



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Aïllament i identificació de microorganismes amb potencial degradació de tovallolletes humides

Grau en Biotecnologia

Treball de fi de grau

Autora: Maria Lozano Quiles

Tutor acadèmic: Ricardo Cordero Otero

Tutor professional: Manuel Porcar Miralles

Tarragona, Juny 2019



INSTITUTE FOR
INTEGRATIVE
SYSTEMS BIOLOGY



PARC CIENTÍFIC
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

ÍNDIX

1. Dades del centre	4
2. Resum	5
3. Introducció	6
4. Hipòtesi de treball i objectius	10
5. Materials i mètodes	10
5.1. Mostreig.	10
5.2. Medis de cultiu, condicions de creixement i aïllament de soques bacterianes.	12
5.3. Assaig qualitatiu de microorganismes amb activitat cel·lulasa.	13
5.4. Assaig de degradació de tovallolletes per microorganismes amb activitat cel·lulasa.	13
5.5. Purificació de DNA i identificació de l'amplicó 16S rRNA.	14
6. Resultats i discussió	14
6.1. Aïllament de microorganismes amb activitat cel·lulasa	14
6.2. Anàlisi de l'amplicó 16S/18S rRNA.	15
6.3. Avaluació de pèrdua de massa de tovallolletes	23
7. Conclusions	27
8. Agraïments	28
9. Bibliografia	29
10. Autoavaluació	35

1. DADES DEL CENTRE

El següent treball s'ha realitzat a l'institut de biologia integrativa de sistemes (I²SysBio). L'I²SysBio és un institut d'investigació amb el que col·laboren la Universitat de València i el Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC). L'institut es troba a un edifici localitzat al Parc Científic del Campus de Burjassot–Paterna de la Universitat de València. Dintre de l'I²SysBio participen molts grups de recerca. El grup de recerca que m'ha donat la oportunitat de dur a terme el següent treball és el de Biotecnologia i Biologia Sintètica, on treballen en aspectes de microbiologia aplicada i de biologia sintètica i on han realitzat projectes com bioprospeccions d'ambients tant naturals com artificials, buscant bacteris, enzims i gens amb aplicacions industrials potencials.

2. RESUM

Actualment les tovalloletes higièniques humides suposen un greu problema de contaminació i de taponaments al clavegueram que provoca un problema tant mediambiental com econòmic. La bioremediació de residus orgànics contaminants, com les tovalloletes humides fetes amb fibres de cel·lulosa, és una tècnica que permet eliminar substàncies tòxiques o contaminants d'una zona determinada mitjançant l'ús de microorganismes. S'ha demostrat la capacitat d'alguns bacteris i fongs de degradar la cel·lulosa del medi ambient. No obstant, no es coneixen microorganismes capaços de degradar les tovalloletes humides. En aquest treball s'aïllen i identifiquen mitjançant la seqüenciació del gen 16S rRNA o 18S rRNA microorganismes procedents de compost i amb activitat cel·lulasa per a després incubar-los individualment amb tovalloletes i avaluar la capacitat de degradació de cada soca aïllada. Per altra banda, s'ha obtingut una col·lecció de bacteris presents a una mostra de tovalloleta degradada i s'ha avaluat la capacitat de degradació de tovalloletes de cada gènere identificat amb seqüenciació del gen codificant per al 16S rRNA. Finalment, la seqüenciació 16S rRNA ha revelat una capacitat moderada de degradació de tovalloletes en soques aïllades dels gèneres

Streptomyces, *Pseudomonas* i *Sphingobacterium*. Així com un elevat percentatge de bacteris del gènere *Rhizobium* a una mostra de tovalloleta degradada.

Paraules clau: Cel·lulosa, Congo Red, cel·lulasa, degradació, tovalloletes.

3. INTRODUCCIÓ

La bioremediació es defineix com el procés on els residus orgànics són biològicament degradats baix condicions controlades. S'utilitzen generalment microorganismes per degradar substàncies contaminants o perilloses per a la salut humana i/o el medi ambient. Els microorganismes utilitzats per a la bioremediació poden o bé endògens al lloc contaminat o bé poden ser aïllats i transportats des d'altra àrea fins al lloc contaminat.

Estudis han demostrat que la bioremediació pot ser un remei efectiu per al tractament d'aigües residuals ja que els microorganismes tenen una gran capacitat per a adaptar-se a entorns molt diferents. (Palma *et al.*, 2017)

El sistema de tractament d'aigües residuals consta d'estacions de bombament, del clavegueram i de les pròpies plantes. La funció del clavegueram és recollir i lliurar a les plantes de tractament les aigües que provenen dels habitatges, de les indústries i de les empreses. Una vegada aquestes aigües entren a les plantes, reben el tractament més adequat i estan preparades per a ser descarregades a corrents d'aigua o per a ser reutilitzades. El tractament d'aigües residuals es pot dividir en dues etapes, l'etapa primària i l'etapa secundària. L'etapa primària consisteix en l'eliminació dels materials sòlids de les aigües. L'etapa secundària es basa en procediments biològics per a la purificació de les aigües residuals. (USEPA, 1998)

La composició química de les aigües residuals ha sigut estudiada. No és així en el cas dels components sòlids que es troben en les aigües residuals. No obstant, els darrers anys s'ha vist un canvi als sòlids que formen part de les aigües residuals. Concretament, s'ha observat un augment en la quantitat de tovalloletes humides.

Estudis sobre els components sòlids de les aigües residuals confirmen que la fracció més àmplia de sòlids és la de paper. Aquesta fracció inclou els no teixits humits (des de 0 g/m³ a 886 g/m³). Els tèxtils, també es troben en un rang molt ampli que varia des de 0 g/m³ a 155 g/m³. (Mitchell, 2017)

Per cada m³ d'aigües residuals, hi ha una quantitat mitjana total de 319g de sòlids. Aquesta quantitat es compon de 207 g de paper per m³ (no teixits) , 62 g de tèxtils per m³, 40 g de branques i fulls, 7.5 g de restes i finalment la fracció més petita són els plàstics amb una mitjana de 3 g/m³ (figura 1). (Mitchell, 2017)

Els no teixits es defineixen com a estructures laminars, planes i lleugeres, formades generalment a partir de fibres. La seva utilització pot ser única, com els no teixits destinats a la higiene personal i neteja. Per altra banda, els no teixits poden ser utilitzats nombroses vegades, com els destinats a l'agricultura o l'empaquetament.

Les tovalloletes humides són un tipus de no teixit. Aquestes, en comparació amb el paper de vàter convencional, proporcionen una major hidratació per a la pell i els residus són més fàcilment eliminats. Les tovalloletes tenen propietats atractives com la proporció d'una loció suau o lubricació. També és destacable la reducció de l'abració al fer ús d'una tovalloleta humida, en contrast amb l'ús del paper higiènic sec. A tots aquests avantatges s'ha de sumar el concepte de les tovalloletes d'un sol ús. Aquestes presenten més comoditat a l'hora de fer ús degut a la seva eficiència, higiene i facilitat d'utilitzar. Això explica l'increment de les vendes de tovalloletes d'un sol ús des dels 796 milions de dòlars fins als 1,4 bilions de dòlars entre 2010 i 2015. A més, es preveu una pujada en el nombre de vendes de tovalloletes d'un sol ús fins a 2,7 bilions de dòlars per a l'any 2020. (Atasağun and Bhat, 2018)

La situació de la contaminació per l'elevat nombre de tovalloletes a les aigües residuals es veu notablement agreujada per la introducció de les tovalloletes d'un sol ús al mercat. Actualment, les tovalloletes humides són fabricades amb tres capes de pasta humidificada unides i suportades per xarxes de fibra. La fibra que forma part de les tovalloletes pot ser tant sintètica com natural (de cel·lulosa).

Els mateixos fabricants d'aquests productes asseguren que aquestes tovalloletes d'un sol ús poden ser eliminades pel vàter i per tant, per les aigües residuals. Ho indiquen

amb l'ús d'etiquetes “tovalloletes biodegradables” als envasos. No obstant, la indústria de tractament d'aigües residuals ha mostrat evidències de que les tovalloletes romanen intactes i causen taponaments, danys i desperfectes a les línies de clavegueram i als equips de les plantes de tractament. (Pantoja Munoz *et al.*, 2018) Aquest fet, per una banda, suposa una reducció de l'estabilitat i per tant una interrupció del sistema de tractament d'aigües residuals. Per altra banda, els taponaments i bloquejos que les tovalloletes provoquen suposa un factor enorme de despesa creixent per a la indústria de tractament de les aigües residuals. (Mitchell, 2017)

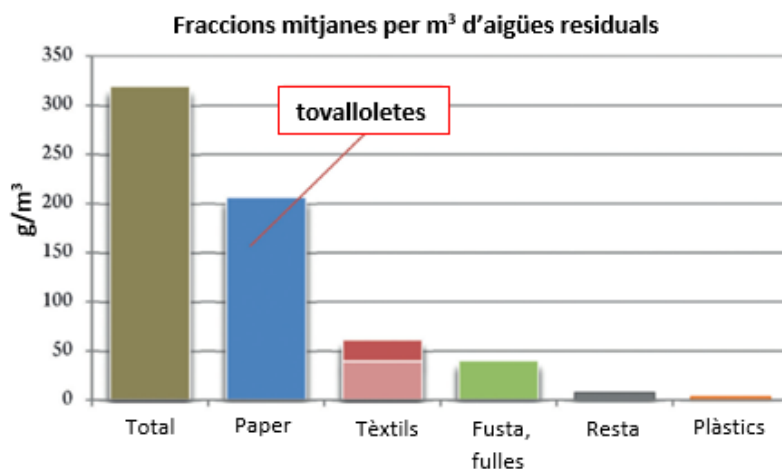


Figura 1. Mitjana de les fraccions de sòlids per m³ d'aigües residuals. (Mitchell, 2017).

Estudis recents confirmen que cap marca espanyola de tovalloletes humides, encara que estigui etiquetada com a biodegradable o s'anuncii com a paper higiènic humit, ho és realment. El paper higiènic es desintegra quasi completament a les aigües residuals, assolint un percentatge de degradació del 95%. Per contra, el percentatge de desintegració de les tovalloletes humides no arriba al 50% en el millor dels casos. A més, la diferència entre els resultats de desintegració dels productes anunciats com a biodegradables i els anunciats com a no biodegradables és quasi nul·la. S'espera que les tovalloletes humides etiquetades com a biodegradables desapareguin de les aigües residuals amb la mateixa eficiència i rapidesa que ho fa el paper higiènic. Malauradament, estudis indiquen que ni les tovalloletes humides normals ni les tovalloletes humides “biodegradables” es degraden més del 5% una vegada són depositades a les aigües residuals mitjançant el vàter, quan haurien de superar al menys un 60% de degradació als dos mesos. La situació es veu desfavorida per la presència de fibres sintètiques en la composició de les tovalloletes humides. Sorprenentment, les fibres naturals de cel·lulosa tampoc es degraden. Probablement per l'aplicació sobre les

mateixes de substàncies conservants, surfactants i hidratants. Aquest fet pot inhibir l'acció dels bacteris sobre les tovalloletes i per tant, fer més lenta la seva degradació. (Habituales, 2016)

El següent treball es focalitza amb el fet de que les fibres de cel·lulosa que componen les tovalloletes no es disgreguen i degraden amb la mateixa facilitat que ho fa el paper higiènic al ser depositat a les aigües residuals, causant nombrosos problemes als sistemes de clavegueram i de tractament d'aigües residuals arreu del món. Suposant tant un problema mediambiental com una gran despesa econòmica.

La cel·lulosa és el polisacàrid principal de la paret cel·lular de les plantes. És un polímer insoluble en aigua compost de unitats repetides de β -D-glucopiranoses unides per enllaços β -1,4 glicosídics. La longitud de cada cadena pot arribar fins als 25,000 residus de cel·lulosa. 15-45 cadenes de glucà es combinen per a formar una microfibra en una organització cristal·lina regular. Un grup d'aquestes microfibrilles formen una macrofibra o una fibra de cel·lulosa. Degut a la seva natura cristal·lina, la cel·lulosa és resistent a la degradació.

Hi ha dues formes de transformar la cel·lulosa a glucosa: de manera química i amb hidròlisi enzimàtica. La hidròlisi enzimàtica de la cel·lulosa amb l'aplicació de cel·lulases és una opció més atractiva degut a que suposa una alternativa més respectuosa amb el medi ambient. Tres cel·lulases principals són les responsables de la hidròlisi completa de cel·lulosa. Les endoglucanases realitzen la hidròlisi dels enllaços glicosídics a les regions amorfes de la cel·lulosa generant oligòmers de cadena llarga (amb extrems no reductors) per a la següent acció d'endoglucanases o celobiohidrolases, les quals hidrolitzen els oligòmers generats en cadenes curtes d'oligosacàrids. Posteriorment actuen les exoglucanases alliberant cel·lobiosa, la qual és hidrolitzada fins a glucosa per les β -glucosidases (E.C. 3.2.1.21) (Figura 2). Una gran varietat de microorganismes a la natura són capaços d'expressar cel·lulases a la natura. Les cel·lulases són produïdes o bé de manera lliure i secretades a l'ambient extracel·lular, com és el cas de fongs aerobis, o bé les cel·lulases es troben agregades formant part d'estructures adjuntes a les cèl·lules. Aquests agregats extracel·lulars són coneguts com a cel·lulosomes. És un complex proteic que ajuda a l'unió entre les cel·lulases i la cel·lulosa (Juturu and Chuan,

2014) (figura 3). Els cel·lulosomes es troben presents a bacteris anaerobis i a alguns tipus de fongs (Malherbe and Cloete, 2002)

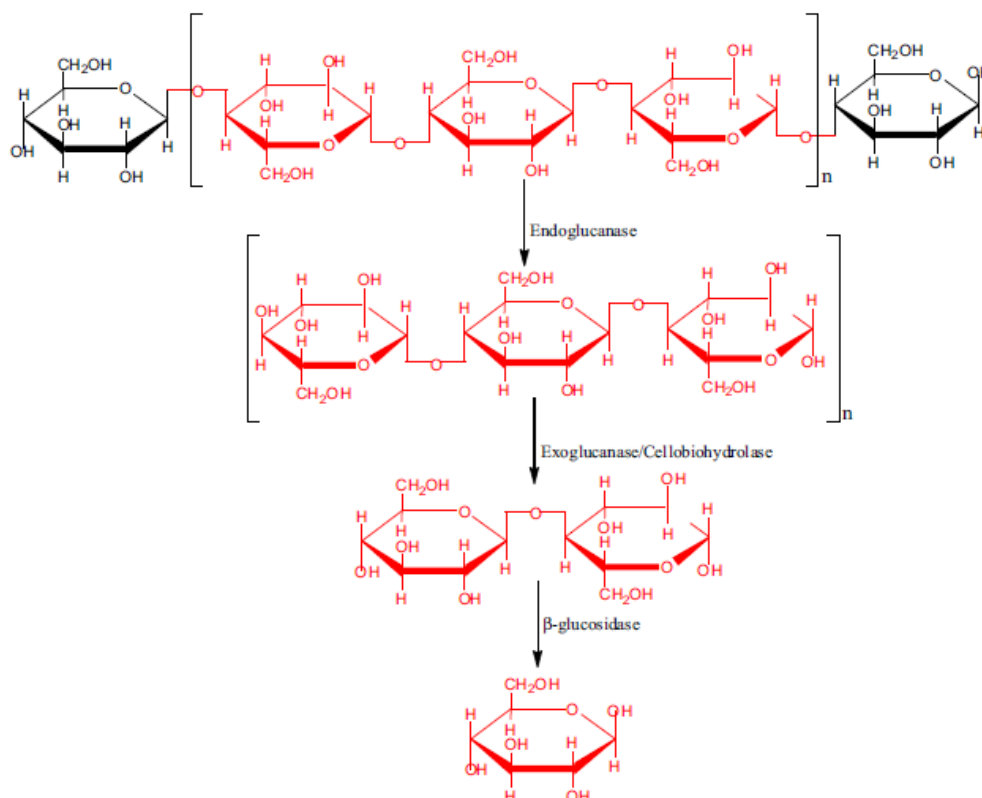


Figura 2. Estructura del polímer de cel·lulosa, la cel·lulosa cristal·lina és representada en color roig, la cel·lulosa amorfa és representada en color negre. Es representen amb fletxes els llocs d'acció de les cel·lulases.

La hidròlisi enzimàtica del polímer de cel·lulosa implica l'acció seqüencial de les cel·lulases. Les cel·lulases catalitzen la hidròlisi de l'enllaç glicosídic entre 2 o més molècules d'hidrats de carboni o també, entre un hidrat de carboni i un component de naturalesa diferent. L'estructura general d'aquest tipus d'enzims es compon de 2 mòduls globulars independents: El primer es tracta d'un domini catalític, el qual realitza la pròpia reacció d'hidròlisi. El segon és un mòdul d'unió a la molècula de cel·lulosa, el qual duu a terme 3 funcions principals: La primera funció és el manteniment de l'enzim pròxim al substrat, en aquest cas, la cel·lulosa. La segona funció és la de reconeixement del substrat i l'última funció és la disruptiva. (Boraston *et al.*, 2004)

El procés de degradació de cel·lulosa proporciona als microorganismes una font de carboni i energia. Les poblacions microbianes sobreviuen i prolifereixen a partir de la cel·lulosa. Per exemple, microorganismes simbiòtics als budells d'alguns animals que ajuden a aquests a digerir la cel·lulosa. (Li *et al.*, 2014). Addicionalment al reciclatge

natural de la cel·lulosa, aquesta ha sigut històricament utilitzada pels humans per a la producció de paper i més tard, de tovalloletes.

Molts estudis de microorganismes productors de cel·lulasa han estat centrats en espècies bacterianes individuals, utilitzant un mètode cultiu-depenent. Per exemple, *Clostridium thermocellum* i *C. cellulolyticum* (Dash *et al.* 2016). No obstant, els processos de degradació de cel·lulosa poden ser duts a terme per un consorci microbià, no només per microorganismes independents. (Cui *et al.*, 2019)

4. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS

Diverses espècies de microorganismes tenen la capacitat de produir cel·lulases per la hidròlisi de les fibres que componen les tovalloletes en condicions normals. Els objectius d'aquest estudi són:

- Establir una col·lecció d'espècies bacterianes associades a un medi amb degradació de tovalloletes amb enfocaments de cultius independents.
- Degradació de tovalloletes per microorganismes amb capacitat de producció de cel·lulases i una posterior identificació.

5. MATERIALS I MÈTODES

5.1. MOSTREIG

Les mostres han sigut recollides de tres fonts diferents: Compostatge convencional fet amb branques d'arbres secs, pells de fruita (plàtan, pera, taronja i poma), cafè, fems de cavall, té i aigua (compost 1); compost fet amb tovalloletes disgregades manualment, medi líquid (composició en g/l: triptona 25.0, peptona 25.0) , aigua i tefló (compost 2).

Els dos tipus de composts han estat incubats a termos de 2L per mantenir el calor produït per les reaccions de descomposició de la matèria orgànica pels microorganismes. La incubació del compostatge convencional ha tingut una durada de 14 dies. La incubació del compostatge fet amb l'única font de carboni porcions de tovalloletes, ha durat 9 dies. S'ha realitzat un seguiment del compostatge controlant la temperatura i el temps, tal i com s'indica en la figura 3 i la figura 4. S'han realitzat 3 oxigenacions al compost 1, a les 47, 165 i 220 hores. També, el compost 2 ha rebut una oxigenació a les 73 hores.

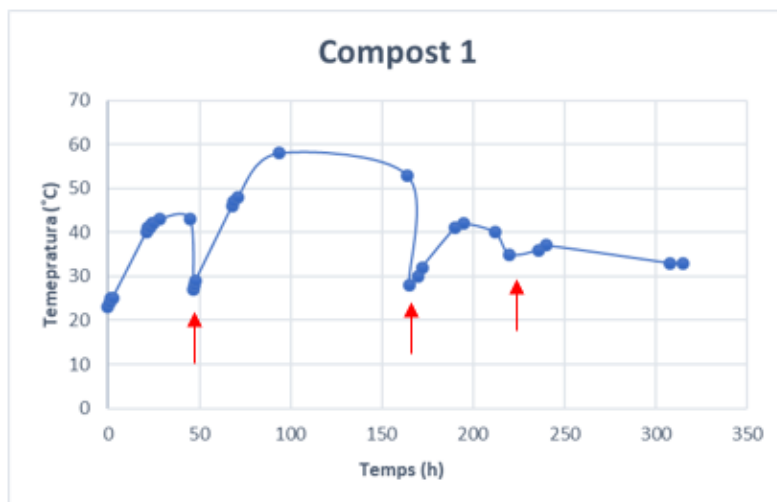


Figura 3. Seguiment de la temperatura durant el compostatge convencional (compost 1). Les oxigenacions van indicades amb fletxes.

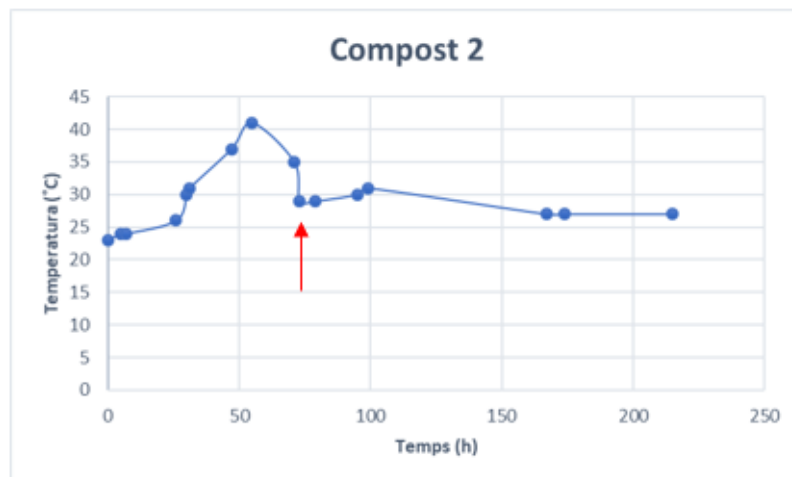


Figura 4. Seguiment de la temperatura durant el compostatge fet amb tovalloletes, medi amb nitrogen i tefló (compost 2). L'oxigenació va indicades amb una fletxa.

Per últim, tovallolletes incubades amb medi mínim líquid (composició en g/l: 2.0 NaNO₃, 1.0 K₂HPO₄, 0.5 MgSO₄ 7 H₂O, 0.5 KCl, 0.5 Sacarosa) i d'aigua procedent d'una sèquia propera de la sortida d'una depuradora al terme de Turis (València), amb Erlenmeyers d'1L, amb agitació de 100 rpm i a temperatura ambient. Les tovallolletes utilitzades en aquest estudi són de la marca 'Bosque verde', comprades a Mercadona. Ambdós tipus de paquets són de 100 unitats i estan etiquetats com a biodegradables. Les mostres de cada Erlenmeyer es van agafar als dos mesos d'incubació una vegada es va poder apreciar visiblement una biodegradació de la tovallolleta, tal i com podem veure a les figures 5 i 6.



Figura 5. A l'esquerra es pot veure l'erenmeyer amb la tovallolleta biodegradada. A la dreta de la imatge, es pot veure el control negatiu.

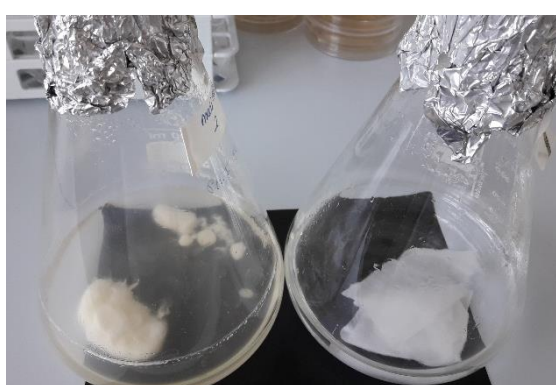


Figura 6. A l'esquerra es pot veure l'erenmeyer amb la tovallolleta biodegradada. A la dreta de la imatge, es pot veure el control negatiu.

5.2. MEDIS DE CULTIU, CONDICIONS DE CREIXEMENT I AÏLLAMENT DE SOQUES BACTERIANES

Els medis de cultiu usats en aquest treball han sigut escollits segons estudis previs en condicions similars. Alíquotes de 50 µl de les mostres originals i mostres diluïdes 10⁻², 10⁻⁴ i 10⁻⁶ vegades van ser sembrades en plaques Petri que contenen medi Lysogenic Broth (LB) (composició en g/l: 10.0 triptona, 10.0 NaCl, 5.0 extracte de llevat, 15.5 agar), medi mínim (MM) suplementat amb carboximetil-cel·lulosa (CMC) (composició en g/l: 6.8 Na₂HPO₄, 3.0 KH₂PO₄, 0.5 NaCl, 1.3 (NH₄)₂SO₄, 0.5 MgSO₄ 7 H₂O, 5.0 CMC-Na, 15.0 agar) i medi King B (KB) (composició en g/l: Peptona 20.0, 1.5 K₂HPO₄, 1.5 MgSO₄ 7 H₂O, 10 ml glicerol, 15.0 agar), i van ser cultivades 72 hores a temperatura ambient. Després de 3 dies d'incubació, colònies individuals van ser aïllades amb sèbres independents en medi LB i MM-CMC fresc i estèril en funció de la morfologia de la colònia (color, mesura i textura). La majoria de les soques aïllades van poder créixer en medi LB i KB,

mentre que al medi MM-CMC, moltes soques van créixer molt lentament. Un total de 90 soques van ser aïllades i nombrades amb les inicials de la font de la mostra següides del nombre. Font (tov: tovalletes, com: compostatge convencional, tef: compostatge amb teflon) – nombre de la soca aïllada. Les soques van ser criopreservades a -20°C en glicerol al 20% per a un possible ús futur.

5.3. ASSAIG QUALITATIU DE MICROORGANISMES DEGRADADORS DE CEL·LULOSA

Les soques aïllades van ser sembrades en plaques Petri amb MM-CMC agar i amb quadrícules dibuixades, ocupant cada soca un quadrant, van ser incubades a temperatura ambient durant 72 hores o fins que van assolir suficient biomassa. Les plaques amb Congo Red a l'1% van ser incubades durant 20 min. Passat el temps indicat, el tint va ser retirat i la superfície de les plaques va ser rentada amb NaCl 1M a l'1%. L'assaig es va dur a terme per triplicat. Com a control positiu es va utilitzar la soca aïllada de compostatge com21. Es va continuar treballant amb les soques aïllades que mostraven una zona clara al voltant de les colònies i les que no van presentar cap canvi es van descartar.

5.4. ASSAIG DE DEGRADACIÓ DE TOVALLOLETES PER MICROORGANISMES AMB ACTIVITAT CEL·LULASA

Els microorganismes degradadors de cel·lulosa aïllats van ser inoculats a tubs de vidre en 5 ml de medi mínim sense font de carboni (composició en g/l: 2.0 NaNO₃, 1.0 K₂HPO₄, 0.5 MgSO₄ 7 H₂O, 0.5 KCl) i amb una porció petita de tovalloleta completament assecada. Els tubs van ser incubats durant 7 dies a temperatura ambient. Es va calcular la pèrdua de pes en grams de la tovalloleta amb la diferència en pes sec abans i després de la incubació, utilitzant una balança analítica. El pes final va ser calculat amb la diferència de pes de falcons de 50 ml abans i després d'afegir el contingut dels tubs inoculats. El contingut dels tubs de vidre a les dues setmanes d'incubació, va ser introduït a falcons de 50 ml. Aquests van ser centrifugats 15 minuts a 4500 rpm i a 25°C. El sobrenedant es va descartar. Es va rentar afegint 5 ml d'aigua destil·lada i centrifugant de nou amb les mateixes condicions. El sobrenedant va ser descartat i el pellet, compost de la tovalloleta i en alguns casos per fibres visiblement separades, va romandre al respectiu falcon. Els falcons van ser assecats a 65°C i posteriorment els pesos foren anotats.

5.5. PURIFICACIÓ DE DNA I IDENTIFICACIÓ DE L'AMPLICÓ 16S

Per a la identificació de les soques aïllades de microorganismes degradadors de cel·lulosa, es va procedir a la seqüenciació del gen corresponent a l'RNA de la subunitat ribosòmica (16S rRNA) d'aquelles soques identificades morfològicament com a bacteris. La PCR dels extractes de DNA de cada soca va ser realitzada usant els primers universals 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG- 3') i 1492R (5'- GGTTACCTTGTTACGACTT- 3'). La seqüenciació del 18S rRNA es va dur a terme per a les soques identificades com a fongs usant els primers universals 86F (5' -ACTGCGAATGGCTCATTAAATCAG- 3') i 1188R (5'- AGTCAAATTAAGCCGCA- 3').

L'extracció de DNA va ser realitzada seguint el següent protocol descrit, (Latorre, Moya and Ayala, 2006). L'amplificació va ser verificada mitjançant una electroforesi amb un gel a l'1.4% d'agarosa. En el cas d'una verificació positiva, els amplicons són precipitats amb isopropanol 1:1 (vol:vol) i amb acetat potàssic 3M 1:10 (vol:vol) durant la nit a -20 °C. Després d'una centrifugació a 13000 rpm durant deu minuts, el DNA és rentat amb etanol al 70%, seguidament centrifugat a 13000 rpm durant tres minuts i resuspès amb 30 µl d'aigua Mili-Q. El 'BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)' ha sigut usat per etiquetar els amplicons, seqüenciats pel mètode de Sanger pel servei de seqüenciació (SCSIE) de La Universitat de València. Les seqüències obtingudes han sigut alineades amb la plataforma EZBioCloud (Yoon *et al.*, 2017)

6. RESULTATS I DISCUSSIÓ

6.1. AÏLLAMENT DE MICROORGANISMES AMB ACTIVITAT CEL·LULASA

S'han obtingut una gran quantitat i varietat de colònies diferents en quant a color i forma a partir del cultiu de mostres obtingudes dels dos tipus de compost i de les tovalloletes degradades en medi LB, i MM-CMC.

La majoria de colònies observades al medi MM-CMC presentaven un creixement molt lent i poca biomassa. Les colònies que provenien del compost eren més abundants i mostraven una major varietat en quant a forma, color i textura. En canvi, la mostra recollida als dos mesos d'incubació de la tovalloleta en agitació a 100 rpm, va

proporcionar una menor quantitat de colònies i majoritàriament presentaven una color crema i groguenc. Un total de 93 colònies foren aïllades i crio-preservades en glicerol al 20% per a un possible ús futur.

Totes les colònies aïllades van ser sotmeses a l'assaig qualitatiu de producció de cel·lulases. Encara que un gran nombre de soques aïllades van ser obtingudes a partir del medi suplementat amb CMC, el nombre de microorganismes resultant amb un nivell considerable de producció de cel·lulases va ser menor.

Deu microorganismes amb capacitat d'hidrolitzar la cel·lulosa foren seleccionats de les 93 soques aïllades segons el mètode de tinció de placa. Les soques Com4, Com12, Com15, Com16, Com17, Com18, Com21, Com25 i Com28 mostraren una zona clara al voltant de les colònies després de tenyir les plaques amb Congo red i des-tenyir-les amb NaCl 1M, tal i com es mostra a la figura 7. El Congo Red és un tint amb alta afinitat per la cel·lulosa. Les zones on la cel·lulosa ha sigut degradada no poden ser tintades, per tant es veuen d'un color clar.

Les colònies que mostraren una zona d'hidròlisi de color groguenc foren escollides per a realitzar el següent assaig, ja que la seva capacitat d'hidrolitzar cel·lulosa queda confirmada. Sorprenentment, cap de les 43 colònies aïllades de les tovalloletes degradades va mostrar degradació de la carboximetilcel·lulosa en les nostres condicions.

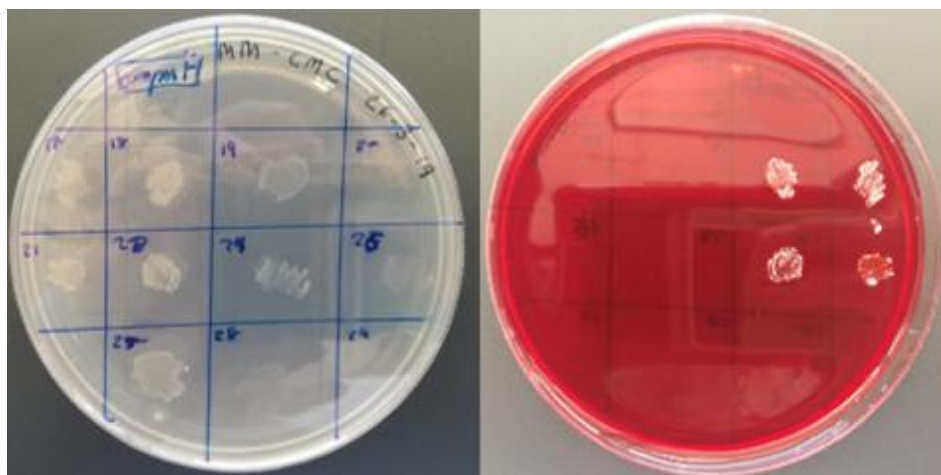


Figura 7. Placa Petri amb 1,5% CMC-Na incubada a temperatura ambient durant 72 h. A l'esquerra es mostra la placa Petri abans de tenyir amb Congo red a l'1% i a la dreta, després.

IDENTIFICACIÓ DE SOQUES AMB ACTIVITAT CEL·LULASA PROCEDENTS DE COMPOST

Les soques amb capacitat de producció de cel·lulases seleccionades van ser identificades amb la seqüenciació de Sanger del gen que codificava per al rRNA 16S/18S. Les 43 colònies obtingudes de la mostra de la tovalloleta degradada també van ser identificades. Tot i dur a terme la extracció del DNA, 13 soques no han pogut ser identificades després de tres intents. La identificació de les soques aïllades es troba a la taula 2.

Les soques productores de cel·lulases seleccionades amb l'assaig del Congo red, pertanyen la majoria a espècies bacterianes i una d'elles a una espècie fúngica. Per a aquesta última, ha sigut impossible seqüenciar correctament el gen que codifica per a la subunitat ribosomal 18S.

Tot i pertànyer a diferents hàbitats, la majoria han sigut identificades prèviament com a productores de cel·lulases i amb propietats interessants per a la biotecnologia. La meitat de les soques productores de cel·lulases seleccionades pertanyen al filum *Actinobacteria*. El filum *Actinobacteria* és una de les unitats taxonòmiques més grans del domini dels bacteris. La majoria dels bacteris d'aquest filum, són químiotrofs i capaços d'utilitzar fonts nutricionals molt diverses, incloent polisacàrids complexos. Són presents a un rang ampli d'ambients com sols, aigua fresca i salada o l'aire. Concretament, el gènere *Streptomyces* representa el 95% de les soques bacterianes aïllades del terra (Barka *et al.*, 2015) on juguen un paper important en el cicle del carboni. La importància d'aquests en ecologia, biotecnologia i medicina és subratllada per la seva capacitat de sintetitzar una gran quantitat de components bioactius incloent antibiòtics i antifúngics així com molts enzims inhibidors i diversos enzims extracel·lulars. Aquests enzims degraden macromolècules incloent cel·lulosa.(Wibberg *et al.*, 2016).

La identificació del gen que codifica per al 16S rRNA o 18S rRNA no és completa, ja que s'ha seqüenciat entre el 50 i el 54% del gen, per tant, no podem estar totalment segurs de que l'espècie identificada sigui la correcta, però sí del gènere quan el percentatge de similitud del DNA és igual o superior a 98,7. El percentatge de similitud de les seqüències

analitzades pel mètode de Sànger és bastant alt, per això podem estar segurs de que amb molta probabilitat les espècies descrites a continuació són les correctes.

Les soques del gènere *Streptomyces* aïllades, probablement pertanyen a les espècies *Streptomyces cellulosa* (99,57%), *Streptomyces albogriseolus* (100,0%), *Streptomyces griseorubens* (100,0%) o *Streptomyces viridodiatstaticus* (100,0%). L'espècie *Streptomyces cellulosa* ha sigut documentada per estudis previs com a una espècie degradadora de cel·lulosa (Rani et al., 2018). *S. cellulosa* també és una potencial font de substàncies antimicrobianes. Així com *Streptomyces albogriseolus*, que a més de degradar la cel·lulosa, també és eficient amb la degradació de substàncies tòxiques que componen herbicides (Arya et al., 2016). És interessant que l'espècie *Streptomyces griseorubens* adapta el seu creixement i activitat de producció de cel·lulasa a un rang ampli de temperatures i pH. Això indica que aquesta soca pot ser crescuda en distints hàbitats i en diferents condicions ambientals, jugant un paper molt important en la degradació de cel·lulosa residual.(Prasad et al., 2013). *Streptomyces viridodiatstaticus* s'ha documentat com a una espècie productora de substàncies antimicrobianes, com la bioxalomicina α_2 (Greenstein and Steinberg, 1994). No obstant, es desconeix activitat cel·lulasa per part de *S. viridodiatstaticus*.

Per altra banda, tres de les soques aïllades han sigut identificades com a *Cellulosimicrobium*. El gènere *Cellulosimicrobium* va ser per primera vegada descrit per (Schumann et al. 2001) amb la reclassificació de *Cellulomonas cellulans* com a *Cellulosimicrobium cellulans*. *Cellulosimicrobium* també pertany a la classe dels *Actinobacteris*. Una característica dels membres d'aquest gènere és la seva activitat d'hidròlisi de la cel·lulosa. Les espècies del gènere *Cellulosimicrobium* han sigut aïllades del terra (Yoon et al., 2007), de mostres clíniques (Delpont et al., 2014) del tracte gastrointestinal d'herbívoros i insectes i d'ambients extrems com l'Antàrtida (Peter and Thamban, 2009).

Aquestes soques pertanyen probablement a les espècies *Cellulosimicrobium aquatile* (99.13%), *Cellulosimicrobium funkei* (99.13%) o *Cellulosimicrobium cellulans* (98.70%). *C. aquatile* va ser per primera vegada aïllat a una pressa hidràulica a l'Índia. Sorprenentment, aquesta espècie ha sigut descrita com a negativa per la hidròlisi de cel·lulosa.(Sultanpuram et al., 2015). *C. funkei* és un bacteri degradador de cel·lulosa i hemicel·lulosa (D. Y. Kim et al., 2016). A part, és un patògen humà. També ha sigut

descriu com a degradador de aflatoxines (AF), que són toxines produïdes per fongs del gènere *Aspergillus sp.* i que afecten a la indústria alimentària (Sun et al., 2015). Per últim, estudis previs afirmen que *C. cellulans* produeix enzims degradants de la paret cel·lular, particularment cel·lulases. (Song and Wei, 2010) És interessant que ha sigut descrit com a un biodegradador del gasoil a ambients marins i suposa, per tant, una potencial aplicació en la bioremediació marina (Nkem et al., 2016). És curiós que una companya que també estava realitzant el treball de fi de grau al mateix laboratori on s'ha dut a terme aquest, ha obtingut la mateixa soca per a la seva col·lecció de bacteris degradadors de gasoil i dièsel. Per a descartar una possible contaminació, s'ha repetit la seqüenciació 16S rRNA per a les soques implicades i s'han comparat les seqüències.

Dues de les soques aïllades amb capacitat d'hidròlisi de la cel·lulosa, han sigut identificades com a bacteris del gènere *Sphingobacterium*. Han sigut aïllats de llacs, del terra, de compost, d'insectes i de superfícies de nòduls de soia (Long et al., 2019). Estudis previs han classificat als bacteris del gènere *Sphingobacterium* com a bacteris amb capacitat d'hidròlisi de la cel·lulosa i activitat cel·lulasa, encara que a un nivell menor que els gèneres *Streptomyces* i *Cellulosimicrobium* (Devi et al., 2018). L'espècie més probable per a les dues soques és *Sphingobacterium multivorum* (amb similituds de 98,77 i 99,08%), la qual és descrita com a patògen oportunista que rarament és involucrat en infeccions humanes. (Grimaldi et al., 2012)

Per últim, una de les soques amb capacitat de producció de cel·lulases, pertany al gènere *Pseudomonas*. Els membres del gènere *Pseudomonas* estan adaptats a moltes condicions ambientals i per tant es troben en un rang ampli de localitzacions com el terra, l'aigua, plantes, teixits animals, menjar, etc. Els bacteris del gènere *Pseudomonas* han sigut classificats com a degradadors de cel·lulosa per estudis previs (Tozakidis et al., 2016). Membres d'aquest gènere estan implicats freqüentment en la degradació i deteriorament d'una gran varietat de productes alimentaris que deriven de plantes o animals. Diversos estudis confirmen que els bacteris del gènere *Pseudomonas* són patògens oportunistes humans (Pathak and Singh, 2016). La soca aïllada productora de cel·lulases en el present estudi, probablement pertany a les espècies *Pseudomonas monteirii* (99.34%) o *Pseudomonas entomophila* (99.34%).

Pseudomonas monteirii ha sigut reportat com a patògen oportunista humà. Ha sigut aïllat del medi ambient però també a hospitals (Ocampo-sosa et al., 2015).

Pseudomonas entomophila és un dels models més importants per l'estudi d'interaccions insecte-microorganisme. De manera similar a altres espècies de *Pseudomonas*, les propietats de *P.entomophila* indiquen que aquesta soca conté un llarg conjunt de gens involucrats en l'adaptació a múltiples fonts de carboni.(Dieppois *et al.*, 2015)

No s'ha trobat cap estudi específic que confirmi la degradació de cel·lulosa per part de *Pseudomonas monteilii* i *Pseudomonas entomophila*.

En resum, la majoria de soques aïllades i seleccionades a partir de l'assaig qualitatiu de producció de cel·lulases amb el mètode de tinció per placa, han sigut prèviament documentades per diversos autors com a microorganismes degradadors de cel·lulosa. A part, altres propietats interessants per a la indústria i la biotecnologia són característiques d'aquestes soques. Per exemple, la producció de metabòlits secundaris bioactius per les soques del gènere *Streptomyces*, com substàncies antimicrobianes per *S. cellulosa* i *S. viridodiataticus* o enzims degradadors de components tòxics d'herbicides per *S. albogriseolus*. A més, *Cellulosimicrobium funkei* té capacitat de degradar aflatoxines, el qual és interessant per la indústria alimentària, i *Cellulosimicrobium cellulans* és un degradador de gasoil. Per tant, pot ser important per a l'àmbit de la bioremediació. Els bacteris aïllats del gènere *Pseudomonas*, participen en la degradació del menjar, així que també són importants per a la indústria alimentària. No obstant, algunes de les soques aïllades pertanyen en alta probabilitat a espècies registrades per estudis previs com a patògens oportunistes humans. Estes són: *Cellulosimicrobium funkei*, *Sphingobacterium multivorum*, *Pseudomonas monteilii* i *Pseudomonas entomophila*.

IDENTIFICACIÓ DE SOQUES PROCEDENTS DE TOVALLOLETES BIODEGRADADES

Un total de 43 soques van ser aïllades d'una mostra de tovalloleta visiblement biodegradada. Les 43 soques van ser sotmeses a l'assaig d'activitat cel·lulasa amb Congo Red, però no es van obtenir resultats.

Mitjançant la seqüenciació del gen que codifica per al 16S rRNA, s'han identificat 9 gèneres bacterians. A la figura 8 es mostra el llistat de gèneres bacterians aïllats junt al percentatge de soques del mateix gènere presents a la mostra.

Un 53,33% de les soques aïllades pertanyen al gènere *Rhizobium*. Dintre d'aquest percentatge l'espècie més propera en un 36,67% de les soques és *Rhizobium*

ipomoeae. Un 6,67% de les soques probablement són *Rhizobium rosettiformans*. El percentatge restant està compost de les espècies *Rhizobium marinum* (3,33%), *Rhizobium aggregatum* (3,33%) i *Rhizobium wuzhouense* (3,33%).

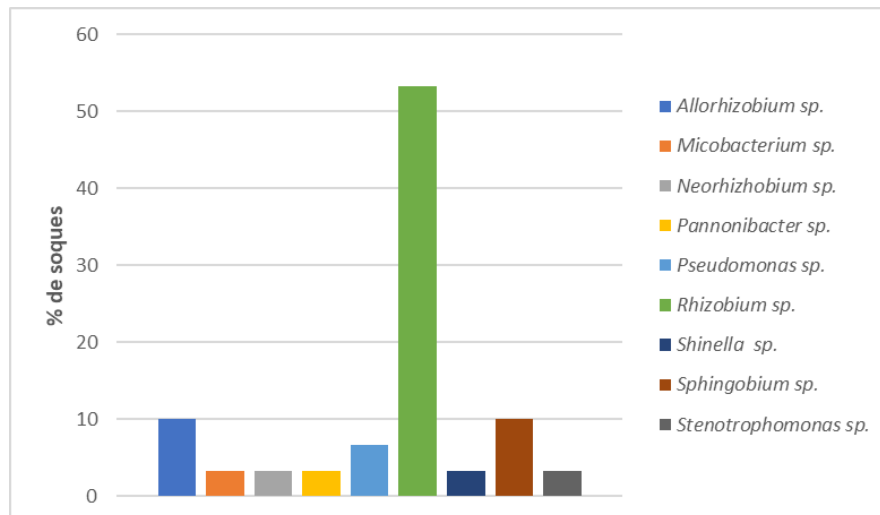


Figura 8. Percentatge de gèneres bacterians aïllats de la tovallola degradada ordenats per ordre alfabètic.

El gènere *Rhizobium* està format per bacteris fixadors de nitrogen que estableixen una simbiosi amb les plantes hoste. Un esdeveniment clau de la infecció primària requereix per al desenvolupament de la simbiosi *Rhizobium*-llegum, és el pas dels bacteris a través de la paret cel·lular de l'arrel. Aquest procés de degradació ha de ser altament localitzat i delicadament equilibrat amb la finalitat de que el bacteri que vagi a establir la simbiosi penetri completament i dugui a terme la infecció satisfactòriament sense matar les cèl·lules de l'arrel i en conseqüència, l'avortament del procés d'infecció (Peix et al. 2010) Els enzims hidrolítics produïts pels bacteris del gènere *Rhizobium* juguen un paper molt important en la penetració d'aquests a les parets cel·lulars de la planta. Estudis previs han detectat activitat de degradació de cel·lulosa a quasi tots els tipus de soques oficials de *Rhizobium*. La cel·lulasa de *Rhizobium* és una 1,4- β -endoglucanasa (EC 3.2.1.4.) amb alta especificitat de substrat per la cel·lulosa no-cristal·lina. (Ramos et al., 2008) La baixa activitat de les cel·lulases dels bacteris que pertanyen al gènere *Rhizobium* és una característica que reprimeix la seva acció degradant a les cèl·lules de l'arrel. D'aquesta manera, s'evita una lisi i mort cel·lular indiscriminada. (Robledo et al., 2015)

La baixa activitat cel·lulasa pot explicar per què l'assaig de detecció d'aquesta activitat amb Congo Red no ha sigut satisfactori per a les soques aïllades de les mostres de

tovalloletes degradades en les condicions establertes. Probablement, per a la detecció de degradació de cel·lulosa per aquestes soques es necessària l'aplicació de tècniques més precises i sensibles.

L'espècie més probable en la majoria de soques aïllades és *Rhizobium ipomoeae*. El percentatge de similitud de les soques aïllades amb aquesta espècie va des de 98,70% fins a 99,86%. Estudis previs confirmen la seva capacitat de degradar cel·lulosa.(Sheu *et al.*, 2019). No obstant, *Rhizobium aggregatum* (98,70%) (re-classificat a partir de *Blastobacter aggregatus*) i *Rhizobium rosettiformans* (99,34% i 99,87%) són negatius per a la hidròlisi de la cel·lulosa (Kaur, Verma and Lal, 2011). *Rhizobium wuzhouense* (99,58%) és l'espècie més recent, aïllada en 2018 per primera vegada. No es té cap referència de degradació de cel·lulosa per part d'aquesta espècie.(Yuan *et al.*, 2018). Una altra espècie probable és *Rhizobium marinum* (99,85%). *R. marinum* va ser aïllada per primera vegada de la superfície de l'aigua de mar i és positiva en activitat cel·lulasa.(Liu *et al.*, 2015)

S'han aïllat més soques pertanyents a la família *Rhizobiaceae*. Tres pertanyen al gènere *Allorhizobium* (98,00 – 98,08%) i una al gènere *Neorhizobium* (93,89%). Ambdós són gèneres recentment segregats del gènere *Rhizobium* (Lavire *et al.*, 2014). Una de les soques aïllades pertany al gènere *Shinella* i l'espècie més probable és *Shinella kummerowiae*(99,45%). *S. kummerowiae* va ser aïllada per primera vegada d'una lleguminosa. També presenta activitat cel·lulasa documentada per estudis previs.(Lin *et al.*, 2008).

Tres de les soques aïllades són classificades com a membres del gènere *Sphingobium*. Les espècies que comprenen aquest gènere han sigut aïllades majoritàriament de sol contaminat i aigües residuals. Són coneguts pels seus paper en bioremediació i biodegradació de contaminants, com carbaril, hexaclorociclohexà i altres components xenobiòtics.(Basta, Buerger and Stolz, 2005)(Bala, Sharma and Lal, 2010)(Yan *et al.*, 2010). L'espècie més probable per a les tres soques aïllades és *Sphingobium scionense*(99,34% – 100,00%). *S. scionense* va ser aïllat per primera vegada al sòl d'una serradora. Posseeix activitat cel·lulasa, així com propietats interessants com la degradació de hidrocarburs aromàtics(Liang and Lloyd-Jones, 2010).

Van ser aïllades dues soques de *Pseudomonas* a la mostra de la tovalloleta degradada. L'espècie més probable d'una de les soques és *Pseudomonas simiae*(99,87%). *P. simiae*

va ser aïllada de mostres clíniques procedents del pulmó d'un mono malalt de pneumònia de l'espècie *Callithrix geoffroyi*, una espècie endèmica de Brasil. No obstant, *P. simiae* no ha sigut classificada com a positiva en activitat cel·lulasa. L'altra de les soques aïllades probablement pertany a les espècies *Pseudomonas granadensis* (98,65%), *Pseudomonas kribbensis* (98,65%) o *Pseudomonas koreensis* (98,65%). *P. granadensis* va ser aïllada de Granada, del parc natural de les serres de Tejeda, Almirajá i Alhama.(Bills *et al.*, 2019). *P. koreensis* ha sigut aïllada de la rizosfera de plantes de vainilla i presenta una molt baixa activitat cel·lulasa. És interessant que posseeix activitat antimicrobiana. *P. koreensis* representa un potencial no sols com a biofertilitzant sinó també com a un agent de control fitosanitari.(Osorio-vega, 2014). *Pseudomonas kribbensis* va ser aïllat per primera vegada del sòl de jardins a Corea del sud. Però, no ha sigut documentat com a degradador de cel·lulosa.(D. C. M. R. J. Kim *et al.*, 2016)

Una de les soques aïllades pertany a un gènere molt interessant a l'àmbit de la biotecnologia, *Stenotrophomonas sp.* Algunes soques de *Stenotrophomonas* poden produir components antimicrobians que protegeixen les plantes, així com factors de creixement que promouen el creixement vegetal. També, moltes soques del gènere *Stenotrophomonas* tenen un nivell molt alt de resistència a metalls pesats i antibiòtics. S'ha vist que tenen la capacitat de degradar un rang ampli de components, incloent contaminants i cel·lulosa(Huang, Sheng and Zhang, 2012). Algunes soques són patògenes oportunistes d'humans(Ryan *et al.*, 2009). Les dues espècies més probables per a la soca aïllada del gènere *Stenotrophomonas* són *Stenotrophomonas indicatrix* (99,30%) i *Stenotrophomonas lactitubi* (99,16%). Ambdues espècies són relativament noves i no han sigut documentades com a degradadores de cel·lulosa o com a productores de cel·lulasa. Van ser aïllades de biofilms formats a l'equip de munyiment d'una granja de productes lactis a Alemanya (Weber *et al.*, 2019).

També s'ha aïllat una soca del gènere *Microbacterium*. Les espècies pertanyents a aquest gènere han sigut aïllades de diversos ambients. Per exemple, menjar fermentat, bolets, formatge, sang humana, sòl, aigua marina, insectes i arrels de plantes. Algunes de les soques del gènere *Microbacterium* han sigut classificades com a degradants de cel·lulosa.(Manfredi, Perotti and Mart, 2015) L'espècie més probable és *Microbacterium saccharophilum* (99,07%). *M. saccharophilum* originalment va ser aïllada del sòl d'una refinaria de sucrosa en Japó. Actualment, *M. saccharophilum* s'utilitza per produir β -

fructofuranosidasa. Per això, aquesta soca és de interès industrial. No obstant, és negativa per a l'activitat cel·lulasa.(Ohta *et al.*, 2013). Altres espècies bastant probables són *Microbacterium deminutum* (98,80%), *Microbacterium pumilum* (98,94%) i *Microbacterium aoyamense* (98,67%). Les tres van ser aïllades per primera vegada del sòl d'un cementiri al Japó. L'activitat cel·lulasa és present a les tres espècies.(Kageyama, Takahashi and Satoshi, 2006)

Per últim, una soca pertanyent al gènere *Pannonibacter* va ser aïllada. L'espècie més probable és *Pannonibacter phragmitetus* (98,94%). Aquest gènere i aquesta espècie, han sigut aïllats de llacs de sosa poc profunds localitzats a Hungria. Concretament, *P. phragmitetus* ha sigut aïllada de rizomes de canya en descomposició, localitzat en aquests llacs. *P. phragmitetus* és positiu per a la degradació de cel·lulosa.

Finalment, encara que cap soca ha sigut positiva per l'assaig qualitatiu d'activitat cel·lulasa realitzat prèviament a la identificació, estudis previs han documentat que la majoria de soques aïllades pertanyen a espècies descrites com a degradants de cel·lulosa. A més, la presència de bacteris del gènere *Rhizobium* és destacable sobre els demès gèneres presents, indicant que probablement aquest gènere jugui un paper important a la degradació de tovalloletes. A part, algunes tenen propietats interessants per a la biotecnologia i per a la indústria. Per exemple, els bacteris del gènere *Sphingobium* i el seu paper amb la biodegradació de components xenobiòtics i hidrocarburs aromàtics. O també, els bacteris del gènere *Pseudomonas* aïllats posseeixen activitats antimicrobianes i fitosanitàries. Així com els bacteris del gènere *Stenotrophomonas* i la seva activitat antimicrobiana.

6.3. AVALUACIÓ DE LA PÈRDUA DE MASSA DE LES TOVALLOLETES

S'ha estudiat la capacitat de degradar tovalloletes dels microorganismes amb activitat cel·lulasa amb la tovalloleta com a única font de carboni. Els valors de la pèrdua de massa de cada tovalloleta, junt a la identificació de cada soca, es mostra a la taula 3. Abans de ser obtinguts els valors de la diferència de massa de les tovalloletes, es va realitzar una avaluació de la terbolesa, del color i de la degradació aparent.

Per a avaluar la terbolesa i la degradació s'utilitzen els signes “-, +, ++, +++”, on “-” es refereix a una apreciació de la terbolesa o degradació nul·la. “+” fa referència a una

apreciació de la terbolesa o degradació baixa. “++” fa referència a una apreciació de la terbolesa o degradació moderada. “+++” fa referència a una apreciació de la terbolesa o degradació alta. L’avaluació la podem observar a la taula 2.

La terbolesa, generalment, és un indicador del creixement. En Microbiologia s'utilitza la terbolesa com a un indicador de la densitat cel·lular. Normalment s'assumeix que a major terbolesa, major nombre de cèl·lules hi ha al cultiu.

Mostra	Terbolesa	Color del medi	Degradació aparent
Com4	+	Transparent	++
Com12	-	Transparent	+
Com15	+++	Blanc	+
Com16	++	Blanc	-
Com17	+	Rosa/Roig clar	+
Com18	++	Groc clar	+
Com21	+	Transparent	++
Com23	-	Transparent	-
Com25	+++	Groc clar	-
Com28	-	Groc clar	+
Tov7	+	Blanquinós	-
Tov9	+	Transparent	-
Tov15	-	Transparent	-
Tov16	-	Transparent	-
Tov25	-	Blanc - rogenc	+
Tov27	-	Transparent	+
Tov35	++	Blanc – marró clar	-
Tov41	-	Transparent	-
Control -	-	Transparent	-

Taula 1. Avaluació de la terbolesa, color del medi i degradació aparent.

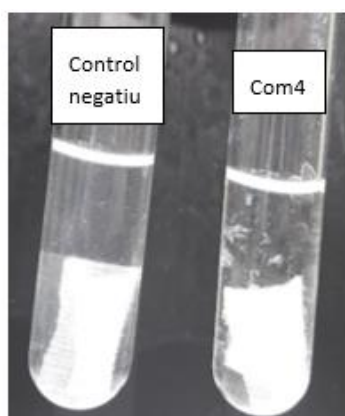


Figura 9. Comparació visual del tub control negatiu (esquerra) i del tub inoculat amb Com4 (dreta).

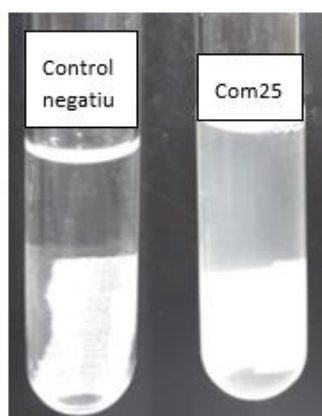


Figura 10. Comparació visual del tub control negatiu (esquerra) i del tub inoculat amb Com25 (dreta).

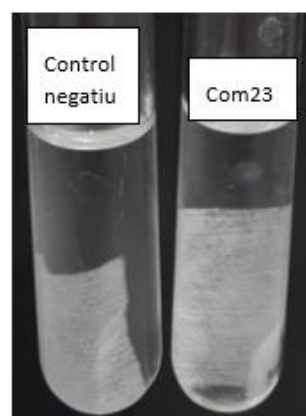


Figura 11. Comparació visual del tub control negatiu (esquerra) i del tub inoculat amb Com23 (dreta).

Els valors de la taula 2, mostren que generalment els tubs que contenen les soques procedents de compost presenten major terbolesa, coloració i degradació aparent que els tubs amb soques procedents de la tovalloleta degradada.

Podem agrupar les soques segons el tipus d'apreciació visual: Aquelles soques que no presenten ni terbolesa al tub on s'incuben (-), ni degradació aparent de la tovalloleta (-), són Com23, Tov15, Tov16 i Tov41, com es veu per exemple a la figura 11. Per altra banda, les soques que presenten terbolesa al medi del tub on s'incuben (+, ++, +++), però no es mostra degradació aparent de la tovalloleta (-), són Com16, Com25, Tov7, Tov9, i Tov35. Podem veure un exemple a la figura 10. Les soques sense terbolesa al tub on són incubades (-) però degradació aparent de la tovalloleta (+, ++, +++) són Com12, Com 28, Tov25 i Tov27.. Per últim, aquelles soques que el tub presenta tant terbolesa com degradació aparent són Com4, Com15, Com17, Com18 i Com21. Com es veu a la figura 9.

Les característiques observades no són pròpies de cada tipus d'espècie bacteriana, més bé, són pròpies de la soca, ja que les soques pertanyents a l'espècie *Sphingobacterium multivorum* (Com15 i Com16) no presenten els mateixos nivells de terbolesa i degradació aparent. El tub on són incubades presenta terbolesa en les dues soques. Per contra, Com15 presenta degradació aparent de la tovalloleta, però Com16 no. També, Com18, Com25 i Com28 pertanyen al gènere *Cellulosimicrobium*, probablement a l'espècie *C. funkei*. Com18 mostra tant terbolesa com degradació, Com25 presenta terbolesa al tub on és incubada però no degradació de la tovalloleta i Com28, presenta degradació aparent de la tovalloleta però no terbolesa al medi. Les dues soques pertanyents al gènere *Streptomyces*, Com4 i Com17, presenten tant terbolesa com degradació aparent.

L'avaluació de la degradació de la tovalloleta en pèrdua de massa es troba en la taula 3. Es pot observar una diferència notable entre els valors corresponents a les soques aïllades de compost (Com4, Com12, ...) i les soques aïllades de la tovalloleta biodegradada (Tov7, Tov9, ...). Les tovalloletes incubades amb soques aïllades de la tovalloleta biodegradada no han patit una degradació rellevant. Entre aquestes soques destaca Tov7 amb una degradació de 0,0045g. Les tovalloletes incubades amb les soques aïllades del compost han patit una major pèrdua de massa. Entre aquestes

soques destaquen Com4, Com12 i Com15 amb valors de 0,0113g, 0,008g i 0,0093g respectivament.

La diferència entre els valors obtinguts de degradació de tovalloletes entre soques aïllades de compost i soques aïllades de la tovalloleta degradada era esperada segons l'avaluació prèvia de la terbolesa, color del medi i degradació. Tot i això, als tubs on s'havien incubat les soques Com12 i Com28 no s'havia apreciat terbolesa, però sí degradació aparent. Finalment en el cas de Com12 s'ha obtingut una degradació de 0,008g i en el cas de Com28, s'ha obtingut una degradació de 0,006g.

Les soques que major nivell de terbolesa presenten al tub on són incubades (+++) són Com15 i Com25, per tant, s'esperaria d'elles que estiguessin assimilant el carboni que les proporciona la tovalloleta. La pèrdua de massa de les tovalloletes incubades amb les soques Com15 i Com25 han sigut 0,0093 i 0,003 respectivament. La degradació aparent va ser major en el cas de Com15, per tant concorden els resultats.

Per altra banda, els valors més alts de degradació aparent corresponen a les soques Com4 i Com21. Com4 ha resultat ser la soca amb major capacitat de degradació amb un valor de 0,0113g. Al contrari que Com21, que ha mostrat un resultat de degradació de 0,0027g.

Un dels controls negatius ha patit una petita degradació de 0,0002g. Una possible contaminació va ser descartada mitjançant sembres de cadascun dels tubs en plaques LB agar. Les plaques van ser incubades durant 72h a temperatura ambient i finalment no es va observar cap contaminació. No obstant, no es pot descartar que hagi hagut algun error experimental al procediment.

Resumint, les soques aïllades de compost convencional han mostrat tenir una major capacitat de degradació de tovalloletes que les soques aïllades de una tovalloleta degradada. A més, tres soques tenen una activitat degradadora de tovalloletes destacable, estes són: Com4, Com12 i Com15, pertanyents als gèneres *Streptomyces*, *Pseudomonas* i *Sphingobacterium*, respectivament.

Mostra	Identificació	Pèrdua de massa (g)
Com4	<i>Streptomyces sp.</i> (100,0%)	0,0113 ± 0,0018
Com12	<i>Pseudomonas sp.</i> (99,34%)	0,008 ± 0,0025
Com15	<i>Sphingobacterium sp.</i> (98,77%)	0,0093 ± 0,0012
Com16	<i>Sphingobacterium sp.</i> (99,08%)	0,005 ± 0,0020
Com17	<i>Streptomyces sp.</i> (99,57%)	0,0053 ± 0,0013
Com18	<i>Cellulosimicrobium funkei</i> (98,83%)	0,0045 ± 0,0015
Com21	ND	0,0027 ± 0,0003
Com23	ND	0,0027 ± 0,0003
Com25	<i>Cellulosimicrobium sp.</i> (99,09%)	0,003 ± 0,0000
Com28	<i>Cellulosimicrobium sp.</i> (98,08%)	0,006 ± 0,0006
Control – (1)		0,0002 ± 0,0000
Tov7	<i>Stenotrophomonas sp.</i> (99,30%)	0,0045 ± 0,0008
Tov9	<i>Pseudomonas sp.</i> (99,87%)	0,001 ± 0,0003
Tov15	<i>Rhizobium sp.</i> (99,86%)	0,001 ± 0,0003
Tov16	<i>Microbacterium sp.</i> (99,07%)	0,002 ± 0,0003
Tov25	<i>Sphingobium sp.</i> (100,00%)	0,002 ± 0,0003
Tov27	<i>Pannonibacter phragmitetus sp.</i> (98,94%)	0,001 ± 0,0012
Tov35	<i>Allorhizobium sp.</i> (98,08%)	0,001 ± 0,0000
Tov41	<i>Shinella sp.</i> (99,45%)	0,0006 ± 0,0003
Control – (2)		0,0000 ± 0,0000

Taula 3. Valors de reducció en pes de porcions de tovallola en massa (g) després d'una setmana d'incubació a temperatura ambient i referits al control sense inocular (n=3). A la columna del mig, es troba el resultat de la identificació de la soca amb el percentatge de similitud. Control - (1) fa referència al control negatiu de les soques aïllades de compost, mentre que Control – (2) fa referència al control negatiu de les soques aïllades de la tovallola.

7. CONCLUSIONS

Les cel·lulases microbianes han mostrat tenir aplicacions en camps molt diversos de la indústria. Són els enzims més utilitzats en processos industrials. Aquests, inclouen: producció de biofuel, paper, biotecnologia del menjar i del vi, i indústria tèxtil. També, les cel·lulases s'utilitzen en investigació i desenvolupament, així com en agricultura i medicina.(Menendez *et al.* , 2015)

L'aplicació de cel·lulases, per raons econòmiques i ecològiques, avui en dia és una alternativa molt interessant per al tractament d'aigües residuals. Les cel·lulases són

produïdes per una gran diversitat de microorganismes, però pocs produeixen els nivells suficients per degradar la cel·lulosa cristal·lina de manera extensiva. (Khan *et al.*, 2016) Els resultats d'aquest estudi mostren que soques amb activitat cel·lulasa pertanyents a *Streptomyces*, *Pseudomonas* i *Sphingobacterium* tenen capacitat de degradar les fibres de cel·lulosa que componen les tovalloletes humides en condicions *in vitro*.

Per altra banda, la majoria de soques aïllades de les tovalloletes degradades han mostrat ser *Rhizobium sp*, amb un percentatge de soques a la mostra de 53,33%, seguidament de *Sphingobium sp* amb un 10%, i *Pseudomonas sp*. també amb un 10%. El percentatge de soques del gènere *Rhizobium* a les tovalloletes degradades és destacable, el qual indica que els bacteris d'aquest gènere poden tenir un paper important amb la degradació de tovalloletes. Tot i això, els resultats de degradació de tovalloletes no han sigut significants per a les soques aïllades. Probablement, la causa sigui una baixa eficiència amb la producció de cel·lulases i per tant, amb la hidròlisi de les fibres de cel·lulosa. En el cas de les soques dels gèneres *Streptomyces*, *Pseudomonas* i *Sphingobacterium*, hem pogut determinar i mesurar una activitat degradadora modesta. Per tot això, estudis addicionals són necessaris per concloure que les soques aïllades en aquest estudi són una potencial font de degradació de tovalloletes en aigües residuals, ja que els estudis d'aquest treball han sigut realitzats en condicions *in vitro*.

8. AGRAÏMENTS

Principalment m'agradaria agrair a Manel Porcar, per donar-me la oportunitat de formar part d'aquest complex científic i per la seva ajuda, paciència i voluntat per explicar les coses, ja que sense ell no hagués pogut dur endavant el projecte.

Agrair a Juli Peretó, Esther Molina, Carlos Gomís i Leila Satari per donar-me la oportunitat d'aprendre al seu costat, per donar-me consells i estar disposats a resoldre'm qualsevol dubte que se'm pogués plantejar, així com a tirar-me una maneta quan va fer falta.

Agrair sobretot a Ramón Herrera per estar disposat a ajudar-me dia sí i dia també a i Daniela Gómez per compartir en mi part del treball del laboratori i fer que en conjunt, el treball sigui més fàcil i amè.

Per últim, vull donar les gràcies a Ricardo Cordero per tutoritzar el projecte i ajudar-me en tot el possible.

9. BIBLIOGRAFIA

- Arya, R. et al. (2016) '*Brevibacillus borstelensis* and *Streptomyces albogriseolus* have roles to play in degradation of herbicide, sulfosulfuron', 3 *Biotech*. Springer Berlin Heidelberg, 6(2), pp. 1–7. doi: 10.1007/s13205-016-0562-z.
- Atasağun et al. (2018) 'Advancement in flushable wipes: Modern technologies and characterization', *Journal of Industrial Textiles*. doi: 10.1177/1528083718795910.
- Bala, K. et al. (2010) '*Sphingobium quisquiliarum* sp. nov., a hexachlorocyclohexane (HCH)-degrading bacterium isolated from an HCH-contaminated soil', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(2), pp. 429–433. doi: 10.1099/ijs.0.010868-0.
- Barka, E. A. et al. (2015) 'Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria', *American Society for Microbiology*, 80(1), pp. 1–43. doi: 10.1128/MMBR.00019-15.Address.
- Basta, T. et al. (2005) 'Structural and replicative diversity of large plasmids from sphingomonads that degrade polycyclic aromatic compounds and xenobiotics', *Microbiology*, 151(6), pp. 2025–2037. doi: 10.1099/mic.0.27965-0.
- Bills, G. F. et al. (2019) '*Pseudomonas granadensis* sp. nov., a new bacterial species isolated from the Tejeda, Almijara and Alhama Natural Park, Granada, Spain', (2015), pp. 625–632. doi: 10.1099/ijs.0.069260-0.
- Boraston, A. B. et al. (2004) 'Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition', 781, pp. 769–781.
- Dash, S. et al. (2016) 'Metabolic modeling of clostridia: current developments and

applications', (December 2015), pp. 1–10. doi: 10.1093/femsle/fnw004.

Delport, J. *et al.* (2014) 'Case Report *Cellulosimicrobium cellulans* isolated from a patient with acute renal failure', (May 2019), pp. 1–4. doi: 10.1099/jmmcr.0.000976.

Devi, S. S. *et al.* (2018) 'Isolation and selection of cellulose-degrading microorganisms for utilization along with earthworms in efficient conversion of municipality waste mix to compost', *Current Science*, 114(6), pp. 1261–1274. doi: 10.18520/cs/v114/i06/1261-1274.

Dieppois, G. *et al.* (2015) '*Pseudomonas entomophila* : A Versatile Bacterium with entomopathogenic properties', pp. 25–35. doi: 10.1007/978-94-017-9555-5.

Greenstein, M. and Steinberg, D. A. (1994) 'Mechanistic Studies and Biological Activity of Bioxalomycin % 2 a Novel Antibiotic Produced by *Streptomyces viridodiastaticus*', 38(8), pp. 1808–1812.

Grimaldi, D. *et al.* (2012) 'Necrotizing fasciitis and septic shock related to the uncommon gram-negative pathogen *Sphingobacterium multivorum*', *Journal of Clinical Microbiology*, 50(1), pp. 202–203. doi: 10.1128/JCM.05151-11.

Habituales, T. M. (2016) 'Limpieza que ensucia'.

Huang, S., *et al.* (2012) 'Isolation and Identification of Cellulolytic Bacteria from the Gut of *Holotrichia parallela* Larvae (Coleoptera : Scarabaeidae)', pp. 2563–2577. doi: 10.3390/ijms13032563.

Juturu, V. and Chuan, J. (2014) 'Microbial cellulases : Engineering , production and applications', 33, pp. 188–203. doi: 10.1016/j.rser.2014.01.077.

Kageyama, A., Takahashi, Y. and Satoshi, O. (2006) '*Microbacterium deminutum* sp. nov., *Microbacterium pumilum* sp. nov. and *Microbacterium aoyamense* sp. nov. ', pp. 2113–2117. doi: 10.1099/ijs.0.64236-0.

Kaur, J., Verma, M. and Lal, R. (2011) 'isolated from a hexachlorocyclohexane dump site , and reclassification of *Blastobacter aggregatus* " ller 1986 as *Rhizobium aggregatum* Hirsch and Mu', pp. 1218–1225. doi: 10.1099/ijs.0.017491-0.

Khan, M. N. *et al.* (2016) *Cellulase in Waste Management Applications, New and Future*

Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Elsevier B.V. doi:
10.1016/B978-0-444-63507-5/00021-6.

Kim, D. C. M. R. J. *et al.* (2016) '*Pseudomonas kribbensis* sp. nov., isolated from garden soils in Daejeon, Korea', *Antonie van Leeuwenhoek*. Springer International Publishing. doi: 10.1007/s10482-016-0743-0.

Kim, D. Y. *et al.* (2016) 'Genetic and functional characterization of an extracellular modular GH6 endo- β -1,4-glucanase from an earthworm symbiont, *Cellulosimicrobium funkei* HY-13', *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. Springer International Publishing, 109(1), pp. 1–12. doi: 10.1007/s10482-015-0604-2.

Latorre, A., Moya, A. and Ayala, F. J. (2006) 'Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(22), pp. 8649–8653. doi: 10.1073/pnas.83.22.8649.

Lavire, C. *et al.* (2014) 'Phylogeny of the Rhizobium–Allorhizobium–Agrobacterium clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov.', *Systematic and Applied Microbiology*. Elsevier GmbH., pp. 8–15. doi: 10.1016/j.syapm.2013.12.007.

Li, Y. *et al.* (2014) 'The evolution of the gut microbiota in the giant and the red pandas', *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, pp. 1–7. doi: 10.1038/srep10185.

Liang, Q. and Lloyd-Jones, G. (2010) '*Sphingobium scionense* sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from contaminated sawmill soil', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(2), pp. 413–416. doi: 10.1099/ijs.0.008144-0.

Lin, D. X. *et al.* (2008) '*Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(6), pp. 1409–1413. doi: 10.1099/ijs.0.65723-0.

Liu, Y. *et al.* (2015) '*Rhizobium marinum* sp. nov., a malachitegreen-tolerant bacterium isolated from seawater', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(12), pp. 4449–4454. doi: 10.1099/ijsem.0.000593.

- Long, X. *et al.* (2019) '*Sphingobacterium griseoflavum* sp. nov., isolated from the insect *Teleogryllus occipitalis* living in deserted cropland', (May), pp. 1956–1961. doi: 10.1099/ijsem.0.000970.
- Malherbe, S. and Cloete, T. E. (2002) 'Lignocellulose biodegradation : Fundamentals and applications', pp. 105–114.
- Manfredi, A. P., Perotti, N. I. and Mart, A. (2015) 'Cellulose degrading bacteria isolated from industrial samples and the gut of native insects from Northwest of Argentina', pp. 1384–1393. doi: 10.1002/jobm.201500269.
- Menendez, E., Garcia-fraile, P. and Rivas, R. (2015) 'Biotechnological applications of bacterial cellulases', (September). doi: 10.3934/bioeng.2015.3.163.
- Mitchell, R. (2017) 'Investigations into wastewater composition focusing on nonwoven wet wipes Badanie składu ścieków ze szczególnym uwzględnieniem chusteczek nawilżanych z włókniny', pp. 125–135. doi: 10.4467/2353737XCT.17.010.6107.
- Nkem, B. M. *et al.* (2016) 'Isolation, identification and diesel-oil biodegradation capacities of indigenous hydrocarbon-degrading strains of *Cellulosimicrobium cellulans* and *Acinetobacter baumannii* from tarball at Terengganu beach, Malaysia', *Marine Pollution Bulletin*. Elsevier Ltd, 107(1), pp. 261–268. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.03.060.
- Ocampo-sosa, A. A. *et al.* (2015) 'Isolation of VIM-2-Producing *Pseudomonas monteilii* Clinical Strains Disseminated in a Tertiary Hospital in Northern Spain', 59(2), pp. 1334–1336. doi: 10.1128/AAC.04639-14.
- Ohta, Y. *et al.* (2013) 'isolated from a sucrose-refining factory', pp. 2765–2769. doi: 10.1099/ijs.0.047258-0.
- Osorio-vega, W. (2014) 'Caracterización bioquímica de microorganismos rizosféricos de plantas de vainilla con potencial como biofertilizantes 1', 25(63), pp. 225–241. doi: 10.15517/am.v25i2.15426.
- Palma, H. *et al.* (2017) 'Assessment of microalga biofilms for simultaneous remediation and biofuel generation in mine tailings water', *Bioresource Technology*, 234, pp. 327–335.

doi: 10.1016/j.biortech.2017.03.063.

- Pantoja Munoz, L. *et al.* (2018) 'Characterisation of "flushable" and "non-flushable" commercial wet wipes using microRaman, FTIR spectroscopy and fluorescence microscopy: to flush or not to flush', *Environmental Science and Pollution Research*. Environmental Science and Pollution Research, 25(20), pp. 20268–20279. doi: 10.1007/s11356-018-2400-9.
- Pathak, V. M. and Singh, A. (2016) 'Screening and Characterization of Cellulose Degrading Bacterial Isolates of Waste disposal Site', 5(6), pp. 898–907.
- Peter, W. and Thampan, A. Æ. M. (2009) 'Phenotypic and molecular identification of *Cellulosimicrobium cellulans* isolated from Antarctic snow Phenotypic and molecular identification of *Cellulosimicrobium cellulans* isolated from Antarctic snow', (September). doi: 10.1007/s10482-009-9377-9.
- Prasad, P., Singh, T. and Bedi, S. (2013) 'Characterization of the cellulolytic enzyme produced by *Streptomyces griseorubens* (Accession No. AB184139) isolated from Indian soil', *Journal of King Saud University - Science*. King Saud University, 25(3), pp. 245–250. doi: 10.1016/j.jksus.2013.03.003.
- Ramos, B. *et al.* (2008) 'Rhizobium cellulase CelC2 is essential for primary', 105(19).
- Rani, R. *et al.* (2018) 'Phenolic compounds as antioxidants and chemopreventive drugs from *Streptomyces cellulosae* strain TES17 isolated from rhizosphere of *Camellia sinensis*', *BMC Complementary and Alternative Medicine*. BMC Complementary and Alternative Medicine, 18(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/s12906-018-2154-4.
- Robledo, M. *et al.* (2015) 'Role of Rhizobium Cellulase CelC2 in Host Root Colonization and Infection', 2.
- Ryan, R. P. *et al.* (2009) 'The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*'. Nature Publishing Group, 7(july). doi: 10.1038/nrmicro2163.
- Schumann, P. *et al.* (2001) 'Reclassification of *Cellulomonas cellulans* (Stackebrandt and Kiedde 1986) as *Cellulosimicrobium cellulans* gen. nov., comb. sp.', pp. 1007–1010.
- Sheu, S. *et al.* (2019) '*Rhizobium ipomoeae* sp. nov., isolated from a water convolvulus

field', (2016), pp. 1633–1640. doi: 10.1099/ijsem.0.000875.

Song, J. M. and Wei, D. Z. (2010) 'Production and characterization of cellulases and xylanases of *Cellulosimicrobium cellulans* grown in pretreated and extracted bagasse and minimal nutrient medium M9', *Biomass and Bioenergy*. Elsevier Ltd, 34(12), pp. 1930–1934. doi: 10.1016/j.biombioe.2010.08.010.

Sultanpuram, V. R. *et al.* (2015) '*Cellulosimicrobium aquatile* sp. nov., isolated from Panagal reservoir, Nalgonda, India', *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. Springer International Publishing, 108(6), pp. 1357–1364. doi: 10.1007/s10482-015-0588-y.

Sun, L. H. *et al.* (2015) 'A novel strain of *Cellulosimicrobium funkei* can biologically detoxify aflatoxin B₁ in ducklings', *Microbial Biotechnology*, 8(3), pp. 490–498. doi: 10.1111/1751-7915.12244.

Tozakidis, I. E. P. *et al.* (2016) 'Proof of concept for the simplified breakdown of cellulose by combining *Pseudomonas putida* strains with surface displayed thermophilic endocellulase, exocellulase and β - glucosidase', *Microbial Cell Factories*. BioMed Central, pp. 1–12. doi: 10.1186/s12934-016-0505-8.

USEPA (1998) 'How Wastewater Treatment Works... The Basics', (May), p. 6. Available at: <http://www.epa.gov/npdes/pubs/bastre.pdf>.

Weber, M. *et al.* (2019) '*Stenotrophomonas lactitubi* sp. nov. and *Stenotrophomonas*', (Lmg 10879), pp. 1830–1838. doi: 10.1099/ijsem.0.002732.

Wibberg, D. *et al.* (2016) 'Complete genome sequence of *Streptomyces reticuli*, an efficient degrader of crystalline cellulose', *Journal of Biotechnology*. Elsevier B.V., 222, pp. 13–14. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.02.002.

Yan, Q. X. *et al.* (2010) '*Sphingobium qiguonii* sp. nov., a carbaryl-degrading bacterium isolated from a wastewater treatment system', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(12), pp. 2724–2728. doi: 10.1099/ijs.0.020362-0.

Yoon, J. *et al.* (2007) '*Cellulosimicrobium terreum* sp. nov., isolated from soil', pp. 2493–2497. doi: 10.1099/ijs.0.64889-0.

Yoon, S.-H. *et al.* (2017) 'Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies.', *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(5), pp. 1613–1617. doi: 10.1099/ijsem.0.001755.

Yuan, T. *et al.* (2018) '*Rhizobium wuzhouense* sp. nov., isolated from roots of *Oryza officinalis*', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Microbiology Society, 68(9), pp. 2918–2923. doi: 10.1099/ijsem.0.002921.

10.AUTOAVALUACIÓ

L'estiu passat vaig realitzar el meu període de pràctiques curriculars a una empresa de microbiologia aplicada. Després, vaig decidir que volia aprofundir més sobre aquest camp i que volia realitzar el treball de fi de grau sobre un tema relacionat. Vaig ser acceptada per a dur-lo a terme al grup de Biotecnologia i Biologia Sintètica de l'Institut de Biologia Integrativa de Sistemes (I²SysBio) del Parc Científic de la Universitat de València. A aquest grup treballen realitzant bioprospeccions de diversos tipus d'ambients. Com que aquests darrers anys s'ha fet notable la presència de taponaments al clavegueram de grans ciutats com València que costen milions d'euros de netejar (en març del 2019, 8 milions d'euros per netejar 5.000 tones i encara en gastaran 12 més), em van proposar un treball sobre investigació dels tipus de bacteris podrien degradar les tovalloletes que segons els fabricants, estan compostes totalment de cel·lulosa i es degraden fàcilment a les aigües residuals.

Aquesta estada m'ha permès familiaritzar-me encara més amb el camp de la microbiologia aplicada. He guanyat coneixements sobretot en el camp de la bioremediació, tant des de la base teòrica com des de la experimental. A nivell teòric, he pogut aprofundir en coneixements que havia adquirit en assignatures del grau com Microbiologia o Metabolisme de microorganismes, així com en Tècniques de Bioquímica i Biologia Molecular.

Inicialment, vaig trobar-me amb poques fonts bibliogràfiques sobre biodegradació de tovalloletes. Per tant, vaig trobar una dificultat afegida en l'elecció i disseny dels procediments experimentals. Per altra banda, les biodegradacions no són procediments

ràpids i en el cas del meu treball, probablement un major temps d'incubació hagués proporcionat uns resultats més precisos. No obstant això, he pogut guanyar capacitat crítica d'avaluació de les dades, identificar resultats satisfactoris o no satisfactoris, pensar en les causes que han pogut portar a l'obtenció dels últims i millorar el procediment experimental utilitzat, corregint els meus errors.