciava *El Periódico* el 14 de setembre del 2007 (*vegeu l'Annex*) després que el *Worldwatch Institute*, una organització dedicada a la recerca, publicqués el seu informe anual *Signes vitals* en què analitza la situació mundial des de diversos aspectes.

En el mateix article apareixia un gràfic que indicava els quinze països del món amb un consum per càpita d'aigua embotellada més elevat a l'any 2005. La informació va ser extreta de la *Beverage Marketing Corporation*, una empresa privada dedicada a la investigació del mercat de les begudes. Segons aquest diagrama, Espanya ocupava la cinquena posició en el rànquing amb 146,5 litres d'aigua embotellada per càpita enfront els 191,1 litres d'Itàlia (que encapçalà la llista) o els gairebé 99 litres dels Estats Units (desena posició).

Efectivament, la societat actual, preocupada per la seva salut però no per la de la Terra, beu molta aigua envasada, possiblement perquè és més pràctic o pels efectes *beneficiosos* que aporta, però el plàstic amb el que estan fetes les ampolles pot representar un problema no tan sols pel medi ambient (no és un material biodegradable) sinó que també ho pot ser per a la salut.

Seguidament es tracten els dos tipus d'aigua que s'han utilitzat en aquest treball de recerca (l'aigua mineral i la de l'aixeta) i també les característiques de l'envàs.

#### **3.1 L'AIGUA**

##### **3.1.1 Aigua mineral natural**

L'aigua embotellada que es pot comprar a les botigues té unes qualitats que la diferencia de la resta d'aigua potable. Segons la normativa europea, l'aigua mineral natural es distingeix de la resta d'aigua apta per al consum humà pel seu contingut en minerals, pels efectes beneficiosos per la salut declarats i pel seu origen.

La seva naturalesa, és a dir, el seu contingut mineral pot ser molt divers. Hi ha aigua de mineralització dèbil, de mineralització forta i amb menys o més quantitat d'un

determinat mineral (sodi, magnesi, calci, fluor, etc.). Com que aquests nutrients són útils per al nostre cos, segons la naturalesa mineral, l'aigua tindrà uns efectes o uns altres sobre la nostra salut. Per exemple, una aigua mineral natural amb nivells de sodi baixos és beneficiosa per aquelles persones amb hipertensió arterial o amb problemes renals<sup>18</sup>.

Pel que fa a l'origen, l'aigua mineral brota de fonts naturals o sigui que no és un medi aïllat. Aquest fet provoca que els organismes vius puguin tenir contacte amb ella, sobretot els microorganismes, generalment innocus, que inclòs hi poden establir el seu hàbitat. Aquests microorganismes són majoritàriament bacteris però també podem trobar espores fúngiques, que es troben en gran quantitat per tot arreu, que donarien lloc a un fong si disposessin de matèria orgànica a partir de la qual germinarien. Però a l'aigua no troben l'aliment suficient per fer-ho.

Les empreses distribuïdores de l'aigua han de dur a terme diversos tractaments bactericides en totes les etapes del procés per evitar la contaminació microbiològica del líquid fonamental mentre això no provoqui una variació en les seves propietats. Aquests tractaments s'apliquen a les canonades,



**FIGURA 12.** *Planta embotelladora*

als dipòsits, a les bombes, a les ampolles i els taps i fins i tot a l'aire que s'empra per inflar les ampolles i l'oli lubricant de les màquines. Així mateix, tot el personal que intervé en el procés ha de seguir uns protocols d'higiene i seguretat biològica. Malgrat els esforços, l'aigua mineral natural mai és estèril però no conté cap bacteri, virus o fong patogen.

Les empreses, a més, han d'analitzar el seu producte abans de comercialitzar-lo. Per fer-ho, tenen en compte la presència de coliforms a l'aigua. Els coliforms són un grup de bacteris compostat per espècies amb forma de bacil, que no produeixen espores, gramnegatives, aeròbiques o anaeròbiques facultatives que fermenten la lactosa i

---

<sup>18</sup> Pertanyents als ronyons.

produeixen gas quan s'incuben a 35°C durant 48 hores i que es troben en el tracte intestinal dels éssers humans i els animals. És per això que s'usen per analitzar l'estat microbiològic de l'aigua i la seva presència indica que hi ha contaminació fecal.

### **3.1.2 Aigua de la xarxa de proveïment urbà**

És l'aigua popularment coneguda com aigua de l'aixeta i prové dels embassaments. Aquesta aigua també està sotmesa a un procés que la fa apta per al consum humà. Per potabilitzar-la s'empren diferents mètodes: la filtració, la depuració, la cloració, o l'aplicació d'ozó, llum ultraviolada o brom. No té les mateixes propietats que l'aigua mineral i, sobretot, té més clor, un producte químic tòxic per als microorganismes.

## **3.2 LES AMPOLLES DE PLÀSTIC**

Des de la seva invenció, el plàstic ha adquirit molta importància en l'actual societat del costum, sobretot en l'envasament de productes. A simple vista té totes les qualitats per ser el material ideal per aquest ús: és barat, mal·leable i resistent a diferents agents químics. A més a més és lleuger i això el converteix en pràctic. Però el plàstic és un producte químic derivat del petroli i això pot provocar efectes negatius a la salut humana.

Anys enrere s'usava el PVC per elaborar ampolles d'aigua i altres envasaments. El policlorur de vinil, que és el nom complet del PVC, és un termoplàstic<sup>19</sup> obtingut a partir de clorur de sodi (NaCl), la sal comuna que s'utilitza en l'alimentació, i petroli o gas natural a més d'additius tòxics que es poden alliberar a l'aliment que s'envasa. Per aquest motiu les autoritats han prohibit que s'utilitzi el PVC com a envasament alimentari i s'ha reemplaçat pel PET.

El PET també és un termoplàstic i el seu nom complet és tereftalat de polietilè. Està fet d'àcid teraftàlic i etilenglicol i en la seva producció s'empra el triòxid d'antimoni (Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) com a catalitzador, de manera que el producte final conté ínfimes parts d'antimoni. L'antimoni és un element químic que pot resultar molt perjudicial per a la

---

<sup>19</sup> Tipus de plàstic que s'estova quan se li aplica la calor suficient i que s'endureix quan es refreda.

salut, es pot arribar a morir si s'ingereix una dosi de 100 mg, però en quantitats petites, no és danyí.

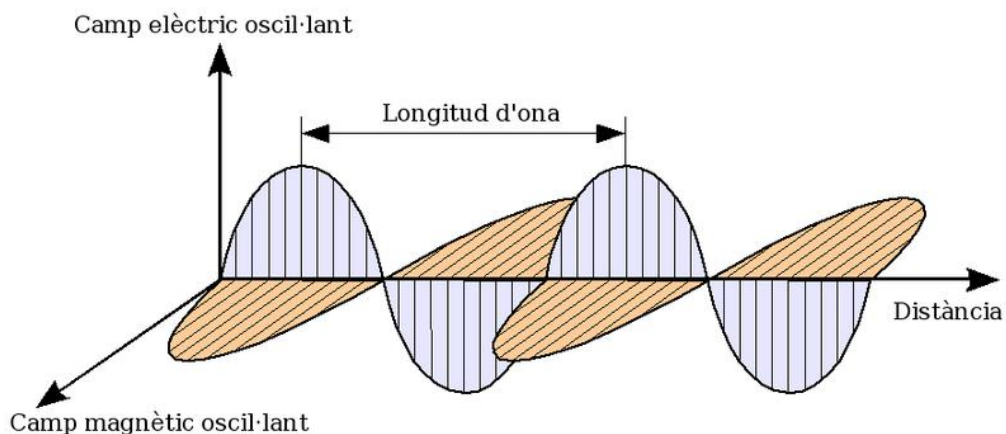
Tant el PET com el PVC, i altres plàstics, alliberen part de les substàncies que el componen en unes condicions normals. Aquest alliberament, però, augmenta quan la temperatura és elevada. Tot i així, moltes normatives europees i estatals controlen molt la qualitat dels envasos plàstics per evitar qualsevol possible contaminació.



**FIGURA 13.** Els símbols del reciclatge que es poden trobar als envasos de PET i als de PVC així com també als altres plàstics, sovint ajuden a identificar el material amb el que està fet un envàs plàstic

### 3.2.1 Les ampolles de plàstic i l'espectre electromagnètic

L'espectre electromagnètic és el conjunt d'ones electromagnètiques. Aquestes ones es propaguen per l'espai i tenen diferents longituds. La longitud d'ona ( $\lambda$ ) és la distància que hi ha entre dos punts consecutius que es troben en el mateix estat d'oscil·lació en un instant de temps determinat tal i com s'indica en la següent figura:




**FIGURA 14.** Representació gràfica d'una ona electromagnètica

Hi ha una relació entre la longitud i l'energia de l'ona. Com més petita sigui la longitud, més energètica serà aquesta i, al contrari, com més gran sigui, menys energia tindrà.

Hi ha ones electromagnètiques per tot arreu però la majoria no les percebem. Les més conegudes són els raigs X que s'empren per fer radiografies, les microones que s'usen a l'electrodomèstic de mateix nom, les de ràdio i les de la llum (també anomenades de l'espectre visible). Aquestes dues últimes són les que captem per alguns òrgans dels sentits: l'orella i l'ull, respectivament.

Les ones que componen la llum blanca tenen diferents longituds que oscil·len entre els 390 nm<sup>20</sup> i els 780 nm i que corresponen, segons la longitud, amb els colors. És a dir, la llum blanca està composta per tots els colors.



Color	Longitud d'ona ( $\lambda$ )
Violeta	390 - 455 nm
Blau	455 - 492 nm
Verd	492 - 577 nm
Groc	577 - 597 nm
Taronja	597 - 622 nm
Vermell	622 - 780 nm

**FIGURA 15.** Longituds d'ona aproximades de l'espectre visible

El fet que una ampolla sigui de plàstic de color blau implica la presència de pigment blau i, quan la llum incideix en ell, aquest deixa passar totes les ones excepte les que tenen una longitud d'ona corresponent al color blau (455 - 492 nm). Aquelles que corresponguin al color blau seran reflectides. Per això l'ull humà capta ones

---

<sup>20</sup> Nanòmetres. És una unitat de longitud que equival a  $10^{-9}$  m, és a dir, una cent milionèsima part d'un metre.

procedents de l'ampolla que, una vegada processades pel cervell, es pot dir que són de color blau.

Això no passa a les ampolles transparents. La transparència és l'absència de color i, per tant, també és l'absència de pigment i la manca d'aquest implica que cap ona de l'espectre visible es reflecteixi, s'absorbeixen totes. Així doncs, l'ull de l'home no capta cap ona electromagnètica.

En definitiva, com que les ampolles blaves reflecteixen l'espectre blau, l'energia de les ones llumíniques que traspassen el plàstic blau serà menor a la de les ones que traspassen el plàstic transparent perquè a la llum del primer cas li manquen unes ones molt energètiques de l'espectre visible, les blaves. Tanmateix, els colors foscos retenen més la calor que no pas els clars, així doncs, les ampolles de color blau retindran més calor que les ampolles transparents.



# **PART PRÀCTICA**

## 4 INTRODUCCIÓ

Una vegada adquirits els coneixements previs a l'experimentació és necessari explicar com s'ha executat l'experiment, quin material i quin mètode s'han fet servir i quins resultats s'han obtingut per poder arribar a unes conclusions amb les que es donarà validesa o no a la hipòtesi inicial.

No obstant això, abans cal posar atenció a la relació que hi ha entre el propòsit d'aquest treball de recerca i l'experiment que s'ha dut a terme, o sigui, cal recordar quina era la hipòtesi plantejada per poder entendre el procediment realitzat al laboratori i després, fer una breu descripció de com s'ha plantejat l'experiment.

La hipòtesi era la següent:

*El fet de reutilitzar les ampolles de plàstic d'aigua mineral natural provoca un augment en el nombre de microorganismes de l'aigua i aquest augment és major a les ampolles de plàstic transparent amb molts replecs que no pas a les ampolles de plàstic blau amb pocs o gens replecs.*

I en conseqüència s'han hagut de reutilitzar ampolles de diferents colors (transparents i blaves) i diferents formes (amb molts replecs, amb pocs replecs i llises) durant un mateix temps i, després, agafar mostres d'aigua de cada una d'elles amb l'objectiu de fer créixer els possibles microorganismes que hi hagués en un medi de cultiu adient. Durant els dies següents ha estat necessari fer el recompte de microorganismes i extreure conclusions.

Treballar amb microorganismes no ha estat fàcil. Per això s'ha hagut de realitzar un assaig en el que s'ha procurat obtenir les pautes necessàries per l'experiment en sí; i una experiència (experiència 1) que hauria d'haver estat la concloent però que, degut als resultats obtinguts, s'ha hagut de repetir posteriorment amb algunes modificacions (experiència 2). Més tard s'ha dut a terme la tinció de Gram amb la que s'ha provat d'identificar el tipus de bacteris que han aparegut fent ús de diversos colorants.

Tot seguit es detalla l'estudi científic realitzat.

## 5 MATERIAL I MÈTODE

En la part principal de recerca s'han dut a terme l'assaig i les experiències 1 i 2 amb l'objectiu d'aconseguir un cultiu microbiològic de mostres d'aigua extretes d'ampolles reutilitzades i d'ampolles sense reutilitzar. Durant l'elaboració dels cultius ha estat essencial mantenir unes condicions d'asèpsia<sup>21</sup> estrictes. El material emprat en aquestes tres experiències ha estat el següent:

### a) Olla a pressió

Amb ella s'han esterilitzat tots els tubs d'assaig usats. La pressió a la que s'arriba dins d'aquest tipus d'olla (1,2 atm) permet que l'aigua bulli a uns 120°C, una temperatura més alta que la temperatura d'ebullició màxima de l'aigua en una olla convencional (100°C). Aquesta temperatura tan elevada provoca la desnaturalització<sup>22</sup> de les proteïnes i en definitiva, la mort dels microorganismes.

### b) Reixeta

S'ha col·locat entre la base de l'olla a pressió i els tubs perquè aquests no estiguessin en contacte directe amb l'aigua.

### c) Paper d'alumini

Ha calgut per recobrir els tubs d'assaig en la seva esterilització per tal d'evitar la contaminació en treure'ls de l'olla. També s'hauria pogut fer amb paper de diari però la tinta, amb l'efecte del vapor d'aigua i la temperatura, hagués contaminat els tubs amb productes químics perillosos per als microbis, que s'haurien d'haver eliminat amb altres tècniques.

### d) 12 ampolles d'aigua de 0,5 L

S'han fet servir de diferents formes (llises o amb diferents graus de rugositat) i colors (blau o transparent). Sis d'elles s'han reutilitzat i les altres sis no. S'han extret mostres

---

<sup>21</sup> Esterilitat.

<sup>22</sup> Pèrdua de la forma tridimensional i, com a conseqüència, de la funcionalitat de les proteïnes.

de totes les ampolles. En el següent apartat s'especifiquen les característiques de cada envàs.

e) Plaques de Petri amb medi de cultiu d'agar-agar<sup>23</sup>

En elles s'ha abocat l'aigua provinent de les ampolles. El medi de cultiu d'agar-agar proporciona als microorganismes els nutrients necessaris per créixer. En cap cas el medi de cultiu ha de tenir cap substància biocida<sup>24</sup>.

f) Bec de Bunsen

S'ha mantingut encès durant tota l'estona que s'ha estat sembrant per crear una atmosfera anòxica<sup>25</sup> amb temperatura elevada al voltant de la flama, unes condicions que impossibiliten la vida microbiana. A més a més ha servit per assegurar-se que el material en contacte amb l'aigua ha estat estèril durant tot el temps que s'han portat a terme les sembres.

g) Tubs d'assaig

S'han fet servir per abocar les mostres d'aigua i diluir-les.

h) Gradeta per a tubs d'assaig

En ella s'han mantingut els tubs d'assaig en els que s'han fet les dilucions drets i dins de l'atmosfera anòxica per evitar qualsevol agent contaminant.

i) Ampolles d'aigua estèril de 10 ml

En aquest líquid s'han diluït les mostres d'aigua. Ha estat important utilitzar aigua estèril i no pas aigua de l'aixeta o mineral per no adulterar microbiològicament o químicament les mostres.

---

<sup>23</sup> Polisacàrid mucilaginos molt emprat en microbiologia per produir de medis de cultiu sòlids.

<sup>24</sup> Compost químic emprat per a la destrucció d'organismes vius.

<sup>25</sup> Sense oxigen.

j) Xeringues estèrils de 10 ml amb agulla

S'han emprat per treure aigua de les ampolles d'aigua estèril i per fer les dilucions. L'agulla ha permès extreure líquid de les ampolles d'aigua estèril amb facilitat.

k) Vas de precipitats

L'aigua estèril rebutjada s'ha abocat en aquest recipient.

I per tal d'identificar els bacteris obtinguts als cultius preparats a l'experiència 2 s'ha dut a terme la tinció de Gram. Aquesta tècnica consisteix en aplicar diferents colorants a les cèl·lules d'una mateixa colònia. A més de mantenir d'utilitzar material estèril, ha calgut realitzar un frotis, una preparació prèvia a la coloració amb la que s'han fixat els bacteris sobre el portaobjectes en el que s'han aplicat els colorants. El material que s'ha utilitzat ha estat el següent:

a) Cultius de bacteris

Obtinguts a l'experiència 2.

b) Portaobjectes

En ells s'han estès els bacteris abans de tenyir-los.

c) Nansa de sembra

Ha estat útil per estendre part de la població bacteriana dels cultius als portaobjectes.

d) Cristall violeta

És el colorant inicial de la tinció.

e) Safranina

És el colorant de contrast de la tinció.

f) Lugol

És una dissolució de iode que serveix per fixar el colorant inicial (cristall violeta).

g) Alcohol de 95°

Ha servit per decolorar el cristall violeta de les mostres.

h) Aigua destil·lada

S'ha usat per rentar l'excés de colorant dels portaobjectes, per realitzar el frotis i per netejar la nansa de sembra després d'estendre els bacteris als portaobjectes.

i) Flascó rentador

Ha servit per aplicar l'aigua destil·lada als portaobjectes a l'hora d'eliminar l'excés de colorant.

j) Cronòmetre

S'ha empleat per mesurar el temps que ha romàs cada colorant en els portaobjectes.

k) Alcohol etílic

S'ha utilitzat per assegurar-se que els portaobjectes han estat estèrils.

l) Paper d'assecar

Amb ell s'ha impregnat els portaobjectes d'alcohol etílic i s'ha eixugat l'aigua sobrant dels portaobjectes després de fer la tinció.

m) Bec de Bunsen

S'ha fet servir per esterilitzar la nansa de sembra i per esterilitzar els portaobjectes. També s'ha utilitzat per accelerar l'elaboració del frotis.

n) Pinces de fusta

Amb elles s'han acostat els portaobjectes a la flama del Bec de Bunsen.

o) Safata de plàstic

S'ha utilitzar per elaborar una cubeta de tinció, això és, un recipient on s'han tenyit els portaobjectes sense tocar la superfície sobre la que s'ha realitzat (la taula del laboratori).

p) Varettes de vidre

Han servit per elaborar la cubeta de tinció i per aplicar l'oli d'immersió als portaobjectes.

q) Microscopi òptic

És l'instrument amb el que s'han observat les mostres de bacteris tenyits a 1000 augments.

r) Oli d'immersió

És un fluid viscos que té el mateix índex de refracció<sup>26</sup> que el vidre. Això provoca que no es perdi llum per reflexió a la superfície de l'objectiu i que la resolució del microscopi augmenti. La imatge, doncs, es veurà més clara.

El mètode utilitzat ha estat l'hipoteticodeductiu. Aquest model és àmpliament utilitzat en la ciència i consisteix en fer-se preguntes, formular unes possibles respostes (hipòtesis) i posar-les a prova. És un mètode científic que té un procediment molt pautat.

En primer lloc cal idear una afirmació hipotètica a partir de l'observació d'un fet mitjançant un raonament inductiu, és a dir, el pensament creatiu. Tot seguit, cal deduir unes conseqüències derivades de la hipòtesi formulada fent ús del raonament deductiu, i a continuació és necessari dur a terme un o diversos experiments per confirmar-la.

---

<sup>26</sup> L'índex de refracció és propi de cada medi (aire, aigua, vidre, etc.) i és la relació entre la velocitat de la llum en el buit i la velocitat de la llum en aquest medi.

## 6 PROCEDIMENT

Abans de començar un experiment és necessari plantejar un disseny experimental que permeti obtenir la informació suficient per corroborar o impugnar la hipòtesi inicial. A més a més, ha d'indicar clarament quin serà el procés a seguir i les variables que es tindran en compte.

En un experiment existeixen tres tipus de variables: la variable independent, la variable dependent i les variables controlades. La primera és aquella que hom pot controlar com per exemple la temperatura, la concentració d'un determinat enzim, la concentració d'un substrat<sup>27</sup> o la forma i el color de les ampolles de plàstic d'aigua mineral, com és el cas d'aquest treball de recerca. El segon tipus de variable, la variable dependent, és aquella que observem que es modifica durant l'experiment i depèn de la variable independent. En el present estudi, la variable dependent és el creixement de microorganismes. Pel que fa a la resta de variables (variables controlades), és important que es mantinguin fixes a totes les mostres per comprovar el veritable efecte que té la modificació de la variable independent; de manera contrària, els resultats obtinguts serien poc fidels a la realitat. Vegem-ho en un exemple:

En aquesta investigació s'ha tractat amb microorganismes i la majoria no suporten temperatures inferiors a 0°C sinó que tenen una temperatura de creixement òptim d'uns 25°C-35°C. No seria rigorós, per l'estudi que s'ha realitzat, haver deixat algunes plaques a la nevera (on la temperatura està pels voltants dels 0°C), altres a temperatura ambient (a uns 20°C) i unes altres en una estufa de cultiu on s'hauria regulat una temperatura constant de 40°C. Tampoc es podria haver realitzat part dels cultius a l'estiu i l'altre part, a l'hivern; en ambdós casos a temperatura ambient. Certament, el creixement microbià seria diferent segons la temperatura.

A l'hora d'elaborar un disseny experimental també cal tenir en compte que és possible que, en algun dels experiments que fem, els resultats siguin erronis o s'hagin obtingut per atzar. No hi ha prou amb un sol experiment per demostrar un fet. És per això que

---

<sup>27</sup> Molècula sobre la que actua un enzim.



s'ha hagut de fer almenys una rèplica de cada experiència que s'ha portat a terme. A més, una manera d'assegurar-se que els resultats que s'obtenen són conseqüència de la modificació dels valors de la variable independent és realitzant un control, és a dir, efectuant una altra experiència, amb els seves oportunes rèpliques, en la que no es modifica cap variable. Els controls d'aquest estudi són les mostres de l'aigua de les ampolles que no s'han reutilitzat. Així es pot avalar o contradir que la presència de microbis a les plaques de Petri és degut a la reutilització de les ampolles.

Com s'ha esmentat abans, a la Introducció d'aquest marc pràctic, per obtenir uns resultats amb els que es pogués tractar, s'han hagut de realitzar tres experiències essencialment iguals, és a dir, utilitzant les mateixes tècniques i un procés molt semblant però amb petites diferències que han facilitat la recollida de dades. Més endavant es tractaran detalladament però abans cal tenir en compte les variables de l'experiment, comunes en totes tres experiències i algunes de les quals ja s'han enunciat abans, així com també la tècnica i el protocol empleats en tots tres casos.

<b>Variables independents</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- El color de les ampolles.</li> <li>- La forma de les ampolles.</li> </ul>
<b>Variable dependent</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La quantitat de colònies bacterianes i fongs que han crescut a les plaques després de reomplir les ampolles.</li> </ul>
<b>Variables controlades</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La persona que ha begut de les ampolles.</li> <li>- El nombre de vegades que s'ha reomplert i s'ha begut aigua de cada una de les ampolles en un mateix dia.</li> <li>- Els dies de reutilització d'una mateixa ampolla.</li> <li>- El moment de beure les ampolles.</li> <li>- L'aixeta de la qual s'han reomplert les ampolles.</li> <li>- El tipus i la quantitat del medi de cultiu.</li> <li>- Les condicions de cultiu.</li> <li>- La capacitat de l'ampolla.</li> </ul>

**FIGURA 15.** Les variables experimentals

Mantenir fixes les variables controlades per no alterar l'experiment és molt important, ja s'ha dit, per això a continuació s'especificarà, cas per cas, com hauria afectat als resultats el canvi d'aquestes variables:

- **La persona que ha begut de les ampolles.** Cal dir que per beure s'establiria contacte directe entre la boca i l'ampolla i la flora bacteriana bucal pot variar molt segons la persona. Aquelles persones que tenen una elevada secreció salival (les que pateixen ptialisme<sup>28</sup>, per exemple), possiblement tinguin menys bacteris que no pas una persona amb una secreció salival normal ja que la saliva conté enzims que destrueixen els bacteris. De la mateixa manera, algú que estigui prenent antibiòtic o que l'hagi pres recentment o algú que practiqui la natació, probablement també tingui menys microbis que una persona amb una salut normal i que no practiqui aquest esport perquè els antibiòtics són mortals pels bacteris així com també el clor de l'aigua de les piscines. Hi ha multitud de casos que exemplifiquen la variació de la microbiota normal a la cavitat normal. En definitiva, ha estat essencial que la font de contaminació de l'ampolla sigui la mateixa perquè la quantitat de microorganismes que s'ha establert a l'aigua fos igual o molt semblant.
- **El nombre de vegades que s'ha reomplert cada una de les ampolles en un mateix dia.** El fet de reomplir les ampolles significa renovar l'aigua. Es pot entendre com un sanejament de l'ampolla en el que s'afegeixen nous nutrients i s'eliminen els productes tòxics. Alhora (i suposadament), els microbis són arrossegats per l'aigua quan es beu, és a dir, el nombre de microorganismes decreix a mesura que es beu aigua. Si una ampolla s'hagués renovat dues vegades diàries i la resta, tan sols una; possiblement a la primera ampolla hi haguessin romàs menys microbis. Conseqüentment, les mostres d'aquesta ampolla presentarien un nombre més baix de fongs i/o bacteris que la resta de mostres i la recerca no hauria sigut fidel a la realitat.
- **El nombre de vegades que s'ha begut aigua de cada una de les ampolles en un mateix dia.** Quantes més vegades es begui, o més concretament, quantes més vegades la boca entri en contacte amb l'interior de l'ampolla; més probabilitats

---

<sup>28</sup> Secreció salival exagerada.

de contaminar l'aigua hi ha. Per això ha calgut beure les mateixes vegades a totes les ampolles que s'han reutilitzat.

- **Els dies de reutilització d'una mateixa ampolla.** És necessari que els possibles microorganismes de l'aigua de les ampolles s'hagin estat el mateix temps dins l'ampolla perquè, en el cas dels bacteris i els llevats, que tenen una reproducció asexual, es podrien multiplicar molt en unes hores. Per tant, el que s'investiga en el present estudi es veuria afectat ja que no hi ha la mateixa quantitat de bacteris un dia que a l'endemà o que el dia anterior.
- **El moment de beure les ampolles.** S'ha hagut de beure cada una de les ampolles al mateix moment perquè és la única manera de controlar que la microbiota oral és la mateixa o molt semblant. No hauria estat lògic que, un dels dies de l'experiència, s'haguessin begut tres ampolles abans d'esmorzar per primera vegada del dia, i les altres tres, també per primera vegada, mitja hora després d'esmorzar ja que en aquest instant la quantitat de microorganismes a la boca és més gran que no pas la quantitat de l'instant anterior degut a la presència de restes de menjar que els ha permès créixer i reproduir-se.
- **L'aixeta de la qual s'han reomplert les ampolles.** Cada aixeta posseeix una canonada diferent de la qual li arriba l'aigua. És probable que alguna d'aquestes canonades estiguin contaminades microbiològicament degut a restes de biològiques que hi queden. Tot i així, a simple vista no sabem si una canonada està infectada o no. Per això ha calgut reomplir totes les ampolles amb l'aigua de la mateixa aixeta: per assegurar-se que totes les mostres provenen d'aigua inicialment igual. Tanmateix, també és possible que una aixeta tingui més calç que una altra i això afecti a la composició química de l'aigua.
- **El tipus i la quantitat del medi de cultiu.** Una vegada són fora de l'ampolla, els microorganismes obtenen l'aliment necessari per viure en el medi de cultiu. En el cas dels experiments d'aquesta investigació, d'agar-agar. Si algunes plaques de Petri haguessin contingut un altre tipus de medi, amb uns altres nutrients de diferent rendiment energètic, el creixement no hauria sigut el mateix en totes les mostres. Quant a la quantitat del medi de cultiu ha hagut de ser la mateixa

perquè el rendiment energètic de 100 g d'agar-agar no és el mateix que el del doble (200 g) d'aquest mucopolisacàrid.

- **Les condicions de cultiu.** La temperatura és un dels factors que més afecta el creixement bacterià. Com s'ha exemplificat abans, posar algunes mostres a la nevera, unes a temperatura ambient i unes altres en una estufa no hauria estat útil per a la present investigació ja que no s'estudia l'efecte de la temperatura en el creixement d'una població microbiana sinó que es vol comprovar l'efecte de l'ampolla en el creixement d'aquestes. En aquest cas només en les mostres a temperatura ambient i les que es mantenen a 40°C haguessin aparegut colònies.
- **La capacitat de l'ampolla.** La concentració de cèl·lules bacterianes en un determinat medi afecta considerablement al creixement de la població degut a la velocitat amb la que s'exhaureixen els nutrients i a l'acumulació de productes metabòlics tòxics (*vegeu la figura 4*). Efectivament, en funció del volum d'aigua que admet l'ampolla (i considerant que el nombre de cèl·lules es manté fix), la concentració serà menor amb més volum i major, amb menys volum. La concentració, doncs, ha hagut de ser la mateixa en tots els casos.

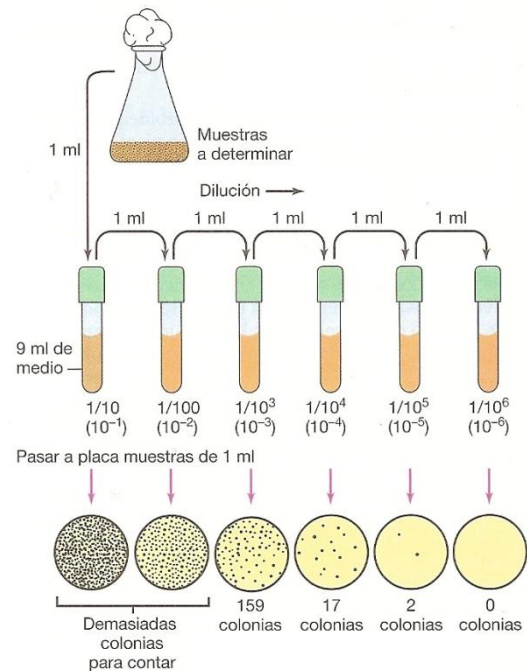
Amb l'objectiu d'estimar el nombre de colònies que han aparegut a cada ampolla s'han extret mostres d'aigua de cada ampolla i s'han introduït en una placa de Petri amb un medi de cultiu que fa possible la vida dels possibles microbis de l'aigua.

El creixement de poblacions bacterianes es pot mesurar de diverses maneres: estimant la quantitat d'algun component que posseeixen, el pes sec total de les cèl·lules o els canvis en el nombre de bacteris. Aquest últim mètode és el que s'ha utilitzat en la present investigació.

La cèl·lula bacteriana és molt petita, la majoria tenen una mida de només uns pocs micròmetres, i a ull nu no es pot veure. Per observar un bacteri, doncs, es requereix l'ús d'un microscopi, però hi ha altres maneres de calcular la variació de la quantitat de cèl·lules ja que aquests microbis sovint s'organitzen en colònies (*vegeu l'apartat 1.1.3*) que es poden veure sense necessitat d'usar cap aparell.

Així doncs, el recompte de bacteris s'ha dut a terme comptant les colònies existents a la placa de Petri i com que cada colònia procedeix d'un sol bacteri, el nombre de colònies coincideix amb el nombre de bacteris inicials en el moment de la sembra. A l'hora d'anotar els resultats, doncs, ha calgut utilitzar com a unitat de mesura les UFC, o el que és el mateix, les unitats formadores de colònies. A aquest tipus de recompte se'l coneix amb el nom de recompte de cèl·lules viables o recompte en placa.






Malgrat l'aparent senzillesa d'aquest tipus de recompte, s'ha de dir que per evitar estimacions errònies ha estat necessari diluir la suspensió cel·lular en aigua estèril (per no contaminar les mostres) abans de sembrar la placa. En cas contrari, un elevat nombre de colònies faria impossible el recompte. A més, moltes d'elles es fusionarien i el recompte igualment no seria precís. Sembrar amb una mostra molt diluïda tampoc seria convenient perquè el número de colònies que creixerien seria tan baix que no seria estadísticament significatiu. En definitiva, s'ha hagut d'escollir una dilució intermèdia en la es pugui realitzar un bon recompte (vegeu la figura 16)





**FIGURA 16.** Diferents dilucions d'una mateixa suspensió cel·lular

Per comptar els fongs tan sols ha calgut observar els que hi havia a cada placa una vegada l'espora havia germinat i les hifes havien crescut, és a dir, quan fossin visibles.

En relació a les ampolles, s'han utilitzat un total de set tipus diferents tot i que a l'assaig només s'ha fet servir un tipus i a les experiències 1 i 2, sis de diferents. Els criteris de selecció han estat el color, la quantitat dels replers i la forma de la boca (normal o tipus *sport*). La marca comercial no ha tingut a veure a l'hora d'escollir les ampolles en cap moment. Tot seguit es descriuen els set tipus d'ampolles utilitzades en l'estudi identificades per lletres enlloc d'identificar-les pel nom de la marca comercial o l'empresa distribuïdora.

Lletra id.	Color	Tipus de boca	Forma	Imatge
A	transparent	normal	10 replecs profunds base circular	
B	transparent	<i>sport</i>	10 replecs profunds base circular	
C	transparent	normal	molts replecs poc profunds base circular	
D	blau	normal	6 replecs profunds base circular	
E	blau	normal	8 replecs profunds base quadrada	

F	blau	normal	molts replecs profunds base circular	
G	blau	normal	llisa un sol replec profund base quadrada	

**FIGURA 17.** Taula d'identificació dels tipus d'ampolles utilitzats en aquest estudi

S'ha de dir que en un principi l'ampolla C no es tenia pensat utilitzar-la sinó que s'ha escollit després de realitzar l'experiència 1.

Quant a la duració de l'experiment, cada experiència ha durat cinc dies, més les seves respectives observacions.

Pel que fa a la pauta que s'ha seguit a l'hora de beure de les ampolles utilitzades en aquest treball de recerca, ha estat sempre la mateixa per a cada una d'elles i ha consistit en començar a beure el dia 1 de l'experiment fins el cinquè dia (el darrer). Al final de cada jornada, i coincidint amb l'exhauriment de l'aigua de totes les ampolles, aquestes s'han reomplert sempre des de la mateixa aixeta i a l'atzar. També cal dir que l'ordre en el que s'ha begut de les ampolles ha estat aleatori per tal d'evitar que, suposadament, a l'ampolla X (si sempre hagués estat la primera en utilitzar) hi quedessin restes de menjar o restes d'algun producte biocida com el dentífric o el clor (el subjecte que ha begut l'aigua de les ampolles practica la natació). Els dies 3 i 5 s'han obtingut les mostres amb les que s'han sembrat les plaques.

Per l'altra banda, les ampolles que no s'han reutilitzat no s'han obert fins el darrer dia de l'experiència (dia 5) que és quan s'han sembrat les plaques amb mostres d'aigua d'aquestes ampolles.

Seguidament s'adjunta una taula que indica cada una de les accions portades a terme durant els cinc dies que ha durat cada experiència.

DIA	1	2	3	4	5
ACCIÓ	Beure i reomplir	Beure i reomplir	Beure, reomplir i sembrar	Beure i reomplir	Beure, reomplir i sembrar

*FIGURA 18. Planificació en el temps de cada una de les experiències*

## 6.1 Assaig

El 10 de juny de 2009 es va començar aquesta experiència amb l'objectiu de trobar la dilució adequada per realitzar un bon recompte de microorganismes a les plaques de Petri de l'experiència 1. És a dir, es va fer un simulacre del veritable experiment però només amb una ampolla: l'ampolla A. Com s'ha dit anteriorment, l'ampolla C no s'ha tingut en compte fins després de la realització de l'experiència 1. Per tant, només es van utilitzar les ampolles A, B, D, E, F i G i es va seleccionar l'ampolla A per dur a terme l'assaig, perquè segons la hipòtesi formulada devia ser la que contenia més microbis després de reutilitzar-la ja que és transparent, amb bastants replecs i amb la forma de la boca que permet el contacte directe amb la cavitat bucal del subjecte que ha begut l'aigua de les ampolles.

El procés seguit és el següent:

Els dies 1 i 2 es beu de l'ampolla fins a esgotar l'aigua. En aquest moment, que coincideix amb el final del dia, es reomple l'ampolla. A més, el dia 2 es van haver d'esterilitzar els tubs d'assaig que s'utilitzarien a l'endemà. Per fer-ho es van embolicar els tubs amb paper de plata i es van introduir sobre una reixeta a l'olla a pressió amb aigua. L'aigua no havia de tocar els tubs d'assaig. Es va encendre el foc i quan va



començar a sortir vapor pel pistó es van comptar quinze minuts. Passat aquest temps s'havia d'esperar a que l'olla perdés pressió i, seguidament, treure els tubs sense desembolicar-los del paper de plata perquè es podrien contaminar.

El dia 3 també es va beure i reomplir l'ampolla però també es va portar a terme les sèmres de les plaques de Petri. Es va escollir fer tres dilucions (1:10, 1:100 i 1:1000). El protocol va ser el següent:

1. Encendre la flama del Bec de Bunsen per crear l'atmosfera anòxica que impossibilita la vida microbiana.
2. Obrir un paquet de tubs d'assaig esterilitzats el dia anterior i col·locar-lo a prop de la zona sense microorganismes que crea la flama del Bec de Bunsen.
3. Agafar quatre tubs d'assaig (A, B, C, D), acostar-los-hi la boca a la flama per assegurar-se de la seva esterilitat i col·locar-los en una gradeta al costat de la flama.
4. Tirar aigua de l'ampolla en un dels tubs (tub A).
5. Agafar 1 ml de l'ampolleta d'aigua estèril amb una xeringa i dipositar-la en un vas de precipitats. Els altres 9 ml es dipositen en una altre tub d'assaig (tub B).
6. Amb la mateixa xeringa (ja que només ha estat en contacte amb aigua estèril), agafar 1 ml del tub A i introduir-lo al tub B. Així s'aconsegueix la dilució 1:10 (un mil·lilitre d'aigua de la mostra en deu mil·lilitres totals, és a dir, nou d'aigua estèril més un de la mostra).
7. Mesclar l'aigua del tub B i amb una altra xeringa agafar 1 ml d'aquest tub i dipositar-lo en una placa de Petri.
8. Homogeneïtzar l'aigua sobre el medi de cultiu de la placa de Petri per tal que, en cas que apareguin bacteris o fongs, no es concentrin tots en una zona.
9. Agafar 1 ml de l'ampolleta d'aigua estèril amb una xeringa i dipositar-la en un vas de precipitats. Els altres 9 ml es dipositen en una altre tub d'assaig (tub C).
10. Amb la mateixa xeringa, agafar 1 ml del tub B i introduir-lo al tub C. Així s'aconsegueix la dilució 1:100 (la dilució anterior tornada a diluir).
11. Mesclar l'aigua del tub C i amb una altra xeringa agafar 1 ml d'aquest tub i dipositar-lo en una placa de Petri.

12. Homogeneïtzar l'aigua sobre el medi de cultiu de la placa de Petri per tal que, en cas que apareguin bacteris o fongs, no es concentrin tots en una zona.
13. Agafar 1 ml de l'ampolleta d'aigua estèril amb una xeringa i dipositar-la en un vas de precipitats. Els altres 9 ml es dipositen en una altre tub d'assaig (tub D).
14. Amb la mateixa xeringa, agafar 1 ml del tub C i introduir-lo al tub D. Així s'aconsegueix la dilució 1:1000 (la dilució anterior tornada a diluir).
15. Mesclar l'aigua del tub D i amb una altra xeringa agafar 1 ml d'aquest tub i dipositar-lo en una placa de Petri.
16. Homogeneïtzar l'aigua sobre el medi de cultiu de la placa de Petri per tal que, en cas que apareguin bacteris o fongs, no es concentrin tots en una zona.

En aquest assaig no es van fer rèpliques perquè no eren necessàries per determinar la dilució que s'ha fet a les altres dos experiències.

El dia 4 només es va beure i reomplir l'ampolla i el dia 5 es va començar a beure però no es va reomplir l'ampolla perquè abans calia fer la sembra de les plaques tant amb les mostres de les ampolles reutilitzades com amb les mostres de les ampolles sense reutilitzar (controls). El protocol va ser el mateix que el que es va seguir el dia 3 excepte en el cas dels controls que tan sols es van fer dues dilucions. A la figura 19 s'esquematitza el disseny experimental d'aquesta prova.

En definitiva, la realització d'aquest assaig ha estat fonamental per poder elaborar les experiències 1 i 2. ja que a més de determinar la dilució adequada per a l'experiència 1, també ha permès tenir un primer contacte amb el material i les tècniques emprades al laboratori a més de familiaritzar-se amb el rigor i l'asèpsia estricta que cal seguir a l'hora de treballar amb microbis.

## **6.2 Experiència 1**

Es va començar el 13 de juny de 2009. Es va seguir el mateix procediment que a l'assaig però realitzant únicament una dilució, és a dir, les mostres d'aigua amb les que es van sembrar les plaques de Petri contenien una desena part d'un mil·lilitre, o sigui, es van sembrar les plaques amb 0,1 ml de l'aigua de les ampolles. A més, el procés es va repetir una altra vegada per cada ampolla de la qual s'extreien mostres amb

l'objectiu de realitzar les rèpliques. El disseny experimental d'aquesta experiència s'especifica a la figura 20.

Com que aquesta havia de ser l'experiència definitiva, es van reutilitzar sis ampolles (A, B, D, E, F i G) i sis ampolles iguals es van fer servir com a controls (no es van utilitzar ni reomplir). Malgrat tot, dels resultats obtinguts no es va poder obtenir cap conclusió ja que moltes de les plaques contenien tantes colònies que eren impossibles de contar.

Així doncs, es va haver de realitzar una nova experiència.

### **6.3 Experiència 2**

Es va començar el 12 de setembre de 2009 i es va seguir el mateix procediment que a l'assaig i a l'experiència 1 però aquesta vegada amb una dilució 1:100. A més de repetir una vegada per cada ampolla de la qual s'extreien mostres amb l'objectiu de realitzar les rèpliques.

Cal dir, però, que la sembra de les mostres de l'aigua de les ampolles-control no es van realitzar totes el dia 5 sinó que les mostres de les ampolles A, B i C (transparentes) es van extreure i cultivar el dia 3 de l'experiència i les mostres de les ampolles D, E i F (blaves) es van extreure i cultivar l'últim dia de l'experiment (dia 5). L'únic motiu que va motivar a fer-ho així va ser la intenció de voler d'avançar feina que s'havia de realitzar el cinquè dia i no es va considerar que allò afectés els resultats.

A més, es va canviar una de les ampolles que s'havia fet servir a l'experiència 1 (ampolla F) i es va utilitzar una altra que era transparent i amb mols replecs (ampolla C). D'aquesta manera s'usaven tres ampolles blaves i tres ampolles transparents.

Aquesta experiència ha estat concloent. El seu disseny experimental, molt similar als anteriors, es descriu a la figura 21.

### **6.4 Tinció de Gram**

L'objectiu de realitzar aquesta tinció ha estat identificar el tipus de bacteris que s'han obtingut a les plaques de Petri després de fer les sembres (gramnegatius i grampositius) per procurar explicar si realment han sigut causa de la reutilització o, al

contrari, ja es trobaven a les ampolles abans de reutilitzar-les cercant el tipus de bacteris que es troben a un lloc i a l'altre bibliogràficament.

Si s'hagués volgut fer un recompte de les cèl·lules totals d'un cultiu, s'hauria d'haver utilitzat el microscopi òptic per observar-les. Tot i així, encara que s'haguessin observat amb el màxim d'augment possible, no s'hagués vist cap. La causa d'aquest fenomen és la manca de contrast entre el bacteri i el medi que l'envolta i la manera més simple de solucionar aquest problema és mitjançant la utilització de colorants.

Aplicant tan sols un colorant (tinció simple) és suficient per augmentar el contrast però sovint s'empren tincions diferencials en la que s'usen diversos colorants i que tenyeixen les cèl·lules d'un color diferent segons la seva composició. Aquest és el cas de la tinció de Gram que, tal i com s'ha especificat en seccions anteriors, marca la diferència entre bacteris grampositius i bacteris gramnegatius, és a dir, entre els que posseeixen una membrana externa que els recobreix la paret cel·lular (gramnegatius) i els que els manca aquesta membrana addicional (grampositius).

Tot seguit s'explica el procés que ha calgut seguir per tenyir cada una de les poblacions:

En primer lloc ha calgut esterilitzar el portaobjectes sobre el que s'han estès els bacteris. Primerament se li ha aplicat calor, o sigui, s'ha acostat a la flama del bec Bunsen amb les pinces de fusta, i després se li ha aplicat alcohol etílic per netejar-lo i assegurar-se de la seva esterilitat. Ha estat important realitzar-ho en aquest ordre per qüestions de seguretat ja que l'alcohol etílic és un producte inflamable.

Seguidament s'ha col·locat una gota d'aigua destil·lada al portaobjectes amb la nansa de sembra prèviament esterilitzada a la flama i després, també amb la nansa de sembra estèril, s'ha agafat una petita part de població d'una mateixa colònia i s'ha mesclat amb la gota d'aigua destil·lada del portaobjectes i s'ha estès aquesta mescla per homogeneïtzar-la. Per fixar els bacteris al portaobjectes (frotis) ha calgut aplicar una mica de calor.

El tercer pas ha consistit en aplicar els colorants als bacteris del portaobjectes dins de la cubeta de tinció. El protocol de l'aplicació dels colorants de la tinció de Gram està molt marcat i es detalla a continuació explicant com afecta a la cèl·lula cada pas:

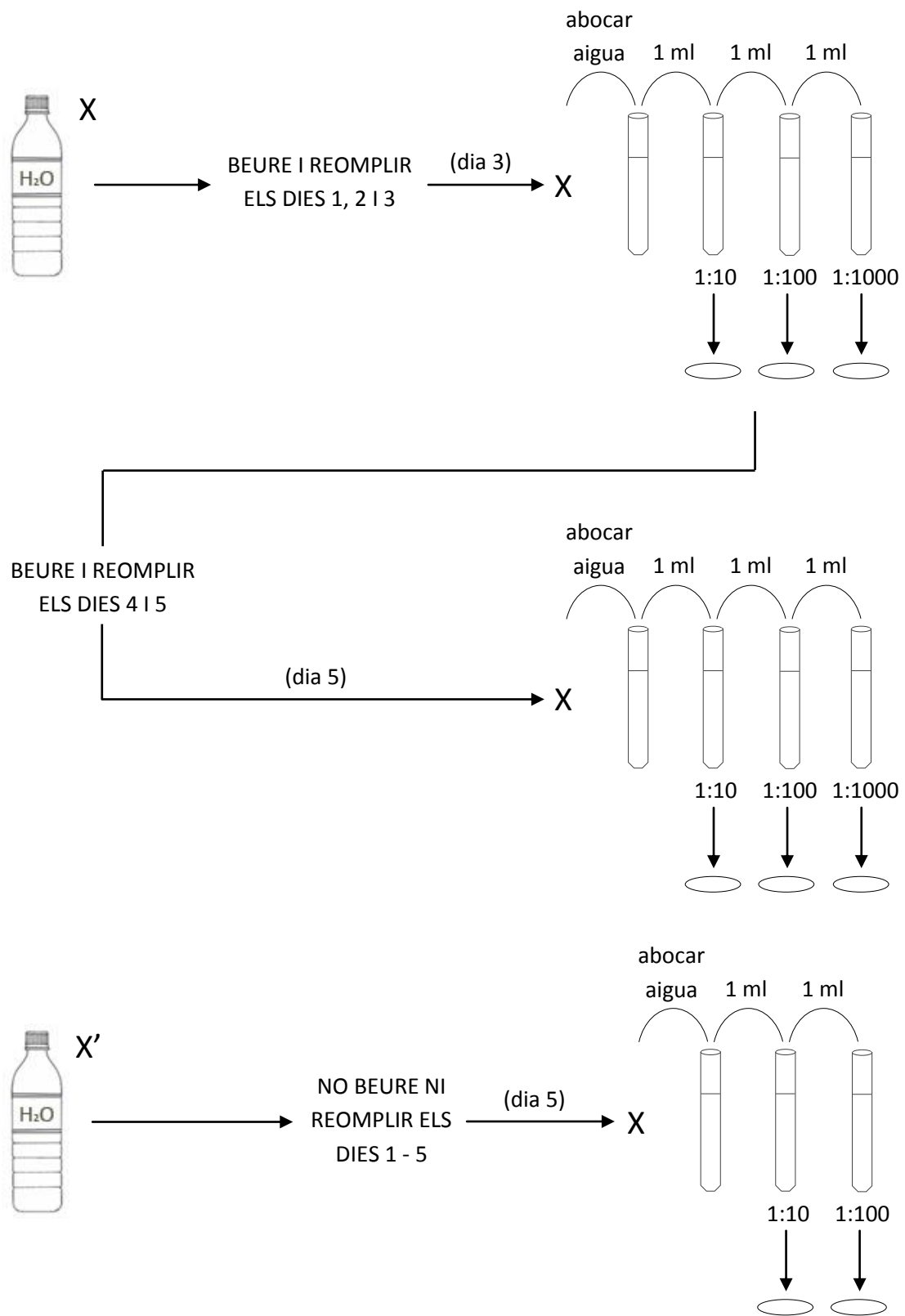
Primer se'ls ha aplicat cristall violeta durant un minut. Aquest colorant penetra a totes les cèl·lules bacterianes. Per tant, en aquest instant totes són de color lila. Després s'han netejat amb aigua destil·lada per eliminar l'excés de cristall violeta i tot seguit se'ls ha aplicat el lugol durant un altre minut. Aquesta dissolució de iode permet la formació d'un del complex CV-I (cristall violeta-iode).

Seguidament s'ha utilitzat l'alcohol de 95° amb el que s'aconsegueix demostrar la primera diferència entre els bacteris grampositius i els bacteris gramnegatius. En els primers, l'alcohol deshidrata la paret cel·lular i com a conseqüència els porus es contreuen i disminueix la permeabilitat de la paret. D'aquesta manera, el complex CV-I, responsable de la coloració violeta no surt de la cèl·lula. En els bacteris gramnegatius, en canvi, l'alcohol degrada la paret cel·lular, la porositat augmenta i el complex CV-I surt de la cèl·lula.

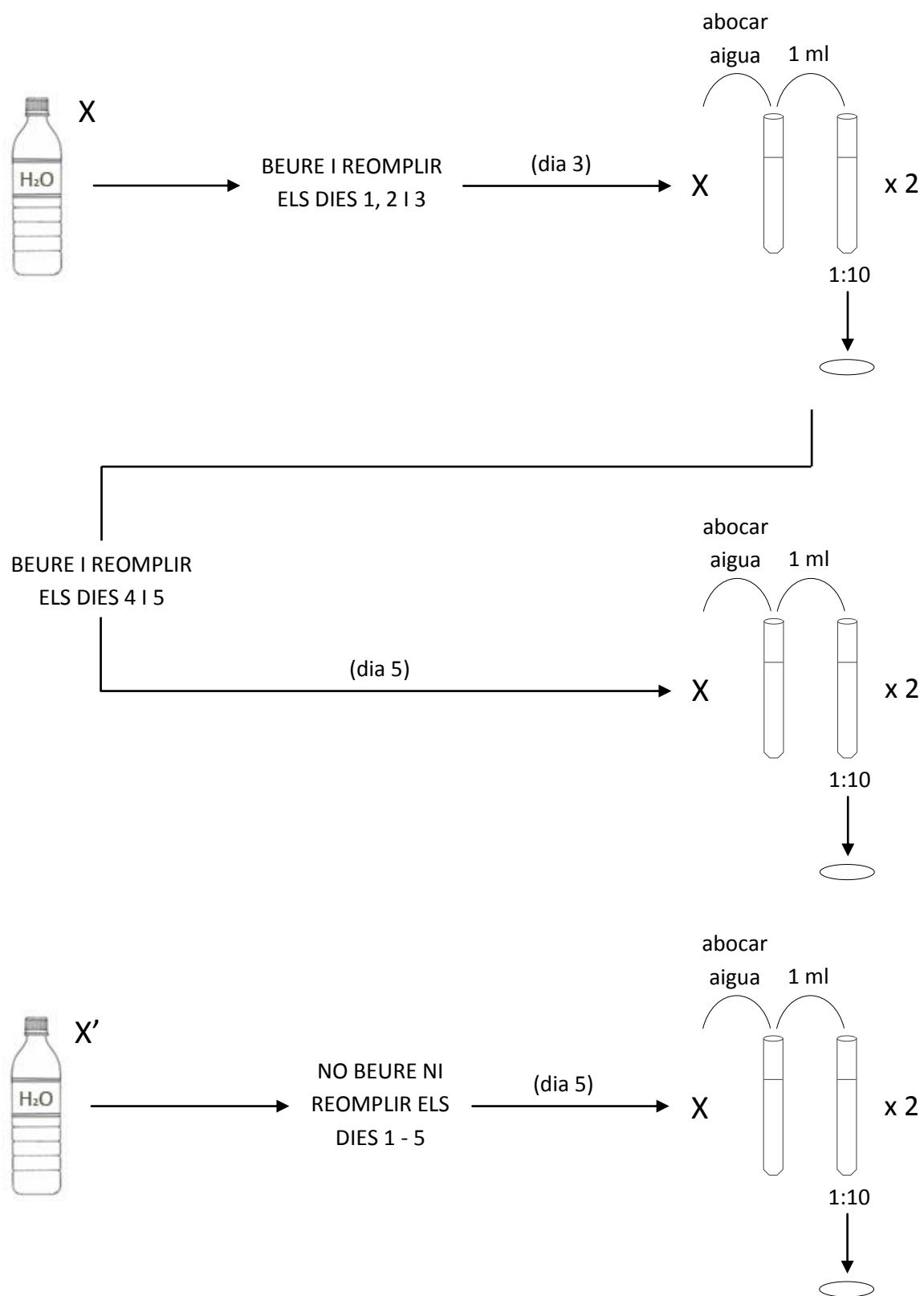
Per acabar, s'ha eliminat l'alcohol amb aigua destil·lada i s'ha emprat la safranina durant un minut per tenyir els bacteris gramnegatius i després s'ha eliminat amb aigua destil·lada.

Una vegada tenyits els bacteris, ha calgut observar-los pel microscopi òptic així que s'ha posat una gota d'oli d'immersió sobre el portaobjectes i s'han observat els microbis tenyits.

Els bacteris gramnegatius sempre reaccionen de la mateixa manera però els bacteris grampositius poden respondre diferent en alguns casos i tenyir-se com si fossin gramnegatius. Per exemple, els cultius de bacteris grampositius vells perden la propietat de retenir el cristall violeta i com a conseqüència es tenyeixen com gramnegatius.



**FIGURA 19.** Disseny experimental de l'assaig



**FIGURA 20.** Disseny experimental de l'experiència 1

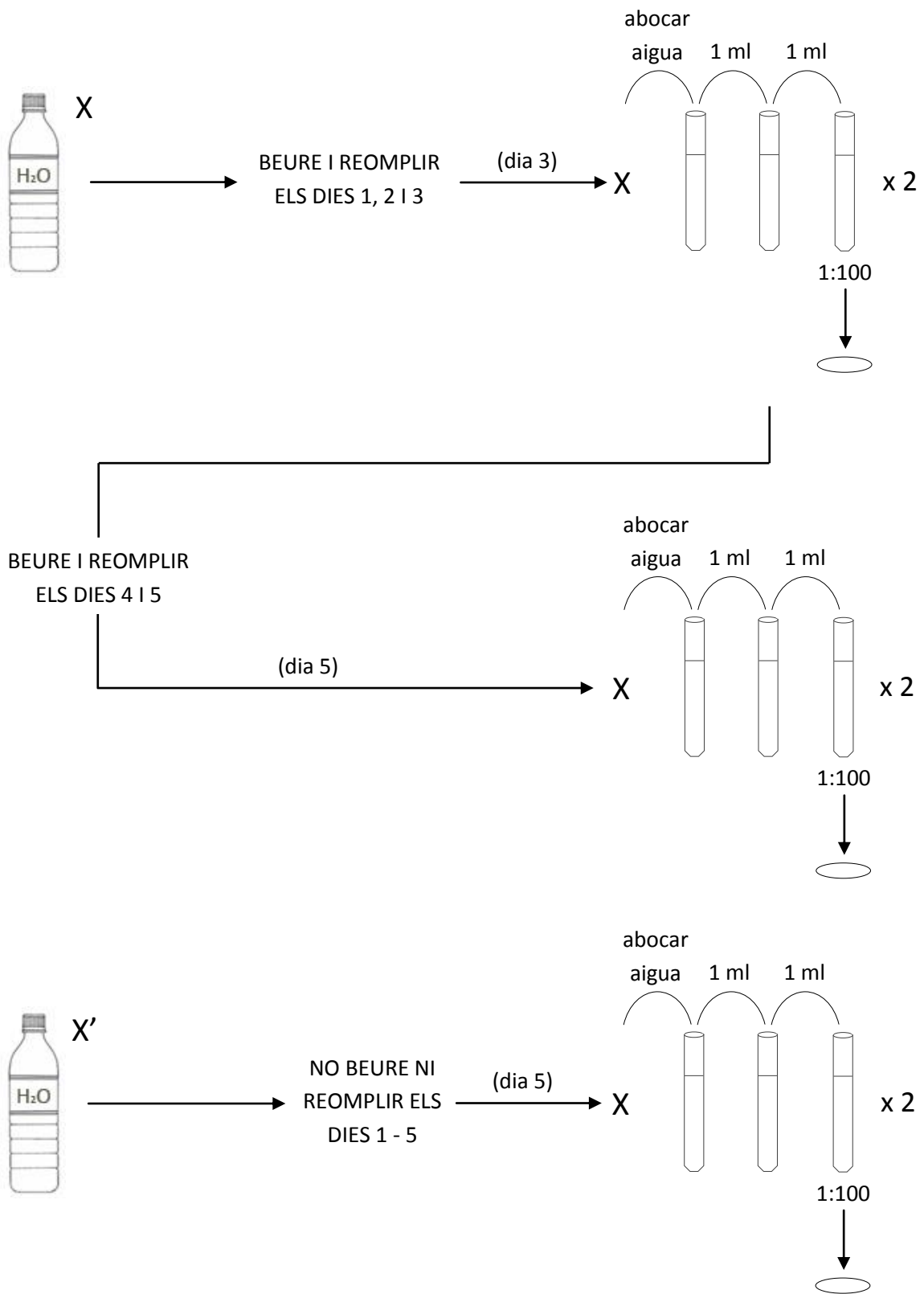


FIGURA 21. Disseny experimental de l'experiència 2



## 7 RESULTATS

Dies després d'haver sembrat totes les mostres en cada una de les experiències van començar a aparèixer microorganismes a les plaques de Petri. Tot seguit s'explica què es va observar a cada prova.

### 7.1 Assaig

Els resultats obtinguts en aquest assaig són molt clars. Únicament han aparegut colònies de bacteris. No ha crescut cap fong en cap de les 8 plaques de Petri sembrades en aquesta ocasió.

En la següent taula s'indiquen els resultats obtinguts a les mostres de l'ampolla control i de l'ampolla reutilitzada en els dies 3 i 5. En el cas del control, no ha aparegut cap colònia a la mostra amb una dilució 1:10 però si que n'han aparegut a la mostra amb una dilució 1:100. Teòricament, en aquesta última mostra, i seguint l'ordre lògic, no hauria d'haver aparegut cap colònia ja que està més diluïda que la primera.

Pel que fa a les mostres de l'ampolla reutilitzada es pot observar com disminueix el nombre de colònies a mesura que la mostra es dilueix.

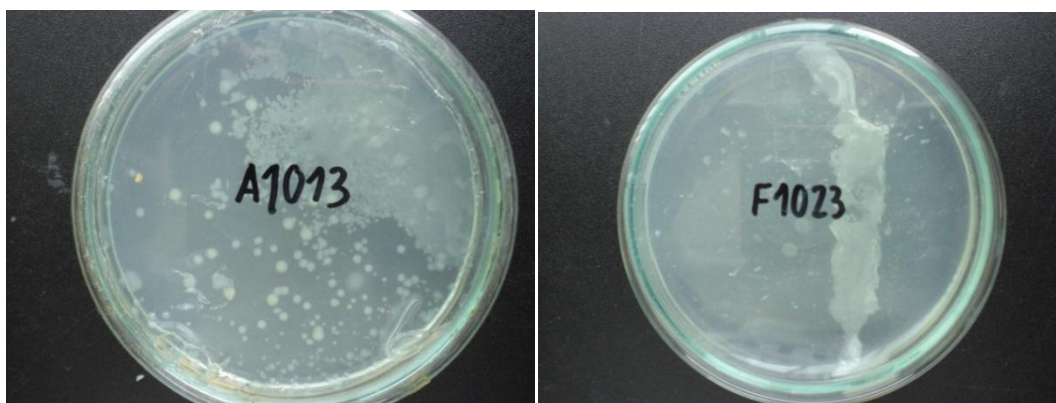
Tot i que les colònies de la mostra amb una dilució 1:10 del dia 5 no s'han pogut comptar per excés, es va escollir realitzar una dilució 1:10 per les mostres de l'experiència 1 ja que, tot i que hi havia moltes colònies, aquest problema es podia solucionar utilitzant programes informàtics o duent a terme un procediment de recompte diferent que s'explica als resultats de l'experiència 2.

	<b>1:10</b>	<b>1:100</b>	<b>1:1000</b>
<b>CONTROL</b>	0	28	-
<b>DIA 3</b>	7	1	0
<b>DIA 5</b>	incomptable	140	2

**FIGURA 22.** Taula de resultats de l'assaig

## 7.2 Experiència 1

La majoria dels cultius obtinguts en aquesta experiència tenien un nombre de colònies tan elevat que ha fet impossible el recompte.



**FIGURA 23.** Algunes de les plaques obtingudes a l'experiència 1

## 7.3 Experiència 2

A continuació s'indiquen els resultats obtinguts en l'experiència 2 però abans cal explicar què significa cada valor de la taula i com s'ha obtingut.

Els símbols ~ indiquen el grau de rugositat de cada ampolla. Quants més símbols, més replecs té l'ampolla. L'ampolla C és la que té més replecs i la F, la que en té menys (només en té un). A més, el color de les cel·les indica el color de l'ampolla (les ampolles D, E i F són blaves i les ampolles A, B i C, transparents).

A les taules s'indiquen el nombre de colònies trobat a les plaques. Com que s'ha realitzat dos rèpliques de cada una de les ampolles cada dia que s'han extret mostres cal trobar la mitjana aritmètica de les colònies trobades a les rèpliques 1 i 2 de cada ampolla segons la següent expressió matemàtica:

$$\text{Nombre de colònies} = \frac{\text{colònies rèplica 1} + \text{colònies rèplica 2}}{2}$$

Tot i així aquest valor no indica res, tan sols el nombre de bacteris que han format una colònia després d'haver diluït la mostra dues vegades. És a dir, com que la dilució utilitzada en aquesta experiència ha estat 1:100 és necessari multiplicar per cent el

nombre obtingut anteriorment. D'aquesta manera es troben les unitats formadores de colònies (UFC) que hi havia a l'ampolla. A les taules s'indiquen els resultats en nombre de colònies (o espores) i en UFC (o espores/ml). Resumint, per aconseguir el valor UFC/ml es segueix la següent fórmula:

$$\frac{UFC}{ml} = \text{nombre mitjà de colònies} \times 100$$

El mateix procediment s'ha seguit per calcular el nombre de floridures i el nombre d'espores per cada mil·lilitre d'aigua.

S'ha de dir que la mitjana aritmètica del nombre de colònies i la mitjana aritmètica del nombre de fongs no dona sempre un nombre enter. S'han aproximat a l'alça tots els resultats que donaven una xifra amb decimals.

També és important dir que les colònies de les plaques on hi havia més no s'han comptat una per una sinó que s'han comptat les que hi havia en diferents centímetres quadrats de la placa escollits aleatòriament i després s'han extrapolat les dades. Per fer-ho s'ha calculat la mitjana del nombre de colònies comptats a cada centímetre quadrat i a continuació s'ha multiplicat per l'àrea total de la placa de Petri. L'expressió matemàtica que s'ha utilitzat, doncs, és la següent:

$$\text{Nombre de colònies} = \frac{\text{colònies}}{\text{cm}^2} \times \text{àrea de la placa de Petri}$$

$$\text{Àrea de la placa de Petri (àrea d'un cercle)} = \pi \times \text{radi}^2$$

El radi de les plaques de Petri utilitzades és de 3,5 cm<sup>2</sup>.

Una vegada obtingut el nombre mitjà de colònies en placa, s'ha seguit el mateix procediment que en el cas anterior (s'ha multiplicat per 100 per tal de trobar les UFC/ml)

AMPOLLA	BACTERIS		FONGS	
	Nº de colònies	UFC/ml	Nº floridures	Espores/ml
A (~~)	1	100	1	100
B (~~)	1	100	7	700
C (~~~)	1	100	9	900
D (~~)	1899	189900	0	0
E (~~)	63	6300	0	0
G (~)	693	69300	0	0

**FIGURA 24.** Taula de resultats de les mostres de les ampolles-control de l'experiència 2

En aquesta taula es pot observar que les ampolles-control blaves contenen molts més bacteris que no pas les ampolles transparents. Tanmateix, també es pot observar que en aquelles plaques on hi ha fongs, hi ha pocs bacteris i que a les plaques on hi ha bacteris, no hi ha fongs.

AMPOLLA	BACTERIS		FONGS	
	Nº de colònies	UFC/ml	Nº floridures	Espores/ml
A (~~)	0	0	0	0
B (~~)	0	0	0	0
C (~~~)	incomptable	-	0	0
D (~~)	0	0	3	300
E (~~)	60	6000	0	0
G (~)	0	0	0	0

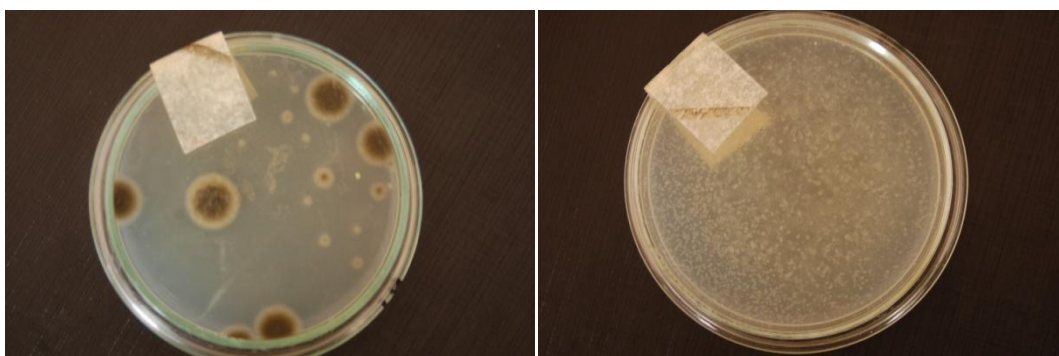
**FIGURA 25.** Taula de resultats de les mostres de les ampolles reutilitzades del dia 3 de l'experiència 2

En la majoria d'ampolles no ha aparegut bacteris ni fongs. Fins i tot n'han aparegut menys que a les ampolles-control. Cal fer incís, igual que en la taula anterior, en el fet que a les plaques amb fongs no contenen bacteris. En l'ampolla C, el recompte ha sigut impossible degut a la gran quantitat de bacteris que hi ha i és per això que no s'han pogut calcular les UFC/ml.

AMPOLLA	BACTERIS		FONGS	
	Nº de colònies	UFC/ml	Nº floridures	Espores/ml
A (~~)	1068	106800	0	0
B (~~)	186	18600	0	0
C (~~~)	616	61600	0	0
D (~~)	incomptable	-	0	0
E (~~)	incomptable	-	0	0
G (~)	incomptable	-	0	0

**FIGURA 26.** Taula de resultats de les mostres de les ampolles reutilitzades del dia 5 de l'experiència 2

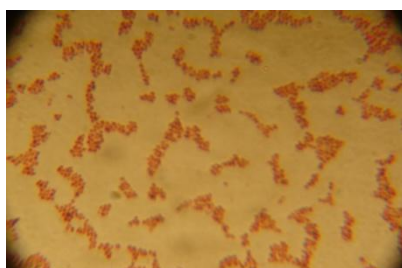
Totes les ampolles han sofert un gran augment en el nombre de bacteris. On més han augmentat és en les ampolles blaves on hi havia tantes colònies que el recompte era impossible. En aquest cas, no ha aparegut cap fong.



**FIGURA 27.** Fongs (esquerra) i multitud de colònies (a la dreta). Plaques obtingudes a l'experiència 2

## 7.4 Tinció de Gram

Totes les poblacions que s'han tenyit han resultat ser gramnegatives. No ha aparegut cap colònia grampositiva.



**FIGURA 28.** Estafilococs gramnegatius

# **CONCLUSIONS I REFERÈNCIES**

## 8 CONCLUSIONS

Una vegada realitzada l'experiència concloent (experiència 2) i obtinguts uns resultats lògics, és possible extreure conclusions amb les que es confirmarà o refutarà la hipòtesi plantejada al principi d'aquest treball de recerca.

En primer lloc cal dir que, segons els resultats obtinguts, el fet de reutilitzar les ampolles de plàstic d'aigua mineral natural provoca un augment del nombre de bacteris en aquests envasos. Molt possiblement la causa d'aquest fet sigui el contacte que s'estableix entre l'ampolla i la boca a l'hora de beure aigua i la possibilitat de vida per part dels microorganismes que troben en l'ampolla un molt bon ambient on viure ja que hi entren moltes restes de menjar de la boca i s'hi manté una temperatura constant i adequada.

Cal dir també que el fet que hagin aparegut microorganismes a les ampolles-control, les quals no s'han reutilitzat en cap moment de l'experiència, no indica que l'aigua embotellada que comprem estigui contaminada. Ja s'ha esmentat a l'apartat 3 del present informe (*vegeu pàgina 26*) que l'aigua embotellada s'obté de deus naturals i que, tot i que es segueixen diversos processos de desinfecció per anul·lar els microorganismes perjudicials per a la nostra salut, l'aigua mai arriba a ser estèril.

El més rellevant de les ampolles no reutilitzades (controls), però, és que han aparegut més bacteris a les ampolles blaves que a les transparents. Aquest fenomen pot ser degut per dues causes. La primera és que les sèmbres de les mostres de l'aigua de les ampolles-control blaves es van dur a terme dos dies més tard que la sembra de les mostres d'aigua de les ampolles-control transparents i això va permetre a la flora de l'aigua de les ampolles-control blaves desenvolupar-se més. La segona possible causa és que, com que les ampolles de color blau retenen més la calor que no pas les transparents, la temperatura de l'aigua d'aquestes ampolles és una mica més elevada i constant que a les ampolles de plàstic transparent i això permet que els bacteris romanguin més temps en una temperatura òptima de creixement.

En relació al descens en el nombre de fongs que apareixen a mesura que passa el temps, es pot dir que és degut a que les espores originàries de les floridures que han

cregut a les plaques provenen del deu d'on s'ha obtingut l'aigua mineral ja que on apareixen més és a les ampolles-control. Tot i així no es pot descartar que les espores s'hagin introduït a les plaques per contaminació durant les sembres, malgrat el rigor que s'ha procurat seguir pel que fa a la tècnica asèptica, ja que a l'ambient n'hi ha moltes.

Un altre dels resultats que crida més l'atenció és que en aquelles ampolles on hi ha fongs hi ha poques o cap colònia. Això no vol dir que a les aquelles ampolles on hi ha espores no hi ha bacteris, sinó que alguns fongs produeixen substàncies biocides i això pot haver provocat l'anul·lació de l'activitat bacteriana a les plaques (és ben coneguda la floridura del gènere *Penicillium* amb la que es produeixen alguns antibiòtics com la penicil·lina).

Pel que fa al color de l'ampolla, segons els resultats que s'han obtingut, el desenvolupament de bacteris és més gran a les ampolles de color blau que a les ampolles transparents. Això pot ser degut, com ja s'ha dit, a que la temperatura és manté durant més temps en les ampolles d'aquest color que a les ampolles transparents.

I en relació a la quantitat de replecs i a la forma de la boca de l'ampolla, s'ha pogut comprovar que la quantitat de replecs que tingui l'ampolla no influeix en el desenvolupament de microorganismes ja que en alguns casos n'apareixen més a les ampolles amb pocs replecs (ampolla A) que no pas a les ampolles amb més replecs (ampolla C). A més, a l'ampolla més llisa (ampolla G) han crescut molts bacteris i ha sigut junt amb les altres ampolles blaves (D i E) on han aparegut més. Tot i així, la forma de la boca de l'ampolla sí que influeix ja que a l'ampolla B (amb tap *sport*), al final de l'experiment (dia 5) ha sigut l'ampolla on menys bacteris hi ha hagut. Molt possiblement la raó d'aquest últim fet sigui que no s'estableix contacte directe entre la boca del bevedor i la de l'ampolla quan la forma d'aquesta és del tipus *sport*.

Quant a la tinció de Gram, és molt possible que hagi esdevingut errònia perquè els resultats mostren que totes les colònies tenyides són gramnegatives i, consultant bibliogràficament, la majoria de la microbiota bucal és grampositiva. Aquest succés té alguns possibles motius. Un d'ells és que la tinció tan sols s'ha fet a 8 colònies de les



obtingudes i potser ha sigut atzar que totes siguin gramnegatives. Un altre possible motiu és que l'antiguitat dels bacteris hagi provocat la pèrdua de la capacitat de retenir el cristall violeta per part dels bacteris grampositius.

En definitiva, es pot considerar que la hipòtesi no és vàlida perquè les ampolles que més bacteris han presentat al final del procés han estat les blaves i s'ha comprovat que la quantitat de replecs no influeix en la quantitat de microbis que es desenvolupen.

## 9 PROPOSTES DE MILLORA

Hi ha diversos aspectes d'aquest treball de recerca que es podrien modificar en cas que es tornés a repetir per tal de millorar-lo.

Quant al recompte del nombre de bacteris es podria haver utilitzat un espectrofotòmetre, un aparell que mesura la quantitat de bacteris en una mostra mitjançant la longitud d'ona. Aquest instrument permet obtenir un nombre de bacteris més aproximat que la tècnica que s'ha utilitza en aquest treball de recerca.

I pel que fa a la tinció de Gram, s'hauria d'haver dut a terme pocs dies més tard del creixement de les colònies per tal d'evitar una suposada pèrdua de la capacitat de retenir el cristall violeta per part dels bacteris grampositius degut a l'antiguitat d'aquestes.

## 10 NOVES VIES DE RECERCA

De l'estudi realitzat en aquest treball de recerca es desprenen algunes idees per a possibles noves investigacions. Tot seguit es descriuen aquestes noves vies de recerca.

En relació a la flora bucal es podria observar quin és l'efecte real dels diferents dentífrics i antisèptics bucals disponibles al mercat. Una possible manera de fer-ho és analitzant mostres bacteriològiques de la cavitat bucal just abans i just després d'utilitzar aquests productes i els minuts o hores posteriors per tal d'observar quant temps triga a regenerar-se la flora.

Per altra banda, una variant de la nova via de recerca tot just assenyalada pot ser l'observació de la variació de la flora bucal després d'ingerir diferents aliments o begudes (menjar *sà* vs. *fast food*, refrescos amb diferents quantitats de sucre, etc.).

Pel que fa a l'estudi de les ampolles de plàstic, una bona manera de comprovar la quantitat de llum que traspasa el plàstic segons el seu color és utilitzant microorganismes fotosintètics. Per tant, una nova recerca pot consistir en utilitzar bacteris o algues amb pigments fotosintètics dins d'ampolles de plàstic iguals però de diferents colors (no tan sols blau i transparent, com s'han utilitzat en aquest treball de recerca, sinó que també verd, vermell, groc o fins i tot negre) i mesurar la quantitat de bacteris que han crescut amb un espectrofotòmetre.

## 11 REFERÈNCIES

Documents impresos:

1. ARENAL, Francisco *et al.*. *Biología al alcance de todos*. Madrid: Pearson Educación, 2007
2. ASTIASARÁN, Iciar; MARTÍNEZ, Alfredo J.. *Alimentos: Composición y Propiedades*. Segunda edició. s.l.: McGraw-Hill, 2000
3. COSTA, Marcel *et al.*. *Biología: Conceptes bàsics*. Barcelona: Teide, 2008
4. INGRAHAM, John L.; INGRAHAM, Catherine A.. *Introducción a la Microbiología. Volumen 1*. Barcelona: Reverté, 1998
5. INGRAHAM, John L.; INGRAHAM, Catherine A.. *Introducción a la Microbiología. Volumen 2*. Barcelona: Reverté, 1998
6. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). *Microorganismos de los alimentos 6: ecología microbiana de los productos alimentarios*. Zaragoza: Acribia, 2000
7. MADIGAN, Michael T.; MARTINKO, John M.; PARKER Jack. *Brock. Biología de los microorganismos*. Desena edició. Madrid: Pearson Educación, 2004
8. MARSH, Philip; MARTIN, Michael. *Oral microbiology*. Segunda edició. Wokingham: Van Nostrand Reinold, 1984
9. SERRA, Salvador; ARMENGOL, Montserrat; MERCADÉ, Joan. *Física 1: Batxillerat*. s.l.: McGraw-Hill, 2008.
10. *Biología II*. Barcelona: Edebé, 2003.

Documents electrònics:

11. AUSTRALIAN GOVERNMENT. DEPARTMENT OF THE ENVIRONMENT, WATER, HERITAGE AND THE ARTS. Numbers of Living Species in Australia and the World. Second edition. Canberra: Australian Biological Resources Study, 2009 [en línea]. <<http://www.environment.gov.au/biodiversity/abrs/publications/other/species-numbers/2009/pubs/nlsaw-2nd-complete.pdf>> [consulta: 4 de setembre de 2009]

12. UNIVERSITY OF CALIFORNIA. MUSEUM OF PALEONTOLOGY. Antony van Leeuwenhoek [en línea]. <<http://www.ucmp.berkeley.edu/history/leeuwenhoek.html>> [consulta: 4 de setembre de 2009]
13. *El Periódico*: “El consum d’aigua mineral es duplica en 8 anys”. 14 de setembre de 2007 [en línea].  
<[http://www.elperiodico.com/default.asp?idpublicacio\\_PK=46&idioma=CAT&idnoticia\\_PK=441114&idseccio\\_PK=1021](http://www.elperiodico.com/default.asp?idpublicacio_PK=46&idioma=CAT&idnoticia_PK=441114&idseccio_PK=1021)> [consulta: 10 de setembre de 2009]
14. <<http://www.windows.ucar.edu/tour/link=/earth/Life/archaea.sp.html&edu=high>> [consulta: 17 de setembre de 2009]
15. <[www.duiops.net/seresvivos/hongos.html](http://www.duiops.net/seresvivos/hongos.html)> [consulta: 17 de setembre de 2009]
16. <[https://www.u-cursos.cl/medicina/2009/0/MAGVIVO3/1/material\\_docente/objeto/210855](https://www.u-cursos.cl/medicina/2009/0/MAGVIVO3/1/material_docente/objeto/210855)> [consulta: 17 de setembre de 2009]
17. <<http://www.candidiasischronica.org/LISOZIMA.htm>> [consulta: 24 de setembre de 2009]
18. <[http://es.wikipedia.org/wiki/Gl%C3%A1ndula\\_sudor%C3%ADpara](http://es.wikipedia.org/wiki/Gl%C3%A1ndula_sudor%C3%ADpara)> [consulta: 24 de setembre de 2009]
19. <<http://vmitjans.pangea.org/pvc/botella.html>> [consulta: 25 de setembre de 2009]
20. <<http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2007/01/30/26566.php>> [consulta: 25 de setembre de 2009]
21. <<http://www.beatramonllull.org/planes/op3estudis/Curri/Bat1/CMC/Bat1CMC.pdf>> [consulta: 19 d’octubre de 2009]

# **ANNEX**

## DIARI DE RECERCA

Durant tota la recerca he anat anotant en una llibreta el seguiment de tots els meus progressos, idees, reflexions, preguntes interiors, inquietuds, motivacions, apunts...

Vaig començar a principis de maig de 2009 explicant quin havia sigut el procés que havia seguit per trobar un tema que m'agradés i em motivés amb tot el que això implica. És a dir, es pot dir que al principi és un diàleg interior on provo de trobar un tema innovador, creatiu, experimental i que no se m'escapés gaire de les meves mans pel que fa al meu nivell d'estudis i als meus coneixements. He de reconèixer que aquesta és una tasca difícil però enriquidora. Saber escollir bé no és fàcil.

Una vegada triat ja el tema, anotava dia a dia tot el que considerava important per als dies posteriors de la recerca. També vaig anotar-hi els diversos dissenys experimentals, els codis de les ampolles, les taules d'identificació de plaques, les taules de resultats, allò que em deien els experts que vaig consultar a més de reproduir íntegrament la comunicació amb les empreses comercialitzadores d'aigua embotellada.

En definitiva, en el Diari de Recerca està tot. Des que vaig començar a rumiar un tema fins el dia abans de la presentació oral. Només llegint-lo puc reviure l'experiència de fer ciència.