



## Les columnes de Winogradsky del bassal del *Pati de les tortugues*



**Treball de recerca**  
Pep Atencia San Miguel  
Tutors: Josep Mari Torres /  
Jordi Urmeneta Maso  
Novembre de 2013



## ÍNDEX

Pròleg i objectius.....	03
1. Introducció.....	05
1.1. El basal del pati de les tortugues com a ecosistema.....	05
1.2. Cicles biogeoquímics y nivells tròfics.....	06
1.3. Les columnes de Winogradsky.....	08
1.3.1. Descobriment de la quimilitotrofia.....	09
1.3.2. Ecosistema i cicle de la matèria a les columnes de Winogradsky.....	09
2. Muntatge i seguiment de les columnes de Winogradsky.....	12
2.1. Metodologia.....	12
2.1.1. Extracció i concentració del substrat.....	12
2.1.2. Muntatge i tractaments.....	13
2.1.3. Observació i captura fotogràfica.....	15
2.2. Resultats i discussió.....	16
2.2.1. Seguiment per setmanes.....	16
3. Observació dels biofilms de les columnes.....	23
3.1. Extracció de les mostres.....	23
3.2. Observació microscòpica.....	24
3.2.1. Metodologia.....	24
3.2.2. Resultats i discussió.....	24
4. Identificació dels bacteris.....	29
4.1. Aïllament per cultiu.....	29
4.1.1. Metodologia.....	29
4.1.2. Resultats i discussió.....	31
4.2. Tinció de gram.....	32
4.2.1. Metodologia.....	32
4.2.2. Resultats i discussió.....	33
4.3. Seqüenciació del 16S DNAr.....	34
4.3.1. Metodologia.....	35
4.3.2. Resultats i discussió.....	37
4.4. Identificació genètica.....	37
4.4.1. Metodologia.....	38
4.4.2. Resultats i discussió.....	39
5. Conclusions.....	42
6. Bibliografia.....	43
<b>Annex 1</b> Seqüències DNA dels bacteris identificats.....	45
<b>Annex 2</b> Document fotocronològic.....	49



## Pròleg i objectius

Aquest treball de recerca és el primer que es fa a la nostra escola relacionat directament amb l'ecologia microbiana i les columnes de Winogradsky, àmbit que estudia el funcionament dels ecosistemes formats per els organismes microscòpics en un espai molt reduït, representant així un punt de partida per a treballs de recerca futurs.

Vaig escollir fer aquest treball perquè la biologia és una de les meves matèries preferides i sempre m'ha interessat assolir nou coneixement. A més, una qualitat que té l'ecologia és que és un àmbit que engloba altres branques de la biologia, i en aquest treball es centra en la microbiologia, des d'un punt de vista bioquímic, microscòpic i de la genètica molecular. El meu interès en aquests àmbits es va incrementar força amb unes activitats pràctiques realitzades a 4t d'ESO que es van portar a terme al laboratori de Bioquímica de la Facultat de Biologia de la UB en el programa "Endinsa't en la Bioquímica" i també, en aquest mateix any, vaig tenir el primer contacte amb les columnes de Winogradsky en una sortida de biologia al Cosmocaixa de Barcelona.

La idea de fer aquest treball va sorgir de la proposta d'un exalumne de l'escola, l'Eudald Pascual, ara ja biòleg, i em va semblar una bona oportunitat per poder entendre com funciona el món científic d'avui dia i endinsar-me en la metodologia científica. Això també m'ha permès entrar a formar part del projecte del *Pati de les tortugues*, font d'altres treballs de recerca, ja que el bassal que es troba en aquest ha estat la base per iniciar el nostre projecte experimental de fabricar les columnes de Winogradsky.

Amb aquest treball de recerca es pretén fabricar les nostres pròpies columnes de Winogradsky i assolir la màxima diversitat d'estrats de colors, o biofilms, que formen els diferents organismes que habiten en el bassal del pati de les tortugues.

Més endavant, hem optat per endinsar-nos més en la matèria i aconseguir arribar al punt de poder identificar espècies de microorganismes que habiten en aquestes columnes de Winogradsky i, d'aquesta manera, poder conèixer i explicar el flux de treball que té lloc per a la identificació d'un microorganisme bacterià. Així doncs, la nostra part experimental consta de dues parts, la fabricació i seguiment d'unes columnes de Winogradsky d'una banda, i fer tot el procés necessari per a poder identificar els microorganismes bacterians de l'altre. La part experimental d'aquest treball de recerca no hauria pogut ser possible sense l'ajut del Dr. Jordi Urmeneta, professor d'Ecologia Microbiana del Departament de Microbiologia de la Facultat de Biologia de la UB i qui, precisament, va fer les columnes de Winogradsky al Cosmocaixa de Barcelona abans esmentades. Ell ens va aconsellar sobre la forma més òptima de muntar les columnes i com distribuir-les i ens va proporcionar els medis i l'ajut necessari per poder dur a terme la identificació dels microorganismes bacterians.

Abans de començar a tractar la part experimental del treball es farà un apartat introductori on s'expliquen conceptes ecològics necessaris per poder entendre el contingut del treball, a més de la importància i característiques que tenen les columnes de Winogradsky que també són

necessàries per poder comprendre la part experimental. La informació teòrica d'aquest treball s'ha extret de llibres, publicacions i documents relacionats amb l'ecologia general, la microbiologia i més concretament de les columnes de Winogradsky i l'ecologia microbiana. Així com de treballs de recerca anteriors relacionats tant amb el bassal del pati de les tortugues com amb la metodologia bioinformàtica. A més de la informació i ajuda proporcionats pel Dr. Jordi Urmeneta.

Per tal de fer més fluida la presentació dels diferents apartats es tractaran únicament els aspectes necessaris i es farà ús del recurs dels annexos, ja que s'inclou un *document fotocronològic*, realitzat conjuntament amb els meus companys Marc Olivella i Júlia Alguacil, de les tasques que s'han portat a terme durant aquests mesos de desenvolupament del treball (com és habitual en els treballs de recerca que formen part del Projecte del Pati de les tortugues), i al que s'hi farà referència directa quan es tractin aspectes metodològics relacionats amb aquest treball.

# 1. Introducció

## 1.1 El bassal del pati de les tortugues com ecosistema

Un ecosistema és un sistema de la natura el qual esta format per un conjunt de relacions entre poblacions d'éssers vius, anomenat biocenosi, i els factors ambientals abiòtics (no dels éssers vius) que intervenen amb els éssers vius s'anomena biòtop. Les relacions internes dins la biocenosi i el biòtop i la relació entre aquests dos dóna lloc a l'ecosistema.

Una altra característica d'un ecosistema és que es pot considerar aïllat en quant a l'entrada i sortida de matèria, ja que aquesta es pot reciclar, però es manté obert en quant a l'entrada i sortida d'energia, sent la d'entrada de millor qualitat, generalment en forma de llum, i la de sortida que ha estat transformada a una de menor qualitat, generalment calor. D'aquesta forma totes les transformacions tant dins el biòtop com de la biocenosi subsisteixen amb la mateixa quantitat de matèria que es va transformant gràcies al flux d'energia.

El bassal del pati de les tortugues n'és un cas d'ecosistema, encara que no estigui totalment aïllat, però l'intercanvi de matèria amb l'exterior es pot considerar mínim. Els organismes es mantenen gràcies a les condicions físico-químiques del bassal i a l'equilibri de les xarxes tròfiques. Aquest equilibri aconseguit probablement té a veure amb un encertat disseny i construcció original del bassal durant el curs 2002-2003 per uns alumnes de l'escola<sup>1</sup>. Durant aquest temps -més de 10 anys- el bassal s'ha mantingut amb aigua i sense drenar el sediment. Els estudis i les accions que s'hi han portat a terme han quedat enregistrades any rere any en diversos treballs de recerca i en els respectius documents fotocronològics<sup>2</sup>.

En realitat l'hauríem de considerar un ecosistema de desenvolupament sostenible perquè s'hi realitzen accions periòdiques<sup>3</sup>. Una d'aquestes accions és la recollida parcial de l'excés de fulles que cada tardor cauen directament al bassal procedents de les plantes enfiladisses i dels arbres caducifolis que el circumden (vegeu annex fotocronològic del dia 6/11/2013); en alguna ocasió s'han extret part de les algues verdes filamentoses que s'havien desenvolupat més del compte en primavera (Gerard Sagués, 2005). Per altra banda, també s'ha incidit voluntàriament en l'equilibri de les xarxes tròfiques per tal de minimitzar la presència d'espècies especialment molestes (mosquits), introduint depredadors específics de les seves larves (Òscar Cusó, 2007).

En qualsevol cas, el fet que no s'hagi hagut de drenar el bassal en tots aquests anys és un clar indicador que el procés de descomposició biològica i el cicle de la matèria s'hi produeixen correctament, i que els principals responsables d'aquest procés es troben en el sediment a partir del qual muntarem les columnes de Winogradsky, com veurem més endavant.

---

<sup>1</sup> realitzat pels alumnes Gerard Castro, Isaac Lleixà, Cristina Martí i Núria Pedrola en el context del seu treball de recerca interdisciplinar: El Pati de les tortugues: <http://www.escolamestral.cat/mestral/secciones.php?menu=94&sec=101>

<sup>2</sup> <http://www.escolamestral.cat/mestral/secciones.php?menu=94&sec=101&subsec=114>

<sup>3</sup> En un treball de recerca anterior ("El pati de les tortugues com a ecosistema") es fa referència a aquest fet, extensiu a tot el pati de les tortugues, com ecosistema de desenvolupament sostenible (Ferran Hernández, 2004).

Un millor exemple per demostrar el funcionament del cicle de la matèria es un experiment que es fa a l'escola des de fa temps, que consisteix en agafar una mica de substrat del bosc i tancar-lo hermèticament en un pot de vidre transparent i es manté en un lluc il·luminat (a prop d'una finestra, per exemple) perquè pugui entrar la llum al seu interior. Aquest pot es va mantenir tancat durant uns quants anys i amb el temps ha anat apareguent diversa vegetació, majoritàriament molses i falgueres (Figura 1).

Aquest pot pesa exactament el mateix que fa uns anys pel fet que cap substància material pot entrar o sortir, i el que ha crescut la vegetació no es a causa d'obtenir més matèria de l'exterior sinó a causa de l'energia obtinguda de la llum que els permet fer tot el procés de la fotosíntesis<sup>4</sup> utilitzant i reciclant els components materials de l'interior del pot.

L'origen i l'explicació d'aquest model simplificat d'ecosistema, que utilitza el meu tutor per introduir els conceptes de cicle de la matèria i de factor limitant en els ecosistemes estan detallats en un treball de recerca anterior del projecte del Pati de les tortugues: "Autosuficiència alimentària de la Tortuga Mediterrània" (Marta Lozano, 2007).



**Figura 1.** Model del cicle de la matèria (tancat) i flux d'energia (obert) d'un ecosistema en una ampolla de vidre hermèticament tancada.

## 1.2 Cicles biogeoquímics i nivells tròfics

Per poder explicar millor el cicle de la matèria s'ha de tenir en compte el paper que hi juguen els éssers vius, és a dir, la biocenosi. Els diferents éssers vius es poden agrupar segons en quin procés de transformació de la matèria formen part. Aquests es divideixen en 5 grups anomenats nivells tròfics: productors, consumidors primaris, consumidors secundaris, descomponedors i transformadors.

- El productors són aquells organismes que són autòtrofs fotosintètics o quimiosintètics. Això vol dir que obtenen la matèria orgànica a partir del carboni del  $\text{CO}_2$  gràcies a l'energia obtinguda de la llum o de compostos químics inorgànics reduïts. Per tant, aquest nivell tròfic produeix matèria orgànica a partir de matèria inorgànica. A aquest

<sup>4</sup> Significat etimològic: foto=llum, síntesi=construcció/creació. La fotosíntesis és el procés que permet als vegetals sintetitzar matèria orgànica a partir d'inorgànica, gràcies a l'energia de la llum.



nivell pertanyen tots els vegetals, els protòfits o algues, els cianobacteris i els bacteris autòtrofs.

- Els consumidors primaris són els heteròtrofs herbívors o fitòfags, és a dir, obtenen el carboni d'altra matèria orgànica i aquesta s'obté d'alimentar-se dels productors, tan si són algues com vegetals, per tant formen part d'aquest grup els animals i els protozous herbívors o fitòfags.
- Els consumidors secundaris són els heteròtrofs carnívors, és a dir, els depredadors, que obtenen l'aliment de la carn del nivell dels consumidors primaris i per tant en formen part la resta d'animals i protozous que no pertanyen a l'anterior. Dins d'aquest nivell es podria distingir un altre que serien els consumidors terciaris que hi formarien part els superdepredadors, aquells animal que mengen tant carnívors com herbívors i que estan presents a la part més alta de les xarxes tròfiques.
- Els descomponedors són els heteròtrofs que s'alimenten de les restes dels consumidors (cadàvers, excrements, mudes de pel,...) i les descomponen en una matèria orgànica més senzilla que acaba finalment en una matèria inorgànica. Hi formen part els fongs i alguns bacteris.
- Els transformadors són els organismes que transformen la matèria inorgànica formada pels descomponedors en matèria inorgànica que sigui aprofitable pels productors i així es tanca el cicle de la matèria als ecosistemes. En formen part diversos grups de bacteris.

Com s'ha observat, els diferents nivells tròfics fan passar la matèria d'un estat a un altre de forma que el següent ho pot aprofitar i fer una altra transició de la matèria. Llavors diferents elements de la matèria fan cicles on es van produint transicions passant per els organismes del diferents nivells tròfics. El cicles concrets de cada element que estan relacionats amb la biocenosi s'anomenen cicles biogeoquímics, dels quals els més importants són els del carboni, l'oxigen i el hidrogen (tenint en compte també el de l'aigua), el nitrogen, el fòsfor i el sofre.

En aquest treball es dóna gran importància al cicle biogeoquímic del sofre degut a que aquest és el bioelement que més importància té en el cicle de la matèria a l'interior de les columnes de Winogradsky. Si es té en compte que els productors són els iniciadors del cicle de la matèria, el cicle del sofre s'inicia quan es troba en forma d'ió sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). Aquest és absorbit per les plantes i passa a forma part de la matèria orgànica, concretament de les proteïnes<sup>5</sup>. Els consumidors s'alimenten de les plantes i el sofre passa a formar part de les proteïnes animals. A partir d'aquest punt apareixen els bacteris de la putrefacció o bacteris reductors del sofre que al ser descomponedors redueixen el sofre present als cadàvers dels animals per passar a formar  $\text{H}_2\text{S}$  i a partir d'aquí els bacteris sulfatitzants oxiden el sofre del  $\text{H}_2\text{S}$  a ions sulfats un altre cop i així es tanca el cicle. També hi ha un altre camí alternatiu on les restes animals i vegetals es carbonitzen i el sofre passa a formar part del carbó i si aquest es combustiona passa a formar diòxid de sofre que va a l'atmosfera i al reaccionar amb l'aigua de l'atmosfera

---

<sup>5</sup> Es troba en els aminoàcids cisteïna i metionina

forma àcid sulfúric ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) i a través de la pluja<sup>6</sup> retorna al sòl, on forma sulfats, amb la qual cosa també es tanca el cicle.

### 1.3 Les columnes de Winogradsky

Sergei Winogradsky (1856-1953) va ser un microbiòleg rus que va descobrir el procés de quimiolitotròfia com a sistema anabòlic<sup>7</sup> d'algunes espècies de microorganismes, que consisteix en oxidar<sup>8</sup> compostos inorgànics reduïts per obtenir energia d'aquesta reacció, i en alguns casos poder formar compostos orgànics a partir del  $\text{CO}_2$ . Winogradsky va crear les columnes, que posteriorment es van batejar amb el seu nom, per a poder estudiar millor els bacteris que utilitzaven aquest sistema nutricional i el funcionament del medi on vivien.

El primer contacte que vaig tenir amb les columnes de Winogradsky va ser a 4t d'ESO en una sortida que vaig fer amb l'escola al Cosmocaixa de Barcelona. En aquesta visita sobre *Història de la matèria*, l'educador ens va ensenyar les columnes de Winogradsky que hi ha al museu (Figura 2).



**Figura 2.** Aquestes imatges corresponen a una sortida de 4t d'ESO (24/02/2012) al Cosmocaixa de Barcelona per les assignatures de Biologia i Anglès (la visita guiada era en anglès). En aquesta visita sobre *Història de la matèria*, l'educador ens va ensenyar les columnes de Winogradsky que hi ha al museu.

Muntatges com els d'aquestes columnes de Winogradsky al Cosmocaixa o amb plaques de petri gegants en el Museu Blau de Barcelona (vegeu annex fotocronològic del dia 18/07/2013) resulten una manera apropiada de fer arribar al públic el gran paper que desenvolupen els microorganismes en el funcionament de la natura (Urmeneta i Duró, 2011).

<sup>6</sup> aquest procés és un dels responsables de la pluja àcida.

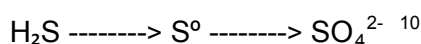
<sup>7</sup> Processos que permeten a un organisme obtenir energia i matèria orgànica.

<sup>8</sup> Reacció que consisteix en extreure electrons d'un element i que resulta en la formació d'altres compostos segons la nova valència adquirida.

### 1.3.1 Descobriment de la quimiolitotròfia

Aquest descobriment ho va fer mentre estudiava uns bacteris filamentosos i incoloros anomenats *Beggiatoa* i *Thiothrix*, que formaven grans colònies en fonts sulfuroses i al ser bastant grans facilitava la seva observació. Mentre estudiava aquest bacteris va observar que la seva presència disminuïa a mesura que l'aigua s'allunyava de les fonts sulfuroses, i alhora, va veure que la quantitat d'àcid sulfhídric (H<sub>2</sub>S) també disminuïa, amb el que va deduir que aquests bacteris necessitaven l'àcid sulfhídric per subsistir (Madigan et al. 2009).

Aquests bacteris tenen uns grànuls de sofre<sup>9</sup> al seu interior, i Winogradsky va observar que si no tenien àcid sulfhídric al medi el grànuls anaven desapareixent. Llavors va provar d'afegir més sulfhídric, cosa que va provocar que els bacteris tornessin a generar els grànuls. Ell va deduir que el que feien aquests bacteris era oxidar l' H<sub>2</sub>S a sofre elemental (S<sup>0</sup>). Després es va preguntar què deuria passar si aquests bacteris es quedaven sense H<sub>2</sub>S, llavors va ser quan va comprovar que davant de la carència d' H<sub>2</sub>S els grànuls de sofre desapareixien dels bacteris i apareixien sulfats (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) en el medi. Així va deduir que aquest bacteris feien el següent procés d'oxidació:



I com que no podien subsistir sense l'H<sub>2</sub>S va arribar a la conclusió de que aquesta reacció era la font d'energia d'aquests bacteris, que passen a dir-se bacteris incoloros del sofre, i així descobrint un procés d'obtenció d'energia que es la quimiolitotròfia, a partir de llavors, passen a dir-se bacteris oxidadors del sofre tots aquells que fan aquest procés d'obtenció d'energia mitjançant la oxidació del sofre (Madigan et al. 2009).

### 1.3.2 Ecosistema i cicle de la matèria en les columnes de Winogradsky

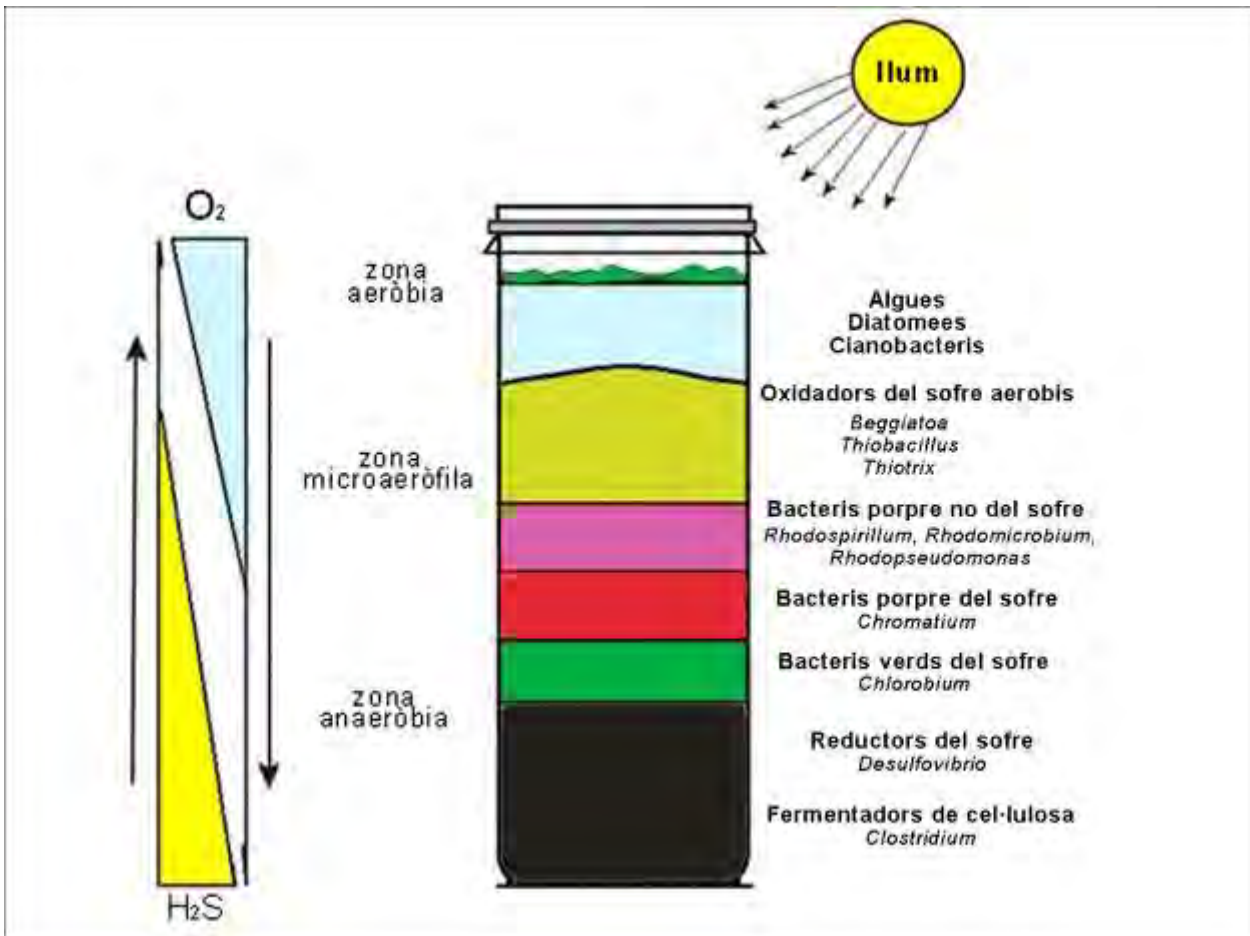
Les columnes de Winogradsky són un sistema format per un tub de vidre amb fang o sediment ric en àcid sulfhídric i aigua que permet el cultiu d'una gran quantitat de microorganismes creant així un ecosistema microbià. Aquest ecosistema és una representació de l'ecosistema de les fonts sulfuroses d'on estudiava els bacteris del sofre, demostrant així, com és el cicle de la matèria d'aquestes fonts. L'estructura vertical de la construcció de les columnes de Winogradsky permet observar amb més facilitat la distribució dels estrats microbians segons el color, ja que presenta un gran gama com el verd, el vermell, el marró, el negre, el porpra i altres més difícils de trobar que serien tonalitats grogues o ataronjades.

---

<sup>9</sup> Són d'un color groc intens.

<sup>10</sup> En la primera de les dues reaccions el sofre perd 2 electrons passant de ser S<sup>2-</sup> A S<sup>0</sup> i a la segona en perd 6 més passant de ser S<sup>0</sup> a ser S<sup>6+</sup>.

A les columnes de Winogradsky hi ha dos compostos principals que influeixen a gran escala a la formació de l'ecosistema microbià: l'oxigen ( $O_2$ ) i l'àcid sulfhídric ( $H_2S$ ). La disposició d'aquests compostos defineix la situació de cadascun dels organismes que habiten a les columnes (Figura 3).



**Figura 3.** Model gràfic de l'estratificació microbiana en les columnes de Winogradsky.

Aquests dos compostos es distribueixen de forma que a la part inferior de la columna no hi ha oxigen (és anòxica o anaeròbia) i hi ha una gran quantitat d'àcid sulfhídric. Això fa que els organismes que habiten aquesta zona tinguin un sistema metabòlic anaeròbic. A mesura que es va pujant hi ha menys àcid sulfhídric i cada cop més oxigen, fins arribar a la part superior on està ple d'oxigen però no hi ha àcid sulfhídric (zona aeròbia). Entremig d'aquestes dues zones se situa una tercera que no conté oxigen en gran quantitat i per tant no s'anomena aeròbia sinó microaeròfila.

Començant des de la zona més inferior (totalment anaeròbia) es troben bacteris del gènere *Clostridium*. Aquest bacteris són estrictament anaerobis (moren en presència d'oxigen i fan una fermentació on descomponen matèria orgànica com glúcids o aminoàcids en matèria orgànica més simple (com alcohols) per obtenir energia. Més a dalt, encara en zona anaeròbia es troben els bacteris reductors del sulfat, un exemple és el gènere *Desulfovibrio* que forma estrats de color negre. Aquests també són estrictament anaerobis i són quimioheteròtrofs, és a dir,

obtenen l'energia a partir de reaccions químiques i obtenen el carboni d'altres compostos orgànics, en aquest cas aprofita els alcohols que produeixen els *Clostridium*. A més, s'anomenen reductors del sulfat perquè redueixen el sulfat a àcid sulfhídric<sup>11</sup>.

Més a dalt s'arriba a una zona que ja no és totalment anaeròbica en la seva part superior i passa a ser una zona microaeròfila, però en la inferior encara segueix havent-hi una alta concentració d'àcid sulfhídric i les condicions són del tot anaeròbies. A l'inici d'aquesta zona ja es troben els bacteris verds del sofre (*Chlorobium*) i el bacteris vermells del sofre (*Chromatium*). Aquest dos són anaerobis estrictes i són fotolitoautòtrofs, és a dir, obtenen l'energia de la llum, el carboni de matèria inorgànica com carbonats i CO<sub>2</sub> i obtenen electrons de matèria inorgànica amb l'oxidació del sulfhídric produït per els bacteris reductors del sulfat. Entre les principals diferències d'aquests dos, es troben el color, el fet de que els bacteris verds del sofre poden aguantar millor la gran concentració d'àcid sulfhídric i per aquesta raó aquests es disposen per sota dels vermells (Madigan et al. 2009).

A més altura es troben els bacteris no del sofre (anomenats així perquè al principi es pensava que no podien utilitzar compostos de sofre com a font d'electrons, y realment alguns si que poden fer-ho encara que no és el més usual) que, a diferència dels del sofre, aquests són fotoheteròtrofs, és a dir, aconseguen el carboni d'altra matèria orgànica menor com alcohols, lípids,... A més de que aquests no tenen com a única font d'electrons els compostos de sofre i que no són anaerobis estrictes, és a dir, són facultatius, poden estar tant a zona aeròbia com a anaeròbia, com és el cas dels bacteris porpra no del sofre (*Rhodospirillum*, *Rhodospirillum*, *Rhodospirillum rubrum*) i els bacteris verds no del sofre (*Chloroflexus*). Alguns d'ells tenen una dualitat metabòlica que els hi permet créixer fototròfica o heterotròficament segons les condicions en que es trobin.

A sobre d'aquest, encara en la zona microaeròfila, es troben els bacteris incolor del sofre (*Beggiatoa*, *Thiothrix*) que són quimiolitòtrofs i obtenen l'energia que resulta de la reacció d'oxidació del sofre.

Ja en la zona aeròbia i de la superfície es troben altres organismes com diatomees (que formen estrats de color marró) algues verdes i cianobacteris (que formen estrats verds i blau-verds) que realitzen tots ells fotosíntesi oxigènica<sup>12</sup>. A la superfície fins i tot poden arribar a aparèixer fongs, com ara floridures.

Amb aquesta estructuració dels organismes es forma un equilibri entre els gradients d'àcid sulfhídric i oxigen tot i que potser alguna condició pot fer variar la producció d'algun dels dos i desequilibrar-ho (López, 2008).

En aquest treball intentarem fer uns muntatges i uns tractaments de columnes per tal d'intentar obtenir un bon equilibri entre els dos gradients de gasos i, en conseqüència, una major biodiversitat de taques de microorganismes.

---

<sup>11</sup> És una reacció de reducció, inversa a la de oxidació de la pàgina 7, que fa guanyar electrons en canvi de perdre'ls.

<sup>12</sup> és a dir, fotosíntesi amb despreniment d'oxigen, gràcies a la presència de dos fotosistemes interconnectats, a diferència de la fotosíntesi bacteriana, que només disposa d'un fotosistema i no desprèn oxigen (Jimeno i Ballesteros, 2009).

## 2. Muntatge i seguiment de les columnes de Winogradsky

La primera part de la part experimental d'aquest treball de recerca consisteix en preparar les columnes de Winogradsky, que és la font dels microorganismes que prenen part en les etapes posteriors de la part experimental. En aquest apartat s'explica com s'han pogut muntar les columnes i un cop aquestes han estat muntades, tot el desenvolupament pel que passa durant un cert interval de temps i les explicacions i conclusions d'aquests canvis que ha sofert a més de les intervencions que han tingut lloc durant el desenvolupament.

### 2.1 Metodologia

En aquest apartat s'explica tot el procés de muntatge de les columnes de Winogradsky i els tractaments realitzats junt amb el canvis visuals que s'han produït al llarg del temps setmana rere setmana.

#### 2.1.1 Extracció i concentració del substrat

Com ja s'ha mencionat al pròleg, la base de les nostres columnes de winogradsky és el basal del pati de les tortugues, d'on hem extret l'aigua i el sediment.

En l'apartat anterior ja s'ha explicat que el sediment ha de ser ric en àcid sulfhídric ( $H_2S$ ), aquest es pot identificar fàcilment gràcies a la seva olor característica que desprèn de manera molt forta. Doncs, el primer que havíem de fer era agafar una petita mostra i comprovar que contenia una alta quantitat d'àcid sulfhídric (vegeu annex fotocronològic del dia 22/02/2013). Per estar del tots segurs que el sediment era l'adequat vam portar la mostra al Dr. Jordi Urmeneta, qui a més ens va proporcionar informació sobre el funcionament de les columnes i consells sobre com preparar-les i distribuir-les (vegeu annex fotocronològic del dia 24/03/2013). Un cop comprovat que el sediment és viable per a la construcció de les columnes, se n'ha d'agafar la quantitat necessària segons el nombre i mida de les columnes que es volen preparar.

Hi ha diferents sistemes per agafar el sediment; si està molt a mà es pot agafar fàcilment amb un estri de jardineria, però en la nostra situació el sediment el volíem del fons del basal, ja que era la part més rica en àcid sulfhídric degut a que era la zona més negra i més anòxica, a més del problema de treure-ho en grans quantitats. Per fer això vam idear un sistema "casolà" per extreure-ho, que consisteix en agafar un pot gros de vidre, agafar unes pinces de suport universal amb les que s'agafa el pot per la vorera i per reforçar-ho vam agafar cordill i brides de plàstic. Amb això i uns quants pots més (per omplir amb el sediment que anem recollint), enfonsàvem el pot al basal i amb l'ajut d'un pal l'enterràvem sota el sediment de forma que s'omplís més d'aquest i evitar que entri massa aigua ja que de moment no la necessitàvem (vegeu annex fotocronològic del dia 08/03/2013). Anàvem omplint els pots d'un en un, esperant a que sedimentessin una mica i així treure l'aigua sobrenedant per poder omplir-ho més de sediment. Un cop ja s'ha recollit el sediment, s'ha de deixar reposar uns dies per a que el material que està en suspensió sedimenti. Quan ja ha sedimentat és pot mesurar la quantitat de sediment recollit, en el nostre cas vam recollir al voltant de 8L. Després s'ha de separar el sediment de l'aigua que s'ha recollit per decantació, intentant que caigui el mínim de sediment. L'aigua que nosaltres vam recollir va ser utilitzada per a la part experimental del treball de recerca de l'Alba Nieto (vegeu annex fotocronològic del dia 21/03/2013).

## 2.1.2 Muntatge i tractaments

Un cop ja es té tot el sediment necessari per a les columnes s'ha de fer la barreja base, que ha de contenir tot el necessari per a poder mantenir un ecosistema sostenible, encara que també és possible que funcioni sense afegir-los ja que el sediment ve d'un altre ecosistema, però serveix per poder assegurar la sostenibilitat d'aquest. Nosaltres vam decidir fer-ho per diferents fonts d'Internet i gràcies als consells del Dr. Jordi Urmeneta. Per fer-ho cal afegir al sediment els següents materials:

- Trossos petits de paper, ja que aquests són teixits de cel·lulosa i pot servir com a font de matèria orgànica per alguns organismes.
- Óssos calcinats, ja que aquest serveixen com a font de fòsfor, el qual és un bioelement que constitueix els grups fosfats dels àcids nucleics dels organismes.
- Qualsevol font de  $\text{CaCO}_3$  (restes d'esquelets, petxines, corall triturat,...) el qual és una sal mineral i com tal fa l'efecte tampó, es a dir, pot regular el pH de l'aigua.
- Guix ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) que serveix com a font alternativa de sulfat, ja que potser el del sediment és insuficient.

Un cop ja es tenen els materials, aquests s'han de barrejar uniformement amb tot el sediment, per això es recomanable tenir un recipient suficientment gran. Vam decidir utilitzar una garrafa de 20 L de les que serveixen aigua potable perquè poguéssim emmagatzemar els 8 L de sediment. Vam tallar la part superior amb una serra i vam utilitzar la pròpia tapa d'embut per omplir les columnes, i un cop afegits tots els materials es barreja de forma que quedi el més uniforme possible (vegeu annex fotocronològic del dia 25/03/2013).

Quan ja es té la barreja feta s'ha d'escollir la distribució de les columnes en funció dels tractaments que es volen realitzar. Com en el nostre cas era un experiment d'observació, teníem que decidir una variable independent. En el nostre cas vam decidir que la variable independent fos la llum, ja que aquesta era la que repercuteix més en el desenvolupament de les columnes i això pot variar segons la direcció de la llum, la intensitat i el tipus. Vam decidir fer una columna que estigués il·luminada horitzontalment amb una llum incandescent, i per l'altre banda fer una columna que estigués il·luminada verticalment amb llum natural, ja que aquesta llum és la més completa i que està tapada horitzontalment amb un tub opac, així representarà millor les condicions del basal del pati de les tortugues.

Un cop ja havíem decidit la variable independent vam pensar de fer una rèplica de cada columna (de menor mida) amb la que podem extreure mostres o comprovar coses en relació a l'estat de les columnes principals, i així no arriscar-se a espatllar l'estat d'aquestes últimes.

Ara només falta distribuir el sediment per les columnes. Les columnes que il·luminaríem horitzontalment haurien de tenir aproximadament 3/4 parts de sediment i 1/4 part d'aigua, i les que estaven il·luminades verticalment, 2/3 parts plena de sediment i 1/3 part d'aigua. El sediment que ens quedava el vam utilitzar per fer un petit experiment apart en el que posàvem el sediment que ens quedava en uns pots més petits i hermètics, un amb poc sediment i l'altra amb 2/3 parts de sediment i 1/3 part d'aigua. Això ho vam fer per comprovar si podíem mantenir un ecosistema equilibrat i totalment aïllat de l'exterior.

Com ja es té el sediment distribuït només falta afegir l'aigua fins a omplir totalment les columnes. Una opció és omplir-la amb aigua destil·lada però nosaltres vam optar per utilitzar aigua del propi bassal del pati de les tortugues, d'on havíem tret el sediment, i d'aquesta forma aconseguir recrear a les columnes unes condicions més semblants a les de l'ecosistema del bassal. Així, les columnes que més s'assemblarien serien les tapades lateralment i il·luminades verticalment per la part superior (una situada al laboratori i l'altra al costat del bassal del pati de les tortugues), ja que el sediment és opac i només pot arribar la llum a la seva superfície.

Un cop es tenen les columnes preparades només falta col·locar-les als seus llocs corresponents a prop d'una font de llum. Les dues columnes sense tapar lateralment es varen situar a prop d'una bombeta incandescent de 25 W (que estava encesa les 24h), al costat -però no a sota- del banc de llum blanca del laboratori (de manera que els hi arribava una mica de llum blanca lateral, a més de la llum ambient); properes a aquestes vam col·locar-hi les columnes hermètiques (Figura 4). Per l'altra banda estaven les dues columnes tapades lateralment, en les que per assegurar que la llum arribés només des de dalt, vam agafar un tub de plàstic opac en el qual hi cabien les columnes de forma ajustada i el vam tallar amb un serra de forma que tapés tota la columna però deixant la part superior una mica al descobert. La principal la vam baixar al pati de les tortugues (Figura 4 dreta) per a que rebés llum natural, la rèplica la vam situar directament sota el banc de llum (Figura 4 esquerra) que tenia un fotoperíode de 12 h). Les columnes las vam numerar de la següent manera: la columna il·luminada de costat (horitzontalment) seria la 1 i la seva rèplica la 2, la il·luminada verticalment seria la 3 i la seva rèplica la 4, i finalment les dues que queden hermètiques, la 5 la que té més sediment i la 6 la que en té menys.



**Figura 4.** Fotografies en les que es pot veure la distribució de les 5 columnes al laboratori de biologia de l'escola (esquerra) i de la situada al Pati de les tortugues (dreta).

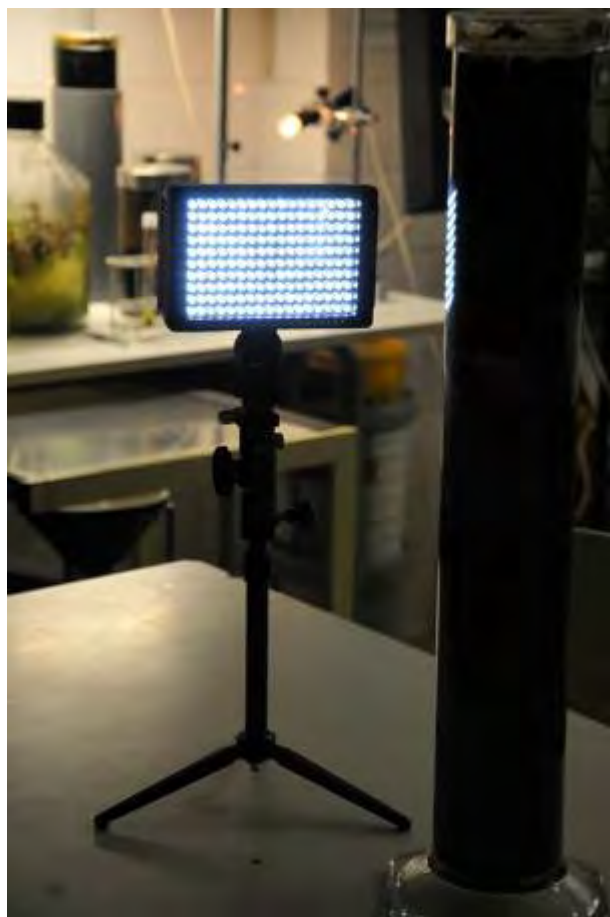
Un cop ja està tot col·locat al seu lloc corresponent, es tapen amb qualsevol tap que pugui ser transparent, com plaques de petri o vidres de rellotge i un cop tot llest ja comença l'etapa següent, l'observació dels canvis que es produeixen en les columnes al llarg del temps.



### 2.1.3 Observació i captura fotogràfica

Per a poder observar i fotografiar les columnes vam tenir una sèrie de dificultats degut al gruix del vidre i a la forma cilíndrica de les columnes utilitzades perquè reflecteixen molt la llum. Per a l'observació a simple vista no hi havia problema, amb una il·luminació adequada es podien veure els diferents estrats de les columnes. El problema apareixia quan s'intentava fotografiar amb un objectiu *macro* muntat en una càmera rèflex i també amb un nou microscopi portàtil, anomenat *microscopi USB*, que vàrem saber de la seva existència arran d'un article de Marc Boada en la secció "Taller y laboratorio" de la revista "Investigación y Ciencia" (Boada, 2012), en el que es comenta que aquests microscopis poden ser utilitzats per fer un seguiment dels biofilms de les columnes de Winogradsky.

Aquest microscopi USB (estudiat a fons per la meua companya Júlia Alguacil) és un estri bastant útil perquè permet observar a través de la pantalla d'un ordinador les coses que s'enfoquen amb aquest, és portàtil i molt senzill d'utilitzar (vegeu annex fotocronològic del dia 04/07/2013), però en un inici no ens va funcionar satisfactòriament per observar les columnes (vegeu més endavant) i les primeres fotografies només són amb càmera rèflex (vegeu annex



**Figura 5.** Focus LED de llum blanca utilitzat per les fotografies dels biofilms de les columnes.

fotocronològic del dia 18/05/2013), però amb problemes també relacionats amb els reflexos. Si es feia amb bastant llum ambiental i es feia una fotografia sense flash quedava el reflex de la llum provinent de les finestres i impedia veure els substrats. I en l'altre cas tancàvem persianes i impedíem que hi hagués massa llum ambiental, d'aquesta manera evitàvem el reflex de la llum que entrava per les finestres i llavors fèiem la fotografia amb flash, però seguia havent-hi el problema del reflex del flash.

Al principi vam estar variant entre aquestes tècniques per intentar assolir el punt on el reflex ens donés menys problemes però al final sempre acabava interferint i no podíem seguir fent les fotos d'aquesta manera. Llavors sens va ocórrer utilitzar un focus de llum LED blanca (VL003-170) que teníem al laboratori de fotografia (Figura 5)<sup>13</sup>.

Aquest focus també produïa reflex però d'una forma molt més reduïda que els altres mètodes ja que el podíem mantenir lluny i il·luminava una zona molt àmplia, per tant permetia veure amb claredat tots els estrats de colors de les columnes i fer les fotografies amb major

<sup>13</sup> El problema és que descobríem aquest sistema massa tard i no es va utilitzar en el seguiment fotogràfic de les columnes dels primers mesos.

qualitat. Aquest es va convertir en el nostre sistema principal per fotografiar les columnes. Més endavant també vam introduir alguns altres detalls com posar un fons blanc quan es feia un pla de la columna. Però el sistema de la il·luminació LED del focus era el sistema més òptim per fer les fotografies de les columnes perquè es veien els colors més reals i amb més contrast. També vam descobrir un sistema per utilitzar aquest focus amb combinació amb el microscopi USB. Consistia en desactivar els llums incorporats en el microscopi (que donaven greus problemes de reflexos) i utilitzar el focus LED amb una inclinació apropiada (el gruix del vidre i la forma cilíndrica de la columna aquí es mostraren favorables)<sup>14</sup>.

## 2.2 Resultats i discussió

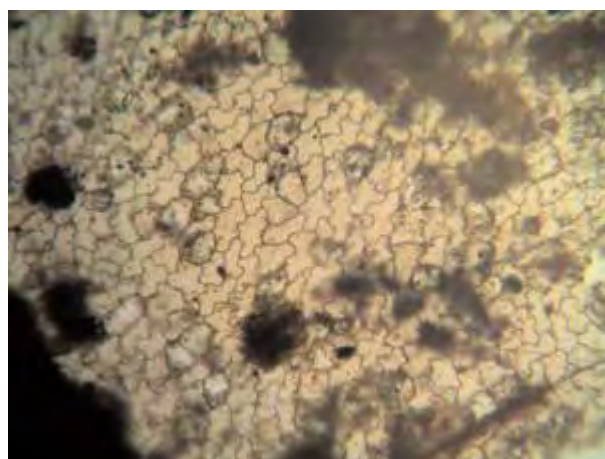
En aquest apartat es comenta l'observació de les nostres columnes al llarg del temps i alguns detalls que cal destacar i es discuteixen els resultats dels canvis que hem anat observant, així com el moment que hem trobat la màxima diversitat de taques.

### 2.2.1 Seguiment per setmanes

Al cap d'una setmana d'haver preparat les columnes no hi havia hagut gaire canvi, però, tal com es podia comprovar amb l'olfacte i les bombolles que sortien despreses del sediment, la quantitat de gas ( $H_2S$ ) havia augmentat considerablement, això vol dir que tot el procés del cicle del sofre ja havia entrat en acció.

Uns dies més tard ocorre un fenomen inesperat per nosaltres: en la columna 1 es veu que part del sediment, aproximadament la meitat, s'ha elevat separant-se de la resta. Deduïm que això ha passat a causa de la gran acumulació de gas  $H_2S$  en el sediment, fins al punt de poder elevar part d'aquest, però aquest fet no l'hem trobat citat a la bibliografia, per aixòensem que l'altre factor que pot haver influït hagi estat una textura del sediment poc compacte, ja que part d'ell procedeix de sediment remogut que va sedimentar (vegeu apartat 2.1.2) i també poc madur, com ho indiquen restes microscòpiques de fulles en un estadi de descomposició encara poc avançat, trobades més endavant en observar al microscopi mostres de biofilms de la part inferior de les columnes (Figura 6).

Ja passades dues setmanes de l'inici de l'experiment, veiem que el fenomen de l'elevació del sediment ha ocorregut en més columnes (excepte en les hermètiques, possiblement degut tant al fet que tenien menys quantitat de sediment i per tant menys  $H_2S$ , com a l'efecte de la pressió per estar tancades). Una conseqüència del fet de tenir



**Figura 6.** Epidermis de les restes d'una fulla vegetal trobada formant part del sediment.

<sup>14</sup> Tant aquesta tècnica com les característiques del microscopi USB es troben a l'obra "Microscopio de USB" de la meua companya Julia Alguacil

una part de sediment a dalt, és que a la superfície de les columnes han aparegut porus per on surt el gas, deixant unes irregularitats en forma de cràter. Aquest mateix dia ja es poden apreciar els primers indicis de colònies microbianes a la part superficial de la columna 4, precisament per la zona ben il·luminada per llum blanca que no està tapada per el tub opac; això suggereix que es tracti de cianobacteris o de bacteris fotosintètics.

Quan ja han passat quatre setmanes han aparegut diverses colònies a gran part de les columnes, sobretot destaca que ja hagin aparegut les primeres colònies de color vermell (suposadament de bacteris vermells del sofre) situades a petits orificis provocats pel gas a la columna 2, però només en la part orientada cap a la llum incandescent, demostrant així l'eficàcia d'utilitzar llum incandescent per al creixement d'aquests bacteris. A més, a les dues columnes il·luminades verticalment han aparegut taques verdes en la superfície del substrat en contacte amb l'aigua (en més quantitat a la columna 4, que té tota la superfície totalment recoberta). Segons es desprèn de les primeres observacions microscòpiques, aquestes taques verdes corresponen majoritàriament a microalgues verdes i cianobacteris.

Al cap de sis setmanes en totes les columnes s'observen taques variades i l'aigua d'algunes columnes comença a agafar una certa tonalitat verdosa, que s'observa millor situant les columnes a contrallum (vegeu annex fotocronològic del dia 18/05/2013). El més remarcable és que les colònies vermelles que van aparèixer dues setmanes abans s'han fusionat i expandit fins al punt d'ocupar una part considerable de la part orientada cap al llum incandescent. En les que més bé s'observen aquestes taques vermelles és en la columna hermètica 5 i en la columna 2 (Figura 7).



**Figura 7.** Estrat de color vermell present a les columnes hermètica 5 i lateral 2 a les sis setmanes d'haver-se iniciat el procés, amb una macrofotografia de cada una. En la foto de la dreta (corresponent a la columna 2), s'observa el límit dels biofilms vermells, que és fins on arriba la influència de la llum incandescent).

Passats dos mesos la varietat de colors ha augmentat força, malgrat els dos colors predominants són el vermell i el verd. El canvi més destacable és que a totes les columnes, menys a les hermètiques i la que està al pati de les tortugues, l'aigua s'ha tornat més verda a causa de la ràpida expansió de cianobacteris i algues, per la qual cosa també gran part de les columnes estan recobertes per les taques verdes, cobrint totalment la part superior en el cas de la columna 4 a on també han aparegut taques de color marró, que més endavant vam demostrar que es tractava de colònies de diatomees. Les taques vermelles han aparegut en gran quantitat per tota la columna 1, i la gran taca vermella de la columna 2 ha crescut considerablement i ha agafat una tonalitat molt intensa, però únicament a la part orientada cap a la llum incandescent, com ja havíem observat anteriorment, però ara es fa més evident

aquest efecte si observem la columna en 4 posicions diferenciades, començant per la posició orientada cap a la llum incandescent fins a l'orientació oposada (Figura 8).



**Figura 8.** Rotació progressiva fins arribar als 180° de la columna 2, començant amb la part orientada cap a la llum incandescent. Es pot comprovar com la part de la columna en la que no incideix la llum incandescent no s'hi han desenvolupat taques vermelles. També es fa evident el color verd intens de la part superior ocupada per l'aigua. (Fotografies realitzades a les 9 setmanes).

A la part superior d'aquesta columna ha aparegut una gran taca verda que sembla formada pels mateixos components que el verd de la columna 4 abans esmentats. En quant a les columnes hermètiques, a la columna 5 hi ha una gran diversitat de mides de taques vermelles i verdes disperses per tot arreu, mentre que a la columna 6 sembla predominar el verd. A part d'això a totes les columnes hem vist indicis de taques de colors més variats però en petita quantitat, com taques de color taronja i de color groc, independentment de si es a la zona superior o a la zona inferior. Sembla que cada vegada les colònies verdes van guanyant més territori, això podria indicar que l'ecosistema de la columna cada cop s'està oxigenant més.

Passen entre 3 i 4 mesos i tant les taques verdes com les marrons de diatomees s'expandeixen, i a les columnes que presenten taques vermelles cada cop en tenen menys i les que queden van assolint un color més apagat, més grisenc (Figura 9).



**Figura 9.** La sèrie de fotografies corresponen a les de la figura 8, però 2 mesos més tard. De la comparativa cal destacar el desenvolupament i expansió del color verd en el sediment, frenant o reduint l'expansió del color vermell, el qual també ha perdut intensitat, ja no és un vermell tant viu. (Fotografies realitzades a les 17 setmanes).

Una setmana més tard el verd i el marró han seguit expandint-se i el vermell s'ha continuat reduint, la novetat aquest cop és que unes taques negres han aparegut a la zona inferior de forma molt ràpida ja que han assolit una mida considerable en pocs dies, aquestes taques negres poden estar formades, segons el què hem vist a l'apartat 1.3.2) per *Desulfovibrio*, bacteris reductors del sofre de color negre.

En la columna 4, que només rep llum a la seva part superior, ens hem trobat amb un fet sorprenent, la presència d'una fina taca de color verd a la seva part inferior. Com pot ser que s'hi desenvolupi un biofilm verd si no hi arriba llum de cap tipus? L'explicació la trobarem a l'observar més detingudament el conjunt de columna i cilindre opac protector de la llum lateral, resulta que entraven petites esclatxes de llum per la zona inferior i només aquí han aparegut aquests biofilms (Figura 10).



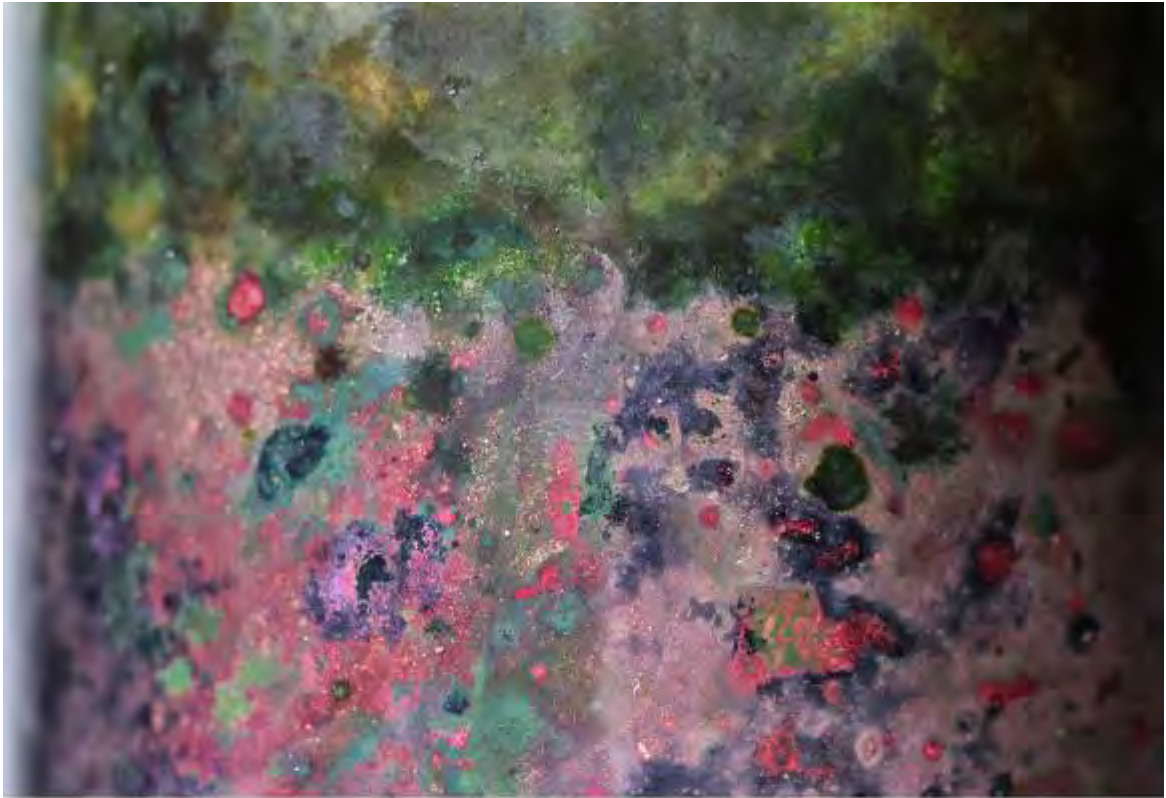
**Figura 10.** La fletxa (foto 1) assenyalava la posició del biofilm verd descobert a la part inferior de la columna 4 (aquí destapada) i que assoleix la totalitat de la superfície inferior (foto 2). La causa és que ha penetrat llum blanca per la part inferior degut a una irregularitat del tub opac, que no estava ben tallat, com es pot observar quan està col·locat (foto3) i l'efecte que té en l'entrada lateral de llum (foto 4).

Els microorganismes causants no poden ser els mateixos que els observats en les taques verdes de la part superior de la columna (algues i cianobacteris), ja que la part inferior de la columna és una zona anaeròbia. Pel què hem vist a l'apartat 1.3.2 el més probable és que es tracti de *Chlorobium*, les bacteries verdes del sofre (vegeu Figura 3).

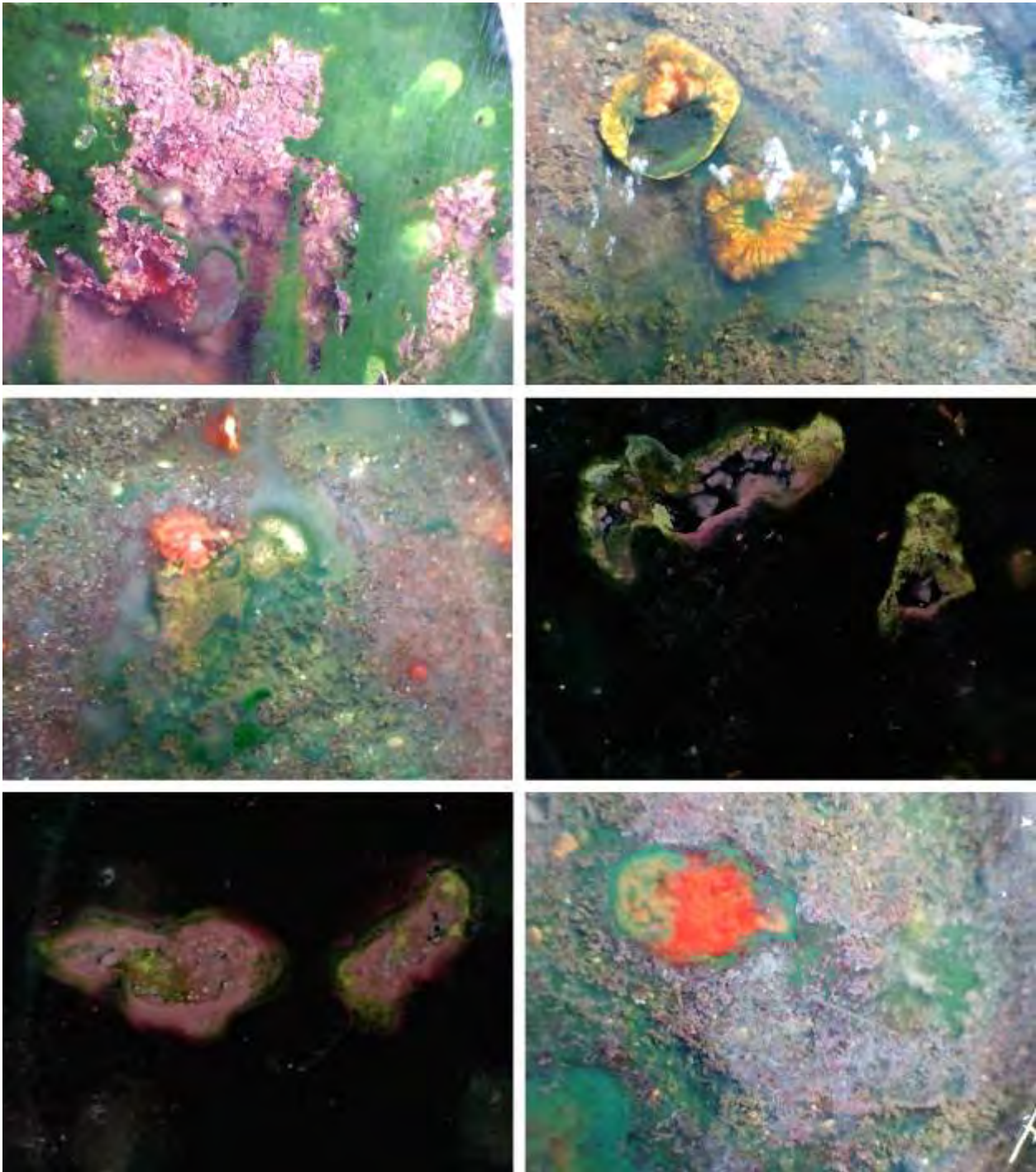
Als 4 mesos s'aconsegueix una bona biodiversitat i coincideix amb el moment en que s'agafen mostres per al seu anàlisi (vegeu apartat 3). Malgrat l'observació de les columnes i el seu seguiment fotogràfic continuarà fins la finalització del treball de recerca, aquí només es presentaran imatges del moment de màxima biodiversitat observada (als 6 mesos), utilitzant la tecnologia especificada a l'apartat 2.1.3, amb diferents graus d'ampliació, i amb l'ajuda de la meua companya Júlia Alguacil. Les fotografies corresponen a la columna 2, que és la que ha mostrat una major biodiversitat, seleccionant les dues parts de la columna que s'han considerat més interessants (Figura 11) i realitzant una macrofotografia a mínima distància d'enfocament amb un objectiu macro (Figura 12) que proporciona una ampliació del fotograma 1:1 (Canon EF 100 mm f/2.8 Macro 1:1 USM) i, finalment, es presenta una selecció de petits detalls dels biofilms capturats amb el microscopi USB amb el mínim augment (ampliació del fotograma 4:1), que corresponen a les columnes 1, 2 i 4 (Figura 13).



**Figura 11.** Fotografies corresponents a la part central de la columna 2 en dues orientacions diferents, la part que dóna a llum lateral difosa de color blanc (esquerra) i la que està orientada a la llum incandescent (dreta), realitzades amb objectiu macro (Canon EF 100 mm f/2.8 Macro 1:1 USM) muntat amb una càmera rèflex Canon 40D) a una distància mitjana per assolir (en vertical) tot el gruix de la columna, en el moment de màxima biodiversitat observada. En el moment de la captura la columna estava il·luminada amb un focus LED de llum blanca, que permet obtenir els colors dels biofilms més contrastats i reals. Aquestes fotografies han estat realitzades amb la col·laboració de la meua companya Júlia Alguacil.



**Figura 12.** Macrofotografies d'una part dels biofilms de la figura 10 amb el mateix equip i metodologia però a distància mínima d'enfocament (ampliació del fotograma 1:1).



**Figura 13.** Microfotografies de detalls petits dels biofilms de les columnes 1, 2 i 4 fetes utilitzant la tècnica de fer servir el microscopi USB amb la llum apagada i il·luminar amb el focus LED de llum blanca (Ampliació aproximada del fotograma 4:1).



Ja passat més temps, en el moment en que donem per conclosa l'etapa d'observació de les columnes, la majoria de columnes del laboratori s'han omplert d'estrats formats per color verds i marrons molt opacs. També s'ha seguit expandint molt les taques de color negre, però encara segueixen quedant taques de color vermell i en totes les columnes segueixen quedant petites taques de colors més estranys com el taronja o el groc (Figura 13). Una cosa curiosa que vam poder observar és que la columna 3, la de l'exterior, a penes havia mostrat indicis de formacions d'estrats d'organismes microbians, com a molt, una mica de verd, possiblement d'algues, a la zona superior. Però el que és més curiós és que la superfície ha brotat herba de pou (*Adiantum capillus-veneris*) una espècie de falguera (vegeu annex fotocronològic del dia 30/10/2013) que creix al voltant del brollador del rierol del bassal de pati de les tortugues.

El fet que part del substrat es mantingués flotant ha permès l'existència d'unes condicions favorables a la germinació d'espores, com si es tractés d'un sòl especialment humit on prolifera aquesta espècie. La procedència de les espores d'aquesta falguera es pot entendre tenint en compte la seva situació a prop de la sortida d'aigua del rierol que desemboca al bassal i que, tant el sediment utilitzat per construir la columna, com l'aigua de la columna, es va extreure d'aquest bassal (vegeu apartat 2.1).

### **3. Observació dels biofilms de les columnes**

En aquest apartat s'explica com vam preparar l'observació i anàlisi dels diferents biofilms que hi havien dispersats per les diferents columnes amb el propòsit de poder identificar la seva composició i d'aquesta manera deduir les condicions ecosistemàtiques de les columnes.

#### **3.1 Extracció de les mostres**

Per extraure les mostres de la columna vam utilitzar diferents mètodes segons la localització del biofilms que es volia observar.

Per a les mostres més superficials, del sobrenedant i la zona superior de la columna, segons el tamany del biofilm que volíem agafar podíem utilitzar el comptagotes de plàstic que era el més pràctic, i per agafar les capes més grans i consistents superficials podíem utilitzar unes pinces de laboratori.

Ara bé, per agafar mostres de les zones més inferiors, les quals estan dintre del sediment, vam tallar la punta d'un comptagotes i la vam enganxar a un tub de vidre i d'aquesta forma poder fer una pipeta prou llarga ja que les que teníem a disposició no ho eren prou.

Algunes mostres eren simplement per fer una observació al laboratori de l'escola i així poder comprovar d'una forma general els organismes de dintre les columnes, per tant no feia falta ser molt rigorosos amb el mostreig. Però per al procés d'identificació dels bacteris responsables de

cada taca de l'ecosistema de les columnes que s'anava a realitzar al Departament de Microbiologia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, amb l'ajut i col·laboració del professor Jordi Urmeneta, feia falta marcar les mostres amb un codi que ens permetés saber la provinença i característiques de la mostra extreta. Aquest codi està format per un número que representa la columna de la que prové la mostra<sup>15</sup>, una lletra, *s* o *l*, que correspon a l'estat del lloc d'on hem extret la mostra, essent la *s* sòlid i la *l* líquid, i una altra lletra, *a*, *b* o *c*, que correspon a la zona d'on hem extret la mostra, *a* corresponent a la zona superior, *b* a la del centre i *c* a l'inferior. En el cas de que s'hagi extret més d'una mostra d'un mateix lloc, per diferenciar-les vam posar una última lletra que correspon al color de la mostra que havíem extret, per exemple, de color verd amb un *v*, de color vermell/porpra amb una *p*, de color marró una *m*,... Aquestes mostres les posàvem en eppendorf on escrivíem el codi amb un retolador permanent.

## 3.2 Observació microscòpica

Per a poder observar els microorganismes mitjançant la observació microscòpica vam utilitzar diferents tècniques d'observació microscòpica depenent del que volguéssim observar

### 3.2.1 Metodologia

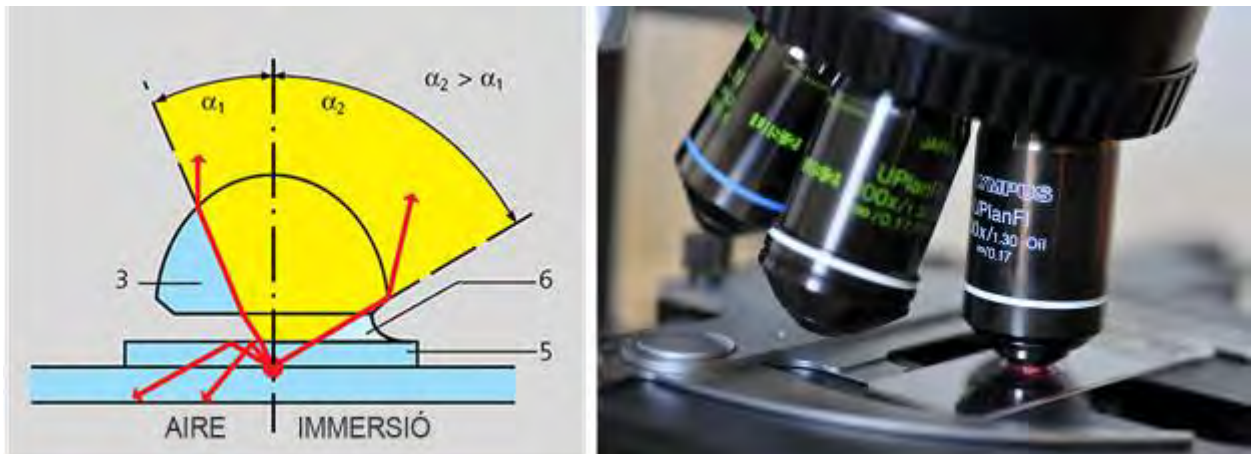
La tècnica de microscòpia que més vam fer servir a l'escola va ser la de preparacions temporals de mostres *in vivo*, sense tenyir, utilitzant un microscopi estàndard, que era la que fèiem al laboratori de l'escola. S'agafa una petita porció de la mostra a estudiar i es col·loca a sobre un portaobjectes en el que prèviament s'ha posat una gota d'aigua, s'homogeneïtza el conjunt i es posa un cobreobjectes a sobre, i s'observa al microscopi, començant amb els objectius de menor augment.

Apart de la tècnica estàndard també vam fer servir la del porta excavat, que consisteix en utilitzar un portaobjectes que presenta al centre una superfície còncava on es posa la mostra. Després s'agafa un cobreobjectes, amb un comptagotes es posa una part de la mostra que es vol observar en forma d'una petita gota amb un escuradents es posa una mica de glicerina a les puntes del cobreobjectes per a que es pugui posar el portaobjectes a sobre, encarant la part còncava amb la gota de mostra. La preparació es capgira i ja està llesta per poder observar al microscopi. Aquesta tècnica serveix per a que d'aquesta forma hi hagi un efecte lupa sobre la mostra i es pugui veure amb més augments.

Per a l'observació de bacteris fixats i tenyits amb la tinció de Gram (vegeu apartat 4.2), el millor és fer servir la tècnica d'immersió. La tècnica d'immersió consisteix en posar una gota d'oli (oli d'immersió) sobre la mostra (per tant no pot ser una mostra humida) perquè l'oli té un índex de refracció superior al de l'aire i això permet augmentar el poder de resolució de l'objectiu (Figura 14).

---

<sup>15</sup> Vegeu apartat 2.1.2 on s'explica la numeració de les columnes.



**Figura 14.** Tècnica d'immersió. Esquerra: Quan l'espai entre la preparació (5) i l'objectiu (3) és ocupat per un líquid d'immersió (6) amb un índex de refracció semblant al del vidre, no es produeix reflexió dels raigs de llum. Dreta: Objectiu d'immersió utilitzat en el Departament de Microbiologia en funcionament.

### 3.2.2 Resultats i discussió

De les observacions que vam fer a l'escola la majoria corresponien a les zones superiors i superficials de les columnes degut a que eren les zones on trobàrem més biodiversitat de microorganismes eucariotes, que eren els que podíem estudiar més bé amb els recursos disponibles a l'escola, i també resultaven més interessants i espectaculars des d'un punt de vista morfològic i cromàtic. Cal fer constar que l'observació directa és molt més variada i rica en detalls que les fotografies que aconseguíem fer, entre altres coses perquè molts dels microorganismes presenten moviment actiu ràpid (per cilis o per flagels) i d'altres, com les diatomees, es mouen per lliscament, de forma passiva, però ben aparent a mitjans i alts augments. Tot això fa que en les microfotografies surtin moguts, desenfocats, o senzillament ni surtin, com passa amb molts bacteris. El millor en aquests casos, com ja hem comentat, és fer una gravació de vídeo en alta definició i després realitzar captures de pantalla en un ordinador que disposi de pantalla d'alta resolució. Aquest tipus de gravacions en alta definició d'observacions "in vivo" les férem al Departament de Microbiologia de la Facultat de Biologia de la UB amb un microscopi que ens va proporcionar el Dr. Jordi Urmeneta el dia que va venir al Departament la meua companya Júlia Alguacil amb mostres de la part superior de les columnes de Winogradsky i d'altres indrets que li interessaven pel seu treball (vegeu annex fotocronològic del dia 23/07/2013)<sup>16</sup>.

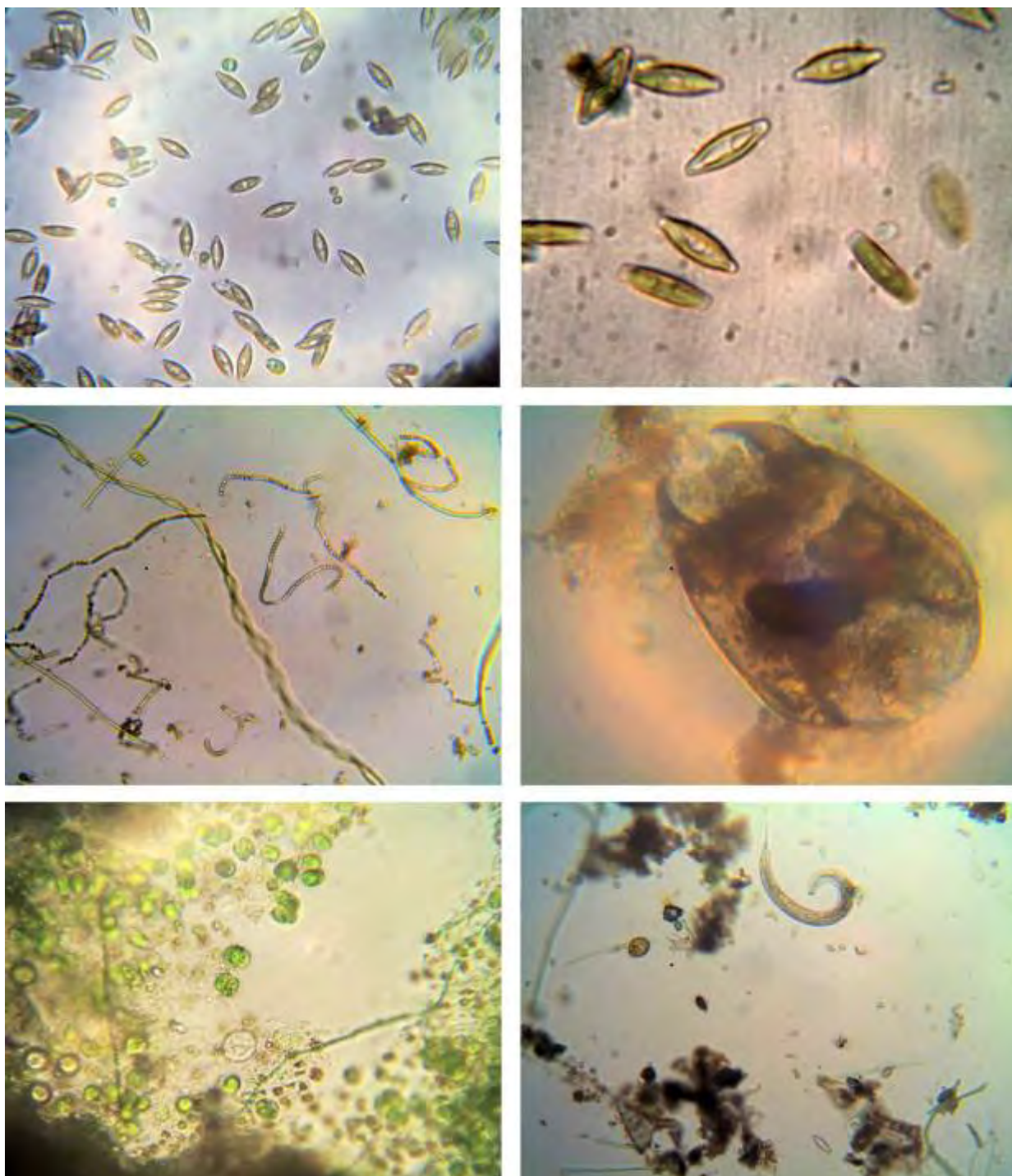
Gràcies a les constants observacions que van tenir lloc (vegeu annex fotocronològic del dia 4/07/2013 i del dia 11/07/2013) vam poder comprovar que els biofilms marrons de la zona superior de les columnes estaven formats per varies espècies de diatomees (Figura 15, a dalt). També vam observar que les taques verdes superficials hi predominaven algues verdes i cianobacteris.

<sup>16</sup> La tecnologia aplicada de captura d'imatge de vídeo està explicada en el treball de recerca de Júlia Alguacil.

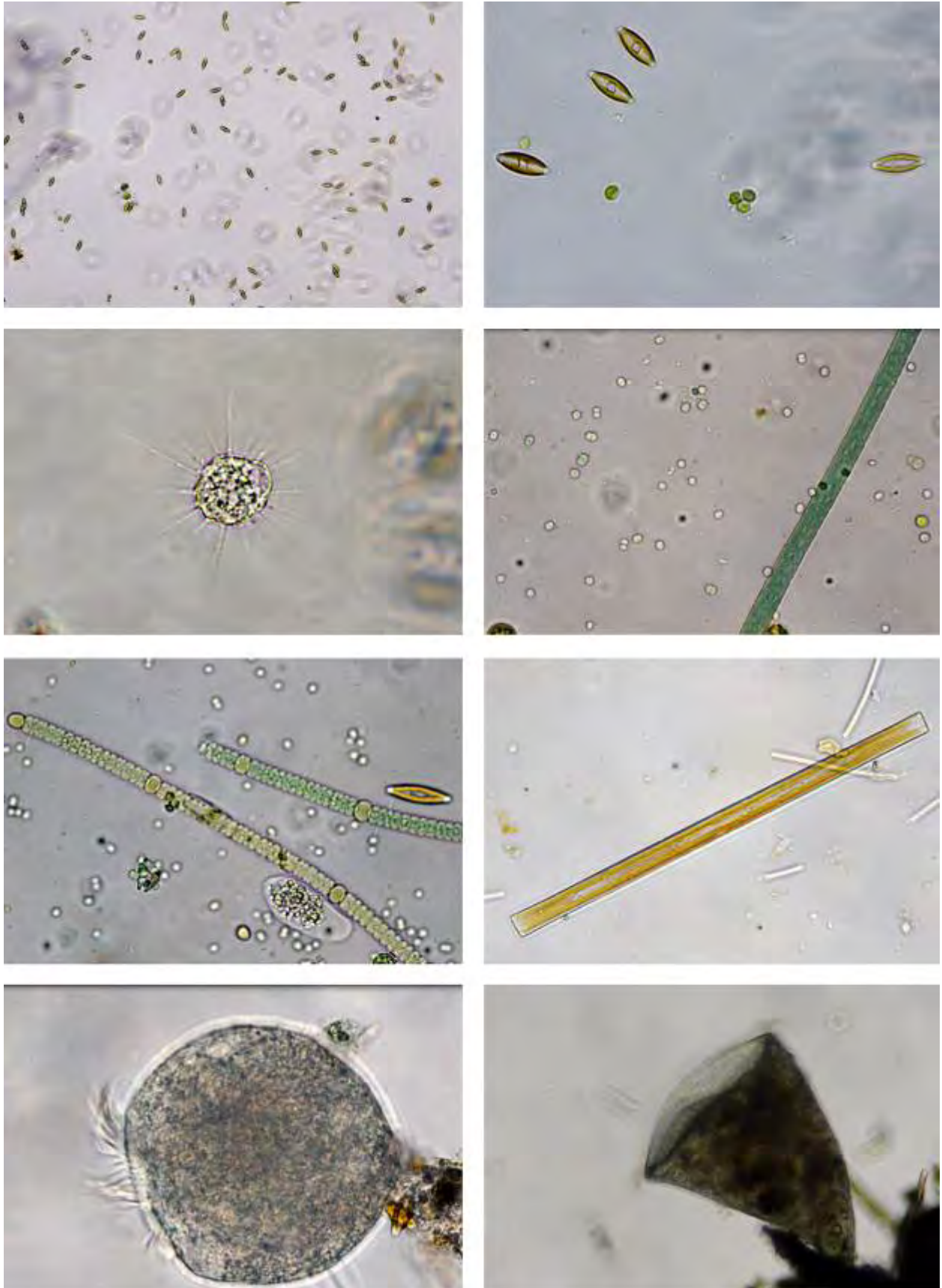
Amb l'ajut de guies de camp de microorganismes d'aigua dolça vam poder identificar alguns dels organismes que vam trobar, com per exemple, entre les algues verdes, vam trobar *Scenedesmus acuminatus*, *Chlorella vulgaris* (que hi abundava en gran quantitat a la superfície de la columna 4), *Scenedesmus longispina*, *Pleurococcus vulgaris*,...

També vam trobar altres organismes que eren més difícils d'identificar; és el cas d'heliozous, d'alguns ciliats, cianobacteris, rotífers i cucs microscòpics i restes diverses com el cap d'un insecte (Figura 15, al mig), dels que només arribàrem a determinar-ne el grup.

Com era d'esperar, la qualitat fotogràfica aconseguida amb l'equip del Dr. Urmeneta és molt superior (Figura 16) a l'obtinguda a l'escola.



**Figura 15.** Alguns dels microorganismes que vam poder observar mitjançant el microscopi òptic de l'escola. Diatomees a dos nivells d'augment diferents (a dalt), cianobacteris (al mig, a l'esquerra), cap d'insecte (al mig, a la dreta), algues verdes unicel·lulars (a baix, a l'esquerra) i un cuc nematode (a baix, a la dreta).



**Figura 16.** Microfotografies corresponents a captures de vídeo realitzades amb l'equip de microfotografia del Departament de Microbiologia de la Facultat de Biologia. S'hi poden observar diatomees, un rizòpode, cianobacteris i protozous ciliats.

## 4. Identificació del bacteris

Després d'haver aïllat les espècies de bacteris en cultius purs ja es pot donar lloc al procés d'identificació d'aquestes espècies aïllades. En aquest apartat s'explica tots els processos que tenen lloc per poder arribar a la seva identificació i classificació. Aquest procés es va realitzar al Departament de Microbiologia de la Facultat de Biologia de la UB, seguint els protocols de pràctiques i les explicacions proporcionades directament pel Dr. Urmeneta.

### 4.1 Aïllament per cultiu

Un dels nostres objectius era aconseguir identificar algunes de les espècies de bacteris heterotròfics que habitaven a les nostres columnes de Winogradsky, per poder fer això primer és necessita aïllar de la resta l'espècie de bacteri que es vol identificar i un cop fet això fer un cultiu amb només aquesta espècie, és a dir un cultiu pur. En aquest apartat s'expliquen els mètodes que hem utilitzat per poder aïllar i cultivar algunes espècies bacterianes de les mostres de les nostres columnes.

#### 4.1.1 Metodologia

A una sola mostra de les columnes de Winogradsky hi ha milers d'espècies de bacteris diferents. Per poder cultivar una de sola primer s'ha d'utilitzar un mètode per separar les espècies bacterianes de la mostra, i d'aquesta forma escollir-ne una per cultivar a part. Per fer aquesta separació hi ha dos mètodes: el cultiu per estries d'esgotament i el cultiu d'extensió.

Primer de tot, s'ha de preparar el medi de cultiu. Aquest depèn del tipus de bacteri que es vulgui cultivar, en el nostre cas vam utilitzar un medi de cultiu per a bacteris d'aigua dolça, ja que l'aigua i el sediment que vam utilitzar per a les columnes provenien del bassal del pati de les tortugues. Aquest medi de cultiu és un medi gelatinós format per agar-agar<sup>17</sup> i els nutrients que seran necessaris per al cultiu de bacteris. La preparació d'aquesta gelatina es fa dissolent en aigua els nutrients, i també s'afegeix l'agar-agar com a agent gelificador. Un cop preparada s'esterilitza la dissolució a 121°C durant uns 20 minuts i un cop esterilitzada, es deixa reposar una estona per a que es refredi un mica. Quan ja no estigui tan calenta (estigui aproximadament a 55 °C) es va decantant a les plaques de petri en un ambient estèril, per a això s'agafa un bec bunsen. S'obre i s'encén la flama amb un llumí, així si es treballa al costat de la flama s'estarà en un medi estèril ja que la flama provoca una corrent d'aire ascendent que s'emporta tots els microorganismes que hi pugui haver. Es va decantant la dissolució fins la meitat de cada placa de petri i quan ja s'ha acabat es deixa refredar per a que solidifiqui. Per conservar les plaques preparades es mantenen en un frigorífic a 4°C.

Un cop ja es tenen els medis de cultiu es pot fer un dels sistemes d'aïllament de bacteris. Per fer qualsevol cultiu de bacteris s'ha de treballar en un medi estèril, per tant s'ha de treballar al costat de la flama d'un bec bunsen.

---

<sup>17</sup> Polímer format per diferents polisacàrids.

Un dels mètodes de cultiu per poder separar les diferents espècies de bacteris és el mètode per estries d'esgotament (vegeu annex fotocronològic del dia 18/07/2013) que consisteix en utilitzar una nansa d'inoculació<sup>18</sup>, que s'ha d'esterilitzar prèviament a la flama del bec bunsen i deixar-la refredar durant alguns segons. Es remou una mica el eppendorf amb la mostra que es vol cultivar per a que quedi homogeni i tots els microorganismes estiguin repartits per igual i llavors es posa la punta de la nansa dins del eppendorf. Per assegurar-se que la nansa està totalment freda es pot tocar prèviament la paret de l'eppendorf abans de posar la punta dins de la mostra. Es reparteix la mostra de forma que es creï un recorregut format per ratlles en zig-zaga, sense aixecar la nansa del medi de cultiu, des d'un extrem a l'altre de la placa, procurant que les ratlles del final estiguin més separades entre ells que les del principi; un cop s'ha repartit per tot el medi es torna a tancar, i tot aquest procés al costat de la flama del bec bunsen per a mantenir l'esterilitat del medi de cultiu. Al principi de l'estria el creixement de les colònies és confluent i no permet un aïllament, però progressivament es van generant menys colònies i cap al final de l'estria el cultiu ha generat colònies aïllades, amb la seva morfologia característica.

L'altre mètode, el mètode per extensió, consisteix en utilitzar una nansa de Digrafsky<sup>19</sup>, que s'esterilitza mullant-la en etanol i cremant aquest a la flama i repetir això dos cops més. Per distribuir la mostra s'ha d'agafar una micropipeta, ajustar-la per a que agafi 100 microlitres, i se li posa la punta que ha d'estar prèviament esterilitzada. També s'ha de tenir amb compte que per cada cultiu que es fa s'ha de canviar la punta ja que aquesta com ha estat utilitzada ja no és estèril i per tant és llença a un contenidor específic. S'agafa la quantitat especificada de la mostra i es disposa al medi de cultiu on es reparteix uniformement per tota la superfície, utilitzant la nansa de Digrafsky prèviament esterilitzada i un cop acabat es tapa el medi de cultiu. Aquest mètode fa que, a mesura que es van repartint tots els bacteris de la mostra de forma més o menys uniforme per tota la superfície del medi de cultiu, es puguin veure les colònies separades un cop hagin aparegut.

Independentment de quin ha estat el mètode utilitzat a mesura que es van preparant els cultius s'ha d'apuntar un codi amb un retolador permanent que permeti reconèixer quin és. En el nostre cas a cada cultiu vam apuntar el codi de la mostra a la que pertanyia i la data del dia que els vam preparar. Quan s'han preparat tots s'han de col·locar a l'estufa de cultiu, que és una incubadora on es poden ajustar les condicions de temperatura idònies per al creixement dels bacteris que en el nostre cas eren 25°C. Els bacteris es reproduïxen de forma binària, és a dir, cada bacteri es divideix en dos de nous, i cada una d'aquestes reproduccions tenen lloc més o menys cada 30-60 min (depenent del tipus de microorganisme). Això provoca que si estan en un ambient idoni per a la seva reproducció al cap de 24h ja s'hauran format les colònies de bacteris. Si en la preparació s'afegeix una quantitat massa gran de la mostra és possible que al formar-se les colònies la majoria s'acabin fusionant i per tant no es puguin distingir les colònies d'una espècie determinada. D'aquestes es pot fer un conteig de les colònies que s'han format i així trobar el nombre d'unitats formadores de colònies que hi havia en el moment en que es va fer la sembra.

---

<sup>18</sup> Nansa que té un punta constituïda per un fil de nicrom que acaba en un cercol petit.

<sup>19</sup> Nansa de vidre que té una estructura triangulada al final.



Si ha sortit bé i es poden distingir les diferents colònies bacterianes ja es pot intentar fer un cultiu pur<sup>20</sup>. Per això es repeteix el sistema de sembra de les estries<sup>21</sup> però aquest cop es recull una mostra de la colònia bacteriana que es vol aïllar, i a mesura que es van preparant els cultius es va posant el codi d'identificació que correspondria al mateix codi que el del cultiu d'on s'ha extret la mostra, però en el cas de que s'hagin extret més d'una mostra d'un cultiu es numera per diferenciar-les de la resta, i també es posa la data de quan s'ha fet. Un cop ja s'han preparat tots els cultius es posen a l'estufa de cultiu en les mateixes condicions que la primera sembra. Per tant trigarà al voltant de 24h en desenvolupar-se.

En el cas de que un dels cultius que s'ha preparat no hagi sortit totalment pur i es volen separar les diferents espècies bacterianes que hi han en ell, s'utilitza el mètode de sembra de les estries escoceses, que és igual al de les estries a diferència de la repartició que té lloc, que en aquest cas es comença a repartir des d'un costat de la placa varies estries paral·leles fins a un altre costat de la placa (aquest no ha de ser el costat oposat), s'esterilitza la nansa de sembra, es refreda en el medi de cultiu i es fan unes noves estries paral·leles, passant per sobre les anteriors amb un cert angle i es va repetint aquest procés fins que ja no es poden fer més estries pel costat i s'encaren unes últimes estries cap al centre del medi. Amb aquesta tècnica hi ha una repartició tan exhaustiva dels bacteris que al final de les estries a penes es formen colònies i les que es formen es poden distingir bé i el més segur es que siguin colònies pures, d'una sola espècie de bacteri (Figura 17). Tot el procés es realitza al costat de la flama del bec bunsen per a mantenir les condicions d'esterilitat.

#### 4.1.2 Resultats i discussió

En el nostre cas, per cada mostra de les columnes que teníem vam fer dues sembres, una per estries d'esgotament i l'altra per extensió, per tant d'una mostra apareixien 2 nombres nous per codi, sent 01 i 02.

De la primera sembra no es van aprofitar tots el cultius per fer cultius pur. Es va fer una selecció de les colònies dels cultius en les que teníem bastant interès. Si les colònies eren de diferents cultius, però eren massa semblants, optàvem per només fer-ne una. D'aquesta manera al final es van preparar 10 cultius purs: 4sc(v)/03, 2L'/01, 4sc(v)/01, 2sb(v)/03, 1L/01, 4sc(v)/02, 2sb(v)/02, 2sb(v)/01, 2sb/02 i 2sb/01.



**Figura 17.** Distribució d'un cultiu fet mitjançant el mètode de les estries escoceses.

<sup>20</sup> Cultiu format només per bacteris d'una mateixa soca.

<sup>21</sup> No es pot el d'extensió perquè la mostra s'agafa directament amb la nansa d'inoculació.

## 4.2 Tinció de Gram

La tinció de Gram és un procés que no permet identificar l'espècie bacteriana però que permet trobar una característica dels bacteris que és el gram mitjançant l'ús d'uns colorants específics. Aquesta característica fa una diferenciació dels bacteris en gram-positius, que presenten una paret bacteriana gruixuda, i els gram-negatius, que tenen una paret bastant més prima i presenten una membrana externa. Aquesta característica junt amb altres permetrà que es pugui confirmar que la identificació és correcta ja que si les característiques definides de la espècie no concorden amb el gram significarà que hi ha hagut alguna confusió en la resta del procés d'identificació

### 4.2.1 Metodologia

Abans de començar a fer la tinció de gram s'ha de preparar la mostra per a que es pugui tenyir i més tard poder observar al microscopi. Llavors, treballant al costat d'un bec bunsen engegat per a que el medi sigui estèril, amb l'ajut de la nansa d'inoculació, que s'esterilitza prèviament a la flama del bec bunsen, s'endinsa en aigua destil·lada i es deixa caure una gota sobre un portaobjectes. S'esterilitza la nansa a la flama i s'agafa una petita mostra (es suficient amb tocar-ho) de bacteris d'un cultiu pur i s'estén per el portaobjectes amb la gota de forma circular. L'únic que falta per a començar la tinció és fixar la mostra al portaobjectes perquè no s'elimini durant els rentats. Per fixar-la es passa ràpidament el portaobjectes amb la mostra per la flama del bec bunsen, aproximadament 3 cops<sup>22</sup>. Es pot saber que la mostra esta fixada si l'aigua que hi havia s'ha evaporat. S'ha de vigilar no passar-se massa temps a la flama perquè pot provocar que es cremin els bacteris i els gram-positius es vegin com a gram-negatius<sup>23</sup>.

Un cop ja estan fixades les mostres es pot procedir a la tinció de gram. Primer s'ha de fer la tinció en algun lloc que pugui contenir residus químics i que alhora els portaobjectes es puguin aguantar al forat. Es col·loquen els portaobjectes al forat del contenidor (els que hi càpiguen) i s'agafa un colorant anomenat cristall violeta. Aquest es posa sobre les mostres<sup>24</sup> fins que quedin ben recobertes i es deixa actuar durant un minut. El que fa el cristall violeta és tenyir de violeta tots els bacteris, tan els gram-positius com els gram-negatius. Un cop ha passat un minut es renten les mostres amb aigua destil·lada per a que el cristall violeta sobrant se'n vagi i acte seguit s'agafa el lugol, es posa sobre les mostres de la mateixa forma que el cristall violeta i es deixa actuar un altre minut. El que fa el lugol és reforçar la tinció del cristall violeta. Un cop passat el minut es torna a afegir aigua destil·lada per a que se'n vagi el lugol i llavors es renta la mostra amb etanol (decoloració) i després es torna a afegir aigua per treure l'etanol sobrant. El que fa l'etanol és destenyir de cristall violeta els bacteris gram-negatius, ja que l'alcohol pot penetrar a la seva paret bacteriana, mentre que els gram-positius queden intactes degut a que aquest no pot traspasar la seva paret cel·lular. Llavors utilitzem la safranina, un colorant rosat, i es posa sobre les mostres de forma que quedin ben cobertes i es deixa actuar un minut. El que fa la safranina es tenyir els bacteris gram-negatius (degut a que en els gram-positius que estan tenyits amb el cristall violeta no es pot detectar el rosat de la safranina) agafant una

---

<sup>22</sup> Es pot comprovar que s'ha fet bé tocant-ho amb la mà, ha d'estar calent però que no cremi.

<sup>23</sup> Aquest pot ser un dels errors per que no concordi amb la identificació posterior.

<sup>24</sup> Amb un comptagotes, normalment ja estarà amb el flascó del colorant.

tonalitat rosa. Finalment es torna a rentar la mostra aigua destil·lada per treure la safranina sobrant. Totes les substàncies que han quedat al contenidor s'han de llençar al contenidor de residus químics.

Les mostres que han estat tenyides poden ser observades pel microscopi amb la tècnica d'immersió<sup>25</sup>. Com ja s'ha mencionat anteriorment els bacteris gram-positius estaran tenyits de color violeta mentre que els gram-negatius ho estaran de color rosa. A més de la tinció en podem observar la forma podent-los classificar, a partir de les 4 formes bàsiques (bacils, cocs, espirils i vibris).

#### 4.2.2 Resultats i discussió

Dels cultius purs que teníem vam fer la tinció de gram i després d'això els vam observar al microscopi amb la tècnica d'immersió (vegeu apartat 3.2.1 i annex fotocronològic del dia 18/07/2013 i 23/07/2013). D'aquesta forma vam poder classificar les soques aïllades segons la seva morfologia i la seva tinció de gram i es va observar que alguns dels cultius no eren realment cultius purs (Figura 18, a dalt):

-Gram positiu: 4sc(v)/02(bacil), 4sc(v)/01(bacil), 1L/01(bacil que forma cadena), 2sb/01 (bacil), 2sb/02 (bacil), 2sb(v)/02 ( bacil) i 2L'/01 (bacil).

-Gram negatiu: no en va aparèixer cap.

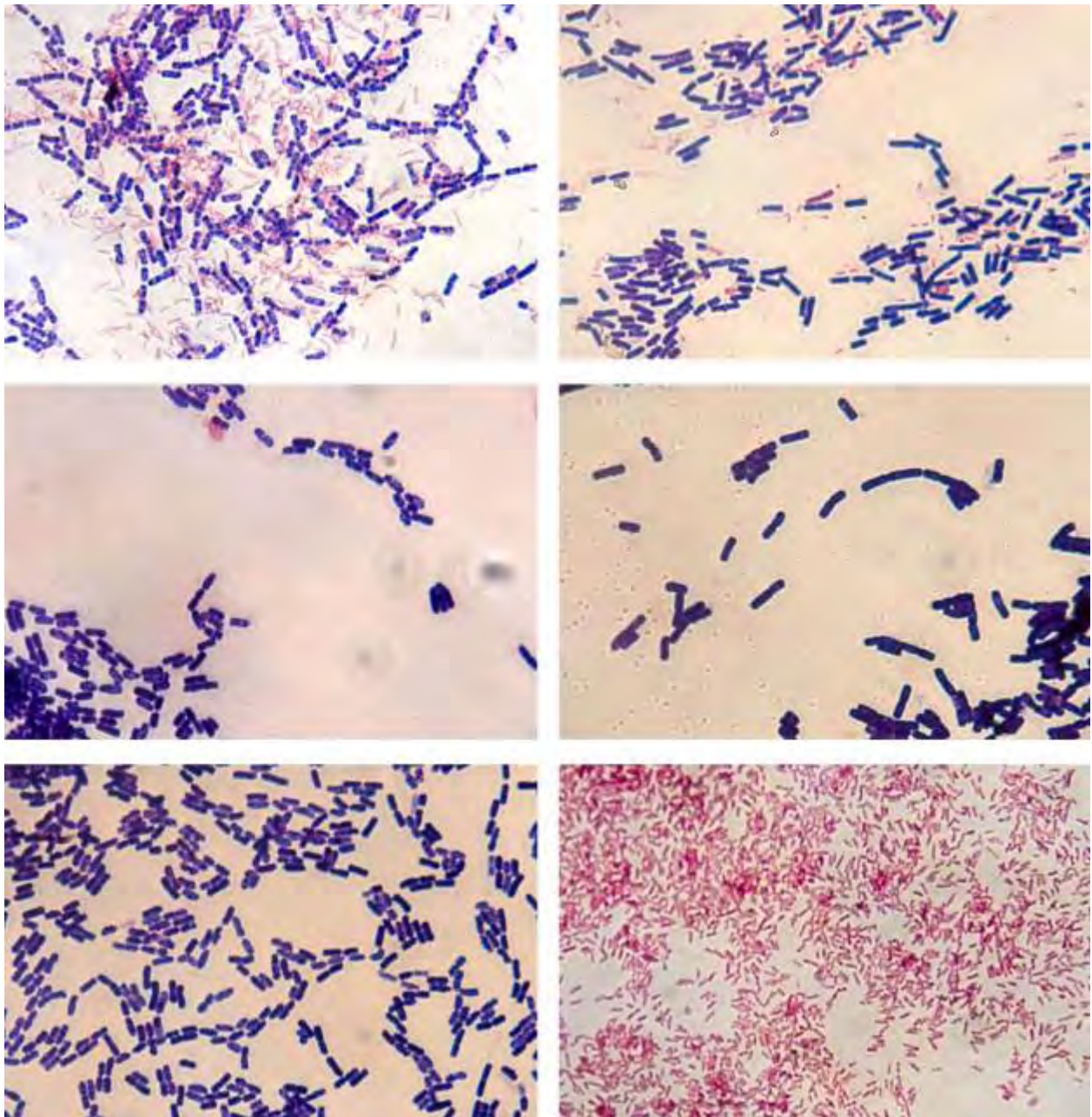
-Cultiu no pur: 4sc(v)/05 i 2sb (v)/03.

Amb els cultius que no eren purs vam decidir fer una nova sembra mitjançant la tècnica de les estries escoceses (mirar apartat pàgina). Per tant d'aquest van sorgir 4 més i d'aquest vam fer la tinció de gram i aquests van ser els resultats: 2sb(v)/06 (impur, format per bacils i cocs), 2sb(v)/05 (bacils gram-negatius), 4sc(v)/05 (bacils gram-positius), 4sc(v)/04 (bacils gram-positius).

A més d'aquests vam trobar en un cultiu una colònia curiosa perquè era d'un color ataronjat al cultiu 4ss' així que vam decidir fer també estries escoceses amb aquests (per assegurar que és pur) i van sortir dues noves colònies de les quals es va fer la tinció de gram. Els resultats van ser que el 4ss'/04 eren bacils gram-negatius i el 4ss'/03 eres bacils gram-positius que formaven cadenes, és a dir, estreptobacils (Figura 18).

---

<sup>25</sup> Llegir apartat de metodologia de la observació microscòpica

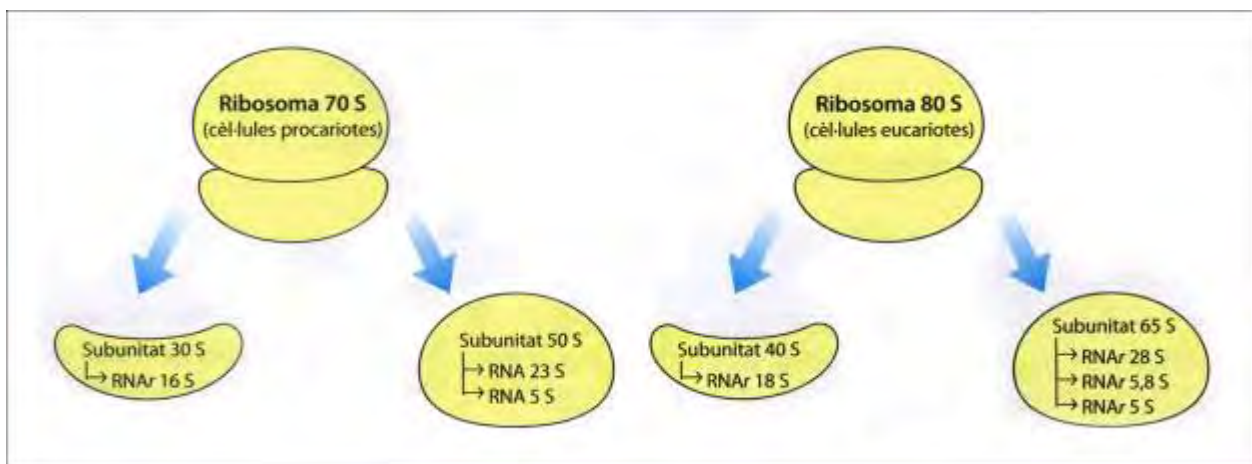


**Figura 18.** Imatges de l'observació microscòpica (amb la tècnica d'immersió) de les soques de bacteris aïllades, gram-positius (liles), gram-negatius (rosats) i impurs (contenen bacteris dels dos colors).

### 4.3 Seqüenciació del gen 16S DNAr

Per poder identificar els bacteris el mètode actualment més precís és a través de la identificació del seu DNA, que en el cas dels bacteris el millor sistema per assegurar la seva identificació és a través de la seqüència del gen que codifica per l'RNA ribosòmic 16s. Per poder fer això a partir de les nostres mostres de bacteris es faran el processos de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR), la electroforesi en gels d'agarosa dels productes de l'amplificació i la seqüenciació dels fragments obtinguts.

L'RNA ribosòmic (RNAr) és l'RNA que constitueix els ribosomes. Representa el 60% del pes d'aquests orgànuls. Units a les proteïnes ribosòmiques, originen en els ribosomes llocs adequats per donar allotjament a l'RNA missatger (RNAm) i també als RNA de transferència (RNAt) en la síntesi de proteïnes. El pes dels RNAr i dels ribosomes se sol expressar segons el *coeficient de sedimentació d'Svedberg*. Aquest coeficient és directament proporcional a la velocitat de sedimentació de la partícula durant la ultracentrifugació<sup>26</sup>. Suposant que la partícula sigui esfèrica, com que la velocitat de sedimentació depèn de la massa de la partícula, a partir d'aquest coeficient se'n pot calcular el pes molecular. El coeficient de sedimentació s'expressa en unitats svedberg (S), en què un svedberg equival a  $10^{-13}$  segons. Les cèl·lules procariotes presenten ribosomes de 70S, i les cèl·lules eucariotes, de 80 S (Figura 19).



**Figura 19.** Ribosomes de les cèl·lules procariotes (70S) i de les cèl·lules eucariotes (80S), amb les seves subunitats i l'RNA corresponent. En el cas concret de l'RNA 16S es pot observar que correspon a la subunitat petita del ribosoma 70S (esquerra de la imatge).

### 4.3.1 Metodologia

El primer procés, el de la PCR que té lloc a una màquina anomenada termociclador, consisteix en la replicació de la cadena de DNA dels bacteris de les mostres. Per a que tingui lloc aquest procés el primer que s'ha de fer és aconseguir aïllar les cadenes de DNA i abans s'ha d'extreure dels bacteris.

Per poder extreure el DNA dels bacteris primer es posa una certa quantitat de les mostres (una o dues colònies) en un eppendorf amb aigua destil·lada estèril que es numeren per distingir-los entre si i saber de quin mostra de bacteris provenen. Tots els tubs preparats d'aquesta manera es posen a 100°C durant 15 minuts en un bany d'aigua per a que la membrana cel·lular dels bacteris es trenqui i tot el contingut surti a l'exterior. Per assegurar que s'hagin trencat les membranes es posen al congelador durant 15 minuts i posteriorment es tornen a posar uns

<sup>26</sup> procés de centrifugació que es duu a terme amb una ultracentrífuga, aparell que aconsegueix camps centrífugs de 250.000 vegades l'acceleració de la gravetat.

altres 15 minuts a 100°C. Això es fa per a que les cèl·lules es trenquin per gelifracció<sup>27</sup>. Com el DNA ja està extret, per poder aïllar-lo de la resta de cossos que pertanyien a l'interior dels bacteri, es mostres s'han de centrifugar ja que com el DNA és menys dens que la resta de cossos, després de la centrifugació quedarà distribuït a la zona superior. Un cop centrifugat, amb una micropipeta (tenint en compte que per cada mostra que es prepara s'ha de canviar la punta) s'extreuen 5 microlites de sobrenedant de les mostres, ja que és on se situa el DNA i es posa en uns eppendorf a part que es numeren igual que d'on prové.

En uns eppendorf especials per al termociclador es posen els 5 microlites de la suspensió de DNA, el número amb el que estava marcat l'eppendorf d'on prové la mostra i tots els elements necessaris per a la replicació del DNA<sup>28</sup>: les bases nitrogenades (o dNTPs) que formen les rèpliques del DNA, la Tag DNA polimerasa que va formant les cadenes de DNA complementàries i els encebadors o *primers* que reconeixen el DNA motlle i posen les primeres bases nitrogenades de les repliques perquè les DNA polimerases les necessiten per a seguir fent la cadena. En el nostre cas vam utilitzar els primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGG CTCAG) i 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT). Quan ja estan preparades les mostres es col·loquen al termociclador que manté les condicions de temperatura ideals per a la replicació del DNA durant els diferents cicles. En aquest cas es fan al voltant de 20 a 30 cicles el quals estan dividits en 3 etapes: la primera, a 90°C, consisteix en la desnaturalització de la cadena de DNA, que dura menys d'un minut. El segon, baixant la temperatura a voltants del 50°C, consisteix en la unió dels encebadors a les cadenes motlle, també dura aproximadament un minut. La tercera, a voltants dels 75°C, es on actua la DNA polimerasa i fa la replica del DNA motlle, aquest dura 2 minuts. Tenint en compte el temps entre cada etapa del cicle, cada un dura uns 6 minuts i segons la quantitat de cicles que es volen fer, en aquest cas 20, es tarda 2h en acabar el procés.

Per visualitzar els productes de l'amplificació un cop ha acabat el procés de la PCR es passa a fer el procés de l'electroforesi que consisteix en el transport de molècules mitjançant l'ús de camps elèctrics. Per tant permet saber si les replicacions s'han produït correctament ja que aquestes es disposaran a un lloc concret i significarà que es pot fer la seqüenciació del gen DNAr 16s.

Per fer l'electroforesi es tenyeixen les mostres amb un colorant blau (tampó de càrrega). A part, es prepara un gel d'agarosa que es posa en un motlle quan està en estat líquid i a sobre es posa una pinta que en el moment en que es solidifiqui li deixarà uns pouets distribuïts en la mateixa direcció (generalment són 10 pouets). Es col·loca el gel a la cubeta d'electroforesi que ha d'estar coberta de tampó TBE i al primer pouet es posa el marcador de pes molecular que és un sistema de referència per saber on s'ha de disposar el DNA en el moment de fer l'electroforesi si surt correctament. A la resta de pouets es posen totes les mostres que contenen el DNA, tenint en compte quina mostra és a cada pouet i llavors s'engega i s'espera fins que acabi el procés, al cap de 45 minuts.

Un cop ha acabat l'electroforesi es treu el gel i es posa amb una espàtula de plàstic en remull en una solució de fluorocrom que s'uneix al DNA (en el nostre cas SybrGreen). I al cap d'una estona es treu i es porta a un visualitzador de gels (un aparell que emet llum ultraviolada). Amb

---

<sup>27</sup> Trencament causat a partir de la descompressió provocada pel gel.

<sup>28</sup> Generalment aquests es poden comprar junts en un pack

la llum ultraviolada es poden observar les bandes de les mostres del DNA. Si les bandes surten de la mida esperada significarà que el procés ha sortit correctament i es pot passar a la seqüenciació del producte de la PCR que hem amplificat. Si no surt no es pot continuar perquè o no hi ha suficient DNA, o hi ha hagut residus que han impedit que es pugui fer bé la replicació,... Però el cas es que no es pot fer la seqüenciació del gen 16s DNAr.

La seqüenciació del gen 16s DNAr consisteix en l'ús d'uns *primers* específics que repliquen un segment del gen 16s DNAr. Aquests *primers* s'anomenen 518F (5'- CCAGCAGCCGCG GTAATACG), que a partir d'un cert punt del gen (la posició 518 en el gen d'*E.coli*) fa la replicació en la direcció *forward*, i el 800R (5'- TACCAGGGTATCTAATCC), que a partir d'un cert punt (la posició 800 en el gen d'*E.coli*) fa la replicació en la direcció *reverse*. Les seqüències obtingudes tindran una zona en comú que ens permetrà fer-ne l'alineament i per tant la posterior fusió en una. Aquest procés es pot fer amb l'ajut de diferents eines bioinformàtiques.

En el nostre cas per fer la seqüenciació vam enviar les mostres vàlides a la empresa MacroGen a Holanda aprofitant que s'enviaven altres mostres del grup de recerca per tal d'economitzar costos.

### 4.3.2 Resultats i discussió

De les mostres de les quals havíem fet la tinció de gram només en vam escollir 9 per començar aquest procés degut a que en el procés d'electroforesi es feien 10 pouets al gel i al primer es posava el marcador de pes molecular i per tant els 9 restants eren els espais que quedaven per a les mostres. Llavors vam fer una altra selecció i a cada una li vam assignar un número: 4sc(v)/06 (1), 1L/02 (2), 4sc(v)/ 01 (3), 4ss'/04 (4), 2sb(v)/06 (5), 1L/01 (6), 4sc(v)/02 (7), 4ss'/02 (8) i 2sb/02 (9).

Al final de l'electroforesi vam poder comprovar que només les mostres 5, 6, 7, 8 i 9 havien amplificat de forma adequada i per tant aquestes podien anar al següent pas que era la seqüenciació.

## 4.4 Identificació genètica

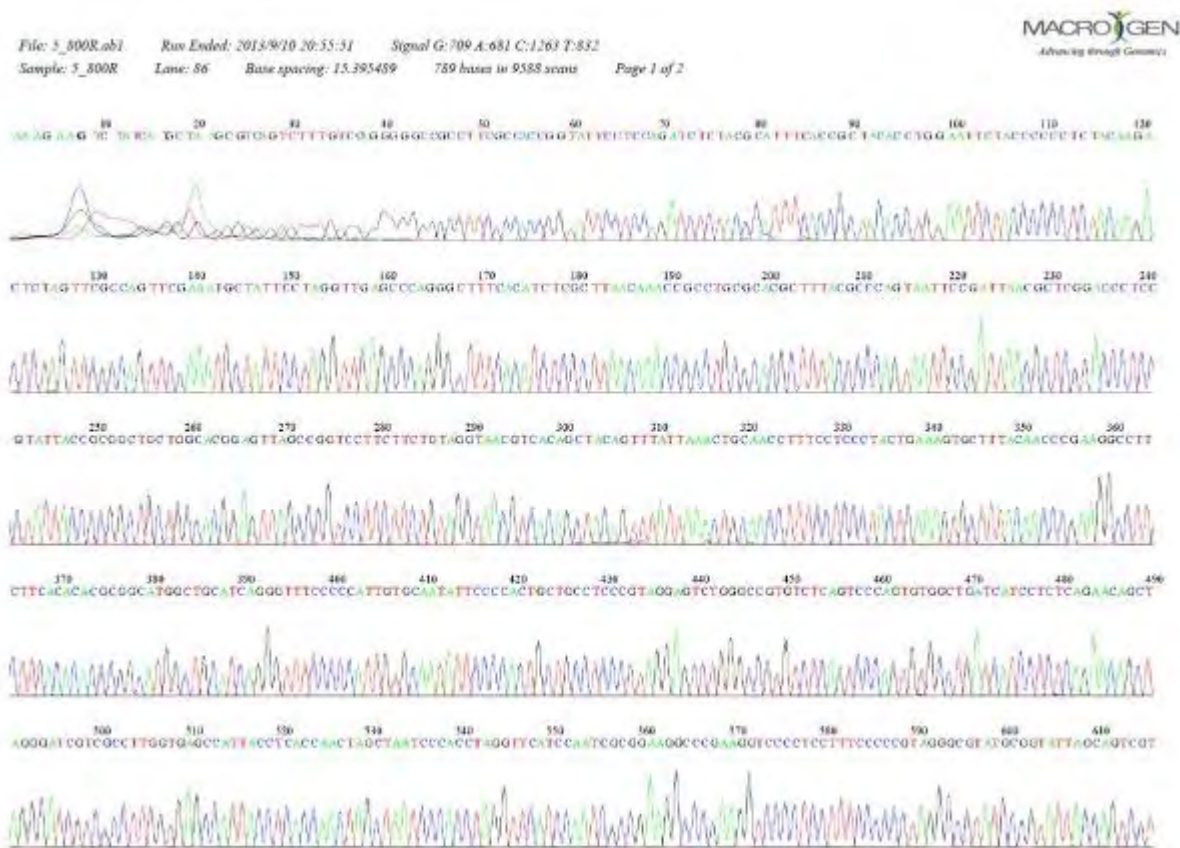
A partir de la seqüenciació dels fragments obtinguts en la PCR, utilitzant els *primers* 518F i 800R, s'obtenen dues seqüències parcials del gen 16s DNAr. Per poder unir les dues seqüències ja no fan falta més processos químics, a partir d'aquest punt es poden utilitzar els ordinadors per a fer aquesta unió dels fragments que ens permetria tenir la seqüència gairebé completa del gen 16s DNAr i a partir d'aquí identificar a quina espècie pertany el DNA i per tant identificar quina era l'espècie de bacteri de la mostra inicial.

Amb l'ajut de programes informàtics es pot trobar tota la cadena del gen 16s DNAr i a partir d'aquesta trobar a quina espècie pertany. Això ja forma part de l'àmbit de la bioinformàtica. La utilització d'algunes de les eines bioinformàtiques estan àmpliament explicades en un treball de recerca anterior ("Iniciació a la bioinformàtica a través de les tortugues de l'escola" de Rubèn

Marías, 2012) i aquí només s'esmentaran alguns dels aspectes que es consideren rellevants en quant al diferent procés que hi té lloc.

#### 4.4.1 Metodologia

De les seqüències de bases nitrogenades dels dos fragments que ens van enviar de Macrogen hi havia dos tipus, uns bloc de notes amb la seqüència de DNA del fragment corresponent de cada mostra en format FASTA<sup>29</sup> i uns altres arxius PDF que contenen els electroferogrames<sup>30</sup> de les seqüències de bases nitrogenades obtinguts de cada mostra a partir dels primers 518F i 800R. A sota de cada base nitrogenada hi havia una petita línia que indicava la probabilitat de que fos aquella base nitrogenada (Figura 20).



**Figura 20.** Exemple d'electroferograma (aquest correspon a la mostra 5), enviat per l'empresa Macrogen, on es mostren les probabilitats de quin és el nucleòtid corresponent a la seqüència de DNA, de forma que es pogués destriar quins nucleòtids no eren viables per a la identificació genètica.

<sup>29</sup> Format introduït per un > i el seu títol corresponent

<sup>30</sup> Un electroferograma és un gràfic realitzat amb els resultats d'un anàlisi per electroforesi (en aquest cas la seqüència de dades produïda per una màquina automàtica de seqüenciació de DNA).



En el cas de que sortissin línies d'altres bases nitrogenades ho feia massa dubtós com per assegurar que forma part de la cadena. Si la gran majoria de la cadena tenia aquestes línies significa que es massa dubtós i per tant la cadena no és vàlida. En aquest cas es podia tornar a enviar les mostres a Macrogen per a que ho repetissin gratis. Als punts on podia passar això eren al principi i al final de cada fragment perquè l'error és cada cop més gran a mesura que avança la seqüència. Així, els fragments dubtosos han de ser eliminats de les cadenes que estaven en el bloc de notes. Un cop eliminats s'ajunten en el mateix bloc de notes els dos fragments 518F i 800R d'una mateixa mostra però mantenint els separats formats FASTA.

Quan es té els dos fragments en un mateix bloc de notes es pot utilitzar un programa online anomenat Mafft que serveix per comparar les dues cadenes en el bloc de notes i les uneix per la part que coincideixen. Per fer això es va a la pàgina de mafft: <http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>. Un cop allà es va a la [online version](#) i s'ha d'assegurar que estigui marcada la opció [alignment](#) que es la opció que ens permet alinear les cadenes dels fragments 500F i 800R. Al requadre on a sobre posa input s'enganxen les dos cadenes 500F i 800R en format FASTA i a la opció [Direction of the nucleotids sequences](#) es marca la segona opció ja que aquesta permet diferenciar les dues cadenes, considerant que una es *reverse* i l'altra *forward*. Un cop fet això es pitja el botó [submit](#) i llavors apareixen les dues cadenes alineades i unides a la part que coincideixen. D'aquesta forma es pot copiar tota la cadena del gen 16s DNAr i enganxar-la al bloc de notes on estan els fragments 518F i 800R, i a sobre de la cadena completa es fa un format FASTA posant el que es vol com a títol d'aquest text. Aquest pot ser la identificació de que és el gen 16s DNAr i la mostra a la que pertany.

#### >Cadena completa gen 16s DNAr – mostra 5

Aquest nou FASTA serveix per al següent pas que és la identificació de l'espècie que es fa a través del programa online Blast. Per utilitzar aquest programa, es va a la pàgina principal<sup>31</sup> i es selecciona l'opció [Nucleotide Blast](#), per especificar la identificació mitjançant seqüències de DNA. A la següent pàgina, on et demana d'introduir el format FASTA, s'introdueix la seqüència de DNA que prèviament s'havia completat gràcies a l'ús del programa Mafft. S'ha d'asegurar que la Database, una opció disponible més a vall, tingui la opció [nucleotide collection](#) seleccionada. Un cop està tot llest es clica el botó blast i d'aquí fa una llista de les possibles espècies a la que pot pertànyer una cadena de DNA i així trobant l'espècie que forma part de la mostra inicial i el tant per cent de coincidència amb la seqüència identificada.

#### **4.4.2 Resultats i discussió**

Quan ens van enviar les seqüències dels dos fragments en alguns la seqüenciació era massa dubtosa i per tant els vam tornar a enviar per a que tornessin a fer la seqüenciació. Aquest cop la majoria ja va sortir bé, però en el cas de la mostra 7 cap de les seqüències del dos fragments era segura a la segona tanda i per tant vam decidir descartar la mostra 7 de la identificació ja que seria molt dubtosa.

---

<sup>31</sup> <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

En quant a la resta, l'alineació de les cadenes i la identificació de l'espècie van sortir bé. Els gèneres de cada mostra els hem trobat però l'espècie era més dubtós ja que aquell fragment del gen 16s DNAr podia pertànyer a més d'una espècie bacteriana però conservant el gènere.

A la taula es presenten els codis de la procedència de cada mostra processada (vegeu apartat 3.1), el color del biofilm, l'aspecte colonial<sup>32</sup>, el resultat de la tinció gram, la morfologia dels bacteris, els que es varen aconseguir identificar i el % de similitud de la seva seqüència del 16S DNAr en comparació amb la de la base de dades.

**Taula 1.** Taula en la que es presenta la procedència i diverses característiques de les mostres processades, incloent les 4 que s'han aconseguit identificar.

Codi aïllat	Color biofilm	Aspecte colonial	Gram	Morfologia	Identificació 16s DNAr	% Similitud
2sb/01	taronja		positiu	bacils	no identificat	-
2sb/02	taronja	regular, llisa	positiu	estreptobacils	<i>Bacillus cereus/ thuringiensis/ sp</i>	99%
2sb (v)/01	vermell/verd		positiu	bacils	no identificat	-
2sb (v)/02	vermell/verd		positiu	bacils	no identificat	-
2sb (v)/05	vermell/verd	irregular	negatiu	bacils	<i>Shewanella putrefaciens/ sp</i>	99%
2sb (v)/06	vermell/verd		positiu	bacils	no identificat	-
2l/01	verd		positiu	bacils	no identificat	-
1l/01	verd apagat	regular, llisa	positiu	estreptobacils	<i>Bacillus cereus/ thuringiensis/ sp</i>	100%
4ss'/02	verd	regular, llisa	positiu	estreptobacils	<i>Bacillus aquimaris/ marisflavil sp</i>	100%
4ss'/04	verd	regular, llisa	negatiu	bacils	no identificat	-
4sc (v)/01	verd	regular, rugosa	positiu	bacils	no identificat	-
4sc (v)/02	verd		positiu	bacils	no identificat	-
4sc (v)/04	verd		positiu	bacils	no identificat	-
4sc (v)/05	verd	regular, rugosa	positiu	bacils	no identificat	-

Per això vam considerar el gènere i les espècies més probables, afegint el terme sp quan es una espècie indeterminada. Els resultats van ser aquests:

5: Gènere: *Shewanella*, espècie: *putrefaciens/ sp*

6: Gènere: *Bacillus*, espècie: *cereus/ thuringiensis/ sp*

8: Gènere: *Bacillus*, espècie: *aquimaris/ marisflavil sp*

9: Gènere: *Bacillus*, espècie: *cereus/ thuringiensis/ sp*

*Shewanella putrefaciens*. És l'únic bacteri gram-negatiu, no fermentador, que produeix àcid sulfhídric. És un anaerobi facultatiu amb capacitat de reduir metabòlicament el ferro i el manganès, que actuen com a acceptors finals d'electrons a la cadena transportadora d'electrons. Es troba en diversos ambients i restes animals que inclouen tots el tipus de medi

<sup>32</sup> en falten alguns perquè hi ha dubte en algunes anotacions

aquàtics (aigües dolces, marines, llacs, rius i aigües residuals), peix, aliments greixosos i al sòl. Les colònies en medi sòlid són rodones de creixement ràpid i d'un color rosa brillant <sup>33</sup>.

*Shewanella putrefaciens* també s'utilitza en bioremediació en biologia sintètica<sup>34</sup> i d'altra banda s'ha relacionat amb el metabolisme de l'òxid de trimetilamina (OTMA) en el procés de descomposició del peix<sup>35</sup>.

Les característiques relacionades amb el metabolisme i el medi on es troba citat aquest organisme són compatibles amb les condicions de la part central de les columnes de Winogradsky i del sediment del basal del pati de les tortugues (per exemple, metabolitzant restes de matèria orgànica) en canvi, no concorda del tot en quant a les característiques de l'aspecte de les colònies observades d'aquest organisme, ja que era bastant irregular i el color rosa brillant s'hi hi era no era gaire destacable.

Els bacteris del gènere *Bacillus* es caracteritzen per ser bacteris gram-positius, amb morfologia bàsica en forma de bacil, generalment formant cadenes (estreptobacils), solen formar colònies circulars de color groguenc (Madigan et al. 2009). És un gènere molt variat, amb moltes espècies<sup>36</sup>, que inclou des de bacteris aerobis, com *Bacillus aquimaris* i *Bacillus marisflavi*, fins a bacteris anaerobis facultatius, com *Bacillus thuringiensis* i *Bacillus cereus*.

Degut a que els membres del gènere *Bacillus* són molt propers no es poden diferenciar acuradament només amb la seqüència del 16S, però les 4 espècies possibles identificades són molt abundants en medis naturals com aigües i sòls<sup>37</sup>.

Així doncs, *Bacillus* i *Shewanella* degraden la matèria orgànica en condicions aeròbiques o anaeròbiques com les que hi ha a les columnes i contribueixen al reciclatge de la matèria en les mateixes i poden desenvolupar un paper important en el procés de descomposició de la matèria orgànica del basal del pati de les tortugues que, com vam comentar a l'inici (vegeu apartat 1.1), ha de ser important perquè el basal té més de 10 anys i no s'ha hagut de drenar mai.

---

<sup>33</sup> [http://web.mst.edu/~microbio/BIO221\\_2010/S\\_putrefaciens.html](http://web.mst.edu/~microbio/BIO221_2010/S_putrefaciens.html)

<sup>34</sup> [http://www.gen-es.org/assets\\_db/publications/documents/pub\\_75\\_d.pdf](http://www.gen-es.org/assets_db/publications/documents/pub_75_d.pdf)

<sup>35</sup> <file:///F:/Shewanella%20putrefaciensis/5.%20CAMBIOS%20POST-MORTEM%20EN%20EL%20PESCADO.htm>

<sup>36</sup> [http://do.rulitru.ru/docs/3/2380/conv\\_1/file1.pdf](http://do.rulitru.ru/docs/3/2380/conv_1/file1.pdf)

<sup>37</sup> [http://do.rulitru.ru/docs/3/2380/conv\\_1/file1.pdf](http://do.rulitru.ru/docs/3/2380/conv_1/file1.pdf)

## 5. Conclusions

En relació a l'objectiu general de muntar i deixar en funcionament diverses columnes de Winogradsky, podem concloure que s'ha assolit plenament, ja que s'han construït un total de 6 columnes i després de 8 mesos totes elles continuen en marxa.

Dels tractaments amb els tipus de llum, es conclou que la llum blanca és necessària per a l'aparició dels biofilms de color verd i que la llum incandescent afavoreix l'aparició i desenvolupament dels de color vermell. El major desenvolupament de les taques de color vermell l'hem observat als dos mesos d'haver iniciat el muntatge de les columnes, mentre que la màxima diversitat de colors s'ha produït entre els 4 i els 6 mesos, depenent del tipus de columna.

Ha resultat que el microscopi USB pot tenir una gran utilitat per a la captura fotogràfica detallada de biofilms de les columnes de Winogradsky quan es combina amb un focus LED de llum blanca.

L'observació microscòpica "in vivo" de mostres de la part superior de les columnes ens ha permès descobrir un micromón extraordinàriament divers de microorganismes eucariotes, alguns dels quals hem aconseguit identificar i també fotografiar.

S'ha dut a terme l'observació dels microorganismes procariotes responsables de la formació dels biofilms de les nostres columnes, i l'aïllament i identificació d'algunes de les espècies bacterianes heterotròfiques que hi habiten (concretament 4 amb seguretat a nivell de gènere i les seves espècies més probables). Aquesta part del treball és la que m'ha permès entendre més bé com funciona el món científic d'avui dia i endinsar-me en la metodologia científica.

De cara al futur, es proposa seguir alguna de les línies de recerca que poden aparèixer en l'evolució d'aquestes mateixes columnes (es deixen muntades), com pot ser un estudi més a fons del metabolisme dels bacteris ja identificats per conèixer millor l'ecologia microbiana del bassal del Pati de les tortugues, identificar-ne de nous partint de la metodologia descrita en aquest treball o perfeccionar el sistema de seguiment fotogràfic amb objectiu macro i amb microscopi USB, entre altres.

## 6. Bibliografia

ALBERT, W. (1975). *Zoología especial, Protozoos*. Ediciones Omega S.A. Barcelona.

BOADA, M. (2012). *Retazos de Biosfera*. Taller y laboratorio. Investigación y Ciencia. Mayo 2012, pg 89-91.

BUENO, D. (2010). *Història natural dels Països Catalans. Suplement Fauna i Flora. La classificació dels éssers vius*. Enciclopèdia Catalana Barcelona, 2010.

CUSÓ, ÒSCAR. (2007). *El bassal del pati de les tortugues*. Treball de recerca de batxillerat. Escola Mestral. 64 pp. (Premi Baldiri-Reixac 2008). [En línia]. Disponible a Internet: <http://www.escolamestral.net/mestral/secciones.php?menu=94&sec=101&subsec=114>

DURÓ, A., URMENETA, J. (2007). *Manchas cromáticas o diversidad de microorganismos*. De Cerca. Investigación y Ciencia 366.

GASCÓN ABELLAN, M. (2010). *Validez y Valor de las Pruebas Científicas: La Prueba del DNA*. <http://www.uv.es/cefd/15/gascon.pdf>

HANS G. S. (1997). *Microbiología general*. Nueva edición. Ediciones Omega S.A. Barcelona.

LOIR, MAURICE (2004). *Guide des diatomées. Plus de 200 microalgues siliceuses photographiées*. ISBN: 2-603-01477-3. Delachaux et Niestlé. Paris. 239 pp.

LÓPEZ, JP. (2008). *La columna de Winogradsky*. Un ejemplo de microbiología básica en un laboratorio de educación secundaria. Rev. Eureka Enseñ. Divul. Cien. 5(3) : 373-376.

LOZANO MARTA (2007) *Autosuficiència alimentària de la Tortuga Mediterrània*. Treball de recerca. Escola Mestral. (Premi Cirit). [En línia]. Disponible a Internet: <http://www.escolamestral.net/mestral/secciones.php?menu=94&sec=101&subsec=114>

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., DUNLAP, P.V., CLARK, D.P. (2009). *Brock. Biología de los microorganismos*. Pearson Educación, S.A. Madrid. 1259 pp.

MARÍAS, RUBÉN (2012). *Iniciació a la bioinformàtica a través de les tortugues de l'escola*. Treball de recerca. Escola Mestral. [En línia]. Disponible a internet: [http://issuu.com/escolamestral/docs/iniciacio\\_a\\_la\\_bioinformatica?e=1116350/1071689](http://issuu.com/escolamestral/docs/iniciacio_a_la_bioinformatica?e=1116350/1071689)

MARSÀ, ALBERT. (2010). *Increment de la biodiversitat al Pati de les tortugues*. Treball de recerca. Escola Mestral. [En línia]. Disponible a internet: <http://issuu.com/escolamestral/docs/natalia-garcia-tr-web>.

PASCUAL, E., HERRERIAS, L., VENDRELL, A, MARÍ, J., MARTÍNEZ, A. I SOLER, J. (2011). *Aportacions a les variacions de pes durant el procés d'hibernació en Testudo hermanni hermanni (Gmelin 1789)*. Butlletí de la Societat Catalana d'Herpetologia n°19.

SAGUÉS, GERARD (2005). *Microclimes al pati de les tortugues*. Treball de recerca de batxillerat. Escola Mestral. 65 pp. (Premi Baldiri-Reixac 2005). [En línia]. Disponible a Internet: <http://www.escolamestral.net/mestral/secciones.php?menu=94&sec=101&subsec=114>

STREBLE H., KRAUTER D. (1987). *Atlas de los Microorganismos de Agua Dulce*. La vida en una gota de agua. Ediciones Omega, S. A. Barcelona. 357 pp.

URMENETA, J., DURÓ, A. (2011). *Explaining Life: Microorganisms in Science Museums*. The american biology teacher. National Association of Biology Teachers. Disponible a internet: <http://www.bioone.org/doi/full/10.1525/abt.2011.73.5.4>

STANLEY I, LETOVSKY. (2009). *Bioinformatics: Databases and systems*. Kluwer Academic Publishers.



## Annex 1 Seqüències DNA dels bacteris identificats

Gènere: *Shewanella*, espècie: *putrefaciens* /sp

>130913-R1\_A07\_5\_518F.ab1 1141

GCGTGCGCAGGCGGTTTGTAAAGCGAGATGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTAGGAATAGC  
ATTTCGAACTGGCGAACTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGA  
AATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGA  
CGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT  
AAACGATGTCTACTCGGAGTTTGGTGTCTTGAACACTGGGCTCTCAAGCTAACGCATTAAG  
TAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAA

>130909-24\_L23\_5\_800R.ab1 789

GCCTTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTA  
CCCCCTCTACAAGACTCTAGTTCCGCCAGTTCGAAATGCTATTCCTAGGTTGAGCCCAGGG  
CTTTCACATCTCGCTTAAACAAACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAAC  
GCTCGGACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTCTTCTTCTGTGTA  
GGTAACGTCACAGCTACAGTTTATTAAACTGCAACCTTTCCTCCCTACTGAAAGTGCTTTAC  
AACCCGAAGGCCTTCTTACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGGTTTCCCCATTGTGCA  
ATATTCCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTG  
ATCATCCTCTCAGAACAGCTAGGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGC  
TAATCCCACCTAGGTTTCAATCGCGGAAGGCCCGAAGGTCCCCTCCTTTCCCCCGTA  
GGGCGTATGCGGTATTAGCAGTCGTTTCCAAGTGTATCCCCTCGACTGGGCAGATCCCT  
AGGCATTAACACCCGTCCGCGCTCGCCACCTCAGGAGTAAACTCCCTTGTGCTGCCGC  
TCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCC

>cadena 5 complerta 16S DNAr

ggctcagattgaacgctggcggcaggcctaacacatgcaagtcgagcggcagcacaagggagttactcctgaggtggcgagcgg  
cggacgggtgagtaatgcttaggatctgccagtcgagggggataacagttggaacgactgctaataccgcatacgcctacgg  
gggaaaggaggggacctcgggcctccgcgattggatgaacctagggtgggattagctagttggtgaggaatggctaccaagggc  
acgatccctagctgttctgagaggatgatcagccactgggactgagacacggcccagactcctacgggaggcagcagtgggga  
atattgcacaatgggggaaaccctgatgcagccatgccgctgtgtgaagaaggcctcgggtgtaaagcactttcagtagggagg  
aaaggtgcagtttaataaactgtagctgtgacgttacctacagaagaaggaccggctaactccgtgccagcagccgcgtaatacg  
gagggctccgagcgtaatcggaattactggcgtaaagcgtgcgagggcgtttgtaagcgagatgtgaaagcctgggctcaacc  
taggaatagcatttcgaactggcgaactagagtctttagaggggggtagaattccagggtgtagcggtgaaatcgtagagatctgga  
ggaataccgggtggcgaaggcggccccctggacaaagactgacgctcatgcacgaaagcgtggggagcaaacaggattagatac  
cctggtagtccacgccgtaaacgatgtctactcggagtttgggtgcttgaacactgggctctcaagctaacgcattaagtagaccgctg  
gggagtacggccgcaagggttaaactcaaatgaa

**Genere: *Bacillus*, espècie: *cereus/ thuringiensis/sp***

>130909-24\_M23\_6\_518F.ab1 1043

GAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGA  
GGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGG  
CGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG  
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCG  
CCTTTAGTGTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCT  
GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA  
GCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCTAGAGATAGGGCTTCT  
CCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACAGCTCGTGTGAGATGTT  
GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACT  
CTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC  
CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCG  
AGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACA  
TGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC  
TTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGGGGT

>130913-R1\_C07\_6\_800R.ab1 1251

CCTCCATATCTCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTTCTGCACTCA  
AGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAG  
AAACCACCTGCGCGCGCTTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTA  
CCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAG  
CTTATTCAACTAGCACTTGTCTTCCCTAACAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATC  
ACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCT  
CCCGTAGGAGTCTGGGCCGT

> Cadena completa 16S DNAr mostra 6

acggcccagactcctacgggaggcagcagtagggaatcttccgcaatggacgaaagtctgacggagcaacgccgctgagtgat  
gaaggcttccgggtcgtaaaactctgtttagggaagaacaagtgtagtgtaataagctggcacctgacggtacctaaccagaaa  
gccacggctaactacgtgccagcagccggtatacgttaggtggcaagcgttatccggaattattgggctaaagcgcgcgagg  
tggtttctaagtctgatgtgaaagcccacggctcaaccgtggagggtcattggaaactgggagacttgagtgacagaagaggaaagt  
ggaattcatgtgtagcgggtgaaatgcgtagagatatggaggaacaccagtgggcaaggcgacttctgttctgtaactgacactga  
ggcgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccacgccgtaaacgatgagtgtaagtgtagagggttcc  
gcccttagtgctgaagttaacgcattaagcactccgctggggagtagcggccgcaaggctgaaactcaaaggaattgacgggggc  
ccgacaagcgtggagcatgtggttaattcgaagcaacgcgaagaacctaccaggtcttgacatcctctgaaaccttagagat  
agggcttctcctcgggagcagagtgacaggtggtgcatggtgctgctcagctcgtgctgagatgttgggttaagtcccgaacgag  
cgcaaccttgatcttagttgcatcattaagttgggactctaaggtgactgccggtgacaaaccggaggaaggtggggatgacgctc  
aatcatcatgccccttagacctgggctacacacgtgctacaatggacggtacaaagagctgcaagaccgaggtggagctaat  
ctcataaaaccgttctcagttcggattgtaggctgcaactcgctacatgaagctggaatcgctagtaatcgcggtacagca  
tgccgcggtgaatacgttcccgggctgtacacaccgccgctcacaccacgagagtttgaacacccgaagtcgggtggg  
gt



**Genere: *Bacillus*, espècie: *aquimaris/ marisflavi/sp***

>130909-24\_I24\_8\_518F.ab1 1018

AAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAG  
GAAAGTGGAAATCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTTGGAGGAACACCAGTGGC  
GAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG  
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCG  
CCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACT  
GAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA  
GCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTC  
CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATG  
TTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCA  
CTCTAAGATGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG  
CCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCTGCAAGACCG  
CGAGGTTTAGCCAATCCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA  
CATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG  
CCTTGTACACACCGCCC

>130913-R1\_I07\_8\_800R.ab1 846

CACTGGTGTTCCTCCAAATATCTACGCATTTACCCGCTACACTTGGAAATCCACTTTCCTCT  
TCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACAT  
CAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCAC  
CTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTC  
AAGGCGCCGCCCTATTCGAACGGCACTTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGTTTTACGATCCGA  
AAACCTTCTT

>Seqüencia completa 16S DNAr mostra 8

aagaaggtttcggatcgtaaaactctgtttagggaagaacaagtgccgtcgaatagggcggcgccctgacggtacctaaccaga  
aagccacggtaactacgtgccagcagccgcgtaatacgtaggtggcaagcgtgtccggaattattggcgtaaagcgcgcgca  
ggtggttcttaagtctgatgtgaaagcccacggctcaaccgtggagggtcattggaaactggggaacttgagtgcagaagaggaaa  
gtggaattccaagttagcggtaaatgcgtagatattggaggaacaccagtgccgaaggcgacttctggtctgtaactgacactg  
aggcgcaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctgtagtccacgccgtaaacgatgagtgctaagtgttagagggttc  
cgcccttagtgctgcagctaacgcattaagcactccgcctggggagtagcggcgaagactgaaactcaaaggaattgacggggg  
ccgcacaagcggtagcatgtggttaattcgaagcaacgcgaagaacctaccaggtctgacatccttgacaaccctagaga  
tagggctttccctcgggggacagagtgacaggtggtgcatggtgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttggttaagtcggcaacg  
agcgcaaccctgatcttagttgccagcattcagttgggcactcaagatgactgccggtgacaaccggaggaaggtggggatgac  
gtcaaatcatcatgcccttatgactgggctacacacgtgctacaatggacggtacaaagggctgcaagaccgaggttagcca  
atccataaaaccgttctcagttcggattgtaggctgcaactcgctacatgaagctggaatcgctagtaatcgcgatcagcatgccg  
cggtgaatacgttccgggctgtacacaccgccc

**Genere: *Bacillus*, espècie: *cereus/ thuringiensis/sp***

>130909-24\_K24\_9\_518F.ab1 945

TAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT  
GAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAG  
GAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTG  
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT  
TAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTAC  
GGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGT  
GGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCTAG  
AGATAGAGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT  
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCAT  
TAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG

>130909-24\_L24\_9\_800R.ab1 798

CCATATCTCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGT  
CTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAA  
CCACCTGCGCGCGCTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCG  
CGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTT  
ATTCAACTAGCACTTGTTCTTCCCTAACAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACT  
CACGCGGCCTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCTACTGCTGCCTCC  
CGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCCGGCTA  
CGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGACGCGGGTCCATC  
CATAAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTTCATTTTGAACCATGCAGTTCAAATGTTATCCGG  
TATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTC  
ACCGTCCGCCGCTAATTCTTGAGAGCAAGCTCTCAATCCATTGCTCGACTTGTCATGTA  
TTAGGCACGCCGCCAG

>Seqüencia completa 16S DNAr mostra 9

ctggcggcgtgcctaatacatgcaagtcgagcgaatggattgagagcttgcctcaagaagttagcggcggacgggtgagtaacac  
gtgggtaacctgccataagactgggataactccgggaaaccggggctaataccggataacatttgaactgcatggttcgaaattga  
aaggcggcttcggctgtcacttatggatggaccgctgcattagctagttggtgaggtaacggctcaccaggcaacgatcgtag  
ccgacctgagaggggtgatcggccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggaggcagcagtagggaatcttccgca  
atggacgaaagtctgacggagcaacgccgctgagtgatgaaggcttccggctgtaaaactctgtttagggaagaacaagtgt  
agttgaataagctggcacctgacggtacctaaccagaaagccacggctaactacgtgccagcagccgcgtaatacgtaggtggc  
aagcgttatccggaattattggcgtaaaagcgcgaggtggttcttaagtctgatgaaagcccacggctcaaccgtggagggt  
cattgaaactgggagacttgagtgcagaagaggaaagtggaattccatgttagcggtgaaatgcgtagagatatggaggaaca  
ccagtggcgaaggcgacttctggtctgtaactgacactgaggcgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctgtagt  
ccacgccgtaaacgatgagtgctaagtgttagaggggttccgcccttagtgcgtaagtaacgcattaagcactccgctggggagta  
cggccgcaaggctgaaactcaaaggaattgacggggggccgcacaagcgtggagcatggtttaaattcgaagcaacgcgaag  
aacctaccaggctctgacatcctctgaaactctagagatagagcttctcctcgggagcagagtgacaggtggtgcatggtgtcgtc  
agctcgtcgtgagatggtgggtaagtcccgcgaacgagcgaacccttgatcttagttgccatcattaagttgggactctaaggtgac  
tgccggtgacaaccggaggaaggtgg

## Annex 2 Document fotocronològic



## Pròleg

Des de ja fa uns quants anys, concretament des de l'any 2003, que és quan el *Pati de les tortugues* passa a ser instal·lació col·laboradora del DMAH (Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya), que ara s'inclou en el Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural (DAAM) de la Direcció General de Medi Natural i Biodiversitat, per a la tinença i cria de tortuga mediterrània (*Testudo hermanni*) a l'Escola, es porta a terme un registre de les activitats que s'hi desenvolupen, any rere any, pels alumnes que hi fan treballs de recerca relacionats, independentment del tema del seu treball de recerca concret.

Això, malgrat representa un esforç extra, facilita als alumnes la realització de pràctiques diverses i permet l'existència d'un "fil conductor" de les diferents accions i activitats realitzades al llarg dels anys i sobretot de la seva ràpida consulta, per tal d'aprendre dels estudis previs i no repetir aquells ja finalitzats. D'aquesta manera, el *projecte* pot anar enriquint-se i evolucionant, amb la participació de tots els alumnes que en formen part.

Per tal de portar a terme aquest registre es fa servir una metodologia molt senzilla, però eficaç. Consistent en dues eines: una de clàssica, la llibreta de camp (cada alumne en disposa d'una on hi anota les diferents activitats que va realitzant i les idees que se li van acudint) i una de més moderna, la fotografia digital. Aquesta última esdevé, més enllà del seu valor gràfic, una eina molt útil per el registre de tasques i esdeveniments de caire cronològic, perquè queda tot enregistrat en les *metadades* que acompanyen a tot arxiu electrònic (data i hora, a part de totes les dades dels paràmetres fotogràfics de la captura realitzada).

En un principi, el registre fotogràfic de les tasques que es porten a terme el realitzava jo mateix, però des de ja fa uns quants anys, els alumnes en general i els de l'Escola en particular (sobretot els de Batxillerat) ja tenen un nivell suficient per realitzar les seves pròpies fotografies de caire científic i precisament aprofitem aquestes sortides per a millorar aquesta modalitat de tècnica fotogràfica al camp. A més, en els últims 6 o 7 anys, ha coincidit que hi ha un alumne que fa un treball específic de fotografia i és el que té la principal responsabilitat del reportatge fotogràfic de les activitats i sortides realitzades.

Josep Marí

## 1. Actualització del banc de dades del projecte *Pati de les tortugues*

### 1.1 Dades de pes i biomètriques de les tortugues

Es continua el seguiment del registre periòdic de pes de les tortugues adultes (tant del període actiu com durant la hibernació) i juvenils que estan en estudi. Aquestes dades es van incorporant, en format Excel, a la base de dades iniciada el 4 de novembre de 2005. També es guarda un registre de les dades de pes i biomètriques de les tortugues nascudes a l'escola (i també dels ous). Aquests arxius es van actualitzant periòdicament, per a possibles estudis posteriors a més llarg termini i també per a fer consultes per als actuals (treball de Marc Olivella).

### 1.2 Registres de dades ambientals

S'enregistren els valors de temperatura de diversos indrets (a nivell de superfície i a nivell d'on s'enterren les tortugues per a hibernar i a nivell dels ous de la incubadora). Aquestes dades són enregistrades periòdicament de forma intermitent (des de desembre de 2004) amb enregistadors *DataLoggerEscort* i guardats en una carpeta (*MyLogger Data*) que es va actualitzant amb els treballs de recerca dels últims anys, per tal de poder ser utilitzades en qualsevol moment en treballs actuals (Marc Olivella) o futurs. Aquest any s'han incorporat uns enregistadors nous (més allargat i estrets que els Escort), Lascar-USB, amb l'objectiu de monitoritzar l'interior de les caixes d'incubació (al costat dels ous). Els fitxers de dades es guarden en el format original (editables amb el programa *EscortConsole* o *EasyLog*) i també en format full de càlcul (*Excel*).

### 1.3 Alliberament d'exemplars nascuts a l'escola

Els dos últims anys s'han realitzat alliberaments (al massís del Garraf i a la serra del Montsant) de tortugues nascudes a l'escola, perquè eren tortugues que havien format part d'estudis relativament llargs (procés d'ossificació de la closca, hibernació/no hibernació, creixement...), les hem tingut alguns anys a l'escola i ja havien assolit les mides mínimes per ésser alliberades. Aquest any no tindrem tortugues per alliberar perquè són encara molt petites; els 12 exemplars que tenim formen part d'un estudi que s'acaba amb un treball de recerca d'aquest curs (Marc Olivella), i el que farem serà portar-les al CRARC en la visita anual del mes d'agost perquè es quedin ja allí fins el moment d'ésser alliberades.

### 1.4 Bioquímica i Microbiologia al basal del pati de les tortugues

Un exalumne de l'escola que està acabant el grau de Biologia, Eudald Pascual, ha proposat de fer un estudi del cicle de la matèria al sediment del basal del pati de les tortugues a través de les columnes de Winogradsky. Aquest treball (portat a terme per Pep Atencia) està en part relacionat amb el de Micromons, un treball de fotografia biològica de Júlia Alguacil, en el que hi ha una part dedicada als micromons del basal del pati de les tortugues de l'escola. Una part experimental del treball de les columnes (dues setmanes) i de microfotografia (un dia) es realitzarà al Departament de Microbiologia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, sota la direcció del Dr Jordi Urmeneta, del grup de recerca Ecogenètica i Diversitat Microbianes.

### 1.5 Document fotocronològic

Es continua portant a terme un registre fotogràfic de les principals tasques i accions realitzades pels alumnes durant el període que dura el seu treball de recerca, ordenades cronològicament, en el mateix format d'anys anteriors (agrupaments de 3 fotografies). Les explicacions del document es fan entre tots, però la responsabilitat de la part fotogràfica i el muntatge final recau, sobretot, en la persona que realitza el treball de recerca de fotografia (treball de Júlia Alguacil).

## 2. CRONOLOGIA DE LES TASQUES PORTADES A TERME AL PATI DE LES TORTUGUES I DE LES VISITES CONJUNTES REALITZADES DURANT EL PERÍODE QUE VA DES DE FEBRER DE 2013 FINS A NOVEMBRE DEL MATEIX ANY

22/02/2013 Avui és el primer dia "oficial" que comencem el treball de recerca i també les tasques de manteniment del pati de les tortugues. Cal dir que alguns aspectes ja els coneixíem perquè els veníem realitzant (juntament amb els altres companys de l'assignatura de biologia) des de feia uns dos mesos; ens referim a la identificació de les tortugues pel seu codi de marcatge individual i a la metodologia per a realitzar el control de pes de les mateixes durant la hibernació. Els detalls dels preparatius per a la hibernació d'aquestes tortugues (en els que hi participaren alumnes de 2n i 3r d'ESO) s'expliquen en el document fotocronològic de l'any anterior, portat a terme per Rubén Marías, Clara Peña i Sandra Roig.

Ens reunim al laboratori amb el nostre tutor, que ens fa entrega d'una llibreta de camp perquè hi anem anotant totes les tasques i observacions que anem realitzant, de cara a poder elaborar l'annex fotocronològic (aquest document) que acompanyarà als nostres treballs de recerca. El registre fotogràfic, així com el seu muntatge, serà sobretot responsabilitat de la Júlia Alguacil, que és la que fa el treball de recerca més relacionat amb fotografia. Planifiquem les tasques més immediates i ens disposem a realitzar-les.

El Pep Atencia fa una estimació del màxim gruix de sediment del bassal i n'extrau una mostra per portar al Dr. Jordi Urmeneta del Departament de Microbiologia de la Facultat de Biologia (més informació en el TR del Pep Atencia).



El Marc ha fet el primer control de pes de les tortugues com a responsable d'aquesta tasca que s'inclou en el seu treball i ha observat un descens notable en el pes d'una tortuga, la C1 (que es troba momentàniament desperta) i es valora la possibilitat de que finalitzi la seva hibernació però al final la continua ja que han caigut en picat les temperatures (7,2 °C de temperatura en aquest moment) i s'espera que encara baixin bastant més. La Júlia ha revisat l'estat de les plantes bulboses del pati i n'ha plantat de noves (fotografiar les flors de plantes bulboses forma part d'un dels seus projectes). Després, juntament amb el Marc, han sembrat diversos llavors de plantes que formen part de la dieta de les tortugues. Ahir la Júlia va fotografiar la plantada de bulbs que feren els alumnes del taller de 3r de Primària al pati de Parvulari, per un possible seguiment del procés.



Esperem a que vingui el Pol (l'encarregat de manteniment de l'escola) perquè ens ha d'ajudar a col·locar una eslinga per tal d'intentar adreçar un arbre que està molt torçat i, al mateix temps, separar una mica un altre de la paret del hall, perquè l'està tocant. Aguantem l'escala al Pol i li anem donant el material, però la veritat és que ell fa tota la feina. Periòdicament l'anirem tensant una mica.



01/03/2013 El Marc realitza unes altres pesades de les tortugues (dimecres 27/02/13 també en va fer una) i observa que algunes tortugues grans han recuperat una mica de pes, però només les femelles, el mascle no. Les petites, per la seva part, no n'han recuperat, malgrat ha plogut molt avui i ahir (més informació en el TR del Marc). Aprenem a fer servir els dataloggers (enregistradors electrònics de dades). Ve l'Eudald (un exalumne de l'escola que va proposar el treball del Pep) a informar una mica sobre el tema de les columnes de Winogradsky i ens deixa un llibre de Microbiologia. En Pep decanta l'aigua del pot de prova amb sediment, que ja havia reposat durant un parell de dies, per tal de portar-lo més concentrat al Jordi Urmeneta.

04/03/2013 Primera entrevista (Pep Atencia i Josep Marí) amb el Dr. Jordi Urmeneta (Departament de Microbiologia, Facultat de Biologia UB) en la que, durant una hora i mitja ben productiva, el Jordi ens ha resolt un munt de dubtes i ens ha donat idees per al muntatge de les columnes, els tractaments (llum vertical i llum horitzontal), el seguiment (visual i fotogràfic) i posterior anàlisi de les comunitats bacterianes. Aquesta última part la realitzarà el Pep al Departament de Microbiologia, sota la supervisió directa del Dr. Urmeneta, durant el mes de juliol, en la que es portarà a terme, entre altres, l'observació microscòpica *in vivo* i en mostres fixades (tinció de Gram) dels bacteris d'alguna de les comunitats cromàtiques de les columnes.



D'altra banda, es procedirà a l'aïllament (cultiu pur) d'alguna espècie bacteriana (a partir d'una mostra d'aigua del sobrenedant de la columna o bé directament d'aigua del basal del pati de les tortugues) per a la seva identificació específica per via genètica. Al laboratori de Microbiologia, el Pep realitzarà de l'espècie aïllada (i sota supervisió) l'extracció de l'ADN, PCR, observació resultats PCR i aïllament de banda corresponent al gen buscat (16S) i purificació del mateix. Un cop purificat el gen 16s es procedeix a enviar-lo (juntament amb molts altres per tal d'economitzar el transport) per a la seva seqüenciació. Un cop ens arribi la seqüència, el Pep pot procedir a la identificació específica seguint el protocol d'un treball de

recerca del curs anterior (*Iniciació a la bioinformàtica a través de les tortugues de l'escola de Rubén Marías*).

El Jordi ens ha ensenyat unes columnes que té al seu laboratori, els aparells per treballar l'ADN i també uns cultius de bacteris fotosintètics i fermentadors (en plaques de Petri molt grans) per substituir les que hi ha al Cosmocaixa (les columnes de Winogradsky del Cosmocaixa també les va muntar ell). Ens ha dit que tot necessita un manteniment; les columnes necessiten certa aportació d'aigua periòdicament per contrarestar la que s'evapora, i les plaques s'han d'anar renovant.



Hem acordat mantenir al Jordi periòdicament informat de les activitats que anem realitzant relacionades amb les columnes (més informació en el TR de Pep Atencia).

08/03/2013 Es munta al laboratori un dispositiu per extreure sediment anòxic del bassal, però el que acaba de funcionar millor és una variant del mateix (més informació en el TR del Pep Atencia). S'extreuen 4 recipients de vidre de 5 L, que es deixaran reposar al laboratori perquè el material que encara està en suspensió (es veu molt tèrbol) acabi sedimentant. L'aigua sobrenedant la utilitzarà l'Alba Nieto en el seu TR d'anàlisi de la concentració d'oxigen (que aquí hauria de ser mínima).



Observem que comencen a brotar algunes de les plantes que sembrarem el 22/02/2013, però encara no estan prou desenvolupades i incorporem (trasplantem) alguns exemplars de dent de lleó i de plantatge de l'hortet i del jardí (allí són considerades males herbes, però són de les més apreciades per les tortugues); també sembrem llavors d'alfals al pati de les tortugues i a la zona destinada del pati de batxillerat, una franja estreta, oberta a ple Sol, on es desenvolupen millor aquestes plantes heliòfiles.

La temperatura ha pujat molt aquests dies, sobretot al mig dia, i algunes tortugues estan despertes o mig despertes. El Marc comprova quines ho estan (la meitat de les petites). Les que estan despertes són les que havien perdut més pes. Decidim mullar els voltants de les caixes on hibernen les petites i una mica també el substrat perquè puguin recuperar una mica de pes o, com a mínim, que no en perdin més. No les traiem de les caixes (donant per



finalitzada la hibernació) perquè el [pronòstic meteorològic municipal a 8 dies](#) indica una nova davallada de les temperatures per la setmana vinent.

Pel que fa a les grans, donem per finalitzat el període d'hibernació, perquè dues estan ben despertades (la femella gran i el mascle) i la que està mig enterrada està amb els ulls oberts. A més, s'ha observat que el mascle ha perdut molt de pes en pocs dies. Es decideix mantenir-les encara en el terrari exterior, però deixant que tinguin accés a l'aigua i l'aliment. Cap de les tres ha volgut beure, però s'han trasplantat diversos exemplars de plantatge i dent de lleó (procedents de l'hortet) al terrari exterior i s'ha vist com la tortuga gran s'apropava a les plantes i començava a menjar.



12/03/2013 Avui per una pràctica de Biologia baixem al pati de les tortugues per agafar mostres amb la resta de companys de classe. Algunes d'aquestes observacions són les que després s'estudiaran més a fons en un dels nostres treballs (Júlia Alguacil).



15/03/2013 Es fa un control de pes per veure si les tortugues petites l'han augmentat per l'increment d'humitat del seu voltant. S'observa que totes les tortugues juvenils recuperen pes, excepte una que el manté i una altra que en continua perdent, la C1. Tenim por que aquesta tortuga, que és la que més pes ha perdut al llarg de la hibernació, i també fa dies que està desperta, s'acabi deshidratant i no es recuperi. De manera que optem per deixar-li beure aigua. Beu un total de  $1.7 \text{ cm}^3$  (quantitat equivalent a un 8% del seu pes!) i la tornem a deixar a la caixa-refugi d'hibernació, amb les altres.

Pel que fa a les grans, es comprova que han menjat part de les plantes que s'havien introduït al terrari exterior el dia abans, recuperant una mica de pes, sobretot la femella gran. També s'ha observat que les tortugues estan més actives i que es situen a la meitat del terrari on la llum del Sol incideix directament.

També configurem els nous enregistradors (*Lascar-USB*) i en posem un al costat d'un *Escort i Log* a l'interior d'una incubadora per comparar-los (més informació en el TR del Marc).

Les temperatures han baixat força (fa dos dies es va arribar a una mínima de 3,3 °C) i encara pot tornar a ploure (fa dos dies van caure 23 L/m<sup>2</sup> a l'escola) i s'espera que aquest temps continuï uns quants dies més.

20/03/2013 La làmina de plàstic transparent que tenim col·locada a la meitat dreta (costat N) del terrari exterior es mostra efectiva, perquè després de la pluja d'aquest matí només està mullada la part esquerra. També observem que el Sol al migdia ja té un grau d'inclinació suficient per arribar a la meitat dreta del terrari, que és precisament on es situen les tortugues grans, que han menjat bastant i ja les deixem lliures per tot el pati. Pel que fa a les petites, veiem que estan totes despertes i ja donem per finalitzada del tot la hibernació d'aquesta temporada, ja que les temperatures han pujat força.



Pugem les tortugues petites al laboratori i les pesem. Seguidament les posem en una safata amb una mica d'aigua perquè puguin beure a voluntat; les tornem a pesar i observem que han augmentat significativament de pes, sobretot la C7 que passa 13.2 g (la més petita) a 16.3 g, un augment considerable en relació al seu pes. La C1 que ja es trobava al laboratori ha passat de 21.9 g (el seu mínim corresponent al dia 09/03/2013) a 30.6 g, ja que ha pogut menjar i beure durant uns quants dies. Deixem les 12 tortugues al terrari especial per rèptils del laboratori, amb bastants exemplars de les plantes preferides de la tortuga mediterrània (compostes del tipus dent de lleó).



21/03/2013 Els 4 pots amb el sediment negre del bassal han estat més d'una setmana hermèticament tancats i el més probable és que l'aigua que hi ha per sobre del sediment anòxic no tingui gens d'oxigen dissolt. Aquesta aigua lliure d'oxigen, com ja hem dit, li interessa a l'Alba Nieto, mentre que el Pep Atencia només necessita el sediment. Per tal de minimitzar el contacte d'aquesta aigua amb l'oxigen de l'aire, realitzem el transvasament de forma ràpida, mantenint obert el mínim de temps possible el recipient on va a parar l'aigua de cadascun dels 4 pots. La forta olor a sulfhídric en destapar els pots ens confirmen les condicions d'anòxia (per això fem el transvasament a l'exterior). El Pep necessita conèixer el volum total que té de sediment per poder-ho distribuir correctament en les diferents columnes i li ajudem a agafar les mides per calcular-lo (més informació en el TR del Pep).



22/03/2013 El Marc fa una pesada de control de les tortugues petites i descobrim que la C6 té un “abultament” a la cloaca i la traiem per posar-la en aigua. En veure que no desapareix el Marí amb l’ajuda d’unes pinces procedeix a treure-li aquest acumulament d’excrements i li aconsegueix treure amb una mica de temps i esforç. La tortuga es queda amb un forat bastant considerable a la cloaca dilatada, però de mica en mica es va tancant,

Mirem el guany de pes de totes les tortugues des del final de la hibernació fins ara i observem que n’hi ha dues que no han recuperat massa pes.

Baixem sis tortugues de les dotze al pati (les que pesen més) i les deixem amb menjar. Procedim a fer una pesada de les grans i veiem que la femella gran ha guanyat en total més de 100 grams mentre que la mitjana, que continua mig adormida, ha guanyat només 5 grams. Les sis tortugues més petites es queden a dalt al laboratori.

25/03/2013 Fem unes pesades de les tortugues grans i petites. Algunes continuen recuperant pes i altres en perden lleugerament. La femella gran perd pes i d’aquesta manera trenca la tendència d’augment de pes pràcticament constant que portava. La Júlia i el Marc fan una neteja del pati i omplen tres sacs de fullaraca i plantes que no volem. Deixen el pati pràcticament net. Seguidament planten diversos exemplars de dent de lleó i plantatge procedents del voltant de l’escola, per les tortugues grans al pati i per les juvenils al terrari exterior del pati. També es canvia una làmpada de radiació ultraviolada de l’aparell antimosquits i es col·loca al pati de les tortugues (zona NE).



El Pep prepara la barreja de sediment a partir dels materials necessaris per a facilitar la aparició i supervivència del bacteris i decideix la distribució de les columnes i la variabilitat entre elles i les munta (més informació al seu TR). La Júlia fa fotos i trasplanta bulbs i plantes. Finalment ho reguem tot i llencem els sacs al contenidor.



30/03/2013 Els dos aquaris s'han buidat i netejat a fons i s'han omplert amb 3 tipus d'aigua: aixeta:garrafa:bassal (1:2:2). S'han posat, procedents del bassal, varies elodees i alguns exemplars flotants de *Riccia*. Hem deixat la persiana de la finestra que dona més a l'est del laboratori (orientada a SO) mig oberta, per tal que entri una mica de sol directe a la tarda fins al terrari on estan les tortugues petites. També hem observat que les plantes enfiladisses caducifòlies del pati comencen a brotar.



19/04/2013 Aquests últims dies el Marc ha anat fent controls de pes de les tortugues però no hi ha hagut cap canvi destacable. Totes les tortugues en diferent mesura (més informació en el TR del Marc) han anat recuperant pes des de la seva hibernació, sobretot les grans. Les tortugues estan actives durant les hores centrals del dia, i es situen a la part NO del pati a la part del matí i a la part NE a la part de tarda, seguint els rajos de sol.

21/04/2013 Anem tots tres amb el nostre tutor al parc del Garraf a buscar crespinell per les tortugues, practicar macrofotografia i veure si trobem plantes bulboses per un projecte del treball de fotografia de la Júlia. El Marí també vol aprofitar la sortida per marcar les coordenades d'uns avencs en el GPS perquè aviat té una sortida amb els de 3r d'ESO. Hem deixat el cotxe al triangle de l'inici del Pla de Querol i hem començat a caminar pel rascler amb una càmera cada un. Al cap de pocs minuts fem una troballa sorprenent, un arbust de pi de poc més d'un metre, estava ple d'unes erugues de color verd que feien un moviment sincrònic cada poc temps. Els hi hem fet moltes fotos i també hem gravat el moviment. El Marí diu que enviarà algunes fotos a experts en artròpodes del departament de Zoologia de la Facultat de Biologia. També veïrem moltes flors blanques d'estepa amb uns forats molt ben fets.



Però el que més ens va sorprendre era la gran quantitat de flors entremig d'un indret tant àrid com el rascler i ens dedicàrem a fer moltes fotos. Trobàrem varies bulboses, però cap orquídia.



Per últim, recollírem uns quants exemplars de crespinell per les tortugues del pati. Aquesta és una planta molt freqüent al massís del Garraf i que fa poc que s'ha comprovat que forma part molt important de la dieta de la tortuga mediterrània en llibertat (més informació en el TR del Marc). El crespinell l'hem vist per tot arreu, però on n'hi ha més i és més fàcil d'agafar amb totes les arrels és a prop de la carretera, entre les pedres.



26/04/2013 La Júlia i el Marí van al pati de les tortugues on alliberaran la granota que els alumnes de P4 tenien a classe. Els nens es col·loquen al balcó del seu pati des d'on tenen una bona visió de tot el pati de les tortugues, i així la Júlia i el Marí poden fer fotos i explica'ls-hi que allà la granota estarà en el seu hàbitat i que ja no caldrà que li donin menjar. Els alumnes es despedeixen de la granota i el Marí l'allibera a prop del bassal on hi ha més vegetació.



El Marc fa un control de totes les tortugues i observa que totes continuen recuperant pes menys la JS2 que ha perdut mig gram (però no és preocupant). També ha hagut de tornar a marcar la C8 ja que s'havia esborrat la seva marca de la closca. Els hi posa menjar suficient per tot el cap de setmana.

16/05/2013 Avui dijous a l'hora de pati (al voltant de les 11:00 h), el Pau Vilaseca i el Roger Ferraz, dos alumnes de 2n d'ESO que fan el seu treball de *Petites investigacions* sobre els animals que habiten al pati de les tortugues, han vist que la tortuga més gran estava començant a fer niu; han demanat una càmera amb teleobjectiu al Marí i han fet un seguiment intermitent de tot el procés (amb fotos i vídeos) fins que la tortuga ha tapat el forat on havia dipositat els 4 ous. Ha trigat moltíssim, perquè entre la primera foto (quan comença a fer el forat) i la última (quan el tapa) han passat un total de 6 hores; 5 hores per fer el forat i una hora

per posar els ous i tapar-los. Un cop la tortuga ja ha marxat del lloc, cap a les 17:00 h, procedim a l'extracció dels ous de la manera habitual, per portar-los a les incubadores del laboratori de biologia.



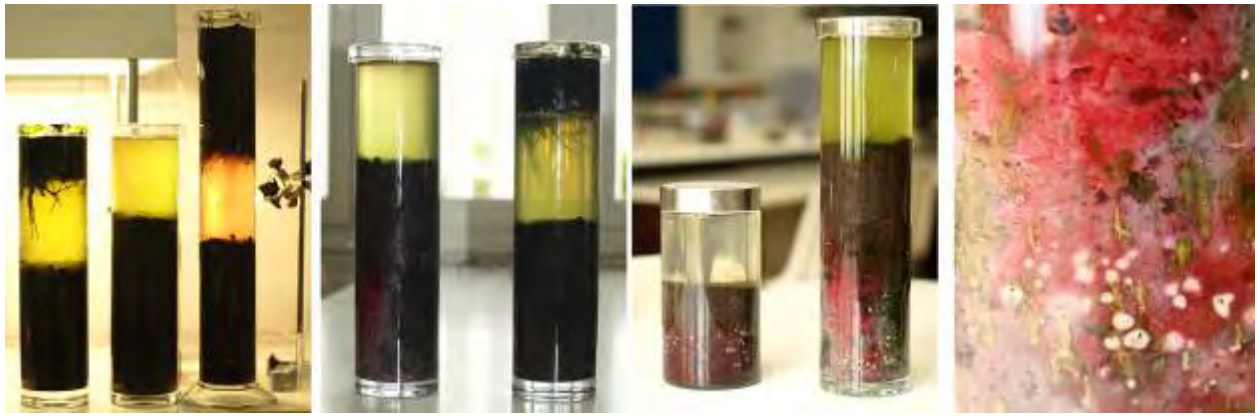
Aquest any hem incorporat uns enregistadors electrònics nous, que són estrets i llargs, per tal d'introduir-los a l'interior de les caixes d'incubació, al costat dels ous, per monitoritzar amb més precisió la temperatura i sobretot la humitat relativa, perquè no es coneixen registres d'aquestes característiques "in situ", és a dir, a dins dels recipients "Ferrero Rocher", i existeix la sospita que les condicions, sobretot d'humitat relativa, són sensiblement diferents de les de l'interior de la incubadora (més informació en el treball de recerca del Marc Olivella).



Aquesta tarda el Marí i la Júlia han anat a Barcelona perquè la fotografia "Límit conoidal al punt de fuga" de la Júlia ha estat premiada en el **14è Concurs de Fotografia Matemàtica de l'ABEAM** (Associació de Barcelona per a l'Ensenyament i l'Aprenentatge de les Matemàtiques). Es poden veure totes les fotografies del concurs intern de fotografia matemàtica de l'escola en el web del CCCB Educació ([http://www.ccbbeducacio.org/ca\\_ES/web/guest/explorar/-/institut/e\\_8826](http://www.ccbbeducacio.org/ca_ES/web/guest/explorar/-/institut/e_8826)).



18/05/2013 Fem el primer control exhaustiu de l'evolució de les columnes de Winogradsky. Ho fem en cap de setmana perquè volem disposar lliurement del laboratori per fer les proves de fotografia de les columnes, estudiant el tipus de llum (natural, directa, a contrallum, flaix...) per tal que les imatges reflecteixin el màxim possible els colors reals. Tenim problemes amb els reflexos que es produeixen i els intentem minimitzar inclinant una mica la direcció de la càmera en relació a la vertical de la columna (més informació en el treball del Pep Atencia).



31/05/2013 Avui ha vingut l'Eudald Pascual per veure com evolucionaven les columnes de Winogradsky i també ens ha portat planàries (aprofitant que n'havia anat a recollir per el seu projecte de fi de grau). Ens ha ensenyat a manipular-les, hem fet 4 tipus de talls que hem deixat en plaques de Petri individuals i també n'ha posat algunes al basal del pati de les tortugues, per veure si s'hi desenvolupen bé. Al cap d'un cert temps revisarem sota les pedres submergides a veure si en trobem alguna.



La Júlia ha realitzat un control de macrofotografia de les columnes i dels recipients hermètics situats sota el banc de llum. Els colors d'algunes columnes de Winogradsky del Pep Atencia són espectaculars; l'Eudald diu que l'evolució va molt bé.



04/06/2013 Trobem la primera posta d'ous de la femella mitjana al pati (segona posta de la temporada). L'ha fet molt tocant a la paret, gairebé entremig del crespinel, al costat de la primera posta de la tortuga gran, és a dir, a la zona del sauló, que el curs passat es va preparar especialment per fer les postes. Marquem els ous com de costum i aquesta vegada introduïm un enregistrator electrònic d'humitat i temperatura al seu costat, dins de la capsa d'incubació, com havíem fet anteriorment, però només amb vermiculita, sense els ous (més informació en el TR del Marc). La posta és de 4 ous (ara en tenim 8 en total).



16/06/2013 Uns dies abans havíem localitzat almenys 2 forats fets per la tortugues on ens pensàvem que hi havien posat ous, però no va ser el cas; van ser dos intents sense ous. Però avui hem trobat un altre forat en un lloc poc habitual, just al mig del pati en un lloc on no hi ha sauló i per tant està ple d'arrels. Allà hem descobert que hi havia ous i hem procedit a extreure'ls. N'hem trobat 6. Són de la femella gran i d'aquesta manera ja en tenim 14. D'altre banda hem comprovat que en la columna de Winogradsky del pati una bona part del sediment està flotant, i hem observat que la passionària, una planta enfiladissa perenne, està molt florida.



19/06/2013 A l'hora de pati hem descobert una marieta "posant-se les botes" de pugó i la Júlia ha anat a buscar una càmera. Avui ens quedem una estona per fer alguns canvis relacionats amb les incubadores. Passem la caixa amb els ous de la segona posta (i que porta incorporat un termohigròmetre) a l'altre incubadora (la que està a una temperatura una mica més baixa, d'uns 29°C). A la primera incubadora (la que està a temperatura més alta) ara només queden els 6 ous de la 3a posta. També traslladem a la primera incubadora la capsa amb els dos sensors i vermiculita (sense ous), que fins avui estaven a la segona incubadora (més informació en el TR del Marc).



20/06/2013 La Júlia amb l'ajuda del Marc i el Marí, porten la classe de P4 al laboratori on els hi fan una breu explicació de tot el que hi ha. En una ocasió treuen la salamandra perquè la puguin veure de prop i a més a més alimenten a la granota que hi ha al terrari. La Júlia i el



Marc els hi fan una senzilla explicació de com funcionen els aparells d'aproximació que disposem a l'escola i tot el que ens permeten veure que nosaltres a simple vista no veiem. Per posar un exemple, ensenyen un pot d'aigua del bassal del pati de les tortugues on els nens a simple vista no hi veuen res, tot seguit els hi expliquen com s'ha de preparar la mostra i on es col·loca per poder-ho veure de molt a prop. Amb el projector els alumnes queden sorpresos perquè s'adonen de que hi ha moltes coses que no veien. Finalment, interactuant amb els nens, els hi ensenyen com apropa un utensili de pocs augments.



26/06/2013 Podem les dues palmeres, diversos nespres del Japó i rebaixem una bona quantitat de l'heura que s'enfila per la soca dels arbres, amb l'objectiu principal que arribi més llum del Sol directe per les tortugues.



28/06/2013 Passem la tercera posta d'ous a la segona incubadora de 29°C.

01/07/2013 Anem a Vilassar de Mar on visitem tres llocs; el primer, un "garden" on hem treballat la fotografia macro amb molts tipus diferents de plantes, el segon, un hivernacle de plantes aquàtiques on també hem treballat la fotografia macro, juntament amb l'objectiu ull de peix i comprem un nenúfar que posteriorment col·loquem al bassal del pati i dos clavells d'aire. Finalment hem anat a un altre hivernacle per continuar treballant la fotografia.



La Júlia (que fa el TR de fotografia) treballa les composicions de les fotografies i comprova que la profunditat de camp es un factor molt important depenent del que pretenguis destacar en una imatge. Realitzem algunes macrofotografies a la mínima distància que la càmera permet enfocar.



En el segon centre que hem assistit (Aquàtiques Vilassar) descobrim un paisatge molt diferent i l'intentem captar de totes les maneres fent servir els diferents objectius, sobretot alternant entre els dos extrems (macro i ull de peix).



Fent proves amb l'objectiu ull de peix, ens adonem de que la millor manera de fer una bona fotografia és tenint un objecte que actuï de primer pla perquè el que ens permetrà l'objectiu es poder fotografia àmpliament tot el que li envolta, tot i que sempre hi hagi una distorsió de la imatge, que es pot fer molt evident.



En un dels hivernacles hi trobem la lletia d'aigua (*Lemna sp*) una planta aquàtica formada per moltes fulles verdes petites flotants, que fan una catifa flotant molt compacte. La Júlia fa una fotografia d'aquesta catifa passant per una barra de fusta que traspasa tot el bassal. Tot seguit l'Aleix, que treballa als hivernacles, ens agafa un nenúfar amb una flor molt maca que ens ha agradat.



Quan ja estàvem de tornada cap al cotxe hem passat per un indret on hi havia, junt a dos paons albins, molts exemplars de clavell d'aire penjants amb fil-ferro del sostre del corral i el Sr. Tolrà ens n'ha regalat dos pel pati de les tortugues. Després, de camí cap a l'entrada de l'autopista que ens portaria cap a Sant Feliu, ens hem aturat a fer un aperitiu a Ca l'Espinaler de Vilassar de Mar.



02/07/2013 Col·loquem bé el nenúfar i les altres plantes aquàtiques que portàrem el dia anterior, i mullem els clavells d'aire, que estaven molt secs.



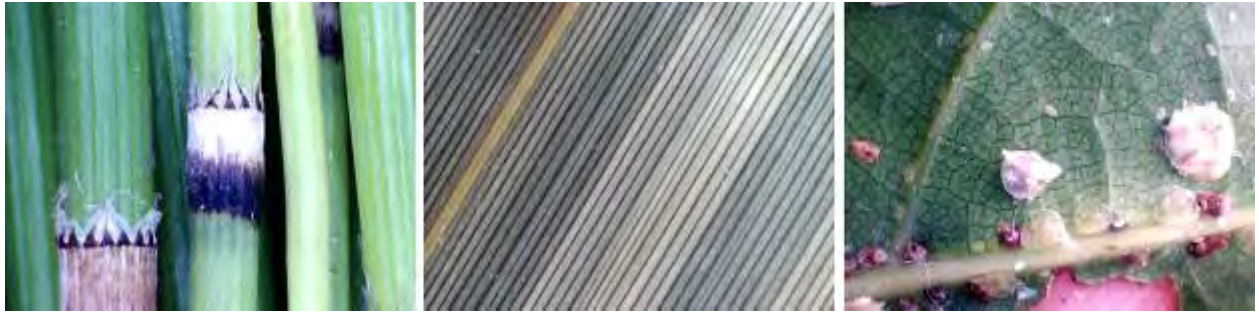
03/07/2013 La femella mitjana realitza la seva segona -i possiblement última- posta (la quarta comptant les dues tortugues) al pati. L'ha fet a la zona del sauló, després de molts intents durant diversos dies en molts altres llocs del pati.

04/07/2013 Dedicuem tot el matí a fer observacions microscòpiques. Fem la primera prova de camp del microscopi USB connectat a un portàtil. Per poder utilitzar aquest instrument es necessiten dues persones, una per aguantar el capçal i la rodeta d'enfocament, i l'altra per controlar l'enfocament en pantalla i fer la captura (més informació en el TR de la Júlia).

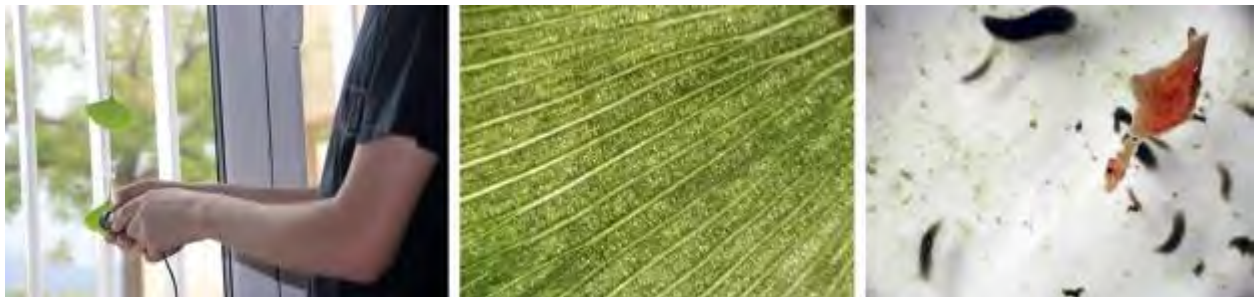


Aquest instrument es mostra molt versàtil al camp, sobretot per fotografiar superfícies en les que l'ocular s'hi pugui recolzar, per tal d'evitar que la imatge surti moguda. Algunes de les fulles del llorer que hi ha al costat del bassal tenien el revers ple de fitoparàsits; gràcies a l'augment del microscopi descobrirem que, a més a més de les taques blanquinoses visibles a ull nu, hi havia un gran nombre de petits pugons que corrien per tot arreu. Tot això "in situ", és a dir, sense haver de separar la fulla de l'arbre. Ara bé, també cal dir que no vam poder utilitzar la

resolució més alta del programa de captura perquè se'ns penjava l'ordinador (més informació en el TR de la Júlia).



El Marí ens havia encarregat de captar la fina nerviació dicotòmica d'una fulla del *Ginkgo biloba* que tenim al pati, però no s'acaba de veure bé i decidim fer un muntatge al laboratori amb el vidre de la finestra, a contrallum. Funciona. Després intentem fotografiar amb el microscopi USB les planàries just després de posar a l'aigua un tros de menjar (fetge que teníem congelat, seguint instruccions de l'Eudald), però es posen molt neguitoses i es desplacen ràpidament en totes direccions fins que troben el camí del menjar. Les planàries surten mogudes per efecte del seu moviment.



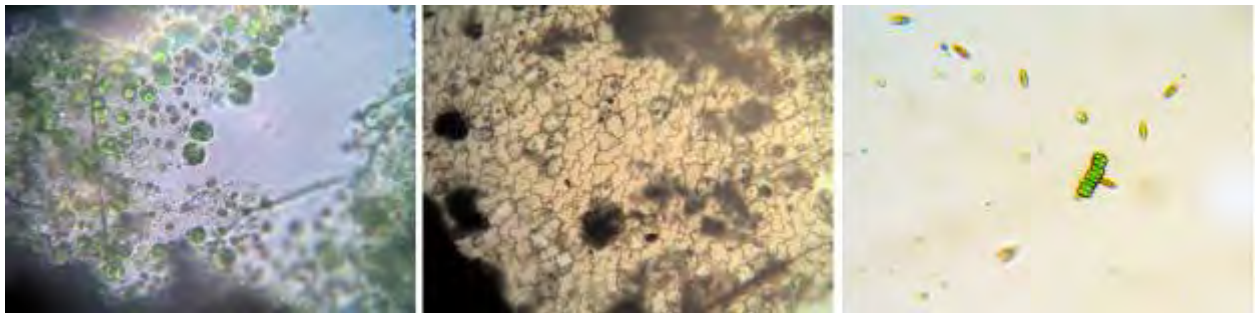
Fem diverses proves per captar amb el color més real possible les taques de les columnes de Winogradsky visibles a ull nu, però de mida més petita. Els millors resultats els obtenim quan s'il·lumina amb llum LED de color blanc (més informació en els TR de la Júlia i del Pep).



Un dels projectes de fotografia de la Júlia està relacionat amb fotografies d'ulls d'animals. Ha volgut fotografiar els ulls d'un insecte pal a través de la lupa binocular, però l'animaló no s'estava quiet i l'hem adormit amb èter el temps just per fer-li dues o tres fotografies enfocades. També ha fet preparacions de tricomes (pèls) del revers de fulles d'argentat i d'olivera. Coneixíem els d'argentat, i ens ha sobtat veure que els d'olivera -malgrat que més petits- tenen una forma molt semblant.



El Pep també ha volgut observar al microscopi (el normal, el de sobretaula) la part superior (de color verd) d'una de les seves columnes. Hem pogut veure com les algues verdes destaquen força pel seu color. També hem pogut identificar una estructura morta corresponent a una epidermis foliar perquè té estomes i no hi ha espai intercel·lular (ho havíem fet a pràctiques de biologia no feia gaire temps); possiblement vingui d'un resta d'una fulla present en el sediment que es va introduir a la columna. Amb un llibre d'identificació d'organismes d'aigua dolça, hem pogut identificar alguns microorganismes a nivell de grup (Cianobacteris, Diatomees, cloròficies del gènere *Scenedesmus*, etc).



05/07/2013 Fem una sortida al massís del Montseny amb l'objectiu de realitzar fotografia biològica d'aproximació i macrofotografia en un indret natural. El Montseny no està gaire lluny i té ambients molt diversos, per això és un dels llocs escollits pel nostre tutor. Fem la primera parada a Sant Marçal i el Marí ens entrega una càmera a cadascú perquè anem fotografiant allò que ens cridi més l'atenció.



En aquest indret ens dividim i repartim per tota una zona amb vegetació baixa, on anem cadascú pel seu compte fotografiant les coses de més interès propi.

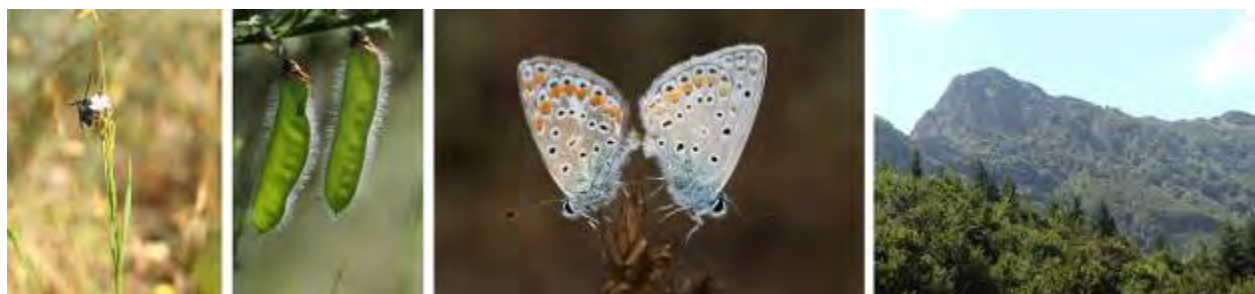
En les fotografies realitzades és on més es mostra el gust de cadascú envers el camp i la varietat de coses que es poden fotografiar.



Com es pot apreciar a les fotografies anteriors i posteriors, és veu una clar interès en la fotografia d'aproximació per part del Marc i la Júlia, i un interès pel paisatge per part del Pep.



La Júlia s'està molta estona amb un mateix motiu perquè treballa l'enfocament selectiu per al seu treball de recerca i li han sortit unes fotos molt maques.



Abans d'entrar al cotxe per desplaçar-nos cap a la fageda de Santa Fe, descobrim una marieta a sobre d'una de les càmeres i li fem un bon grapat de fotos.



Després anem a un rierol en una zona obaga per continuar practicant la fotografia biològica, però aquest cop amb la intenció de fotografiar animals més grans que abans. D'aquesta manera aconseguim fotografiar varies espècies d'insectes, un llimac (*Arion rufus*) i una granota (*Rana temporaria*). Practiquem amb el flaix anular d'una de les càmeres.



La Júlia fa proves amb el flaix i la velocitat d'obturació. Fa diferents fotografies amb velocitats d'obturació diferents i amb flaix o sense flaix. S'adona que amb flaix el que fas és capturar un moment on es poden veure perfectament tots els detalls de l'aigua caient, en canvi amb un velocitat d'obturació més lenta el que et permet és captar el moviment de l'aigua. A més a més el flaix et proporciona més transparència alhora de fotografiar l'aigua.



Amb l'ajuda de guies de camp hem aconseguit classificar varies espècies d'insectes i larves aquàtiques d'insectes, d'amfibis... i fins i tot una planària.



Per tal d'augmentar el contrast de les fotografies situem el recipient de plàstic amb els organismes a sobre de la camisa blanca del Marí.



Al migdia anem a dinar a la terrassa de l'Avet blau, un bar-restaurant. Després de dinar anem cap a una altra zona de Santa Fe, a prop de l'embassament, per continuar practicant la fotografia i classificació d'espècies.



Trobem agalles de faig (*Mikiola fagi*) que es tracta d'una resposta vegetal a la presència d'un paràsit. La fulla crea un teixit amb un creixement anòmal per intentar evitar una possible infecció per part de l'insecte paràsit.



Un dels aspectes que hem après és que a l'hora de fotografiar amb un objectiu macro ens trobem amb el problema de l'enfoc, ja que hi ha molt poca profunditat de camp i només tenim l'opció de que algunes de les parts de l'objecte d'interès surtin enfocades. De manera que hem de decidir quina és la part que ha de quedar més nítida per aconseguir una bona imatge, jugant amb la posició de la càmera respecte el motiu. A més a més hem de tenir present el fons perquè el subjecte surti més destacat i cridi més l'atenció. També tenim l'opció d'utilitzar el flaix amb un fons fosc, fent que aquest quedi negre.



10/07/2013 La tortuga gran fa la seva 3a posta de la temporada (la 5a entre les dues femelles). És de 3 ous (més un que s'ha trobat ben destrossat en el niu; ha fet el niu molt a prop de la paret que dona al menjador. Ara tenim un total de 21 ous. Ja feia un parell de dies que s'observava com aquesta tortuga intentava fer una posta, però no acabava d'enllestir-la. Entre altres coses perquè quan ho feia a la zona del sauló, com ja està molt disgregat, no aconseguia fer el forat prou fons perquè el sauló disgregat tornava a caure al forat, i quan ho intentava en altres indrets topava amb obstacles (pedres, arrels...) i no el podia acabar.



11/07/2013 El Pep dedica el matí a fer observacions microscòpiques de les columnes de Winogradsky amb diverses tècniques (inclosa la del porta excavat) i fa algunes comprovacions interessants, per exemple, que les taques marrons de les columnes (del terç superior, més oxigenat) són constituïdes per diatomees, i que a la part superior il·luminada de color verdós hi ha multitud d'organismes; n'ha intentat classificat alguns amb una guia de camp, però la majoria són difícils d'identificar, de manera que ha fet microfotografies dels més abundants per ensenyar-los el proper dilluns al Jordi Urmeneta.



12/07/2013 Agafem plantes d'alfals de la parcel·la de batxillerat per posar a les tortugues grans, descobrim un exemplar de morró (*Anagallis arvensis*) de flor hexàmera, quan es tracta d'una flor típicament pentàmera. Possiblement es tracti del mateix exemplar que va trobar un alumne del curs passat (Rubén Marías) en el mateix indret. El Pep li fa algunes fotografies amb objectiu macro.



15/07/2013 Avui el Pep comença la part pràctica de l'anàlisi dels biofilms de les columnes al laboratori del Departament de Microbiologia de la Facultat de Biologia de la UB. Abans, però, hem anat a l'escola per agafar les mostres de les columnes i guardar-les, convenientment etiquetades, en recipients *Ependorf*. Un cop al laboratori de microbiologia, amb el Marí i el Jordi, hem acabat de programar el calendari d'actuacions per dues setmanes.



16/07/2013 Es fa un control de pes de les tortugues (encara esperem que la femella 6218 pugui fer una posta) i s'afegeix aigua al bassal. La calor d'aquests dies ha fet que s'evaporés força aigua- Com és habitual, quan s'omple el bassal, molts dels carpins vermells passen a la part poc fonda del bassal.



17/07/2013 Hem canviat les hores del terrari on hi ha 4 insectes pal, que ja són adults i posen ous. El Pau –el fill del Vicenç- ha estat l'encarregat de recollir uns quants ous del terrari (més de 20) que s'han guardat en una placa de Petri, la resta d'ous els hem recollit i els hem portat al pati de les tortugues, en un indret humit (entre la molsa i les falgueres, a prop del brollador de la cascada). Tot ho ha fet el Pau sota la supervisió de la Júlia.



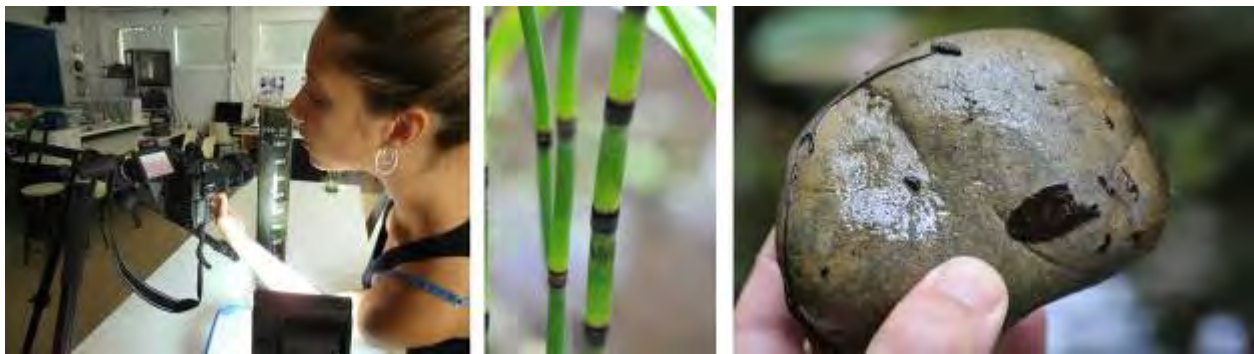
18/07/2013 El Marí torna a passar pel departament de Microbiologia per veure com va tot i parlar amb el Jordi Urmeneta. Es fa una fotografia de cada un dels dos tipus de sembra que es va realitzar en placa. El marí li demana al Jordi de fer una fotografia del muntatge (colònies bacterianes atrapades en una resina endurida) que està preparant per una exposició de microbiologia al Museu Blau de Barcelona. Les colònies vermelles de *Serratia* són molt vistoses.



El mètode de sembra simple per esgotament ha estat suficient per poder obtenir cultiu pur en la majoria de casos, però en dos d'ells no ha estat així i es procedeix, en aquests, a fer servir un mètode més acurat, el mètode de sembra escocès. El Pep ensenya les tincions de Gram que va fer el dia anterior i en prepara una per observar al microscopi amb la tècnica d'immersió i explica com va fer les fotos amb l'equip del Jordi. Després, abans de marxar, neteja l'oli de l'objectiu d'immersió amb dissolvent orgànic (una mescla d'alcohol i èter) i uns papers especials (més informació en el TR del Pep).



19/07/2013 La Júlia dedica bona part del matí a practicar la tècnica d'enfocament amb *Live view* i lupa d'enfocament, i ho aplica a fer macrofotografies de les columnes de Winogradsky. Després fa algunes macrofotografies al pati de les tortugues. Hem trobat 3 planàries sota una pedra submergida, senyal que s'hi han adaptat bé a l'aigua del bassal.



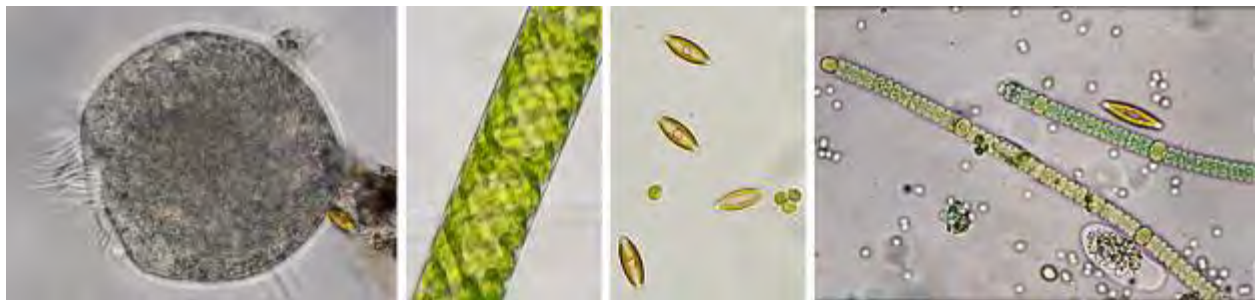
23/07/2013 La Júlia i el Marí, després de passar per l'escola i agafar mostres del bassal del pati de les tortugues i de les columnes del TR del Pep, fan una visita al Departament de Microbiologia, on hi ha el Pep fent les pràctiques, per poder-les fotografiar amb el sistema que té muntat en Jordi Urmeneta. Aquest sistema consisteix en microscopi òptic amb una càmera reflex acoblada i connectat a un ordinador des d'on amb un determinat programa es poden fer fotos i vídeos en alta definició.



La Júlia prepara diferents mostres de diferents zones del bassal; organismes de sota d'una fulla, algunes algues filamentosos i fulles d'Elodea. Amb les columnes del Pep en prepara un parell procedents de la zona superficial i d'una taca més marró. Les mostres les va preparant a mida que acaben d'observar i fotografiar les primeres preparades, perquè sinó l'aigua de la mostra a causa de la calor s'assecarà i ja no podem fer observacions "in vivo".



La Júlia amb l'ajuda del Pep, fotografia i grava el diferents organismes d'interès de les mostres preparades. S'observen bacteris vius en moviment ràpid i també organismes relativament grans, com un protozou amb una corona de cilis que no para de moure. En el cas dels motius estàtics fan una captura en la que tenen en compte tots els factors de lluminositat, però en el cas dels motius dinàmics, perquè les fotografies no quedin mogudes, fan gravacions i així posteriorment podran fer una captura de pantalla de l'organisme en qüestió amb una pantalla d'alta resolució.



El Pep fa una selecció de les mostres de tinció de Gram, les observa amb un objectiu d'immersió i fa les microfotografies com li ha ensenyat en Jordi Urmeneta.



24/07/2013 Abans de començar les vacances d'agost, el Carlos (tècnic informàtic) i el Marí volen comprovar si el pluviòmetre està ben net, perquè sospiten que en la tempesta del dijous passat va marcar menys del previst. El troben parcialment obstruït per excrements d'ocell i com no és la primera vegada hi volen posar remei. Fan una corona de punxes de filferro (plastificat) al voltant de la part superior del pluviòmetre, amb la inclinació suficient perquè no influeixi en els registres de pluja i confiant en que serà efectiu en el sentit d'evitar que els ocells s'hi posin i facin les seves necessitats a l'interior del recipient cònic. Mantenir l'estació meteorològica en bones condicions, així com la seva derivació inalàmbrica situada al pati de les tortugues, és molt important per alguns treballs de recerca (més informació en el TR del Marc).



Després de tornar a col·locar el pluviòmetre al seu lloc, el Marí i el Pol fan un descobriment en el terrat més alt de l'escola que els sorprèn: s'hi està desenvolupant una població de crespinell, una de les plantes clau per l'alimentació de les tortugues, i que precisament havíem portat algun exemplar del Garraf (vegeu explicació del dia 21/04/2013). El Pol i el Marí n'agafen una bona quantitat amb les arrels i el Carlos s'ocupa de plantar-les al pati de les tortugues al costat de les altres; després fa una regada generosa de tot el pati. Ho tornarà a repetir a mitjans del mes d'agost, que pujarà expressament per regar i donar un suplement alimentari a les tortugues grans. També observem que la passionària s'ha enfilat pel pi insigne i està ben florida.



31/07/2013 Canviem les plantes d'heura del terrari dels insectes bastó, recollim els ous i els portem al pati de les tortugues, al mateix lloc que els del dia 17/07/2013. Descarreguem les dades dels dataloguers.



05/08/2013 El Marí s'ha trobat que havien nascut 2 tortugues de la posta n°2 (possiblement del dia anterior) i dues més mostraven senyals. De fet, la tercera ha nascut al cap de poca estona.



06/08/2013 Ha nascut la quarta tortuga de la segona posta. D'aquestes 4 tortugues, 3 presenten una duplicació en una placa marginal. El temps d'incubació d'aquestes tortugues ha estat molt exacte, de 60 dies, que és l'esperat a aquesta temperatura d'incubació. Després hem afegit aigua al bassal (molta calor i molts dies sense ploure havien fet abaixar el nivell) i quan hem tret la bomba del brollador el tub flexible (que va de la bomba fins al brollador) s'ha partit en dos. El Marí ha trobat tub del mateix gruix, però de PVC (que és més resistent) i ha canviat el tram sencer. L'altra bomba, la que impulsa aigua a la cascada, quan s'ha tret fora de l'aigua per netejar el filtre, el tub vell ha aguantat, és a dir, no s'ha trencat com l'altre, però segons el Marí, això pot passar a la propera vegada (per això també ha comprat tub de PVC per quan s'hagi de canviar el d'aquest tram). Després de netejar els filtres, observem com ha augmentat significativament la pressió de sortida d'aigua, tant la del brollador, com la de la cascada.

07/08/2013 Avui és el dia de la visita anual al CRARC. Arribem a l'escola a les 9:15h; el Marc s'ocupa de les tortugues, el Marí prepara les capsos pel transport i la Júlia fa unes fotografies de d'insectes atrapats en l'herba aferradissa de la parcel·la de plantes heliòfiles del pati de batxillerat. L'efecte d'aquesta planta sobre insectes que hi queden enganxats va ser descoberta en un treball de recerca anterior (Natàlia Garcia, 2010), i el Marí li ha demanat a la Júlia que en faci una continuació ampliant la metodologia d'observació de plantes amb ganxos (més informació en el TR de la Júlia).

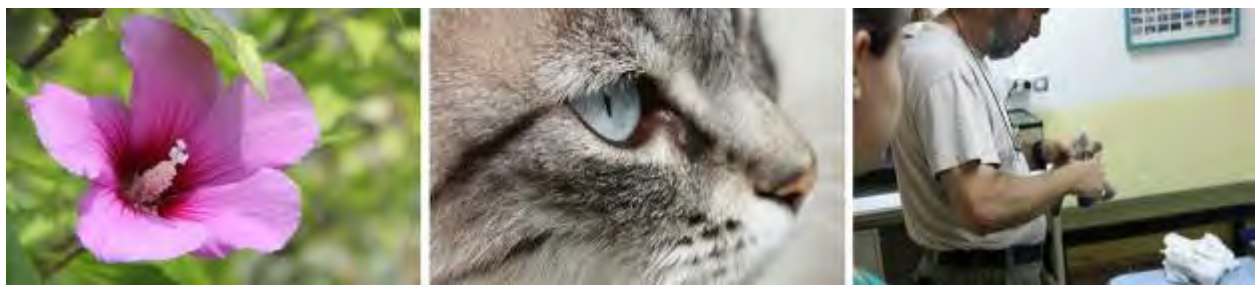


El Marc pesa les tortugues grans i les posa en una gàbia de transport (ha observat que la tortuga mitjana, la que pensàvem que encara podia fer una posta, no ha baixat de pes). Fa el mateix amb les 12 juvenils; per aquestes serà la última pesada, perquè es quedaran al CRARC- Observem molta diferència entre les 6 que estaven al terrari del laboratori (molt petites) i les 6 mantingudes al terrari exterior (molt més grans); la comparativa, però, s'haurà de fer amb valors relatius, ja que inicialment es posaren les més petites al terrari interior (més informació en el TR del Marc). Un cop hem arribat al CRARC, ensenyem les tortugues juvenils a Joaquim Soler (Director tècnic del CRARC) i el Marí li fa entrega d'una còpia en paper dels treballs de recerca de l'any anterior relacionats amb les tortugues. Arriba l'Albert (Director científic del CRARC) i pregunta al Marí sobre alguns dels resultats d'aquest any del treball del Marc relacionats amb la pèrdua de pes de les juvenils durant la hibernació, que ja havien comentat per e-mail. Els resultats sembla ser que són concloents i no caldrà repetir-los; a més,

al tractar-se de dades no publicades podrien ser motiu d'un nou article, però s'han d'acabar d'analitzar a fons (més informació en el TR del Marc). Després l'Albert es posa a parlar del viatge naturalista que acaben de fer ell i el Quim a Galàpagos i li diu al Marí que estan allà es va recordar d'ell perquè trobaren l'esquelet gairebé intacte d'una iguana morta de les Galàpagos i li va comentar al Quim: "li podríem portar l'os d'un dit al Marí perquè dediqui un dels seus treballs de recerca a esbrinar per osteocronologia quina edat tenia aquest animal"... però de seguida va desistir perquè d'aquest privilegiat indret natural no es pot extreure ni un gra de sorra. L'Albert ens diu que va a parlar un moment amb els integrants del curs ("CURSO PRACTICO DE CLINICA DE. REPTILES 2013") que imparteix a joves veterinaris i que aviat ens avisarà perquè ens hi incorporem. Mentrestant, el Quim facilita a la Júlia la fotografia d'ulls d'amfibis i rèptils traient algun exemplar dels terraris.



L'Albert triga més del que pensàvem a avisar-nos, per tant decidim començar a visitar les instal·lacions exteriors. Trobem una planta (*Hibiscus syriacus*) que crida l'atenció de la Júlia perquè va fer un treball de fotografia científica sobre aquesta planta quan feia 3r d'ESO. El Marí ens explica que quan feren l'ampliació de les instal·lacions exteriors al CRARC per la tortuga mediterrània, plantaren bastants exemplars d'aquesta espècie per les tortugues; el mateix any es plantaren 3 exemplars al pati de les tortugues (Albert Marsà, 2010), que encara hi són. La Júlia també intenta fotografiar els ulls d'un preciós gat (barreja entre siamès i tigrat) que és, segons el Quim, una adopció recent. L'Albert ens avisa que ja hi podem anar. A l'entrar al recinte annex als laboratoris, notem una forta olor a queratina (a banya cremada, o a dentista, segons el Marc) perquè el Quim està marcant tortugues amb una serra radial mini; ens explica que és millor aquest sistema que el de serra manual (el que s'ha fet servir a l'escola abans dels alliberaments al Garraf i al Montsant els dos anys anteriors) perquè, en el cas de passar-se i fer sang a l'animal, la ferida queda cauteritzada.



Entrem a la zona dels laboratoris de veterinària del CRARC amb les nostres tortugues adultes. L'Albert fa una ecografia a cada femella i no hi veu ous ni fol·licles en desenvolupament.



Tot seguit, aprofitant que ja han posat en marxa aquest aparell, porten una tortuga molt gran i perillosa (és una tortuga mossegadora), la Concha. Li fan una revisió i ens ensenyen els òrgans que es poden apreciar des de la pantalla, en aquest cas sí que s'observen els ous.



Després acompanyem a l'Albert que la porta al seu recinte exterior i ens fa una explicació d'aquests animals. A continuació tornem al laboratori i l'Albert administra una dosi d'antiparasitari a les nostres tortugues grans; ho fa amb els dos sistemes, a la gran li administra amb sonda gàstrica i a les altres dues amb una injecció.



04/09/2013 El Pol i el Marí fan una podada molt important a l'heura de la paret sud i nosaltres tres recollim totes les branques i les fulles que queden escampades pel pati de les tortugues. Les anem col·locant en una malla per així al final fer una pilota de fulles, lligar-la i pujar-la cap als containers. Tot seguit, amb l'ajuda del Pol, tallem amb una serra lligada a un pal, totes les branques seques del pi que hi ha al pati, i aquestes les pugem lligades amb una corda.





20/09/2013 Avui fem la dissecció dels ous que no han eclosionat per veure si s'hi poden observar embrions prou desenvolupats per poder saber si presenten duplicacions. Ens hi ajuden l'Alba i la Isabel, companyes de biologia. Trobem força embrions, alguns ben desenvolupats i els guardem en un pot amb formol, juntament amb altres trobats en treballs de cursos anteriors. Només trobem un ou clarament no embrionat (més informació en el TR del Marc).



26/09/2013 La Júlia fa proves d'algunes càmeres reflex de l'escola (2 Olympus, 3 Canon i 1 Nikon) i hi incorpora la seva càmera reflex Olympus i una càmera compacta Canon. També fa proves dels objectius macro de cada marca (2 per marca, exceptuant Nikon que només utilitza un objectiu macro). Utilitza una carta de calibratge i un trípode per poder tenir més estabilitat i que les fotografies no surtin mogudes. D'altra banda posa les mateixes condicions de captura en totes les càmeres perquè així no hi hagi diferències i es pugui fer una comparació més exacte. Finalment fa varies fotografies amb enfoc manual i una amb enfoc automàtic.



27/09/2013 Col·loquem un espantaocells (amb l'ajuda del Pol) al costat NE del pati de les tortugues perquè aquest estiu hem observat com alguns tudons entren al pati per aquest costat i fan "escala" a la barana de l'entrada i s'hi van acumulant excrements. Però el més greu és que s'ha observat que s'estavellen contra els vidres de les portes que comuniquen amb el menjador. Això ja havia passat fa tres anys i s'hi va buscar una solució similar que va funcionar (Alba Ramon, 2010).



El Pep torna al laboratori de Microbiologia de la Facultat de Biologia perquè el Jordi Urmeneta li ha d'entregar les seqüències d'ADN dels bacteris i explicar-li el procediment que ha de seguir. S'hi està tot el matí.

Al migdia ve l'Eudald Pascual a recollir un llibre de microbiologia que ens havia deixat i el Marí li fa entrega d'un exemplar del "Boletín de la Asociación Herpetológica Española) on surt la publicació en què ell és coautor. El Pep li explica com va el treball, la visita d'avui amb el Jordi i li ensenya les columnes amb el llum LED. L'Eudald vol saber si les planàries que va portar (vegeu el dia 31/05/2013) s'han adaptat bé al bassal del pati de les tortugues. Per això baixa al pati per comprovar-ho, però torna al cap d'una estona sense haver-ne trobat cap. El Marí li insisteix que n'han vist, que la Júlia el dia que agafava mostres del bassal per observar al microscopi del laboratori de Microbiologia en va trobar (vegeu dia 19/07/2013). L'Eudald torna a baixar, ara acompanyat del Marí, i després d'una bona estona de buscar, aconseguen trobar-ne dues a sota d'una pedra. Potser han costat de trobar perquè avui s'ha afegit aigua al bassal i s'ha remogut l'aigua. També hem observat que cada cop que s'afegeix aigua al bassal, els carpins vermells es desplacen a la zona del brollador.



01/10/2013 Buidem el receptacle de la trampa antimosquits que tenim al pati de les tortugues. Ho fem al laboratori aquesta vegada (les anteriors ho fèiem al bassal i els peixos ho menjaven) perquè volem fotografiar-ho per deixar constància dels altres insectes atrapats, a més a més dels mosquits. Al tornar a col·locar la trampa al seu lloc del pati (al cap de dos dies) ens adonem que les caixes d'hibernació estan molt desplaçades del seu lloc, i descobrim que la causa són les tortugues; les femelles intenten escapar-se del mascle, que les empaita a totes hores per l'aparellament. Possiblement la calor inusual d'aquests dies -avui s'ha arribat als 30,4°C- hi tingui alguna cosa a veure.



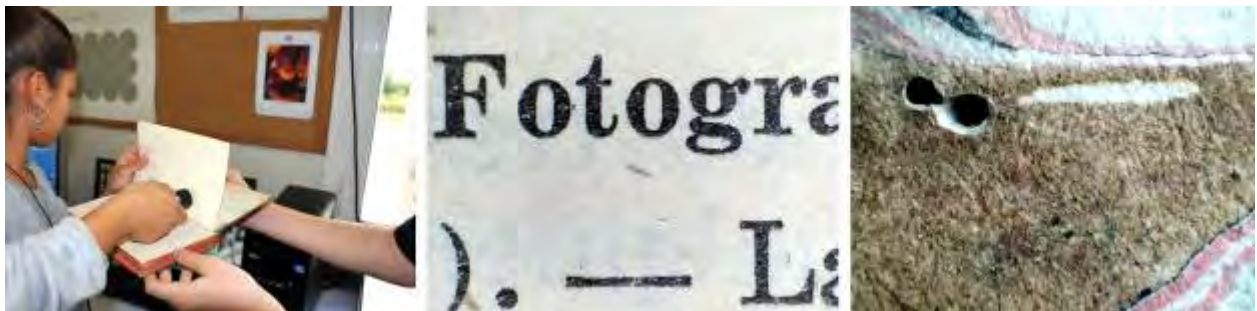
04/10/2013 La Júlia estrena un microcarro per fotografia macro que va muntat al tríode per tal de poder fer sèries de fotos d'objectes i d'insectes modificant el punt d'enfocament per aplicar la tècnica d'enfocament compost o per apilament (més informació en el TR de la Júlia Alguacil).



10/10/2013 L'espai *Blog de mestres* de Catalunya Ràdio i Catalunya informació s'ha interessat pel projecte del Pati de les tortugues i avui han entrevistat al nostre tutor i també a nosaltres tres, que ens han preguntat pel nostre treball de recerca. Al Marc li ha tocat parlar més perquè és el que fa el treball més directament relacionat amb les tortugues.



17/10/2013 La Júlia acaba l'encàrrec de l'Emília Ocaña (professora de Castellà) de realitzar microfotografies d'alguns detalls de llibres molt vells que han portat de casa seva els alumnes del projecte "Libros y papeles", que substitueixen al de *Petites investigacions* dels últims anys. La Júlia havia començat aquest treball amb el microscopi USB connectat a un portàtil que havia donat problemes (i no es podia utilitzar la màxima resolució perquè es penjava) i es va decidir fer-ho amb l'ordinador de la nova estació de fotografia que hi ha a l'aula d'informàtica. Algunes fotos es feien a contrallum (per detectar les marques d'aigua, per exemple), però de la majoria es captava la textura de la superfície i els dibuixos. La Júlia es va interessar per un llibre dels més antics que tractava sobre fotografia. Un dels aspectes més curiosos de la superfície de la coberta d'alguns llibres eren els forats realitzats per insectes.



21/10/2013 Avui ens han avisat que sortia l'entrevista que ens feren la setmana passada sobre el projecte del Pati de les tortugues i els nostres treballs de recerca. La veritat és que ens ha fet molta il·lusió sentir-nos per la ràdio. I com està penjada al web i al facebook del Blog de mestres de Catalunya Ràdio, ho hem pogut enviar als amics.



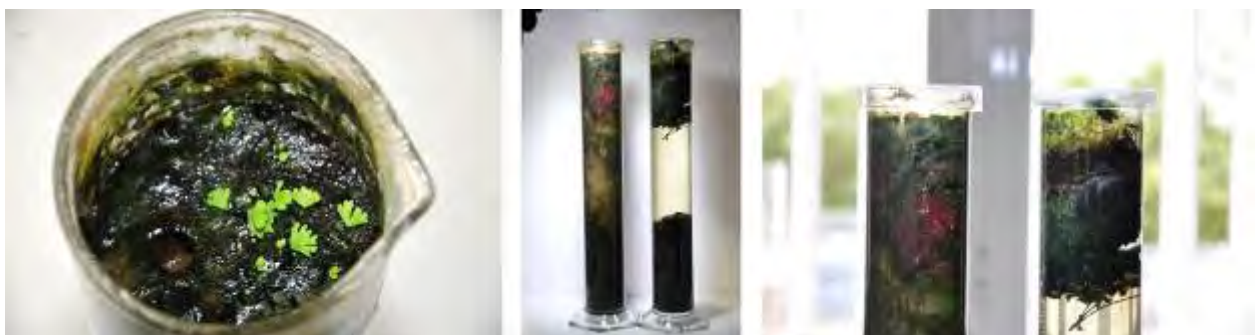
25/10/2013 La Júlia dedica la primera part de la tarda (avui el laboratori de biologia no està ocupat) a fer fotografies a través de la lupa binocular d'un insecte pal, després d'adormir-lo, i també als seus ous característics.



Més tard va a l'aula d'informàtica (on hi ha els microscopis USB connectats a l'ordinador de l'estació digital Windows) per realitzar el càlcul dels augments dels nous microscopis USB; una mica més tard, amb el Marí, estudien unes noves cartes de calibratge d'objectius fotogràfics, que acaben d'imprimir en alta qualitat en format Din-A3 amb la impressora del laboratori de fotografia.



30/10/2013 El Pep, que avui fa segurament les últimes fotografies de les seves columnes, descobreix que en la part superior de la columna que està al pati de les tortugues han nascut plantes (sembla ser que es tracta de la falguera que abunda a prop del sortidor d'aigua del rierol del bassal).



31/10/2013 Durant la classe de biologia hem dedicat una estona a observar els colors primaris i secundaris amb el microscopi USB, un aspecte que la Júlia ha treballat a fons (més informació en el seu treball de recerca).



Per la tarda la Júlia ha fet un reportatge fotogràfic a distància macro a una *Mantis religiosa* que un alumne de primer de batxillerat (Enric Vila) havia trobat al laboratori (no sabem com hi havia entrat).

Després de la sessió de fotos amb càmera rèflex i objectiu macro, es va adormir l'animal amb una càmera narcòtica improvisada perquè la Júlia volia fer una foto d'un ull ampliat amb la lupa binocular, però el resultat no va ser gaire bo en comparació a la bona qualitat de les macrofotografies. Al final, quan la mantis es va començar a despertar es va alliberar entre les fulles d'una planta enfiladissa del pati de les tortugues.



5/11/2013 A la Júlia li faltava una fotografia de "mirades animals", la de salamandra. Li demana ajuda per agafar-la o aguantar-la a la Núria Barrios, una companya que l'animaló no li fa massa gràcia, però la Júlia li ensenya a agafar-la correctament (amb les mans mullades, ja que és un amfibi) i el projecte es pot acabar satisfactoriament; per la seva part, el Pep també s'ha quedat per discutir alguns aspectes finals del seu treball amb el Marí.



6/11/2013 Recollim algunes fulles del bassal del pati de les tortugues, però la veritat és que aquest any, en comparació als anys anteriors per les mateixes dates (segons hem pogut comprovar consultant documents fotocronològics anteriors) n'hi ha molt poques, possiblement perquè aquesta tardor es fa esperar (els àlbers i les robínies encara tenen gairebé totes les fulles) i també per una qüestió relacionada amb el reg d'aquesta part del pati. Abans aquesta

zona estava connectada al sistema general de reg de l'escola (i es regava un cop per setmana en aquesta època de l'any), però s'ha anul·lat aquesta connexió, de manera que ara reguem la zona del pati (on no hi arriba l'aigua de pluja) només de tant en tant de forma manual amb la mànega i possiblement per aquesta raó els exemplars de parra verge hagin produït menys quantitat de fulles. A dia d'avui, és la única caducifòlia del pati que ja ha perdut gairebé totes les fulles.



De cara al curs vinent està previst fer una nova connexió de reg d'aquesta zona del pati amb l'entrada autònoma d'aigua del pati de les tortugues (situada a l'extrem NO) que alimenta el reg dels aspersors. Pel que fa a l'inici d'hibernació de les tortugues, aquest any sembla que el període començarà encara més tard que l'anterior, perquè les temperatures són anormalment altes. Malgrat tot, ja hem deixar netes i a punt les caixes-refugi per a la hibernació de les tortugues juvenils nascudes aquest any (sèrie M) i el terrari exterior protegit amb malla electrosoldada per a la hibernació de les tortugues grans.

12/11/2013 Demà és l'entrega definitiva de les tres còpies dels nostres treballs de recerca. Adjuntem una còpia de les tres portades.



## **Agraïments**

Hem d'agrair per la col·laboració en aquest treball de recerca especialment al Dr. Jordi Urmeneta, qui ens va anar donant consell durant tot aquest temps i ens ha proporcionat els medis i ajuts necessaris per poder fer tot el procés d'aïllament i identificació dels organismes bacterians, i en la correcció dels resultats. També agraïm a l'Eudald Pascual per proposar aquest treball i fer-ne el seguiment. Junt amb el meus companys de treball de recerca relacionats amb el projecte del Pati de les tortugues, especialment a la Júlia per la seva col·laboració en la part fotogràfica, i personalment agraeixo al meu tutor Josep Marí per la direcció i per donar-me l'oportunitat de fer un treball de recerca com aquest.

