



FAGOTERÀPIA COM A ALTERNATIVA AL TRACTAMENT AMB ANTIMICROBIANS

TREBALL DE RECERCA

Cristina Prudkyy Habryley

2n Batxillerat A

Tutoritzat per: Lourdes Farrés Casademont

INS Pla de l'Estany

Banyoles, 4 d'octubre del 2022

“A healthy outside starts from the inside.”

Robert Urich

ABSTRACT

L'abús i el mal ús dels antibiòtics ha afavorit l'aparició de bacteris multiresistents als diferents tipus d'antibiòtics que disposem, i la velocitat en què aquests adquireixen noves resistències és més elevada que la velocitat en la qual en descobrim de nous. No s'és conscient del que representa aquest problema per a la societat. Cada vegada, les persones agafen més infeccions bacterianes i, actualment, no hi ha alternatives als antibiòtics.

Partint d'aquest problema, m'he plantejat elaborar aquest treball de recerca anomenat: *Fagoteràpia com a alternativa al tractament amb antimicrobians*, que, concretament es basa a comprovar l'eficiència i eficàcia dels virus bacterians contra un tipus de bacteri: *Salmonella*. Mitjançant la recerca experimental, vull descobrir si la fagoteràpia, una teràpia fàgica descoberta fa uns segles, es podria tornar a utilitzar per a combatre contra aquestes infeccions bacterianes de bacteris resistents.

Per a poder resoldre el problema plantejat, he dut a terme un seguit de pràctiques treballant amb una soca bacteriana de *Salmonella*, bacteriòfags i antibiòtics. He sembrat dilucions emprant diferents tècniques i analitzat els resultats finals per tal de poder elaborar les conclusions finals d'aquest treball.

Tot el conjunt de pràctiques m'han permès treballar amb els bacteriòfags de manera que com a resultat final, a través de diferents processos, càlculs i gràfiques, he pogut demostrar que els bacteriòfags, i, per tant, la fagoteràpia podria arribar a ser una alternativa als antibiòtics.

El abuso y el mal uso de los antibióticos ha favorecido la aparición de bacterias multirresistentes a los diferentes tipos de antibióticos que disponemos, y la velocidad en la que estos adquieren nuevas resistencias es mayor que la velocidad en la que descubrimos nuevas. No se es consciente de lo que representa este problema para la sociedad. Cada vez, las personas cogen más infecciones bacterianas y, actualmente, no existen alternativas a los antibióticos.

Partiendo de este problema, me he planteado elaborar este trabajo de investigación llamado: *Fagoterapia como alternativa al tratamiento con antimicrobianos*, que, concretamente, se basa en comprobar la eficiencia y eficacia de los virus bacterianos contra un tipo de bacteria: *Salmonella*. Mediante la investigación experimental, quiero descubrir si la fagoterapia, una terapia fágica descubierta hace unos siglos, podría volver a utilizarse para combatir contra estas infecciones bacterianas de bacterias resistentes.

Para poder resolver el problema planteado, he llevado a cabo una serie de prácticas trabajando con una cepa bacteriana de *Salmonella*, bacteriófagos y antibióticos. He sembrado diluciones utilizando diferentes técnicas y analizado los resultados finales para poder elaborar las conclusiones finales de este trabajo.

Todo el conjunto de prácticas me han permitido trabajar con los bacteriófagos, de forma que como resultado final, a través de diferentes procesos, cálculos y gráficas, he podido demostrar que los bacteriófagos, y, por tanto, la fagoterapia podría llegar a ser una alternativa a los antibióticos.

The abuse and misuse of antibiotics has favored the appearance of multiresistant bacteria to the different types of antibiotics that we have, and the speed at which they acquire new resistance is greater than the speed at which we discover new ones. It is not aware of what this problem represents for society. People are getting more and more bacterial infections, and there are currently no alternatives to antibiotics.

Based on this issue, I have considered developing this research work called: *Phagotherapy as an alternative to antimicrobial treatment*, which, specifically, is based on verifying the efficiency and effectiveness of bacterial viruses against a type of bacteria: *Salmonella*. Through experimental research, I want to find out if phagotherapy, a phage therapy discovered a few centuries ago, could be used again to combat these bacterial infections from resistant bacteria.

In order to solve the problem posed, I have carried out a series of practices working with a bacterial strain of *Salmonella*, bacteriophages, and antibiotics. I have seeded dilutions using different techniques and analyzed the final results in order to draw up the final conclusions of this work.

The whole set of practices has allowed me to work with bacteriophages in such a way that as a final result, through different processes, calculations and graphs, I have been able to demonstrate that bacteriophages, and, therefore, phage therapy could become an alternative to the antibiotics.

AGRAÏMENTS

Vull agrair a totes les persones que m'han ajudat a elaborar aquest treball de recerca, ja que sense elles, no hauria estat possible.

En primer lloc, vull donar les gràcies a la meva tutora Lourdes Farrés per tota l'ajuda que m'ha aportat durant tot el treball. Els consells i idees que m'ha anat recomanant, així com l'assessorament que m'ha fet i les seves mostres d'interès en tot moment. Moltes gràcies, Lourdes.

A la Universitat Autònoma de Barcelona per la gran oportunitat que m'han donat i que m'ha permès realitzar la part pràctica en els seus laboratoris de recerca experimental. I a tots els professors que ens han acompanyat durant les estades.

I per últim, a tota la meva família i amics, per escoltar-me, donar-me suport i fer-me costat durant tota la realització del treball. Moltes gràcies.

ÍNDEX:

Introducció	1
MARC TEÒRIC	4
1. Classificació dels microorganismes	4
2. Microorganismes amb organització cel·lular	4
2.1 Procariotes	4
2.1.1 Morfologia	5
2.1.2 Història	5
2.1.3 Creixement	6
2.1.4 Reproducció	8
2.1.5 Estructura	9
2.1.6 Metabolisme	12
2.2 Diversitat bacteriana	13
2.2.1 Eubacteris	13
2.2.2 Arqueobacteris	14
2.3 Eucariotes	14
2.3.1 Protists	15
2.3.2 Fongs	15
3. Microorganismes sense organització cel·lular	15
3.1 Virus	16
3.1.1 Estructura dels virus	16
3.1.2 Cicle dels virus	18
3.1.2.1 Cicle lític	18
3.1.2.2 Cicle lisogènic	19
3.1.3 Retrovirus	19
3.1.4 Tractament i prevenció d'infeccions víriques en humans	20
3.1.5 Aplicacions dels virus	20
3.2 Viroides	20
3.3 Prions	21
4. Antibiótics	21
4.1 Què són?	22
4.2 Mecanismes d'acció	23
4.3 Origen	24

5. Resistència als antibiòtics	25
5.1 Mecanismes de resistència bacteriana	26
5.2 Principals causes de la resistència als antibiòtics	28
5.3 Conseqüències de la resistència als antibiòtics	29
5.4 Mesures a prendre per combatre contra la resistència als antibiòtics	30
6. Fagoteràpia: Alternativa a la utilització d'antibiòtics	30
6.1 Història	31
6.2 Avantatges i inconvenients	32
6.3 Aplicacions	34
PART PRÀCTICA	35
7. Tècniques generals	36
7.1. Tècniques d'esterilització	36
7.2. Preparació de medis de cultiu	37
Fonament	37
Tipus de Medis de cultiu	37
Mètodes de preparació dels medis de cultiu	38
8. Pràctiques generals:	40
8.1. Mètodes de recompte de microorganismes	40
Fonament	40
A- Tècniques de dilució i càlculs	40
B- Recompte directe (mètode de Breed)	41
8.2. Mètodes d'aïllament i de conservació de microorganismes	42
Fonament	42
A- Aïllament per dilució	42
B- Aïllament per esgotament en placa	43
8.3. Metodologies bàsiques del treball amb bacteriòfags	44
PRÀCTICA 1	44
PRÀCTICA 2	46
PRÀCTICA 3	49
PRÀCTICA 4	53
PRÀCTICA 5	55
PRÀCTICA 6	56
PRÀCTICA 7	57
9. Conclusions	62
10. Valoració final	65
11. Bibliografia	66
12. Annex	70

Introducció

Sempre m'ha agradat la biologia, en especial el món microscòpic, més desconegut i invisible. Per aquest motiu, estic estudiant el batxillerat científic. M'agradaria cursar estudis universitaris d'aquesta modalitat. M'apassiona el fet de conèixer detalls del món dels microorganismes perquè ens ajuda a percebre, en tota la seva amplitud i complexitat, la meravella del món que ens envolta.

Per escollir el tema del meu treball de recerca tenia molt clar que estaria relacionat amb la microbiologia. Inicialment, el tema que m'havia proposat girava entorn de les floridures, fongs microscòpics que proliferen en els aliments. Tanmateix, se'm va presentar l'oportunitat de participar en les Estadades Argó de la Universitat Autònoma de Barcelona. Aquestes, em permetien treballar en un laboratori científic de recerca, en el Departament de Genètica i Microbiologia de la UAB. Participar en aquest programa em permetia investigar en aquest món microscòpic que m'apassiona però en aquest cas amb bacteris i virus. De les propostes que em varen oferir, *“La fagoteràpia com a alternativa al tractament amb antimicrobians”* em va semblar una bona opció. Desconeixia en què consistia i era una bona oportunitat per aprendre'n més.

Durant l'estada, se'ns va fer una introducció als conceptes més bàsics de la microbiologia com també a la fagoteràpia. També vàrem conèixer les tècniques més generals de laboratori i vàrem realitzar un conjunt de pràctiques de microbiologia a la mateixa universitat. Algunes d'aquestes les detallo en aquest treball.

He gaudit molt fent aquesta recerca. Poder dur a terme la part pràctica del treball de recerca en un laboratori universitari ha estat tota una experiència.

Problema inicial:

Podria ser la fagoteràpia un tractament vàlid com a alternativa a l'ús d'antibiòtics?

Objectius del treball:

- Distingir les característiques d'alguns grups significatius de microorganismes, especialment bacteris i virus.
- Conèixer els diferents tipus d'antibiòtics, els seus efectes i la resistència als antibiòtics per part dels bacteris.
- Aprendre a elaborar solucions d'antibiòtics, fer titulacions, tincions i filtracions amb bacteriòfags.
- Comparar l'eficàcia i eficiència entre els bacteriòfags i els antibiòtics sobre una colònia bacteriana de *Salmonella*.
- Comprovar si la fagoteràpia podria ser una alternativa eficaç per a combatre infeccions bacterianes i, en un futur, arribar a substituir o complementar l'ús dels antibiòtics.
- Dur a terme el meu treball de recerca en un laboratori de recerca universitari.
- Prendre contacte amb el món universitari i amb el seu sistema de relacions socials i laborals.

Hipòtesis:

Hipòtesi 1: Potser infectant una soca de *Salmonella* amb el bacteriòfag P22 lític, el P22 lisogènic, el SE1 i el λ per separat, aconseguim eliminar-la.

Hipòtesi 2: Potser la soca de *Salmonella* és sensible al tractament amb l'antibiòtic ampicil·lina, amb l'espectinomicina i amb l'estreptomomicina per separat.

Hipòtesi 3: Potser el tractament amb l'antibiòtic ampicil·lina és més eficaç i eficient que el tractament amb els altres dos antibiòtics per separat.

Hipòtesi 4: Potser l'ús del bacteriòfag P22 lític sobre una colònia de *Salmonella* és més efectiu que l'ús dels antibiòtics ampil·lina, espectinomicina i estreptomina per separat.

Metodologia:

El treball de recerca s'estructura en tres parts. La primera part és una introducció teòrica al món dels microorganismes, fent especial èmfasi en els bacteris i virus, els antibiòtics, la seva resistència i la fagoteràpia. A la segona part hi ha una relació de les tècniques i metodologies bàsiques que he utilitzat per poder dur a terme la tercera part més experimental. En aquesta tercera, he aplicat diversos tractaments amb antibiòtics i bacteriòfags per separat a una soca bacteriana concreta. Posteriorment, he fet un recull dels resultats obtinguts i n'he extret unes conclusions.

MARC TEÒRIC

1. Classificació dels microorganismes

Els microorganismes són compartiments vius que interaccionen amb l'entorn i altres cèl·lules de forma dinàmica. Normalment, no es poden veure a ull nu, i, per tant, es necessita l'ajuda d'un microscopi òptic o electrònic per poder veure'ls. En general, els microorganismes es poden referir a qualsevol sistema biològic unicel·lular, tot i que hi ha algun tipus de cèl·lules aïllades que es podrien veure a simple vista, ja que molts microorganismes poden arribar a formar colònies. Pertanyen a tres regnes diferents: Protists, Fongs i Moneres.

Aquests microorganismes es poden trobar a la natura, fins i tot en hàbitats amb condicions extremes de temperatura, humitat o pressió com per exemple: en fons oceànics, en els deserts, en l'Antàrtida...

Els microorganismes poden ser beneficiosos o perjudicials per a altres organismes. Alguns causen malalties, com la grip o la malària. Altres són molt rellevants a la natura, ja que descomponen la matèria orgànica morta. I per últim, alguns són beneficiosos per l'ésser humà, per exemple, els llevats, que participen en la fabricació del pa i la cervesa, o altres que fabriquen medicaments per diverses malalties humanes.

La microbiologia és la ciència encarregada d'estudiar els microorganismes. El primer científic que va estudiar els microorganismes va ser el francès Pasteur al segle XIX. Un dels seus descobriments més rellevants va ser l'elaboració de la primera vacuna contra la ràbia.

2. Microorganismes amb organització cel·lular

Els organismes cel·lulars són aquells organismes que estan formats per cèl·lules, i, per tant, no depenen d'altres organismes per al seu funcionament.

Hi ha dos tipus de microorganismes cel·lulars: els procariotes i els eucariotes.

2.1 Procariotes

Els organismes procariotes són un tipus d'organismes unicel·lulars (formats per una sola cèl·lula) que es caracteritzen per no disposar d'un nucli cel·lular diferenciat, és a dir, el seu material genètic (ADN) no està compactat a l'interior d'una membrana nuclear, sinó que està dispers en una regió del citoplasma anomenada nucleoide. Tampoc contenen orgànuls amb membrana.

Els organismes procariotes es poden classificar en: Eubacteris i Arqueobacteris.

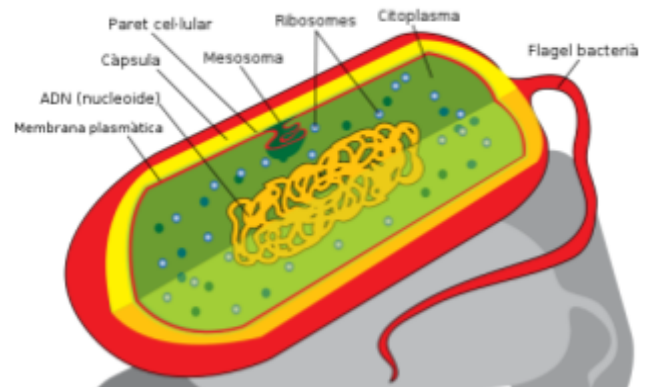


Figura 1: Parts d'un procariota

2.1.1 Morfologia

Els bacteris presenten una gran varietat de mides i formes. Les cèl·lules bacterianes són aproximadament deu vegades més petites que les cèl·lules eucariotes i mesuren entre 0,5-5 micròmetres de llarg.

La majoria de bacteris tenen forma esfèrica, i són anomenats cocs, també poden tenir forma de vara, anomenats bacils. Alguns bacteris en forma de vara, anomenats vibrions, són corbats o amb forma de coma, i altres poden tenir forma d'espiral, anomenats espirils.



Figura 2: Formes dels bacteris

Aquesta gran varietat de formes és determinada per la seva paret cel·lular i el citoesquelet. La forma és molt important pels bacteris perquè pot afectar la seva capacitat d'adquirir nutrients, adherir-se a superfícies, fugir dels seus depredadors i nedar per diferents líquids.

2.1.2 Història

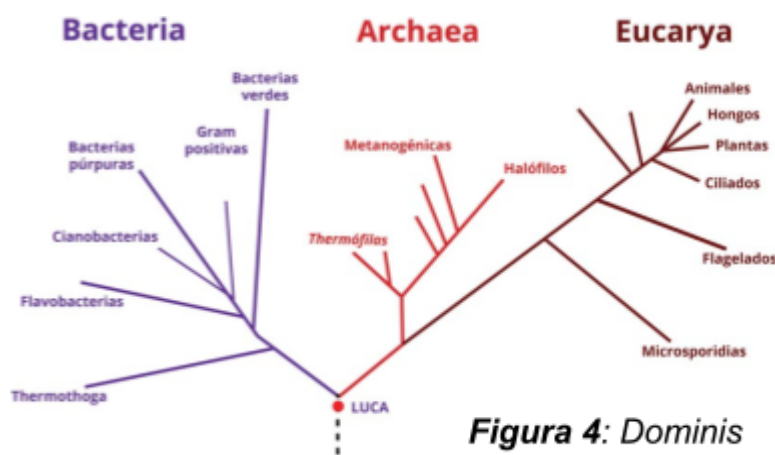
Antony van Leeuwenhoek, un microbiòleg neerlandès, és conegut com a pare de la microbiologia i inventor del microscopi. Va ser el primer a observar al microscopi diversos



Figura 3: Antony van Leeuwenhoek

microorganismes i cèl·lules. L'any 1623 va veure per primer cop els bacteris. No va ser fins a l'any 1828 que Ehrenberg va proposar el terme "bacteri", ja que abans encara no s'utilitzava. Louis Pasteur i Robert Kock van descriure la relació que hi havia entre els bacteris i les malalties, i els va assignar com a possibles microorganismes patògens.

Al principi els bacteris eren considerats fongs microscòpics, però quan van poder estudiar la seva estructura cel·lular, van ser classificats com un grup diferent de la resta d'organismes. El 1938, Herbert Copeland els va agrupar en un regne propi anomenat primer "*Micota*" i després com a "*Monera*".



El 1949, Woese va separar els procariotes en dos grups segons les seves seqüències d'ARN ribosòmic 16S, i els va anomenar els regnes dels "*eubacteris*" i "*arqueobacteris*". Segons Woese cadascun d'aquests grups havia

evolucionat de manera separada i el 1990 ho va confirmar creant un sistema de tres dominis que els va anomenar "*Bacteria, Archaea i Eucarya*".

2.1.3 Creixement

- Taxa de creixement microbià:

El creixement d'una població microbiana s'estudia analitzant la corba de creixement d'un cultiu microbià. Quan els microorganismes es cultiven en un medi líquid, creixen normalment en un cultiu discontinu o sistema tancat, és a dir, s'incuben en un recipient tancat on no s'afegeix més quantitat de medi que la inicial, per tant, les concentracions de nutrients disminuiran i les de residus augmentaran.

Podem representar el creixement de microorganismes que es divideixen per fissió binària com el logaritme del nombre de cèl·lules enfront del temps d'incubació. La corba resultant té les 4 fases diferents.

1- La fase d'adaptació o latència, és una fase prèvia a la divisió cel·lular en la qual els microorganismes estan sintetitzant nous components. Aquesta fase es produeix per diversos motius com per exemple, que les cèl·lules siguin velles i tinguin mancances en ATP, cofactors... substàncies que han de ser sintetitzades abans del creixement. També és important perquè pot ser que aquesta població cel·lular abans vivia en un medi diferent i, per tant, ara ha de sintetitzar nous enzims per metabolitzar els nutrients del nou medi resultant-ne un creixement lent per preparar-se per a un creixement més ràpid. Al final d'aquesta fase les cèl·lules repliquen el seu DNA, augmenten de mida i comencen a dividir-se.

2- La fase logarítmica, que està marcada per un ràpid creixement exponencial. És una fase on els microorganismes creixen i es divideixen fins al màxim possible, en funció del seu potencial genètic, el tipus de medi i les condicions en què creixen. La velocitat de creixement és constant, és a dir, els microorganismes es repliquen en intervals regulars, i la població és més uniforme química i fisiològicament, és per això que els cultius en aquesta fase s'utilitzen per a fer estudis bioquímics i fisiològics.

3- La fase estacionària, que és provocada per la depleció dels nutrients, és una transició d'un creixement ràpid a un estat de resposta a l'estrès. Aquí el creixement de la població cessa i la corba es torna horitzontal. Hi ha una expressió augmentada dels gens implicats en la

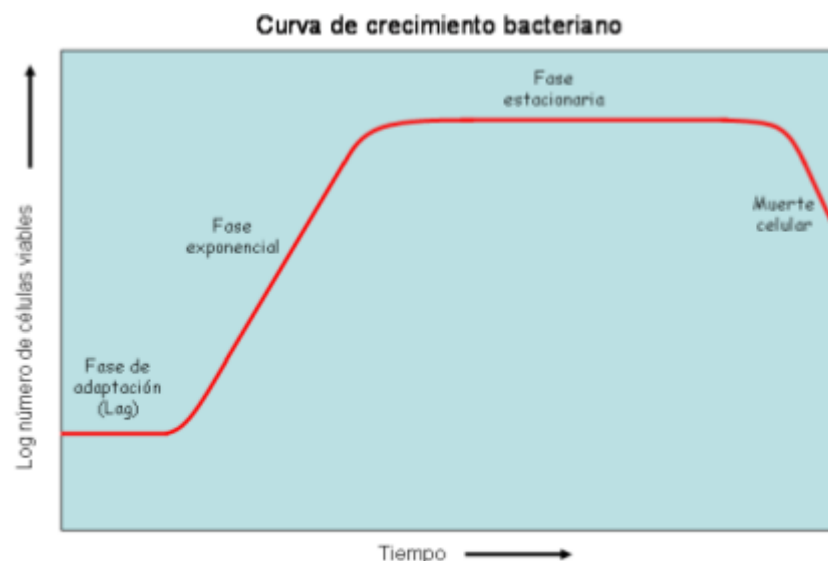


Figura 5: Corba de creixement bacterià

reparació de l'ADN, el metabolisme dels antioxidants i el transport de nutrients. Els bacteris arriben a aquesta fase quan la població és d'unes 10^9 cèl·lules/mL. El nombre de microorganismes viables es manté constant a causa de l'equilibri entre la divisió i la mort cel·lular. S'arriba a aquesta fase per diversos motius com la limitació de nutrients, l'acumulació de productes residuals tòxics...

4- I la fase de mort cel·lular, que és l'última fase on apareixen canvis ambientals perjudicials, com per exemple la privació de nutrients i l'acumulació de residus tòxics, que originen la disminució del nombre de cèl·lules viables, fet que caracteritza la mort. Aquesta fase també és logarítmica, igual que la fase exponencial.

2.1.4 Reproducció

La reproducció dels bacteris és per fissió binària, per tant, és asexual. Creixen i es multipliquen molt ràpidament fins a una mida fixa. En la divisió cel·lular, es produeixen dues cèl·lules filles idèntiques (clòniques). Alguns bacteris, tot i reproduir-se asexualment, formen estructures reproductives més complexes com per exemple la formació de fructificacions per part dels mixobacteris, la formació d'hifes aèries o la gemmació, que és quan una cèl·lula forma una protusió que se separa i forma una altra cèl·lula filla.

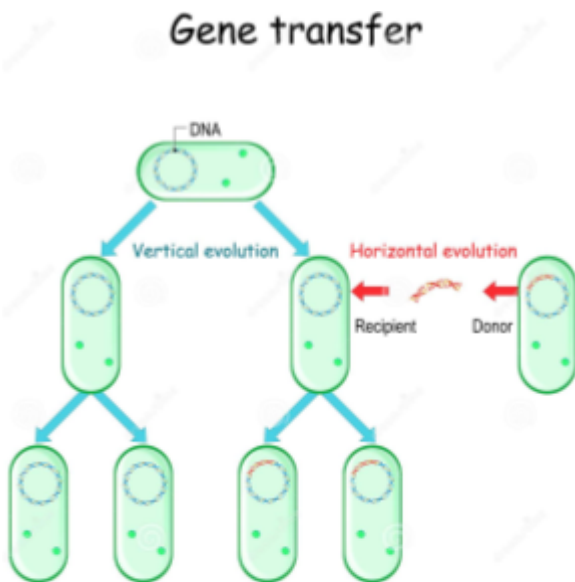


Figura 6: Transferència de gens

La reproducció dels Eubacteris i Archeobacteris és asexual i per fissió binària. També presenten transferència horitzontal de gens, que és el mecanisme a partir del qual tot i tenir reproducció asexual, poden originar diversitat bacteriana. Aquest procés consisteix en el fet que un organisme transfereix el material genètic a una altra cèl·lula que no és descendent. No és replicatiu i forma part dels mecanismes de traspàs horitzontal de gens. Això facilita els canvis ràpids en el genoma procariontic i també la capacitat d'adaptació a nínxols nous.

En canvi, la transferència vertical passa quan un organisme rep el material genètic dels seus ancestres, per exemple dels seus pares o d'una altra espècie de la qual ha evolucionat.

La transferència és un procés que es considera com una causa important en la resistència a fàrmacs. Quan una cèl·lula bacteriana aconsegueix aquesta resistència, pot transferir ràpidament aquests gens a altres espècies. Per exemple, els enterobacteris intercanvien el material genètic a través de l'aparell digestiu en el qual viuen.

Hi ha 3 mecanismes comuns de transferència horitzontal de gens:

- a) Transformació: L'alteració genètica de la cèl·lula resultant per la introducció, absorció i expressió del material genètic d'un altre bacteri (DNA o RNA). Aquest procés és relativament comú en els bacteris, però menys comú en els eucariotes. La transformació normalment s'utilitza per inserir nous gens en bacteris per experiments, o per aplicacions industrials i mèdics.

Mechanisms of horizontal gene transfer

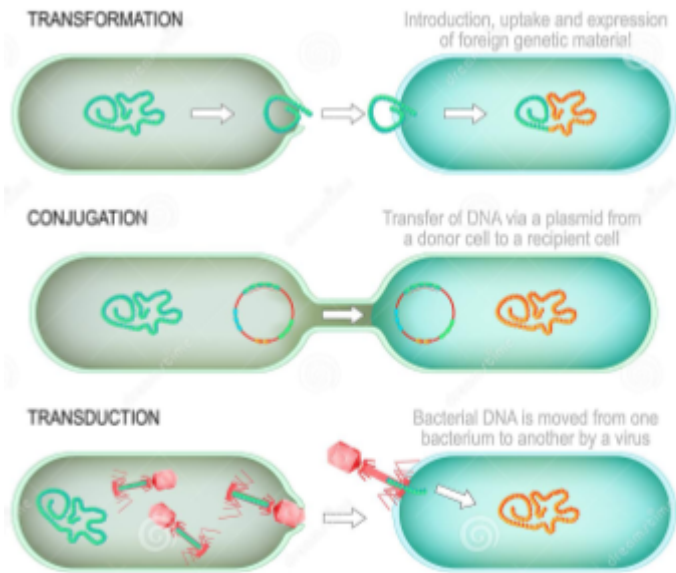


Figura 7: Mecanismes transferència horitzontal de gens

- b) Transducció: El procés pel qual l'ADN d'un bacteri a un altre a través d'un virus bacterià (bacteriòfag).
- c) Conjugació: El procés pel qual una cèl·lula bacteriana viva transfereix el material genètic a través del contacte amb una altra cèl·lula. Es transfereixen plasmidis conjugatius d'un bacteri a un altre per mitjà d'un pèl sexual anomenat pili que els acosta. La transferència no està clar si es produeix a través del canal intern del pèl.

2.1.5 Estructura

ESTRUCTURES INTRACEL·LULARS:

- Membrana cel·lular

La cèl·lula bacteriana està envoltada per una membrana lipídica, o membrana cel·lular que protegeix el que conté la cèl·lula i reté nutrients, proteïnes i altres components essencials del citoplasma dins la cèl·lula. Com que són procarïotes, els bacteris no tenen òrgans limitats per la membrana al citoplasma, i, per tant,

contenen poques estructures intracel·lulars grans. Doncs, no tenen nucli, mitocondris, cloroplasts ni la resta d'òrgànuls presents a les cèl·lules eucariotes, com l'Aparell de Golgi i el Reticle endoplasmàtic (RE).

- Cromosoma bacterià

Els bacteris, com que no tenen un nucli limitat per membranes, tenen el seu material genètic amb forma d'un sol cromosoma normalment circular situat al nucleoide, que conté el cromosoma amb les proteïnes i l'ARN associats.

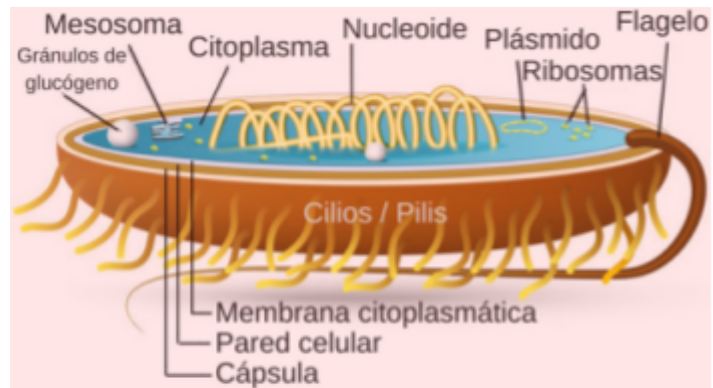


Figura 8: Parts d'un bacteri

També, poden contenir plasmidis,

que són petits fragments d'ADN extracromosòmic circular de doble cadena que pot contenir gens de resistència als antibiòtics o factors de virulència. Aquesta molècula pot existir i replicar-se independentment del cromosoma o estar integrat en el mateix.

- Ribosomes

Els bacteris també tenen ribosomes per poder produir proteïnes, però tenen una forma diferent que de la dels eucariotes i arqueobacteris.

- Inclusions

També hi ha altres estructures que tenen només alguns bacteris, com per exemple les inclusions, que són grànuls de substàncies que actuen com a reserva energètica o com a precursors per a components estructurals i macromoleculares.

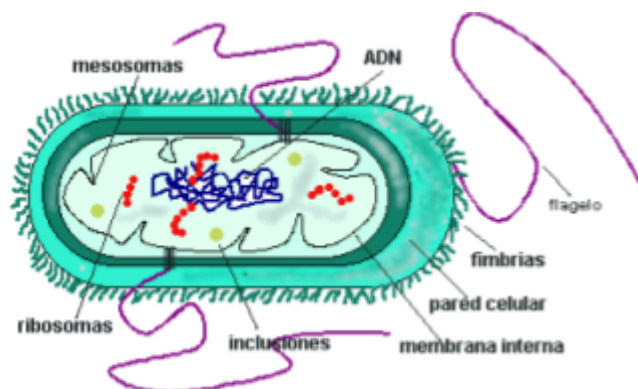


Figura 9: Parts d'un bacteri

- Òrgànuls especials

I els clorosomes, que són vesícules de bacteris fotosintètics amb bacterioclороfil·la.

ESTRUCTURES EXTRACEL·LULARS:

- Paret cel·lular

Els bacteris estan coberts per una paret cel·lular que envolta la membrana cel·lular. Aquesta paret està composta de peptidoglicà també anomenat mureïna, que està constituïda per cadenes de polisacàrids reticulades amb pèptids que contenen D-aminoàcids. La paret cel·lular bacteriana es pot diferenciar de les plantes que es componen de cel·lulosa, i els fongs, que es componen de quitina. També, es diferencia dels arqueobacteris, perquè aquests no contenen peptidoglicà.

Hi ha dos tipus diferents de paret cel·lular bacteriana: les grampositives i les gramnegatives. El seu nom deriva de la reacció de les cèl·lules a la tinció de Gram, una prova que s'utilitza des de fa molt de temps per poder classificar les espècies bacterianes.

Els bacteris grampositius tenen una paret cel·lular espessa amb moltes capes de peptidoglicà i àcids teicoïcs. En canvi, els bacteris

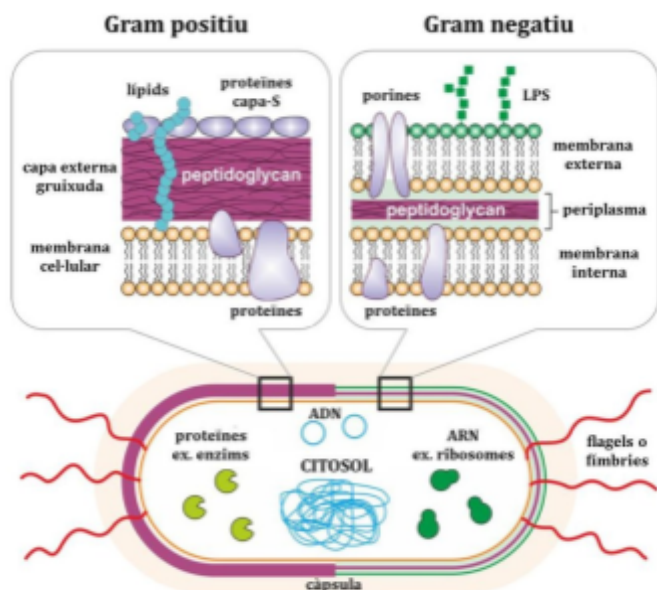


Figura 10: Bacteris grampositius i gramnegatius

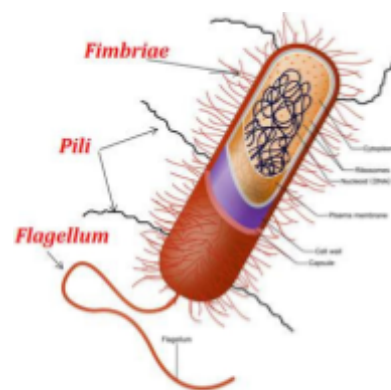
gramnegatius tenen la paret cel·lular molt més prima que es compon d'unes poques capes de peptidoglicà envoltades per una segona membrana lipídica.

Molts bacteris tenen una capa S que cobreix l'exterior de la cèl·lula, formada de molècules proteïques. Aquesta capa proporciona protecció química i física i també pot servir de barrera de difusió macromolecular.

Apèndixs de la superfície cel·lular:

- Flagels

Els flagels són unes estructures proteïques rígides que fan uns 20 nanòmetres de diàmetre fins a 20 micròmetres de llarg. La seva funció ajuda que els bacteris puguin desplaçar-se o adherir-se al medi en



Cell-Surface Appendages of a Bacterial Cell
Figura 11: Parts d'un bacteri

el qual es troben. Els flagels són impulsats per l'energia alliberada per la transferència d'ions al llarg d'un gradient electroquímico a través de la membrana cel·lular. Un bacteri pot tenir un flagel, cap o molts.

- Pèls o fimbries

Els bacteris també tenen fimbries, que són uns filaments fins de proteïna. Fan només 2-10 nanòmetres de diàmetre fins a uns quants micròmetres de llarg. Estan distribuïdes per tota la superfície de la cèl·lula i es creu que estan implicades en l'ancoratge a superfícies sòlides o altres cèl·lules.

- Pili

Els pilis són apèndixs cel·lulars, una mica més grans que les fimbries, que poden transferir o ajudar a transferir el material genètic entre cèl·lules bacterianes en el procés de conjugació.

- Càpsula bacteriana

Molts bacteris produeixen càpsules o capes viscloses que envolten la cèl·lula. Aquestes estructures protegeixen les cèl·lules de ser embolicades per cèl·lules eucariotes, com els macròfags. També poden funcionar com antígens i estar implicades en el reconeixement de cèl·lules, a més de contribuir a l'ancoratge a superfícies i la formació de biofilms.

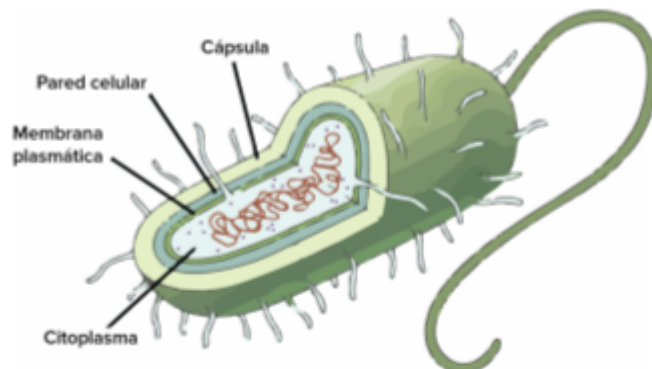


Figura 12: Parts d'un bacteri

2.1.6 Metabolisme

Els bacteris tenen una gran varietat de vies metabòliques. Alguns depenen d'una font de carboni orgànic, i són anomenats heteròtrofs. Altres només requereixen diòxid de carboni, i són anomenats autòtrofs. Si obtenen energia oxidant compostos químics, es diuen quimiòtrofs, mentre que si obtenen energia de la llum gràcies a la fotosíntesi, són autòtrofs. Aquestes dues categories poden combinar-se entre si, i formar per exemple, fotoautòtrofs. Els bacteris també es poden diferenciar segons

l'origen dels equivalents reductors que utilitzen. Aquells que fan servir compostos inorgànics s'anomenen litòtrofs, la resta fan servir compostos orgànics i s'anomenen organòtrofs. El tipus de metabolisme energètic, l'origen dels equivalents reductors usats i la font de carboni poden combinar-se de diferent manera, i poden canviar en un mateix organisme depenent de les condicions externes.

Molts bacteris es poden classificar en tres grups diferents depenent de la seva resposta a l'oxigen:

		FONT D'ENERGIA	
		FOTÒTROFS (Energia del Sol)	QUIMIÒTROFS (Energia Química)
FONT DE CARBONI	AUTÒTROFS (CO ₂)	FOTOAUTÒTROFS <ul style="list-style-type: none"> • Vegetals • Algues • Cianobacteris • Bacteris verds del sofre • Bacteris purpuris del sofre 	QUIMIOAUTÒTROFS <ul style="list-style-type: none"> • Bacteris incolor del sofre • Bacteris del nitrogen • Bacteris de l'hidrogen • Bacteris del ferro
	HETERÒTROFS (Materia Orgànica)	FOTOHETERÒTROFS <ul style="list-style-type: none"> • Bacteris purpuris no del sofre 	QUIMIOHETERÒTROFS <ul style="list-style-type: none"> • Animals • Fongs • Protozous • La majoria dels bacteris

Figura 13: Metabolisme

Els que només poden créixer en presència d'oxigen són els aeròbics, els que només creixen en absència d'oxigen són els anaeròbics i els que es poden desenvolupar tant amb oxigen com no, són els anaeròbics facultatius.

Els bacteris que ocupen ambients considerats extrems per als humans formen els extremòfils.

2.2 Diversitat bacteriana

2.2.1 Eubacteris

Els Eubacteris, també coneguts com a bacteris veritables, són un grup de microorganismes procariotes simples i molt abundants, presents a la majoria d'ecosistemes de la Terra. Poden tenir funcions beneficioses per a la nostra espècie, com perjudicials, provocant malalties i danys orgànics. Es caracteritzen per tenir mureïna a la paret cel·lular, lípids amb àcids grassos no ramificats connectats per enllaços èster en les membranes cel·lulars i ARN polimerases característiques. També, estan formats per una doble capa lipídica amb un interior aquós, conegut com a citosol, on es troba el material genètic de la cèl·lula (en una regió especialitzada coneguda com a nucleoide) i també proteïnes cel·lulars com per exemple, els ribosomes, per poder traduir les proteïnes.

Alguns tipus principals de grups bacterians són:

-Els enterobacteris, que són els bacteris de la flora intestinal dels mamífers. Per exemple l'*Escherichia coli* i la *Salmonella*.

-Les espiroquetes, són bacteris llargs, prims i ondulats que inclou tots els bacteris espirils, com el *Treponema pallidum*, que causa la sífilis.

-Els bacteris fixadors de nitrogen, són els bacteris que poden contribuir en els cicles biogeoquímics. Fixen el nitrogen de l'atmosfera a la terra formant nitrats que són imprescindibles pel metabolisme de les plantes.

-Els bacteris de l'àcid làctic, són els bacteris que fermenten la lactosa i formen àcid làctic com els lactobacils o els bífidus.

-Els bacteris quimioautòtrofs són els bacteris que produeixen matèria orgànica a partir de la inorgànica, utilitzant energia de reaccions químiques.

-I els cianobacteris, són els bacteris que s'encarreguen de fer la fotosíntesi. Són els primers fotosintetitzadors oxigènics coneguts que van aparèixer fa més de 2.000 milions d'anys.

2.2.2 Arqueobacteris

Els Arqueobacteris són un grup de microorganismes procariotes unicel·lulars igual que els Eubacteris, però unes de les principals diferències són que se'ls considera extremòfils perquè podem trobar-los en ambients extrems a escala de salinitat, pH i temperatura. I la seva paret cel·lular és diferent perquè els Eubacteris tenen un polímer anomenat peptidoglicà, en canvi, els Arqueobacteris no el tenen.

2.3 Eucariotes

Els organismes eucariotes són un tipus d'organisme unicel·lular com els protozous o pluricel·lular (formats per més d'una cèl·lula) com els animals, les plantes i els fongs. A diferència de les cèl·lules procariotes, els eucariotes tenen un nucli diferenciat amb el seu material

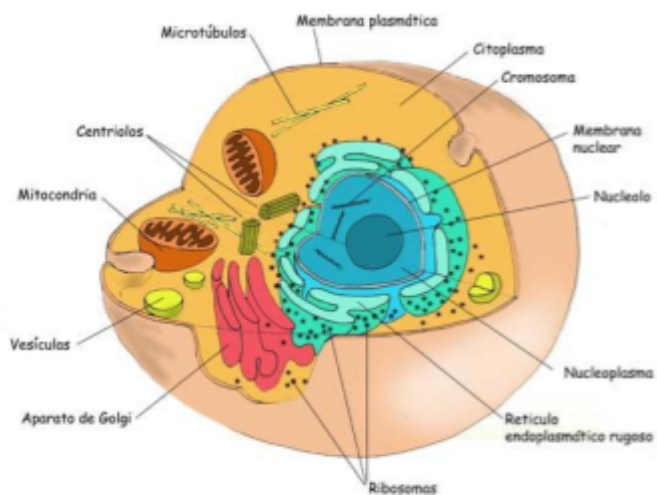


Figura 14: Parts d'una cèl·lula eucariota

genètic dins de l'embolcall nuclear i altres orgànuls tancats dins de les membranes biològiques com els mitocondris o els aparells de Golgi. Les plantes i les algues contenen cloroplasts que permeten realitzar la fotosíntesi. Les cèl·lules eucariotes poden mesurar entre 10-100 micres.

Els microorganismes eucariotes es poden classificar en: Protists (protozous i algues), i Fongs (llevats).

2.3.1 Protists

Els protists són un grup divers d'organismes eucariotes d'estructures molt simples, que inclou els protozous i les algues. Poden ser unicel·lulars, com la majoria, o bé pluricel·lulars sense teixits especialitzats.

Els protists viuen en qualsevol medi que contingui aigua en estat líquid. Molts protists (algues) són fotosintètics i productors primaris essencials dels ecosistemes com ara les algues. A l'oceà, per exemple, els protists formen part del plàncton. Altres protists, en aquest cas protozous com els cinetoplàstids i els apicomplexos, són la causa de les diverses malalties humanes greus, com la malària i la malaltia del son.

2.3.2 Fongs

Els fongs són un regne d'organismes de cèl·lules eucariotes, de digestió externa que inclou tant organismes unicel·lulars, com els llevats i les floridures, com pluricel·lulars, els quals produeixen un cos fructífer conegut com a bolet.

Alguns exemples de fongs són els llevats, les floridures i els bolets. La majoria no es poden veure a ull nu, i viuen al sòl, en la matèria morta, i com a simbionts de plantes, animals o altres fongs. Són molt importants als ecosistemes, ja que descomponen la matèria orgànica i són indispensables en els cicles i intercanvis dels nutrients.

3. Microorganismes sense organització cel·lular

Els organismes acel·lulars són aquells organismes que no estan formats per cèl·lules, i, per tant, depenen d'altres organismes pel seu funcionament. No se'ls consideren organismes vius, perquè no fan les tres funcions vitals de nutrició, relació, i reproducció. Utilitzen la maquinària de la cèl·lula que han infectat, de l'hoste. Doncs, els virus, viroides i prions són considerats microorganismes sense organització cel·lular.

3.1 Virus

El virus és un agent infeccios submicroscòpic que pot mesurar entre 0,01-0,3 micres i menors. Només es pot replicar a l'interior de les cèl·lules d'organismes hoste. Els virus poden infectar qualsevol ésser viu, fins i tot els microorganismes com els bacteris i els arqueobacteris. Els virus es poden trobar en molts ecosistemes del planeta i són l'entitat biològica més nombrosa de la Terra. Es creu que hi ha més virus a la Terra que estrelles a l'univers. Es calcula que existeixen 10^{31} virus poblant a la Terra. L'origen dels virus és incert,

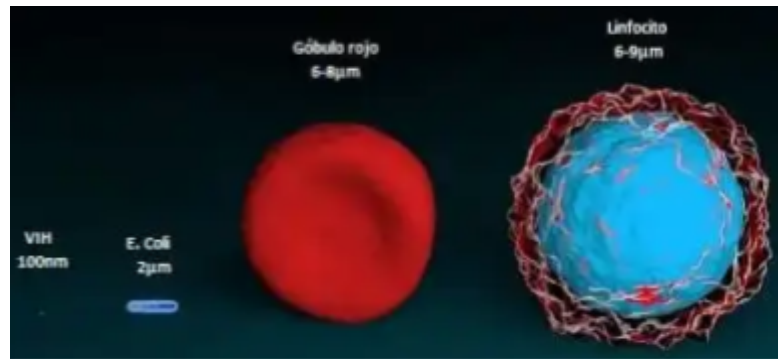


Figura 15: Comparació de mides

però hi ha diferents teories

que l'expliquen: la teoria regressiva, la teoria de l'origen cel·lular i la teoria basada en un món prebiòtic d'ARN.

Els virions de la majoria de les espècies no es poden veure amb un microscopi òptic, sinó que es necessita un microscopi electrònic, ja que són cent vegades més petits que la majoria de bacteris.

3.1.1 Estructura dels virus

Els virus estan formats per un àcid nucleic que està envoltat per una càpsida proteica i de vegades per una coberta membranosa. No es poden reproduir per ells mateixos, per tant, han d'infectar cèl·lules. Tampoc tenen metabolisme propi i necessiten els enzims d'altres organismes. I no tenen moviment propi, fan un desplaçament passiu en fluids.

Els virus són paràsits obligats de cèl·lules. Per poder reproduir-se s'han d'adherir a la superfície de les cèl·lules hoste per introduir el seu genoma víric. Dins la cèl·lula, el genoma víric utilitza la matèria, l'energia i la maquinària enzimàtica de la cèl·lula hoste

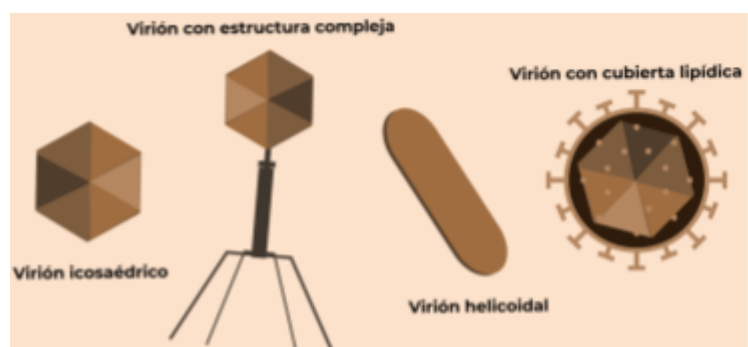


Figura 16: Estructura dels virus

per destruir l'ADN cel·lular, replicar el seu propi material genètic i dirigir la síntesi de les proteïnes que formaran les cobertes dels nous virus.

Els virus s'estructuren en tres parts:

1- El genoma víric, que es compon d'una o més molècules de DNA i/o RNA de cadena oberta o circular, monocatenària o bicatenària.

2- La càpsida o coberta proteica, que envolta el genoma víric i la seva funció és protegir el material genètic i reconèixer els receptors de membrana de la cèl·lula hoste. Aquesta càpsida està formada per proteïnes globulars o capsòmers disposats de forma regular i simètrica. I pot ser de diversos tipus: icosaèdrica, amb una càpsida

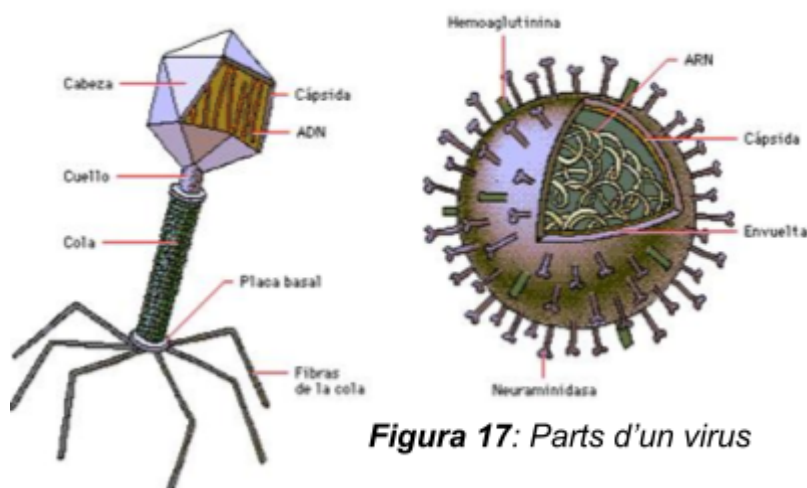


Figura 17: Parts d'un virus

formada per un icosaedre, com per exemple, l'*Adenovirus*. També pot ser de tipus helicoidal, amb una càpsida de forma allargada, com el virus de la ràbia. I per últim pot ser complexa, on es pot distingir el cap, la cua, i el sistema d'encolatge, com

els bacteriòfags. Quan el virus només té la càpsida i el genoma víric, se l'anomena nucleocàpsida.

3- Alguns poden tenir també una coberta membranosa que envolta la nucleocàpsida d'alguns virus com el de la grip, la verola, la sida... Aquesta coberta es compon d'una bicapa lipídica procedent de les cèl·lules hoste parasitades i de glicoproteïnes, la síntesi de les quals està controlada pel genoma víric. La funció de les glicoproteïnes és el reconeixement de la cèl·lula hoste i permetre la introducció del genoma víric per fagocitosi.

Els virus es poden classificar de diferents maneres:

-Segons l'hoste que parasiten: Virus bacterians, virus d'animals, virus de vegetals, virus de fongs o virus de virus.

-Segons el tipus de material genètic que té: ADN, ARN o combinat. Monocatenari, bicatenari o amb combinació. Circular, lineal o fragmentat.

-Segons la forma de la seva càpsida: icosaèdrica, helicoidal, complexa, lipídica o membranosa.

3.1.2 Cicle dels virus

Els virus tenen dos tipus principals de cicles reproductius: el cicle lític i el cicle lisogènic. Tots dos cicles coincideixen en les següents fases:

- 1-Fixació, adsorció o adhesió
- 2-Penetració
- 3-Alliberament o despullament de l'àcid nucleic
- 4-Replicació del genoma víric i síntesi de nous capsòmers (fase d'eclipsi)
- 5-Acoblament dels nous virus
- 6-Lisi o alliberament

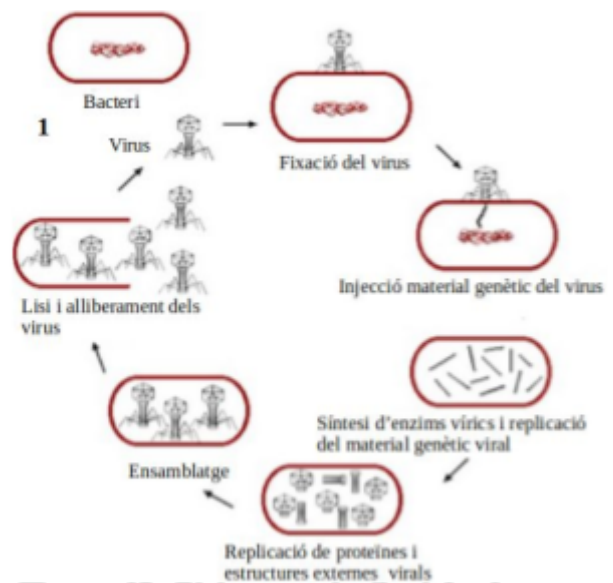


Figura 18: Cicle reproductiu dels virus

3.1.2.1 Cicle lític

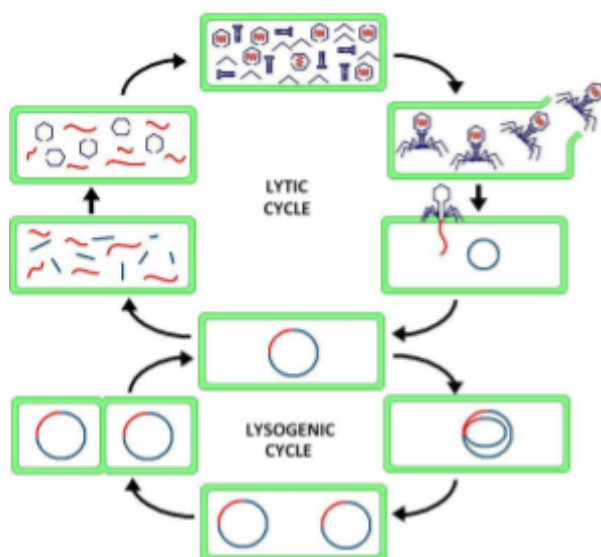


Figura 19: Cicle lític

El cicle lític és un dels cicles de reproducció dels virus. Aquest cicle dona com a resultat la destrucció de les cèl·lules i la seva membrana. En el cicle lític, l'ADN víric existeix separat com a molècula dins la cèl·lula bacteriana i es replica i transcriu separadament de l'ADN bacterià de l'hoste per fer-ne còpies. Aquest cicle fa que la infecció sigui ràpida. Els virus que fan aquest cicle són anomenats virus virulents.

3.1.2.2 Cicle lisogènic

El cicle lisogènic és el segon cicle de reproducció dels virus. Aquest cicle es caracteritza per la integració de l'àcid nucleic del virus dins del genoma de la cèl·lula hoste o la formació d'una regió d'ARN o ADN que es replica en el citoplasma del bacteri. La cèl·lula infectada es podrà continuar reproduint de manera normal, i el material genètic del virus, anomenat profag (en cas de bacteriòfags) o provirus (en la resta de virus), es podrà transmetre a les cèl·lules filles de cada divisió cel·lular i un esdeveniment posterior pot alliberar-la, causant la proliferació de nous fags a través

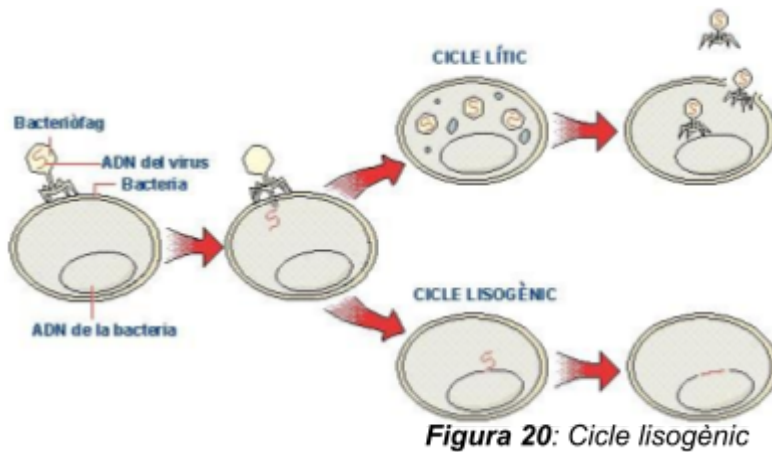


Figura 20: Cicle lisogènic

del cicle lític. Els cicles lisogènics es poden donar també en eucariotes encara que el sistema d'incorporació de l'ADN no estigui completament dilucidat, però són més difícils de detectar.

3.1.3 Retrovirus

Els retrovirus són virus d'RNA que infecten cèl·lules animals i que tenen cicles reproductius més complicats. Els retrovirus són una família de virus amb RNA monocatenari amb un enzim anomenat transcriptasa inversa (retrotranscriptasa), que és capaç de transcriure l'RNA a DNA, un procés oposat al que es dona normalment. Un exemple de retrovirus és el VIH o virus de la immunodeficiència humana. Aquest retrovirus és el causant de la sida (síndrome

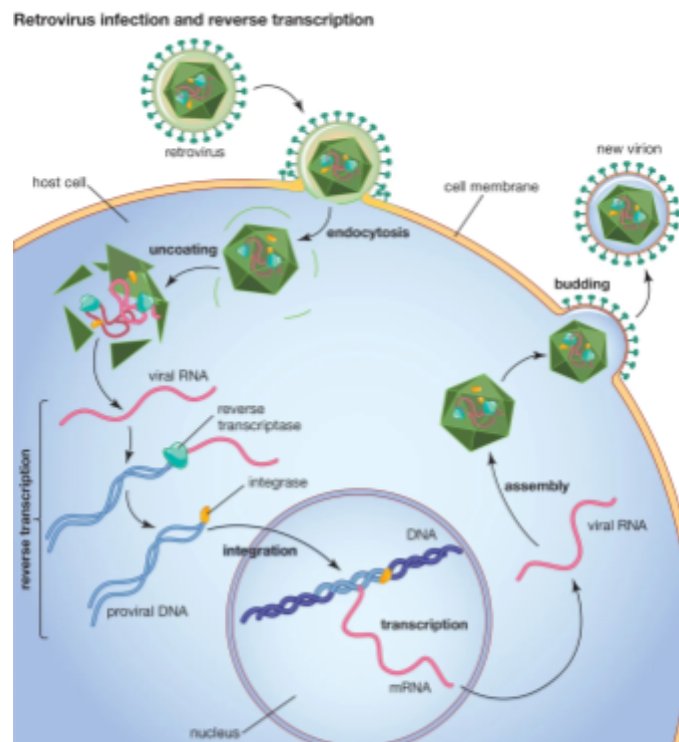


Figura 21: Infecció d'un retrovirus

d'immunodeficiència adquirida). L'ADN dels retrovirus endògens, són els que es poden integrar dins el genoma de la cèl·lula fins a molt de temps.

3.1.4 Tractament i prevenció d'infeccions víriques en humans

Els diferents tipus de tractaments d'infeccions víriques són les vacunes, els antivirals, que sovint són anàlegs de nucleòsids, la higiene i les quarantenes. Però hi ha diferents obstacles com les mutacions dels virus, sobretot virus ARN i molts errors d'RNA polimerasa. També els rumors contra les vacunes, el cost del disseny i el seu estudi, els reservoris virals...

3.1.5 Aplicacions dels virus

Algunes de les aplicacions del virus són de vectors en teràpia gènica o enginyeria genètica, en la prevenció i control de càncers, en el control de plagues biològiques i patògens, en la producció de vacunes, en l'evolució de les espècies, ja que causen reordenacions al DNA com els retrovirus endògens, i també s'estan començant a utilitzar en la fagoteràpia.

3.2 Viroides

Els viroides són petites molècules d'RNA, amb pocs centenars de nucleòtids, circulars i monocatenàries, que no estan protegides per cap classe de coberta i que infecten a les cèl·lules vegetals (hoste). Els viroides entorpeixen la síntesi proteica en plantes amb l'RNA interferència. L'entitat infectiva dels viroides és la menys coneguda.

Encara que funcionin de manera similar als virus, es diferencien per la manca de lípids i de proteïnes. Són extremadament resistents, i toleren la calor i la radiació ultraviolada gràcies al compacte plegament del seu RNA.

Els viroides són els causants d'algunes malalties com el cadang-cadang del coco i l'exocortis dels cítrics.



Figura 22: Malalties provocades per viroides

3.3 Prions

Els prions són proteïnes infeccioses causants de diverses malalties degeneratives del cervell en diferents espècies animals: tremolor ovina de les ovelles, encefalopatia espongiforme bovina (malaltia de les vaques boges), síndrome de Creutzfeldt-Jakob (en éssers humans). Probablement, es

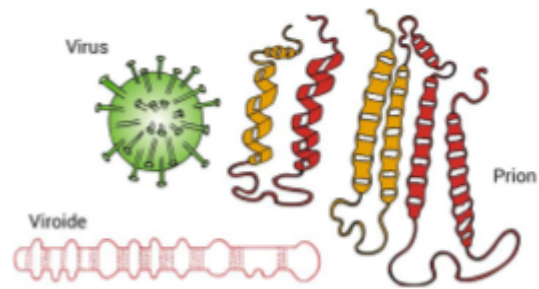


Figura 23: Virus, viroides i prions

transmeten pel consum de carn d'animals infectats. Els prions són agents infecciosos d'acció molt lenta, això fa que el període d'incubació fins que apareixen els primers símptomes sigui d'uns deu anys. Els prions són indestructibles, per tant, són resistents a tractaments físics i químics, i no es destrueixen ni es desactiven per la calor a temperatures de cocció normals. Per ara, no es coneix cap tractament per

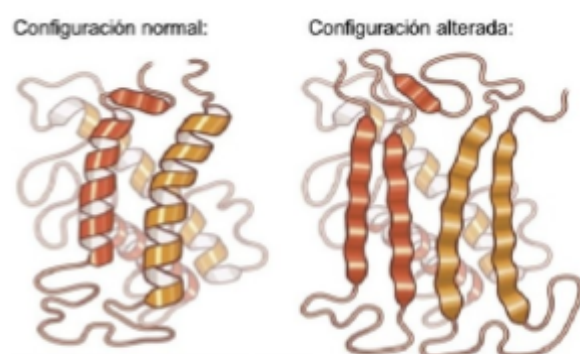


Figura 24: Prions

Són formes mal plegades de proteïnes normals presents en les cèl·lules del cervell. Quan el prió penetra en una cèl·lula que conté la forma normal de la proteïna, la transforma en prió, desencadenant-se una reacció en cadena que fa que es formin agregats de prions causants del mal funcionament cel·lular i la degeneració del cervell.

4. Antibiótics

La paraula antibiòtic prové del grec *anti*, que significa contra i *biotikós*, que es tradueix com de la vida o dels éssers vius. Per motius històrics, el terme antibiòtic ha canviat el seu significat i actualment es fa servir com a sinònim tant d'antimicrobià com d'antibacterià.

Per tant, un antibiòtic és una substància química capaç, a baixes concentracions, d'inhibir el creixement d'altres microorganismes o d'eliminar-los.

4.1 Què són?

Els antibiòtics són substàncies químiques (fàrmacs) de composició molt variada produïdes en el metabolisme d'alguns bacteris i fongs, però que tenen un efecte sobre alguna part vital d'altres organismes, especialment bacteris. Els antibiòtics serveixen per combatre infeccions causades per bacteris, matant o impedit el creixement i la reproducció dels microorganismes.

Existeixen diverses classes d'antibiòtics i antieubacterians sintètics d'ús comú avui dia. Els antibiòtics poden ser classificats en bactericides o bacteriostàtics, depenent si el fàrmac directament causa la mort de l'eubacteri (en cas que produeixi la mort mitjançant la destrucció de la seva membrana, és a dir, provocant-ne la lisi, s'anomenarà bacteriolític), o si només inhibeix la seva replicació, respectivament. A la pràctica, aquesta classificació es basa en el comportament de l'antibiòtic en el laboratori i en ambdós casos es pot posar fi a una infecció.

Segons la relació que hi ha entre l'activitat i la concentració, els antibiòtics poden classificar-se en tres categories:

- Acció bactericida poc relacionada amb la concentració: beta-lactàmics i glicopèptids.
- Acció bactericida que depèn de la concentració: aminoglicòsids i fluoroquinolones.
- Els que es comporten com a bacteriostàtics: macròlids, tetraciclins i cloramfenicol.

Hi ha molts antibiòtics d'origen natural als regnes animal i vegetal, com per exemple:

- Regne animal (en els humans): calostro, saliva, llàgrimes, mucositats de les vies respiratòries.
- Regne animal (en altres animals): la saliva dels gossos, les pues d'algunes espècies de porcs espins, la sang dels al·ligàtors, la pell dels hipopòtams, la mel de les abelles...
- Regne vegetal: vegetals freqüents com l'all, la ceba, la llimona... i les plantes medicinals com l'absenta, l'arbre del te, l'asafètida, l'espernallac, la farigola...

4.2 Mecanismes d'acció

Els antibiòtics poden tenir diferents mecanismes d'acció, però els més importants són:

-Inhibició de la paret bacteriana: La paret cel·lular dels bacteris és una estructura específica dels bacteris i una diana pels antibiòtics. Els fàrmacs actuen per aquest mecanisme i bloquegen la síntesi del peptidoglicà, el component principal de la paret cel·lular, deixant la cèl·lula desprotegida de la pressió interna generada per les concentracions, molt més altes en l'interior, de proteïnes i altres molècules que es troben dins de la cèl·lula. Aquesta pressió produeix la lisi. Els bacteris que no tenen aquesta estructura, anomenats *Mycoplasma*, són resistent de forma natural a aquests medicaments, com per exemple els β -lactàmics (penicil·lines, cefalosporines, carbapenems...)



Figura 25: Mecanismos d'acció

-Alteració de la membrana plasmàtica: Hi ha alguns fàrmacs que inhibeixen el creixement bacterià perquè danyen els components de la membrana plasmàtica, destruint la seva permeabilitat selectiva i permetent l'entrada i sortida de molècules vitals sense control. Hi ha moltes maneres d'alterar l'estabilitat de la membrana plasmàtica, per exemple, destruint els fosfolípids. Alguns exemples serien la polimixina B i daptomicina.

-Inhibició de la síntesi de proteïnes: Els antibiòtics que interfereixen en la síntesi de proteïnes actuen contra els ribosomes procariotes. La diferència entre els ribosomes procariotes 70S i els ribosomes eucariotes 80S és la base de la toxicitat selectiva d'aquests antibiòtics. A causa d'aquesta diferència, els antibiòtics són capaços de diferenciar entre els ribosomes procariotes i els eucariotes i no perjudiquen les cèl·lules de l'hoste. Alguns exemples en serien els aminoglicòsids, tetraciclines i l'eritromicina.

-Inhibició del metabolisme dels àcids nucleics: La síntesi d'àcids nucleics és necessària en tots els organismes, doncs, la toxicitat selectiva d'aquests antibiòtics és força limitada. Malgrat això, hi ha enzims essencials, les topoisomereses 7 (girasa) i les polimerases 8, que són diferents entre organismes procariotes i eucariotes. Com a resultat, els antibiòtics d'aquest grup ataquen aquestes estructures específiques. Per exemple les quinolones, tetraciclines i rifampicina.

-Inhibició de la síntesi d'àcid fòlic: Vitamina necessària per a la síntesi de purines (àcids nucleics) i alguns aminoàcids. Els humans no el podem sintetitzar, per tant, cal incorporar-lo en la dieta. Per això els antibiòtics que n'inhibeixen la síntesi en bacteris no tenen cap efecte en humans. Per exemple les sulfamides.

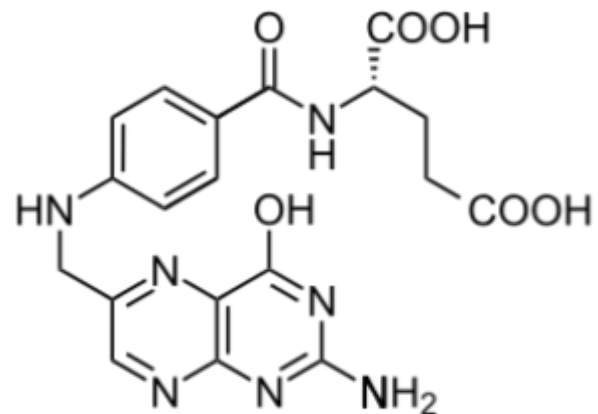


Figura 26: Àcid fòlic

4.3 Origen

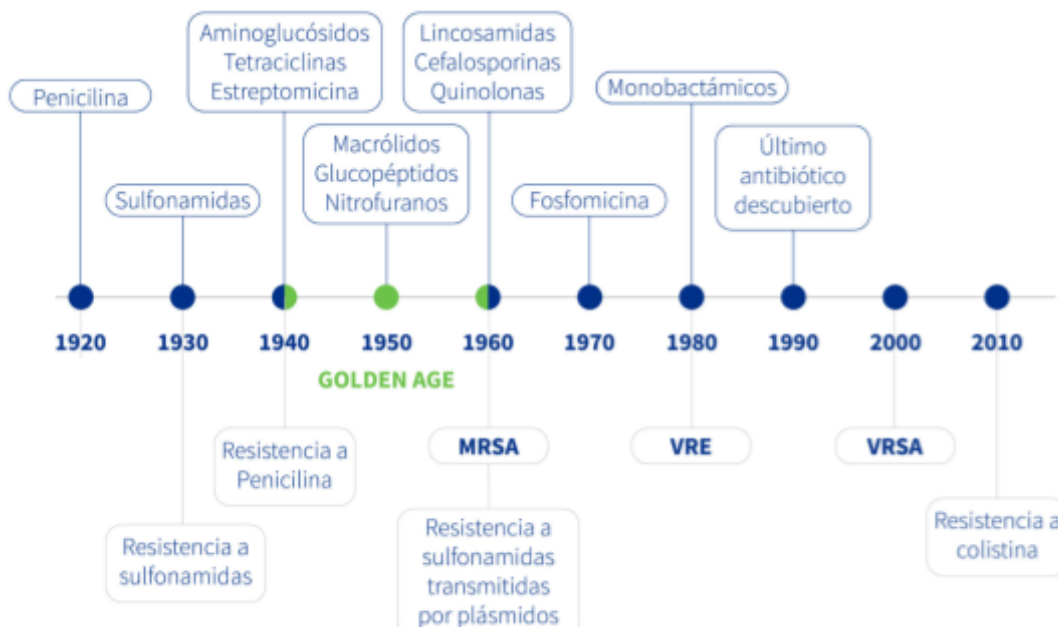


Figura 27: Cronologia dels antibiòtics

El primer antibiòtic descobert per l'home va ser la penicil·lina. El 1928 Alexander Fleming estava cultivant el bacteri *Staphylococcus aureus* en un plat d'Agar, el qual va ser contaminat per fongs accidentalment. En observar-lo, va advertir que en el medi de cultiu al voltant de la floridura no hi havia la presència d'eubacteris. Anteriorment, havia treballat en les propietats antieubacterianes del lisozim, un enzim que danya les cèl·lules bacterianes, i per això va interpretar de manera correcta del que va veure: que el fong estava segregant alguna cosa que inhibia el creixement del bacteri. Encara que no va poder purificar el material obtingut, va informar del descobriment en la literatura científica. Pel fet que el fong era del gènere *Penicillium*, va denominar al producte penicil·lina.

A causa de la necessitat de tractar les infeccions provocades per ferides durant la II Guerra Mundial, es van invertir molts recursos a investigar i purificar la penicil·lina, i un equip liderat per Howard Florey va tenir èxit a produir grans quantitats del principi actiu pur. Molt aviat es va generalitzar l'ús dels antibiòtics.



Figura 28: Penicil·lina

Durant els descobriments de nous antibiòtics, han anat apareixent resistències per part dels microbis patògens, com per exemple les β -lactamases. Això obliga a la recerca constant de noves formes antibiòtiques. Aviat es va començar a fer síntesi química d'antibiòtics, fent modificacions a les estructures naturals conegudes. Actualment, davant la gran quantitat de resistències, es tendeix a buscar noves espècies bacterianes que tinguin noves formes d'antibiòtics no coneguts.

5. Resistència als antibiòtics

La resistència als antibiòtics és la capacitat d'un microorganisme (bacteri) de resistir els efectes d'un antibiòtic. Hi ha bacteris naturalment resistents a determinats antibiòtics, mentre que d'altres adquireixen resistència mitjançant mutacions en alguns dels seus gens després de l'exposició a un antibiòtic. L'antibiòtic, en entrar en contacte amb una població bacteriana, permet només la proliferació d'aquells bacteris que presenten aquella

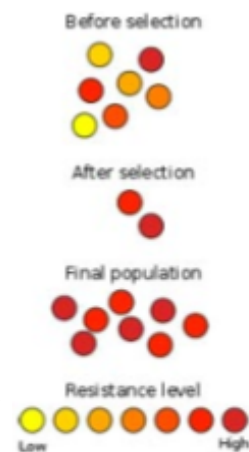
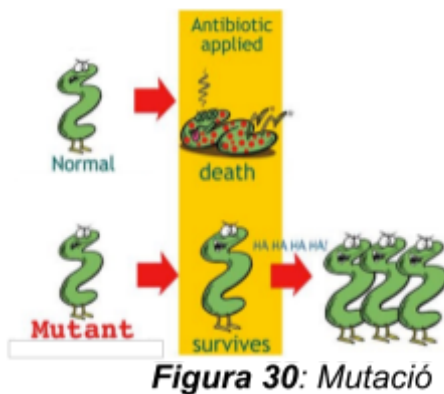


Figura 29:
Resistència antibiòtica

mutació natural que anul·la l'acció de l'antibiòtic. Un cop es genera la informació genètica, els bacteris poden transmetre els nous gens a través de transferència horitzontal (entre individus) per intercanvi de plasmidis; o igualment producte d'una conversió lisogènica.

Si un bacteri porta diversos gens de resistència, se l'anomena multiresistent o, informalment, superbacteri.

Les mutacions i la transferència horitzontal de gens són propietats universals dels bacteris que han passat durant milions d'anys com a part de l'evolució. La freqüència de mutacions que originen resistència a antibiòtics varia segons l'antibiòtic i el bacteri. Aquestes mutacions es donen amb més freqüència en bacteris deficients al sistema de reparació de l'ADN (hipermutadores).



El primer pas és que alguns dels gens de resistència de bacteris ambientals o d'altres bacteris, anomenats resistoma, puguin passar a través d'elements genètics eficaços i dels mecanismes habituals de transferència genètica, principalment conjugació, però també transformació i transducció, a bacteris hostes i patògenes d'humans i animals.

La resistència als antibiòtics és un problema de salut pública mundial, i la seva gravetat creix any rere any. El 2013 es van produir almenys set-centes mil morts atribuïbles a organismes antibiòtic-resistents (de les quals vint-i-tres mil van ser als EUA), el 2019 1,27 milions i s'espera que per al 2050 la xifra hagi augmentat a deu milions a l'any, superant el nombre de morts per càncer.

5.1 Mecanismes de resistència bacteriana

La resistència antibacteriana és un problema continu i que va en augment. Es fa encara més gran quan un microorganisme presenta més d'un mecanisme de resistència i quan té la facultat de transmetre'l, no només a la seva descendència, sinó també a altres bacteris de la seva mateixa o diferent espècie.

Els fenòmens de resistència antibacteriana són variats, destacant entre ells quatre mecanismes principals:

1. Enzims hidrolítics:

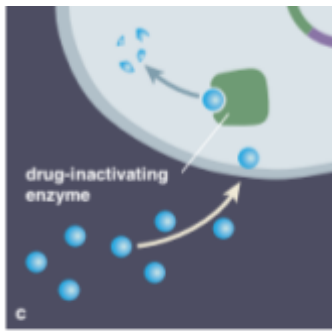


Figura 31: Enzims hidrolítics

Els bacteris sintetitzen enzims que hidrolitzen l'antibacteriana, destruint la seva acció antibacteriana, sense tenir possibilitat d'actuar sobre el microorganisme.

β -lactamases: són enzims que hidrolitzen la unió peptídica endocíclica de l'anell β -lactàmic. La producció de β -lactamases és el mecanisme més freqüent de resistència antibiòtica.

2. Modificació del centre actiu:

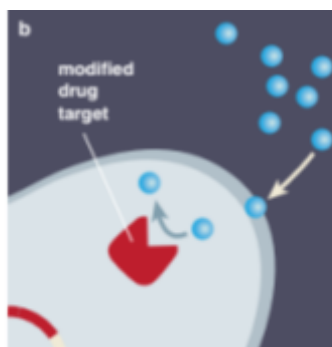


Figura 32: Modificació centre actiu

La modificació d'un aminoàcid genera un blanc diferent i disminueix així l'afinitat d'unió per l'antimicrobià.

Modificació de PBP: El PBP (penicillin-binding-protein) és un complex enzimàtic que permet la síntesi del peptidoglicà, un compost de la paret cel·lular en bacteris, principalment en grampositius, si es produeix mutació del lloc d'unió a l'antimicrobià com els β -lactàmics, aquests no poden actuar i es genera resistència a ells.

Modificació ribosomal: Els gens *erm A* i *erm B* produeixen modificació del lloc actiu del ribosoma, mitjançant metilació. Aquest mecanisme és important en la resistència als macròlids (grup de medicaments, típicament d'antibiòtics, l'activitat dels quals està produïda per un anell macròlid), en *S. pneumoniae* i en *S. pyogenes*.

3. Disminució de la permeabilitat de la paret cel·lular a l'ingrés de l'antimicrobià:

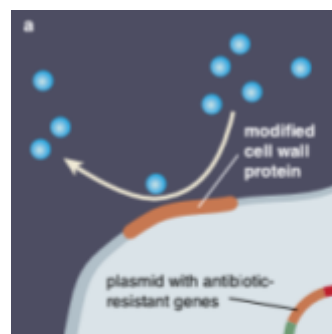


Figura 33: Disminució de la permeabilitat de la paret cel·lular

Canvis al diàmetre i/o nombre de porines (proteïnes que travessen una membrana cel·lular), poden bloquejar l'ingrés de l'antibacteriana al bacteri.

Porines: Existeix una disminució de l'expressió de porines que disminueix la susceptibilitat a betalactàmics i fluoroquinolones en *Pseudomonas*.

4. Bombes d'eflux:

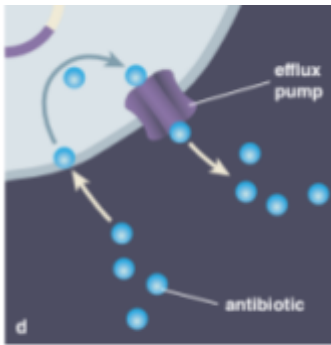


Figura 34: Bombes d'eflux

Transporta l'antimicrobià cap a l'exterior de la cèl·lula sense modificacions, però sense acció antibacteriana. Hi ha bombes d'efluxos multidrogues a la paret bacteriana que permeten l'expulsió de drogues com els antibacterians. Els gens involucrats són MefA

(*Streptococcus pneumoniae*), NorA (*Staphylococcus aureus*) i Mex (*Pseudomonas aeruginosa*). Aquests gens

expliquen la resistència a macròlids en aquests patògens

i a fluoroquinolones. Per combatre aquest tipus de resistència es troben a l'estudi l'associació d'inhibidors de bombes d'eflux juntament amb l'antibacterià.

5.2 Principals causes de la resistència als antibiòtics

1. L'excés de prescripció d'antibiòtics en malalties infeccioses on no estan indicats (com les produïdes pels virus) o que pateixen persones joves i sanes on la infecció pot remetre fàcilment.
2. Els pacients no acaben o no segueixen correctament el tractament prescrit.
3. Els pacients s'automediquen.
4. L'ús excessiu d'antibiòtics en la producció agropecuària. Els animals, els peixos i els vegetals poden rebre tractament antibiòtic per evitar o minimitzar que pateixin infeccions i morin durant el seu creixement i no es puguin vendre pel consum humà posterior.
5. Hàbits inadequats d'higiene. Les persones podem transmetre a altres persones els bacteris resistents directament o a través del contacte amb superfícies o aliments que manipulem on hi són presents. És important mantenir hàbits correctes d'higiene i de manipulació dels aliments.
6. La propagació en espais on hi ha malalts, per exemple, en els hospitals o en la sala d'espera dels centres d'atenció primària.

5.3 Conseqüències de la resistència als antibiòtics

Molts dels tractaments disponibles per a les infeccions bacterianes comunes estan perdent eficàcia. Com a conseqüència, hi ha casos en què no és possible tractar adequadament els pacients infectats amb cap dels antibiòtics disponibles. Aquesta resistència podria alentir i dificultar el tractament, podent causar complicacions o fins i tot la mort. D'altra banda, és possible que el pacient necessiti cures addicionals o antibiòtics alternatius més costosos, que podrien tenir efectes secundaris més greus, o bé requereixi tractaments més invasius, com injeccions intravenoses, que s'han d'administrar en hospitals.

Un recent informe de l'OMS va establir clarament que la resistència dels bacteris comuns als antibiòtics ha assolit nivells alarmants a moltes parts del món. Per exemple, a Europa s'ha produït un augment de la resistència als principals antibiòtics per part de bacteris comuns, com l'*Escherichia coli*, que provoca, entre d'altres, infeccions del tracte urinari, l'*Staphylococcus aureus*, resistent a la meticilina, la *Klebsiella pneumoniae* i la *Pseudomonas aeruginosa*.

Per a l'OMS, això suposa un risc per a les fites de la medicina moderna, que depèn de la disponibilitat de medicaments antibacterians eficaços. Per exemple:

- Les infeccions associades a l'assistència sanitària, com la pneumònia, podrien no respondre als medicaments disponibles o recomanats (per exemple, la penicil·lina), posant en perill la vida dels pacients.
- La cistitis, una de les infeccions bacterianes més comunes entre les dones, podria tornar-se intractable o necessitar tractament per via intravenosa, cosa que elevaria la càrrega econòmica per als pacients i per al sistema de salut en general.
- Els medicaments antibacterians utilitzats per prevenir infeccions després d'una cirurgia o tractar infeccions comunes en l'atenció neonatal i les cures intensives podrien perdre eficàcia o tornar-se ineficaces.

Un problema descrit en l'informe de l'OMS és que, des de 1985, a penes s'han descobert i desenvolupats antibiòtics per a substituir els que estan perdent eficàcia.

5.4 Mesures a prendre per combatre contra la resistència als antibiòtics

1. Mantenir uns bons hàbits higiènics en el vostre entorn, rentar-se les mans amb freqüència i en la manipulació d'aliments.
2. Extreuar la higiene en el contacte amb els malalts.
3. Mantenir el carnet de vacunacions al dia.
4. Evitar els riscos de contagi durant les relacions sexuals.
5. Fer servir mocadors de paper d'un sol ús.
6. Posar el colze davant la boca en esternudar, mai la mà.
7. Fer ús d'antibiòtics només quan un professional de la salut els recepti. No oblidar que els antibiòtics no serveixen per tractar un virus, com ara el de la grip o del refredat.
8. No automedicar-se.
9. Quan receptin un medicament, seguir sempre les instruccions: respectant la dosi, l'horari i la durada recomanada. No abandonar el tractament abans d'hora, tot i trobar-nos millor.
10. No guardar tractaments antibiòtics sobrants, portar-los al punt SIGRE de la farmàcia.
11. Consultar als professionals sanitaris del centre d'atenció primària, metges, infermeres, i també als farmacèutics si hi ha algun dubte.

6. Fagoteràpia: Alternativa a la utilització d'antibiòtics

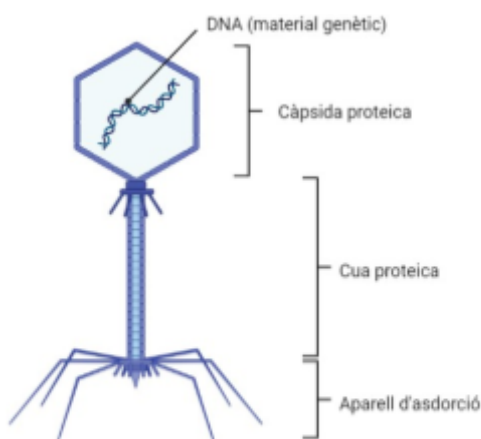


Figura 35: Parts d'un bacteriòfag

La fagoteràpia o teràpia fàgica és una teràpia que utilitza bacteriòfags (virus bacterians) per tractar infeccions bacterianes patogèniques. La fagoteràpia té diverses aplicacions en medicina així com en odontologia, ciència, veterinària i agricultura.

6.1 Història

El descobriment dels bacteriòfags va ser reportat per Frederick Twort el 1915 i per Félix d'Herelle el 1917. D'Herelle va observar que els fags sempre apareixien a les cadires dels pacients que es trobaven en recuperació de la disenteria causada per *Shigella*. A causa d'això, aviat es va aprendre que els bacteriòfags es trobaven on els bacteris es desenvolupen amb facilitat, com en: drenatges, rius contaminats pels sistemes de deixalles i en les cadires dels pacients malalts. La teràpia de fags va



Figura 36: Félix d'Herelle

ser ràpidament reconeguda per diversos científics com una alternativa clau per erradicar infeccions bacterianes. Un investigador georgià, George Eliava, estava fent

descobriments similars, per la qual cosa va viatjar a l'Institut Pasteur a París, on va conèixer D'Herelle. Posteriorment, va fundar el 1923 l'Institut Eliava a Tbilissi, Geòrgia. Aquesta institució va ser destinada al desenvolupament de la teràpia de fags.



Figura 37: Institut de bacteriòfags

Tot i que el coneixement en aquesta àrea s'anava ampliant, pel que fa a la biologia dels fags i com fer servir correctament la barreja d'aquests mateixos, els primers usos d'aquesta tècnica van ser poc fiables. Quan els antibiòtics van ser descoberts i comercialitzats per E.U.A. i Europa el 1941, els científics occidentals van perdre temporalment l'interès en l'estudi i l'ús de la teràpia de fags.

Actualment, hi ha una extensa biblioteca i centre de recerca a l'Institut George Eliava a Tbilissi, Geòrgia. Avui dia la teràpia de fags és un tractament popular en aquesta regió, però també s'utilitza a Rússia i a Polònia.

Com a resultat de l'increment a la resistència d'antibiòtics, des del 1950 i l'avanç en el coneixement científic, s'ha renovat l'interès mundial sobre la capacitat de la teràpia de fags per erradicar les infeccions bacterianes, a la biopel·lícula microbiana crònica, i fins i tot en situacions industrials.

6.2 Avantatges i inconvenients

1. Avantatges:

→ Tant si s'aplica a bacteris resistents als antibiòtics com a bacteris susceptibles, l'eficàcia d'eliminació dels bacteriòfags és idèntica.

→ La producció de bacteriòfags és menys costosa que la d'antibiòtics, i, per tant, se'n pot fer en molta més quantitat.

→ L'acció antimicrobiana dels bacteriòfags és molt específica, ja que només s'enfoca en un o pocs ceps d'un bacteri. Quan es fan servir en una teràpia, només es dirigeixen a aquest bacteri patògen específic i la resta romandrà intacte. En canvi, els antibiòtics tradicionals tenen una major varietat d'efectes, matant bacteris perjudicials, així com bacteris útils, com els que ens faciliten la digestió d'aliments.

→ Els bacteriòfags són microorganismes que estan extraordinàriament disponibles en abundància, ja que es poden trobar en la seva forma normal al medi ambient. Per exemple, s'han aïllat en mostres de terra una densitat de 10⁸ partícules/g. Això vol dir que els éssers humans, els animals i les plantes estan en contacte amb els fags durant la major part de les nostres vides sense que causin reaccions aparentment adverses.

→ Els bacteriòfags poden multiplicar-se en presència de l'hoste bacterià apropiat, per així combatre infeccions. Quan infecten els bacteris patògens, augmenten les seves propietats antimicrobianes.

→ Els fags evolucionen al mateix temps que els bacteris, per tant, si els bacteris poden evolucionar per obtenir resistència, els virus poden evolucionar per superar la resistència.

→ La fagoteràpia té un alt índex terapèutic, per la qual cosa s'espera que tingui pocs efectes secundaris.

→ Com que els fags es repliquen in vivo, es poden fer servir amb eficàcia en petites dosis.

→ Es pot fer servir una varietat de fags per incrementar les probabilitats d'èxit, o obtenir mostres prèvies per identificar i cultivar els fags apropiats.

→ Els bacteriòfags són inofensius, no només per a l'organisme de l'hoste, sinó també per a altres tipus de flora normal (com la que es troba als intestins). D'aquesta manera s'aconsegueix reduir el risc de contraure un altre tipus d'infecció.

→ Els fags tendeixen a tenir més èxit que els antibiòtics en presència d'una biopel·lícula coberta per una capa de polisacàrids, la qual els antibiòtics no solen ser capaços de penetrar-hi. Evidències demostren l'habilitat dels fags per arribar al lloc d'acció requerit (incloent-hi el cervell, on els fags poden traspasar la barrera hematoencefàlica).

→ Encara que els bacteris poden desenvolupar resistència als fags, aquesta resistència és més fàcil de superar que la resistència als antibiòtics.

2. Inconvenients:

→ L'especificitat dels bacteriòfags per als seus bacteris objectiu és molt alta, la qual cosa significa que, per assegurar-se que tots els ceps seran eliminats, cal utilitzar una barreja de diversos fags amb un rang d'hostes diferents.

→ L'ús dels bacteriòfags requereix un estudi detallat de la biologia així com de les característiques genètiques. La finalitat d'aquesta investigació ha de ser assegurar que en cap cas els fags no són portadors o capaços de transmetre factors de virulència a altres bacteris.

→ L'acceptació per part de la societat pot ser un problema, ja que els bacteriòfags estan associats amb virus perillosos. Tot i això, aquests virus són totalment específics d'aquests bacteris i per aquesta raó, són inofensius per als humans, els animals, les plantes o el medi ambient.

→ L'aparició de resistència contra els antimicrobians derivats dels fags podria ser un tema de preocupació. En el cas dels bacteriòfags, els bacteris es poden fer resistents a aquests, i, el sistema immune del pacient pot, en alguns casos, generar una resposta immune al fag. Però l'ús d'una barreja de diferents fags minimitza la probabilitat d'adquirir-hi resistència.

6.3 Aplicacions

- Recol·lecció

La manera més simple del tractament de fags involucra la recol·lecció local d'aigua que és probable que contingui grans quantitats de bacteris i bacteriòfags, per exemple de desguassos, aigües residuals i altres fonts. També poden ser extrets de cadàvers. Les mostres són preses i aplicades als bacteris que han de ser destruïts i han estat cultivats en un mitjà de creixement.

Si els bacteris moren, com generalment passa, la barreja és centrifugada; els fags són recol·lectats de la part superior de la barreja i poden ser extrets.

Les solucions de fags són provades per veure quins mostren efectes de repressió de creixement (lisogènia) o destrucció (lisi) dels bacteris objectiu. Els fags que mostren lisi són posteriorment amplificats en cultius dels bacteris objectiu, passats a través d'un filtre per extreure'n tot excepte els fags, i després distribuir-los.

- Administració

Els fags poden generalment ser liofilitzats i convertits en píndoles sense impactar en l'eficàcia materialment. Amb temperatura estable de fins a 55 °C i amb vida útil de catorze mesos alguns tipus de fags han mostrat que poden estar en una píndola.

L'aplicació en forma líquida és possible, emmagatzemats perfectament en vials refrigerats.

L'administració oral funciona millor quan s'inclou un antiàcid, així el nombre de fags que sobreviuen el pas per l'estómac s'incrementa.

L'administració tòpica sovint involucra l'aplicació de gases que es col·loquen a l'àrea que serà tractada.



Figura 38: Solució antibacterial

PART PRÀCTICA

Cronologia:

Com ja he explicat abans, l'objectiu final d'aquesta recerca és demostrar que la fagoteràpia pot ser una alternativa vàlida a l'ús d'antimicrobians.

Tot seguit, detallo la cronologia de les pràctiques dutes a terme per assolir els meus objectius, entre les quals n'he inclòs també algunes de necessàries per conèixer les tècniques d'esterilització, preparacions de medis de cultiu i mètodes de recompte, aïllament i conservació de microorganismes.

- **Pràctica 1:** per esbrinar quin bacteriòfag infecta a la *Salmonella*, i, d'aquesta manera, a la pràctica 7, poder comparar aquest bacteriòfag amb els altres tres antibiòtics.
- **Pràctica 2 i 3:** per conèixer la tècnica del recompte de plaques i els bancs de dilucions.
- **Pràctica 4:** les tincions em seran útils per aprendre a distingir els bacteriòfags de les colònies bacterianes en diferents plaques.
- **Pràctica 5:** l'elaboració d'una solució d'antibiòtic que serà la que utilitzaré a la pràctica final.
- **Pràctica 6:** per a l'obtenció del cultiu de nit de *Salmonella*.
- I per últim, la **pràctica 7** on faré l'estudi comparatiu entre el tractament amb antibiòtics i un bacteriòfag per separat.

7. Tècniques generals

7.1. Tècniques d'esterilització

Mètode	Temps i temperatura	Utilització	Actuació	Desavantatges
Calor seca	1 hora a 170 °C	Material de vidre i de metall	Desnaturalització de components cel·lulars	Alguns plàstics es fonen. No es pot utilitzar per medis líquids.
Esterilització intermitent	30 min a 100 °C durant 3 dies	Medis, teixits, líquids, sòlids	Mort dels microorganismes per calor durant els primers 30 min. Les espores germinen i les cèl·lules vegetatives són destruïdes en el cicle següent.	Dura molt de temps.
Calor humida (Autoclau)	Entre 15 i 30 min a 121 °C i una pressió de 15 PSI	Vidre, medis líquids, sòlids, metalls, etc	Desnaturalització de components cel·lulars	Alguns components del medi no són estables a temperatures elevades.
Filtració	Filtres de 0,45 µm o de 0,22 µm, aparell de buit	Medis líquids	Retenció dels bacteris en el filtre	Només permet esterilitzar medis líquids.
Gasos	Òxid d'etilè	Material termosensible	Desnaturalització de components cel·lulars	Molt tòxic, inflamable.
Radiació	Ultraviolada o ionitzant	Medis líquids, sòlids, fàrmacs, material de plàstic d'un sol ús.	Mutacions que interfereixen en el metabolisme i causen la seva mort.	La radiació UV té poc poder de penetració. Per utilitzar radiació gamma cal tenir accés a equipament radioactiu.

7.2. Preparació de medis de cultiu

Fonament

Els medis de cultiu han de satisfer tots els requisits nutritius dels microorganismes que es volen estudiar. Ha de contenir fonts de carboni, nitrogen, sofre, fòsfor i, en menor quantitat, ferro, magnesi, cobalt, manganès... així com una font d'energia i una font de poder reductor. En medis **mínims o sintètics**, la composició es coneix exactament i el medi es prepara fent ús de quantitats conegudes de cada un dels constituents. En medis **rics o complexos**, es fan servir components com extracte de llevat, triptona o peptona que, tot i que tenen una composició heterogènia i indeterminada, contenen tots els elements que el bacteri necessita per desenvolupar-se. El medi de cultiu pot ser líquid (**brou**) o bé estar solidificat amb agar (**medi sòlid**).

Tipus de Medis de cultiu

Els medis de cultiu destinats per cultivar microorganismes es poden dividir en tres grups:

A. Medis de desenvolupament

Normalment, contenen totes les substàncies nutritives per a la bona multiplicació dels microorganismes. Són emprats per recomptes i manteniment dels microorganismes. Per exemple: el medi LB, l'aigua peptonada, el medi Sabouraud, etc.

B. Medis selectius

Normalment, s'utilitzen per aïllar alguns bacteris especials. Contenen substàncies que afavoreixen el desenvolupament del microorganisme que es vol aïllar, a la vegada que contenen d'altres substàncies que inhibeixen el creixement d'altres tipus de microorganismes. Per exemple: l'agar de McConkey i l'agar d'eosina i blau de metilè per l'aïllament de coliforms, l'agar Manitol Salt per l'aïllament de *Staphylococcus* o l'agar Wright per l'aïllament de *Rhizobium*.

C. Medis diferencials o determinatius

S'utilitzen per determinar les propietats fisiològiques i bioquímiques dels bacteris. Per exemple: l'agar citrat de Simmons o citrat de Koser, que s'empra per determinar si un bacteri pot utilitzar citrat extern com a única font de carboni, el medi MR-VP, on es determina el tipus de fermentació dels enterobacteris, etc. Alguns medis com el McConkey i el Manitol Salt, són exemples de medis diferencials i a la vegada selectius.

Mètodes de preparació dels medis de cultiu

Consideracions generals:

Actualment, la preparació de medis de cultiu és molt ràpida i senzilla. La majoria de fórmules que defineixen un medi de cultiu són subministrades comercialment per diferents empreses en forma deshidratada. La preparació consisteix a dissoldre la quantitat adequada en el volum d'aigua destil·lada que s'indica. En el cas dels medis sòlids, l'agar ja pot estar inclòs en el medi deshidratat, o bé cal afegir-lo. Una vegada preparat, si el medi conté agar cal portar-lo a ebullició fins a aconseguir una bona dissolució.

En aquells casos en què els medis no se subministren comercialment, cal pesar cada un dels seus components i procedir com en el cas anterior. Si el medi porta algun sucre en la seva composició, normalment aquest es prepara dissolt en aigua, s'esterilitza per filtració, i s'afegeix estèrilment després d'haver preparat i esterilitzat la resta dels components.

Preparació de medis sòlids:

Els medis sòlids es preparen afegint agar al medi líquid, a una concentració final del 10-20%. L'agar es fon a 95 °C, la qual cosa permet cultivar els microorganismes des de baixes temperatures fins a 95 °C. A més a més, una vegada líquid no solidifica fins a 40 °C. Això permet la preparació de medis de cultiu a temperatura ambient, així com l'addició de microorganismes en l'agar fos per procedir posteriorment a la sembra en placa. L'agar forma un gel consistent i transparent que és utilitzat per molt pocs microorganismes, ja que està constituït per barreges complexes de polisacàrids lineals i ramificats. Avui en dia és el medi solidificat més usat en la preparació de medis de cultiu per microorganismes.

La quantitat d'agar habitual per preparar medis sòlids oscil·la entre 12 i 18 g/l, però pot dependre del tipus d'agar, la duresa que es vulgui aconseguir, o la temperatura d'incubació o ambient en què s'hagin de manipular els tubs o les plaques. L'agar s'incorpora al medi, es bull 1 o 2 min i posteriorment s'esterilitza i s'aboca en plaques o en tubs.

L'anomenat **agar tou** (utilitzat en la sembra en doble capa) conté entre 5 i 7 g/l d'agar. L'agar s'incorpora al medi, es prepara igual que abans i després d'esterilitzar es distribueix en tubs petits. A l'hora de realitzar la sembra, es liqua prèviament el medi i es manté a una temperatura constant de 45 °C. Seguidament, es procedeix a sembrar els microorganismes.

De vegades, en la preparació de certs medis de cultiu es prepara el que s'anomena **agar base**. Consisteix en una dissolució d'agar en aigua sense cap d'altre component. La concentració d'agar pot ser la final o bé més concentrada.

PH dels medis de cultiu:

Per a un adequat creixement dels microorganismes, els medis de cultiu han de tenir el pH apropiat al tipus de microorganisme que es desitja fer créixer. La majoria de microorganismes es desenvolupen bé a pH neutre (entre 7 i 7,2). Si els components del medi donen lloc a un valor diferent de pH caldrà ajustar-lo amb HCl 0,1 M o NaOH 0,1 M. L'òptim de pH per altres microorganismes com els llevats és àcid, al voltant de 5,5.

Durant la preparació de qualsevol medi de cultiu, cal tenir en compte que en el procés d'esterilització amb l'autoclau, el pH pot disminuir en 0,2 unitats, la qual cosa fa que en la preparació de la majoria de medis de cultiu, ajusti el pH a 7,4 abans de procedir a l'esterilització.

8. Pràctiques generals:

8.1. Mètodes de recompte de microorganismes

Fonament

El recompte de microorganismes es pot calcular determinant el nombre de microorganismes que creixen en un determinat medi de cultiu desenvolupant colònies visibles (recompte **viable**) i comptant les cèl·lules o agrupacions de cèl·lules que es poden observar en la mostra mitjançant tècniques microscòpiques (recompte **directe o total**).

A- Tècniques de dilució i càlculs

El creixement dels bacteris és molt elevat i donen lloc a poblacions tan grans que és necessari diluir-les per tal d'obtenir colònies aïllades que es puguin comptar. Per a poder fer això, es necessita barrejar una petita quantitat de mostra amb un volum d'aigua o d'una dissolució salina estèrils (diluent).

Una dilució simple es calcula dividint el volum de mostra entre el volum total (la mostra més el diluent).

Les dilucions són més exactes quan es fan sèries de petites dilucions que fent-ne una de gran. El conjunt d'aquestes dilucions s'anomena **dilució seriada**, i la dilució total és el producte de cadascuna de les dilucions de la sèrie. La dilució s'escriu utilitzant notació exponencial, per exemple, una dilució 1:1000 s'escriurà 10^{-3} o -3 .

Passos per fer una dilució seriada:

- 1- Pipetejar en condicions estèrils la mostra en el tub de diluent.
- 2- Barrejar els continguts agitant lleugerament el tub.
- 3- Repetir el procés les vegades necessàries fins a tenir en 0,1 ml de l'última dilució un nombre de bacteris adequat.

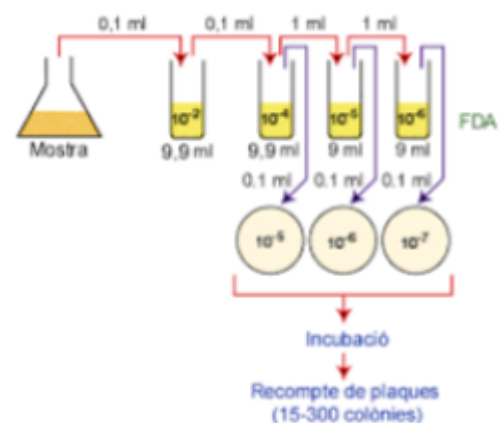


Figura 39: Procediment per a la determinació de viables utilitzant dilucions seriades (FDA: factor de dilució acumulat)

- 4- De les últimes dilucions realitzades sembrar 0,1 ml sobre la placa (estenenent amb la nansa de Digrafsky) o bé sembrar en un tub d'agar tou i abocar-ho a la placa.
- 5- Posar a incubar les plaques a la temperatura òptima i un cop passat el temps necessari, fer un recompte del nombre de colònies, utilitzant les plaques que tinguin entre 15 i 300 colònies.
- 6- Expressar el resultat en **unitats formadores de colònies per mil·lilitre** (cfu/ml) segons la fórmula següent:

$$\text{cfu / ml} = \frac{\text{núm. colònies}}{\text{dilució acumulada} \times \text{volum sembrat}}$$

B- Recompte directe (mètode de Breed)

- 1- Agafar un portaobjectes, netejar-lo amb etanol per treure'n el greix que pugui tenir i deixar-lo assecar.
- 2- Dibuixar un quadrat d'1 cm de costat, amb un retolador que escrigui sobre vidre.
- 3- Donar la volta al portaobjectes i s'ha d'observar una superfície ben delimitada d'1 cm².
- 4- Amb una micropipeta estendre 0,01 ml de la mostra, prèviament homogeneïtzada, sobre el quadrat.
- 5- S'asseca immediatament, es fixa per calor suaument i es cobreix l'extensió amb blau de metilè durant 1 minut.
- 6- Rentar-ho amb aigua, sense utilitzar la flama i examinar-ho a través del microscopi.
- 7- A continuació es compta el nombre de microorganismes en diferents camps. En el recompte de mostres molt diluïdes en les quals el nombre de cèl·lules per camp és molt petit, cal comptar un nombre de camps més elevat. Si les cèl·lules estan homogèniament repartides es pot aplicar la següent taula:

Nre. de bacteris / camp	Nre. de camps que s'han de comptar
0 - 3	64
4 - 6	32
7 - 12	16
13 - 25	8
26 - 50	4
51 - 100	2
+ 100	1

Si la distribució no és homogènia, s'han de comptar un mínim de 10 camps (i com a mínim 300 cèl·lules). Per obtenir el nombre de cèl·lules per ml de la nostra mostra problema, cal aplicar la següent fórmula:

$$\text{núm. cèl·lules / ml} = \frac{(\text{mitjana cèl·lules/camp}) \times \text{núm. camps totals en } 1 \text{ cm}^2}{\text{volum (ml)} \times \text{factor dilució acumulada}}$$

$$\text{núm. camps totals en } 1 \text{ cm}^2 = \frac{1}{\pi r^2} \text{ On } r, \text{ és el radi del camp del microscopi (90 } \mu\text{m)}$$

8.2. Mètodes d'aïllament i de conservació de microorganismes

Fonament

L'aïllament de microorganismes consisteix en la separació en medi sòlid de dos o més microorganismes que es troben junts en una determinada mostra, amb l'objectiu d'aconseguir colònies separades i poder obtenir cultius purs.

Per aïllar microorganismes es poden emprar diferents procediments:

A- Aïllament per dilució

L'aïllament per dilució es basa en l'extensió per la superfície d'una placa d'agar d'un nombre de microorganismes petit com perquè en créixer, cada un d'ells doni lloc a una colònia ben aïllada. Per assolir que el nombre d'organismes que s'inocula sigui prou baix, es fan dilucions de la suspensió original.

- 1- Preparem una sèrie de dilucions utilitzant solució salina (NaCl 0,9%) (Ringer ¼)
- 2- Sembrem 0,1 ml de les dues últimes dilucions en la superfície d'una placa, realitzant una extensió homogènia amb la nansa de Digrafsky.
- 3- Incubem les plaques a la temperatura adequada.
- 4- Una vegada han crescut els bacteris, hem d'observar colònies aïllades per tal de poder distingir les característiques i procedir a l'obtenció de cultius purs.

Utilitzant aquest procediment, també podem fer un recompte de viables per a cada morfologia colonial analitzada, fent els càlculs.

B- Aïllament per esgotament en placa

a) En ziga-zaga

- 1- Des d'una suspensió de microorganismes o des d'una colònia, agafem una mostra amb la nansa de Kolle.
- 2- Sembrem per estria en ziga-zaga fins a esgotar la nansa sobre una o dues plaques de medi sòlid.
- 3- Incubem les plaques a la temperatura adequada, i una vegada han crescut els bacteris, hem d'observar colònies aïllades.

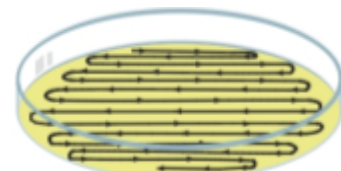


Figura 40: Sembra simple

b) En escocès

Amb la nansa de Kolle procedim tal com s'indica a la imatge. Per a dur a terme cada una de les etapes, és necessari que esterilitzem cada cop la nansa de Kolle.

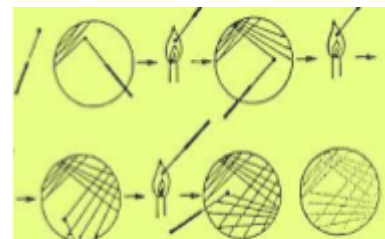


Figura 41: Sembra seqüencial

8.3. Metodologies bàsiques del treball amb bacteriòfags

PRÀCTICA 1. Test de la gota

El test de la gota és un mètode que s'utilitza per determinar la presència de bacteriòfags en un volum determinat de mostra.

Objectiu

Esbrinar quins dels quatre bacteriòfags (P22 lític, P22 lisogènic, SE1 i λ) que tenim, infecten al bacteri *Salmonella*.

Material

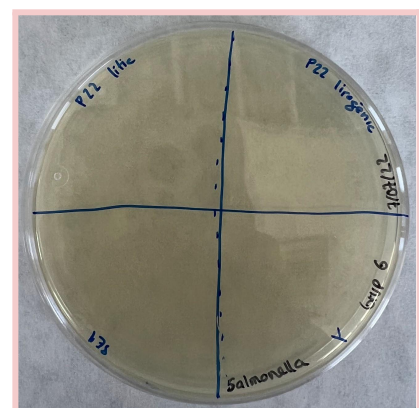
- 1 Placa de Petri amb agar LB
- Medi LB tou (0,7%)
- Cultiu de nit (overnight (ON)) de *S. enterica*
- Micropipeta groga a 100 μ L
- Puntetes grogues
- Vòrtex
- Bunsen

Bacteriòfags a testar:

- P22 lític
- P22 lisogènic
- SE1
- λ

Procediment

- 1- Utilitzar dilució 1/10 de l'ON (cultiu de nit de *Salmonella*).
- 2- Dividir la placa en quatre seccions.



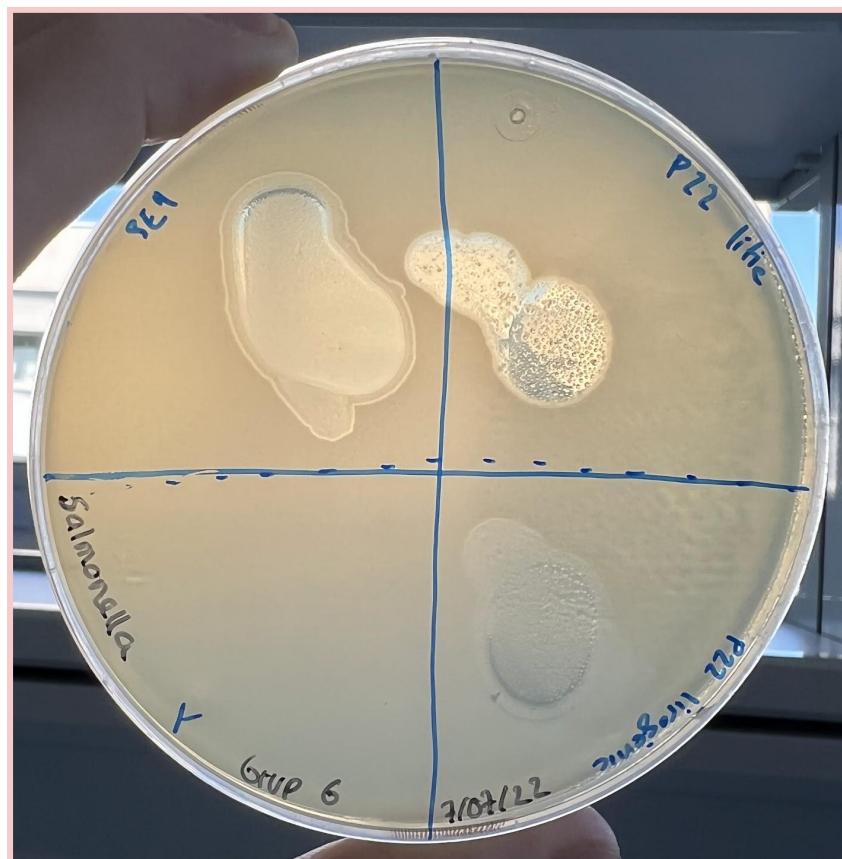
3- Fer una sembra en doble capa utilitzant 3 mL del medi LB tou (0,7%) + 100 μ L de la dilució de la soca de *Salmonella*. Agitem per inversió dues vegades, i aboquem a la placa repartint uniformement. **EN TOT MOMENT HEM DE TREBALLAR AMB ESTERILITAT**

4- Deixar assecat durant 5 minuts.

5- Quan la placa estigui seca, dipositar una gota (10 μ L) de cada un dels quatre bacteriòfags a testar en la secció corresponent.

6- Deixar assecat i incubar ON a 37 °C.

Resultats



En la imatge podem observar que algunes gotes dels bacteriòfags que hi hem posat infecten a la *Salmonella*, com el P22 lític, el P22 lisogènic i el SE1, perquè es pot veure la calba (zona més transparent on no hi ha bacteris) que ha format a la placa. En canvi, el bacteriòfag λ no infecta al bacteri, ja que no ha format cap calba.

PRÀCTICA 2. Titulació de bacteriòfag lític per a recompte de PFUs

Titular consisteix a fer dilucions seriades per tal de disminuir la concentració de bacteriòfags que hi ha en una dilució i, d'aquesta manera, poder-ne determinar el nombre a través de PFUs (unitats formadores de plaques, o també de calbes/colònies), que és una mesura indirecta de la quantitat de virus presents en una mostra que permet determinar la concentració en termes de dosi infecciosa.

Objectiu

Determinar el nombre d'unitats formadores de calbes que tenim a la mostra del bacteriòfag.

Material

- 4 Plaques de Petri amb agar LB
- Cultiu de nit (overnight (ON)) de *S. enterica*
- Vòrtex
- Bunsen
- 4 tubs de medi LB tou (0,7%)
- $MgSO_4$
- Micropipeta blava i groga
- Puntetes blaves i grogues
- 4 Tubs Eppendorf

Bacteriòfag a testar:

- P22 lític

Procediment

1- Agafem els 4 tubs Eppendorf i els indiquem cada un amb -2,-4,-6, i -8 per poder fer les dilucions seriades del llisat.

2- Posem 990 μL de $MgSO_4$ a cada tub.



3- Agafem 10 μL de P22 lític, afegim al tub -2 i barregem amb el vòrtex. Canviem la punta de la micropipeta.

4- Agafem 10 μL del tub -2, i ho afegim al tub -4 i tornem a barrejar amb el vòrtex. Tornem a canviar de punta.

5- Agafem 10 μL del tub -4, ho afegim al tub -6, barregem amb el vòrtex i canviem de punta.

6- Agafem per última vegada 10 μL del tub -6, ho posem al tub -8, i ho barregem tot amb el vòrtex.



7- En un tub amb 3 mL de LB tou (0,7%) es posen 100 μL de *Salmonella* (dilució 1/10 de l'ON) (prèviament barrejada amb el vòrtex), canviem de punta, i afegim també 100 μL de la dilució -2. Agitem per inversió dues vegades, i aboquem a la placa -2 repartint uniformement.

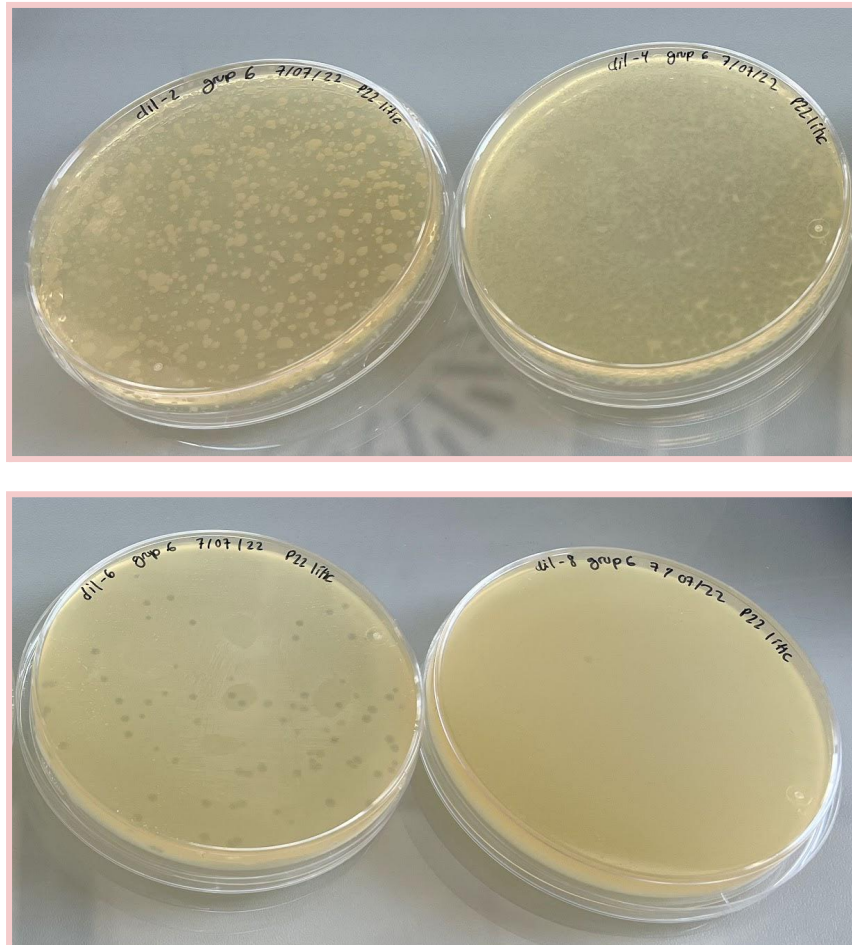
8- En un altre tub de LB tou, tornem a posar 100 μL de *Salmonella* i 100 μL de la dilució -4. Agitem 2 vegades per inversió, i aboquem a la placa anomenada -4.



9- Repetim el mateix procés amb la dilució -6 i amb la dilució -8.

9- Deixem assecar i ho incubem tot a 37 °C.

Resultats



Per poder fer la quantificació, he triat la placa -6, ja que és la que conté entre 15 i 300 calbes.

Per poder fer l'operació, he contat el nombre de calbes que hi ha, ho he dividit per la dilució acumulada, en aquest cas, la dilució -6 i multiplicat pel volum sembrat, per tant, 0,1 mL.

El resultat és $8'8 \cdot 10^8$ pfu/ml (unitats formadores de plaques per cada ml).

Operació:
$$\text{pfu / ml} = \frac{\text{núm. calbes}}{\text{dilució acumulada} \times \text{volum sembrat}}$$

$$\text{pfu / ml} = \frac{88}{0,000001 \times 0,1} = 8'8 \cdot 10^8 \text{ pfu/ml}$$

PRÀCTICA 3. Recuperació de calbes i titulació + filtració de solucions amb cèl·lules bacterianes i bacteriòfags

Objectiu

Esbrinar en cada calba, quantes unitats formadores de calbes (partícules víriques infectives) tenim.

Material

- ON de *S. enterica*
- Plaques de titulació de la pràctica anterior P22 lític
- 6 Plaques de Petri amb agar LB
- Llisat de bacteriòfag P22 lític
- Micropipeta blava i groga
- Puntetes blaves i grogues
- Bunsen
- Vòrtex
- Tubs Eppendorf
- Centrifugadora
- 4 tubs de LB tou (0,7%)
- 2 nanses de Digrafsky
- Agitador
- Xeringa i filtre amb membrana de 0,45 µm de diàmetre de porus
- MgSO₄

Procediment

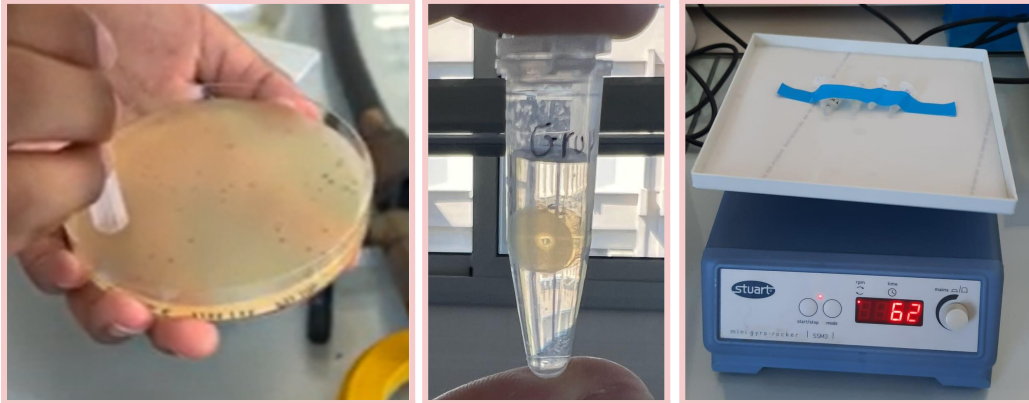
1- Seleccionem una calba ben aïllada d'una de les plaques de titulació de la pràctica anterior i la marquem amb un retolador.

2- Posem 1 mL de MgSO₄ a un tub Eppendorf.



3- Amb una punta blava es recupera la calba del bacteriòfag P22 lític amb bacteris i es diposita al tub Eppendorf.

4- Es deixa en agitació suau per diluir la calba i perquè s'alliberin els bacteriòfags P22 lítics de l'agar, durant 30 minuts.



5- Es barreja uns 30 segons amb el vòrtex.

6- Agafem 100 μL del tub amb el P22 lític amb bacteris i ho posem a un altre tub que l'anomenarem com a "no filtrat".

7- El tub amb P22 lític, el posem a la centrifugadora durant 1 min a 13.000 rpm.

8- Traiem el tub, i ara agafem 500 μL i ho posarem a dins la xeringa amb el filtre, per a després, filtrar-ho i posar-ho tot dins el tub anomenat "filtrat".



9- Fem un banc de dilucions (-2,-4,-6 i -8) de la mateixa manera que a la pràctica anterior: Al tub -2 posem 990 μL de MgSO_4 i 10 μL del tub filtrat. Ho barregem amb el vòrtex i canviem de punta de la micropipeta. Al tub -4 posarem 990 μL de MgSO_4 i 10 μL del tub -2, ho barregem amb vòrtex i tornem a canviar la punta. I així successivament fins a fer el tub -8.

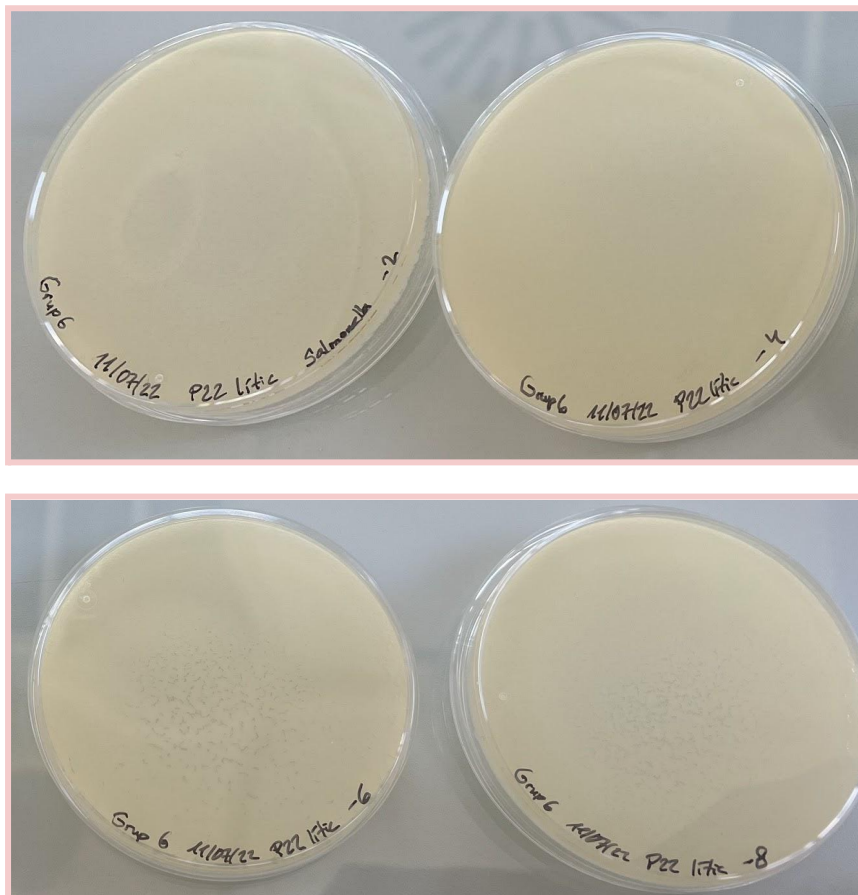
10- A continuació, hem de sembrar les dilucions: Agafem 100 µL de Salmonella, ho posem a dins del tub amb LB tou (0,7%), canviem de punta, i ara agafem 100 µL del tub -2 i també ho posem a dins del tub amb LB tou (0,7%), agitem per inversió dues vegades, i ho tirem a la placa anomenada -2. Fem el mateix amb els altres tubs (-4,-6 i -8).

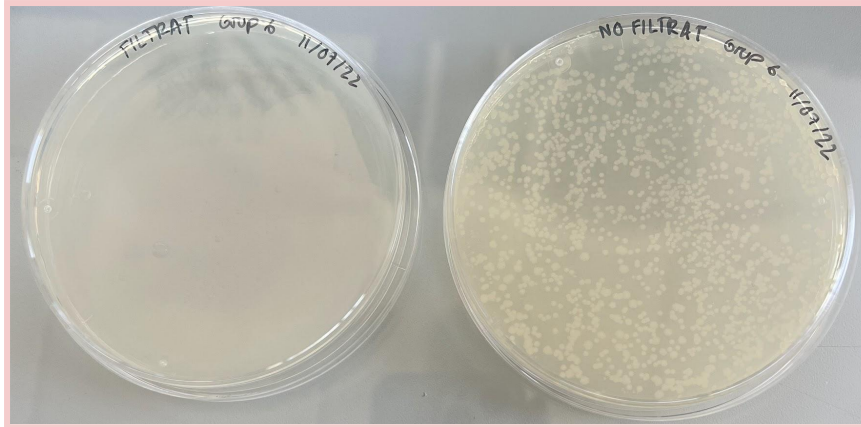
11- Per sembrar el tub filtrat, agafarem 100 µL del tub, els posarem a la placa anomenada "filtrat", i amb la nansa de Digralsky ho dispersarem per tota la placa.

12- Per últim, barregem amb el vòrtex el tub no filtrat, agafem 100 µL i els posem a la placa anomenada "no filtrat". Ho dispersem amb la nansa de Digralsky.

13- Posem totes les plaques a incubar a 37 °C.

Resultats





Per poder fer la quantificació, havíem de comptar les calbes que hi havia a la placa d'entre 15 i 300 calbes.

El resultat és $2'1 \cdot 10^6$ cfu/ml (unitats formadores de calbes per cada ml).

Operació:
$$\text{cfu / ml} = \frac{\text{núm. calbes}}{\text{dilució acumulada} \times \text{volum sembrat}}$$

$$\text{cfu / ml} = \frac{21}{0,0001 \times 0,1} = 2'1 \cdot 10^6 \text{ cfu/ml}$$

PRÀCTICA 4. Tinció amb el colorant vital *Triphenyl-Tetrazolium Chloride* (TTC)

Objectiu

Tenyir 4 plaques de Petri de les pràctiques anteriors per a poder observar millor el creixement bacterià i diferenciar-ho de les calbes dels bacteriòfags.

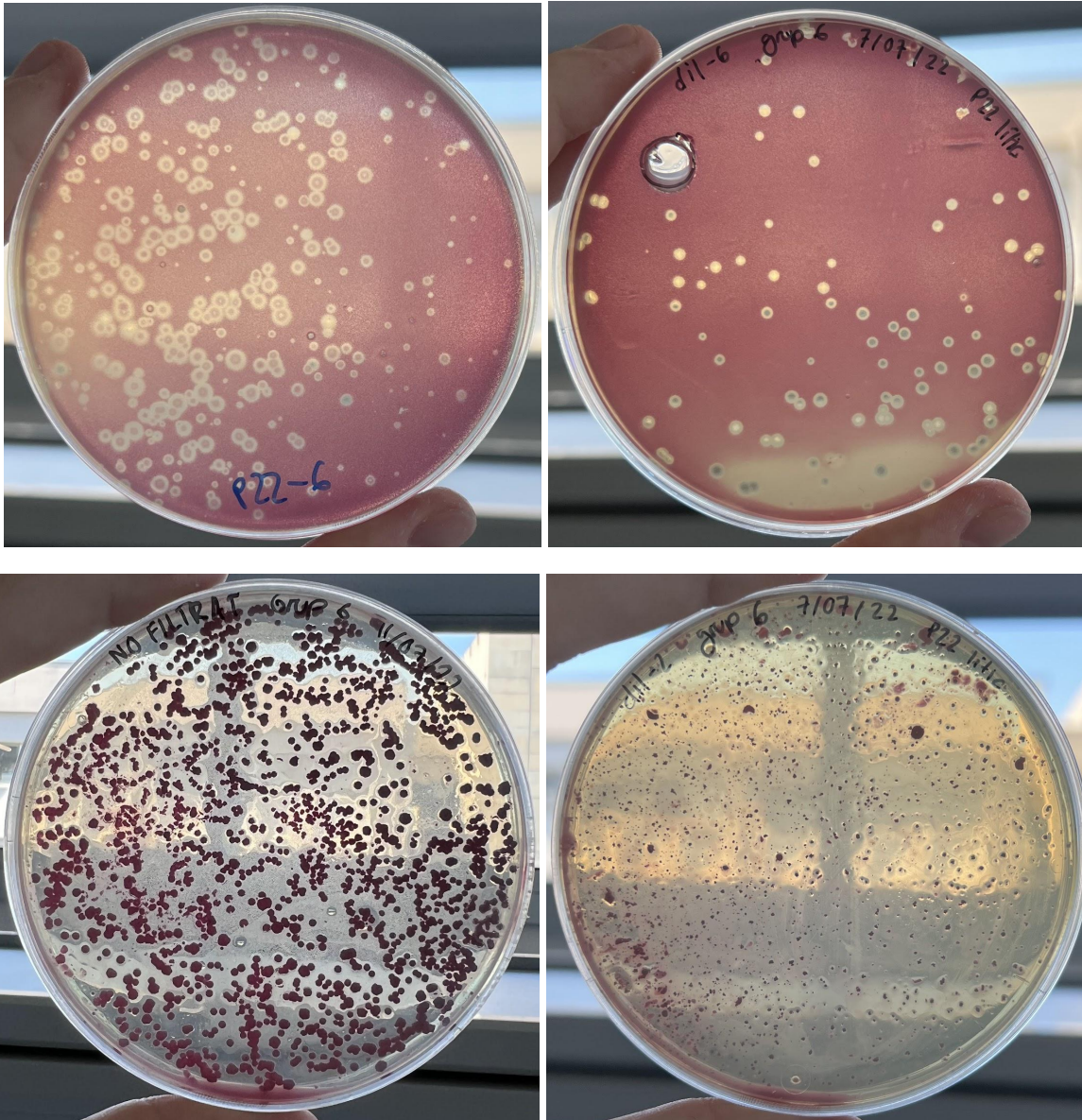
Material

- Colorant vital
- Plaques de les pràctiques anteriors
- Micropipeta blava
- Punta blava

Procediment

- 1- Triem 4 plaques qualssevol de les pràctiques anteriors.
- 2- Amb una micropipeta blava, mesurem 1000 μ L del colorant vital i ho repartim a poc a poc a cada placa que es vol tenyir. Ho repetim 5 vegades perquè així, en total hi hagi 5 mL del colorant a cada placa.
- 3- Ho deixem 30 minuts a 37 °C, i ho retirem.
- 4- Amb una micropipeta, traiem el colorant sobrant, i el dipositem a un recipient a part.

Resultats



En aquestes fotografies podem observar les quatre plaques tenyides, de color vermell, les colònies bacterianes, i, de color transparent, els bacteriòfags.

PRÀCTICA 5. Fabricació solució d'antibiòtics

Objectiu

Fabricar solucions d'antibiòtics (100 mg/ 5 ml) per a després, poder-les comparar amb el bacteriòfag a la pràctica final.

Material

- Ampicil·lina
- Espectinomicina
- Estreptomomicina
- H₂O
- Agitador
- Xeringues amb filtre PES de diàmetre de porus de 0,45 µm
- Congelador

Procediment

- 1- Pesar 20 mg d'ampicil·lina, espectinomicina, estreptomomicina.
- 2- Dissoldre en 1 mL de H₂O grau MilliQ estèril.
- 3- Agitar fins a la seva completa dissolució.
- 4- Filtrar utilitzant un filtre i una xeringa.
- 5- Conservar a -20 °C fins a la seva utilització.

PRÀCTICA 6. Cultiu ON de Salmonel·la

Objectiu

Fer un cultiu de nit de Salmonel·la per deixar-lo cultivant tota la nit, i l'endemà estigui en fase exponencial.

Material

- Nansa de col
- Bunsen
- Ampolla amb 10 mL d'LB estèril
- Placa amb Salmonel·la
- Agitador de bany

Procediment

1- Agafem una nansa de col, l'esterilitzem i ens esperem uns segons perquè es refredi.

2- Agafem unes 3-4 colònies de la placa amb Salmonel·la.

3- Obrim l'ampolla amb LB amb esterilitat, i posem la nansa de col per desprendre les cèl·lules.

4- Tornem a esterilitzar l'ampolla i la nansa de col per tal d'eliminar la Salmonel·la que hi quedi.

5- Posem l'ampolla a l'agitador de bany durant tota la nit.

PRÀCTICA 7. Comparació de l'eficàcia i l'eficiència entre els bacteriòfags i els antibiòtics

Objectius

Veure l'activitat de cadascun dels tres antibiòtics: espectinomicina (bacteriostàtic), ampicil·lina (bacteriolític) i estreptomina (bactericida), i el bacteriòfag P22 lític, segons el seu tractament. També elaborar una corba de creixement de dues formes: seguint la densitat òptica de cada cultiu i amb un banc de dilucions i sèmres.

Material

- ON de *S. enterica* preparat a la pràctica anterior
- Micropipeta blava i groga
- Puntetes blaves i grogues
- Aigua destil·lada
- Tubs Eppendorf
- Plaques de Petri de medi LB sòlid
- Espectrofotòmetre
- NaCl (0,9%)
- Nanses de Digralsky
- Agitador de bany
- Bunsen
- Vòrtex
- Cubetes visibles

Procediment

- 1- Realitzar una ressembrada de l'ON de *S. enterica* 1:50 en 200 mL de LB. (afegir 4 mL del cultiu de nit en 200 mL de LB al 0,5% de NaCl).
- 2- Deixar la ressembrada unes 2 hores a 37 °C amb agitació fins a obtenir una A_{550} de 0,2-0,3.
- 3- Un cop es té el cultiu a la DO desitjada (temps 0), dividir-lo en 5 ampolles amb 20 mL cadascuna i afegir els tractaments corresponents:

- A) Control negatiu (C-): afegir 200 µL de NaCl (0,9%)
- B) Ampicil·lina (Ap): afegir 200 µL a una concentració de 20 mg/mL
- C) Espectinomicina (Spc): afegir 200 µL a una concentració de 20 mg/mL
- D) Estreptomicina (Str): afegir 200 µL a una concentració de 20 mg/mL
- E) Bacteriòfag P22 lític: afegir 200 µL a una concentració de 10^{10} pfu/mL

4- De la mostra comuna (ressembra), realitzar la seva densitat òptica posant 1 mL de la mostra a una cubeta visible i posant-ho a l'espectrofotòmetre. Anotar el resultat al temps 0.

5- De la mostra comuna, agafar també 100 µL i posar-los al tub Eppendorff -1 amb 900 µL de NaCl (barrejant amb el vòrtex cada dilució que fem).

6- Fer un banc de dilucions fins al tub -6, és a dir, posar 100 µL del tub de la dilució anterior amb 900 µL de NaCl.

7- Deixar els cultius 10 minuts a 37 °C sense agitació, per facilitar l'adsorció del bacteriòfag P22 lític.

8- Del banc de dilucions anterior, s'han de sembrar 0,1 mL de les dilucions -2,-4 i -6 a les plaques de Petri amb la nansa de Digrafsky (començant per la -6 fins a la -4) (no cal canviar de nansa).

9- Passats els 10 minuts, posar tots els cultius a l'agitador de bany a 37 °C.

10- Al minut 30, agafar les ampolles del bany, i, amb esterilitat obrir-les, agafar 1 mL, deixar l'ampolla ràpidament a l'agitador, i posar el mL a una cubeta visible per mesurar la seva densitat òptica. Anotar el resultat. Abocar el contingut de la cubeta a una ampolla de residus.

11- Al minut 60, realitzar el mateix que al minut 30. Anotar el resultat.

12- Al minut 90, realitzar el mateix que al minut 60. Anotar el resultat. I, a més a més, agafarem 100 µL de l'ampolla per fer un altre banc de dilucions igual que al temps 0, i sembrar les dilucions -2,-4 i -6 amb la nansa de Digrafsky.

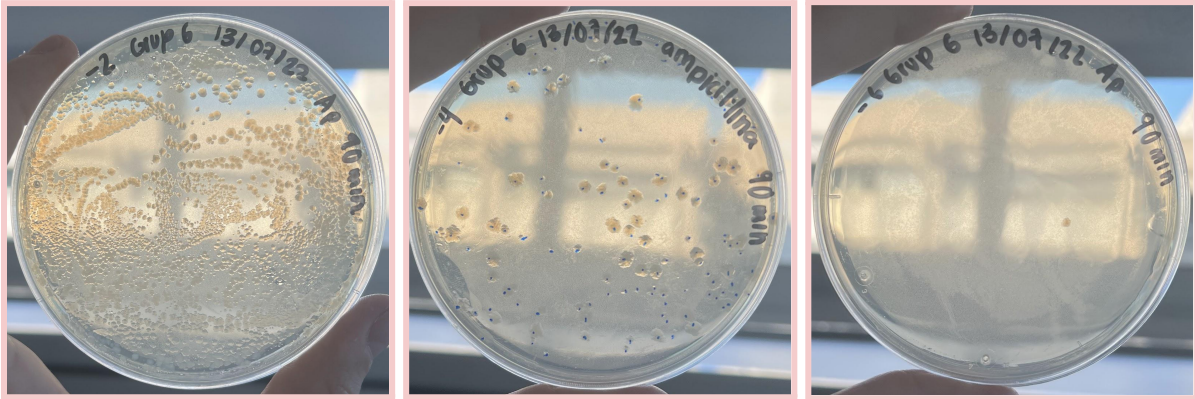
13- Al minut 120 i 150, realitzar el mateix que al minut 30. Anotar els resultats.

14- Al minut 180, realitzar el mateix que al minut 90, és a dir, calcular la densitat òptica i a més, fer el banc de dilucions i sembrar 3 plaques.

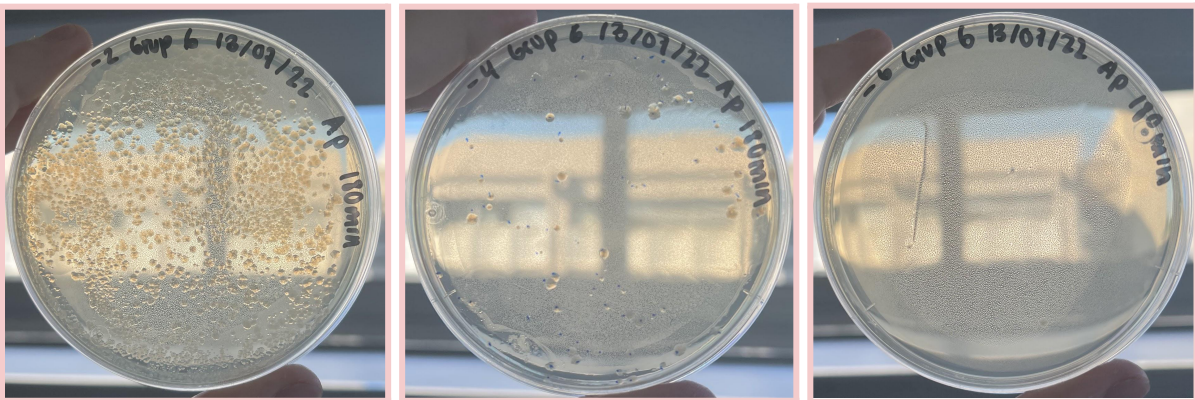
15- Posar totes les plaques sembrades i anotades a incubació.

Resultats

90 minuts:



180 minuts:



Observació, anàlisi i interpretació dels resultats.

-Densitat òptica (DO₅₅₀):

Temps	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
C-	0,295	0,446	0,625	0,826	0,978	1,045	1,059
Ap		0,083	0,06	0,051	0,046	0,042	0,038
Spc		0,36	0,37	0,389	0,408	0,402	0,403
Str		0,34	0,316	0,318	0,309	0,317	0,287
P22 lític		0,367	0,118	0,097	0,07	0,051	0,054

En aquesta taula podem observar que, com era d'esperar, el control negatiu va creixent de manera exponencial, per tant, podem comprovar que el creixement bacterià és correcte. En canvi, amb el tractament dels antibiòtics ampicil·lina i estreptomomicina i el bacteriòfag P22 lític, el creixement bacterià va baixant la major part del temps. En el cas de l'antibiòtic espectinomicina, aquest va pujant lleugerament.

-Recompte de viables (CFU/mL):

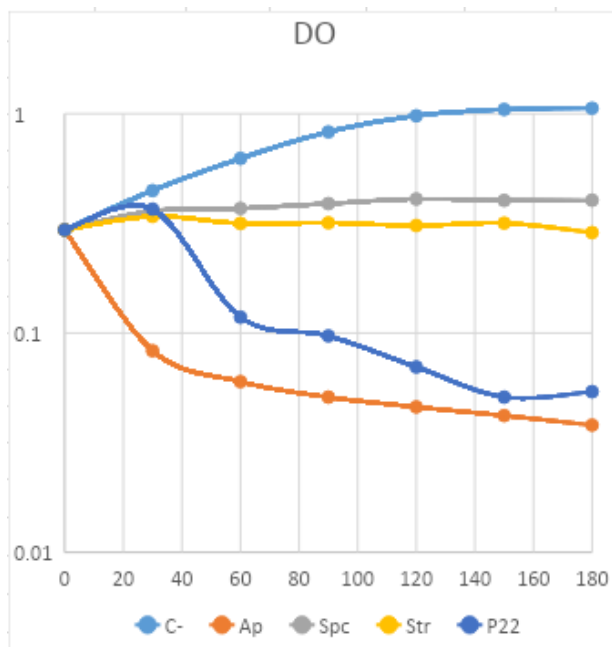
Temps	0 min	90 min	180 min
C-	1,6 · 10 ⁸	9,5 · 10 ⁸	2,13 · 10 ⁹
Ap		1,22 · 10 ⁷	7,4 · 10 ⁶
Spc		1 · 10 ⁸	6 · 10 ⁷
Str		1,89 · 10 ⁵	*
P22 lític		2,1 · 10 ⁵	1,5 · 10 ⁶

*El resultat que falta, és degut a un error en el banc de dilucions i no s'ha pogut calcular el nombre de colònies a la placa.

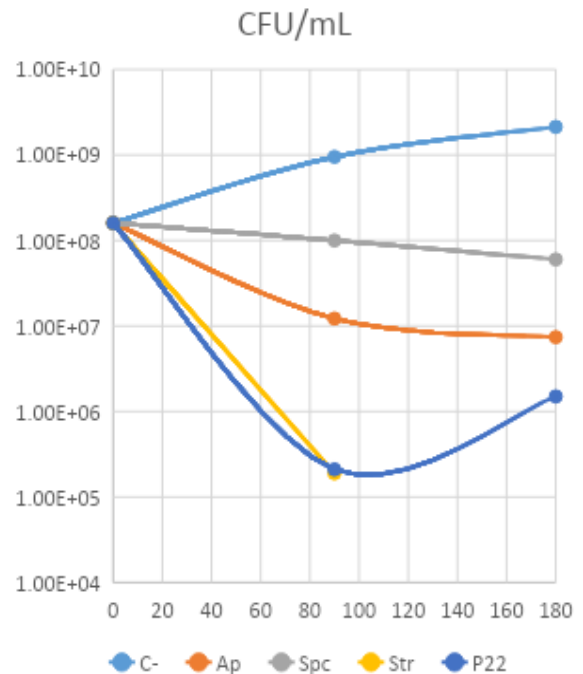
A la taula podem veure que el recompte de viables del control negatiu puja, igual que a la densitat òptica, per tant, la colònia de bacteris es van reproduint i multiplicant. En canvi, en les mostres amb l'ampicil·lina, l'espectinomicina i probablement l'estreptomomicina, el nombre de bacteris baixa. En la mostra amb el bacteriòfag, primer baixa i després, en el minut 180, torna a pujar.

-Representacions gràfiques de la DO_{550} i recompte de viables en escala semilogarítmica:

Densitat Òptica:



Recompte de Viables:



En els gràfics, podem veure que en la mostra del control negatiu la densitat òptica creix exponencialment i el nombre de cèl·lules també augmenta al llarg del temps. Gràcies a aquest control, podem comparar l'efecte dels antibiòtics i el bacteriòfag.

A la gràfica de la densitat òptica es pot veure clarament que l'antibiòtic ampicil·lina i el bacteriòfag P22 lític tenen una activitat bacteriolítica. Lisen i maten els bacteris, al llarg del temps baixa la seva densitat òptica i el recompte de viables. Cap al final del gràfic, en la mostra amb el bacteriòfag P22 lític la densitat òptica comença a augmentar, i això podria ser degut al fet que el bacteri es torna resistent al fag. Això també podria passar a la mostra amb l'ampicil·lina si la deixéssim més estona perquè al final de la gràfica veiem que no baixa sinó que es manté.

Per altra banda, les mostres amb l'antibiòtic espectinomicina i l'estreptomicina, la seva densitat òptica no augmenta al llarg del temps, per tant, no fan lisi. La mostra amb l'antibiòtic espectinomicina, com que es manté tant en la densitat òptica com en el recompte de viables, és un antibiòtic amb efecte bacteriostàtic. En el cas de l'antibiòtic estreptomicina, mata a les cèl·lules bacterianes (baixa el recompte de viables), però no les desintegra (la densitat òptica es manté).

9. Conclusions

Conclusions a partir de les pràctiques

Hipòtesi 1: Potser infectant una soca de *Salmonella* amb el bacteriòfag P22 lític, el P22 lisogènic, el SE1 i el λ per separat, aconseguim eliminar-la.

Els bacteriòfags que han infectat a *Salmonella* i l'han eliminat han sigut el P22 lític, el P22 lisogènic i l'SE1. **El bacteriòfag λ no infecta a *Salmonella*.**

Per tant, la **hipòtesi no és correcta**.

Hipòtesi 2: Potser la soca de *Salmonella* és sensible al tractament amb l'antibiòtic ampicil·lina, amb l'espectinomicina i amb l'estreptomicina per separat.

Els resultats obtinguts a la pràctica 7 permeten comprovar que el creixement bacterià disminueix quan li afegim l'antibiòtic ampicil·lina, l'espectinomicina i l'estreptomicina per separat.

Per tant, la **hipòtesi és correcta**.

Hipòtesi 3: Potser el tractament amb l'antibiòtic ampicil·lina és més eficaç i eficient que el tractament amb els altres dos antibiòtics per separat.

Havent realitzat la pràctica 7, s'observa que la densitat òptica del tractament amb l'ampicil·lina disminueix més que amb els altres dos antibiòtics. No es pot comprovar si el recompte de viables de l'ampicil·lina també sigui menor que el de l'estreptomicina a causa de manca de dades. Considerant la densitat òptica podríem dir que l'ampicil·lina és més eficaç i eficient que els altres dos antibiòtics. Per tant, aquesta hipòtesi només **podem afirmar-la del cert en el cas de la densitat òptica**.

Hipòtesi 4: Potser l'ús del bacteriòfag P22 lític sobre una colònia de *Salmonella* és més efectiu que l'ús dels antibiòtics ampil·lina, espectinomicina i estreptomicina per separat.

Observant els resultats de la densitat òptica de la pràctica 7, es pot apreciar que el bacteriòfag és menys efectiu que l'antibiòtic ampil·lina, però més efectiu que els antibiòtics espectinomicina i estreptomicina. Per contra, en el recompte de viables sí que és més efectiu que els altres tres antibiòtics perquè disminueix més, encara que a partir del temps 90 comenci a créixer. Aquesta **hipòtesi no la podem negar ni confirmar**.

Conclusions finals

Els antibiòtics han estat des de fa dècades els fàrmacs més revolucionaris, podent curar tota mena de malalties i reduint la mortalitat de forma significativa. Tot i això, malgrat tots els avenços en la seva producció, el seu efecte s'ha anat deteriorant de manera gradual fins a arribar a la crisi actual derivant d'un abús descontrolat del consum d'antibiòtics, per part de persones i ramaders, de prescripcions incorrectes i de la manca de recerca. Com a conseqüència, els bacteris i altres microorganismes causants de malalties infeccioses s'han adaptat a la presència d'aquests antibiòtics i han mutat de manera que han adquirit resistència, fent que aquests tractaments resultin inefectius.

Aquesta decadència dels antibiòtics ha motivat el descobriment d'una sèrie d'alternatives, com ara l'ús de bacteriòfags, un tipus de virus que té la capacitat de destruir cèl·lules bacterianes i, per tant, curar infeccions multiresistents. Aquest tractament presenta la seguretat i eficàcia necessària per convertir-se en la nostra millor arma contra els bacteris, sent la solució al problema dels antibiòtics.

Nombrosos casos de pacients que patien infeccions provocades per bacteris multiresistents han utilitzat còctels de diversos bacteriòfags en una mateixa preparació. D'aquesta manera, encara que el bacteri fos resistent a un determinat tipus, el podria atacar un altre bacteriòfag.

Pel treball amb bacteriòfags, cal fer controls per demostrar que s'estan usant fags lítics, evitant, d'aquesta manera, els fags lisogènics, que s'integrarien en el genoma de la cèl·lula hoste i, en conseqüència, no poden produir una lisi ràpida.

Als inicis de la fagoteràpia, les restes del bacteri lisat no s'eliminaven, i això provocava rebuig en el pacient a causa de les endotoxines que contenien aquests preparats. Tanmateix, en l'actualitat, és fàcil de superar, ja que els fags es poden ultracentrifugar perquè perdin les toxines.

Un altre dificultat que pot presentar la teràpia fàgica és que, després de la inserció dels bacteriòfags per tal d'eliminar una infecció bacteriana, aquests virus queden presents en el medi. Tot i que, en un principi, són inofensius, caldrà més temps per veure com evolucionen i si poden suposar alguna amenaça.

Generalment, es consideren positius els efectes que causen els bacteriòfags sobre les soques bacterianes, però, segons els experts, calen més proves i controls per a poder determinar exactament quins poden ser els efectes secundaris que podrien desenvolupar.

En conclusió, podem veure que la fagoteràpia no només és una alternativa als antibiòtics sinó també un aliat d'aquests. Aquests virus representen una arma capaç d'adaptar-se i evolucionar, a més de ser increïblement precisa. Cal tenir en compte que, malgrat la seva capacitat per adaptar-se contra les resistències que desenvolupen els bacteris, hauríem de fomentar l'ús responsable d'aquests agents per evitar complicacions i despeses innecessàries. Un altre factor que cal tenir en compte és que no s'hauria d'abandonar la investigació de nous antibiòtics.

Al llarg d'aquest treball, de recerca, s'ha pogut observar i comprovar que tant els antibiòtics com els bacteriòfags utilitzats, actuen sobre el bacteri *Salmonella enterica* i, per tant, es pot assegurar que els dos mètodes l'aconsegueixen eliminar.

Probablement, els tractaments mixtos d'antimicrobians i fags puguin ser increïblement efectius. Faran falta més estudis futurs per assegurar el bon funcionament d'aquests tractaments.

10. Valoració final

Quan vaig iniciar aquest treball desconeixia el món de la fagoteràpia. L'estada Argó de la Universitat Autònoma de Barcelona, concretament en el Departament de Genètica i Microbiologia de la UAB, m'ha permès aprendre per finalment elaborar el meu treball de recerca sobre l'ús de la fagoteràpia com a nou mètode de teràpia antimicrobiana.

Realitzar el treball m'ha fet créixer:

- Acadèmicament: ampliant la meua visió en el camp de la microbiologia, així com en la fagoteràpia.
- Científicament: adquirint nous coneixements de la metodologia científica, emprant el mètode científic en la meua recerca.
- Experimentalment: treballant en un laboratori universitari i introduint-me en el món de la recerca científica amb professionals i professors.
- Personalment: descobrint i ampliant nous interessos.

Estic molt orgullosa per haver acabat aquest treball de recerca, tot i que m'hauria agradat aprofundir més experimentant amb altres tipus de bacteris, i comparant amb més antibiòtics i bacteriòfags.

Ha estat un tema molt divers i inesperat, però que finalment ha resultat ser curiós i divertit.

11. Bibliografia

- [1] Alós, Juan-Ignacio. *Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global*. 2014. Elsevier España, S.L.U. [en línia] [Data de consulta: 09/09/2022] <<https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-resistencia-bacteriana-antibioticos-una-crisis-S0213005X14003413>>.
- [2] Bertran Prieto, Pol. *Las 12 diferencias entre arqueas y bacterias*. MédicoPlus. [en línia] [Data de consulta: 19/06/2022] <<https://medicoplus.com/ciencia/diferencias-arqueas-bacterias>>.
- [3] Colaboradores de Wikipedia. *Fagoterapia*. Wikipedia, *La enciclopedia libre*. 25 de juny del 2022 [en línia] [Data de consulta: 11/09/2022] <<https://es.wikipedia.org/wiki/Fagoterapia#Historia>>.
- [4] Colaboradores de Wikipedia. *Resistencia a antibióticos*. Wikipedia, *La enciclopedia libre*. 25 de setembre del 2022 [en línia] [Data de consulta: 06/09/2022] <[Resistencia a antibióticos - Wikipedia, la enciclopedia libre](#)>.
- [5] Col·laboradors del projecte Viquipèdia. *Antibiòtic*. Viquipèdia, *l'Enciclopèdia Lliure*. 27 de juliol del 2022 [en línia] [Data de consulta: 07/07/2022] <<https://ca.wikipedia.org/wiki/Antibi%C3%B2tic>>.
- [6] Col·laboradors del projecte Viquipèdia. *Antonie van Leeuwenhoek*. Viquipèdia, *l'Enciclopèdia Lliure*. 11 d'agost del 2022 [en línia] [Data de consulta: 21/06/2022] <https://ca.wikipedia.org/wiki/Antonie_van_Leeuwenhoek>.
- [7] Col·laboradors del projecte Viquipèdia. *Bacteris*. Viquipèdia, *l'Enciclopèdia Lliure*. 19 de setembre del 2022 [en línia] [Data de consulta: 21/06/2022] <<https://ca.wikipedia.org/wiki/Bacteris>>.
- [8] Col·laboradors del projecte Viquipèdia. *Cicle lisogènic*. Viquipèdia, *l'Enciclopèdia Lliure*. 9 de juny del 2022 [en línia] [Data de consulta: 29/06/2022] <https://ca.wikipedia.org/wiki/Cicle_lisog%C3%A8nic>.
- [9] Col·laboradors del projecte Viquipèdia. *Cicle lític*. Viquipèdia, *l'Enciclopèdia Lliure*. 9 de juny del 2022 [en línia] [Data de consulta: 28/06/2022] <https://ca.wikipedia.org/wiki/Cicle_l%C3%ADtic>.
- [10] Col·laboradors del projecte Viquipèdia. *Eucariotes*. Viquipèdia, *l'Enciclopèdia Lliure*. 13 de juliol del 2022 [en línia] [Data de consulta: 19/06/2022] <<https://ca.wikipedia.org/wiki/Eucariotes>>.
- [11] Col·laboradors del projecte Viquipèdia. *Fongs*. Viquipèdia, *l'Enciclopèdia Lliure*. 8 de juny del 2022 [en línia] [Data de consulta: 20/06/2022] <<https://ca.wikipedia.org/wiki/Fongs>>.
- [12] Col·laboradors del projecte Viquipèdia. *Microorganisme*. Viquipèdia, *l'Enciclopèdia Lliure*. 28 de juliol del 2021 [en línia] [Data de consulta: 19/06/2022] <<https://ca.wikipedia.org/wiki/Microorganisme>>.
- [13] Col·laboradors del projecte Viquipèdia. *Procariotes*. Viquipèdia, *l'Enciclopèdia Lliure*. 25 de juny del 2022 [en línia] [Data de consulta: 19/06/2022] <<https://ca.wikipedia.org/wiki/Procariotes>>.
- [14] Col·laboradors del projecte Viquipèdia. *Protists*. Viquipèdia, *l'Enciclopèdia Lliure*. 19 de juny del 2022 [en línia] [Data de consulta: 20/06/2022] <<https://ca.wikipedia.org/wiki/Protists>>.
- [15] Col·laboradors del projecte Viquipèdia. *Virus*. Viquipèdia, *l'Enciclopèdia Lliure*. 19 de setembre del 2022 [en línia] [Data de consulta: 20/06/2022] <<https://ca.wikipedia.org/wiki/Virus>>.
- [16] *Els microorganismes*. [en línia] [Data de consulta: 19/06/2022] <<http://www.xtec.cat/~dnavar7/inici.htm>>.
- [17] *Els virus-Biologia i geologia*. [en línia] [Data de consulta: 07/07/2022] <<https://sites.google.com/site/4biogeo/biologia-cel-lular/els-virus>>.

[18] *Historia de los antibióticos: la batalla entre el hombre y las bacterias*. 20 de juliol del 2021. HIPRA 2022. [en línia] [Data de consulta: 05/07/2022]
<<https://aboutsmallruminants.com/es/historia-antibioticos-cronologia/>>.

[19] ICS Catalunya Central. *La resistència als antibiòtics*. 22 de febrer del 2018. Institut Català de la Salut Catalunya Central. [en línia] [Data de consulta: 05/09/2022]
<[La resistència als antibiòtics - Institut Català de la Salut Catalunya Central \(icscatalunyacentral.cat\)](http://www.icscatalunyacentral.cat)>.

[20] *Microbiologia*. Professors de la Unitat de Microbiologia del Dept. de Genètica i de Microbiologia de la UAB (Fac. Biociències). 2020. [PDF] [Data de consulta: 07/08/2022]
<https://www.copiacopia.es/wp-content/uploads/extra_product_options/9cf121f93906ed07e5e2230d553391d7/MICRO1.pdf>.

[21] Montagud Rubio, Nahum. *Eubacterias: qué son, características y tipos*. 11 de juny del 2021. Psicología y mente. [en línia] [Data de consulta: 19/06/2022]
<<https://psicologiymente.com/salud/eubacterias>>.

[22] Moreno, Claudia, González, Rubén y Beltrán, Constanza. *Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios*. 2009. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello. [en línia] [Data de consulta: 09/09/2022]
<https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-48162009000200014>.

[23] PD-AGRI. *Ventajas y desventajas del uso de fagos y enzimáticos*. 14 de gener del 2019. Misset Uitgeverij B.V. [en línia] [Data de consulta: 11/09/2022]
<<https://es.allaboutfeed.net/ventajas-y-desventajas-del-uso-de-fagos-y-enzimaticos/>>.

[24] Pérez Porto, Julián, y Gardey, Ana. *Viroides*. 2015. Definicion.de. [en línia] [Data de consulta: 29/06/2022]
<<https://definicion.de/viroides/>>.

[25] *Què són els antibiòtics?*. Farmàcies Ecoceutics. [en línia] [Data de consulta: 30/06/2022]
<<https://www.ecoceutics.com/ca/respostes-de-salut/salut/antibiotics/>>.

[26] *Resistencia a los antibióticos: causas, consecuencias y formas de contenerla*. 6 d'abril del 2022. GreenFacts 2001–2022. [en línia] [Data de consulta: 05/09/2022]
<[Resistencia a los antibióticos: causas, consecuencias y formas de contenerla \(greenfacts.org\)](https://greenfacts.org)>.

[27] System_70. *Els virus*. 24 de març del 2021. [PDF] [Data de consulta: 28/06/2022]
<http://cosmolinux.no-ip.org/recursos_aula/BIO2nBAT/Microbiologia/els_virus1.pdf>.

[28] *Transferencia horizontal de genes*. 2022 LUMITOS AG. Quimica.es. [en línia] [Data de consulta: 05/07/2022]
<https://www.quimica.es/enciclopedia/Transferencia_horizontal_de_genes.html>.

Llibres:

[29] Ingraham, John L. i Catherine A. *Introducció a la microbiologia*. Volum 1. Col·lecció Scriptorium. Traducció de la primera edició nordamericana 1999. Editorial Reverté, S.A.

[30] Lepetit (eds). *La resistencia bacteriana*. Cuadernos monograficos.

[31] Robert B. Raffa, Scott M. Rawls, Elena Portyansky Beyzarov. *Farmacología ilustrada*. Netter. Elsevier Masson.

Figura 1:

<https://biolulia.wordpress.com/miscel%C2%B7lania/2-eso/1-els-essers-vius/1-2-la-cel%C2%B7lula/2-2-cel%C2%B7lules-procariotes/>

Figura 2:

<http://www.xtec.cat/~ajimeno/cn1eso/11laclasificacio/11laclasificacio.htm>

Figura 3:

<http://xsierrav.blogspot.com/2017/03/origenes-de-l-microscopio-ii-la-obra-de.html>

Figura 4:

<https://portalacademico.cch.unam.mx/biologia2/caracteristicas-generales-dominios-y-reinos/caracteristicas-generales-tres-dominios>

Figura 5:

https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Curva_de_crecimiento.png

Figura 6:

<https://es.dreamstime.com/transferencia-de-gen-es-por-ejemplo-bacterias-evoluci%C3%B3n-horizantal-y-vertical-contacto-celda-del-donante-destinatario-gen%C3%A9tica-image196348166>

Figura 7:

<https://es.dreamstime.com/transferencia-de-gen-es-mecanismos-horizontales-gen%C3%A9tica-horizantal-conjugaci%C3%B3n-adn-trav%C3%A9s-un-pl%C3%A1smido-una-c%C3%A9lula-donante-image199112202>

Figura 8:

<https://www.significados.com/celula-procariota/>

Figura 9:

<https://www.juntadeandalucia.es/averroes/centros-tic/29000694/helvia/aula/archivos/repositorio/0/10/html/microbio.html>

Figura 10:

https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-1-Estructura-bacteriana-on-LPS-son-els-lipopolisacarids-Basat-en-figura-2_fig2_308653548

Figura 11:

<https://www.infodeakos.com/post/fimbrias-adhesinas-pili-y-flagelos>

Figura 12:

<https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/dna-and-rna-structure/a/prokaryote-structure>

Figura 13:

<https://selectivitatbiologia.weebly.com/metabolisme.html>

Figura 14:

https://www.ecured.cu/C%C3%A9lula_eucariota

Figura 15:

<https://www.elgencurioso.com/diccionario/celula-procariota/>

Figura 16:

<https://genotipia.com/virus-estructura/>

Figura 17:

<https://microbiologiageneraluvg.wordpress.com/2013/08/24/estructura-y-replicacion-de-los-virus/>

Figura 18:

https://ioc.xtec.cat/materials/FP/Recursos/fp_cai_c06/_web/fp_cai_c06_htmlindex/WebContent/u2/a1/continguts.html

Figura 19:

https://ca.wikipedia.org/wiki/Cicle_l%C3%ADtic

Figura 20:

<https://docplayer.es/48121212-La-cel-lula-1r-nom-cognoms-grup-biologia-jordi-carmona.html>

Figura 21:

<https://delphipages.live/ro/stiinta/chimie/reverse-transcriptase>

Figura 22:

<https://slideplayer.es/slide/14447829/>

Figura 23:

<https://www.abc.com.py/edicion-impresa/suplementos/escolar/2020/04/14/virus-viroides-y-prions/>

Figura 24:

<https://slidetodoc.com/microbiologia-aplicada-docente-mirna-muoz-2013-reinos-de/>

Figura 25:

<https://slideplayer.es/slide/3118658/>

Figura 26:

https://ca.wikipedia.org/wiki/%C3%80cid_f%C3%B2lic

Figura 27:

<https://aboutsmallruminants.com/es/historia-antibioticos-cronologia/>

Figura 28:

<http://enfeps.blogspot.com/2012/07/la-primera-inyeccion-al-hombre-de.html>

Figura 29:

[Resistencia a los antibióticos: causas, consecuencias y formas de contenerla \(greenfacts.org\)](http://greenfacts.org)

Figura 30, 31, 32, 33 i 34:

<https://drive.google.com/file/d/1xhEoGRr4ZhbypgWW7gb5R2Ajl-S4aVMD/view?usp=sharing>

Figura 35:

<https://www.cienciaoberta.cat/bacteriofags/>

Figura 36:

<https://www.revistac2.com/la-interesante-historia-de-los-virus-que-comen-bacterias/felix-d-herelle/>

Figura 37:

https://es.linkedin.com/company/g--eliava-institut-e-of-bacteriophages-microbiology-and-virology?trk=similar-pages_result-card_full-click

Figura 38:

<https://www.bbc.com/portuguese/vert-fut-55815174>

Figura 39:

https://www.copiacion.es/wp-content/uploads/extra_product_options/9cf121f93906ed07e5e2230d553391d7/MICRO1.pdf

Figura 40:

<https://blocs.xtec.cat/labobiogeofxv/2018/06/29/successio-ecologica-de-comunitats-microbianes/>

Figura 41:

http://www.gdlaromanica.cat/campus/pluginfile.php/26521/mod_resource/content/1/UD5_NA1_4_Sembres.pdf





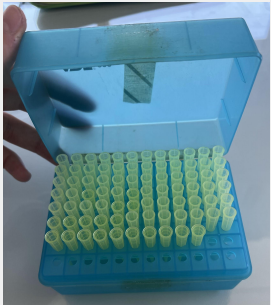
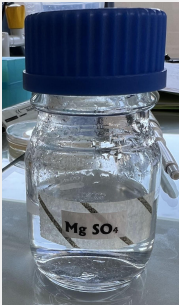
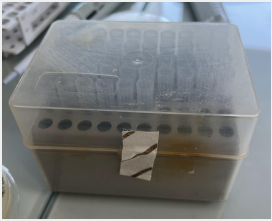


Figura portada:



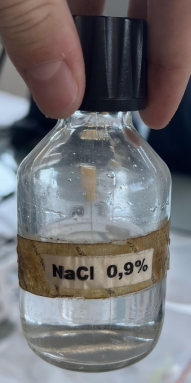
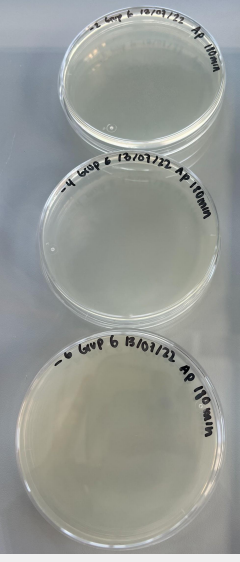
<https://avinews.com/los-bacteriofagos/>

Les altres figures són pròpies.

12. Annex

MATERIAL DE LABORATORI UTILITZAT EN LES PRÀCTIQUES:

			
<p>Medi LB tou (0,7%)</p>	<p>Cultiu de nit (overnight (ON)) de <i>S. enterica</i></p>	<p>Micropipeta groga</p>	<p>Micropipeta blava</p>
			
<p>Bunsen</p>	<p>Puntes grogues</p>	<p>MgSO₄</p>	<p>Puntes blaves</p>
			
<p>Espectrofotòmetre</p>	<p>Xeringa i filtre amb membrana de 0,45 µm de diàmetre de porus</p>	<p>Nanses de Digiralsky</p>	<p>Agitador de bany</p>

			
<p>Vòrtex</p>	<p>Tubs Eppendorf</p>	<p>NaCl (0,9%)</p>	<p>Plaques de Petri amb agar LB sòlid</p>
<p>Centrifugadora</p>		<p>Agitador</p>	