

BLOC III - Protocols de les pràctiques a camp

Paràmetres físics i químics

pH. Calibració del pH-metre

Per assegurar-se una mesura correcta del pH, l'aparell s'ha de calibrar de tant en tant. La seva freqüència depèn de la precisió desitjada, del nombre de mesures i de les condicions de treball (temperatures extremes, brutícia de les mostres, etc).

L'aparell va proveït d'un elèctrode connectat a la posició A i d'una sonda de temperatura connectada a la posició B gràcies a la qual pot fer automàticament la compensació segons la temperatura de la mostra.

Passos a seguir per a calibrar el pH-metre.

- 1 ■ Prémer la tecla I/O. La pantalla apareix en mode pH.
- 2 ■ Rentar l'elèctrode amb aigua destil·lada, submergir-lo dins el tampó 7,02 i agitar lleugerament. Esperar que la lectura de la pantalla s'estabilitzi.
- 3 ■ Prémer la tecla que representa un flascó i apareix en pantalla el valor teòric del tampó: 7,02 (el símbol és intermitent)
- 4 ■ Prémer de nou la mateixa tecla, l'instrument introdueix la dada. La lectura de la pantalla ja no és intermitent.
- 5 ■ Rentar l'elèctrode amb aigua destil·lada i submergir-lo en el tampó de pH 4,00. Agitar lleugerament. Esperar que la lectura de la pantalla s'estabilitzi.
- 6 ■ Prémer la tecla que representa una ampolla. Surt a la pantalla el pH del segon tampó: 4,00 (el símbol és intermitent).
- 7 ■ Prémer de nou la mateixa tecla, l'instrument introdueix la dada i passa a lectura. El símbol de la pantalla ja no és intermitent.
- 8 ■ Rentar l'elèctrode amb aigua destil·lada i l'instrument està preparat per a mesurar el pH.

Important :

- **Les** dissolucions tampó no es poden tornar al flascó original una vegada utilitzades.
- **Els** tampons s'han de renovar una vegada a l'any.
- **L'elèctrode** romandrà sempre protegit per la funda amb dissolució de KCl.

pH. Mesura del pH amb pH-metre

Passos a seguir per a mesurar el pH.

Si la calibració ja està feta, la sonda de temperatura estarà connectada en la posició B.

- 1 ▪ Prémer la tecla I/O.
- 2 ▪ Rentar l'elèctrode amb aigua destil·lada.
- 3 ▪ Introduir l'elèctrode dins la mostra i agitar lleugerament.
- 4 ▪ Prémer la tecla pH.
- 5 ▪ Rentar l'elèctrode amb aigua destil·lada, abans de canviar de mostra.

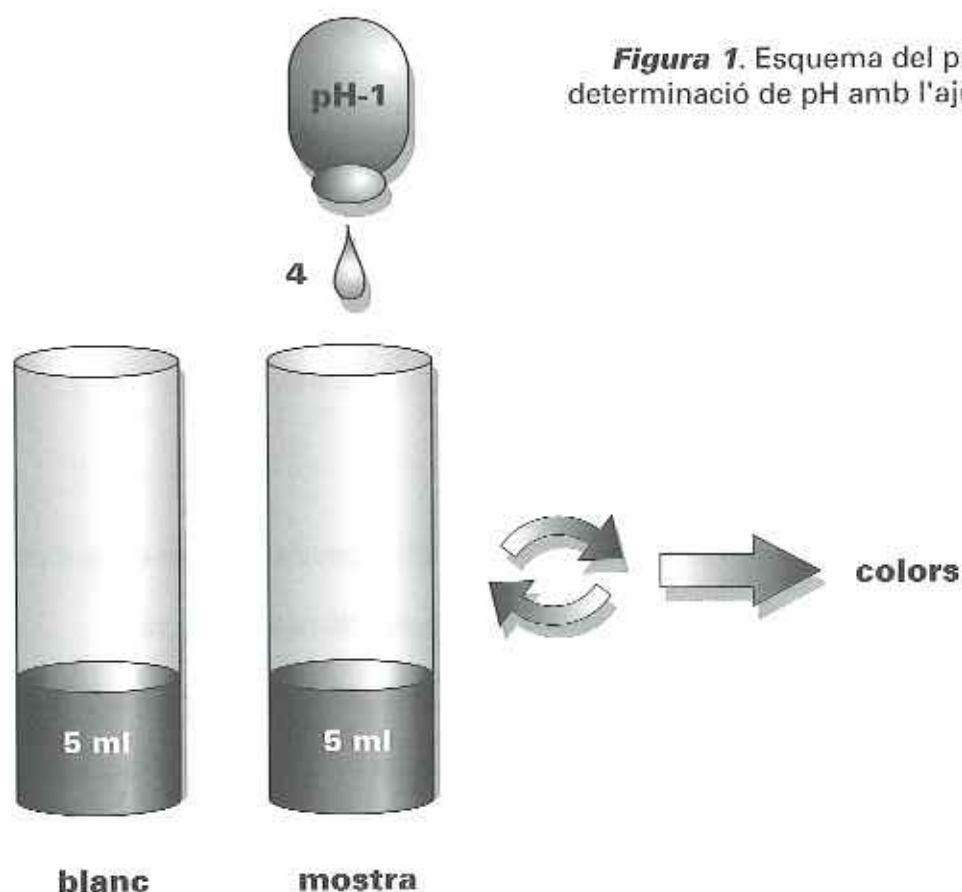
pH. Mesura del pH amb kit

Mostra de qualsevol aigua

Posa 5 ml de mostra a cada tub. Col·loca un dels dos tubs (s'anomena el blanc) a la posició de dalt (posició A) del suport i a l'altre afegeix:

- 4 gotes del reactiu pH-1, tanca el tub i agita'l

Col·loca el tub amb la mostra en la posició B (la de baix) del suport, desplaça'l longitudinalment i quan el dos tubs tinguin el mateix color fes la lectura del pH.



▪ **Pren** mostres d'aigua d'entrada i sortida i determina el valor del pH en les dues aigües. Hi ha diferències? Per què?

Conductivitat. Calibració del conductímetre

El conductímetre no necessita gairebé ésser calibrat. Tanmateix, si que requereix una bona precisió o de tant en tant es pot calibrar amb una dissolució patró de KCl 0,010 M. Aleshores, s'ha d'operar de la següent manera:

▪ Calibració del conductímetre

- 1 ▪ Omplir fins la meitat el pot de plàstic amb la dissolució patró de KCl 0,010 M.
- 2 ▪ Introduir la cèl·lula en la dissolució i agitar lleugerament.
- 3 ▪ Prémer la tecla que indica un flascó amb KCl i apareixerà a la pantalla el valor de conductivitat sense compensar l'efecte de la temperatura. El símbol de les unitats és llavors intermitent.
- 4 ▪ Prémer una altra vegada la mateixa tecla i l'aparell introdueix la dada de conductivitat específica a 20 °C. Les unitats ja no són intermitents.

Important:

- **No** tornis la porció de dissolució patró al flascó partida.

Manteniment:

- **Treu** la pila en períodes llargs que no s'utilitzi i canvia-la quan estigui esgotada.
- **Renta** la cèl·lula amb aigua destil·lada després de cada mesura.
- **Si** la cèl·lula està molt bruta es pot rentar amb detergent o un dissolvent.
- **La** cèl·lula es pot mantenir en aigua destil·lada o a l'aire en períodes de no ús.

Conductivitat. Mesura de la conductivitat

Encara que la conductivitat és la inversa de la resistència elèctrica de la dissolució, el conductímetre dóna les mesures en conductivitat específica, que és el paràmetre que habitualment s'utilitza per quantificar la conductivitat d'una dissolució. Les seves unitats són Siemen/cm, $\mu\text{S/cm}$ o mS/cm .

Els passos a seguir són:

- 1 ▪ Prémer la tecla i/o; l'instrument està preparat per a mesurar.
- 2 ▪ Submergir la cèl·lula dins la mostra, agitar i llegir directament.
- 3 ▪ Rentar la cèl·lula amb aigua destil·lada i deixar-la a l'aire.

▪ **Pren** mostres d'aigua destil·lada, de l'aixeta i d'entrada a la depuradora. Mesura la conductivitat segons el mètode descrit i comenta'n els resultats obtinguts. La mesura de la conductivitat és simple i directa.

Determinació de l'oxigen dissolt

L'oxímetre necessita un temps llarg d'escalfament, de manera que ha d'estar sempre en la posició d'espera o «stand by», stb, a l'aparell.

- 1 · Posa l'aparell en posició de mesura d' O_2 .
- 2 · Treu la funda de protecció de la sonda.
- 3 · Agita la sonda dins l'aigua.

▪ **Determina** l'oxigen dissolt en les mostres d'aigua de l'entrada i del reactor biològic. Has observat diferències? Quines implicacions creus que té això en el procés de depuració de l'aigua residual que es fa a l'EDAR de Lleida?

Nitrogen. Determinació analítica de nitrogen

Es faran les determinacions d'amoni (NH_4^+), nitrits (NO_2^-) i nitrats (NO_3^-) mitjançant un test colorimètric. Aquest mètode consisteix bàsicament a omplir dos tubs amb 5 ml de mostra a cadascun, en un d'ells no s'ha d'afegir res (es diu que fa de blanc). A l'altre tub es posen els reactius i després es mou conjuntament amb el blanc sobre una escala de colors fins que els dos tubs tinguin colors semblants. La lectura del resultat es fa sobre la mateixa escala de colors.

De vegades és necessari fer una dilució, perquè la concentració de la mostra no és dins del marge de mesura del test. En aquest cas la concentració obtinguda s'ha de multiplicar pel mateix factor de dilució.

Seguretat i higiene

Penseu que aquesta aigua està contaminada i per això podria donar lloc a malalties per contacte amb la pell o per ingestió. Per aquesta raó:

- **Poseu-vos** els guants de làtex abans de començar.
- **No** us toqueu els llavis amb les mans durant l'experiment.
- **Quan** hagueu acabat i ho hàgiu recollit tot, traieu-vos els guants i renteu-vos les mans.
- **A** casa, abans de dinar, torneu a rentar-vos les mans.
- **Cap** dels reactius necessita precaucions especials pel seu maneig llevat de dos: en la determinació del fosfat s'utilitza àcid sulfúric al 10% contingut al tub PO_4-1 i en la determinació de detergents, el flascó TA-4 conté cloroform. El maneig ha d'ésser sense por, però amb precaució i coneixent els seus efectes. Ambdós tenen una etiqueta taronja impresa al flascó.

El sulfúric és un àcid corrosiu que provoca cremades a la pell. Si algú es taqués, cal rentar-se amb aigua abundant.

El cloroform és un compost orgànic clorat. És nociu per inhalació, ingestió i per contacte amb la pell. Possibilitat d'efectes irreversibles. Si es treballa amb guants, en un lloc ventilat i després d'utilitzar-lo es tanca immediatament el flascó, no hi haurà cap perill.

Gestió dels residus

Tots els residus generats a les anàlisis són inofensius per al medi ambient. Per aquesta raó es poden llençar directament a les canalitzacions de la depuradora. Només la fase orgànica que es forma en la determinació de detergents s'ha de recollir separatament.

Nitrogen. Determinació d'amoni

Mostra C:

Abans de fer l'anàlisi has de fer una dilució 1 a 10. Agafa 2 ml de la mostra amb la xeringa, posa'ls al got i omple'l d'aigua destil·lada fins a 20 ml. Omple els 2 tubs amb 5 ml cadascun d'aquesta dilució. El líquid arribarà fins a la ratlla. Posa un dels tubs a la posició de dalt (A) del suport negre i a l'altre afegeix-hi:

- 12 gotes del reactiu NH_4^+ -1 i agita'l amb el tap ben roscat.
- 1 cullereta rasa del reactiu NH_4^+ -2. Agita  i espera  5 min.
- 4 gotes del reactiu NH_4^+ -3, agita  i espera  7 min.

Col·loca el tub a la posició (B) del suport i desplaça'l longitudinalment al llarg de l'escala. Quan el color dels dos tubs sigui igual, llegeix la concentració. Aquest resultat és el de la dilució; però com que la mostra d'aigua està 10 vegades més concentrada, multiplica el resultat per 10 per a saber el resultat final. Buida i renta els dos tubs.

Mostra A

Fes una dilució 1:3 amb 5 ml de la mostra A i afegeix-hi aigua destil·lada fins a arribar a 15 ml al got de plàstic. Omple les dos xeringues amb 5 ml de mostra ja diluïda. Repeteix les operacions d'abans i llegeix els resultats a la cartolina. Fes la correcció de la dilució multiplicant per 3. Buida i renta els tubs.

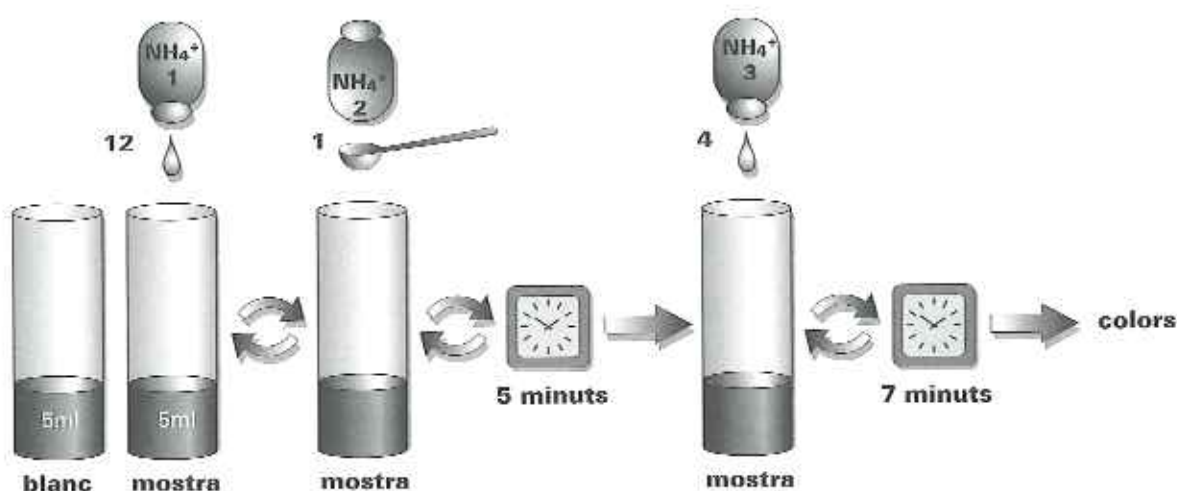


Figura 2. Esquema del procés de mesura de nitrogen amoniacal amb el kit.

Nitrogen. Determinació de nitrits

Mostra C

Fes una dilució 1:10 agafant 1 ml de mostra C i afegint 9 ml d'aigua destil·lada. Posa 5 ml d'aquesta dilució a cada tub. Posa el blanc al suport (posició A) i a l'altre afegeix-hi:

- 4 gotes del reactiu NO_2^- -1 al tub amb la mostra i agita
- 1 cullereta rasa del reactiu NO_2^- -2 i agita
- **Espera** 10 minuts i després col·loca el tub amb la mostra a la posició de baix (B) del suport i desplaça'l per la cartolina amb la mostra i el blanc fins que els colors d'ambdós tubs siguin iguals. Llegeix el resultat i corregeix el factor de dilució. Renta els tubs.

Mostra A

Fes una dilució 1:10 agafant 1 ml de mostra A i afegint-hi 9 ml d'aigua destil·lada. Posa 5 ml d'aquesta dilució a cada tub. Posa el blanc al suport (posició A) i a l'altre afegeix-hi:

- 4 gotes del reactiu NO_2^- -1 al tub amb la mostra i agita
- 1 cullereta rasa del reactiu NO_2^- -2 i agita
- **Espera** 10 minuts i després col·loca el tub amb la mostra en la posició lliure (B) del suport i desplaça'l per la cartolina amb la mostra i el blanc fins que els colors d'ambdós tubs siguin iguals. Llegeix el resultat i corregeix el factor de dilució multiplicant el resultat per 10. Renta els tubs.

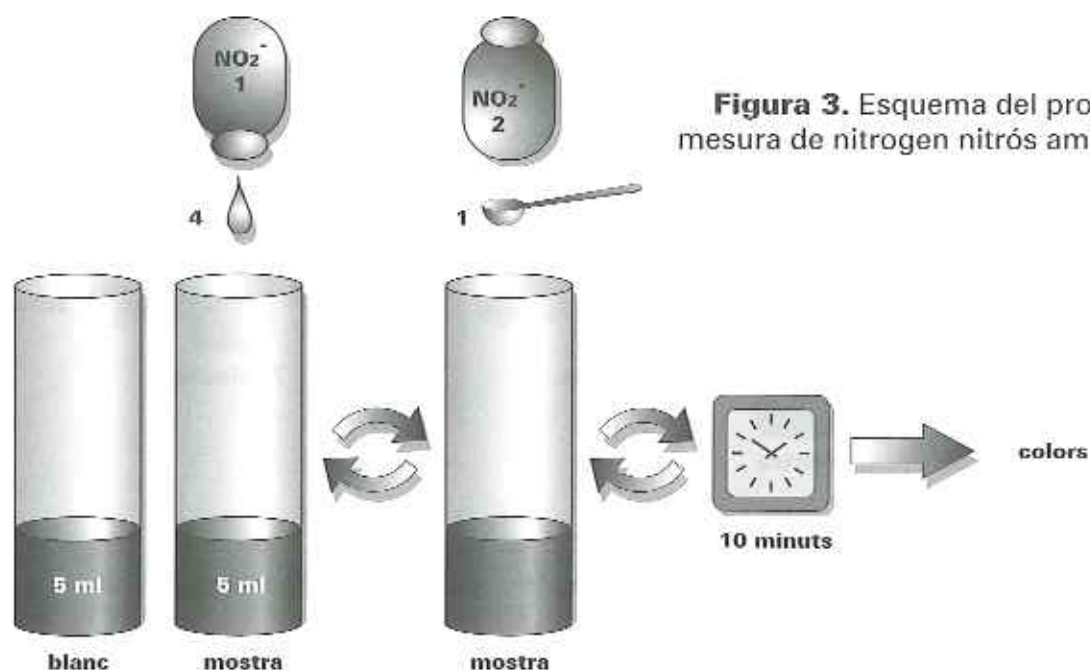


Figura 3. Esquema del procés de mesura de nitrogen nitrós amb el kit

Nitrogen. Determinació de nitrats

Mostra C

Posa directament 5 ml de la mostra C a cada tub. Posa un dels tubs al suport negre (part de dalt) i a l'altre afegeix-hi:

- 5 gotes del reactiu NO_3^-1 , agita
- Una cullera rasa del reactiu NO_3^-2 , agita, col·loca el tub al suport.
- **Espera** 5 minuts.

Desplaça el suport amb els dos tubs al llarg de la cartolina i quan es vegin del mateix color llegeix els resultats. Com que no s'ha fet cap dilució, no cal fer la correcció del resultat. Renta els tubs.

Mostra A

Posa 5 ml de mostra a cadascun dels tubs. Posa'n un a la posició A del suport (la de dalt) i a l'altre afegeix-hi:

- 5 gotes del reactiu NO_3^-1 , agita.
- Una cullera rasa del reactiu NO_3^-2 , agita, col·loca el tub al suport
- **Espera** 5 minuts.

Desplaça el suport amb els dos tubs al llarg de la cartolina i quan es vegin del mateix color llegeix els resultats. No cal fer cap correcció del resultat per dilució. Renta els tubs.

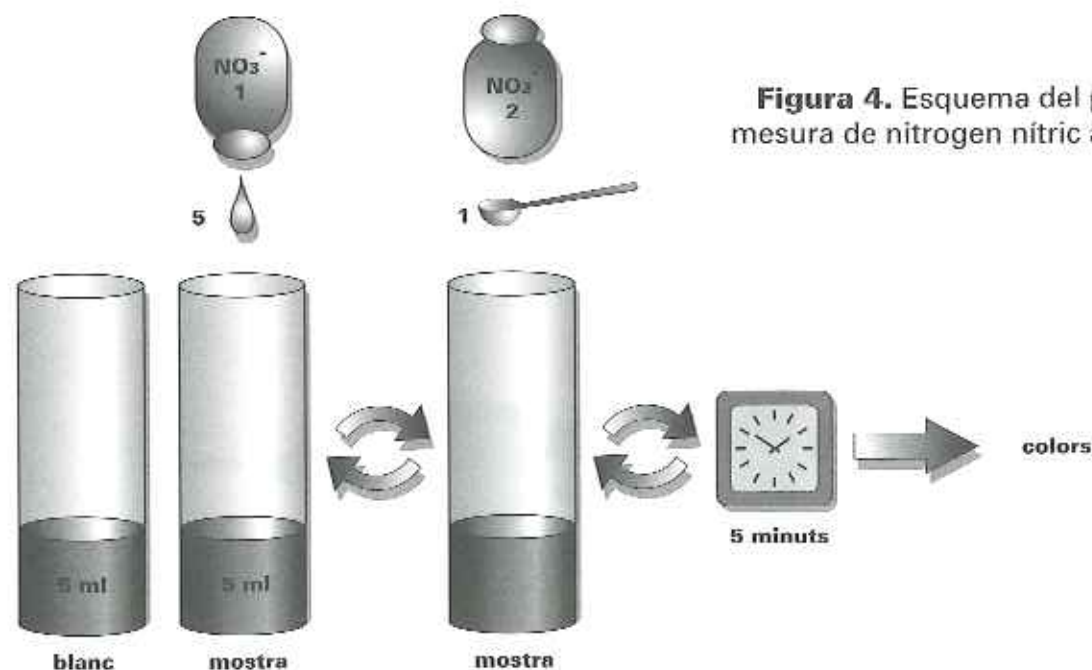


Figura 4. Esquema del procés de mesura de nitrogen nítric amb el kit

Fòsfor. Determinació de fosfats

Mostra C

Fes una dilució de la mostra C d' 1:2, pren 5 ml de la mostra C i afegeix 5 ml d'aigua destil·lada. Posa la meitat a cadascun dels tubs. Posa'n un a la posició A (la de dalt) del suport i a l'altre afegeix-hi:

- 6 gotes del reactiu $\text{PO}_4\text{-1}$, agita ,
- **Compte! El reactiu $\text{PO}_4\text{-1}$ és àcid sulfúric**
- 6 gotes del reactiu $\text{PO}_4\text{-2}$, agita ,
- **Espera**  10 minuts.

Col·loca el tub a la posició B del suport i desplaça'l per la cartolina. Quan els colors dels dos tubs siguin iguals llegeix el resultat a sobre. Fes la correcció corresponent a la dilució. Renta els tubs.

Mostra A

Fes una dilució igual que l'anterior amb 5 ml d'aigua destil·lada. Posa el blanc a la posició A del suport i a l'altre tub afegeix-hi:

- 6 gotes del reactiu $\text{PO}_4\text{-1}$, agita ,
- **Compte! El reactiu $\text{PO}_4\text{-1}$ és àcid sulfúric!**
- 6 gotes del reactiu $\text{PO}_4\text{-2}$, agita ,
- **Espera**  10 minuts i després

Col·loca el tub a la posició B del suport i desplaça'l per la cartolina. Quan els colors dels dos tubs siguin iguals llegeix el resultat a sobre. Fes la correcció corresponent a la dilució multiplicant el resultat per dos. Renta els tubs.

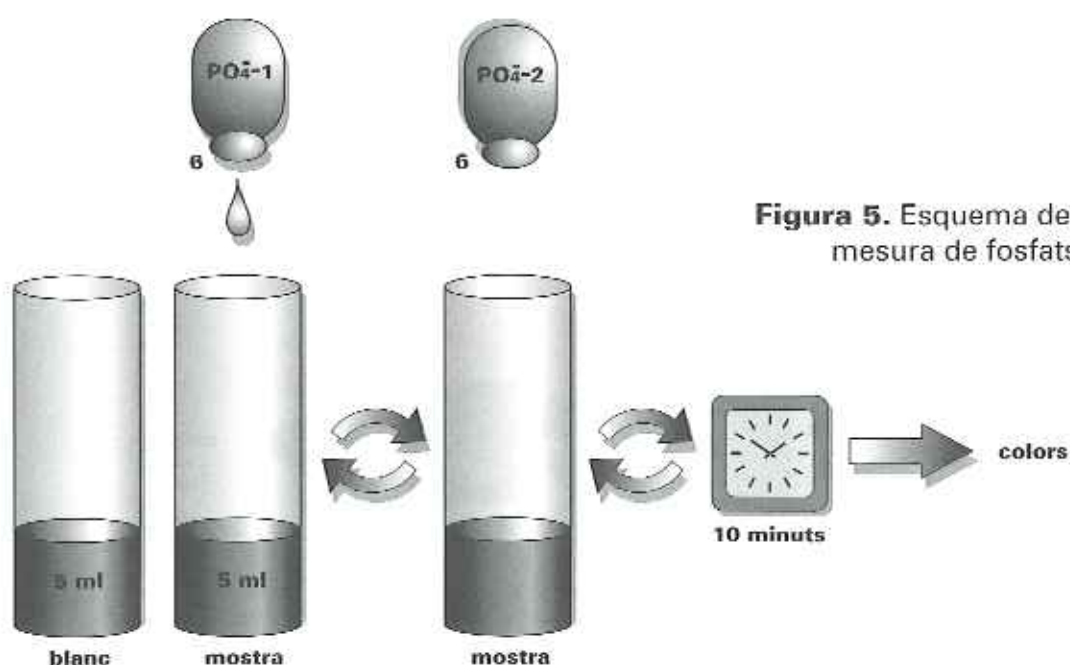


Figura 5. Esquema del procés de mesura de fosfats amb el kit

Detergents. Determinació analítica

Omple la cubeta amb 5 ml de la mostra i:

- **Afegeix** 10 gotes del reactiu TA-1, agita 
- **Afegeix** 4 gotes del reactiu TA-2, agita 
- **Amb** la pipeta de plàstic afegeix 2 ml del reactiu TA-4 (**Compte! és cloroform!**). Tanca el flascó.
- **Tapa** la cubeta i agita'l durant 30-40 segons prement el tap amb força. Espera  2 minuts fins que se separin dues fases. Treu la fase superior amb la xeringa i llença-la al pot de les deixalles.
- **Afegeix** 5 ml d'aigua destil·lada al líquid que resta a la cubeta, 4 gotes del reactiu TA-3 i barreja-ho suaument durant 30 segons.
- **Espera**  2 minuts fins que se separin dues fases i treu la superior amb la xeringa, després.

Compara el color amb la cubeta de referència, amb l'ajut de la cartolina blanca.

Activitats posteriors

Els principals indicadors del tractament de depuració

L'analítica que vàreu fer a l'EDAR no inclou alguns dels paràmetres més habituals en el treball d'un laboratori d'aigües residuals, com ara els sòlids en suspensió (SS), la demanda química d'oxigen (DQO), la demanda biològica d'oxigen (DBO). No hem fet aquestes anàlisis, perquè requereixen d'un procés llarg i d'una infraestructura més complexa. No obstant això, sí que podem analitzar alguns valors habituals d'aquests paràmetres a l'EDAR de Lleida.

El paràmetre SS mesura la quantitat de sòlids no dissolts presents en la mostra. S'expressa en mg/l.

La DBO és una mesura de la quantitat d'oxigen consumit pels microorganismes presents durant la degradació biològica de la matèria orgànica de la mostra en unes condicions prefixades. La DBO s'expressa en mg/l.

La DQO és una mesura de la quantitat d'oxigen consumit durant l'oxidació amb reactius químics (fortament oxidants) de la matèria orgànica de la mostra. La DQO s'expressa en mg/l.

En els dos paràmetres anteriors, la quantitat d'oxigen consumit està directament relacionada amb la quantitat de matèria orgànica present en la mostra.

	ENTRADA	SORTIDA
SS	170 mg/l	20 mg/l
DBO ₅	160 mg/l	20 mg/l

Taula 1. Valors mitjans dels paràmetres SS, DBO a l'entrada i sortida de la depuradora.

Un cop feta l'analítica «in situ» de l'aigua a l'entrada i a la sortida de l'EDAR, observa les dades de la taula1 i comenta les variacions que s'han produït en els diferents paràmetres analitzats. Interpreta aquestes variacions en funció del que sabeu sobre el procés de depuració de les aigües residuals.

Els canvis de la mostra un cop recollida

ATENCIÓ: L'aigua del reactor biològic conté multitud d'organismes, alguns dels quals poden ser patògens. Cal tenir molta cura en manipular l'aigua: utilitzeu sempre guants de làtex i desinfecteu, per exemple amb lleixiu, tot allò que hagi estat en contacte amb l'aigua (pipetes, portaobjectes i cobreobjectes, ampolles...)

En la vostra visita a l'EDAR heu tingut ocasió d'agafar una mostra d'aigua del reactor biològic per a continuar el seu estudi al laboratori de l'Institut.

L'aigua del reactor biològic es troba en unes condicions ambientals (biòtop) especials que han estat dissenyades per a facilitar l'acció depuradora dels organismes (biocenosi). Quan nosaltres separem una petita quantitat d'aquesta aigua per portar-la a l'Institut, estem alterant les condicions ambientals de la mostra.

Paràmetres biològics

La depuració de l'aigua residual a l'EDAR de Lleida és fonamentalment un procés biològic, tot i que també hi ha processos físics. La major part dels processos biològics tenen lloc al reactor biològic, que és un ecosistema complex en què multitud d'éssers vius col·laboren en l'eliminació dels contaminants que hem afegit a l'aigua.

L'aigua del reactor biològic és un caldo de cultiu excel·lent on proliferen una multitud d'organismes de grups taxonòmics diferents: bacteris, cianofícies, protozous, algues unicel·lulars, cenobials i filamentosos, fongs, a més d'alguns metazous com ara rotífers, nemàtodes i larves d'insectes.

1 ▪ Classifica els grups taxonòmics presents en el reactor biològic segons tinguin estructura cel·lular eucariota o procariota, segons siguin autòtrofes o heteròtrofes, segons siguin unicel·lulars, colonials o pluricel·lulars. Estableix un sistema d'agrupació segons les seves similituds i cerca informació suplementària que t'ajudi a diferenciar els grups d'iguals característiques.

2 ▪ Quins factors ambientals creus que canviaran des del moment en què agafem la mostra? Com seran aquests canvis? Poden afectar els canvis a la biocenosi?

Els canvis progressius que experimentarà el biòtop de la nostra mostra d'aigua, respecte del biòtop del reactor biològic produiran canvis progressius en el tipus i freqüència dels organismes vius que hi són presents (biocenosi). Aquesta variació progressiva de la biocenosi d'un ecosistema per adaptar-se a les noves condicions ambientals s'anomena, en ecologia, successió ecològica.

Per tot això, cal que observem la mostra d'aigua del reactor biològic el més aviat possible, si volem que les nostres observacions ens permetin copsar de la millor manera possible la biocenosi del reactor biològic. No obstant això, si anem fent observacions sistemàtiques durant les setmanes següents, obtindrem informació sobre la successió ecològica que es desenvoluparà a l'ampolla on tenim la mostra.

	Pro/ Eucariotes	Uni/ Pluricel·lulars	Auto/ Heteròtrofes	Altres característiques
Bacteris				
Cianofícies				
Protozoous				
Algues				
Fongs				
Rotífers				
Nemàtodes				
Larves				

L'estudi dels components de la biocenosi del reactor biològic es pot afrontar de formes molt diferents:

- **Podem** estudiar l'estructura dels flocs, que com ja hem vist és on té lloc la major part de l'activitat biològica.

- **Podem** centrar el nostre estudi en els bacteris que formen part de la biocenosi d'aquest ecosistema. Això requereix posar en pràctica moltes de les tècniques que són habituals en microbiologia. Així, ens podem proposar determinar quantitativament la població de bacteris presents en el reactor, o bé ens podem proposar aïllar alguna de les espècies presents en la població mixta per estudiar-ne algunes de les característiques: morfologia de la colònia, morfologia del bacteri... Però per a fer tot això caldrà posar en pràctica altres tècniques microbiològiques més bàsiques: preparació de medis i reactius, esterilització de material i medis.

- **Podem** fer un inventari de les espècies d'eucariotes presents a l'aigua del reactor biològic tot observant-ne la morfologia, estructura interna, forma de moviment, hàbits... en una mena de safari no violent pel microcosmos d'una gota d'aigua.

3 ■ Siheu fet l'observació de la mostra d'aigua durant algunes setmanes, segurament haureu observat l'aparició d'alguna espècie que no havíeu pogut observar durant els primers dies. Com podem explicar aquest fet? Eren presents a la mostra original? Han aparegut de sobte?

En general, l'aigua que prové del reactor biològic presenta una concentració d'organismes vius prou elevada perquè no ens calgui preocupar d'aplicar tècniques de concentració de la mostra. No obstant això, si ho volem fer, podem: o bé centrifugar una mica d'aigua i eliminar el sobrenadant per a observar a continuació el sediment o bé deixar sedimentar els flocs i agafar aigua del fons. Aquest últim sistema produeix una concentració de la mostra més selectiva que el primer sistema.

Els millors resultats els obtindrem si agafem una mica d'aigua de la zona més rica en flòculs, tot i que agafar-la d'altres zones ens permetrà observar la biocenosi de zones on el biòtop és diferent.

Observació de l'aigua del reactor biològic

Procediment

- I** • **Posa** una gota d'aigua del reactor biològic sobre un portaobjecte net i desengreixat.
- II** • **Cobreix** la gota amb un cobreobjectes
- III** • **Observa** la preparació amb augments progressius fins a arribar a l'objectiu d'immersió (recorda que per a aquest objectiu cal afegir una gota d'oli d'immersió).
- IV** • **Dibuixa** amb el màxim de detall possible les diferents espècies que has observat. Observa en quina posició les has vist respecte dels flocs.
- V** • **Intenta** determinar el gènere al qual pertany cada una de les espècies observades (per fer-ho pots utilitzar la guia d'identificació de microorganismes o bé qualsevol altre llibre que puguis trobar a la biblioteca)

Dibuix	Descripció

Activitat 2.3 (2)

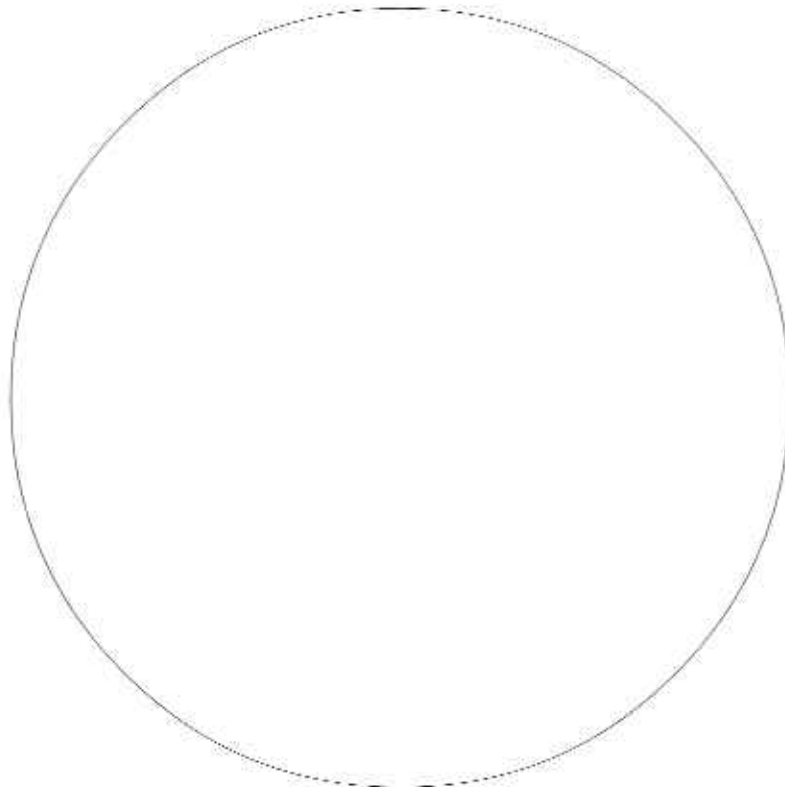
Dibuix	Descripció

Activitat 2.4

Observació de l'estructura dels flocs

Procediment

- I • **Mescla** sobre un portaobjectes net una gota d'aigua del reactor biològic amb una gota de tinta xinesa negra (si la preparació surt excessivament tintada, podeu reduir-ne la quantitat).
- II • **Col·loca** un cobreobjectes
- III • **Observa** la preparació a 100 augments (p.e.10x10). Fixa't especialment en quin percentatge dels flocs pots observar sense tenyir (part formada per polímers extracel·lulars secretats pels bacteris) i quin percentatge roman acolorit.
- IV • **Dibuixa** les formes i proporcions que has observat en els flocs.



Observació de bacteris al microscopi

▪ **Els** organismes procariotes (bacteris i cianofícies) són tan petits que resulten difícils d'observar fins i tot amb un bon microscopi. Si heu fet observacions de l'aigua del reactor biològic «in vivo» segurament heu observat que en utilitzar els objectius de més augments (x40, x100) apareixien una mena d'ombres poc definides, moltes vegades mòbils, que us ha estat impossible identificar. Les dimensions d'aquestes ombres eren notablement inferiors a les dels altres organismes que havíem observat (eucariotes); són amb tota seguretat bacteris.

Tot i que l'observació dels bacteris en aquestes condicions ja ens dona alguna informació (forma, mobilitat, presència d'associacions, mida relativa...) podem desitjar augmentar el contrast de la cèl·lula per tal de millorar-ne l'observació. Per fer això hem de recórrer al tenyiment de les cèl·lules.

Existeixen molts tipus de tenyiments diferents que es poden aplicar en aquestes situacions: tenyiments simples (amb un sol colorant), tenyiments compostos (amb més d'un colorant), etc. Si ho desitgeu podreu trobar informació en algun manual de tècniques histològiques o de microscòpia.

Nosaltres us proposarem dues alternatives que són o bé les més fàcils o bé les més habituals en l'estudi de la morfologia dels bacteris. Aquestes tècniques són:

Tècnica 1

1 • Tenyiment de blau de metilè

El blau de metilè és un colorant àcid que penetra fàcilment la membrana citoplasmàtica de les cèl·lules (especialment si estan mortes) i reacciona químicament amb el citoplasma acolorint tot l'interior de la cèl·lula.

Procediment:

- **Agafa** amb una pipeta o un comptagotes una mica de l'aigua que vols observar i diposita-la sobre un portaobjectes net.
- **Escampa** la gota sobre el portaobjecte amb l'ajut d'una agulla emmanegada o d'una nansa de Kolle, de forma que el líquid es reparteixi el més uniformement possible sobre el vidre.
- **Escalfa** suaument el portaobjectes sobre la flama d'un bec d'alcohol o de gas fins que l'aigua s'hagi evaporat totalment (amb això aconseguirem matar els bacteris i enganxar-los al vidre; això s'anomena fixació).
- **Diposita** sobre el portaobjectes unes gotes de solució colorant de blau de metilè i deixa'l actuar uns 3 minuts.
- **Passat** aquest temps renta suaument sota l'aixeta l'excés de colorant fins que vegis que l'aigua surt neta. Deixa assecar la preparació i observa-la al microscopi sense tapar-la amb el cobreobjectes. Per a fer una bona observació caldrà treballar amb l'objectiu d'immersió (x100).

Tècnica 2

2 • Tenyiment de Gram

El tenyiment de Gram és un tipus de tenyiment diferencial que és utilitzat abastament entre els microbiòlegs per tal de diferenciar els bacteris que es tenyeixen (Gram +) dels que no ho fan (Gram -). Aquest fet és un caràcter taxonòmic molt important.

Procediment:

- **Agafa** amb una pipeta o un comptagotes una mica de l'aigua que vols observar i diposita-la sobre un portaobjectes net.
- **Escampa** la gota sobre el portaobjectes amb l'ajut d'una agulla emmanegada o d'una nansa de Kolle, de forma que el líquid es reparteixi el més uniformement possible sobre el vidre.
- **Escalfa** suaument el portaobjectes sobre la flama d'un bec d'alcohol o de gas fins que l'aigua s'hagi evaporat totalment (amb això aconseguirem matar els bacteris i enganxar-los al vidre; això s'anomena fixació).
- **Diposita** sobre el portaobjectes unes gotes de solució colorant cristall de violeta i deixa'l actuar 1 minut.
- **Decanta** el colorant que resta i afegeix unes gotes de Lugol (solució de iode-iodur potàssic); deixa'l actuar 2 minuts.
- **Passat** aquest temps renta suaument sota l'aixeta l'excés de Lugol fins que vegis que l'aigua surt neta.
- **Cobreix** el portaobjectes amb unes gotes de solució colorant de safranina i deixa-la actuar 1 minut.
- **Passat** aquest temps renta suaument sota l'aixeta l'excés de safranina fins que vegis que l'aigua surt neta.
- **Deixa** assecar la preparació i observa-la al microscopi sense tapar-la amb el cobreobjectes. Per a fer una bona observació caldrà treballar amb l'objectiu d'immersió (x100).

▪ **Fes** preparacions tenyides amb blau de metilè i amb el tenyiment de Gram de la mostra d'aigua del reactor biològic. Pots fer el mateix amb les colònies que han sortit al laminocultiu (aquesta font de bacteris és millor ja que està molt més enriquida en bacteris que no pas l'aigua del reactor). Observa les diferències entre els dos tenyiments i comenta'ls.

Preparació de medis de cultiu

Al principi de la microbiologia, els medis de cultiu es preparaven a partir de brous diversos (de carn, de patata...) solidificats o no amb l'ajut d'agar. Aquests medis de cultiu resultaven molt heterogenis i poc reproduïbles, per la qual cosa es van anar substituint, quan això ha estat possible, per medis de composició més definida (sals diverses, vitamines, hidrats de carboni, extractes diversos, etc. en proporcions ben definides). Aquests medis es poden preparar bé a partir dels seus components mesurant-los un a un o bé a partir de medis

deshidratats fabricats de forma industrial als quals tan sols cal afegir l'aigua i dissoldre (brous) o fondre (agars).

Si utilitzem un medi deshidratat preparat de forma industrial, cal seguir les instruccions de preparació que apareixen en els pots en què presenten el seu medi, o bé en els catàlegs dels seus productes. No obstant això, donarem a continuació unes normes generals de preparació que podem seguir en tots els casos, excepte quan el fabricant del medi indiqui el contrari.

1. Calculeu la quantitat de medi deshidratat necessari per a preparar el volum de medi desitjat.

2. Peseu el medi deshidratat que necessitem sense contaminar el pot (no retorneu producte al pot i utilitzeu estris nets per fer l'extracció)

3. Introduïu el medi deshidratat en un recipient adient (erlenmeyer o ampolla) en què posteriorment introduïrem el volum d'aigua desionitzada necessària tot i mullant les parets interiors del recipient per arrossegar el medi deshidratat que hi pugui haver quedat adherit.

4a. Si es tracta d'un medi líquid (caldo), agitarem el recipient fins a la total dissolució i després repartirem el medi en tubs que posteriorment esterilitzarem a l'autoclau.

4b. Si es tracta d'un medi sòlid (agar), agitarem suaument i després deixarem que el medi s'hidrati en repòs uns 15 minuts. Finalment escalfarem el medi fins fondre'l totalment (el medi adquireix transparència) i el dispensarem en tubs per ésser introduïts a l'autoclau o bé l'esterilitzarem i el repartirem en plaques de Petri estèrils.

Activitat 2.6 (2)

1 - Preparació d'una solució isotònica per a fer dilucions

Les solucions isotòniques són utilitzades freqüentment en microbiologia quan s'ha de posar en contacte els bacteris amb un medi que no en permeti el creixement (exempt de nutrients) però que tampoc alteri la viabilitat dels microorganismes (provoqui xocs osmòtics). Existeixen moltes formulacions diferents de solucions isotòniques: solució Ringer^{1/4}, Aigua de peptona, Aigua de peptona tamponada... De totes aquestes, la primera, la solució Ringer^{1/4} és la més utilitzada tradicionalment.

Formulació:

La solució Ringer és una mescla de sals inorgàniques que donen lloc a un medi isotònic amb el del citoplasma dels microorganismes. Té la següent formulació:

La solució Ringer es presenta en dues formes: la forma concentrada i la forma diluïda.

Solució Ringer concentrada:

Clorur sòdic (NaCl)	9 g/l
Clorur potàssic (KCl)	0,42 g/l
Clorur càlcic (CaCl ₂)	0,48 g/l
Bicarbonat sòdic (NaHCO ₃)	0,20 g/l

Habitualment la solució Ringer es manté preparada d'aquesta forma, però s'utilitza en una dilució 3:1 (solució Ringer^{1/4})

Preparació

- **Posa** una mica d'aigua destil·lada en un vas de precipitats.
- **Pesa** una a una les sals de la formulació anterior i afegeix-les al vas de precipitats que agitarem fins a la total dissolució.
- **Passa** el contingut del vas de precipitats a una proveta i afegeix aigua destil·lada fins a obtenir un litre. D'aquesta manera hem obtingut una solució Ringer concentrada.
- **Si** volem obtenir la solució Ringer^{1/4} caldrà agafar una part de solució concentrada i diluir-la amb tres parts d'aigua destil·lada.

2 - Dilucions successives de la mostra original

Objectiu

En microbiologia és molt freqüent que una mostra, de la qual volem saber quants bacteris/ml té, doni en sembrar 1 ml en una placa de Petri amb medi PCA un nombre de colònies tal que sigui impossible de comptar-les (>300). En aquests casos, per poder efectuar un recompte inferior a 300 colònies/ml cal procedir a diluir la mostra problema en una solució isotònica estèril per evitar la mort dels bacteris per lisi.

Procediment

El procediment que se segueix habitualment és el següent:

- 1 • A** partir del cultiu problema transfereix 1 ml a un tub d'assaig estèril en què prèviament, has dipositat de forma asèptica 9 ml d'una solució isotònica estèril (solució Ringer^{1/4} aigua de peptona, Aigua de peptona tamponada, etc.).
- 2 • Agita** el tub per tal d'homogeneïtzar l'inòcul amb el diluent.
- 3 • Repeteix** els passos 1 i 2 amb un segon tub, prenent en aquest cas l'inòcul del tub anterior.
- 4 • Repeteix** el pas 3 tantes vegades com dilucions diferents desitgis fer.

3 · Sembra per inclusió

Objectiu

L'objectiu d'aquesta tècnica és repartir uniformement els m.o. presents en un volum conegut de mostra per tota la massa del medi de cultiu, de forma que el creixement posterior de les colònies a partir de cada un dels m.o. viables permeti fer-ne el recompte (que expressarem com a unitats formadores de colònies per ml: u.f.c./ml).

Procediment

1 • Fon en un bany a 100 °C tants tubs amb PCA com plaques tinguis intenció de preparar. Un cop fos totalment l'agar, passa'l a un bany a 47° C fins a estabilitzar la temperatura de l'agar.

2 • Diposita 1cc de cada dilució preparada en una placa de Petri, retola'ls adequadament (si vols obtenir resultats més significatius, ho pots fer per duplicat).

3 • Afegeix a cada una de les plaques de Petri el contingut d'un tub amb medi PCA temperat a uns 47 °C i homogenitza la mostra amb el medi mitjançant la combinació de moviments suaus de la placa en sentit rotatori i en direccions perpendiculars.

4 • Deixa solidificar l'agar i introdueix les plaques cap per avall a l'estufa d'incubació regulada a 36°C durant 48 h.

5 • Compta el nombre de colònies visibles al final del període d'incubació en cada una de les plaques (si has fet una sèrie de dilucions de la mostra original, desprecia els recomptes inferiors a 30 i superiors a 300, calcula el nombre de ufc/ml en la mostra original multiplicant el nombre de colònies pel factor de dilució de la placa que serà 10^n , on n és el nombre d'ordre del tub dins la sèrie de dilucions començant per la mostra original ($n=0$). Si has obtingut més d'un valor vàlid, pots expressar el resultat final com el valor mitjà de tots els valors acceptables).

En aquesta tècnica cal controlar adequadament la temperatura del medi de cultiu (per evitar matar els m.o. si l'agar és massa calent) i no trigar gaire a homogenitzar la mostra amb el cultiu (per evitar que es produeixi la solidificació de l'agar mentre estem fent la sembra).

Recompte de microorganismes aerobis mesòfils viables totals

1. Tècnica tradicional per inclusió

Objectiu

Determinar el nombre de microorganismes presents en l'aigua del reactor biològic mitjançant la tècnica tradicional. Donades les condicions del cultiu, tan sols farem recompte dels microorganismes aerobis (estrictes o facultatius), viables (en condicions de créixer) i mesòfils (que creixen bé a temperatures moderades).

L'estudi quantitatiu, de la població de bacteris presents en l'aigua del reactor biològic, requereix fer sèmbres de dilucions successives de l'aigua problema, en un medi nutritiu no específic i la posterior incubació a la temperatura adient.

Procediment

1 • A partir de l'aigua problema que vàreu recollir a l'EDAR, cada grup realitzarà una sèrie de dilucions decimals (fins a la dilució 10^7) segons el procediment habitual.

2 • Feu una sembra per inclusió en medi PCA per a cada una de les dilucions (incloent-hi la mostra). Incubeu les plaques a 36°C durant 48 h, passades les quals realitzareu el recompte.

3 • Expressau el resultat com a unitats formadores de colònies/ml (u.f.c./ml) fent la mitjana, si és possible, dels resultats de dues dilucions consecutives.

Activitat 2.7 (2)

2. Tècnica amb laminocultiu

Objectiu

Els laminocultius són un sistema d'obtenció i cultiu de mostres presumptament contaminades que permet realitzar tot el procés de recompte de bacteris i/o fongs d'una forma simple i amb molt poc ús de laboratori i instal·lacions.

El sistema consisteix en una làmina de plàstic coberta per les dues cares per dues capes de medi de cultiu (poden ser iguals o diferents). Aquesta làmina es tanca dins d'un recipient tubular de plàstic que en facilita el transport tot mantenint l'esterilitat i actua alhora com a cambra d'incubació.

Segons quina sigui la naturalesa del medi de cultiu del que disposa el laminocultiu podrem fer recomptes d'una o altra espècie bacteriana (o fins i tot de dues alhora si la làmina ve preparada amb dos medis diferents)

Procediment

- **Agafa**, de forma asèptica, una mostra d'aigua del reactor biològic.
- **Treu** el laminocultiu del tub de transport tot descargolant el tap.
- **Sense** tocar la superfície del medi amb les mans, submergeix tota la part del laminocultiu on es troba el medi de cultiu en l'aigua del reactor biològic durant 3 segons.
- **Treu** el laminocultiu de l'aigua, deixa'l escórrer uns segons i torna'l a posar dins del tub de transport. Enrosca el tap sense tancar-lo del tot.
- **Porta** el tub amb el laminocultiu a l'Institut, on l'incubareu durant 24-48 h a 37°C (si no disposeu d'estufa d'incubació, podeu deixar el laminocultiu en un lloc que tingui una temperatura el més semblant possible). Si no podeu aconseguir temperatures majors de 20-25 graus, aleshores podeu fer la lectura dels resultats a les 48-72 h, tot i que heu de tenir en compte que els tipus de microorganismes que creixeran en aquestes condicions vénen influenciats per la temperatura de cultiu.
- **Compara** el nombre de colònies que s'observen sobre el laminocultiu amb la carta d'interpretació de resultats.

NOTA: Si en lloc d'utilitzar un laminocultiu preparat amb medi PCA (agar de recompte en placa), utilitzem medis selectius per a coliforms i *Enterobacteriaceae* aleshores el recompte que obtindrem serà més específic i limitat a aquest grup de bacteris.

Carta d'interpretació de resultats

Els resultats obtinguts per diferents mètodes d'inoculació de diferents productes o materials no han de ser comparats entre si.

Tanmateix, poden comparar-se assajos realitzats per la mateixa tècnica en el mateix tipus de material i obtenir resultats quantitatius.

La làmina Hygicult E/β - GUR està recoberta, per un costat amb agar VRB modificat contenint glucosa i lactosa. Aquest medi està concebut per a la detecció de bacteris pertanyents a la família *Enterobacteriaceae*.

La presència d'aquests bacteris en aliments cuinats és un indicador de la mala manipulació i condicions higièniques inadequades. Aquests bacteris creixen sobre el medi Hygicult E/β - GUR donant colònies vermelles.

El creixement d'organismes gram-positius queda inhibit, l'altra cara de la làmina està recoberta amb medi incolor β - glucuronidasa. Aquest medi detecta l'activitat de l'enzim β - glucuronidasa que és específica per a un 90% d'*E.coli* aproximadament. L'enzim és produït també per algunes espècies d'*Edwardsiella*, *Salmonella*, *Shigella* i *Yersinia*.

Els organismes β - glucuronidasa positius creixen en aquest medi donant colònies marrons de diversos tons. La coloració pot ésser feble en algunes soques a altes concentracions de 10^6 - 10^7 ufc/ml, pel que qualsevol índex de coloració marró indica creixements β- glucuronidasa positius.

Els organismes β - glucuronidasa negatius, gram-negatius creixen en aquest medi donant colònies incolores. Els organismes gram-positius queden inhibits.

Per estimar el grau de contaminació es poden utilitzar els següents límits:

	contacte	immersió/hisop
net	0 colònies / cara	$<10^3$ ufc / ml
contaminat	1-10 colònies / cara	10^3 ufc / ml
molt contaminat	>10 colònies / cara	$>10^3$ ufc / ml

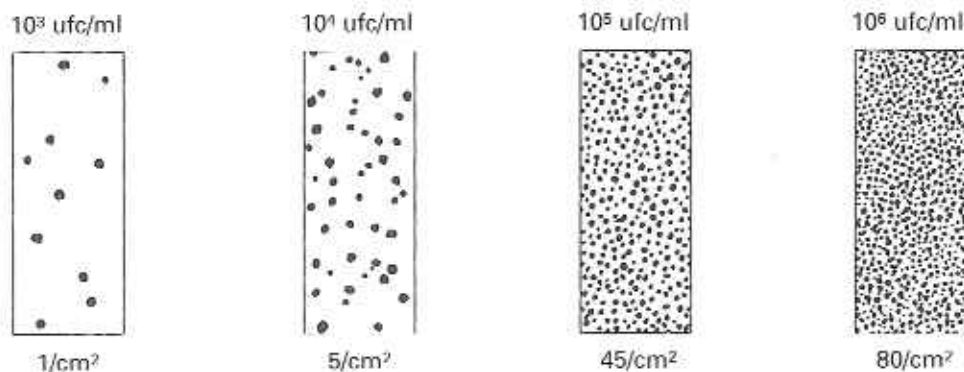


Figura 6. Patró d'interpretació dels resultats del laminocultiu

Preparació de mostres de plàncton per a la seva observació microscòpica

L'aigua del reactor biològic és un caldo de cultiu excel·lent on proliferen multitud d'organismes de grups taxonòmics diferents: bacteris, cianofícies, protozous i algues unicel·lulars, cenobials i filamentoses, a més d'alguns metazous, nemàtodes i larves d'insectes.

La densitat d'aquesta biocenosi és prou gran perquè no ens calgui aplicar tècniques de concentració (centrifugació de la mostra i decantació del sobrenedant).

La forma de fer les observacions microscòpiques dependrà de quin sigui el nostre objectiu. Si volem observar la morfologia dels organismes sense cap alteració deguda a la fixació de la mostra, hem de recórrer a observacions en viu de

la mostra sense acolorir (en aquest cas pot resultar difícil diferenciar les cèl·lules del medi extern) o acolorida amb un colorant vital (per exemple blau de metilè al 0.1%). Aquest tipus d'observació "in vivo" ens permet apreciar el moviment, però té l'inconvenient que cal observar la mostra el més aviat possible per tal d'evitar els canvis que succeeixen en les poblacions a causa de la variació de les condicions ambientals del medi produïdes al separar la mostra d'aigua del reactor biològic i conservar-la en unes condicions diferents.

Si no volem observar la mostra tot seguit o bé no ens interessa veure el moviment podem recórrer a fixar la mostra amb, per exemple, formol.

Bibliografia

Apha-awawa-wpcf. *Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales.* Ed. Díaz de Santos (1992).

Bellmann et al. *Invertebrados y organismos unicelulares.* Ed. Blume (1994).

Berk, S.G., Gunderson, J.H. *Wastewater organisms a color atlas.* Ed. Lewis Publishers (1993).

Degrémont. *Water Treatment Handbook.* (vol 1 i 2), 6a edició (1991).

Enciclopèdia Catalana. *Història Natural dels Països Catalans V 4. Plantes inferiors.* Ed. Enciclopèdia Catalana (1985).

Enciclopèdia Catalana. *Història Natural dels Països Catalans V 8. Invertebrats no Artròpodes.* Ed. Enciclopèdia Catalana (1991).

Jenkisn, D., Richard, M.G., Daigger, G.T. *Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming.* Ed. Lewis Publishers Inc (1993)

Needham J.G., Needham P.R. *Guía para el estudio de los seres vivos de las aguas dulces.* Ed. Reverté. Barcelona (1978).

Universidad de Murcia. *Ecología de aguas continentales. Prácticas de Limnología (I)* Ed Universidad de Murcia (1994).

Sear. *Microscopía de la Depuración.* Ed Sear

Stanier, Y. et ali. *Microbiología* Ed. Reverté (1992).

Streble, H., Krauter D. *Atlas de los microorganismos de agua dulce.* Ed. Omeg (1985).

Tebbutt T.H.Y. *Fundamentos de control de la calidad del agua.* Ed. Limusa (1990).

Winkler M.A. *Tratamiento de aguas de desecho.* Ed. Limusa (1993).

Integral núm. 161, pg 57. *Los detergentes*

El mundo científico núm. 52 nov. 1985. *Contaminación por nitratos.*

El mundo científico núm. 104 vol 10 pg 790. *Contaminación por fosfatos.*

LA PAERIA



Ajuntament de Lleida
**Regidoria de Sostenibilitat i
Medi Ambient**



PAPER ECOLÒGIC
T.C.F.
100% lliure de clor