

**Títol del treball:**

Anàlisi estructural del biofilm microbià de les llacunes salades  
dels Monegros

---

Estudiant: Nura Abbas Via

Grau en Ciències Ambientals

Correu electrònic: nura1194@hotmail.com

Tutor: Anna Maria Romaní Cornet

Empresa / institució: Institut d'Ecologia Aquàtica, Facultat de Ciències,  
Universitat de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor\*):



Nom del tutor: Anna Maria Romaní Cornet

Nom del cotutor\*:

Empresa / institució: IEA, Facultat de Ciències, Universitat  
de Girona

Correu(s) electrònic(s): anna.romani@udg.edu

\*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació:

# Anàlisi estructural del biofilm microbià de les llacunes salades dels Monegros



Estudiant: Nura Abbas Via

Tutora: Anna Maria Romaní Cornet

TFG - Grau en Ciències Ambientals

Juliol 2016

## RESUM

Els biofilms són estructures formades per un conjunt de microorganismes com bacteris, algues i fongs. Aquests, estan envoltats per unes substàncies polimèriques extracel·lulars (EPS) que ells mateixos segreguen i que són essencials per a l'estructura i l'estabilitat del biofilm. Els biofilms es troben arreu del món en moltes condicions i ambients extrems, i un bon exemple són en les llacunes salades dels Monegros (Espanya), zona de mostreig d'aquest treball. L'objectiu d'aquest estudi és determinar la quantitat de microorganismes que defineixen l'estructura del biofilm de quatre llacunes (La Playa, Salineta, Chiprana 1 i Chiprana 2) per tal d'observar si el grau de salinitat i de sequera els afecta significativament. Per això, s'han aplicat tècniques al laboratori com l'extracció d'EPS, que s'utilitza per a estimar la quantitat de polisacàrids present a les llacunes. També s'ha aplicat la tinció amb DAPI per tal de determinar la densitat bacteriana, que es basa en tenyir els bacteris i fer-ne un posterior recompte. Una altre de les tècniques emprades ha estat l'extracció d'ergosterol, que s'ha realitzat per a determinar la biomassa fúngica, en la que es realitza una extracció i separació en fase sòlida i una posterior lectura en HPLC. També s'han analitzat els nitrats, fosfats i amonis de l'aigua d'aquestes llacunes, i se n'ha estimat el contingut d'aigua i la clorofil·la. Els resultats obtinguts mostren uns valors similars i elevats de microorganismes, sobretot de bacteris i de contingut d'EPS a les quatre llacunes, però sorprenentment també de fongs, que inicialment s'havien esperat menors, degut a la manca d'aigua i d'humitat en algunes zones i l'extrema salinitat. Les dues llacunes que presenten una major salinitat i que estan menys afectades per les condicions de sequera, tenen una elevada biomassa fúngica i una baixa biomassa algal, que es pot contrastar amb les altres dues llacunes de la zona Chiprana, ja que mostren unes condicions més extremes de sequera i presenten una biomassa algal elevada i una baixa biomassa fúngica. A les quatre llacunes s'ha mostrat un elevat contingut d'EPS, però sobretot a la Chiprana 1. Això significa que alguns d'aquests microorganismes poden adaptar-se a aquestes condicions severes, ja sigui fent-se més resistents o bé amb mecanismes de protecció com ho són les substàncies polimèriques extracel·lulars que segreguen. Aquest fet comporta que s'esdevinguin i es formin microorganismes amb característiques molt especials, capaços de tolerar salinitats superiors a les del Mar Mediterrani.

## RESUMEN

Los biofilms son estructuras formadas por un conjunto de microorganismos como bacterias, algas y hongos. Estos, están rodeados por unas sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que ellos mismos segregan y que son esenciales para la estructura y la estabilidad del biofilm. Estos se encuentran alrededor de todo el mundo, en condiciones y ambientes extremos. Y un buen ejemplo son en las lagunas saladas de Monegros (España), zona de muestreo de este trabajo. El objetivo de este estudio, es determinar la cantidad de microorganismos que definen la estructura del biofilm de cuatro lagunas (La Playa, Salinetas, Chiprana 1 y Chiprana 2) para observar si el grado de salinidad y de sequía les afecta significativamente. Para ello, se han aplicado un conjunto de técnicas de laboratorio, como la extracción de EPS, que se utiliza para estimar la cantidad de polisacáridos presente en las lagunas, y la tinción con DAPI para determinar la densidad bacteriana, que se basa en teñir las bacterias y hacer un posterior recuento. Otra de las técnicas empleadas ha sido la extracción de ergosterol, realizado para determinar la biomasa fúngica, en la que se realiza una extracción y separación en fase sólida y una posterior lectura en HPLC. También se han analizado los nitratos, fosfatos y amonios del agua de estas lagunas, y se ha estimado el contenido de agua y la clorofila. Los resultados obtenidos muestran unos valores similares y elevados de microorganismos, sobre todo de bacterias y de EPS en las cuatro lagunas, pero sorprendentemente también de hongos, que inicialmente se habían supuesto menores, debido a la falta de agua y humedad en algunas zonas y la extrema salinidad. Las dos lagunas que presentan una mayor salinidad y están menos afectadas por la sequía, tienen una elevada biomasa de hongos y muy pobre en biomasa algal, cosa que nos permite contrastar las otras dos lagunas de Chiprana, que tienen unas condiciones más extremas de sequía y presentan una biomasa algal elevada y una biomasa de hongos menor. En todas las lagunas hay un elevado contenido de EPS pero sobretodo en la Chiprana 1. Esto significa que algunos de estos microorganismos pueden adaptarse a estas condiciones severas, ya sea haciéndose más resistentes o con mecanismos de protección como lo son las sustancias poliméricas extracelulares que segregan. Este hecho conlleva que ocurran y se formen microorganismos con características muy especiales, capaces de tolerar salinidades superiores a las del Mar Mediterráneo.

## SUMMARY

Biofilms are structures formed by a group of microorganisms such as bacteria, algae and fungi. These, are surrounded by extracellular polymeric substances which they secrete and are essential for the biofilm structure and stability. Biofilms can be found worldwide in many conditions and in extreme environments, such as salty lagoons of the Monegros Desert (Spain), our sampling area. The aim of this study is determine the content of the microorganisms that define the biofilm structure of four lagoons (La Playa, Salineta, Chiprana 1 and Chiprana 2), to observe if the salinity and the drought gradient affect them significantly. In the laboratory we applied some techniques such as EPS extraction, which is used to estimate the amount of polysaccharides present in the lagoons. It has been also used the DAPI staining to determine bacterial density, based on the staining the bacteria and make a subsequent recount. Another technique used has been ergosterol extraction, which is used to determine fungal biomass, carried out in an solid-phase extraction and separation and a subsequent HPLC reading. We have also analyzed the nitrates, phosphates and ammonium from the water of these lakes, and it has been estimated the water content and the algal biomass too. The results show similar and high values of microorganisms, mainly bacteria, and high EPS content in the four lagoons, but surprisingly, there are also high values of fungi, which were initially expected to be lower due to the lack of water and moisture in some areas and the extreme salinity. The two more salty lagoons and less affected by extreme drought conditions had more fungal biomass but very low algal biomass, in contrast to the two Chiprana lagoons that showed a higher drought extreme conditions and had high algal biomass and very low fungi biomass. In all the lagoons the EPS content was high, but specially in Chiprana 1. This means that some of these microorganisms may adapt to these severe conditions, either becoming stronger or by protection mechanisms such as extracellular polymeric substances. This fact leads to form microorganisms with very special characteristics and which are able to tolerate higher salinities than the Mediterranean Sea.

# ÍNDEX

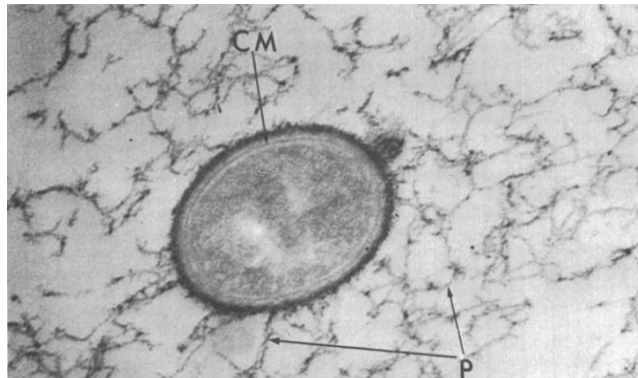
• <b>INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>1</b>
• <b>OBJECTIVES</b> .....	<b>6</b>
• <b>MATERIALS I MÈTODES</b> .....	<b>7</b>
- Zona d'estudi .....	7
- Mostreig experimental.....	7
- Paràmetres físico-químics .....	8
<i>Anàlisi de nutrients</i> .....	9
- Estructura del biofilm .....	9
- Paràmetres biològics .....	10
<i>Contingut de polisacàrids en substàncies polimèriques extracel·lulars</i> .....	10
<i>Densitat de bacteris</i> .....	11
<i>Biomassa fúngica</i> .....	12
<i>Biomassa algal</i> .....	15
- <i>Anàlisis estadístiques</i> .....	15
• <b>RESULTATS</b> .....	<b>16</b>
- Paràmetres físico-químics .....	16
<i>Anàlisi de nutrients</i> .....	16
- Estructura del biofilm .....	18
- Paràmetres biològics .....	19
<i>Contingut de polisacàrids en substàncies polimèriques extracel·lulars</i> .....	19
<i>Densitat de bacteris</i> .....	20
<i>Biomassa fúngica</i> .....	21
<i>Biomassa algal</i> .....	22
• <b>DISCUSSIÓ</b> .....	<b>23</b>
• <b>ÈTICA I SOSTENIBILITAT</b> .....	<b>25</b>
• <b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>26</b>
• <b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>27</b>

# INTRODUCCIÓ

Els biofilms són un conjunt de microorganismes (algues, bacteris, cianobacteris, fongs i protozous) adherits a una superfície i embolcallats en una matriu extracel·lular de substàncies polimèriques.

La primera vegada que es descriu una associació superficial bacteriana és en el 1684 per Antonie van Leewenhoek davant la Royal Society de Londres, en la que va explicar que havia observat acumulacions de microorganismes a la superfície bucal utilitzant un simple microscopi. Tot i així, aquest concepte no va començar a desenvolupar-se fins el 1936, en el que Zobell i Anderson van determinar agrupacions de bacteris en la superfície de l'aigua de mar i una distribució d'aquests a mesura que augmenta la profunditat. A partir d'aquí i juntament amb el descobriment del microscopi electrònic, es van potenciar les observacions d'aquesta estructura microbiana tant universal, i es desenvoluparen altres branques com per exemple per el tractament de malalties (Mora-Gómez *et al.*; 2015). També es descobreix en un estudi realitzat en una planta de tractament d'aigües, que el biofilm està compost per

polisacàrids (Figura 1) (Jones *et al.*, 1969), i en el 1978, Costerton *et al.*, desenvolupen una teoria en la que s'expliquen els mecanismes per els quals els microorganismes s'adhereixen a materials tant vius com inerts formant un agregat multicel·lular que resulta ser beneficiós per el nínxol ecològic en el que habiten (Donlan, 2002).



**Figura 1.** Imatge en microscopi electrònic d'un biofilm en una planta de tractament. CM (membrana cel·lular), P (polisacàrids). Font: Jones *et al.*, 1969

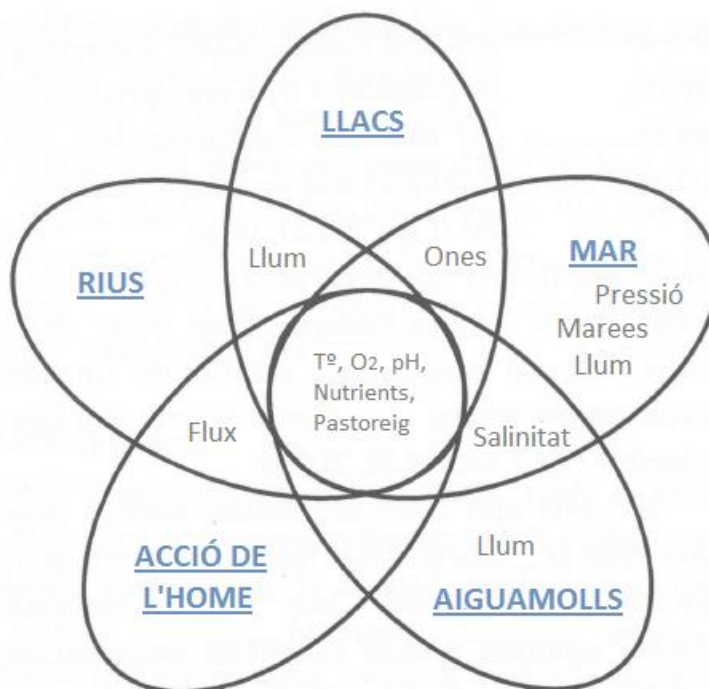
En el 1983, Wetzel descriu els biofilms com agrupacions de bacteris, algues, fongs i protozous embolcallats en una matriu de substàncies polimèriques extracel·lulars que colonitzen les superfícies de rius i llacs (Mora-Gómez *et al.*, 2015).

L'estructura del biofilm es comprèn per cèl·lules microbianes i una matriu extracel·lular formada per substàncies polimèriques (EPS) , té una arquitectura definida i proporciona un ambient òptim per a l'intercanvi de material genètic entre cèl·lules. (Donlan, 2002)

Aquestes substàncies polimèriques són d'origen biològic i estan produïdes sobretot per bacteris i fongs, en menor quantitat per algues i protozoous, i formen la matriu de l'EPS, que és un paràmetre estructural crucial per l' integritat, estabilitat i arquitectura del biofilm, a més de ser un refugi i protecció en èpoques d'estrès hídric i condicions desfavorables. L'EPS exerceix un paper clau en el substrat, així com també absorbeix la matèria soluble i particulada i els metalls i compostos tòxics. El gruix del biofilm depèn de la seva estructura tridimensional, desenvolupada en capes i gradients de nutrients. S'ha demostrat que els biofilms són estructures obertes altament hidratades que contenen una elevada fracció d'EPS i grans canals d'espais buits entre les microcolònies que s'hi formen, que són els que faciliten el transport de l'aigua a través de l'estructura del biofilm, i per tant també determinen l'espai del biofilm (Romaní, 2010).

La seva associació és irreversible, és a dir, que la unió d'aquests microorganismes no s'elimina amb un lleu rentat. En una matriu de material format principalment per polisacàrids, també s'hi poden trobar materials no cel·lulars com ara vidres minerals, partícules corrosives o restes d'argila o llim (Donlan, 2002).

Els biofilms estan presents en tots els medis aquàtics, incloent corrents, rius, llacs i embassaments, però també zones intermareals i mar obert. També poden formar-se biofilms en aiguamolls, pantans o estructures artificials fetes per l'home. Tot i així, hi haurà certs factors ambientals que seran especialment determinants a l'hora de formar un biofilm característic (Figura 2) (Mora-Gómez *et al.*, 2015).



**Figura 2.** Esquema dels principals factors que afecten el desenvolupament d'un biofilm en ambients tant naturals com artificials. Font: Modificat des de Mora-Gómez *et al.*, 2015

A causa de l'elevada àrea que ocupa un biofilm, els organismes involucrats que tenen un metabolisme autotròfic i heterotròfic fan que aquestes comunitats aquàtiques esdevinguin llocs molt importants per a la captació, transformació i emmagatzematge de matèria orgànica

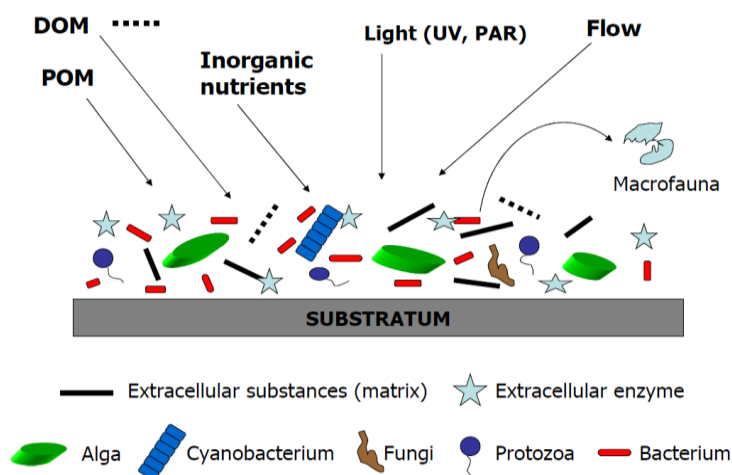


dissolta fluvial, a més de que contribueixen significativament en el cicle del carboni del sistema (Romaní A.M, 2010).

En sistemes aquàtics, els biofilms poden ser molt diversos en funció del substrat en el que es desenvolupen. En ecosistemes naturals, el biofilm es pot desenvolupar sobre substrat inert com sorra, sediments o roques, però també en estructures mortes orgàniques com fusta, fullaraca o POM (Matèria Orgànica Particulada). També pot arribar a formar-se en plantes vives com ara bé macròfits aquàtics i macroalgues. Pot ser que un biofilm no es desenvolupi sobre cap substrat, de tal manera que queden en suspensió. Els biofilms també es poden desenvolupar sobre substrats creats artificialment per l'home, com ara canonades i vaixells. La naturalesa del substrat és la que determina la composició i l'estructura del biofilm, per el que també en determina el seu metabolisme (Mora-Gómez *et al.*, 2015). El substrat, per tant, pot ser el factor més important per al desenvolupament d'un biofilm, ja que les propietats del substrat poden regular els patrons d'acumulació i de distribució cel·lular durant les primeres etapes del seu desenvolupament (Terlizzi i Faimali, 2010).

La figura següent (Figura 3) mostra un biofilm teòric, en el que s'inclouen tots els possibles components de l'estructura microbiana que s'hi desenvolupa, a més dels paràmetres ambientals que afecten l'estructura i funcionament del biofilm (llum, nutrients disponibles, i velocitat del flux de l'aigua). El biofilm facilita que el metabolisme microbià consumeixi els nutrients inorgànics i l'ús de la descomposició de la matèria orgànica (POM i DOM) (Romaní, 2010).

La disponibilitat de matèria orgànica per els microorganismes del biofilm, prové de l'aigua dels voltants i/o aquella que ha estat retinguda en el biofilm per els canals buits intercel·lulars o produïda pels organismes fotosintètics del propi biofilm (Romaní, 2010).



**Figura 3.** Esquema d'un biofilm teòric. S'hi representen tots els possibles components i els principals factors ambientals que afecten l'estructura i el funcionament d'un biofilm. Font: (Romaní, 2010).

Com s'ha esmentat anteriorment, els biofilms es poden desenvolupar en molts substrats diferents, però la diversitat de substrats vindrà condicionada per la gran diversitat d'ambients en la que es pot desenvolupar un biofilm. El fet de que es puguin formar tant en zones d'extrema sequera, tropicals o al Pol sud, implica la gran adaptabilitat d'aquests microorganismes a condicions extremes i severes. Dos dels factors més importants que afecten els biofilms microbians aquàtics són la sequera i la salinitat, paràmetres que permeten que aquesta estructura microbiana tingui organismes molt particulars adaptats a aquestes condicions (Casamayor *et al.*, 2013).

Com que els biofilms resulten ser unes estructures tant variables i es troben en ambients tant diferents, els microorganismes que conformin cada biofilm tindran la capacitat d'adaptar-se al medi o substrat en el que es trobin exposats. En aquest estudi ens centrem en les comunitats del biofilm del sediment que es forma en llacunes salades sotmeses a una gran variabilitat de condicions hidrològiques i per tant els dos factors principals seran la salinitat i la disponibilitat d'aigua.

Es considera que en ambients més salats hi ha menys riquesa d'espècies, però certs estudis en els últims anys han anat revelant el contrari, com per exemple Casamayor *et al.*, (2013), en el que no s'observen diferències en la riquesa dels OTUs al llarg d'un gradient de salinitat ni tampoc una disminució de la riquesa en bandes d'electroforesis en gel (DGGE) amb una salinitat superior al 15%.

S'ha de tenir en compte que encara es desconeixen molts microorganismes d'aquests ambients extrems, com funcionen, com s'adapten i quines són aquelles condicions ambientals que els resulten més favorables i desfavorables. Pel que sembla, s'ha estudiat que en algunes llacunes salades hi ha l'abundància d'uns cloròfits que són substancialment diferents a qualsevol altre tipus d'alga verda, tant d'aigua dolça com salada. (Casamayor *et al.*, 2013).

Els bacteris són uns organismes capaços d'adaptar-se a moltes condicions, degut a que estan arreu del món i en moltes condicions diferents, des dels intestins fins ambients extrems salins o àcids (American Society for Microbiology, 2012). Els fongs, per altra banda, són més sensibles, ja que, tot i que es coneixen estudis de fongs micorrízics que toleren certs nivells de salinitat (Aguilar *et al.*, 2009), són uns organismes que requereixen un cert grau d'humitat i no solen habitar en zones d'extrema salinitat. Per últim, les algues poden habitar zones amb presència de salinitat i també tenen mecanismes contra la sequera (Holzinger i Karsten, 2013). Per tant, en un ambient extrem, com per exemple amb elevades salinitats o temperatures, s'espera trobar un major nombre de bacteris i algues, que no pas de fongs.

Altres paràmetres com ara el pH, els nivells de nutrients, la força iònica i la temperatura, juguen un paper molt important en l'adheriment microbià al substrat. Molts estudis, com ara Donlan *et al.*, (2004) o Fera *et al.*, (1989), demostren l'efecte dels canvis estacionals sobre l'adheriment bacterià i sobre la formació del biofilm microbià, que segurament estaran provocats per la variació en la temperatura de l'aigua. La gran evapotranspiració que hi ha en aquestes zones implica que el nivell de les llacunes sigui variable, provocant així un gran dinamisme en les condicions ambientals. La disponibilitat d'aigua, per tant, és un paràmetre que limitarà molt la formació d'un biofilm.

Les llacunes salades representen un 0,1% de la superfície terrestre. Els llacs salins ocupen aproximadament el 5% de terres àrides o semi àrides distribuïts arreu del món. Proporcionen un percentatge d'aigua (0,008%) molt similar al que aportem les aigües continentals d'aigua dolça (0,009%) segons el conveni Ramsar, 2010.

Els llacs salins continentals més coneguts estan localitzats a Austràlia, al sud-est d'Estats Units, a l'oest de Xina i a l'Àfrica. A Europa, les llacunes continentals salades són escasses i estan greument amenaçades (Casamayor *et al.*, 2013). Espanya és el país europeu que més llacunes salades té, on les llacunes que s'hi troben estan en depressions terciàries relacionades amb materials geològics salats. Tot i així, també hi ha llacunes formades en àrees endorreiques que han quedat aïllades per rius, o bé formades tectònicament (Comín i Alonso, 1998).

La zona del desert dels Monegros, al Nord Est d'Espanya, conté un dels majors conjunts de llacunes salades d'Europa i constitueix un paisatge únic de gran valor científic i ecològic. Aquest conjunt d'aiguamolls salins es coneixen com a Salades, i s'han documentat en estudis geològics, hidrològics, mineralògics i edàfics.

Les depressions salines d'aquest entorn, són molt dinàmiques i proporcionen un nínxol ecològic per a les plantes i animals que hi viuen. Moltes estudis han revelat un gran nombre d'endemismes principalment d'invertebrats, plantes vasculares, líquens i briòfits (Braun-Blanquet i Bolòs, 1958; Casas *et al.*, 1992; Conesa *et al.*, 2011), a més de la presència de microorganismes bentònics fotosintètics actius en zones riques en sulfat de magnesi (Guerrero i de Witt, 1992). La presència de microorganismes extremòfils com ara bacteris o arqueus i la seva identitat genètica, continuen sent un gran misteri per ecòlegs i investigadors, que cada dia intenten fer un pas més en aquesta cerca. Tot i així, en els últims 15 anys, s'ha començat a conèixer la diversitat genètica de les comunitats microbianes que viuen ambients salins, tant de l'Antàrtida com de deserts (Bowman *et al.*, 2000; Demergasso *et al.*, 2004), fet que permet

anar descobrint dia a dia més característiques, funcions i adaptacions d'aquests microorganismes tant particulars.

En aquest treball de recerca, es vol estudiar l'estructura del biofilm que es forma al sediment superficial bentònic de quatre llacunes que formen part de 'Les Salades' dels Monegros, per tal de determinar la biomassa microbiana dels tres grups principals d'organismes que el componen, bacteris, algues i fongs, així com també l'EPS . S'han analitzat també els paràmetres fisicoquímics de l'aigua. A cada llacuna s'ha tingut en compte el gradient de contingut d'aigua i s'han recollit mostres submergides a la llacuna i també mostres humides i mostres seques.

## OBJECTIVES

The main objectives of this study are:

- To determine the content of algae, fungi, bacteria and EPS content in the benthic sediment biofilm of four saline lagoons in the Monegros area, submitted to extreme drought conditions.
  - *Hypothesis:* It is expected to have low biomass, because the salinity conditions of the water would affect the microorganisms that live there. Thought, is expected to have a greater amount of bacteria and algae than fungi.
  
- To observe how the salinity and drought gradient affect the microbial communities by comparing different levels of humidity in each lagoon.
  - *Hypothesis:* It is expected that the most extreme conditions of drought and salinity would determine a lower microbial biomass of benthic biofilms in the salty lagoons.

# MATERIALS I MÈTODES

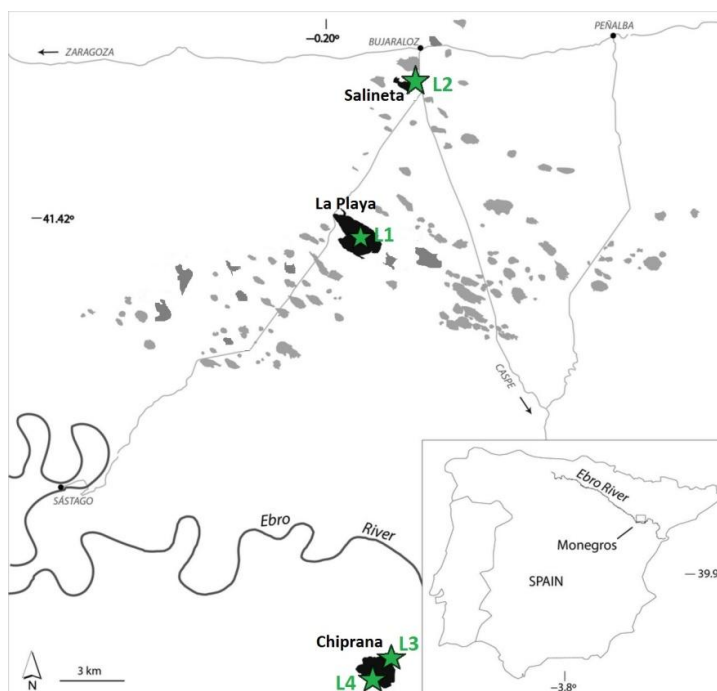
## Zona d'estudi

Les llacunes analitzades es localitzen al sud del desert dels Monegros, prop de Saragossa, Aragó (NE d'Espanya). Es tracta d'un territori amb unes condicions de sequera extremes, a més de l'elevada salinitat que presenten les llacunes, ja que aquestes estan vinculades a surgències d'aigües subterrànies salades. El conjunt d'aquests petits llacs formen un espai únic a Europa, degut a les seves particularitats físiques, químiques i biològiques que s'hi desenvolupen (Conesa *et al.*; 2011). La temperatura mitjana anual de la zona és d'uns 14,9 °C i els règims de pluges mostren una alta variabilitat interanual i estacional (Castañeda *et al.*, 2013). El període més calorós es correspon amb el període més sec, de juny a setembre, i la temporada en la que acostuma a haver-hi precipitacions és d'octubre a maig. Per tant, els canvis hidrològics de les llacunes vindran condicionats, per la relació entre l'elevada evaporació i l'escassetat de precipitacions (Casamayor *et al.*, 2013). Aquest fet origina variacions molt importants en el nivell de l'aigua de les llacunes, i s'accentua en aquelles que tenen poca profunditat, per el que el mostreig d'aquest estudi estarà comprès per diferents graus d'humitat en cada punt.

## Mostreig experimental

El mostreig es va dur a terme l'abril de 2015, i es va focalitzar en quatre llacunes dels Monegros, La Playa (L1), Salineta (L2) i dues llacunes a la zona de Chiprana, al sud del riu Ebre (L3 i L4, també anomenades Chiprana 1 i Chiprana 2) (Figura 4). Les llacunes es van escollir per ser de dimensions grans i per tenir aigua

en el moment del mostreig. La primera llacuna, La Playa, és la que té una major extensió, amb una superfície d'unes 200 Ha, i per ordre d'extensió la segueixen la llacuna Chiprana 2, la



**Figura 4.** Localització geogràfica del Desert dels Monegros, en el que també s'hi troba la Conca Central de l'Ebre. El sistema inclou 149 depressions salines dipositades sobre una roca mare rica en guix. Les llacunes estudiades, La Playa, Salineta i Chiprana 1 i 2, estan marcades. Font: Casamayor *et al.*, 2013

Salineta i la Chiprana 1. La llacuna Chiprana 2 té unes característiques diferents a la resta, com per exemple el seu elevat contingut en  $SO_4$  i la seva major profunditat ( $> 1m$ ) (Casamayor *et al.*, 2013). A la mateixa zona hi ha petites llacunes més someres entre les quals es va escollir la Chiprana 1 (L3), una petita llacuna que mostrava un clar gradient d'humitat i tenia una crosta fina de sal.

En les quatre llacunes es varen recollir mostres de sediment amb diferents gradients d'humitat, per tal de poder establir possibles diferències entre les llacunes i també amb el percentatge d'aigua de les mostres (Taula 1). Es van agafar tres rèpliques de cada punt mostrejat, i aquestes es dipositaren en recipients de plàstic i es guardaren en fresc (4°C) fins arribar al laboratori, on es guardaren per una part les mostres de sediment i aigua al congelador, i per una altra les mostres per al recompte de bacteris que es dipositaren en formol al 4% i es guardaren a 4°C fins al seu anàlisi.

In-situ es varen mesurar paràmetres físico-químics de l'aigua com la conductivitat, concentració d' $O_2$ , la temperatura i el pH.

De totes les anàlisis que es descriuen a continuació, les mesures físico-químiques de l'aigua, l'AFDW, el contingut d'aigua i de clorofil·la de les mostres de sediment van ser realitzades prèviament a l'inici del meu TFG. En aquest treball es fa un recull d'aquestes dades i s'analitzen estadísticament, juntament amb totes les dades analitzades en el meu TFG com són, l'anàlisi d'EPS, la biomassa bacteriana i la biomassa de fongs.

## Paràmetres físico-químics

Els paràmetres físico-químics analitzats són l'oxigen, el pH, la conductivitat, la temperatura i els nutrients com l'amoni, els nitrats i els fosfats. En la Taula 2 es resumeixen els paràmetres i la metodologia emprats.

Paràmetre		Metodologia	
Oxigen	Determinar la concentració d'oxigen i el seu percentatge de saturació.	Oxímetre	
pH	Determinar el pH de les llacunes	pH-metre	
Conductivitat	Determinar la salinitat de la riera	Conductímetre	
Temperatura	Determinar la temperatura de la riera	Oxímetre	
Amoni	Absorbància	690 nm	Espectrofotòmetre
Nitrats	Separació de cations i anions per determinar la presència de $NO_3$		Cromatògraf iònic
Fosfats	Absorbància	890 nm	Espectrofotòmetre

**Taula 2.** Taula en la que es resumeixen els paràmetres emprats i la seva metodologia.

Llacuna	Tipus de mostres recollides segons el grau d'humitat
1	Aigua
	Humit
	Sec
2	Aigua
	Humit
	Sec
	Sec salat
3	Aigua
	Humit
	Sec
4	Aigua
	Humit

**Taula 1.** Classificació de les llacunes d'estudi. Es classifiquen en gradients d'humitat per tal d'analitzar l'efecte de la sequera sobre aquesta zona. Cada un d'aquests gradients tindrà tres rèpliques (A,B,C)

## **Anàlisi de nutrients**

### **Amoni**

Per a l'anàlisi d'amoni ( $\text{NH}_4^+$ ) s'utilitza el mètode del salicilat de Reardon *et al.*, (1996). Aquesta tècnica colorimètrica consisteix en afegir a la mostra dos reactius (reactiu 1 i reactiu 2) que reaccionaran amb l'amoni dissolt en aigua, i proporcionarà un color característic que tindrà diverses tonalitats en funció de la concentració d'amoni present. És imprescindible realitzar una recta patró i un blanc, per tal d'establir un gradient de concentracions de referència, i aquests s'han de processar igual que les mostres.

El reactiu 1 estarà compost per salicilat sòdic, citrat trisòdic deshidratat i nitroprussiat de sodi deshidratat en 100 mL d'aigua milliQ. El reactiu 2 estarà compost per hidròxid de sodi i sal de sodi de l'àcid dicloroisociamina, també en 100 mL d'aigua milliQ (Butturini *et al.*, 2009).

### **Nitrats**

Per a l'anàlisi de nitrats, s'utilitza la tècnica del Cromatògraf iònic.

Les mostres, prèviament filtrades i congelades per a la seva preservació, es dipositen en vials de vidre i es processen en el cromatògraf iònic. D'aquesta manera s'obtenen les concentracions de  $\text{NO}_3^-$  de cada mostra en mg/L.

### **Fosfats: Fòsfor reactiu soluble (PRS)**

Per a l'anàlisi de fosfats, s'ha seguit el protocol del molibdat de Murphy *et al.*, (1962). Es tracta d'una tècnica colorimètrica que consisteix en fer reaccionar el molibdat amb el fòsfor, obtenint una coloració blava. Per tal de que reaccioni s'hi afegeixen dos reactius, el reactiu 1; compost per tartrat de potassi i antimoni, àcid sulfúric i molibdat d'amoni tetrahidratat en 1 L d'aigua milliQ, i el reactiu 2; àcid ascòrbic en 0,5 L d'aigua milliQ (preservat en foscor i fresc). La patró es prepara a partir de fosfat i es processen en les mateixes condicions que les mostres.

## **Estructura del biofilm**

El concepte AFDW fa referència al pes sec lliure de cendres que s'utilitza com a un índex que ens indicarà el percentatge de matèria orgànica quantificat en la mostra o substrat amb el que es treballi. Aquest paràmetre permet quantificar la matèria orgànica present en la mostra, ja provingui d'algues, bacteris o fongs (Water on the web, 2003)

Per tal de realitzar aquest protocol, es recomana seguir les pautes segons Stirin, 1981. Es procedeix a agafar la mostra fresca de sediment, de la qual se'n mesurarà el pes fresc immediatament just després d'arribar del camp de realitzar el mostreig. A continuació les mostres es dipositaran en una estufa a 70 °C durant mínim unes 48 hores, per tal de que es perdi tota l'aigua. Quan s'arriba a un pes constant, aquest es determina com a pes sec, i es torna a dipositar la mostra a la mufla, però aquest cop a 450 °C durant quatre hores, per tal de que es cremi tota la matèria orgànica.

Finalment es pesa la mostra i s'obté el pes de cendres. Un cop s'obtenen aquestes dades es procedeix a calcular el contingut d'AFDW, que es realitzarà restant el pes sec menys el pes de les cendres. Pel que fa el contingut d'aigua, es tracta simplement de restar el pes fresc i el pes sec (Steinman i Lamberti, 1996).

## Paràmetres biològics

### *Contingut de polisacàrids en substàncies polimèriques extracel·lulars*

L'anàlisi de polisacàrids a l'EPS ('*Extracellular Polymeric Substances*') consisteix en determinar la quantitat de polisacàrids en les substàncies polimèriques extracel·lulars que hi ha a les mostres.

Les substàncies polimèriques extracel·lulars són polímers d'origen biològic produïts sobretot per bacteris, fongs i algues que formen una matriu cel·lular que estructura el biofilm bacterià (Romaní, 2008; Wingender *et al.*, 2012). Aquesta anàlisi determinarà la quantitat d'EPS dels biofilms de les llacunes, de tal manera que es podrà fer una aproximació de l'estructura d'aquestes comunitats. El contingut d'EPS és també un possible indicador de protecció contra les condicions de sequera i salinitat extremes i per tant d'espera que hi hagi un contingut elevat en les mostres d'estudi.

Per a l'extracció d'EPS s'utilitzarà resina d'intercanvi catiònic, ja que permet separar amb precisió fragments d'aquestes substàncies extracel·lulars. Aquesta extracció sembla ser especialment adequada per l'extracció de substàncies húmiques i proteiques del biofilm i també de carbohidrats. Les condicions d'extracció han d'estar ben definides, ja que la seva eficàcia depèn de l'intensitat d'agitació, de la quantitat de resina i del temps d'extracció (Jahn *et al.*, 1995). Abans d'iniciar el procés cal tenir preparats certs reactius com ara HCl 4M, HCl 5M i NaOH 1M en aigua milliQ, àcid sulfúric concentrat al 95% i fenol al 80%. També s'haurà



de tenir la resina d'intercanvi catiònic ben condicionada, després d'haver seguit un protocol en el que s'ha tractat la resina amb base i àcid per tal de que adquireixi les propietats adequades per a l'extracció.

Per tal de dur a terme l'anàlisi es procedirà a agafar 1mL de sediment de cada una de les mostres prèviament congelades i es dipositaran en un eppendorf de 2mL, en el que s'hi afegiran 1mL d'aigua milliQ i 0,3 g de resina catiònica prèviament neutralitzada. Es barreja manualment per tal que la resina entri en contacte amb la mostra. S'incuba durant una hora en gel i amb agitació constant a 250 rpm.

Un cop finalitzada l'agitació es centrifuguen els eppendorfs a 11000 rpm durant 15 minuts a 4°C. Seguidament es pipetegen 250 µL del sobrenedant i es barregen amb 250 µL d'aigua milliQ dins tubs digestors de vidre d'uns 15 mL.

A continuació es procedeix a l'assaig Phenol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Dubois *et al.*, 1956) en el que s'haurà d'afegir 12,5 µL de la solució fenol als 500 µL dels tubs digestors i barrejar molt cuidadosament. A continuació s'afegeixen 1,25 mL d'àcid sulfúric concentrat. Aquest pas s'ha de procurar fer amb pipeta de vidre o bé amb una pipeta que tingui un filtre que aguantí la corrosivitat de l'àcid. Aquest s'ha de dipositar directament al centre amb un sol moviment. Després es tapen els tubs amb els taps i es deixa reposar durant 10 minuts (per què es refredin). Tot seguit s'han de dipositar dins de l'escalfador amb aigua a 30 °C durant 20 minuts, on es desenvoluparà un color groc-marronós característic en funció de la quantitat d'EPS que hi hagi.

A partir d'aquí es pot mesurar l'absorbància a 485nm amb una cubeta de quars. Per tal de poder realitzar una recta de referència, paral·lelament al protocol, també s'haurà preparat una patró mitjançant dues solucions stock de glucosa. Els resultats del contingut de polisacàrids en l'EPS es donen en µg de glucosa-equivalents/cm<sup>3</sup>.

### **Densitat de bacteris**

Per a calcular la densitat de bacteris presents a cada mostra (nº bacteris/cm<sup>3</sup>) s'utilitza el mètode de tinció líquida amb DAPI (4,6-diamidino-2 fenilindol), que és un colorant cromosòmic i nuclear que emet fluorescència de color blau, després d'unir-se als parells d'AT de l'ADN. Les mostres es filtren amb filtres negres de policarbonat de 0,2 µm i s'observen en el microscopi d'epifluorescència (Molecular Probes, 2006).

Per tal de poder fer aquest recompte bacterià, primer de tot s'ha de realitzar una extracció dels bacteris de la mostra de sediment i dissoldre'l en una solució de pirofosfat, evitant així, que hi hagi una aglomeració de cèl·lules i de residus cel·lulars. Les mostres s'emmagatzemaran a la nevera en aquest estat fins el moment de ser utilitzades.

En el moment de l'extracció de les mostres, aquestes es soniquen tres vegades en cicles d'un minut per tal de separar correctament les cèl·lules bacterianes i es deixen reposar uns cinc minuts per tal que sedimentin les partícules més pesants que poden interferir en l'observació i el recompte futur.

Tot seguit es realitza una dilució 1:50 amb el sobrenedant de les mostres sonicades amb una dissolució pirofosfat (40µl mostra + 1860 µl pirofosfat), i es deixa reposar durant 30 minuts en agitació. Després, s'afegeixen 100µl de la solució de DAPI prèviament descongelada i es torna a deixar reposar amb absoluta foscor durant 30 minuts més amb agitació.

Un cop acabat aquest procés, es procedeix a filtrar cada una de les mostres en filtres de policarbonat negre de 0,2 µm, i a continuació es prepara la làmina amb la que es treballarà en el microscopi. Per tal de preparar-la, s'agafa un portaobjectes, s'hi diposita una gota d'oli d'immersió, i tot seguit es col·loca el filtre negre. A sobre d'aquest, s'hi diposita una altra gota d'oli i finalment es col·loca el cobreobjectes. Aquesta preparació es pot preservar congelada fins el moment de l'observació amb el microscopi d'epifluorescència.

Un cop fet el recompte de bacteris, es procedeix a fer el càlcul de la biomassa bacteriana a partir de la fórmula següent, En la que s'obté el nombre de bacteris per cm<sup>3</sup>.

$$\frac{\text{Nº bacteris}}{\text{cm}^3} = \frac{n \left(\frac{A}{at}\right) d \left(\frac{V_m}{V_f}\right)}{S}$$

n = nombre total de bacteris comptats

A = àrea de filtració

at = àrea ocupada del filtre ( multiplicat per els camps)

d = factor de dilució

V<sub>m</sub> = volum total de la mostra (mL)

V<sub>f</sub> = volum filtrat (mL)

S = volum de la mostra de sediment (cm<sup>3</sup>)

### ***Biomassa fúngica***

La biomassa fúngica de les mostres es pot quantificar gràcies a la concentració d'ergosterol que tinguin, ja que hi ha molt bona correlació entre ambdós paràmetres. L'ergosterol és una molècula que es troba a la membrana cel·lular dels fongs, i la seva funció és estructurar i impermeabilitzar els lípids de membrana, tal i com fa el colesterol a les cèl·lules animals.

La determinació d'aquest compost es divideix en tres etapes, la primera, on es realitza l'extracció de l'ergosterol de la mostra, la segona on es realitza una separació en fase sòlida, en la que l'ergosterol queda retingut en uns cartutxos prèviament activats i condicionats, i finalment, amb l'ajuda d'isopropanol, s'elueix l'ergosterol retingut en els cartutxos. I la tercera etapa en la que, amb aquesta mostra final, es realitza una cromatografia líquida en HPLC.

#### Extracció i separació en fase sòlida

Primer de tot, és necessari liofilitzar les mostres, ja que la mínima presència d'aigua en aquestes podria fer minvar l'efecte del metanol en KOH per a la seva extracció. Serà necessari tenir preparats certs reactius com KOH 0.14M i KOH 0.12 en metanol, KOH 0.4M en metanol, aigua milliQ i HCl 0.75M en aigua mQ. Aquests, es necessitaran per activar, condicionar i fixar la mostra en els cartutxos. Les mostres es poden preservar en un recipient hermètic (dessecador) un cop liofilitzades.

Per començar el protocol, es pesen les mostres i es transfereixen en tubs digestors de 15 ml en els quals s'haurà disposat una lleugera capa de TEFLON a la boca del tub, per tal que quan s'enrosqui el tap no es pugui evaporar el contingut de dins.

Tot seguit, s'afegeixen 10 ml de KOH 0,14 M en metanol a cada una de les mostres i es tapen els tubs digestors. Aquests s'han de dipositar en un escalfador amb aigua a 80°C durant 30 minuts, i després cal que es refredin durant 20 minuts més (en foscor). Si un cop retirats els tubs de l'escalfador, s'observa una disminució del volum de KOH 0.14M afegit anteriorment, s'hi afegirà la quantitat que en manqui.

Durant aquest temps d'espera, es procedirà a realitzar el muntatge de la separació en fase sòlida, és a dir, es muntarà el recipient de vidre amb la seva tapa de marbre i es connectarà a una bomba de buit. Sobre el marbre es col·locarà primer de tot la clau de pas, seguit dels cartutxos, el connector i per últim l'embut de plàstic. Tots els orificis del marbre que no quedin ocupats, s'hauran de tapar, ja que si no, no es faria el buit. Seguidament es poden anar passant reactius per els cartutxos per tal que els filtres els absorbeixin. Primer de tot s'afegeixen 7,5 mL de metanol pur per tal d'activar-los, i a mesura que el filtre el vagi absorbint i quedi impregnat (sense deixar que s'assequin), es van tancant les claus de pas. Un cop hagi passat tot el metanol i les claus estiguin tancades, es procedeix a condicionar-los, afegint 7,5 mL d'una solució anomenada *conditioning* formada per 900 mL de KOH i 150 mL d'HCL 0.75 M, i es segueix el mateix protocol fins que totes les claus quedin tancades.

Un cop les mostres s'han refredat, es filtren (perquè són mostres molt brutes, amb sediment), tot seguint un muntatge amb la bomba de buit. Durant el filtratge, s'han de netejar bé els tubs digestors, de tal manera que s'hi afegeix dues vegades 5 mL de metanol, per tal d'assolir un volum aproximat de 30 mL. Un cop fet el filtratge, les mostres es dipositen en tubs de major volum (40mL) i s'hi afegeixen 5mL HCl 0.75 M.

A continuació, amb els cartutxos activats i condicionats i les mostres filtrades, es procedeix a fer passar les mostres per els cartutxos, i un cop aquestes estiguin absorbides, s'hi afegeixen 2,5 mL de KOH 0,4M en metanol per a netejar. Els cartutxos s'han de deixar amb la bomba de buit engegada i amb la clau de pas oberta durant com a mínim una hora per tal de que s'assequin bé. Si hi ha ergosterol en alguna de les mostres aquest es quedarà retingut en els filtres degut a la seva càrrega.

Transcorregut el temps d'espera es tancaran les claus de pas i es tancarà la bomba. Es procedirà a pesar i numerar els vials corresponents a les mostres, i es col·locaran sota cada pas que correspongui a un cartutx. S'afegiran 1,6 mL d'isopropanol per tal de que arrossegui les mostres fixades als cartutxos i es reculli dins els vials. Seguidament es tornaran a pesar els vials, però aquest cop amb el les mostres dins, per tal d'establir una equació per saber la relació volum-pes i determinar la quantitat d'isopropanol que s'ha perdut després de passar per els cartutxos.

Durant aquest protocol, paral·lelament s'haurà de fer una patró i un blanc, per tal d'establir un gradient i per observar la capacitat de retenció de l'ergosterol.

#### Lectura en HPLC

Aquest procés és molt senzill un cop la màquina està preparada, o ja porta bastants dies en funcionament, però si no, s'ha de seguir un protocol detallat per tal de que es puguin prendre les mesures correctament. El primer pas és preparar el metanol amb el que es treballarà, sonicant-lo com a mínim 20 minuts per tal de desgasificar-lo i així no entri cap bombolla d'aire a la columna. Tot seguit s'engega la bomba binària, el detector d'absorbància i l'injector automàtic, s'introdueixen les dades en el programa anomenat Empower i es fan controls de pressió abans d'iniciar l'anàlisi. Sempre s'ha de vigilar amb el volum de metanol amb el que es treballarà ja que és un procés molt llarg i se'n necessita molta quantitat.

Un cop analitzades les dades, s'observaran els pics del gràfic que mostra el programa i es valorarà la presència d'ergosterol a partir de l'àrea del pic i les àrees de les mostres patró.

### **Biomassa algal**

Per tal de poder determinar la biomassa algal, s'extreu clorofil·la continguda en el sediment i se'n mesura la seva concentració mitjançant la mesura de la seva absorbància. S'ha seguit un protocol segons Jeffrey *et al*; 1975 .

El procediment consisteix en submergir les mostres en 10 mL d'acetona al 90% en vials de vidre, i introduir-les en un bany d'ultrasons durant 4 minuts per tal de realitzar l'extracció activa. Cal filtrar l'extracte per tal de reduir la turbolesa de la mostra i com que la clorofil·la és molt sensible a la llum i a la temperatura, s'ha treballat en una cambra amb llum verda i a una temperatura ambient (es treballa en un laboratori condicionat).

Per acabar l'anàlisi, es procedeix a llegir l'absorbància de les mostres a 430, 665 i 750 nm. En aquesta última els valors han de ser molt propers a 0, ja que en aquesta longitud d'ona, la clorofil·la no emet color. La lectura a 665 nm indica la quantitat de clorofil·la que conté l'extracte de la mostra i a 430nm descriu la presència de pigments carotenoides o productes de degradació.

Per tal de poder calcular el valor de clorofil·la final de cada mostra s'utilitzarà la fórmula següent:

$$\text{Clorofil·la } (\mu\text{g}/\text{cm}^2) = 11,4 \cdot (\text{Abs } 665 - \text{Abs } 750) \cdot \frac{V}{B}$$

V = Volum de l'extracte en mL  
B = Volum en cm<sup>3</sup> sediment

### **Anàlisis estadístiques**

Un cop analitzades les mostres, es procedirà a fer-ne les anàlisis estadístiques amb el programa Rcmdr. Aquestes anàlisis seran ANOVAs unifactorials, i en alguns paràmetres també bifactorials, en les que es determinarà si els paràmetres analitzats (contingut de matèria orgànica -AFDW-, EPS, bacteris, fongs, clorofil·la, fosfats i amonis i nitrats) varien significativament en funció de la llacuna i el grau d'humitat.

En el cas dels resultats dels bacteris (bacteris/cm<sup>3</sup>), aquests s'han estandarditzat fent-ne el seu logaritme en base 10, per tal de poder introduir-les en l'Rcmdr. Això es deu a que no es compleix ni el test de Levene ni el de Shapiro-Wilk amb les dades no estandarditzades.

## RESULTATS

### Paràmetres fisico-químics

Els resultats dels paràmetres fisico-químics de les quatre llacunes es resumeixen en la Taula 3.

Llacuna	Paràmetres				
	Oxigen (mg/L)	pH	Conductivitat (mS/cm)	Temperatura (°C)	Hora del mostreig
1	9,37	8	> 200	23,8	12 h
2	7,29	8,21	149,7	26,7	14 h
3	7,54	8,36	104,2	27,4	16 h
4	9,19	8,58	75,1	22,8	17 h

Taula 3. Taula resum dels resultats obtinguts dels paràmetres fisico-químics mesurats in-situ

Les mesures in situ mostren que la llacuna amb una major salinitat és la L1, La Playa, tot seguit de L2 i L3. Pel que fa a la temperatura, la que presenta un valor major és la L3, tot seguit de la L2. El pH és molt semblant en les quatre llacunes, i la concentració d'oxigen és major en la L1 i en la L4.

Mentre que els valors d'oxigen, de temperatura i de pH són similars entre les llacunes, els de conductivitat tenen valors bastant diferents entre ells. Això comportarà que si hi ha diferències entre les llacunes en la concentració de clorofil·la o en la biomassa bacteriana i fúngica, un factor important, serà el grau de salinitat.

### Anàlisi de nutrients

Per a l'anàlisi de nutrients, s'han determinat els valors mitjans de cada llacuna per a estimar-ne la quantitat. En els següents gràfics (Figures 5,6 i 7) s'indiquen els valors obtinguts.

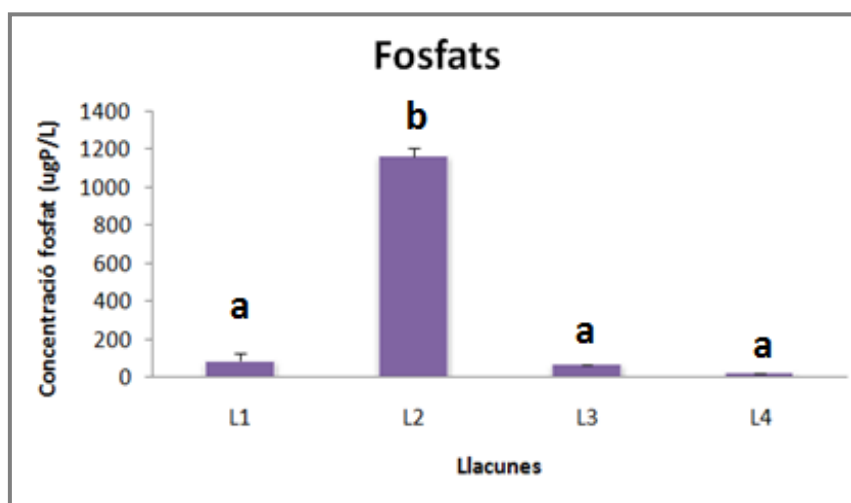
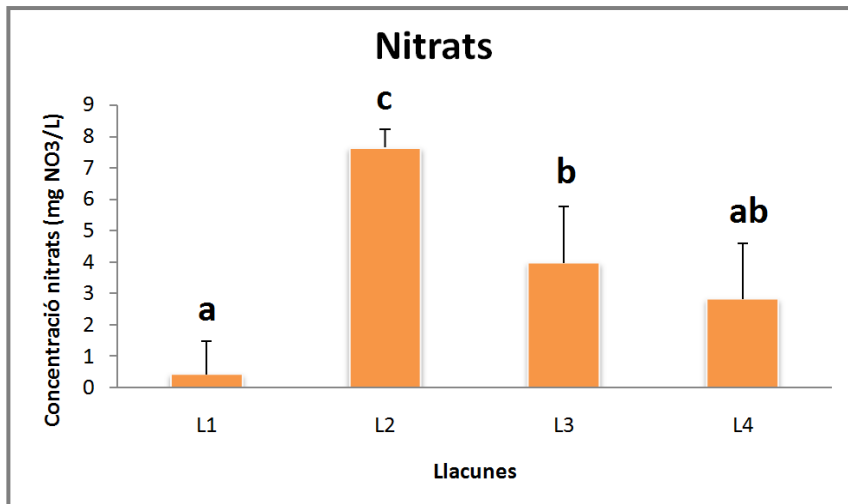
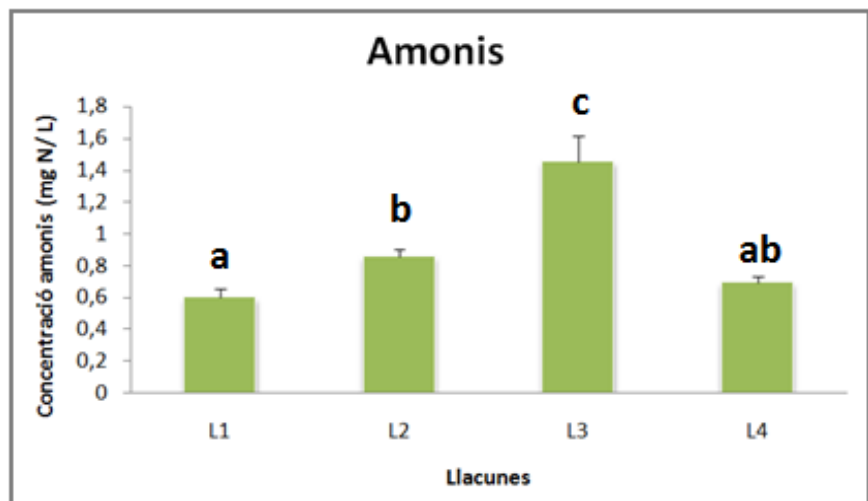


Figura 5. Gràfic en el que es representen els valors mitjans de fosfats per a cada llacuna. S'indica també la seva classificació segons el test de Tukey i la desviació estàndard en barres d'error. n= 3



**Figura 6.** Gràfic en el que es representen els valors mitjans de nitrats per a cada llacuna. S'indica també la seva classificació segons el test de Tukey i la desviació estàndard en barres d'error.. n= 3

**Figura 7.** Gràfic en el que es representen els valors mitjans d'amoni per a cada llacuna. S'indica també la seva classificació segons el test de Tukey i la desviació estàndard en barres d'error.. n= 3



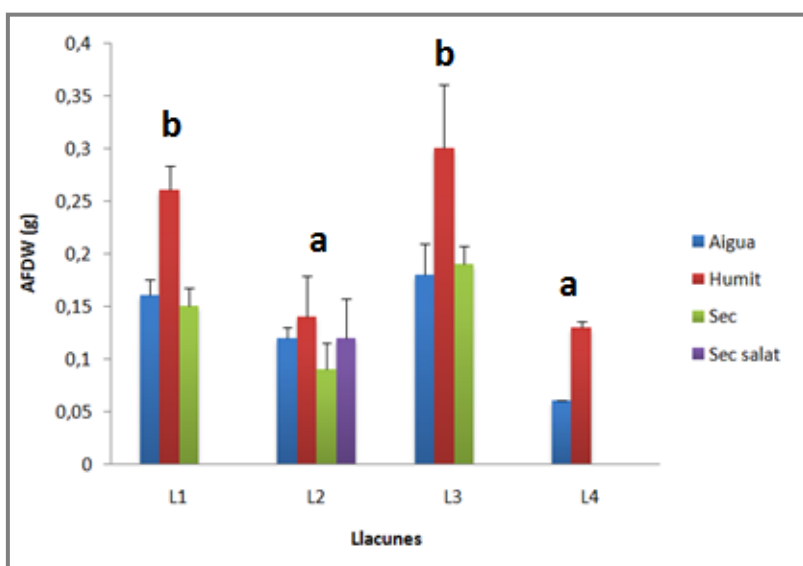
Per a determinar si els valors obtinguts dels nutrients són significativament diferents entre les quatre llacunes estudiades, s'ha realitzat una ANOVA unifactorial per a cada paràmetre (fosfats, nitrats i amonis).

Un cop realitzades les ANOVAs, s'analitzen els resultats obtinguts, i se'n dedueix que la concentració de fosfats, nitrats i amonis és significativament diferent entre llacunes (Taula 4). Com que els valors obtinguts mostren que el factor llacuna té un efecte significatiu, es realitza el test de Tukey per tal de saber quines de les llacunes són diferents a les demés, en el que s'obté, per fosfats ( $F = 1113$ ,  $p = 8.02 \cdot 10^{-11}$ ), que n'hi ha de dos tipus, a i b, i aquest segon només pertany a la L2, que és la llacuna que té uns valors majors de fosfats i amb una gran diferència. Pel que fa els nitrats ( $F = 16.23$ ,  $p = 0,00092$ ) el resultat del test de Tukey ha determinat que cada llacuna és diferent de les demés, però que la L4 és un entremig de la L1 i la L3. En el cas dels amonis ( $F = 51,98$ ,  $p = 1.37 \cdot 10^{-5}$ ) hi ha un patró semblant, ja que les quatre llacunes són diferents i la L4 és un entremig entre la L1 i la L2.

## Estructura del biofilm

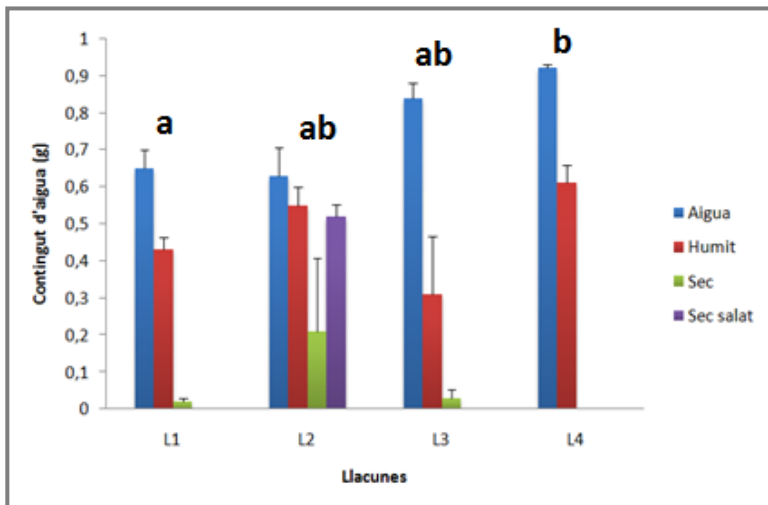
S'ha realitzat el càlcul del contingut d'aigua i del pes sec lliure de cendres (AFDW) de les mostres i s'ha representat gràficament en les Figures 8 i 9. En aquests, es poden observar certs patrons, com ara que les mostres que contenen més contingut d' AFDW és el rang humit. Les ANOVAs mostren que el contingut d'AFDW és significativament diferent entre llacunes i que també es veu afectat per el grau d'humitat ( $F = 39.6506$ ,  $p = 1.858 \cdot 10^{-9}$ ) però no hi ha un efecte de l'interacció dels dos factors indicant que l'efecte del grau d'humitat en el contingut de matèria orgànica és igual entre les quatre llacunes. Si es realitza el test de Tukey per el pes sec lliure de cendres pel factor llacuna, s'obté que hi ha dos grups diferenciats, dividits en L1 i L3 i L2 i L4.

Per altra banda, les mostres que presenten una major quantitat d'aigua, evidentment, són aquelles preses dins de l'aigua, i les mes seques les que en tenen una menor quantitat. Cal destacar que el valor del gradient sec salat de la L2, presenta un valor de quantitat d'aigua molt elevat. Els resultats de l'ANOVA bifactorial (Taula 4) indiquen un efecte significatiu del factor llacuna i també del factor grau d'humitat ( $F = 10.7117$ ,  $p = 0.0001169$ ). La interacció entre els dos factors indica que l'efecte de la variació del grau d'humitat sobre el contingut d'aigua és diferent segons a quina llacuna ens trobem. Si es realitza el test de Tukey per el contingut d'aigua per el factor llacuna, s'obté que hi ha tres grups diferenciats, a,b i ab, essent aquests últims un entremig dels dos anteriors.



**Figura 8.** Gràfic en el que es compara l'AFDW de les quatre llacunes en funció del gradient d'humitat establert. S'indica també la seva classificació segons el test de Tukey i la desviació estàndard en barres d'error.  $n=3$





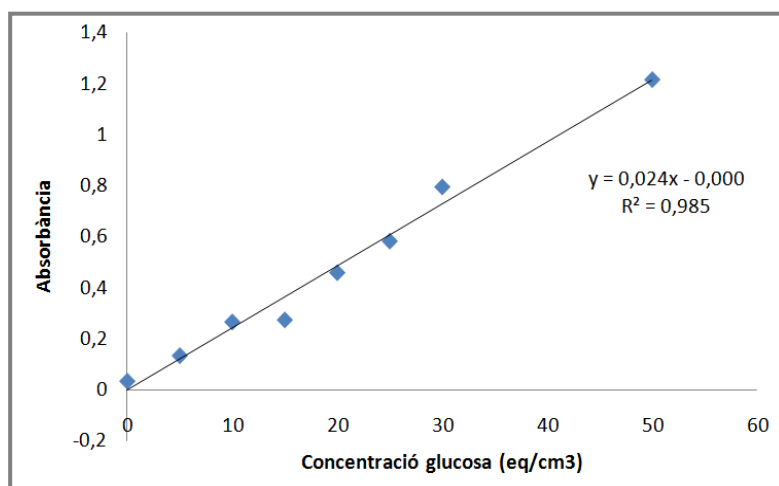
**Figura 9.** Gràfic en el que es s'avalua el contingut d'aigua de les quatre llacunes en funció del gradient d'humitat establert. S'indica també la seva classificació segons el test de Tukey i la desviació estàndard en barres d'error.. n= 3

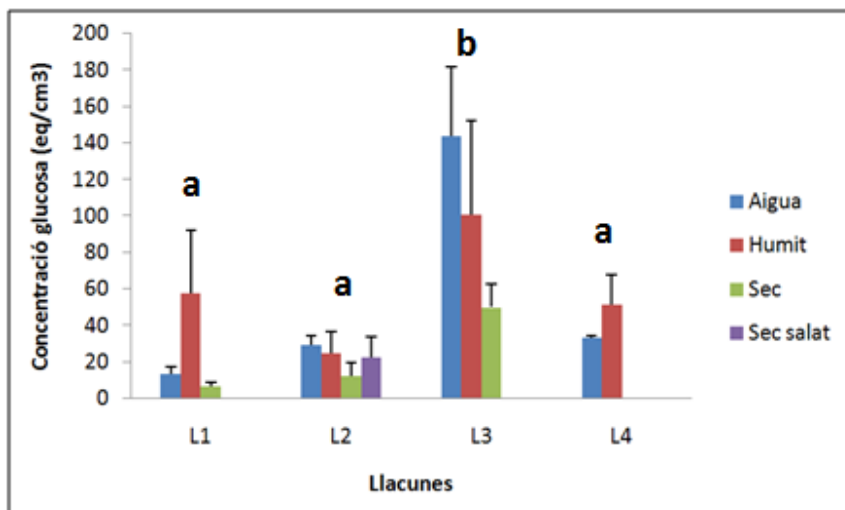
## Paràmetres biològics

### *Contingut de polisacàrids en substàncies polimèriques extracel·lulars*

Un cop processades les mostres en l'espectrofotòmetre, es calcula gràcies a la recta patró (Figura 10), la concentració de glucosa present en cada mostra (representat en la Figura 11). Tal i com s'hi pot observar, la llacuna Chiprana 1 (L3) és la que té una major concentració de glucosa en EPS en els tres gradients d'humitat que té. La L2, per contra, és la que té uns valors menors, i aquests són semblants entre els diferents graus d'humitat, no com succeeix en la L1, que el grau humit té un valor que destaca sobre els demès.

**Figura 10.** Gràfic en el que es representa la recta patró de glucosa.





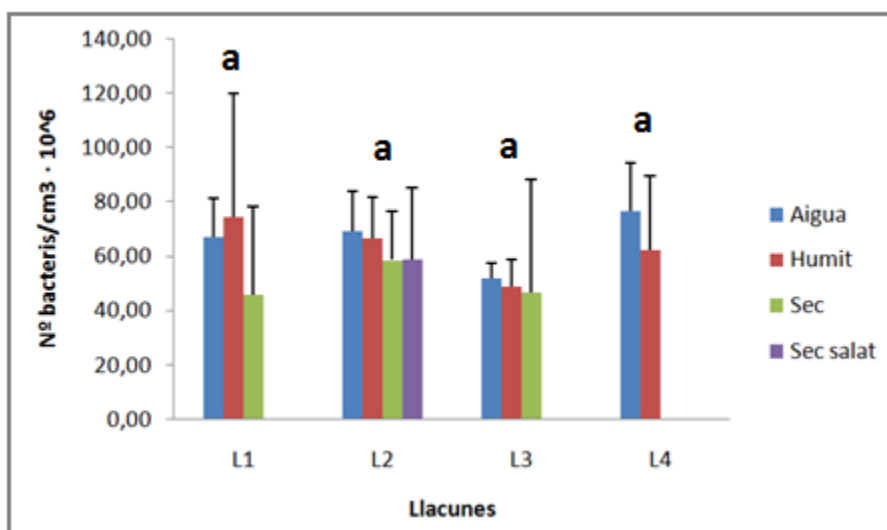
**Figura 11.** Gràfic en el que es compara la concentració de glucosa en EPS (eq/cm<sup>3</sup>) de les quatre llacunes en funció del gradient d'humitat establert. S'indica també la seva classificació segons el test de Tukey i la desviació estàndard en barres d'error. n= 3

Evidentment, el factor llacuna en aquest anàlisi, a l'igual que en l'anterior, ha estat bastant significatiu ( $F= 4.9241$ ,  $p = 0.008337$ ), ja que es tracta d'un factor fortament determinant per a l'EPS. Pel que fa el valor sobre el factor humitat, també ha estat significatiu ( $F= 4.9241$ ,  $p = 0.008337$ ), i l'interacció entre els dos factors també ( $F = 3.9129$ ,  $p = 0.009788$ ).

Això significa que s'acceptarà l' hipòtesi alternativa en els tres casos per què els dos factors analitzats (llacuna i grau d'humitat) tenen un paper molt important en la determinació de la quantitat d'EPS (mitjançant la concentració de glucosa), sobretot el factor llacuna. Un cop realitzat el test de Tukey, es determina que hi ha dos tipologies de llacunes, L1, L2 i L4 per una banda, i L3, amb majors concentracions, per l'altre.

### Densitat de bacteris

Els resultats de densitat de bacteris es mostren a la Figura 12.



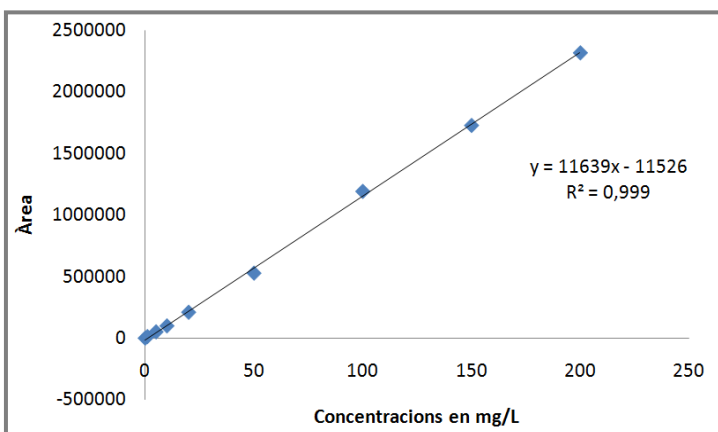
**Figura 12.** Gràfic en el que es compara el nombre de bacteris/cm<sup>3</sup> · 10<sup>6</sup> de les quatre llacunes en funció del gradient d'humitat establert. S'indica també la seva classificació segons el test de Tukey i la desviació estàndard en barres d'error .

Tal i com es pot observar, el nombre de bacteris en les quatre llacunes és molt semblant, tot i que potser el valor més restringit està en la L3.

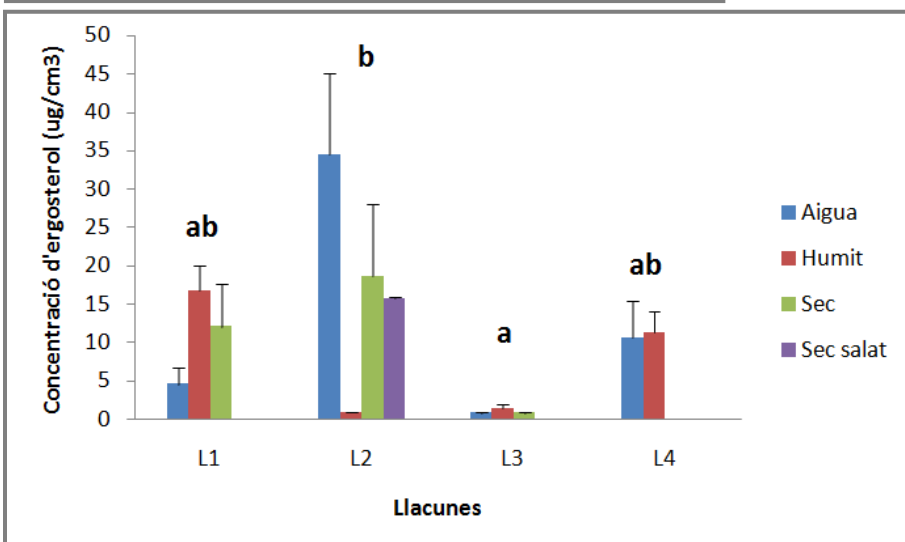
En l'ANOVA bifactorial, els paràmetres avaluats, tant individualment com en la seva interacció, han donat valors no significatius (Grau d'humitat  $F= 1.2539$ ,  $p = 0.3124$ ) (Llacuna  $F=0.8036$ ,  $p = 0.5042$ ) (Interacció  $F= 0.2155$ ,  $p = 0.9525$ ), de tal manera que també s'accepta l'hipòtesi nul·la per què les llacunes mostren resultats molt semblants entre elles i no sembla que cap dels dos factors jugui un paper important en el nº de bacteris/cm<sup>3</sup> que hi ha a les mostres. Per tal de corroborar-ho, es realitza el test de Tukey que indica que les quatre llacunes tenen les mateixes característiques pel que fa al nº de bacteris/cm<sup>3</sup>.

### Biomassa fúngica

Per tal de poder calcular les concentracions d'ergosterol, determinant així la quantitat de fongs presents en les mostres, s'ha realitzat una recta patró (Figura 13) a partir de les àrees mesurades en els cromatogrames obtinguts (programa Empower). Un cop obtingudes les concentracions d'ergosterol, es procedeix a fer un gràfic (Figura 14) en el que es mostren aquests valors i siguin comparables entre les llacunes.



**Figura 13.** Gràfic en el que es representa la recta patró d'ergosterol

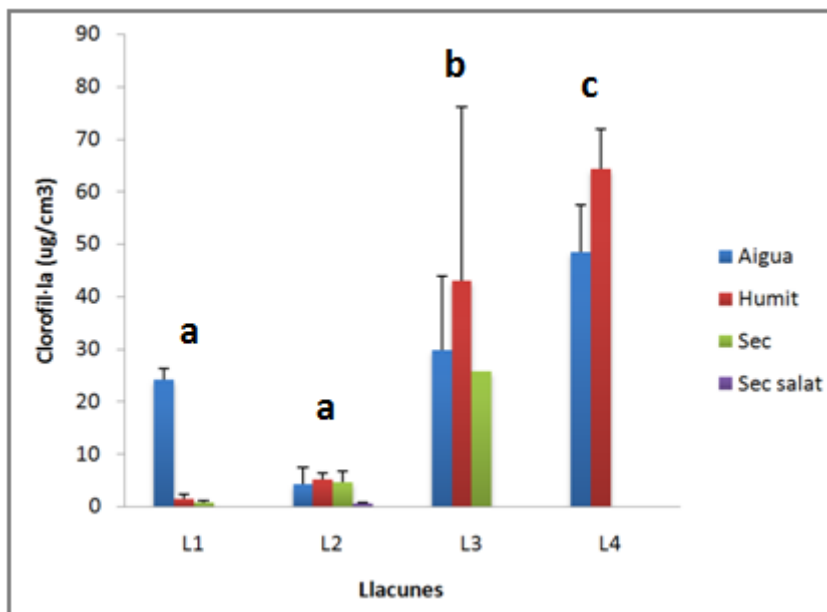


**Figura 14.** Gràfic en el que es compara la concentració d'ergosterol (ug/cm<sup>3</sup>) de les quatre llacunes en funció del gradient d'humitat establert. S'indica també la seva classificació segons el test de Tukey i la desviació estàndard en barres d'error. n=3

L'ANOVA bifactorial per el factor llacuna, ha obtingut un valor significatiu ( $F= 6.3662$ ,  $p= 0.002496$ ), però el grau d'humitat ha resultat no ser-ho ( $F= 0.8015$ ,  $p = 0.505263$ ). Pel que fa la interacció d'ambdós factors envers la concentració d'ergosterol, tal i com el factor llacuna, ha donat significativa ( $F = 5.1400$ ,  $p = 0.002409$ ). Això significa que les llacunes són significativament diferents entre elles, i per tal de saber com estan classificades s'ha realitzat el test de Tukey, en el que s'obté que la L1 i la L4 són un entremig de les llacunes L2 (amb els valors màxims) i L3 (amb els valors mínims). Tot i així, els resultats de les mostres del gradient humit de la L2, podrien ser anòmales degut a algun problema durant l'extracció, ja que a les altres llacunes en les condicions d'humitat, hi ha unes concentracions d'ergosterol significatives.

### *Biomassa algal*

Per a poder determinar la quantitat de clorofil·la present a les nostres mostres, s'ha aplicat la fórmula explicada anteriorment, obtenint valors de  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ . Un cop calculades les concentracions, es procedeix a realitzar un gràfic representatiu (Figura 15), en el que es mostra que les llacunes que més presenten clorofil·la són les de la zona Chiprana (L3 i L4).



**Figura 15.** Gràfic en el que es compara la concentració de clorofil·la ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) de les quatre llacunes en funció del gradient d'humitat establert. S'indica també la seva classificació segons el test de Tukey i la desviació estàndard en barres d'error.  $n= 3$

Es prossegueix a realitzar una ANOVA bifactorial, que resulta ser significativa per el factor llacuna ( $F = 36.2887$ ,  $p = 6.869 \cdot 10^{-9}$ ), però en canvi, del factor del grau d'humitat, no se n'han obtingut valors significatius ( $F = 2.0284$ ,  $p = 0.137924$ ). El resultat de l'interacció entre el grau d'humitat i la llacuna ha resultat ser bastant significativa, amb  $F = 4.0035$  i  $p = 0.009274$ . Això significa que el factor llacuna és rellevant i implica que les característiques de cada llacuna

determinaran la biomassa algal d'aquestes. Si es realitza un test de Tukey per el factor llacuna, s'observa una divisió en tres tipologies de llacunes, essent L1 i L2 del mateix grup.

A continuació s'adjunta una taula resum en la que es descriuen si els paràmetres estudiats han resultat ser significatius o no, per tal de poder establir-ne conclusions.

PARÀMETRES	Variable	Factor: Llacuna	Factor: Gradient d'humitat	Factor: Ll x Gh
Nutrients	Fosfats	< 0.0001	-	-
	Nitrats	< 0.0001	-	-
	Amonis	< 0.0001	-	-
Estructura biofilm	AFDW	< 0.0001	< 0.0001	0,8306
	Contingut d'aigua	< 0.0001	< 0.0001	0,001169
Biològics	EPS	0,008337	< 0.0001	0,009788
	Bacteris	0,5042	0,3124	0,9525
	Ergosterol	0,002496	0,07611	0,002409
	Clorofil-la	< 0.0001	0,137924	0,009274

**Taula 4.** Taula resum dels valors significatius i no significatius dels paràmetres estudiats després de les ANOVAs corresponents. Els valors significatius estan marcats.

## DISCUSSIÓ

Els resultats de les característiques físico-químiques ens indiquen que les llacunes estudiades tenen unes condicions extremes que fan variar les característiques dels microorganismes que hi viuen.

Els paràmetres físico-químics estudiats, mostren unes condicions de salinitat molt més elevades que les del Mar Mediterrani (59.4 mS/cm), sobretot dues llacunes, La Playa (L1) i la Salineta (L2). En aquest estudi es varen recollir mostres de sediment tot seguint un gradient d'humitat per tal de comprovar si aquest es complia a l'hora d'analitzar el contingut d'aigua. Es pot afirmar que es compleix, ja que totes les llacunes segueixen aproximadament un gradient d'humitat, amb excepció del gradient sec salat, només característic en la L2, que té uns nivells d'aigua semblants als del gradient humit. El contingut d'aigua analitzat de la Chiprana 1 (L3), mostra un gradient extremadament marcat, però es pot justificar a causa de que aquesta llacuna era d'una mida menor i mostrava símptomes de sequera més severa que les demès. Paràmetres com la clorofil-la tenen nivells semblants si es comparen amb estudis anteriors, però altres, com els bacteris, els fongs i l'EPS, han presentat concentracions més elevades (Casamayor *et al.*, 2013; Romaní, 2010)

Com que la biomassa microbiana analitzada ha estat superior a la que s'esperava, es descarta la primera hipòtesi en la que s'esperava una biomassa baixa de microorganismes, sobretot de fongs. Tot i que el factor llacuna no sigui significatiu per al nombre de bacteris, els nivells obtinguts de densitat bacteriana han estat elevats, cosa que determina que són capaços de tolerar les condicions extremes de la zona d'estudi. Pel que fa als nivells de biomassa algal, la concentració de clorofil·la és semblant a les concentracions que es troben en biofilms de riu (Romaní, 2010), però disminueix significativament en l'extrema salinitat de les llacunes L1 i L2.

Els nivells d'EPS analitzats mostren una clara diferència entre les llacunes estudiades, en la que la Chiprana 1 (L3), seguint el gradient d'humitat de més aigua a menys, té uns valors molt més elevats que la resta. Els valors obtinguts d'EPS per a les quatre llacunes són generalment superiors comparats amb altres estudis (Mata, 2006). Hi ha un factor a destacar pel que fa a aquest paràmetre, ja que tot i que el nombre de bacteris és elevat i bastant semblant en totes les llacunes, la concentració d'EPS no està compensada de la mateixa manera, cosa que significa que en la L3, els microorganismes que hi habitin estaran segregant més substàncies extracel·lulars que els demès. Això pot justificar-se amb les condicions de la llacuna, que és somera i té un marcat gradient d'humitat, cosa que podria implicar que els microorganismes segreguessin més EPS per tal d'estar més protegits davant les condicions adverses a les que estan exposats. Evidentment, els anàlisis estadístics realitzats per aquest paràmetre han resultat ser tots bastant significatius, cosa que implica que l'EPS és un paràmetre que va molt lligat al gradient de sequera i al tipus de llacuna, i que per tant és molt representatiu. De tots els paràmetres analitzats dels diferents biofilms només l'EPS s'ha vist afectat per el gradient de sequera.

L'anàlisi d'aquestes quatre llacunes ha determinat que tenen diferents característiques que permeten diferenciar-les, determinades per paràmetres físico-químics, nutrients, EPS o clorofil·la. L'elevada salinitat de les llacunes anteriorment esmentada, l'elevat nivell de nutrients, sobretot a la Salineta (elevada concentració de fosfats i nitrats) i a la Chiprana 1 (elevada concentració d'amoni), i l'elevada biomassa microbiana registrada en la majoria de llacunes, permet establir característiques diferencials entre l'estructura de les llacunes i el seu biofilm. Això permet corroborar la segona hipòtesi establerta, que remarca la importància de la salinitat i la sequera en la determinació i diferenciació de la comunitat d'organismes presents en els Monegros.

Tot i així, hi ha organismes com els bacteris, que no han variat tant dràsticament en funció del gradient de sequera ni tampoc semblen afectats per l'elevada salinitat, cosa que significa que

són capaços d'adaptar-se gradualment a les condicions més severes. Segons Casamayor *et al.*, (2013), s'observa que no hi ha un efecte de la salinitat en la diversitat de bacteris, fet que indica que probablement s'adapten a aquestes extremes condicions.

Contràriament al que s'havia esperat, la biomassa fúngica no és tant baixa com s'esperava, sobretot en la L1 i L2, que justament són les llacunes amb una salinitat més extrema. Pel que fa les altres dues llacunes de la zona de Chiprana, hi ha una biomassa de fongs molt més baixa i coincideix amb els biofilms on s'ha trobat més biomassa algal. Un possible raó per el baix contingut de fongs a la L3 serien les condicions extremes de sequera d'aquesta llacuna somera. Aquest fet fa que l'estructura del biofilm sigui diferent, més heterotròfica en les llacunes La Playa i Salineta i més autotròfica a llacunes Chiprana 1 i 2.

Els efectes de la salinitat i la sequera sobre les llacunes Salades dels Monegros tenen una gran importància sobre la determinació de l'estructura del seu biofilm i dels microorganismes que la componen. Alguns d'aquests, mostren aquest efecte desenvolupant mecanismes de protecció segregant substàncies com l'EPS per tal de protegir-se de l'estrès hídric o conductivitats molt elevades, d'altres, s'adapten a les condicions ambientals adverses i se'n fan resistents.

## ÈTICA I SOSTENIBILITAT

Les llacunes salades, com per exemple les d'aquest estudi, tenen una gran importància intrínseca com a espais reduïts i escassos mundialment, per el que s'han de protegir. A més, a nivell biològic i ecològic, aquests ecosistemes aquàtics constitueixen una comunitat heterogènia d'organismes endèmics adaptats a les característiques extremes de salinitat i sequera a la que estan exposats.

L'espècie *Eucypris aragonica* és l'endemisme més conegut de les Salades dels Monegros, i presenta unes condicions iòniques i de temperatura molt específiques que únicament permeten que visqui allà (Blasco, 1991). Quan Braun-Blanquet i Oriol de Bolòs varen estudiar la flora de la depressió de l'Ebre, van afirmar que aquesta zona tant especial i característica d'Aragó, era un centre d'especiació. Estudis realitzats posteriorment, demostren l'elevat contingut de microorganismes com bacteris i arqueus i la seva gran diversitat adaptada a ambients hipersalins també molt diversos, des de deserts fins al Pol sud (Casamayor *et al.*, 2013).

Això implica una comunitat molt complexa estructurada per plantes, algues, invertebrats i microorganismes endèmics que necessita una especial protecció. Decrets com el 204/2010, o Articles del Conveni Ramsar, protegeixen aquests ambients hipersalins tant escassos en el món.

## CONCLUSIONS

- Extreme conditions may not imply a reduced biomass, but those conditions can lead to some microorganisms adapt becoming resistant to adverse conditions as bacteria or fungi do, or developing protection mechanisms such as EPS.

- Extreme drought and salinity conditions have a significant effect on lagoons and its microbial structure. It has been shown that salinity affects organisms such as algae, because levels of chlorophyll demonstrate the absence of these photosynthetic organisms at very high salinities. It has also been shown that the drought gradient allows the formation of differentiated microhabitats and ruled by the lack of water, as observed with the variation levels of EPS, which is higher where the worse conditions are.



## BIBLIOGRAFIA

Fotografia de la portada extreta de Casamayor *et al.*, (2013).

- **Aguilar, S., Pérez, J., Ferrera, R., Grimaldo, O., Cervantes, L., González, D.** (2009). Hongos ectomicorrícicos y la tolerancia a la salinidad en plantas). *Revista chilena de historia natural*, 82(1), 163-168.

- **American Society for Microbiology. Microbeworld.** (2012). *Types of microbes. Bacteria.* Recuperat el 15 de juliol des de : <http://www.microbeworld.org/types-of-microbes/bacteria>

- **Blasco, J.** (1991). *Fauna de Artrópodos de los Monegros, La fauna endémica y su origen.* Fauna Ibérica. MNCN (CSIC). Recuperat el 18 de juliol des de: <http://www.fauna-iberica.mncn.csic.es/faunaib/monegro/mat.php#mat>

- **Braun-Blanquet B, Bolòs O.** (1958). *Les groupements végétaux du bassin moyen de l'Ebre et leur dynamisme.* An Est Esper. Aula Deu. 5:1-126.

- **Bryant RG.** (1996). Validated linear mixture modeling of Landsat TM data for mapping evaporite minerals on a playa surface: methods and applications. *Int. J Remote Sense* 17:315-330.

- **Butturini, A., Sabater, S., Romaní i Cornet, A. M.** (2009). *La química de las aguas: los nutrientes.* Conceptos y técnicas en ecología fluvial, 2009. Editors: Arturo Elosegi i Sergi Sabater, capítol 7, p. 97-116.

- **Casamayor, E. O., Triadó-Margarit, X., Castañeda, C.** (2013). *Microbial biodiversity in salineshallowlakes of theMonegros Desert, Spain.* *FEMS Microbiology Ecology*, 85(3), 503-518.

- **Casas C, Cros RM, Brugués M.** (1992). *Endangeredbryophytes of theIberianPeninsula: Los Monegros.* *BiolConservy* 59:221-222.

- **Castañeda, C., Herrero, J, Conesa, J.A.** (2013). *Distribution, morphology and habitats of saline wetlands: a case study from Monegros, Spain.* *Geologica acta*, vol 11 nº 4.

- **Conesa J.A, Castañeda C, Pedrol J.** (2011). *Las saladas de Monegros y su entorno. Hábitats y paisaje vegetal.* Consejo de Protección de la Naturaleza de Aragón. Zaragoza. 540 pg

- **Costerton, J. W., Geesey, G. G., & Cheng, K. J.** (1978). *How bacteria stick.* *Scientific American*, 238, 86-95.

- **Donlan R.M.** (2002) *Biofilms: Microbial Life on Surfaces*, Emerg Infect Dis.
- **Donlan RM, Pipes WO, Yohe TL.** (1994) *Biofilm formation on cast iron substrata in water distribution systems*. Water Res. 28:1497–503.
- **Dubois, M., K. A. Gilles, J.K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith.** (1956). *Calorimetric method for determination of sugars and related substances*. Anal. Chem. 28: 350- 356.
- **Fera P, Siebel MA, Characklis WG, Prieur D.** (1989). *Seasonal variations in bacterial colonization of stainless steel, aluminum, and polycarbonate surfaces in a seawater flow system*. Biofouling. 1:251–61.
- **Guerrero MC, de Witt R.** (1992). *Microbial mats in the inland saline lakes of Spain*. Limnetica 8:197-204.
- **Holzinger, A., Karsten, U.** (2013). *Dessication stress and tolerance in green algae: consequences for ultrastructure, physiological and molecular mechanisms*. Front Plant Sci. 2013; 4: 327.
- **Jahn, A., & Nielsen, P. H.** (1995). *Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilms using a cation exchange resin*. Water Science and Technology, 32(8), 157-164.
- **Jeffrey, S.W., Humphrey, G.F.** (1975). *New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b and c in higher plants, algae and natural phytoplankton*. Biochemie and Physiologie der Pflanzen, 167, 191-19
- **Jones HC, Roth IL, Saunders WM III** (1969) *Electron microscopic study of a slime layer*. J. Bacteriol. Jul;99(1):316-25.
- **Mata, J.A.** (2006). *Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros Halomonas, Alteromonas, Idiomarina, Palleronia y Salipiger*. Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
- **Molecular Probes, invitrogen detection technologies.** (2006). *DAPI Nucleic Acid Stain*. Recuperat 9 juliol 2016 des de:  
<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp01306.pdf>
- **Mora-Gómez, J., Freixa, A., Perujo, N., & Barral-Fraga, L.** (2015). *Limits of the biofilm concept and types of aquatic biofilms*. Aquatic biofilms: ecology, water quality and wastewater treatment. In Press. ISBN, 978-1.

- **Murphy, JAMES, & Riley, J. P.** (1962). *A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters*. *Analytica chimica acta*, 27, 31-36.
- **Romaní, A. M.** (2010). *Freshwater biofilms*. In: S. Dürr, J.C. Thomason (eds.) *Biofouling*. Wiley-Blackwell. Blackwell Publishing, UK, ISBN: 978-1-4051-6926-4. pp. 137-153
- **Steinman, A.D. and G. A. Lamberti.** (1996). *Biomass and pigments of benthic algae*. pg 297 "Methods in Stream Ecology". Hauer, F.R. and G.A. Lamberti (eds). Academic Press, San Diego, CA.
- **Stirin, J.** (1981). *Manual of methods in aquatic environment research*. Part 8. Ecological assesment of pollution effects. FAO Fish. tech. Pap. 209 (FIRI/T209), 70pg.
- **Terlizzi, A., & Faimali, M.** (2010). Fouling on artificial substrata. *Biofouling*, 170-184. Wiley-Blackwell
- **Water on the web (WOW).** (2003). *Dry weight and ash free dry weight*. Determining Periphyton Biomass. Recuperat el 12 de juliol des de:  
[http://www.waterontheweb.org/curricula/ws/unit\\_01/Mod\\_4\\_5/DW-AFDW5-2003.pdf](http://www.waterontheweb.org/curricula/ws/unit_01/Mod_4_5/DW-AFDW5-2003.pdf)
- **Wetzel, R. G.** (1983). *Limnology* (2nd edn). Saunders College Publishing, Philadelphia, 767, R81pp.
- **Wingender, J., Neu, T. R., Flemming, H. C. (Eds.).** (2012). *Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function*. Springer Science & Business Media.
- **Zobell, C. E., & Anderson, D. Q.** (1936). *Vertical distribution of bacteria in marine sediments*. *AAPG Bulletin*, 20(3), 258-269.