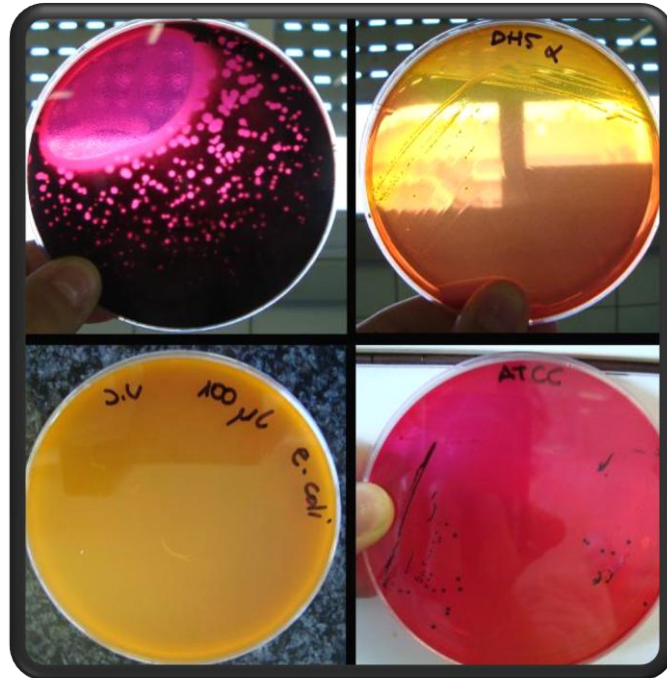


# FAGOTERÀPIA COM ALTERNATIVA AL TRACTAMENT AMB ANTIMICROBIANS



*“L’enemic del nostre enemic és el nostre amic;*

*Aquest és un bon lema per a la fagoteràpia.”*

## AGRAÏMENTS

A la meva tutora, per la seva ajuda i dedicació; a tots els professors de Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, per la paciència i el treball desinteressat; i, és clar, a la meva família, per tot el que queda, que no és pas poc.

## ÍNDEX GENERAL

<b>0. Introducció</b> .....	9
0.1. Hipòtesi.....	9
<b>1. Els microorganismes</b> .....	11
1.1 Els bacteris.....	12
1.1.1 Importància dels bacteris.....	12
1.1.2 Definició de bacteri .....	12
1.1.3 Estructura bacteriana.....	13
1.1.4 Fisiologia dels bacteris .....	14
1.1.5 Tipus de bacteris .....	16
1.2 Els virus.....	17
1.2.1 Definició de virus.....	17
1.2.2 Estructura dels virus.....	17
1.2.3 Viroides i prions .....	18
1.2.4 Cicle dels virus.....	18
1.2.5 Els bacteriòfags .....	19
1.2.5.1 Definició de bacteriòfag.....	19
1.2.5.2 Cicle lític .....	20
1.2.5.3 Cicle lisogènic.....	21
1.2.5.4 Teràpia fàgica.....	22
<b>2. Els antibiòtics</b> .....	23
2.1. Definició d'antibiòtic.....	23
2.2. Classificació dels antibiòtics.....	23
2.3. Característiques dels antibiòtics utilitzats en el treball.....	23

<b>3. Tècniques generals</b> .....	24
3.1. Material i equipament bàsic.....	24
3.2. Tècniques d'esterilització .....	25
3.3. Medis de cultiu .....	26
3.3.1. Tipus de medis de cultiu .....	27
3.3.2. Mètodes de preparació de medis de cultiu .....	27
3.4. Mètodes de recompte de microorganismes .....	29
3.5. Mètodes d'aïllament de microorganismes.....	31
3.5.1. Aïllament per dilució .....	31
3.5.2. Aïllament per esgotament en placa .....	31
3.6. Observació de microorganismes: tincions.....	32
3.6.1. Protocol de tinció simple .....	33
3.6.2. Protocol de tinció de Gram .....	33
<b>4. Metodologies bàsiques del treball amb bacteriòfags</b> .....	34
4.1. Aïllament de fags .....	34
4.2. Test de la gota .....	34
4.3. Titulacions.....	35
4.4. Tinció de calves.....	36
<b>5. Aplicacions dels bacteriòfags: fagoteràpia</b> .....	37
5.1. Pràctica: Evolució de la soca bacteriana LT2 davant d'un bacteriòfag lític, un de lisogènic, i tres antibiòtics diferents.....	38
<b>6. Resultats</b> .....	41
6.1 Seguiment DO.....	41
6.2 Viables .....	42
<b>7. Conclusions</b> .....	44

<b>8. Annexos</b> .....	46
8.1. Material i equipament d'un laboratori de microbiologia .....	46
8.2. Unitats .....	50
<b>9. Glossari</b> .....	51
<b>10. Bibliografia</b> .....	56

## ÍNDEX D'IL·LUSTRACIONS

Figura 1. Diferents morfologies dels bacteris .....	12
Figura 2. Estructura bacteriana .....	14
Figura 3. Càpsida vírica helicoïdal .....	18
Figura 4. Càpsida vírica complexa .....	18
Figura 5. Càpsida vírica icosaèdrica.....	18
Figura 6. Bacteriòfags adherint-se a una cèl·lula hoste .....	19
Figura 7. Bacteriòfag vist amb el microscopi electrònic .....	19
Figura 8. Cicle lític.....	20
Figura 9. Cicle lisogènic .....	21
Figura 10. Antibiòtics.....	23
Figura 11. Material de laboratori .....	24
Figura 12. Bunsen.....	24
Figura 13. Plaques amb medi sòlid.....	26
Figura 14. Ampolles amb medi líquid.....	26
Figura 15. Medi sòlid refredant-se .....	28
Figura 16. Plaquejar.....	28
Figura 17. Procediment per a la determinació de viables utilitzant dilucions seriades.....	30
Figura 18. Sembra per estria en <i>ziga-zaga</i> .....	31
Figura 19. Sembra en escocès .....	31
Figura 20. Preparació d'un <i>frottis</i> .....	32
Figura 21. Colorants per a fer la tinció de mostres bacterianes .....	33
Figura 22. Mostra bacteriana tenyida.....	33

Figura 23. Acció dels bacteriòfags sobre la soca bacteriana LT2 .....	34
Figura 24. Recompte de calves a partir de la titulació .....	36
Figura 25. Mostra bacteriana amb bacteriòfags tenyida .....	36
Figura 26. Corba d'infecció bacteriana estàndard .....	37
Figura 27. Modificació de la corba d'infecció bacteriana amb la inserció d'un fag lític .....	37
Figura 28. Modificació de la corba d'infecció bacteriana amb la inserció d'un fag lisogènic .....	38
Figura 29. Espectrofotòmetre .....	39



## 0. INTRODUCCIÓ

El tema que havia escollit inicialment pel meu treball de recerca girava entorn dels antibiòtics, però l'oportunitat que em va presentar l'Estada a l'Empresa al Departament de Genètica i Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, em va obrir noves portes. Vaig poder triar entre diversos temes que ens oferien i em vaig decidir per "la fagoteràpia com alternativa al tractament amb antimicrobians". És a dir, poder donar suport o no a una teràpia, experimentant de manera *in vitro*.

L'estada es va dividir en dues parts: primer de tot, una part teòrica per conèixer els conceptes més bàsics de la microbiologia. Llavors, vaig tenir l'oportunitat de fer pràctiques al laboratori de microbiologia de la mateixa universitat.

Puc dir que he gaudit fent aquest treball, ja que poder realitzar pràctiques en un laboratori de recerca universitari, quan tot just havia acabat el primer curs de batxillerat, ha estat tota una experiència.

Aquest treball de recerca es divideix, bàsicament, en tres parts. La primera part és una introducció teòrica al món dels microorganismes i els antibiòtics. A la segona part hi explico les tècniques i metodologies bàsiques que he hagut d'utilitzar per a poder realitzar la tercera part. Així doncs, aquesta última part, és la més experimental. El que he fet ha estat escollir una soca bacteriana concreta, i assignar-li dos bacteriòfags i tres antibiòtics concrets, amb els quals ha estat infectada. A partir d'això, he pogut veure com ha actuat cada element i he pogut treure'n conclusions.

Actualment, la hipòtesi de si la teràpia fàgica pot ser una alternativa eficaç per a combatre infeccions bacterianes i, en algun moment, podria arribar a substituir l'ús dels antibiòtics, està sent estudiada per experts d'arreu del món. Per tant, aquest és un tema molt actual el qual encara està en procés de desenvolupament. Val a dir que alguns països ja han posat aquesta teràpia en pràctica en alguns camps, però els experts afirmen que cal observar quins podrien ser els efectes secundaris de la utilització de bacteriòfags.

### 0.1 Hipòtesi

La hipòtesi d'aquest treball és si la soca bacteriana *Salmonella enterica* serovarietat Typhimurium LT2 pot ser eliminada pels bacteriòfags L1 i P22. També té com a objectiu comprovar si els antibiòtics ampil·lina (Ap), espectinomicina (Spc) i estreptomicina (Str) eliminen aquesta infecció.

Els resultats a esperar són que tant els bacteriòfags com els antibiòtics inhibeixin o destrueixin els bacteris, però cal veure de quina manera ho fan, amb quines semblances i diferències.

## 1. ELS MICROORGANISMES

La microbiologia és la ciència que es dedica a l'estudi dels microorganismes\*, un grup molt ampli i divers d'organismes microscòpics, amb la capacitat de realitzar els seus processos vitals de creixement, generació d'energia i reproducció, independentment d'altres cèl·lules\*. Els microorganismes poden ser unicel·lulars\* o pluricel·lulars\*. D'altra banda hi ha microorganismes que són autòtrofs\* i, d'altres que són heteròtrofs\*. Per observar-los es necessita utilitzar el microscopi òptic o electrònic.

Els microorganismes influeixen en totes les formes de vida de la Terra, i els podem trobar tant en ambients familiars com en llocs poc comuns, inclosos molts hàbitats amb condicions extremes de humitat, temperatura o pressió: fons oceànics, deserts, guèisers, etc. Es coneixen alguns microorganismes que són capaços de resistir força temps en el buit, i d'altres extremadament resistents a la radioactivitat. També n' existeixen que són capaços de resistir temperatures (altes i baixes) extremes i concentracions de sal molt elevades.

Els microorganismes també interactuen amb la majoria d'organismes pluricel·lulars. El cos humà és ple de microorganismes que no són perjudicials, sinó que són beneficiosos. També n'hi ha molts tipus que poden produir malalties, els anomenats patògens\*. Alguns microorganismes són utilitzats en processos biotecnològics: la fermentació del pa, la producció de begudes alcohòliques, la purificació d'aigües residuals, etc.

El món microbià està format per cinc grups:

- Algues
- Fongs
- Protozous
- Virus\*
- Bacteris\*

Aquest treball es centrarà en els bacteris i els virus.

---

\*Les paraules amb asterisc (\*) estan incloses dins del glossari amb una breu definició (ordenació per ordre alfabètic).

## 1.1. Els bacteris

### 1.1.1 Importància dels bacteris

Es poden trobar bacteris a tots als ambients del planeta Terra. S'ha vist l'interès del seu estudi per la comprensió de la fisiologia\* cel·lular, de la síntesi de proteïnes i de la genètica\*. Tot i que els bacteris patògens semblen ser els més preocupants, la seva importància en la naturalesa és menor. El paper dels bacteris no patògens és fonamental: intervenen en el cicle del nitrogen i del carboni, i també en el metabolisme del sofre, el fòsfor i el ferro. Els bacteris que es troben al sòl i a les aigües són indispensables per a l'equilibri biològic.

A més, els bacteris són utilitzats en les indústries alimentàries i químiques, ja que intervenen en la síntesi de vitamines i antibiòtics\*.

### 1.1.2 Definició de bacteri

Anthony van Leeuwenhoek va ser el primer en observar els bacteris, el 1683, usant un microscopi d'una sola lent que ell mateix dissenyà. Però el mot *bacteri* no va ser emprat fins molt més tard quan al 1828, Ehrenberg, el proposà usant una paraula grega que vol dir "petit bastó".

Els bacteris, tot i que són organismes molt simples, unicel·lulars i procariotes\*, amb escasses estructures internes i tan sols quatre tipus de formes externes, presenten una gran variabilitat de metabolismes\*, des de l'heteròtrof fins a l'autòtrof, i des de l'aerobi\* fins a l'anaerobi\*. Tenen una mida que pot oscil·lar entre 1,5µm i 7µm.

Hi ha quatre tipus morfològics de bacteris:

- Els bacils, en forma de bastó
- Els cocs, de forma esfèrica
- Els espirils, en forma de bastó cargolat
- Els vibrions, en forma de coma ortogràfica

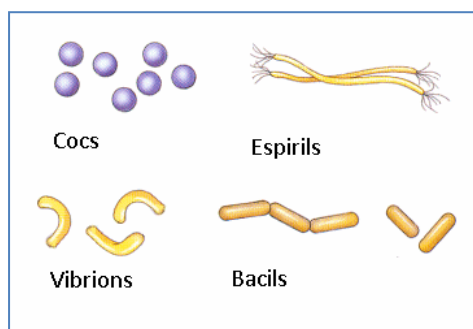


Fig. 1 Diferents morfologies dels bacteris.

Font: Reino Monera.

Alguns bacteris poden formar agrupacions d'individus, ja que es mantenen units entre si mitjançant components químics de la càpsula bacteriana.

### 1.1.3 Estructura bacteriana

Els components estructurals més importants dels bacteris són:

La paret bacteriana: és una coberta rígida que dóna forma a les cèl·lules. La diferent composició de la paret bacteriana fa que els bacteris reaccionin de manera diferent quan es fa la tinció de Gram\*. Els bacteris grampositius (gram<sup>+</sup>)\* queden tenyits de color blau, mentre que els bacteris gramnegatius (gram<sup>-</sup>)\* queden tenyits de color vermell.

La membrana plasmàtica: és la coberta que envolta el citoplasma. La seva funció és delimitar el bacteri i regular el pas de substàncies nutritives. Conté nombrosos sistemes enzimàtics i és on es formen els components de la càpsula i la paret bacteriana.

Aquesta membrana actua com a barrera osmòtica i regula el transport de productes cel·lulars cap a l'exterior.

El citoplasma, que conté el citosol i el morfoplasma (ribosomes i inclusions): aproximadament el 85% del citoplasma és aigua. Els ribosomes que conté estan formats per RNA\* ribosòmic. Els antibiòtics actuen sobre els ribosomes bacterians alterant-ne la seva funció.

El DNA bacterià: format per una cadena doble de DNA\* circular.

Hi ha altres components, que els poden presentar o no:

La càpsula bacteriana: és una capa de mucosa formada per diferents polisacàrids que envolta la paret bacteriana. Només la presenten alguns bacteris. És rígida i el seu gruix és molt variable. Aquesta càpsula protegeix el bacteri de la fagocitosis\*.

Els flagels: són estructures proteiques responsables del moviment del bacteri.

La pili: estructures curtes adherides a la paret bacteriana que faciliten l'adherència del bacteri a l'hoste. Només són presents als bacteris gramnegatius.

Els plasmidis: elements formats per DNA circular de doble cadena. Es troben al citoplasma.

L'espore bacteriana: és una estructura de resistència present en algunes espècies bacterianes que els permet sobreviure en condicions extremadament desfavorables. El material genètic de la cèl·lula es concentra i s'envolta per una capa protectora, que fa que sigui impermeable a la

dessecació, la calor i molts agents químics. El bacteri redueix la seva activitat metabòlica. Quan les condicions són més favorables es produeix la germinació, que origina una cèl·lula única que, posteriorment, es reproduïx. L'espóra no es tenyeix amb els colorants habituals, i s'identifica com una zona clara, rodona o ovalada, que contrasta amb la resta del bacteri que es veu tenyit de color al microscopi òptic.

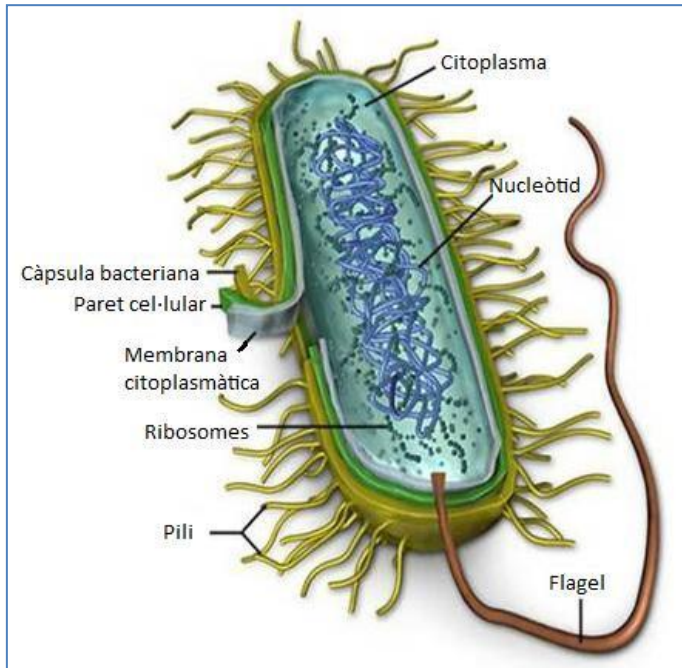


Fig. 2 Estructura bacteriana.

Font: [Todofisicoquimica](#).

#### 1.1.4 Fisiologia dels bacteris

Els bacteris necessiten una aportació energètica per desenvolupar-se. La font d'energia que utilitzen és molt variada: hi ha bacteris que utilitzen la llum, els processos d'oxidació-reducció, la matèria orgànica...

A més a més dels elements indispensables per a la síntesi dels seus components i d'una font d'energia, certs bacteris tenen factors de creixement, que són unes substàncies específiques, indispensables pel creixement. El creixement bacterià és proporcional a la concentració dels factors de creixement. D'aquesta manera, les vitamines que constitueixen els factors de creixement per a certs bacteris, poden ser dosificats per mètodes biològics.

Per determinar el creixement dels bacteris s'ha de fer un seguiment, durant un temps determinat, del número de bacteris per unitat de volum. S'utilitzen mètodes directes com el recompte mitjançant el microscopi, o el recompte de colònies en un cultiu, i també mètodes indirectes com la densitat òptica (DO)\*. En una corba de creixement bacterià hi trobem sis etapes. La fase de latència i la fase exponencial (on la taxa de creixement és màxima) són les

més importants. El creixement bacterià s'atura quan s'exhaureix un o varis aliments, s'acumula una substància nociva o el pH\* es torna desfavorable.

### **Funció de nutrició**

Els bacteris poden dur a terme tots els tipus de metabolismes que hi ha. A més, una mateixa espècie pot, fins i tot, tenir dos tipus de metabolisme diferents, segons les característiques del medi i l'abundància de nutrients. Poden ser fotoautòtrofs, fotoheteròtrofs (requereixen energia lluminosa, però també molècules orgàniques), quimioautòtrofs i quimiheteròtrofs (s'alimenten de matèria orgànica morta o viva).

### **Funció de relació**

Moltes espècies de bacteris disposen de mobilitat. El desplaçament es pot fer mitjançant els flagels, moviments de contracció i dilatació, o per reptació sobre un substrat sòlid.

S'han comprovat respostes davant d'estímuls lluminosos (fototactisme) en bacteris fotosintètics, i també d'estímuls químics (quimiotactisme). Per exemple, una de les respostes més conegudes respecte a variacions del medi és la formació d'espores, que són un forma de resistència a condicions desfavorables.

### **Funció de reproducció**

La reproducció dels bacteris és de tipus asexual i es duu a terme per mitjà de la bipartició\* o fissió binària. Els bacteris descendents són genèticament idèntics al progenitor, per la qual cosa les colònies de bacteris estan formades per clons.

Els bacteris tenen mecanismes relacionats amb la reproducció anomenats parasexuals, per mitjà dels quals intercanvien informació genètica amb altres bacteris, siguin o no de la mateixa espècie.

Hi ha tres tipus de mecanismes d'intercanvi genètic:

- Conjugació: el bacteri donador transmet DNA per mitjà d'un pèl sexual a un altre bacteri receptor.
- Transducció: fenomen d'intercanvi genètic accidental a través d'un agent transmissor, generalment un virus.
- Transformació: un bacteri introdueix a dins seu fragments de DNA que estaven lliures en el medi i procedien de la lisi\* d'altres bacteris.

### 1.1.5 Tipus de bacteris

La classificació dels bacteris és molt complexa i no només es basa en les característiques morfològiques, sinó també en la manera en què es tenyeixen amb els colorants (gram<sup>+</sup>, gram<sup>-</sup>), en la manera de formar colònies, en el tipus de nutrició, en la fisiologia (tolerància a la temperatura i al pH, requeriments d'oxigen i sals), en la bioquímica, la genètica i les anàlisis moleculars.

Actualment es coneixen unes 9000 espècies de bacteris, però els especialistes estimen que n'hi pot haver més de 10 milions. Les espècies conegudes s'agrupen en més de 20 fílums\*, i tots pertanyen al regne\* de les moneres i dominis\* *Archaea* i *Bacteria*.

Els principals grups de bacteris són els bacteris porpres i verds, els cianobacteris, els bacteris nitrificants, els fixadors de nitrogen, els entèrics, les espiroquetes, els bacteris de l'àcid làctic, els micoplasmes... entre d'altres.

La soca\* bacteriana utilitzada en aquest treball per fer les pràctiques és la *Salmonella enterica* serovarietat Typhimurium LT2, que pertany dins del grup dels bacteris entèrics. Els treballadors de la Universitat Autònoma de Barcelona van escollir aquesta soca per fer les pràctiques, ja que és fàcil de manipular, té un baix risc d'infecció i té un preu assequible.



## 1.2 Els virus

### 1.2.1 Definició de virus

Els virus són partícules microscòpiques constituïdes per un àcid nucleic (DNA o RNA) envoltat per una càpsula proteica i, de vegades, una coberta membranosa. Quan es troben fora de les cèl·lules són totalment inerts, tot i que contenen la informació necessària pel seu cicle reproductor.

Els virus són capaços d'adherir-se a la superfície de les cèl·lules, introduint en elles el seu material genètic (genoma víric) i reproduir-se utilitzant la matèria, l'energia i el sistema enzimàtic de la cèl·lula hoste que ha envaït. Per tant, els virus són paràsits intracel·lulars obligats.

Segons l'hoste que parasiten, els virus es classifiquen en virus bacterians o bacteriòfags\*, virus vegetals i virus animals. Altres criteris de classificació són segons si tenen DNA o RNA, la forma de la càpsula proteica, o la presència o no de coberta membranosa.

Existeixen diverses opinions sobre si els virus són una forma de vida o si només són estructures orgàniques que interactuen amb els éssers vius. Per això, alguns autors es refereixen a aquests com a "organismes al límit de la vida". És a dir, tot i que disposen de material genètic i es poden reproduir, necessiten una cèl·lula hoste per fer-ho i, a més, no tenen estructura cel·lular.

### 1.2.2 Estructura dels virus

Genoma víric: està format per una o més molècules de DNA o RNA, lineal o circular.

Càpsida: és la coberta proteica que envolta el genoma víric. La seva funció és protegir l'àcid nucleic i reconèixer els receptors de membrana de les cèl·lules que el virus parasita. El conjunt del genoma víric i la càpsida s'anomena nucleocàpsida. Està formada per proteïnes globulars anomenades capsòmers, que s'ordenen d'una manera regular i simètrica. Hi ha diferents tipus de càpsides: icosaèdrica, helicoïdal i complexa.

Coberta membranosa: està formada per una doble capa lipídica que procedeix de les cèl·lules parasitades, i per glicoproteïnes que tenen la funció de reconèixer la cèl·lula hoste.

S'anomena virió la partícula vírica morfològicament completa i capaç d'infectar a cèl·lules.

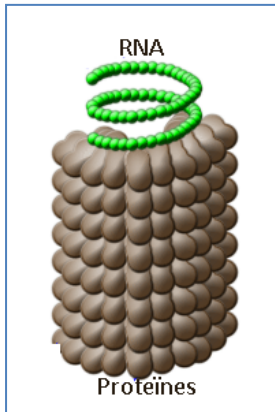


Fig. 3 Càpsida vírica helicoidal.

Font: Bionova.

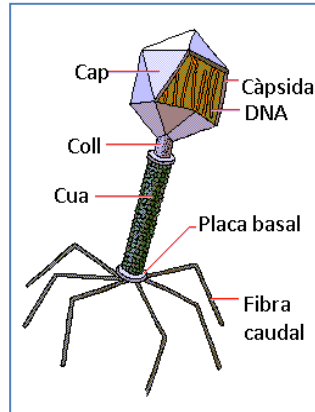


Fig. 4 Càpsida vírica complexa.

Font: *Ciències para el mundo contemporáneo*.

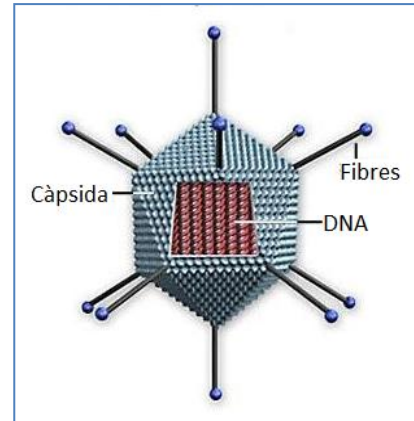


Fig. 5 Càpsida vírica icosaèdrica.

Font: Bionova.

### 1.2.3 Viroides i prions

Els virus són molt simples estructuralment, però encara es coneixen altres agents infecciosos més simples: els viroides i els prions.

Els viroides són cadenes simples de RNA que no tenen coberta proteica. El que fan és penetrar al nucli de la cèl·lula infectada, on sintetitzen més viroides. Només infecta a cèl·lules vegetals.

Els prions són proteïnes amb una forma espacial diferent a les proteïnes normals. Normalment es troben a la membrana de les neurones, i són capaces d'induir que les proteïnes normals de la cèl·lula adoptin la forma de prió.

### 1.2.4 Cicle dels virus

Els virus no tenen funció de nutrició i, per tant, no necessiten energia ni matèria per créixer. Tampoc no necessiten energia per relacionar-se, ja que el contacte amb les cèl·lules de l'hoste és a l'atzar. En canvi, presenten mecanismes interns que els permeten reproduir-se dins de les cèl·lules hoste i desenvolupar un cicle vital, que consta de diferents parts:

1. Fixació o adsorció: el virus entra en contacte amb la cèl·lula hoste de manera fortuïta i s'hi adhereix. Hi ha una gran especificitat en aquest contacte, ja que en la superfície de les cèl·lules hoste hi ha diverses molècules que actuen com a receptors que permeten l'adhesió de virions.
2. Penetració: els virus perforen la paret cel·lular mitjançant enzims i introdueixen el material genètic al citoplasma bacterià.

3. Replicació del genoma víric i síntesi de capsòmers: el material genètic del virus es replica dins del citoplasma bacterià i es sintetitzen proteïnes, com els capsòmers.
4. Acoblament dels nous virus: els capsòmers acabats de formar s'uneixen formant càpsides, mentre que les molècules de material genètic es pleguen i penetren a les càpsides.
5. Lisi o alliberament: a causa d'un enzim, es produeix la lisi del bacteri i els nous virions formats surten a l'exterior i ja són capaços d'infectar altres bacteris.

## 1.2.5 Els bacteriòfags

### 1.2.5.1 Definició de bacteriòfag

Els bacteriòfags, també anomenats fags, són virus especialitzats a parasitar cèl·lules bacterianes. Tenen moltes formes i mides diferents, però la seva estructura, bàsicament, és una càpsida complexa. La càpsida complexa consta de dues parts: el cap, de tipus icosaèdric i que conté l'àcid nucleic, i la cua, adaptada per a la injecció de l'àcid nucleic a l'interior del bacteri. A la base de la cua hi ha una placa basal que té espines i a la qual s'uneixen fibres causals.



Fig. 6 En aquesta imatge es poden veure bacteriòfags adherint-se a una cèl·lula bacteriana hoste, i d'altres que ja hi han penetrat. També s'hi poden veure càpsides blanques, que són les que han injectat el seu material genètic dins el bacteri. Es pot fer una comparació de la mida dels fags amb la mida del bacteri.

Font: Interactive Biology.

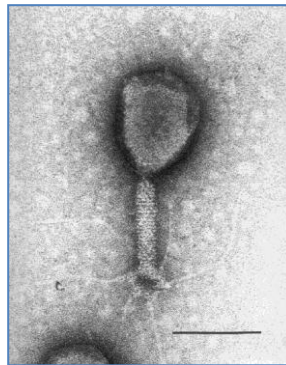


Fig. 7 Bacteriòfag observat amb un microscopi electrònic.

Font: Bacteriologia e Immunologia On-line.

### 1.2.5.2 Cicle lític

S'anomena així perquè finalitza amb la lisi o ruptura de la cèl·lula hoste. La majoria de bacteriòfags segueixen el mateix patró en el cicle lític:

- Fase de fixació: les fibres caudals del virus són les primeres en entrar en contacte amb la paret del bacteri, i s'hi fixen mitjançant enllaços químics. Posteriorment, claven les espines basals a la paret bacteriana.

- Fase de penetració: el fag perfora la paret cel·lular del bacteri per mitjà d'enzims lisozims situats a la placa basal. Aleshores, la beina de la cua es contrau i introdueix el material genètic a través d'aquesta perforació. El genoma víric passa directament al citoplasma bacterià.

- Fase d'eclipsi: en aquest període no s'observa res anormal a l'interior del bacteri, ni tan sols els mateixos virus. En realitat, però, és quan hi ha més activitat metabòlica. Una vegada el DNA víric entra a l'interior del bacteri, es transcriu en RNA missatger (RNAm) utilitzant els nucleòtids i enzims del bacteri. El RNAm víric és traduït pels ribosomes bacterians, i es sintetitzen proteïnes enzimàtiques i estructurals.

Les proteïnes enzimàtiques fan que el DNA víric es repliqui varies vegades, mentre que les proteïnes estructurals formen els capsòmers i les cues dels virus.

- Fase d'acoblament: els capsòmers acabats de formar es reuneixen formant càpsides, mentre que les noves molècules de DNA víric es pleguen i penetren a les càpsides.

- Fase de lisi: per l'acció d'un enzim, la membrana plasmàtica i la paret que envolta el bacteri es trenca (lisi cel·lular).

D'aquesta manera, els nous virus que s'han format en el seu interior surten i podran infectar a altres bacteris.

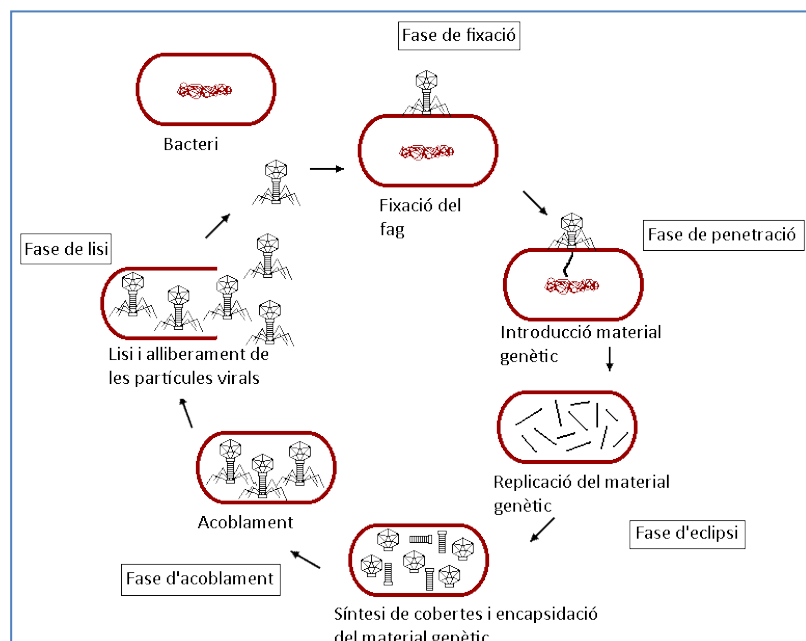


Fig. 8 Cicle lític.

Font: Biologia  
Médica.

### 1.2.5.3 Cicle lisogènic

Alguns virus, quan infecten a un bacteri, no li produeixen la lisi immediata, sinó que insereixen el seu material genètic al cromosoma bacterià. Aquest fenomen s'anomena lisogènia, i aquests virus, atenuats o pròfags.

En estat de lisogènia, un bacteri és immune a infeccions causades pel mateix tipus de virus que el pròfag que té integrat en el seu DNA. Aquesta resistència s'hereta de generació en generació de la cèl·lula hoste, ja que el DNA pròfag s'hereta juntament amb el DNA cel·lular.

El DNA del pròfag pot viure en forma latent durant diverses generacions de la cèl·lula hoste, fins que un estímul determinat induïx la separació del DNA del pròfag del DNA del bacteri. Llavors, s'inicia el cicle lític que produirà la lisi bacteriana.

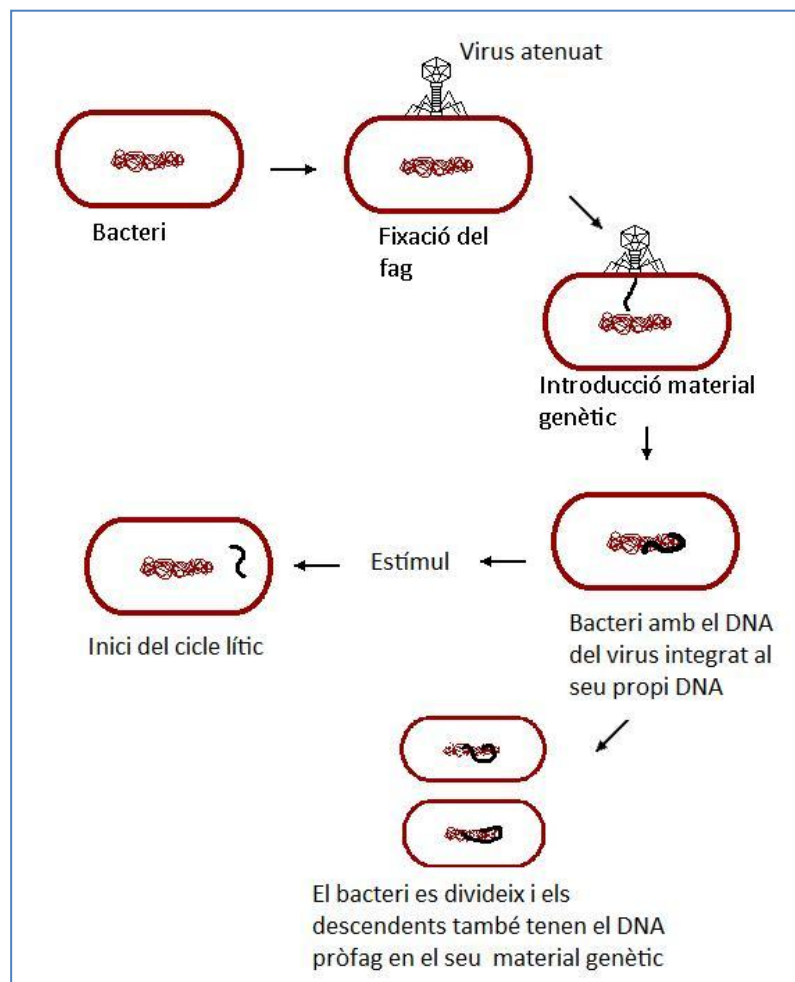


Fig. 9 Cicle lisogènic.

Font: Biología Médica.

#### 1.2.5.4 Teràpia fàgica

La teràpia fàgica o fagoteràpia consisteix en utilitzar bacteriòfags, virus que infecten a bacteris, per tal de tractar malalties causades per aquests microorganismes.

Els bacteriòfags es troben pràcticament a qualsevol lloc del planeta, són paràsits obligats i altament específics sobre determinades soques bacterianes. S'ha proposat la seva utilització tant per a combatre bacteris que produeixen infeccions en humans, com en animals i cultius.

També s'ha proposat el seu ús en ambients alimentaris i hospitalaris, amb la finalitat d'evitar el creixement de bacteris en aquestes zones. Tot i que es considera que els fags, de moment, no substituiran als antibiòtics, podrien ser d'una gran utilitat si actuen de forma coordinada amb aquests.

#### **Història de la fagoteràpia**

La història de la teràpia fàgica s'inicia amb el descobriment dels bacteriòfags. La primera persona que va informar sobre una activitat antimicrobiana va ser Ernest Hankin, el 1896. L'any 1915, Frederick Twort va formular la hipòtesis que aquesta activitat antibactericida podia ser deguda a un virus. El 1917, Félix d'Herelle, va afirmar que aquest fenomen podia estar causat per un virus capaç de parasitar a bacteris i els va anomenar *bacteriòfags*, una paraula que, literalment, significa "menjadors de bacteris".

Poc després del seu descobriment, el 1919, d'Herelle va començar a utilitzar els fags per a tractar algunes infeccions. Algunes empreses van comercialitzar fags contra diverses infeccions durant la dècada del 1930.

D'Herelle va arribar a establir una patent per la fagoteràpia en diversos països com França i Estats Units.

L'inici de l'era dels antibiòtics va suposar el declivi de la teràpia fàgica. L'alta eficàcia dels antimicrobians va fer que es retallessin els fons per a la investigació d'aquest tipus de virus. Tot i això, l'aparició de soques bacterianes resistents a un elevat nombre d'antibiòtics, obliga a investigar noves estratègies, i això fa que es torni a mirar de nou cap a teràpies que en el passat van ser efectives.

## 2. ELS ANTIBIÒTICS

### 2.1 Definició d'antibiòtic

Un antibiòtic és una substància que mata o inhibeix el creixement d'altres microorganismes. Afecten a cèl·lules bacterianes, però no a cèl·lules eucariotes\* ni als virus.



Fig. 10 Fotografia d'antibiòtics.

Font: ACTA.

### 2.2 Classificació dels antibiòtics

Hi ha diverses maneres de classificar els fàrmacs antibacterians, però tenint en compte el seu efecte sobre els bacteris, trobem dos grans grups:

- Bacteriostàtics: eviten el desenvolupament i la multiplicació bacteriana; el sistema immunitari del propi malalt pot destruir llavors els patògens.
- Bactericides: tenen la capacitat de destruir el bacteri; la seva acció és irreversible. Aquests fàrmacs actuen sobre la paret o la membrana citoplasmàtica.

Segons la seva procedència podem distingir entre antibiòtics naturals, que s'obtenen a partir de microorganismes (fongs, bacteris, etc.); sintètics, que s'obtenen totalment per síntesi química; o semisintètics, que s'obtenen per modificacions químiques d'antimicrobians naturals, amb l'objectiu de millorar-los.

### 2.3 Característiques dels antibiòtics utilitzats en el treball

Els antibiòtics utilitzats en la part pràctica d'aquest treball són l'ampicil·lina, l'estreptomicina i l'espectinomina.

Ampicil·lina: és un antibiòtic semisintètic i bactericida. Actua inhibint l'última etapa de la síntesi de la paret cel·lular bacteriana, unint-se a unes proteïnes específiques localitzades a la paret cel·lular. Com que impedeix que la paret es desenvolupi correctament, provoca la lisi del bacteri i la seva mort.

Estreptomicina: és un antibiòtic bactericida elaborat pel fong *Streptomyces griseus*.

Espectinomina: és un antibiòtic bacteriostàtic, que inhibeix la síntesi proteica de determinats bacteris gramnegatius.

### 3. TÈCNIQUES GENERALS

#### 3.1 Material i equipament bàsic

##### a) Material de vidre o plàstic esterilitzable

Tubs d'assaig de diferents mides, plaques de Petri, pipetes graduades, pipetes Pasteur, nances de Digralski, matrassos, erlenmeyers, provetes, ampolles amb tap de rosca, portaobjectes, cobreobjectes, etc.

##### b) Material divers

Nances de Kolle, gradetes, cistelles metàl·liques, bunsen, termòmetres, paper d'emalatge, indicador de pH, etc.

##### c) Aparells

Balances, microscopi òptic, refrigeradors, estufes o cambres d'incubació, centrifugadores, espectrofotòmetre.



Fig. 11 Material de laboratori: pinces, nances de Digralski, bastonets, pera...

Font: Judit Vilar.



Fig. 12 Bunsen.

Font: Judit Vilar.



### 3.2 Tècniques d'esterilització

En un laboratori de microbiologia és molt important treballar en condicions d'esterilitat\*. Els següents mètodes serveixen per esterilitzar material, medis, etc. Posteriorment, per a la manipulació d'aquests, s'utilitza el bunsen, un instrument amb una flama que esterilitza el que hi ha a uns 20 centímetres de distància. D'aquesta manera, s'impedeix que el material esterilitzat es contami amb microorganismes durant la seva manipulació.

Mètode	Temps i temperatura	Utilització	Actuació	Desavantatges
<b>Calor seca</b>	1 hora a 170°C	Material de vidre i de metall	Desnaturalització de components cel·lulars	No es pot utilitzar en medis líquids. Alguns plàstics es fonen
<b>Esterilització intermitent (Tindalització)</b>	30 min a 100°C durant 3 dies consecutius	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
<b>Calor humida (Autoclau)</b>	15-30 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
<b>Filtració</b>	Filtres de 0,45µm o de 0,22µm, aparell de buit	Medis líquids	Retenció dels bacteris en el filtre	Tan sols permet esterilitzar medis líquids
<b>Gasos</b>	Òxid d'etilè	Material termosensible	Desnaturalització de components cel·lulars	Molt tòxic, inflamable
<b>Radiació</b>	Ultraviolada o ionitzant (raigs X o gamma)	Medis líquids, sòlids, fàrmacs, material de plàstic	Mutacions que interfereixen en el metabolisme i causen la seva mort	La radiació UV té poc poder de penetració.

### 3.3 Medis de cultiu

Els medis de cultiu han de satisfer tots els requeriments nutritius dels microorganismes que es volen estudiar. Per tant, s'ha de conèixer bé el microorganisme per poder escollir el medi adient.

Ha de contenir fonts de carboni, nitrogen, sofre, fòsfor i, en menor quantitat, altres elements com ferro, magnesi, cobalt, manganès, etc., i també una font d'energia.

En medis sintètics, la composició es coneix exactament i el medi es prepara utilitzant quantitats conegudes de cada un dels components. En canvi, en medis rics o complexes, s'utilitzen 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 (en aquest cas es parla de brou) o bé estar solidificat amb agar\*, (en aquest cas es parla de medi sòlid o d'agar nutritiu).

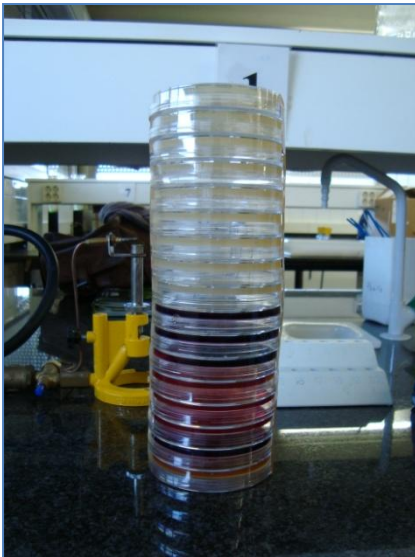


Fig. 13 Plaques amb medi sòlid: medi LB les de color blanquinós, i medi XLD les de color vermell.

Font: Judit Vilar.



Fig. 14 Ampolles amb medi líquid LB.

Font: MCD LAV.

### 3.3.1 Tipus de medis de cultiu

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

a) Medis de desenvolupament

Els medis de desenvolupament normalment contenen totes les substàncies nutritives per a la bona multiplicació dels microorganismes. Són emprats per recomptes i manteniment dels microorganismes.

Exemples: el medi LB, l'aigua peptonada i el medi Sabouraud.

b) Medis selectius

Normalment s'utilitzen per aïllar un tipus de bacteri determinat. Contenen substàncies específiques que afavoreixen el desenvolupament del microorganisme que es vol aïllar. Al mateix temps, també contenen altres substàncies que inhibeixen el creixement d'altres tipus de microorganismes.

Exemples: 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.

Exemples: l'agar citrat de Simmons o citrat de Koser, que és utilitzat per determinar si un bacteri pot utilitzar citrat extern com a única font de carboni, o el medi MR-VP, on es determina el tipus de fermentació dels enterobacteris.

### 3.3.2 Mètodes de preparació dels medis de cultiu

#### **Condicions generals**

Actualment, la preparació dels medis de cultiu és molt ràpida i senzilla. La majoria de fórmules que defineixen un medi de cultiu són subministrades comercialment en forma deshidratada. La preparació només consisteix en dissoldre la quantitat adequada en el volum d'aigua destil·lada que s'indica.

En aquells casos en què els medis no se subministrin comercialment, cal pesar cada un dels seus components i procedir com en el cas anterior.

## Preparació de medis sòlids

Els medis sòlids es preparen afegint agar al medi líquid. L'agar es fon a 95°C, la qual cosa permet cultivar els microorganismes des de temperatures baixes fins a 95°C. A més a més, una vegada líquid no solidifica fins a 40°C. Llavors podem preparar medis de cultiu a temperatura ambient. L'agar forma un gel consistent i transparent que, avui en dia, és el medi solidificant més utilitzat en la preparació de medis de cultiu per a microorganismes.

La quantitat d'agar que s'afegeix a un medi per solidificar-lo depèn de:

- El tipus d'agar (casa comercial, grau de puresa, etc.)
- La duresa que es vulgui aconseguir
- La temperatura d'incubació i la temperatura ambient en què s'hagin de manipular els tubs o les plaques

La quantitat habitual per preparar medis sòlids oscil·la entre 12 i 18 g/l. L'agar s'incorpora al medi i es bull de 1 a 2 minuts. Posteriorment, s'esterilitza amb l'autoclau i es deixa refredar una mica, sense que solidifiqui, i s'aboca en plaques. El procés de dipositar-ho en plaques en la quantitat desitjada s'anomena plaquejar.



Fig. 15 Erlenmeyers de 3L de capacitat, que contenen el medi sòlid, refredant-se. Posteriorment s'abocuen en plaques i acaben de solidificar.

Font: Judit Vilar.



Fig. 16 Plaquejar.

Font: Judit Vilar.

### **pH dels medis de cultiu**

Per a un creixement adequat dels microorganismes, els medis de cultiu han de tenir el pH apropiat al tipus de microorganisme que es vol fer créixer. La majoria de microorganismes es desenvolupen a pH neutre (entre 7 i 7,2). Es pot ajustar el pH amb HCl 0,1M per a medi àcid o amb NaOH 0,1M per a medi bàsic.

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. Per això, en la preparació de la majoria de medis de cultiu, s'ajusta el pH a 7,4 abans de fer l'esterilització.

### **3.4 Mètodes de recompte de microorganismes**

El recompte del nombre de microorganismes d'una mostra pot calcular-se, d'una banda, determinant el nombre de microorganismes que creixen en un determinat medi de cultiu formant colònies\* visibles (recompte viable). I, d'altra banda, comptant les cèl·lules o agrupacions de cèl·lules que es poden observar en la mostra mitjançant tècniques microscòpiques (recompte directe).

### **Tècniques de dilució i càlculs**

En condicions adients de creixement, els bacteris es multipliquen i donen lloc a poblacions tan grans que sovint és necessari diluir-les per tal d'obtenir colònies aïllades que es puguin comptar. Per això és necessari barrejar una petita quantitat de mostra amb un diluent\*, el Ringer\*.

Una dilució\* simple es calcula:

$$\text{Dilució} = \frac{\text{volum de mostra}}{\text{volum total (mostra+diluent)}}$$

Per exemple, la dilució de 1mL de mostra en 9mL de Ringer equival a:

$$\frac{1}{1+9} = \frac{1}{10} \text{ i s'escriu } 1:10$$

Està demostrat que les dilucions són més exactes si es fan sèries de petites dilucions que fent-ne una de gran. El conjunt d'aquestes dilucions s'anomena dilució seriada.

Per exemple, si diluïm 0,5mL de mostra en 4,5mL de diluent, i llavors 0,5mL d'aquesta primera dilució en 4,5mL de diluent, la dilució final serà:

$$\frac{0,5}{4,5+0,5} \times \frac{0,5}{4,5+0,5} = \frac{1}{100} \text{ que s'escriu } 1:100$$

Per facilitar els càlculs, la dilució s'escriu utilitzant la notació exponencial. Per tant, en l'exemple donat, la dilució final 1:100 s'escriurà  $10^{-2}$  o també  $10^{-2}$ .

Per dur a terme una dilució seriada cal seguir una sèrie de passos:

- Pipetejar en condicions estèrils la mostra en el tub de diluent.
- Barrejar els continguts agitant lleugerament el tub.
- Repetir el procés de forma seriada tantes vegades com sigui necessari fins a tenir en 0,1 mL de l'última dilució un nombre de bacteris adequat.
- De les últimes dilucions realitzades es sembra 0,1mL sobre una placa (estenant amb la nansa de Digrafski).
- Les plaques es posen a incubar a una temperatura òptima i, un cop passat el temps necessari, es fa un recompte del nombre de colònies. S'utilitzen aquelles plaques que tinguin entre 15 i 300 colònies.

Els resultats obtinguts sempre s'expressen en unitats formadores de colònies per mil·lilitre (cfu/ml):

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

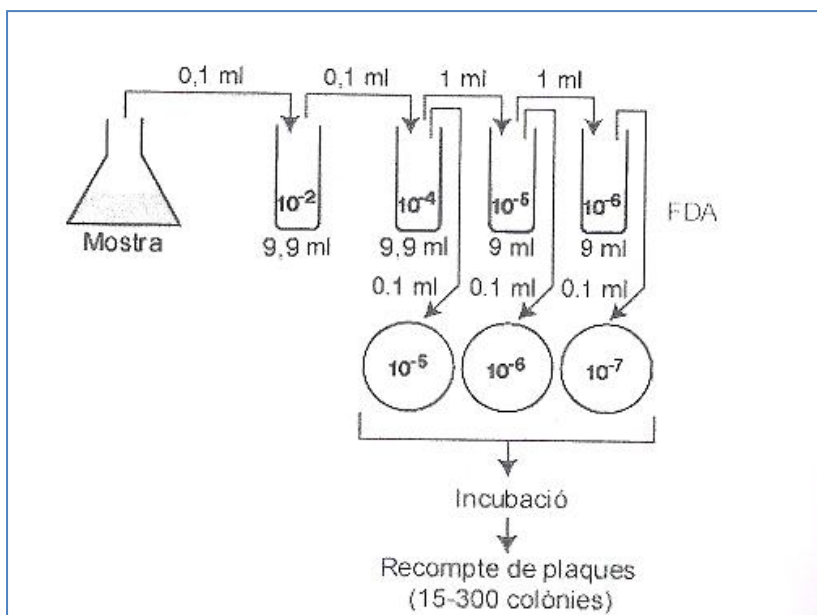


Fig. 17 Procediment per a la determinació de viables utilitzant dilucions seriades.

Font: Dossier Microbiologia, UAB.

### 3.5 Mètodes d'aïllament de microorganismes

L'aïllament de microorganismes consisteix en la separació en un 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.

#### 3.5.1 Aïllament per dilució

Es basa en estendre per la superfície d'una placa d'agar un nombre de microorganismes prou petit com perquè al créixer, cada un d'ells doni lloc a una colònia ben aïllada. Es pot aconseguir fent dilucions seriades.

#### 3.5.2 Aïllament per esgotament en placa

##### **En ziga-zaga**

Des d'una suspensió de microorganismes o des d'una colònia, s'agafa una mostra amb la nansa de Kolle. Posteriorment, es sembra\* per estria en *ziga-zaga* i s'incuben les plaques a la temperatura adequada.

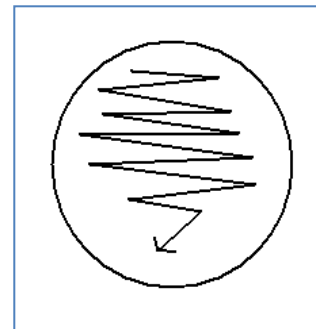


Fig. 18 Sembra per estria en *ziga-zaga*.

Font: Judit Vilar.

##### **En escocès**

Amb la nansa de Kolle procedim tal i com s'indica a la imatge. Per dur a terme cada una de les etapes (a), (b), (c) i (d), és necessària l'esterilització de la nansa de Kolle cada cop.

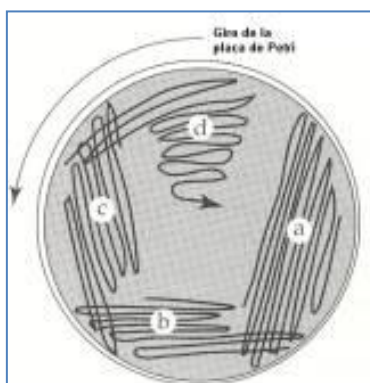


Fig. 19 Sembra en escocès.

Font: Equipo y materiales de laboratorio.

### 3.6 Observació de microorganismes: tincions

Quan s'observa un microorganisme al microscopi es veu sense color i és difícil apreciar la seva morfologia, la mida i, a vegades, l'agrupació. Per això cal utilitzar tincions que posin en manifest aquestes característiques i facin visibles determinades estructures.

La tinció simple més corrent és la tinció amb blau de metilè, amb la qual cosa es pot determinar ràpidament la forma, la mida i l'agrupació dels bacteris més comuns.

La tinció diferencial més utilitzada és la tinció de Gram. S'anomena diferencial perquè els bacteris poden presentar dues coloracions (blava o vermella) depenent de la diferent composició i estructura de la seva paret bacteriana. A més a més, existeixen diferències fisiològiques entre els bacteris segons la tinció de Gram que presentin: els bacteris grampositius són més resistents a l'acció d'alguns enzims, mentre que els bacteris gramnegatius resisteixen amb més facilitat als medis àcids i als detergents.

Finalment, les estructures com els flagels, les endòspores i les càpsules, que no són visibles amb tincions simples, poden posar-se en manifest amb tincions específiques.

Per tal de poder tenyir una mostra i fer-ne una posterior observació, primer de tot cal fer un *frottis*\*, és a dir, la fixació de bacteris sobre un portaobjectes. Si es fa des d'un medi líquid, cal col·locar dues gotes del medi de cultiu sobre un portaobjectes amb la nansa de Kolle. Llavors s'ha d'expandir aquesta mostra i, finalment, assecar-ho sobre la flama del bunsen. Cal anar molt en compte per no cremar la mostra.

Si el que es té és un medi sòlid, primer de tot s'han col·locar dues gotes d'aigua destil·lada sobre un portaobjectes. Llavors es frega el cercle d'una nansa de Kolle per la mostra i, tot seguit, es barreja amb l'aigua del portaobjectes. Finalment s'asseca amb la flama del bunsen.

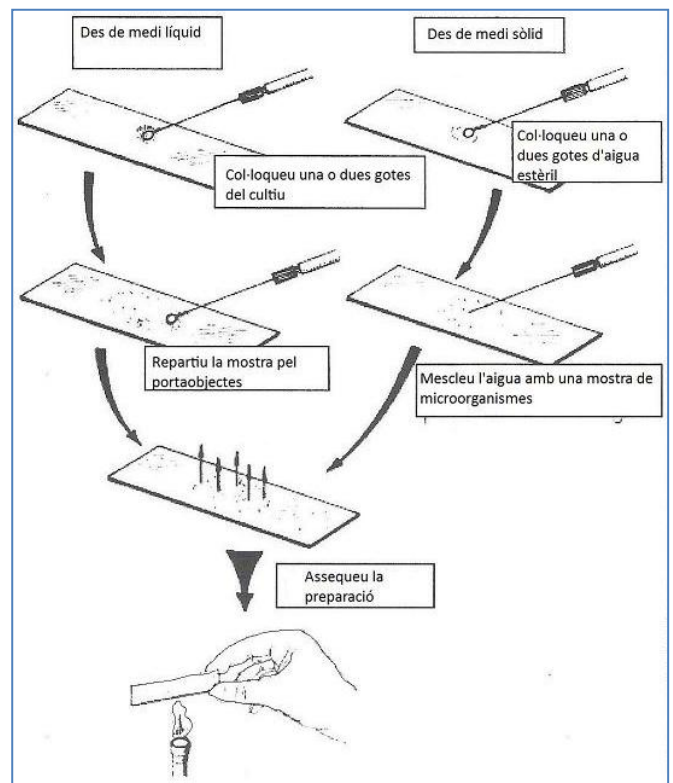


Fig. 20 Preparació d'un *frottis*.

Font: Dossier Microbiologia, UAB.



### 3.6.1 Protocol de tinció simple

Primer de tot s'ha de fer un *frottis* i fixar-lo a la flama. Seguidament s'ha de tenyir durant 1 minut amb blau de metilè. Llavors, s'ha de rentar amb aigua i, finalment, cal assecar-ho i ja es pot observar la mostra.

### 3.6.2 Protocol de tinció de Gram

Primer de tot cal fer un *frottis* i fixar-lo a la flama. Després s'ha de tenyir amb cristall violeta durant un minut. Posteriorment es renta amb aigua i es deixa escórrer. Llavors s'hi afegeix lugol durant un minut, i es torna a rentar amb aigua. Fet això, s'ha de rentar amb alcohol i tenyir la mostra amb safranina alcohòlica durant 1-2 minuts.

Els bacteris grampositius queden tenyits de color blau i els gramnegatius de color vermell.



Fig. 21 Colorants per a fer la tinció de mostres bacterianes.

Font: Judit Vilar.



Fig. 22 Portaobjectes que conté una mostra de *Serratia marcescens* tenyida. Es pot veure que és un bacteri gramnegatiu, ja que la mostra ha quedat tenyida de color vermell.

Font: Judit Vilar.

## 4. METODOLOGIES BÀSIQUES DEL TREBALL AMB BACTERIÒFAGS

### 4.1 Aïllament de fags

S'escull una mostra determinada (aigua, femta, etc.) i es sembra en un medi líquid enriquit per tal que hi puguin créixer tots els microorganismes que hi ha. Primer de tot es fa un centrifugat\*, així les partícules més grans sedimenten i es poden treure. Llavors es filtra i, com que els virus són els microorganismes més petits, són els que queden filtrats. D'aquesta manera es podran sembrar en una placa i ja estaran aïllats.

### 4.2 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.

Per exemple, per a determinar si hi ha bacteriòfags en una soca bacteriana de LT2, el procediment seria el següent:

Primer de tot s'ha de preparar un eppendorf amb 900µL de Ringer + 100µL del bacteri LT2. Se n'extreuen 100µL i es barregen en un tub que conté medi semisòlid (LB tou). Posteriorment s'expandeix aquesta mescla sobre una placa i cal esperar que solidifiqui.

Un cop ha solidificat es divideix la placa en quatre seccions i, a cada secció, s'hi afegeixen 10µL (una gota) de virus: En la primera secció hi afegim 10µL P22 L, que és un bacteriòfag lític; en la segona secció hi afegim 10µL P22 LS, que és un bacteriòfag lisogènic; en la tercera i quarta secció hi afegim 10µL L1 i 10µL L2, respectivament.

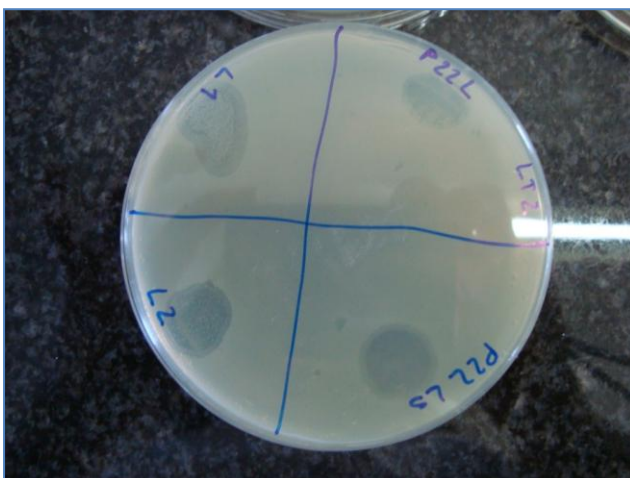


Fig. 23 Acció dels bacteriòfags sobre la soca bacteriana LT2.

Font: Judit Vilar.

En la imatge es pot veure que en les gotes de virus que s'hi han tirat hi havia bacteriòfags, ja que han pogut destruir els bacteris LT2 del voltant i, d'aquesta manera, han originat unes calves\* (zones més transparents on no hi ha bacteris).

### 4.3 Titulacions

Titular consisteix en 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.

Utilitzant un fag prèviament aïllat, el P22, es preparen quatre eppendorfs amb:

1- 900µL MgSO<sub>4</sub>\* + 100µL P22 → -1

2- 900µL MgSO<sub>4</sub> + 100µL del primer eppendorf → -2

3- 990µL MgSO<sub>4</sub> + 10µL del segon eppendorf → -4

4- 990µL MgSO<sub>4</sub> + 10µL del tercer eppendorf → -6

Lavors es preparen quatre plaques amb medi sòlid:

1- S'hi estén un tub que contingui la barreja de medi semisòlid + 100µL ATCC (soca bacteriana) + 100µL eppendorf -1

2- S'hi estén un tub que contingui la barreja de medi semisòlid + 100µL ATCC + 100µL eppendorf -2

3- S'hi estén un tub que contingui la barreja de medi semisòlid + 100µL ATCC + 100µL eppendorf -4

4- S'hi estén un tub que contingui la barreja de medi semisòlid + 100µL ATCC + 100µL eppendorf -6

Lavors s'han de deixar assecar les quatre plaques.

Posteriorment es poden observar els resultats: en les tres primeres plaques, que contenen les dilucions -1, -2 i -4, els bacteris han estat eliminats pels fags. En canvi, en la placa que contenia la dilució -6, s'hi pot observar un nombre determinat de calves (110 calves, exactament).

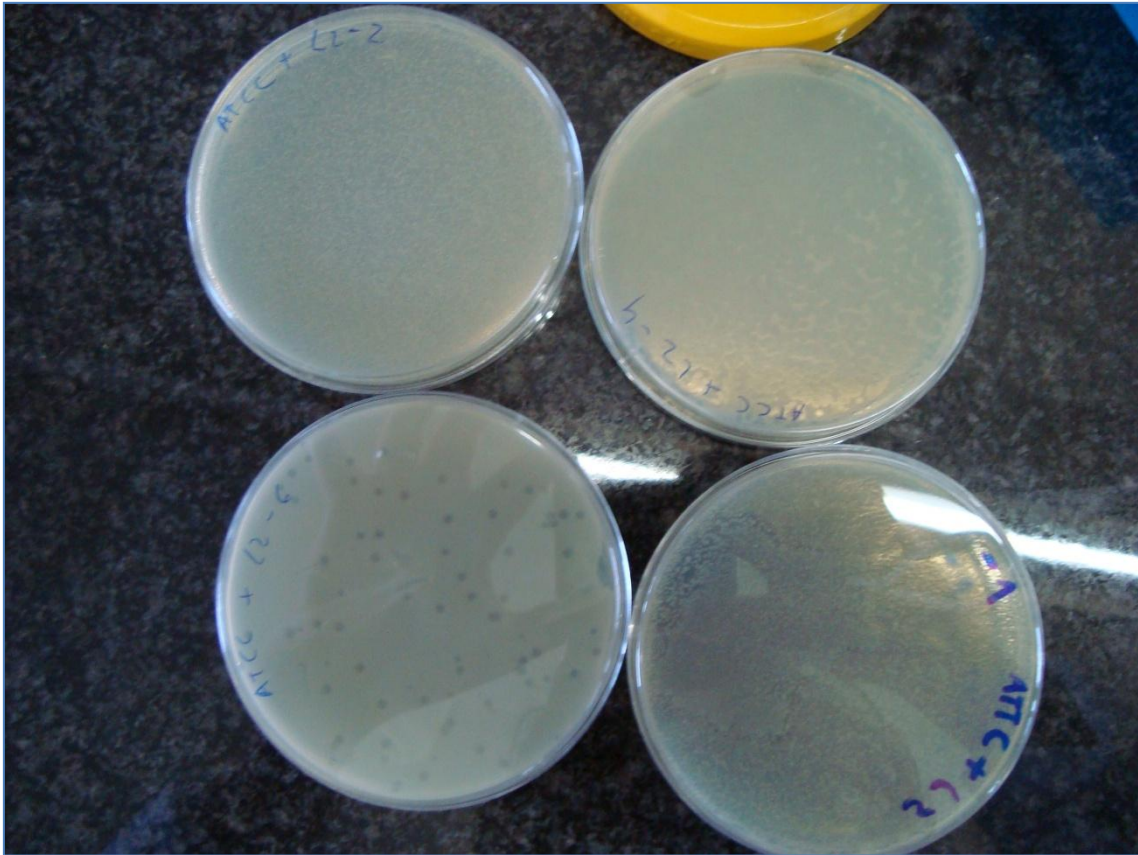


Fig. 24 Recompte de calves a partir de la titulació.

Font: Judit Vilar.

Els resultats obtinguts sempre s'expressen en unitats formadores de plaques per mil·lilitre:

$$\text{Pfu/ml} = \frac{\text{Núm.calves}}{\text{volum sembra+FDA}} = \frac{110 \text{ calves}}{0,1 \times 10^6} = 1,1 \cdot 10^9 \text{ pfu/ml.}$$

#### 4.4 Tincions de les calves

Per tal de poder comptar millor les calves que hi ha en una placa, es pot tenyir la mostra. El colorant més utilitzat és el TTZ. El que fa aquest producte és tenyir la zona de la placa on hi ha bacteris. Per tant, on hi hagi les calves amb bacteriòfags quedarà transparent i serà més fàcil el seu recompte. El que s'ha de fer és abocar 100µL aprox. d'aquest colorant sobre la placa i estendre'l movent la placa, fins que quedi tota coberta.



Fig. 25 Mostra tenyida. Es pot observar que la zona de la placa on hi ha bacteris s'ha tenyit, mentre que les calves han quedat sense color.

Font: Judit Vilar.

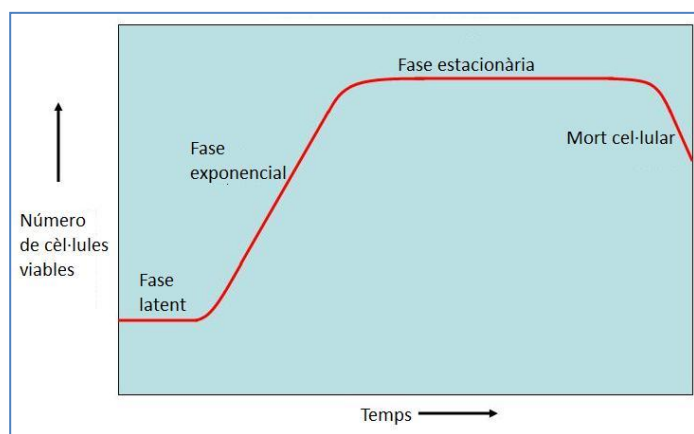
## 5. APLICACIONS DELS BACTERIÒFAGS: FAGOTERÀPIA

Quan un bacteri infecta a un organisme ho fa seguint un determinat patró, que anomenem corba d'infecció. Aquesta corba consta de quatre fases:

- Fase latent o d'adaptació: els bacteris s'adapten al medi.
- Fase de creixement exponencial: els bacteris augmenten, creixen, es multipliquen.
- Fase estacionària: la quantitat de bacteris es manté constant.
- Fase de mort cel·lular: el nombre de bacteris comença a descendir, ja que algun factor intern o extern ha combatut la infecció.

Fig. 26 Gràfica que representa una corba d'infecció bacteriana estàndard.

Font: Es Academic.



El que es fa al laboratori és aplicar un bacteriòfag específic que impedeixi el creixement del bacteri i, d'aquesta manera, posi fi a la infecció.

Si s'aplica un fag lític, la corba d'infecció es modifica de la següent manera:

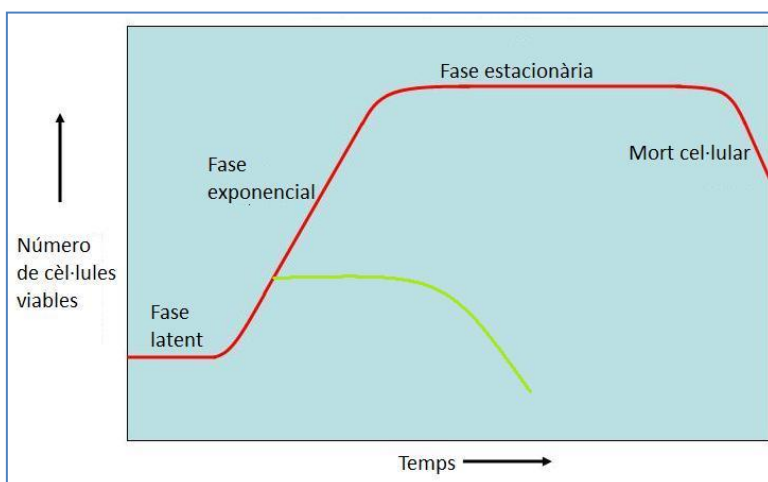


Fig. 27 El començament de la corba verda representa el moment en el qual s'insereix el bacteriòfag lític. Llavors, es pot veure que el nombre de cèl·lules bacterianes comença a descendir, ja que el fag provoca la seva mort.

Font: Es Academic.

Quan es detecta la presència de bacteris s'introdueix el bacteriòfag lític. Aquest s'adhereix a les cèl·lules bacterianes i inicia el seu cicle lític, que acaba amb la lisi de les cèl·lules i, per tant, la seva mort. Com es mostra a la gràfica de la figura 27, el nombre de bacteris comença a disminuir.

En canvi, si el fag que s'insereix és lisogènic, la gràfica es mostra com la següent:

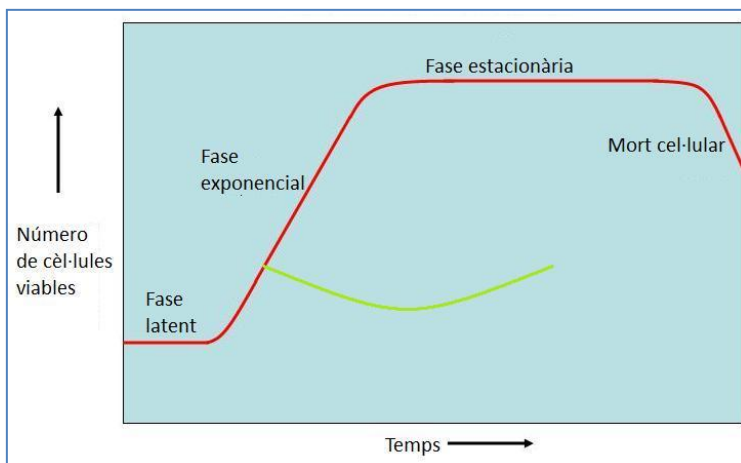


Fig. 28 L'inici de la corba verda representa el moment en el qual s'insereix el fag lisogènic. Llavors, es pot observar com evoluciona la població de bacteris.

Font: Es Academic.

Quan es detecta la presència dels bacteris causants de la infecció i s'apliquen fags lisogènics, el nombre de bacteris no disminueix. El que succeeix és que els fags lisogènics incorporen el seu material genètic dins dels bacteris, però no els eliminen. Pot passar que el final del cicle lisogènic variï i el bacteri s'elimini, ja que és possible que els fags provoquin la lisi del bacteri des del seu interior.

### 5.1 Pràctica: Evolució de la soca bacteriana LT2 davant d'un bacteriòfag lític, un de lisogènic, i tres antibiòtics diferents

L'objectiu d'aquesta pràctica és infectar una soca bacteriana de *Salmonella enterica* amb diferents antibiòtics i bacteriòfags i, d'aquesta manera, poder veure com actua cada un d'ells.

Material: ampolles amb tap de rosca, pipetes, cubetes de plàstic, plaques de petri, nanses de Digrafsky.

Aparells: espectrofotòmetre, estufa o incubadora.

Bacteris: O/N *Salmonella enterica* serovarietat Typhimurium LT2

Fags a testar: L1 (lític) i P22, que anomenarem L2 (lisogènic)

Antibiòtics: Ampicil·lina (Ap), Espectinomicina (Sp) i Estreptomicina (Str).

L'aparell que s'utilitza per determinar la quantitat de bacteris és l'espectrofotòmetre, que mesura la densitat òptica (DO). El que fa és mesurar la terbolesa del brou del cultiu i, d'aquesta manera, estimar la biomassa de la població bacteriana. En un espectrofotòmetre, un raig de llum es transmet a través d'una suspensió bacteriana fins arribar a una cèl·lula fotoelèctrica. A mesura que el nombre de bacteris augmenta, el brou es torna més tèrbol, absorbeix més llum i, per tant, n'arriba menys a la cèl·lula fotoelèctrica. El canvi de llum és enregistrat a l'aparell com a percentatge de transmissió (quantitat de llum que passa a través de la suspensió) i com a absorbància o densitat òptica (valor derivat del percentatge de transmissió). Aleshores, un brou amb molts bacteris tindrà una DO elevada, ja que la diferència entre la llum que arriba a la cèl·lula i la llum que ha emès l'aparell és gran. En canvi, un brou en el qual els bacteris encara no han crescut gaire, tindrà una DO baixa, ja que la diferència de la llum que emet l'espectrofotòmetre amb la llum que rep la cèl·lula fotoelèctrica és menor.



Fig. 29 Espectrofotòmetre.

Font: Judit Vilar.

El protocol que s'ha de seguir per dur a terme la pràctica és el següent.

Primer de tot es prepara una ampolla de tap de rosca amb 10mL de medi LB líquid i 400µL de la soca bacteriana LT2. El que s'està fent és fer una dilució 1/40 del cultiu de LT2 crescut durant tota la nit, que és el que s'anomena overnight (ON)\*.

Amb una pipeta s'agafa 1mL d'aquesta mescla i es posa a una cubeta, (en la figura 29 es pot veure també la cubeta). Es mesura la DO amb l'espectrofotòmetre i és de 0,2 aprox. Això vol dir que la quantitat de bacteris que conté és petita, i s'hauran d'incubar\* per tal que comencin la fase exponencial.

Tot seguit es posa l'ampolla a incubar a 37°C durant 30 minuts. D'aquesta manera, els bacteris es començaran a reproduir.

D'altra banda, es necessita una altra cubeta que contingui 1mL de medi LB, que serà el "blanc". És a dir, una cubeta de control que no estarà infectada per cap bacteri, només contindrà medi. D'aquesta manera tindrà una DO= 0 (tota la llum que emet és rebuda per la cèl·lula receptora).

Passats els 30 minuts, es posa la cubeta control a l'espectrofotòmetre per tal que es gradui i, seguidament, s'hi posa una cubeta que conté 1mL de l'ampolla que s'estava incubant. La DO és de 0,5 aprox. El cultiu ja està en fase exponencial (creixement de bacteris).

Aquesta ampolla de ressembla de l'O/N LT2 ja està preparada per poder-la infectar, però se'n necessiten cinc més per tal de poder-ne infectar cada una amb un fag o un antibiòtic diferent. Per tant, es repeteix aquest procés cinc vegades més, per tal que quedin sis ampolles amb *Salmonella enterica* (s'enumeren per tal que sigui més fàcil).

Seguidament, es prossegueix a infectar el bacteri LT2:

Les ampolles 1 i 2 s'infecten amb el fag lític L1 i el fag lisogènic P22 (=L2) respectivament, en una raó MOI=1 (és a dir, correspon un bacteriòfag per a cada bacteri, aprox.)

Les ampolles 3, 4 i 5 s'infecten amb els antibiòtics ampil·lina (Ap, a una concentració final de 200 ng/ $\mu$ l), espectinomicina (Spc, a una concentració final de 200 ng/ $\mu$ l) i estreptomycin (Str, a una concentració final de 200 ng/ $\mu$ l), respectivament.

Finalment, l'ampolla 6 no la infectem amb res, ja que serveix de control.

Cada 30 minuts s'agafa 1mL de cada una de les ampolles i es posa en les seves respectives cubetes, per tal de poder-ne obtenir les DO amb l'espectrofotòmetre. Cal apuntar els resultats en una taula per a poder-los interpretar.



## 6. RESULTATS

### 6.1 Seguiment DO (longitud d'ona 550 nm)

Temps real (min)	Temps després infecció (min)	control	Ap 200	Spc 200	Str 200	L1	L2
0		0,181	0,291	0,191	0,196	0,175	0,174
30	0	0,465	0,563	0,451	0,495	0,616	0,550
90	60	1,262	0,755	0,792	0,732	0,077	0,489
150	120	1,753	0,811	0,927	0,714	0,067	0,330

Els primers valors que tenim, a temps real 0, encara no s'ha infectat amb res la soca bacteriana LT2, perquè primer es necessita que el cultiu estigui creixent i actiu per a poder veure l'efecte de qualsevol tractament. Si, per contra, s'apliqués directament el tractament sense deixar que creixessin abans les colònies de bacteris, no es podria saber si l'efecte que es veu és degut al fag o antibiòtic o perquè el cultiu no ha pogut créixer bé. Això podria ser a causa que no s'hagués fet una bona dilució o que el cultiu de nit utilitzat estigués malmès.

Els següent valors, a temps real 30, és just el moment en el qual s'ha infectat amb els bacteriòfags a una MOI de 1, i amb els antibiòtics corresponents. La DO ja ha incrementat perquè el cultiu de LT2 ha anat creixent i, per tant, la terbolesa ha augmentat.

El cas en el qual s'ha aplicat un bacteriòfag lític (L1), es pot observar que la DO augmenta fins a 0,616. En aquest moment el bacteri es troba en fase exponencial, i és quan s'hi afegeix el fag L1. El que fa aquest fag és adherir-se a les cèl·lules bacterianes i lisar-les. Per tant, com que la població bacteriana és reduïda per l'acció del fag, la DO disminueix fins a 0,067 (la diferència entre la llum emesa per l'espectrofotòmetre i la llum rebuda per la cèl·lula fotoelèctrica és molt petita).

En la soca bacteriana infectada amb el bacteriòfag lisogènic P22 (L2), s'hi observa també un creixement fins a 0,550 DO, moment en el qual s'ha infectat amb el fag. Llavors, es pot apreciar una disminució de la DO, però no tan gran com la que s'ha pogut veure en el cas anterior. Això passa perquè el que fa el fag L2 és adherir-se a la cèl·lula bacteriana i introduir-hi el seu material genètic, però no sempre la lisa. Per tant, les cèl·lules bacterianes queden

infectades amb el fag, que podrà desenvolupar el seu cicle lisogènic. D'aquesta manera, la DO és aproximadament de 0,330.

En el cas dels antibiòtics es pot apreciar, a simple vista, que la població bacteriana segueix creixent, però això no és del tot cert. En el cas de molts antibiòtics no sempre es lisen les cèl·lules, sinó que simplement moren. Així doncs, en un espectrofotòmetre només podem apreciar si la població s'està morint en el cas que les cèl·lules es lisen. Si les cèl·lules es moren però no es lisen, la DO es mantindrà constant perquè "els cossos cel·lulars", encara que morts, continuaran interferint amb el pas de la llum.

Aquest fet podria suposar un problema, ja que només es poden apreciar les cèl·lules bacterianes que s'han lisat, i no pas totes les que han estat destruïdes. Per aquest motiu, també es fa un recompte de viables, fent una sembra en plaques de petri.

## 6.2 Viables (unitats en cfu/ml)

Temps real	Temps després infecció	control	Ap 200	Spc 200	Str 200	L1	L2
30	0	$1,66 \cdot 10^{08}$	$9,40 \cdot 10^{07}$	$1,23 \cdot 10^{08}$	$1,16 \cdot 10^{08}$	$8,90 \cdot 10^{07}$	$1,73 \cdot 10^{08}$
150	120	$1,93 \cdot 10^{09}$	$6,00 \cdot 10^{05}$	$4,00 \cdot 10^{08}$	$2,40 \cdot 10^{06}$	$2,22 \cdot 10^{06}$	$1,00 \cdot 10^{07}$

Els primers valors, a temps real 30, és el nombre aproximat de cèl·lules bacterianes que han crescut. Aquest és el punt de partida, és a dir, la població inicial. Seguidament, es sembra el que hi ha a les ampolles: en una placa s'hi sembra l'LT2 infectat amb L1, en una altra LT2 infectat amb L2 i, les a les tres plaques següents, l'LT2 infectat amb els corresponents antibiòtics, ja esmentats abans.

Les plaques sembrades amb LT2 infectat amb ampicil·lina i estreptomina, han reduït notablement la població de bacteris.

Les plaques infectades amb els bacteriòfags L1 i L2 també han reduït la població bacteriana i, per tant, es pot deduir que serien un bon mètode per a combatre infeccions provocades per aquest bacteri.

L'espectinomicina té menys efecte perquè en comptes de ser un bactericida, com els altres dos antibiòtics, és un bacteriostàtic. És a dir, para el creixement cel·lular un cop actua. Quan es

tracta un cultiu no totes les cèl·lules estan en el mateix punt del cicle cel·lular, per tant a unes els afectarà abans el tractament que a les altres. D'aquesta manera, algun cultiu pot créixer una mica, ja que un tractament no sempre és immediat.

Per tant, els resultats ens mostren que tots els tractaments tenen un efecte.

## 7. CONCLUSIONS

A principis del segle XX, amb la descoberta de la penicil·lina, es van començar a fabricar els primers antibiòtics. D'aquesta manera es van poder combatre les malalties causades per infeccions bacterianes, que causaven la mort d'una gran part de la població.

Durant els últims anys hi ha hagut un abús descontrolat del consum d'antibiòtics. 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.

Tot i que els antibiòtics segueixen sent uns fàrmacs eficaços per lluitar contra les infeccions bacterianes, durant els últims anys han aparegut algunes espècies que s'han tornat multirresistents a molts antibiòtics i, quan es van acabant els compostos tradicionals, és quan s'ha de pensar en altres alternatives per a poder eliminar la infecció bacteriana. Una d'aquestes alternatives és la teràpia fàgica, és a dir, utilitzar virus anomenats bacteriòfags que tenen la capacitat de destruir cèl·lules bacterianes i, per tant, acabar amb la infecció.

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* LT2, i li causen la mort. Per tant, es pot assegurar que tots dos mètodes aconseguen l'objectiu principal.

El doctor Pedro García, investigador del Consell Superior d'Investigacions Científiques, treballa amb bacteriòfags del bacteri *Streptococcus pneumoniae* amb la finalitat de desenvolupar noves teràpies per combatre les malalties que aquest microorganisme produeix: pneumònia, otitis, meningitis, entre d'altres. Segons el doctor García, la teràpia amb bacteriòfags està especialment indicada davant les infeccions que no responen als antibiòtics habituals. Afegeix que "els estudis amb els diferents productes derivats dels fags ja fa uns quants anys que es duen a terme, però la via per a la comercialització de fàrmacs és llarga i segueix un procés que ha de passar per les fases d'avaluació en animals i en humans. Tot i això, ja hi ha alguns compostos al mercat destinats a combatre, per exemple, infeccions provocades per bacteris multirresistents en casos de cremades a la pell."

Per exemple, durant l'agost del 2006, la FDA (Food and Drug Administration) d'Estats Units, va aprovar l'ús de bacteriòfags en certes carns amb la finalitat d'acabar amb el bacteri *Listeria monocytogenes*.

Un article del diari *La razón*, publicat el 18 de desembre del 2010, explica el problema que suposen les soques bacterianes multirresistents. Alfonso H. Magadán, microbiòleg de la Universitat de Laval, a Quebec (Canadà), defensa la fagoteràpia com una bona opció: “[...] degut al desenvolupament de soques resistents als antibiòtics, la fagoteràpia és una bona opció. Aquesta teràpia va ser desenvolupada en països de l’est, però amb l’aparició dels antibiòtics va quedar en desús. Ara però, s’està tornant a *posar de moda*. Una teràpia combinada d’antibiòtics i fags podria ser una bona solució.”

Actualment, la fagoteràpia s’està orientant a diverses utilitats, com per exemple en agricultura, granges, etc. En general, allà on es pugui originar una infecció bacteriana difícil de tractar amb mètodes convencionals.

D’altra banda, hi ha la probabilitat que els bacteris mutin amb facilitat i es tornin resistents a aquests virus. L’avantatge de treballar amb els fags és que es pot utilitzar un còctel que contingui varis fags 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 utilitzant fags lítics, evitant, d’aquesta manera, els lisogènics, que s’integrarien en el genoma de la cèl·lula hoste. Aquest tipus de fags no poden produir una lisi ràpida.

Cal afegir, també, que al principi de la utilització de la teràpia fàgica, les restes del bacteri lisat no s’eliminaven, i això provocava rebuigs en el pacient a causa de les endotoxines que contenien aquests preparats. Aquest problema però, en l’actualitat és fàcil de superar, ja que els fags es poden ultracentrifugar i, d’aquesta manera, perden les toxines.

Un altre problema que planteja aquesta pràctica 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.






En el seu conjunt, 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 les tècniques com la fagoteràpia.

## 8. ANNEXOS

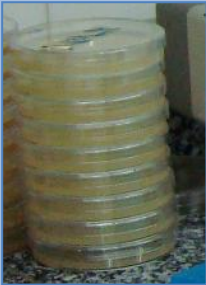

### 8.1 Material i equipament d'un laboratori de microbiologia

APARELL	DESCRIPCIÓ
<p><b>Ampolles amb tap de rosca</b></p> 	<p>Ampolles esterilitzades per a posar-hi cultius bacterians líquids o també productes de laboratori com Ringer, MgSO<sub>4</sub>...</p>
<p><b>Autoclau</b></p> 	<p>Aparell que té unes condicions de pressió i temperatura adequades per tal de poder desnaturalitzar els components cel·lulars. S'utilitza per esterilitzar material de vidre, metall, medis líquids i sòlids...</p>
<p><b>Balança electrònica</b></p> 	<p>Aparell que es fa servir per a mesurar masses.</p>
<p><b>Bunsen</b></p> 	<p>Font de calor graduable que crema gas com a combustible. Esterilitza el que hi ha a uns 20 centímetres de distància. D'aquesta manera, s'impedeix que el material esterilitzat es contamiï amb microorganismes durant la seva manipulació.</p>

<p><b>Centrifugadora</b></p> 	<p>Aparell que serveix per a barrejar i mesclar les dilucions.</p>
<p><b>Cistella metàl·lica</b></p>	<p>Se sol posar el material de laboratori dins una cistella metàl·lica per esterilitzar-lo amb l'autoclau.</p>
<p><b>Cubeta</b></p> 	<p>Recipient de vidre o plàstic on s'hi posa la dilució a analitzar amb l'espectrofotòmetre.</p>
<p><b>Erlenmeyer</b></p> 	<p>És un recipient de vidre no calibrat. Té el fons pla i un coll curt, que evita que es perdi el material quan hi ha reaccions d'efervescència. També es fa servir per a contenir-hi dissolucions. Els erlenmeyers amb capacitat de 1-3L s'utilitzen per a preparar medis de cultiu.</p>
<p><b>Espectrofotòmetre</b></p> 	<p>Aparell que determina la quantitat de bacteris. Mesura la densitat òptica (DO) o terbolesa del brou.</p>

<p><b>Estufa o cambra d'incubació</b></p> 	<p>Aparell o cambra que manté una temperatura de 37°C. D'aquesta manera, els cultius bacterians poden créixer.</p>
<p><b>Matrassos</b></p> 	<p>És un recipient aforat que s'utilitza per a mesurar volums amb exactitud.</p>
<p><b>Nansa de Digrafski</b></p> 	<p>Nansa de plàstic o metall. Té forma de "L" i es fa servir per la sembra de cultius en plaques.</p>
<p><b>Nansa de Kolle</b></p> 	<p>Pot ser de plàstic o metall. Un dels extrems té forma de cercle i permet transferir cultius o, senzillament, agafar-los.</p>
<p><b>Paper indicador de pH</b></p> 	<p>Dóna una mesura aproximada del pH d'un medi.</p>



<p><b>Pipetes graduades</b></p> 	<p>Transfereixen volums concrets de líquids. N'hi ha de diferents capacitats.</p>
<p><b>Pipetes Pasteur</b></p> 	<p>Es fan servir per agafar quantitats molt petites d'un líquid. També s'utilitzen per prendre una calva de fags.</p>
<p><b>Plaques de petri</b></p> 	<p>Recipient de vidre o plàstic amb una base ampla i de molt poca altura. S'hi fan cultius.</p>
<p><b>Pots rentadors</b></p> 	<p>Contenen aigua destil·lada. Solen ser de plàstic i acaben amb un tub flexible que permet dirigir el raig d'aigua.</p>

## 8.2 Unitats

Unitat		Equivalència
$\mu\text{L}$	microlitre	$1000\mu\text{L} = 1\text{mL}$
$\mu\text{m}$	micròmetre	$1000\mu\text{m} = 1\text{mm}$
nm	nanòmetre	$1.000.000\text{nm} = 1\text{mm}$
ng/ $\mu\text{L}$	nanograms/microlitre	$1.000.000\text{ ng} = 1\text{g}$
M	molar	mols de solut/ litre de dissolució
cfu/mL	unitats formadores de colònies per mil·lilitre	
pfu/mL	unitats formadores de plaques per mil·lilitre	
MOI	multiplicitat d'infecció (per exemple: una MOI de raó 1, indica que estadísticament correspon un bacteriòfag per a cada bacteri)	

## 9. GLOSSARI

### A

**Aerobi:** organismes que només són capaços de viure i desenvolupar-se en presència d'oxigen.

**Agar:** medi de cultiu solidificat per a microorganismes.

**Anaerobi:** organismes que no necessiten la presència d'oxigen per a poder viure i desenvolupar-se.

**Antibiòtic:** substància natural o artificial que té la capacitat d'inhibir el creixement o la reproducció d'alguns microorganismes i evitar la progressió d'un procés infecció en un ésser viu.

**Autòtrof:** es diu dels organismes que per nodrir-se incorporen del medi únicament aliments no orgànics. És comú en plantes, algues i alguns bacteris.

### B

**Bacteriòfag:** virus especialitzat en parasitar cèl·lules bacterianes. N'hi ha de lítics i de lisogènics.

**Bacteris:** grup d'organismes vius de mida microscòpica, unicel·lulars i d'organització procariota.

**Bipartició:** també anomenada fissió binària. És un sistema de reproducció asexual en el qual la cèl·lula mare, per mitosi, genera dues cèl·lules filles idèntiques.

### C

**Calva:** zona on hi havia bacteris que han estat fagocitats pels bacteriòfags.

**Cèl·lula:** unitat morfològica, fisiològica i genètica de tot ésser viu.

**Centrifugat:** aplicar una força a una substància per tal de separar-ne els components segons la seva densitat.

**Colònies:** agrupacions de bacteris del mateix tipus.

**Condicions d'esterilitat:** en aquest context, que no conté microorganismes.

## D

Dilució: dissolució d'un cos sòlid en un líquid.

Diluent: substància que dissol a una altra.

DNA: sigles que corresponen a l'àcid desoxiribonucleic. Hi ha el DNA monocatenari (d'una sola cadena) i el bicatenari (de dues cadenes complementàries). També es diferencia entre DNA lineal i circular.

DO: densitat òptica. Valor amb el qual mesura l'espectrofotòmetre.

Domini: classificació de les espècies feta pel microbiòleg C. Woese.

## E

Eucariota: es diu de la cèl·lula que presenta la major part del material genètic separat de la resta del citoplasma per una membrana que delimita el nucli.

## F

Fagocitosis: acte pel qual determinades cèl·lules o organismes unicel·lulars engloben i generalment digereixen o destrueixen elements molt diversos, com ara bacteris i altres gèrmens, cossos estranys, deixalles metabòliques, etc.

Fílum: tàxon que agrupa les classes semblants. Un fílum es defineix com una via evolutiva diferent i independent de totes les altres.

Fisiologia: estudi de les funcions dels éssers vius.

*Frottis*: preparació microscòpica que s'aconsegueix estenent en una capa fina un líquid orgànic o cèl·lules obtingudes.

## G

Genètica: branca de la biologia que estudia els fenòmens de l'herència i de la variació de les espècies.

Gramnegatiu: es diu del bacteri que queda tenyit de color vermell en la tinció de Gram.

Grampositiu: es diu del bacteri que queda tenyit de color blavós en la tinció de Gram.

## **H**

Heteròtrof: es diu dels organismes que utilitzen per alimentar-se matèries orgàniques que constitueixen o que han constituït altres organismes.

## **I**

Incubació: en aquest context, posar una mostra bacteriana en una estufa a 37°C, per tal que els bacteris es desenvolupin i es reproduïxin.

## **J**

-

## **K**

-

## **L**

Lisi: trencament de la paret bacteriana per acció d'un agent (bacteriòfags o antibiòtics, en aquest treball), que causen la mort del bacteri.

## **M**

Metabolisme: conjunt de reaccions químiques que es produeixen a l'interior de les cèl·lules.

MgSO<sub>4</sub>: sulfat de magnesi, producte utilitzat per a fer dilucions amb bacteriòfags.

Microbiologia: ciència biològica que s'ocupa de tots els organismes microscòpics.

Microorganisme: organisme que només pot ser observat amb l'ajut d'una lent o d'un microscopi.

## **N**

-

## **O**

Overnight (O/N): cultiu de bacteris crescut durant la nit.

## **P**

Patògens: es diu d'aquells organismes capaços de causar una malaltia als éssers vius.

pH: símbol que s'utilitza per expressar la concentració d'ions d'hidrogen.

Pluricel·lular: es diu dels organismes que estan constituïts per més d'una cèl·lula i posseeixen cèl·lules diferenciades que realitzen funcions especialitzades.

Procariota: es diu de la cèl·lula que presenta el seu material genètic en una regió del citoplasma anomenada nucleoide.

## **Q**

-

## **R**

Regne: Grup superior de classificació taxonòmica dels éssers vius.

Resistència: sensibilitat disminuïda o nul·la d'una soca bacteriana a un antibiòtic.

Ringer: substància salina que s'utilitza per a fer dilucions amb bacteris.

RNA: sigles que corresponen a l'àcid ribonucleic. N'hi ha de diferents tipus: RNA missatger, RNA ribosòmic, RNA de transferència, RNA nucleolar, etc.

## **S**

Sembra: es diu que es fa una sembra bacteriana quan s'agafen bacteris d'un cultiu i s'estenen en una placa amb medi. Les sèmres permeten aïllar els bacteris.

Soca: subtipus o variant genètica d'un bacteri.

## **T**

Tinció de Gram: tinció diferencial per la visualització de bacteris grampositius o gramnegatius.

## **U**

Unicel·lular: es diu dels organismes formats per una sola cèl·lula o un sol tipus de cèl·lula.

**V**

Virus: partícules microscòpiques molt senzilles. No arriben a tenir estructura cel·lular, ja que no tenen un citoplasma amb els enzims necessaris per dur a terme un metabolisme.

**W**

-

**X**

-

**Y**

-

**Z**

-

## 10. BIBLIOGRAFIA

La informació per l'elaboració del present treball ha estat treta de diversos llocs:

### a) Llibres especialitzats

- GRANADOS, Raquel; VILLAVERDE, M<sup>a</sup>Carmen. *Microbiología II*. Espanya: Paraninfo, S.A., 2003.
- INGRAHAM, John L.; INGRAHAM, Catherine A.; PRENTISS, Harriet. *Introducció a la microbiologia*. Barcelona: Reverté S.A., 1999.
- JIMENO, A.; BALLESTEROS, M. *Biología 2n batxillerat*. Barcelona: Grup Promotor/Santillana Educación S.L., 2009.
- L. C. Junqueira, José Carneiro. *Biología Celular y Molecular*. Santiago, Chile: EDICIONES McGraw – Hill Interamericana de Chile Ltda., 2007
- MYRVIK, Quentin; PEARSALL, Nancy; WEISER, Russell. *Bacteriología y micología médicas*. Mèxic: Interamericana, 1990.

### b) Articles de revistes de divulgació científica

- JOFRE, Joan. "Els virus bacterians: uns elements cabdals en la generació de variabilitat bacteriana". *Memorias de la Real Academia de Ciencias y Artes de Barcelon*, núm. 983 (abril 2003), p. 3-39.

### c) Documentals

- *The antibiotic adventure* [DVD]. Director: Pierre Bressiant. Productora: France 5; 2008.

### d) Pàgines webs

- **Departamento de Biología-Geología IES María Casares, A Coruña**. [en línia].  
<<http://www.bionova.org.es/biocast/documentos/tema20.pdf>>
- **Instituto Químico Biológico (IQB)**. [en línia]  
<<http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/a052.htm>>
- **La Razón, periódico on-line**. [en línia]  
<<http://www.larazon.es/noticia/3528-superbacterias-un-gen-aumenta-la-resistencia-a-los-antibioticos>>



- **Microbiología y Immunología On-line, Instituto Politécnico Nacional, México.** [en línia]  
<<http://pathmicro.med.sc.edu/spanish/chapter7.htm>>
- **Portal Médico.** [en línia]  
<[http://www.portalesmedicos.com/diccionario\\_medico/index.php/Estreptomicina](http://www.portalesmedicos.com/diccionario_medico/index.php/Estreptomicina)>
- **Revista AquaTIC online.** [en línia]  
<[http://www.revistaaquatic.com/aquatic/pdf/18\\_2.pdf](http://www.revistaaquatic.com/aquatic/pdf/18_2.pdf)>