

# **ESTUDI DE LA MICROBIOTA AQUÀTICA DE LA VALL D'ALINYÀ**

**RICARD GUERRERO,\* MERCEDES BERLANGA,\*  
XAVIER ROIG\* I MERCÈ PIQUERAS\***

\* Departament de Microbiologia. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona. Avinguda Diagonal, 645, E-08028 Barcelona.

GUERRERO, R.; BERLANGA, M.; ROIG, X.; PIQUERAS, M. (2004). «Estudi de la microbiota aquàtica de la vall d'Alinyà». In: GERMAIN, J. [ed.]. *Els sistemes naturals de la vall d'Alinyà*. Barcelona: Institució Catalana d'Història Natural (Treballs de la Institució Catalana d'Història Natural; 14), p. 97-119. ISBN: 84-7283-724-6

## Resum

La microbiota aquàtica de la vall d'Alinyà s'ha estudiat al llarg del riu d'Alinyà, riu de Perles i riu del barranc de l'Alzina, amb un total de vuit estacions de mostreig. Mitjançant tècniques de cultiu en placa i microscòpia òptica, s'han estudiat les poblacions naturals de la biota planctònica i de la microbiota adherida a les roques a la part del riu no sotmesa a les perturbacions produïdes per l'activitat humana. L'anàlisi microscòpica de les biopel·lícules recollides d'algunes roques de l'estació núm. 5 posa de manifest la presència d'una comunitat complexa de microorganismes, en la qual trobem diatomees, bacteris i restes amorfes de detritus. A partir de mostres d'aigua agafades de l'estació núm. 5, es procedí al recompte de viables mesòfils en placa. Els valors trobats eren entre  $2 \times 10^2$  i  $8 \times 10^3$  unitats formadores de colònia (UFC) per mL, corresponents a l'hivern i a l'estiu, respectivament. A més, es realitzà el control microbiològic de les aigües amb l'estudi de coliforms, enterococs i clostridis sulfitoreductors. S'observà un augment en el nombre de microorganismes d'origen fecal a les estacions 2, 4 i 6. El canvi més significatiu es dona a l'estació núm. 4, en què es detectà el nombre més elevat de microorganismes en qualsevol època de l'any. No obstant això, hi havia diferències segons les estacions com a conseqüència de l'impacte del turisme. S'observà la capacitat autodepuradora del riu, tot i que la recuperació no assolix els valors que trobem a la part del riu on no hi ha hagut contaminació. Des del punt de vista microbiològic, l'aigua de la deu (estació 8) és apta per al consum humà.

PARAULES CLAU: microbiota aquàtica, contaminació fecal, bacteris mesòfils, potabilitat de l'aigua, autodepuració.

## Resumen

La microbiota acuática del valle de Alinyà se ha estudiado a lo largo del río de Alinyà, río de Perles y río del Barranc de l'Alzina, con un total de ocho estaciones de muestreo. Mediante cultivo en placa y microscopía óptica se han estudiado las poblaciones naturales de la microbiota planctónica y de la microbiota adherida a las rocas en la parte del río no sometida a las perturbaciones producidas por la actividad humana. El análisis microscópico de las biopelículas recogidas de algunas rocas de la estación nº 5 pone de manifiesto la presencia de una comunidad compleja de microorganismos, en la que se encuentran diatomeas, bacterias y restos amorfos de detritus. A partir de muestras de agua recogidas de la estación nº 5, se procedió al recuento de viables mesófilos en placa. Los valores encontrados estaban entre  $2 \times 10^2$  y  $8 \times 10^3$  unidades formadoras de colonias (UFC) por ml, correspondientes al invierno y al verano, respectivamente. Además, se realizó un análisis microbiológico de las aguas con el estudio de coliformes, enterococos y clostridios sulfitorreductores. Se observó un aumento en el número de microorganismos de origen fecal en las estaciones 2, 4 y 6. El cambio más

significativo se produce en la estación nº 4, donde se detectó el número más elevado de microorganismos en cualquier época del año. No obstante, había diferencias según las estaciones como consecuencia del turismo, especialmente en la primavera y sobre todo en verano. Se observa la capacidad autodepuradora del río, aunque la recuperación no llegue a los valores que encontramos en la parte del río donde no ha habido contaminación. Desde el punto de vista microbiológico, el agua de la fuente (estación nº 8) es apta para el consumo humano.

**PALABRAS CLAVE:** microbiota acuática, contaminación fecal, bacterias mesófilas, potabilidad del agua, autodepuración.

## *Abstract*

The microbiota of the Alinyà valley was studied along the rivers Alinyà, Perles and Barranc de l'Alzina, with a total of 8 sampling stations. Plate culture and light microscopy were used to study the natural populations of planktonic microbiota and the microbiota attached to rocks in the part of the river not affected by human activity. Microscopical study of the biofilms from some rocks at station No. 5 revealed the presence of a complex microbial community including diatoms, bacteria and amorphous detritus. Samples of water from station No. 5 were analysed for mesophilic bacteria by plate counts, their values ranging from 200 colony forming units (CFU) per millilitre in winter to 8000 CFU  $\times$  ml<sup>-1</sup> in summer. In addition, the presence of coliforms, enterococci, and sulfite-reducing clostridia was monitored to assess the microbiological quality of the water. Increases in the numbers of microorganisms of faecal origin were detected in samples from stations 2, 4 and 6. The most significant change took place at station No. 4, where the highest numbers were obtained at all times of the year. Depending on the season, however, there were differences due to the impact of tourism, especially in spring and above all in summer. The capacity of the river for self-purification is observable, although the values found differ from those for the part of the river that is not contaminated. Station No. 8 was at a spring, and the water there was microbiologically safe for human consumption.

**KEYWORDS:** aquatic microbiota, faecal contamination, mesophilic bacteria, water potability, self-purification.

## 1. INTRODUCCIÓ

L'ecosfera està formada per la totalitat dels organismes vius de la Terra i pel seu entorn abiòtic. Pot dividir-se en atmoecosfera, hidroecosfera i litoecosfera, per descriure els ambients aeri, aquàtic i terrestre, respectivament, habitats pels éssers vius. Els microorganismes viuen dins dels hàbitats d'aquestes ecosferes. El conjunt de variables físiques, químiques i biològiques de cada hàbitat determina el tipus de poblacions que s'hi pot trobar i estableixen els nínxols ecològics que els organismes ocupen en aquell hàbitat. En el cas dels organismes «superiors», com ara els animals i les plantes, que ocupen territoris amplis, la dimensió correspon al paisatge i es mesura en metres. Per als microorganismes, en canvi, l'escala de l'hàbitat és microscòpica i es mesura en mil·límetres.

Els mars i els continents suporten ecosistemes que es poden considerar relativament independents; cada tipus està organitzat de manera diferent al voltant d'un cicle de recirculació dels materials en què la resultant s'aparta poc de l'eix vertical. Les aigües epicontinentals, però, són un cas especial de sistema aquàtic i, bàsicament, són un sistema de transport gairebé horitzontal, pel qual s'evacua l'excés de pluja que cau en els continents (Margalef, 1992). L'aigua precipitada erosiona i renta la superfície de la terra emergida, i duu a terme un transport net de material que va a parar al mar. Els materials transportats viatgen en suspensió, com ara les argiles, detritus i organismes, o dissolts en l'aigua, en forma de sals i matèria orgànica. Les aigües epicontinentals estan desgastant contínuament la superfície dels continents i, respecte a la biosfera, actuen de transportadors de l'excés net de la producció dels continents cap al mar. L'organització d'un sistema fluvial depèn de l'estructura geomètrica del paisatge, de la distribució de les alçades, dels pendents màxims en cada punt i de la força erosiva de les aigües. Constitueix un procés de creació d'estructura, que admet nombroses composicions amb una distribució graduada per les mides dels materials del cabal. El flux d'un riu és variable, sempre depèn de fluxos excepcionalment grans, que solen ser sobtats; l'aigua circula constantment i es renova amb rapidesa. El riu constitueix un bon model o paradigma de molts sistemes ecològics sotmesos a un espectre de perturbacions. Tanmateix, en el cas del riu, les perturbacions tenen lloc de manera particularment ràpida. A les muntanyes amb pendents pronunciats, es generen canals d'aigua que convergeixen successivament. Cada confluència contribueix a atenuar diferències, tendeix a uniformitzar la qualitat de l'aigua i a estabilitzar el llit del riu. Cal destacar, també, que hi té lloc una selecció dels organismes amb «una mateixa funció» de procedència diferent i s'hi «decideix» quina —o quines— poblacions sobreviuran en el tram següent (Margalef, 1992). Els rius tenen un grau elevat d'interfície amb la litosfera al llarg de les seves ribes (marges), on hi ha una gran activitat de transferència de substàncies químiques procedents de la litosfera que són abocades al riu arrossegades per la pluja i per l'erosió de la mateixa riba.

En un hàbitat determinat, hi ha microorganismes autòctons, que sobreviuen, creixen i realitzen les seves activitats metabòliques ocupant els nínxols ambientals disponibles per a les poblacions microbianes. Cada microorganisme autòcton desenvolupa un metabolisme actiu i competeix amb èxit amb altres membres autòctons de la comunitat microbiana. Els microorganismes autòctons presenten generalment característiques adaptatives que els fan fisiològicament compatibles amb el seu ambient físic i químic, fins i tot quan es produeixen fluctuacions. En contraposició a la naturalesa permanent

dels membres autòctons de la comunitat microbiana, hi ha microorganismes al·lòctons, que són membres temporals de l'hàbitat i no ocupen els nínxols funcionals de l'ecosistema. Normalment, aquests microorganismes han crescut en altres llocs i han estat transportats a un ecosistema que els resulta aliè. Els rius, per la seva naturalesa, sempre contenen una proporció elevada de microorganismes al·lòctons. Els microorganismes que hi viuen estan adherits a les superfícies submergides, com ara les roques, i formen biopel·lícules o bé es troben en suspensió a l'aigua i formen part del plàncton.

Hi ha dues variants interessants dins dels microorganismes autòctons i al·lòctons. Dins dels autòctons habituals, que desenvolupen la seva funció d'una manera més o menys continuada al llarg de l'any, podem trobar els microorganismes zimògens. Aquests microorganismes també són «naturals» de l'hàbitat en qüestió, però tenen una activitat molt variable segons els nutrients que poden utilitzar. És el cas d'organismes d'alta activitat degradadora (per exemple, cel·lulolítics, lignilolítics, queratinolítics) que, encara que sempre són presents, desenvolupen una activitat sobtada i intensa quan s'acumulen en un punt determinat del substrat adequat. Lògicament, aquesta activitat està relacionada amb èpoques de deposició del material i té un caràcter estacional i/o periòdic. És el cas de l'acumulació de materials vegetals en el sòl durant la tardor, o l'acumulació de material orgànic divers per deposició torrencial en diverses èpoques de l'any, normalment, en la nostra geografia, al principi de la primavera i de la tardor.

La variant específica dels microorganismes al·lòctons són els microorganismes de contaminació animal, específicament fecal. Encara que és difícil delimitar la diversitat dels contaminants fecals, podríem limitar l'espectre als contaminants procedents de les femtes (encara que també podríem tenir en compte els procedents de pells, plomes, exudats, regurgitacions, etc.) d'ocells i mamífers. I dins de tots aquests, sens dubte, els més importants i nombrosos, amb gran diferència, són els procedents de femtes humanes i d'animals de granja. La contaminació fecal pot tenir un impacte de gran importància en els hàbitats naturals, especialment si són de dimensions reduïdes (com és el cas de la vall d'Alinyà). Aquest impacte és conseqüència de diversos factors, que, encara que procedeixen d'una mateixa causa, tenen efectes diferents. Per exemple: un mateix focus de contaminació fecal continuada (granja, pous negres, clavegueram defectuós) ocasiona un augment de la càrrega orgànica, de la càrrega d'elements químics (nitrogen, fòsfor), una introducció de microorganismes potencialment patògens, una contaminació per patògens immediats, una entrada d'altres concentracions d'antibiòtics (en el cas de les granges), etc. És clar que els sistemes naturals tenen mecanismes per autodepurar-se i eliminar la contaminació fecal, però per fer-ho necessiten temps i espai, i els efectes locals i immediats no són solament degradables, sinó que en molts casos són clarament nocius. L'augment imparable de la població humana resident (a la vall d'Alinyà, un fenomen de cap de setmana i vacances durant tres o quatre èpoques de l'any) i l'entrada continuada de la contaminació fecal de granges han d'ésser contrarestades per unes mesures estrictes de contenció física i d'estímul de la depuració (en el cas de la vall d'Alinyà), com també d'estímul dels sistemes d'autodepuració.

L'estudi de les poblacions microbianes autòctones (i zimògenes) i al·lòctones (i contaminants) d'un hàbitat determinat és un dels reptes principals de l'ecologia microbiana, que encara no ha estat resolt totalment pel desconeixement que hi ha de la diversitat microbiana real. Es calcula que avui dia es coneix no més d'un 0,1 % de les espècies bacterianes. Pel que fa als virus, el desconeixement és encara més gran: solament se'n detecten una part dels que causen algun efecte patògen en els humans o en els animals

més propers. Molts treballs que estudien la biodiversitat dels hàbitats aquàtics específics contenen llistes amb la composició del fitoplàncton, del zooplàncton i de les plantes i animals que viuen en els fons o en altres superfícies submergides. Tanmateix, molts pocs estudis tenen en compte el bacterioplàncton i els bacteris que formen biopel·lícules. I, quan se'ls ha considerat, com és el cas de la recerca feta a l'estanyol d'en Cisó (Pla de l'Estany), hi han estat inclosos per les peculiaritats específiques del medi. Amb tot, després de vint anys d'estudis sobre aquest estanyol, la llista taxonòmica dels organismes que s'hi han identificat només inclou cinc espècies de bacteris fotosintètics; en canvi, conté més de quaranta espècies fitoplanctòniques i més de vint-i-cinc zooplanctòniques. D'altra banda, cal tenir en compte que l'estudi de la diversitat bacteriana no pot seguir el model d'altres estudis de biodiversitat. En primer lloc, perquè els criteris emprats per a la identificació dels bacteris no es basen únicament en característiques morfològiques, i la identificació directa només és possible en molt poques espècies. En segon lloc, perquè el concepte d'espècie no pot aplicar-se de la mateixa manera en els organismes eucariotes (que tenen aïllament meiótic) que en els organismes procariotes (que tenen una gran capacitat de transferència gènica horitzontal i que normalment no presenten sexualitat).

En alguns bacteris, es pot determinar les seves característiques fisiològiques mitjançant el cultiu. Hi ha molts bacteris, però, que no poden cultivar-se mitjançant les tècniques estàndard. El percentatge de bacteris cultivables presents en els ambients naturals pot variar des del 0,1 % (Torsvik *et al.*, 1990, Trüper, 1992) fins a l'1 % (Liesack & Stackebrandt, 1992; Amman *et al.*, 1995), tot i que algun altre investigador dona un marge més ampli, entre 0,1 % i 10 % (Head *et al.*, 1998). A més, s'ha demostrat que les espècies bacterianes que creixen en cultius axènics (o «purs») no són les més abundants a la natura (Ward *et al.*, 1994). Malgrat la dificultat d'estudis dels bacteris, es creu que els gèneres *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Brevibacterium*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Streptomyces* i *Spirillum* es troben àmpliament distribuïts als rius (Atlas & Bartha, 2001).

Els rius solen rebre grans quantitats d'abocaments industrials i urbans. El vessament d'aigües residuals urbanes en un riu hi introdueix una gran quantitat de compostos orgànics. L'oxigen, generalment, s'escorça després de la descàrrega dels residus urbans perquè és utilitzat en la descomposició microbiana dels compostos orgànics. Els afluents industrials també introdueixen substàncies químiques tòxiques, com ara metalls pesants, que poden afectar negativament l'activitat i la supervivència dels microorganismes. La disponibilitat d'aigua amb les garanties higièniques necessàries per al consum humà i per a altres usos depèn en gran manera dels sistemes d'eliminació de residus líquids. L'augment de la població humana, especialment en els nuclis urbans, durant els segles XVIII i XIX, no va estar acompanyat al principi dels serveis higiènics adequats. Aquesta situació va propiciar l'aparició d'epidèmies devastadores causades per microorganismes enteropatògens com ara *Vibrio cholerae* (causant del còlera), *Salmonella typhi* (causant de la febre tifoide) i diverses soques de *Salmonella* i *Shigella* (que causen infeccions gastrointestinals de gravetat variable). La característica comuna d'aquestes malalties és que els organismes infecciosos que les causen es propaguen a través de les femtes d'individus malalts i de persones portadores clínicament asimptomàtiques. L'abocament d'aigües residuals sense depurar o depurades de manera inadequada pot causar la contaminació fecal de llacs, rius o reservoris d'aigües subterrànies que serveixen de subministra-

dors municipals d'aigua, amb la qual cosa els microorganismes patògens es disseminen ràpidament. La ruta primària de transmissió de la infecció és la ingestió d'aigua, però les fruites, les verdures i els atuells de taula rentats amb aigua contaminada també són possibles mitjans de transmissió de la infecció.

Per a la salut pública, és fonamental assegurar la potabilitat de l'aigua. Per avaluar l'eficàcia dels processos de depuració i per establir normes de seguretat de l'aigua potable cal una metodologia objectiva. La detecció directa de patògens com ara *Salmonella* o *Shigella* en els controls de rutina és molt difícil, i les anàlisis bacteriològiques determinen la presència de microorganismes que es prenen com a indicadors, com ara *Escherichia coli*. Els tests positius per a *E. coli* no demostren la presència d'organismes enteropatògens, però sí la possibilitat de la seva presència. Perquè un organisme pugui ser considerat «indicador», ha d'estar present en el medi sempre que ho estiguin els patògens i ha de ser més abundant; a més, ha de sobreviure igual o més temps que els patògens i ha de ser fàcil de detectar mitjançant cultius en medis selectius. Com més abundant sigui l'organisme indicador en un medi, més probable és la presència d'un patògen.

L'objectiu d'aquest treball és l'estudi de la microbiota aquàtica de la vall d'Alinyà al llarg del riu Alinyà, del riu de Perles i del riu del barranc de l'Alzina, amb un total de vuit estacions de mostreig. S'ha centrat en dos aspectes: *a*) l'estudi de les poblacions naturals mitjançant tècniques de cultiu en placa i microscòpia òptica, a la part del riu no sotmesa a pertorbacions produïdes per l'activitat humana (abocament d'aigües residuals i ramaderia), i *b*) determinació de la qualitat de l'aigua, des del punt de vista microbiològic, mitjançant l'anàlisi dels coliforms, dels enterococs i dels clostridis sulfitoreductors.

## 2. MATERIAL I MÈTODES

### 2.1. OBTENCIÓ DE LES MOSTRES

Les mostres es van recollir en flascons estèrils de boca ampla, en què va deixar-se sempre una cambra d'aire per tal de poder homogeneïtzar-ne el contingut. Van traslladar-se al laboratori, refrigerades, al més aviat possible. En alguns casos, es poden prendre les mostres en bosses de plàstic esterilitzades. Quan l'aigua a analitzar conté clor o un altre halogen, cal neutralitzar-lo amb tiosulfat sòdic (per exemple, de 0,1 mL d'una solució del 3 % en el cas d'una mostra de 100 mL d'aigua potable). Si la mostra conté una quantitat elevada de metalls (coure, zinc, etc.) s'ha de recollir en flascons amb un agent quelant, com ara l'àcid etilendiaminotetraacètic (EDTA) a pH 6,2 (en 100 mL de mostra caldrà afegir 0,3 mL d'una solució d'EDTA del 15 %). En la recollida d'aigües superficials, s'han d'evitar els llocs propers a la vora de llacs, embassaments, rius, etc., i les zones molt profundes o molt superficials. Un sistema pràctic és submergir un flascó i obrir-lo a 10 cm de profunditat a contracorrent.

TAULA 1. Localització geogràfica de les zones de mostreig (\*).

<i>Estació</i>	<i>Coordenades</i>	<i>Altitud</i>
Núm. 1 «Inici» km 3	42° 11' 12" N 1° 21' 39" E	630 m
Núm. 2 «Remellat després»	42° 10' 59" N 1° 22' 49" E	650 m
Núm. 3 «Remellat abans»	42° 11' 09" N 1° 23' 04" E	680 m
Núm. 4 «Alinyà després»	42° 11' 38" N 1° 25' 21" E	900 m
Núm. 5 «Alinyà abans»	42° 11' 41" N 1° 25' 49" E	980 m
Núm. 6 «Després granja»	42° 12' 33" N 1° 26' 06" E	1.060 m
Núm. 7 «Abans granja»	42° 12' 33" N 1° 26' 06" E	1.070 m
Núm. 8 «Font de l'Aiguaneix»	42° 11' 05" N 1° 26' 35" E	1.300 m

(\*) *Mapa comarcal de Catalunya*, núm. 04 de l'Alt Urgell. Escala 1:50.000. Generalitat de Catalunya. Departament de Política Territorial i Obres Públiques. Institut Cartogràfic de Catalunya.

*Mapa general*. Sèrie L. Organyà. Hoja nº 34-11 (253). Escala 1:50.000. Cartografía Militar de España. Servicio Geográfico del Ejército.

*Mapa general*. Sèrie L. Oliana. Hoja nº 34-12 (291). Escala 1:50.000. Cartografía Militar de España. Servicio Geográfico del Ejército.

Sistema de Posicionament Global (GPS).

### ESTACIONES DE MOSTREIG

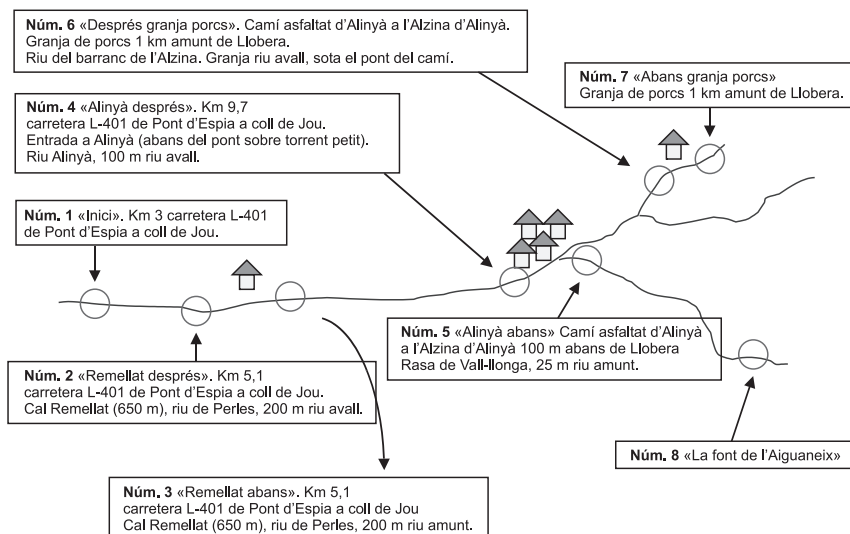


FIGURA 1. Esquema de la localització de les estacions de mostreig.



La taula 1 i la figura 1 indiquen la localització de les estacions de mostreig. Les mostres van agafar-se a l'hivern, a la primavera i a l'estiu, per fer un estudi comparatiu del recompte de coliforms fecals (*E. coli*), enterococs i clostridis sulfitoreductors, tenint en compte les condicions ambientals i l'època d'any.

## 2.2. OBSERVACIÓ MICROSCÒPICA

A partir d'un raspap d'una roca, s'observen els microorganismes presents *in vivo*, sense cap tipus de tractament amb colorants, amb un microscopi de contrast de fase a 400×. D'algunes colònies crescudes en agar TSA (triptona soia agar) o agar midó (que s'expliquen en l'apartat posterior), es va realitzar la tinció de Gram i la tinció de negre Sudan.

Tinció de Gram:

1. Fixació de la mostra amb calor. S'hi afegeix el colorant primari, violeta de cristall, durant 1 minut.
2. Es renta amb aigua i s'hi afegeix un mordent, Lugol (30 segons).
3. Es renta de nou amb aigua i es decolora amb etanol.
4. Es renta amb aigua i s'hi afegeix el colorant de contrast, safranina, durant 1 minut.
5. Es renta amb aigua, s'asseca la preparació i s'observa a 1.000× amb oli d'immersió.

Tinció de negre Sudan:

1. Fixació de la mostra amb calor en un portaobjectes, que se submergeix en una solució de negre Sudan al 0,3 % (p/v) dissolt en alcohol etílic al 70 % (v/v), durant 10 minuts.
2. Es renta la preparació amb una solució de xilè i s'asseca amb paper de filtre.
3. Posteriorment, es tenyeix amb una solució de safranina de 0,5 % (p/v) en aigua destil·lada i s'observa a 1.000× amb oli d'immersió.

## 2.3. RECOMPTE D'AEROBIS MESÒFILS A 30 ± 1 °C

És el recompte de la microbiota total, sense especificar els tipus de bacteris, mitjançant la utilització de medis de cultiu no selectius com ara l'agar TSA (triptona soia agar) i l'agar midó.

1. Es reparteixen alíquotes de 0,1 mL de la mostra. Si es pensa que el nombre de bacteris pot ser molt elevat, es fan dilucions decimals consecutives de la mostra i se'n sembren també 0,1 mL en plaques de Petri amb els medis de cultiu TSA o agar midó (dues plaques per dilució).
2. Amb la nansa de Drigalsky es reparteix l'inòcul per tota la superfície, efectuant moviments de rotació fins que el líquid quedi completament absorbit.
3. S'incuben a 30 °C durant 24-48 hores.
4. Es compten les colònies crescudes i es calcula el nombre de bacteris aerobis mesòfils per mil·lilitre de mostra (que és equivalent al nombre d'unitats formadores de colònies per mL, UFC × mL<sup>-1</sup>).

## 2.4. RECOMPTE DE COLIFORMS TOTALS PEL MÈTODE DEL NOMBRE MÉS PROBABLE (NMP): COLIMETRIA PRESUMPTIVA

L'enumeració viable pel mètode del nombre més probable (NMP) proporciona una estimació dels microorganismes viables existents en una mostra. És un mètode estadístic derivat de la teoria de probabilitats, que es pot aplicar només quan s'hagin homogeneïtzat bé les mostres i les dilucions, partint també de la suposició que 1) els microorganismes estan distribuïts a l'atzar; 2) que la presència d'un o més microorganismes per tub origina sempre creixement, i 3) que no hi ha influències perturbadores del creixement. De vegades, aquestes suposicions no són correctes. Aquest mètode s'utilitza en mostres poc contaminades. Per a mostres molt contaminades, el recompte en placa és més precís.

El mètode de l'NMP consisteix a preparar sèries de tres tubs amb 10 mL de brou de MacConkey doble concentrat amb campana de Durham; sis tubs amb 10 mL de brou de MacConkey a concentració normal i campana de Durham. A continuació se n'especifica el protocol:

1. La primera sèrie de tubs (tres tubs de MacConkey doble concentrat) s'inocula amb 10 mL de la mostra d'aigua per tub després d'homogeneïtzar-la bé.
2. La segona i la tercera sèries de tres tubs cadascuna amb brou de MacConkey a concentració normal s'inoculen amb 1 i 0,1 mL de mostra respectivament.
3. S'incuben tots els tubs a 37 °C durant 24-48 hores.

Es consideren positius aquells tubs en què l'indicador de pH ha virat a groc per la formació d'àcid a partir de la lactosa del medi i aquells en què s'hagi format gas (bombolles a la campana de Durham). La determinació de l'NMP de coliforms totals es fa segons la taula de McCrady (taula 2).

## 2.5. COLIMETRIA CONFIRMATIVA: COMPROVACIÓ DE LA PRESENCIA D'*ESCHERICHIA COLI*

La prova presumptiva és força inespecífica, perquè diversos bacteris que no pertanyen a la família de les enterobacteriàcies també poden créixer a 37 °C amb producció d'àcid i gas en MacConkey. Es pot aconseguir un enriquiment molt més específic d'*E. coli* incubant-lo a 44,5 °C en brou de MacConkey (prova d'Eijkman). Aquesta temperatura és inhibidora per als altres microorganismes fermentadors de lactosa. De cada tub positiu en el recompte de coliforms totals, s'inoculen dos tubs de brou de MacConkey amb campana de Durham, amb la nansa de Kolle i s'incuba a 44,5 °C durant 24-48 hores. S'hi ha d'observar creixement i formació de gas.

Malgrat que la temperatura d'incubació és selectiva per *E. coli*, cal utilitzar altres medis de cultiu selectius per als enterobacteris, per exemple agar MacConkey i agar Levine (EMB-lactosa). De cada tub positiu del recompte total de coliforms, se'n fa una sembra per estria en plaques de MacConkey i d'EMB-lactosa. Amb els tubs de colimetria presumptiva on s'ha confirmat la presència d'*E. coli* (mitjançant el creixement en agar EMB-lactosa i agar MacConkey), es calcula l'NMP de coliforms fecals (*E. coli*) per mL de mostra amb la taula 2. Les colònies típiques d'*E. coli* en el medi MacConkey són de color violeta fosc, són grans i tenen un halo tèrbol. És un medi selectiu que conté

TAULA 2. Nombre més probable de bacteris per mil·lilitre de mostra utilitzant tres sèries de tres tubs amb 10 mL de medi de cultiu. La primera sèrie s'inocula amb 10 mL; la segona, amb 1 mL, i la tercera, amb 0,1 mL. El resultat és el nombre de bacteris per mL (calculat estadísticament).

<i>Tres tubs Inòcul 10 mL</i>	<i>Tres tubs Inòcul 1 mL</i>	<i>Tres tubs Inòcul 0,1 mL</i>	<i>NMP (bact × mL<sup>-1</sup>)</i>
0	0	0	<3
0	0	1	3
0	1	0	3
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	480
3	3	2	1.100
3	3	3	>2.400

Ordre de 27 de juliol de 1983; BOE del 13 d'agost de 1983.

sals biliars, lactosa i l'indicador de pH, roig neutre. *E. coli* fermenta la lactosa, el pH del medi baixa i vira a violeta, l'halo correspon a la precipitació de les sals biliars, substància que només poden tolerar els bacteris entèrics. En el medi EMB-lactosa, les colònies d'*E. coli* formen un reflex metàl·lic verd característic a causa de la precipitació dels colorants eosina groga i blau de metilè.

## 2.6. RECOMPTE D'*ENTEROCOCCUS* PEL MÈTODE DEL NOMBRE MÉS PROBABLE (NMP): ESTREPTOMETRIA PRESUMPTIVA

Com en el cas de recompte de coliforms, es necessiten tres tubs amb 10 mL de brou de Rothe doble concentrat i sis tubs de brou de Rothe a concentració normal i es procedeix de la manera següent:

1. La primera sèrie de tres tubs, que contenen 10 mL de brou de Rothe doble concentrat, s'inocula amb 10 mL de la mostra d'aigua.
2. La segona i tercera sèries, cadascuna amb tres tubs amb 10 mL de brou de Rothe a concentració simple, s'inoculen amb 1 i 0,1 mL de mostra, respectivament.
3. Els tubs s'incuben a 37 °C durant 24-48 hores.

Els tubs positius són aquells en els quals s'observa creixement de terbolesa com a conseqüència del creixement bacterià. La determinació de l'NMP d'enterococs totals es fa segons la taula de McCrady (taula 2).

## 2.7. ESTREPTOMETRIA CONFIRMATIVA

Els tubs positius de la prova presumptiva s'agiten i amb la nansa de Kolle se sembren inòculs en tubs amb 5 mL de medi Litsky i s'incuben a 37 °C durant 24-48 hores. Els tubs positius són aquells que presenten terbolesa com a conseqüència del creixement i, de vegades, un pòsit violaci al fons del tub.

A més, es realitzen altres proves complementàries: 1) catalasa; els microorganismes que pertanyen al gènere *Enterococcus* són catalasa negatius; 2) creixement a 45 °C; els enterococs poden créixer a aquesta temperatura. La determinació de l'NMP d'enterococs per mL d'aigua es fa segons la taula de McCrady (taula 2).

## 2.8. RECOMPTE D'ESPORES DE CLOSTRIDIS SULFITOREDUCTORS

Els clostridis sulfitoreductors són bacils grampositius anaerobis estrictes que, en condicions adverses, desenvolupen formes de resistència (espores). L'absència o presència d'espores proporciona informació sobre la qualitat de l'aigua o de productes d'origen animal, i també és indicatiu de la llunyania en el temps de la contaminació. El procediment és el següent:

1. Es mantenen 10 mL de mostra al bany maria a 80 °C durant 10 minuts; amb aquest tractament s'eliminen totes les formes vegetatives.
2. Es refreda ràpidament sota el raig d'aigua de l'aixeta.
3. Es mesclen 5 mL de mostra amb 5 mL d'agar SPS doble concentrat fos que es manté a 45 °C, i es deixa solidificar. Aquest procés s'ha de fer per duplicat. El cultiu s'incuba a 37 °C durant 48-72 hores.

La presència de clostridis sulfitoreductors es confirma si als tubs es formen colònies negres. El xoc tèrmic que s'aplica a la mostra fa germinar les possibles espores dels bacteris i destrueix les formes vegetatives. D'altra banda, l'agar SPS conté citrat fèrric i sulfít sòdic. Els clostridis sulfitoreductors produiran sulfur de ferro a partir d'aquests compostos i es formarà un precipitat negre. Aquest medi porta també polimixina i sulfadiazina, compostos que inhibeixen el creixement d'altres components de la microbiota, i tioglicolat, que millora les condicions reductores (d'anaerobiosi) necessàries per al creixement dels clostridis.

### 3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

#### 3.1. ESTUDI DE LA MICROBIOTA AQUÀTICA DE LA VALL D'ALINYÀ: POBLACIONS NATURALS

En els ambients aquàtics, trobem diferents hàbitats que es localitzen a la columna d'aigua (i són arrossegats pel corrent) o en els sediments o superfícies submergides com ara les roques, on formen biopel·lícules (Lock, 1993). Les biopel·lícules estan constituïdes per poblacions microbianes que formen una comunitat coordinada i estan incloses en una matriu d'exopolisacàrid. De fet, les biopel·lícules s'assemblen als teixits de les cèl·lules eucariotes pel seu cooperativisme i pel fet d'estar «protegides» de les variacions sobtades de les condicions ambientals mitjançant el manteniment d'una «homeòstasi primitiva» dins de la matriu d'exopolímers. Aquests biopolímers retenen humitat i nutrients, i afavoreixen la formació de microambients en la biopel·lícula, en la qual els organismes es distribueixen segons les seves condicions abiòtiques òptimes o permissives imperants (Costerton *et al.*, 1995). Totes les roques escollides a l'atzar entre la font de l'Aiguaneix i el riu Alinyà (estació núm. 5) estan recobertes per un llim molt prim (biopel·lícula). En aquesta part del rierol les comunitats microbianes aquàtiques no estan sotmeses a «la contaminació» o vessat d'aigües residuals que podrien modificar la composició de les poblacions de les biopel·lícules. L'anàlisi microscòpica de les mostres determina la pre-

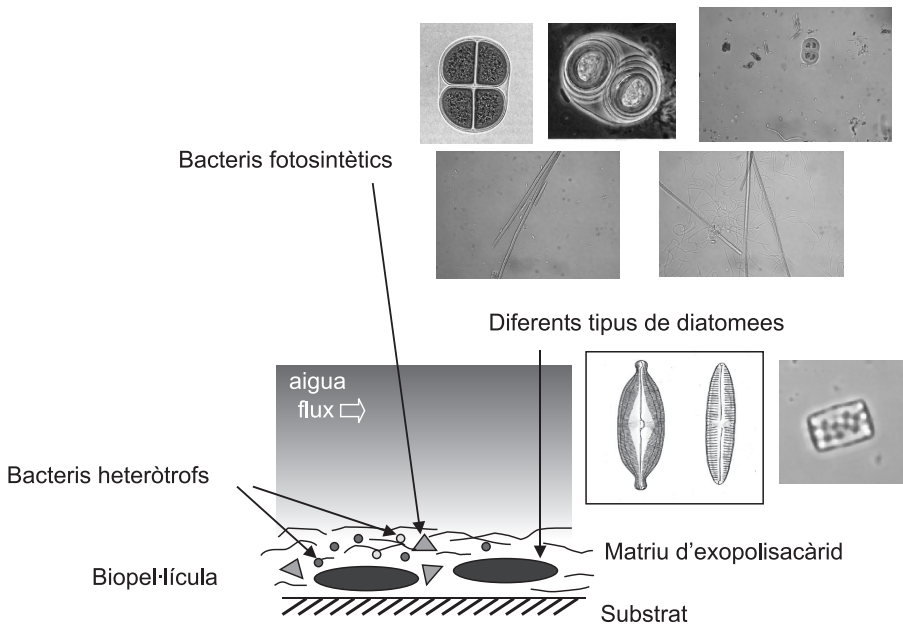


FIGURA 2. Representació esquemàtica d'una biopel·lícula d'una roca submergida en un riu. La comunitat és complexa: trobem bacteris fotosintètics, bacteris heteròtrofs, diatomees i restes de matèria orgànica englobats en una matriu d'exopolisacàrid.

sència d'una comunitat complexa de microorganismes, en la qual trobem diatomees, bacteris i restes amorfes de detritus. Entre els bacteris, destaquem l'existència de cianobacteris filamentosos (*Lyngbya*) i coccoïdals (*Chroococcus*), i altres bacteris heteròtrofs (figura 2).

El curs superior dels rius es caracteritza per aigües poc profundes molt oxigenades i de moviment ràpid. Normalment, la producció primària és baixa i l'entrada de matèria orgànica prové principalment de la litosfera circumdant. En els rius, la majoria dels microorganismes estan adherits a superfícies com ara les roques submergides que absorbeixen ràpidament els nutrients dissolts. Quan aquests microorganismes es moren i es degraden, alliberen nutrients que són consumits de nou per altres microorganismes que es troben riu avall. Com a conseqüència, el desplaçament dels nutrients es fa molt més lentament que el corrent d'aigua. El reciclat dels nutrients en un riu no es produeix en el mateix lloc, sinó una mica més avall (figura 3).

A partir de mostres líquides agafades a l'estació núm. 5, es va procedir al recompte de viables en placa. Aquest mètode és selectiu per a determinats grups de microorganismes. El grau de selectivitat varia segons el medi de cultiu utilitzat i les condicions i el període d'incubació. Aquesta selectivitat és un inconvenient quan s'intenta calcular la biomassa total microbiana en un ecosistema, però permet el recompte de tipus particulars de microorganismes. Vàrem estudiar els bacteris aerobis mesòfils mitjançant la utilització de dos medis de cultiu no selectius, el TSA i l'agar midó (són medis de cultiu que no tenen cap substància en la seva composició que seleccioni un tipus de microorganisme determinat, a diferència dels medis de cultiu selectius com ara l'agar MacConkey, que afavoreix el creixement d'enterobacteris com ara *Escherichia coli* o *Salmonella*). El nombre de microorganismes obtingut no va variar significativament respecte als dos medis de cultiu escollits. Els valors trobats se situaven entre  $2 \times 10^2$  i  $8 \times 10^3$  UFC  $\times$  mL<sup>-1</sup>, corresponents a l'hivern i a l'estiu, respectivament. A l'estiu, el volum d'aigua del rierol és menor (època seca) i la temperatura és més alta, la qual cosa pot afavorir el desenvolupament

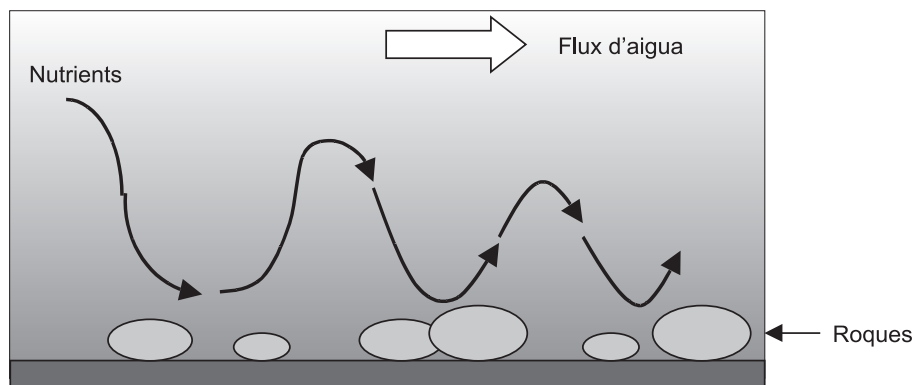


FIGURA 3. Moviment dels nutrients en el curs d'un riu. El flux d'aigua és ràpid i la microbiota està adherida sobre les roques formant les biopel·lícules. Els nutrients no van a la mateixa velocitat que l'aigua, perquè són absorbits per la biota que està adherida. Després de la mort dels organismes i de la mineralització de la biomassa, els nutrients són arrossegats pel corrent durant un període curt de temps, immediatament abans de tornar-se a repetir el cicle.

dels microorganismes. Els bacteris es troben en totes les aigües naturals i sediments. Al plàncton s'ha estimat una mitjana d'  $1 \times 10^6$  bacteris  $\times \text{mL}^{-1}$  en la majoria d'aigües naturals (rius, llacs, estuaris i mars). No obstant això, la concentració pot variar entre  $4 \times 10^3$  i  $1,2 \times 10^7$  bacteris  $\times \text{mL}^{-1}$  segons la quantitat de matèria orgànica present. Els valors augmenten en els sediments dels llacs i marins, que són aproximadament d'  $1 \times 10^9$  bacteris per gram de pes sec, similars als trobats en els sòls (Lynch & Hobbie, 1988; Whitman *et al.*, 1998). En el cas de les aigües d'Alinyà, els valors trobats indiquen que són oligotròfics, amb poca matèria orgànica, com correspon a rierols d'alta muntanya.

Com ja s'ha esmentat, és possible que només un 1 % dels microorganismes que viuen en estat natural pugui cultivar-se en condicions de laboratori (Amann *et al.*, 1995). A més, els bacteris que poden créixer en cultius purs no sembla que siguin els més abundants a la natura (Ward *et al.*, 1994). La incorporació de les tècniques de la biologia molecular als estudis d'ecologia microbiana ha permès explorar l'extensió de la biodiversitat en el món microbià i avançar en el coneixement dels ecosistemes microbians. Malgrat que amb les tècniques clàssiques de cultiu se subestimi la biodiversitat d'un espai, el recompte en placa dels bacteris viables aerobis mesòfils permet observar la diversitat relativa dels bacteris heteròtrofs planctònics. En general, cada bacteri individual forma una colònia característica quan creix en un medi de cultiu sòlid (és un creixement clonal d'un bacteri que ha quedat fixat en l'agar).

En el nostre estudi, les morfologies colonials trobades a les plaques de TSA i agar midó són de cinc tipus: *a*) colònies irregulars mucoses, de color +/- blanc, mida ~4 mm; *b*) colònies rodones, ben delimitades, +/- blanques, 1-2 mm; *c*) colònies rodones, ben delimitades, color groc, 1-2 mm; *d*) colònies amb el «marge asserrat», seca, 2-4 mm, i *e*) colònies rodones, petites ~1 mm. Les colònies més nombroses trobades són les del tipus *a*. L'estudi d'algunes colònies escollides a l'atzar correspon a bacteris gramnegatius en què hem detectat glòbuls de poli- $\beta$ -hidroxialcanoats (PHA) mitjançant la tinció de negre Sudan. Els procariotes són els únics organismes que acumulen aquesta substància de reserva de carboni i energia (figura 4) constituïda normalment per copolímers de diferents unitats ordenades regularment. La composició i els tipus d'unitats presents en el copolímer estan determinats per la font de carboni que se subministra al microorganisme. Normalment, l'acumulació d'aquest polímer respon a una limitació del creixement per manca d'un nutrient essencial, que sol ser el nitrogen (Guerrero & Mas-Castellà, 1990).

En medis oligotròfics, com són les aigües del rierol (estació núm. 5), les cèl·lules no diferenciades (com ara *Pseudomonas* o *Ralstonia*, que pertanyen a la microbiota na-

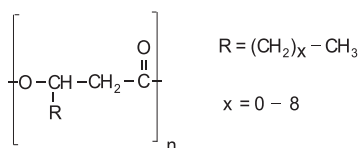


FIGURA 4. Fórmula química general dels poli- $\beta$ -hidroxialcanoats. Quan  $x = 0$ , la fórmula correspon al PHB (poli- $\beta$ -hidroxibutirat). Quan  $x$  val successivament 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 i 8, tenim el poli- $\beta$ -hidroxivalerat, poli- $\beta$ -hidroxicaproat, poli- $\beta$ -hidroxiheptanoat, poli- $\beta$ -hidroxioctanoat, poli- $\beta$ -hidroxinonanat, poli- $\beta$ -hidroxidecanoat, poli- $\beta$ -hidroxidodecanat i poli- $\beta$ -hidroxidodecanat, respectivament.

tural d'aquelles aigües) responen a la limitació d'un determinat nutrient mitjançant la síntesi de sistemes de transport d'alta afinitat per a aquest nutrient, i amb l'expressió d'un transportador i la utilització d'altres sistemes que puguin utilitzar fonts alternatives més abundants en el medi (Martin, 2000). No obstant això, aquestes respostes solen ser insuficients per assegurar la supervivència, i els microorganismes necessiten degradar macromolècules i polímers de reserva, com ara el glucogen o els PHA. L'acumulació de substàncies de reserva determina la capacitat de previsió del bacteri o *time-binding*, mitjançant el qual el microorganisme s'anticipa a unes possibles condicions adverses del medi, acumula diverses substàncies quan al seu entorn hi ha una quantitat de nutrients superior a la que li caldria per créixer. El bacteri consumeix aquestes substàncies quan no hi ha una font externa d'energia per al manteniment de les funcions mínimes de la cèl·lula, com ara la conservació de l'equilibri osmòtic, el potencial de membrana o la renovació dels components cel·lulars. Aquesta estratègia de «previsió de les condicions futures» ha estat fonamental per a l'evolució i manteniment de la vida a la Terra (Guerrero & Berlanga, 2001).

Generalment, s'accepta que la vida als rius no és extremadament variada, perquè les condicions ambientals en aquest medi són molt dures i perquè els llits de molts rius només porten aigua algunes temporades. Això és cert en el cas de la macrobiota eucariota, però no en el cas dels microorganismes. L'aplicació de tècniques moleculars a l'estudi de les biopel·lícules i de la biota planctònica és molt probable que mostri una gran diversitat inesperada de formes de vida microbiana.

### **3.2. CONTROL MICROBIOLÒGIC DE LA QUALITAT DE L'AIGUA**

Els organismes infecciosos transmesos per l'aigua solen viure en el tracte intestinal dels seus hostes i abandonen el cos per les femtes. El patògen pot penetrar en un nou hoste mitjançant el consum d'aigua provinent de reservoris contaminats principalment per residus fecals que han estat abocats a les aigües superficials. Això implica l'alliberament en aquestes aigües d'una població microbiana al·lòctona que provoca un desequilibri en la composició natural de la microbiota autòctona dels sistemes aquàtics naturals. El riu Alinyà és un bon exemple de dos tipus de perturbacions provocades per l'activitat humana; un és l'abocament d'aigües residuals d'origen urbà, i l'altre, el de les aigües residuals d'una activitat ramadera (provenen d'una granja de porcs).

El control microbiològic de la qualitat d'aigua es va realitzar al llarg del riu Alinyà amb vuit estacions d'estudi. Les estacions núm. 5 i núm. 7 són controls de la presència de microbiota normal (se suposa que no hi ha contaminació fecal). L'estació núm. 6 correspon a la granja de porcs. L'estació núm. 4 correspon a l'abocament d'aigües residuals als afores del poble d'Alinyà. Les estacions núm. 1, 2 i 3 són punts de mostreig per comprovar el poder «autodepurador» del riu d'Alinyà, essent el núm. 1 el lloc més allunyat del punt d'abocament de les aigües residuals del nucli urbà d'Alinyà. Com ja s'ha esmentat, l'abocament d'aigües urbanes al curs d'un riu provoca una perturbació en l'ecosistema tant des del punt de vista fisicoquímic com biològic. La natura tracta de limitar aquest desequilibri intentant tornar a les condicions originals del sistema. La contaminació és l'acumulació de substàncies en un espai i temps determinats i apareix quan el medi és incapaç de tornar a l'equilibri o situació original. A l'estació núm. 8,



que és una font on la gent agafa aigua i en beu, es va realitzar l'estudi de potabilitat des del punt de vista microbiològic. L'estudi de control microbiològic constà de l'anàlisi dels coliforms, dels enterococs i dels clostridis sulfitoreductors al llarg del temps. La importància per a la salut pública de la qualitat de les aigües destinades al consum humà fa necessària la fixació de normes de qualitat de les aigües potables de consum públic (Reial decret 1138/1990, de 14 de setembre, BOE, núm. 226).

Els coliforms són bacils gramnegatius aerobis o anaerobis facultatius no esporulats que poden créixer en presència de sals biliars i que metabolitzen la lactosa amb producció d'àcid i gas en 48 hores a 35 °C. Representen quatre gèneres dins la família Enterobacteriaceae: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* i *Enterobacter*. Es troben a l'intestí dels éssers humans i dels animals, però també a altres llocs, com ara a les verdures, la closca dels ous, els sòls, etc. La determinació de tots els bacteris que creixen en un medi amb sals biliars, que són lactosa positius i que produeixen gas, es coneix com a *colimetria presumptiva*. Com a indicador de contaminació fecal, *Escherichia coli* és millor que els altres gèneres de coliforms perquè *E. coli* forma part de la microbiota habitual de l'intestí humà i dels animals homeotermes, mentre que *Enterobacter aerogenes* es troba amb més freqüència a l'ambient. Tanmateix, *E. coli* té l'inconvenient de sobreviure poc temps en l'ambient extraentèric, per la qual cosa la seva presència a les aigües indica que la contaminació és recent. La determinació de la presència de coliforms fecals (presumptivament *E. coli*) és el que es coneix com a colimetria confirmativa (vegeu l'apartat «Material i mètodes»).

*Streptococcus* es troba dintre del grup dels microorganismes grampositius amb morfologia de coc. Els membres d'aquest grup es caracteritzen per la disposició en parelles o en cadenes. En general, són immòbils, no esporulats i catalasa negatius, microaeròfils o anaerobis facultatius. Els estreptococs d'origen fecal es denominen enterococs (*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*). La seva presència indica, doncs, contaminació fecal. No es multipliquen a l'aigua, especialment si el contingut de matèria orgànica és baix. Són menys nombrosos que *E. coli* en les femtes humanes; així, una proporció de coliforms (*E. coli*): enterococs (*E. faecalis*) de 4:1 a les aigües seria indicatiu d'una contaminació recent de procedència humana. Els enterococs s'inactiven molt més lentament que els coliforms a les aigües. La disminució de l'índex (a causa de l'augment del denominador) indicaria una contaminació més llunyana en el temps.

La determinació dels clostridis sulfitoreductors i de les seves espores té importància en l'anàlisi d'aigües; la seva presència pot ser indicativa d'una contaminació fecal llunyana en el temps, ja que el temps de supervivència de les espores és molt més elevat que qualsevol altre indicador. La figura 5 mostra un esquema de l'aïllament dels microorganismes indicadors descrits en aigües d'origen fecal respecte al temps.

Les taules 3, 4, i 5 mostren els resultats de les anàlisis microbiològiques d'aigua del riu Alinyà a l'hivern, primavera i estiu, respectivament. A les estacions núm. 5 i 7 no hi ha contaminació fecal. En canvi, s'ha observat un augment en el nombre de microorganismes d'origen fecal en tres punts del riu que corresponen a les estacions 2, 4 i 6. A l'estació núm. 2, hi ha una masia petita; la pertorbació no és gaire alta, però s'hi observa un lleuger augment, tant de coliforms fecals com d'enterococs, respecte al punt 3 del mostreig. El canvi més significatiu es dona a l'estació núm. 4, després del nucli urbà. En aquest punt del riu s'ha trobat el nombre més elevat de microorganismes en qualsevol època de l'any. Hi ha, però, diferències segons les estacions de l'any; la major abundància a la primavera i, sobretot, a l'estiu, pot atribuir-se al turisme de la zona.

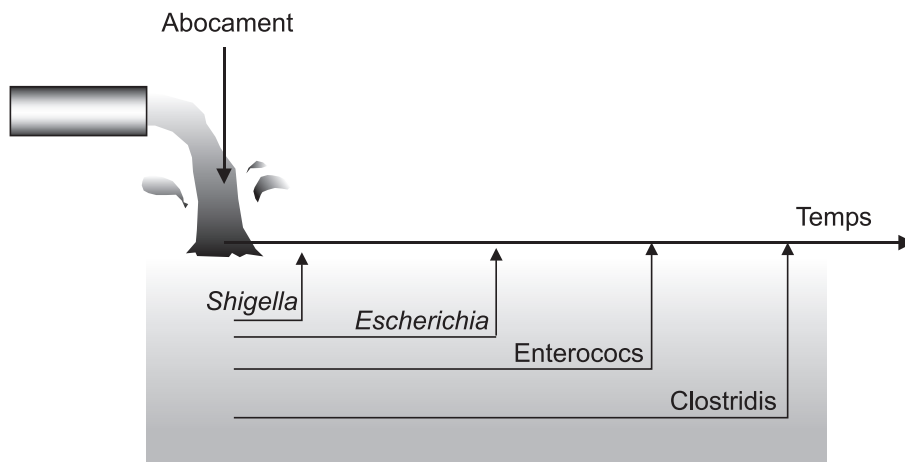


FIGURA 5. Aïllament de microorganismes indicadors de contaminació fecal respecte al temps.

Un altre punt de «desequilibri» és l'estació núm. 6, que correspon a la granja de porcs. Els valors de coliforms fecals (*E. coli*) i enterococs són sorprenentment baixos, tot i la terbolesa de l'aigua i que desprèn un fort tuf d'aigües fecals. Els resultats obtinguts poden atribuir-se a l'abocament de residus orgànics amb algun producte inhibidor del creixement de microorganismes. En ramaderia, els antibiòtics s'utilitzen com a tractament dels animals malalts, com a mesura profilàctica per evitar malalties del bestiar i com a promotors del creixement individual. S'ha observat que la utilització dels antibiòtics com a estimuladors del creixement fa augmentar el pes de l'animal entre un 5 i un 10 % respecte als animals que no són tractats. Aquest efecte es deu probablement a un millor «aprofitament» dels pinsos (un augment de l'absorció intestinal). Els antibiòtics emprats com a promotors de creixement són exclusius per als animals, però estructuralment són similars als que s'apliquen en el tractament d'infeccions humanes. L'avoparcina fou un antibiòtic molt utilitzat en ramaderia fins a l'any 1993, en què la Unió Europea en prohibí l'ús a causa de l'augment significatiu de resistència microbiana a l'antibiòtic vancomicina (d'ús clínic humà utilitzat en el tractament d'infeccions produïdes per soques de *Staphylococcus aureus* resistents a la meticil·lina), que és un antibiòtic estructuralment molt similar a l'avoparcina. S'ha estimat que la quantitat d'antibiòtics emprats en ramaderia és mil vegades superior a la que es destina a l'aplicació en els humans, i el seu ús és principalment amb finalitats profilàctiques. Els antibiòtics no haurien de ser el recurs per solucionar deficiències en les condicions higièniques de les instal·lacions. A més, l'excés d'antibiòtics en concentracions baixes estan creant les condicions adients per al desenvolupament i la dispersió de soques bacterianes resistents als antibiòtics, fenomen que pot tenir conseqüències greus per a la salut pública.

A l'hivern, s'han detectat més microorganismes que a la primavera, perquè la primavera és l'època de pluges i hi ha un efecte de dilució, tot i que ja comenci a observar-se més afluència de gent. Fins i tot a l'estiu, que és quan més microorganismes d'origen fecal trobem, el riu tendeix a «eliminar» o recuperar la situació inicial (abans de l'abocament de residus urbans), tot i que no s'arriba a assolir els valors inicials trobats a les estacions de control (estacions núm. 5 i núm. 7). En el cas de l'estació núm. 1, els valors

TAULA 3. Colimetria, estreptometria i clostridis sulfitoreductors del riu Alinyà a l'hivern.

<i>Estació</i>	<i>Microorganismes</i>	<i>Resultats</i>
Núm. 1	Coliforms fecals	43 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Enterococs	7 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Clostridis	Absència en 5 mL
Núm. 2	Coliforms fecals	150 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Enterococs	11 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Clostridis	Absència en 5 mL
Núm. 3	Coliforms fecals	7 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Enterococs	4 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Clostridis	Absència en 5 mL
Núm. 4	Coliforms fecals	480 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Enterococs	240 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Clostridis	Absència en 5 mL
Núm. 5	Coliforms fecals	< 3 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Enterococs	< 3 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Clostridis	Absència en 5 mL
Núm. 6	Coliforms fecals	23 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Enterococs	4 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Clostridis	Absència en 5 mL
Núm. 7	Coliforms fecals	< 3 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Enterococs	< 3 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Clostridis	Absència en 5 mL
Núm. 8	Coliforms fecals	< 3 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Enterococs	< 3 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Clostridis	Absència en 5 mL

TAULA 4. Colimetria, estreptometria i clostridis sulfitoreductors del riu Alinyà a la primavera.

<i>Estació</i>	<i>Microorganismes</i>	<i>Resultats</i>
Núm. 1	Coliforms fecals	23 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Enterococs	< 3 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Clostridis	Absència en 5 mL
Núm. 2	Coliforms fecals	23 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Enterococs	3 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Clostridis	Absència en 5 mL
Núm. 3	Coliforms fecals	93 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Enterococs	9 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Clostridis	Absència en 5 mL
Núm. 4	Coliforms fecals	1.100 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Enterococs	150 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Clostridis	Absència en 5 mL
Núm. 5	Coliforms fecals	< 3 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Enterococs	< 3 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Clostridis	Absència en 5 mL
Núm. 6	Coliforms fecals	15 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Enterococs	< 3 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Clostridis	Absència en 5 mL
Núm. 7	Coliforms fecals	< 3 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Enterococs	< 3 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Clostridis	Absència en 5 mL
Núm. 8	Coliforms fecals	< 3 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Enterococs	< 3 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Clostridis	Absència en 5 mL

TAULA 5. Colimetria, estreptomètria i clostridis sulfitoreductors del riu Alinyà a l'estiu.

Estació	Microorganismes	Resultats
Núm. 1	Coliforms fecals	480 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Enterococs	240 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Clostridis	Absència en 5 mL
Núm. 2	Coliforms fecals	210 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Enterococs	240 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Clostridis	Absència en 5 mL
Núm. 3	Coliforms fecals	150 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Enterococs	150 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Clostridis	Absència en 5 mL
Núm. 4	Coliforms fecals	> 2.400 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Enterococs	> 2.400 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Clostridis	Absència en 5 mL
Núm. 5	Coliforms fecals	9 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Enterococs	9 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Clostridis	Absència en 5 mL
Núm. 6	Coliforms fecals	9 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Enterococs	93 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Clostridis	Absència en 5 mL
Núm. 7	Coliforms fecals	< 3 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Enterococs	< 3 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Clostridis	Absència en 5 mL
Núm. 8	Coliforms fecals	< 3 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Enterococs	< 3 bacteris $\times$ mL <sup>-1</sup>
	Clostridis	Absència en 5 mL

obtinguts són també sorprenents, perquè hi ha un nombre més alt de microorganismes del que es podria esperar atesa la capacitat «autodepuradora» del riu. És possible que hi hagi algun abocament d'aigües residuals d'alguna casa propera i que siguin aigües d'origen fecal humà. De fet, el quocient EC/EF (EC = *Escherichia coli*; EF = *Enterococcus faecalis*) > 1. La microbiota intestinal humana conté aproximadament cinc vegades més *Escherichia* que enterococs, mentre que en els animals (com ara els porcs, vaques, ovelles, etc.) és a l'inrevés, de tal manera que valors EC/EF < 1 indicarien una contaminació fecal de les aigües d'origen animal (alguna granja). Aquest resultat no l'hem observat a l'estació núm. 6, on possiblement —com ja s'ha esmentat— hi hagi hagut també un abocament d'alguna substància tòxica per als microorganismes assajats.

Hi ha una diferència marcada entre el grau d'importància de les malalties infeccioses com a causa de mort als països en via de desenvolupament i als països desenvolupats. A les zones del món en desenvolupament, les malalties infeccioses representen un 40 % de les morts enfront del 4 % dels països desenvolupats. La diferència respon a les deficiències en la nutrició i en les mesures higienicosanitàries dels països en desenvolupament. Organitzacions internacionals, com ara la FAO i l'OMS, i la legislació existent a cada país intenten garantir la qualitat microbiològica dels aliments i de les aigües mitjançant el compliment d'una normativa que marca el límit màxim d'uns determinats microorganismes patògens (o potencialment patògens) presents en una mostra. La Reglamentació tecnicosanitària per al proveïment i control de qualitat de les aigües potables de consum públic, aprovada pel Reial decret 1423/1982, de 18 de juny, fou elaborada en el desenvolupament del Codi alimentari espanyol (R. 1967, 1985) i, posteriorment, modificada pel Reial decret 1138/1990 (BOE núm. 226), que descriu la normativa

per al control de la qualitat de les aigües potables, que és definida per la legislació: «Son aquellas aguas potables utilizadas para este fin, cualquiera que sea su origen, bien en estado natural o después de un tratamiento adecuado, ya sean aguas destinadas directamente al consumo o aguas utilizadas en la industria alimentaria para fines de fabricación, tratamiento, conservación o comercialización de productos o sustancias destinadas al consumo humano y que afecten a la salubridad del producto alimenticio final.» D'acord amb la legislació actual (RD 1138/1990), l'estudi de potabilitat des del punt de vista microbiològic de l'estació núm. 8, la font, indica que compleix la qualitat microbiològica. Cap dels valors de coliforms, enterococs i clostridis obtinguts de les mostres de l'estació núm. 8 no ultrapassen els valors límits de referència.

## 4. REFLEXIONS I PERSPECTIVES

La legislació actual preveu la preservació i la gestió dels espais naturals i d'espècies vegetals i animals; la protecció d'animals, especialment de vertebrats, és la branca que està jurídicament i socialment més desenvolupada. Tanmateix, diferents projectes d'estudis de biodiversitat estan ampliant el seu abast i s'hi estan incloent grups d'organismes que abans no es tenien en compte. L'informe *Estratègia catalana per a la conservació i l'ús sostenible de la diversitat biològica*, que el 1999 va realitzar l'Institut d'Estudis Catalans mitjançant un conveni de col·laboració amb el Departament de Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya, va tenir en compte tots els components vius dels ecosistemes i va dedicar un apartat als microorganismes. També va incloure un apartat sobre gens i genomes, l'estudi dels quals pot ser fonamental per analitzar comunitats microbianes que no poden estudiar-se per mitjans convencionals.

La protecció de les espècies que es troben en ambients naturals és una salvaguarda dels hàbitats i ambients on viuen habitualment. No obstant la nova visió global de la natura, encara no hi ha lleis que considerin la protecció d'espècies de microorganismes dels ambients naturals ni la preservació i gestió de la diversitat d'espècies microbianes. La Directiva Hàbitats (CEE, 1992) reclama que es designin zones especials de conservació per a les espècies vegetals que s'hi detallin, com s'havia fet anteriorment per protegir els ocells. Caldria prendre mesures conservadores que integressin tots els grups d'éssers vius que es troben en els ambients naturals i que, per tant, incloguessin també els microorganismes. La vall d'Alinyà reuneix les condicions adients per dur-hi a terme un treball d'aquest tipus.

En el cas dels microorganismes, la biodiversitat pot ser explorada en termes d'ecosistema, de poblacions, d'espècies i de molècules. D'altra banda, els índexs de diversitat microbiana s'estableixen a partir de tres components: la riquesa d'espècies, l'equitat i la composició. Els índexs de diversitat d'espècies, que són habituals en l'estudi ecològic de macroorganismes (plantes, animals, fongs, etc.), no són adients per determinar la diversitat bacteriana per la dificultat esmentada de definir cada espècie pels mitjans clàssics. Aquesta dificultat, però, ha quedat compensada pel desenvolupament de tècniques moleculars que permeten un altre enfocament dels estudis de diversitat en els bacteris.

L'anàlisi comparativa de subunitats petites de RNA ribosòmic i altres seqüències de gens dels microorganismes presents en un hàbitat determinat aporten una mesura de la seva diversitat alhora que permeten la construcció d'arbres filogenètics que faciliten un cert tipus d'identificació de les espècies. L'estudi de la composició dels lípids de la membrana cel·lular, que és característica de cada espècie bacteriana, també permet en molts casos identificar les espècies o, si més no, indicar l'estructura i diversitat de les comunitats que s'estudien.

Per a la propera fase de l'estudi de la biodiversitat microbiana de la vall d'Alinyà, es proposa emprar diverses tècniques moleculars que no necessiten cultiu previ i que analitzen alguns components cel·lulars, com ara els àcids nucleics a l'interior de la mateixa cèl·lula o després de fer-ne l'extracció, i els àcids grassos dels fosfolípids. Al mateix temps es proposa ampliar l'estudi als components de la microbiota de diferents tipus de sòls presents a la Vall. Les tècniques de seqüenciació automàtica de l'ADN estalvien molt de temps i són més segures que els mètodes clàssics que empraven nucleòtids marcats amb isòtops radioactius. Tanmateix, per a aquesta tècnica, que permet llegir d'una tirada fragments de més de mil dos-cents parells de bases i fer simultàniament una seqüenciació bidireccional, cal disposar d'un equipament molt car i no sempre a l'abast dels investigadors. L'anàlisi dels lípids, especialment dels àcids grassos, és molt útil per a l'estudi de les comunitats microbianes de llocs, sòls, rizosfera i sediments. Els lípids, emprats com a biomarcadors signatura, permeten fer una avaluació quantitativa dels microorganismes viables, de la composició de les comunitats microbianes i de l'estat fisiològic i nutricional de la comunitat. Atesa la rapidesa amb què els fosfolípids es degraden a diglicèrids (de minuts a hores després de la mort de la cèl·lula), són uns biomarcadors molt adients per determinar les cèl·lules viables (Navarrete *et al.*, 2000). Aquesta tècnica, tot i que sigui més laboriosa que la seqüenciació automàtica de l'ADN, és més fàcil de dur a la pràctica perquè no requereix aparells tan costosos.

## BIBLIOGRAFIA

- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. (1995). «Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation». *Microbiol. Rev.*, 59, p. 143-169.
- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. (2001). «Los microorganismos en sus hábitat naturales: microbiología del aire, del agua y del suelo». *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Madrid: Pearson Educación, p. 329-382.
- COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. (1995). «Microbial biofilms». *Annu. Rev. Microbiol.*, 49, p. 711-745.
- «Directiva 9762/CE del Consell, de 27 d'octubre de 1997, per la qual s'adapta al progrés científic i tècnic la directiva 92/43/CEE, relativa a la conservació dels hàbitat naturals i de fauna i flora silvestres». Consell de les Comunitats Europees.
- GUERRERO, R.; MAS-CASTELLÀ, J. (1990). «Acumulación de polímeros por bacterias: aplicaciones biotecnológicas». In: CASADESÚS, J.; RUIZ-BERRAQUERO, F., [ed.]. *Microbiología 1990*. Madrid: Sociedad Española de Microbiología. p. 187-200.
- GUERRERO, R.; BERLANGA, M. (2001). «La "inmortalidad" procariota y la tenacidad de la vida». *Actualidad SEM*, 32, p. 16-23.

- HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. (1998). «Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms». *Microb. Ecol.*, 35, p. 1-21.
- LIESACK, W.; STACKEBRANDT, E. (1992). «Unculturable microbes detected by molecular sequences and probes». *Biodiv. Conserv.*, 1, p. 250-262.
- LOCK, M. A. (1993). «Attached microbial communities». In: FORD, T. E. [ed.]. *Aquatic Microbiology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications. p. 113-138.
- LYNCH, J. M.; HOBBI, J. E. (1988). *Microorganisms in action: Concepts and application in microbial ecology*. Oxford: Blackwell Scientific Publication. p. 132-162.
- MARGALEF, R. (1992). «Las aguas epicontinentales». *Planeta azul, planeta verde*. Barcelona: Biblioteca Scientific American, p. 171-195.
- MARTIN, A. (2000). «Bacterial starvation». In: LEDERBERG, J. [ed.]. *Encyclopedia of Microbiology*. 2a ed. San Diego: Academic Press. p. 394-403.
- NAVARRETE, A.; PEACOCK, A.; MACNAUGHTON, S. J.; URMENETA, J.; MAS-CASTELLÀ, J.; WHITE, D. C.; GUERRERO, R. (2000). «Physiological status and community composition of microbial mats of the Ebro Delta, Spain, by signature lipid biomarkers». *Microb. Ecol.*, 39, p. 92-99.
- «Reial decret 1138/1990, de 14 de setembre, pel qual s'aprova la Reglamentació tecnosanitària per a l'abastament i control de qualitat de les aigües potables de consum públic». *Boletín Oficial del Estado*, núm. 226 (20 setembre).
- TORSVIK, V.; GOKSØYR, J.; DAAE, F. L. (1990). «High diversity in DNA of soil bacteria». *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, p. 782-787.
- TRÜPER, H. G. (1992). «Prokaryotes: an overview with respect to biodiversity and environmental importance». *Biodiv. Conserv.*, 1, p. 227-236.
- WARD, D. M.; FERRIS, M. J.; NOLD, S. C.; BATESON, M. M.; KOPCZYNSKI, E. D.; RUFF-ROBERTS, A. L. (1994) «Species diversity in hot spring microbial mats as revealed by both molecular and enrichment culture approaches - relationship between biodiversity and community structure». In: STAL, L. J.; CAUMETTE, P. [ed.]. *Microbial Mats. Structures, development and environmental significance*. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag. (NATO ASI Series; 35), p. 33-44.
- WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. (1998). «Prokaryotes: the unseen majority». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, p. 6578-6583.

