



*FAQOTERÀPIA:
una alternativa als antibiòtics*



Agraïments

M'agradaria dedicar les següents línies d'agraïment a totes aquelles persones que gràcies a la seva col·laboració i el seu inestimable suport, han fet possible l'elaboració aquest treball.

En primer lloc, agrair al tutor d'aquest projecte, Jordi Cervera, per totes les orientacions i indicacions que han permès perfeccionar aquest treball. No puc oblidar la seva valuosa ajuda per tenir l'oportunitat d'assistir a les estades de l'empresa que ofereix la UAB a través del Programa Argó.

També mostrar la meva gratitud a la Susana Campoy, la Carlota Bardina i la Núria Vigués, professores de la UAB, pels seus ensenyaments, sobretot en l'aspecte metodològic i experimental, i per oferir-se sempre desinteressadament a aconsellar-me i a aclarir certs dubtes envers el marc experimental.

Als meus pares agrair-los la seva paciència, suport logístic i en especial el seu temps generós i gratuït del que he disposat en tot moment.

El meu darrer agraïment el vull reservar pel treball pròpiament i el temps que li he dedicat, perquè m'ha permès adquirir coneixements científics i definir la meva intenció de formar-me en el món de la investigació.

Sumari

El tema d'aquest treball de recerca s'inclou dins la disciplina de la Biologia, concretament a la branca de la Microbiologia Molecular. L'objectiu d'aquest estudi és demostrar quina seria la millor solució per eradicar aquells patògens bacterians que han adquirit resistències als antibiòtics tradicionals. Per tal de dur a terme aquesta experiència, es dissenyarà una part pràctica on es compararà l'efecte de dos tractaments que constitueixen la solució per combatre les soques bacterianes resistents.

La base en què es fonamenta cada teràpia és totalment diferent: la primera, coneguda amb el nom de quimioteràpia parteix de l'ús d'antibiòtics i la segona, anomenada fagoteràpia o teràpia fàgica consisteix en l'aplicació de microorganismes vírics procedents d'ecosistemes naturals.

Índex

1. Introducció	1
2. Microbiologia	3
2.1 Introducció a la microbiologia	3
2.2 Microorganismes	3
3. Bacteris	8
3.1 Morfologia	9
3.2 Estructura	11
3.2.1 Part externa	12
3.2.2 Part interna	20
3.3 Fisiologia	21
3.3.1 Nutrició	22
3.3.2 Font d'energia	23
3.3.3 Metabolisme	24
3.3.4 Respiració	26
3.3.5 Relació	27
3.3.6 Reproducció	28
3.3.7 Creixement	32
4. Antimicrobians	37
4.1 Definició	38
4.2 Actuació	38
4.3 Usos i aplicacions	40
4.4 Propietats dels agents antimicrobians	42
4.5 Quimioteràpia antimicrobiana	43
4.5.1 Obtenció de fàrmacs	43
4.5.2 Característiques generals dels fàrmacs antibacterians	45
4.5.3 Factors que influeixen en l'eficàcia dels fàrmacs	47
5. Resistències a substàncies antimicrobianes	48
5.1 Mecanismes de resistència	49
5.2 Origen i transmissió de les resistències	53
5.2.1 Gens de resistència	54
5.2.2 Adquisició de resistències per mitjà d'intercanvi genètic ...	55
6. Fagoteràpia	57
6.1 Bacteriòfags	58
6.1.1 Composició i estructura dels bacteriòfags	58
6.1.2 Infecció	63
6.1.3 Replicació vírica	65
6.1.3.1 Cicle lític	65
6.1.3.2 Cicle lisogènic	67
6.2 Avantatges i desavantatges de la fagoteràpia	69

7. Part experimental	72
7.1 Objectiu	72
7.2 Hipòtesi	72
7.3 Procediment	72
7.3.1 Metodologia bàsica de la teràpia amb antibiòtics:	
Antibiograma	73
7.3.2 Metodologia bàsica de la teràpia fàgica: Titulació	77
7.3.3 Transducció	82
7.3.4 Corba d'infecció	88
8. Conclusions	106
9. Annex	109
10. Bibliografia	111

1. Introducció

Prenent com a punt de partida l'àmbit de les ciències per a dur a terme el treball de recerca, vam voler desenvolupar un tema relacionat amb les resistències bacterianes envers les substàncies biocides. El poc rigor d'aquest enunciat ens obria un ventall de possibilitats massa extens i alhora amb certa ambigüitat per estudiar. Tot i això, el que clarament teníem definit com a objectiu era analitzar l'efecte d'un dels compostos biocides més coneguts, els antibiòtics, en el tractament de malalties infeccioses especialment per a l'espècie humana. La meua assistència a la universitat va acotar el camp de treball respecte aquesta matèria gràcies a l'assessorament que vaig rebre per part dels docents especialitzats en microbiologia molecular i finalment vam optar per fer un estudi comparatiu entre els antibiòtics i un element antibacterià de naturalesa vírica (utilitzat en una tècnica anomenada fagoteràpia). Vam considerar molt atractiu el desenvolupament d'aquest tema, actualment poc investigat dins la comunitat científica, sobretot per la seva peculiaritat: destruir un bacteri patogen per a la salut humana utilitzant un virus, el qual aparentment pot ser més perjudicial per aquesta. Resulta sorprenent com "l'enemic del teu enemic pot arribar a ser el teu amic".

A partir d'aquí vam definir una tesi que gira entorn a la següent qüestió: Quin dels dos productes biocides testats (antibiòtics o fagoteràpia) és més eficaç en la destrucció de cèl·lules bacterianes que han adquirit resistències antibiòtiques? La resposta a aquest plantejament constitueix el nucli d'aquest treball format per un bloc teòric, on es recullen els coneixements científics necessaris per poder comprendre els conceptes principals que envolten l'assumpte estudiat i un bloc pràctic que mitjançant el mètode científic permet contrastar els resultats d'aquesta investigació.

L'apartat teòric consta de cinc subtemes: una breu introducció a la microbiologia; la morfologia, l'estructura i la fisiologia bacteriana; els compostos antimicrobians o biocides; les resistències als mateixos i l'ús de la fagoteràpia com a mètode d'eradicació de bacteris.

En l'apartat experimental s'exposa el procediment que s'ha seguit, els resultats obtinguts, les corresponents conclusions i es completa amb especulacions derivades del falseig de les hipòtesis inicialment plantejades. A grans trets, el mètode emprat consisteix en incorporar un gen de resistència a un cultiu bacterià determinat i sotmetre'l a la infecció per part d'antibiòtics i virus bacteriòfags (espècie vírica utilitzada en la fagoteràpia). Aquest cultiu (ja infectat) es deixarà créixer i posteriorment es compararà amb el cultiu control (que no s'ha infectat). D'aquesta manera, es podrà observar quin d'aquests productes antibacterians destrueix una quantitat superior de cèl·lules i per tant és més efectiu alhora d'eliminar els bacteris.

Finalment el treball presenta unes conclusions finals on es fa un balanç general dels resultats obtinguts i es dóna resposta a la qüestió proposada.

Així doncs, el present treball de recerca pretén mostrar una alternativa innovadora i de fàcil accessibilitat que podria convertir-se en el futur de la medicina moderna.

2. Microbiologia

2.1 Introducció a la Microbiologia

La microbiologia és la ciència que estudia els microorganismes, és a dir, aquells organismes massa petits per poder ser observats a simple vista i la visualització dels quals requereix l'ús del microscopi. Aquesta definició implica que l'objecte material de la microbiologia ve determinat per la mida dels éssers que investiga, fet que suposa que abasta una enorme heterogeneïtat de tipus estructurals, funcionals i taxonòmics¹: des de partícules no mòbils com els virus i prions, fins a organismes cel·lulars tan diversos com els bacteris, els protozous i part de les algues i dels fongs. Podem definir, doncs, els microorganismes com a éssers de mida microscòpica dotats d'individualitat, que necessiten per al seu estudi una metodologia pròpia i adequada a les seves petites dimensions i presenten una organització biològica senzilla, bé sigui acel·lular² o cel·lular, i en aquest últim cas podran classificar-se en unicel·lulars, cenocítics³, colonials o pluricel·lulars però sense diferenciació en teixits o òrgans.

2.2 Microorganismes

Tal com s'ha explicat anteriorment, la microbiologia s'encarrega de l'estudi d'aquells objectes o agents de diàmetre inferior a un mil·límetre que no es poden observar clarament i per tant requereixen l'ús d'un microscopi per poder ser examinats. No obstant això, alguns microorganismes són visibles a simple vista com les floridures del pa, les algues filamentoses o les espècies bacterianes *Thiomargarita* i *Epulopiscium*. De manera que la dificultat d'establir els límits de la microbiologia ha comportat el suggeriment d'altres criteris per a definir el seu àmbit d'estudi. Entre

¹ Classificació dels éssers vius en grups o taxons.

² No presenten estructura cel·lular i són considerats paràsits: infecten cèl·lules per poder reproduir-se.

³ Cèl·lules plurinucleades (presenten més d'un nucli cel·lular).

les múltiples alternatives proposades al llarg dels anys, se sosté la que actualment la majoria de microbiòlegs recolzen. Aquesta es basa en la divisió dels organismes en tres dominis: *Bacteria*, *Archaea* i *Eucarya*.

- ***Bacteria***: aquest domini està format per cèl·lules procariotes generalment unicel·lulars. Són microorganismes que es troben de manera abundant al sòl, l'aigua i l'aire i a més a més són els principals habitants de la pell, la boca i els intestins humans.
- ***Archaea***: domini format per organismes procariòtics que es distingeixen dels classificats com a *Bacteria* en molts aspectes, especialment en les seqüències de RNA ribosòmic. També manquen d'un component essencial a les parets cel·lulars i posseeixen lípids de membrana característics. Algunes *Archaea* duen a terme processos metabòlics inusuals com la capacitat de generar gas metà.
- ***Eucarya***: inclou microorganismes formats per cèl·lules eucariotes. Dins d'aquest domini també pertanyen els animals i les plantes, tot i que els microorganismes que s'estudien són:
 - **Protists**: es distingeixen algues unicel·lulars, protozous, mucoses i florits aquàtics.
 - **Algues**: són protists fotosintètics que juntament amb els cianobacteris⁴ produeixen el 75% de l'oxigen del planeta.

⁴ Bacteris que tenen la capacitat de realitzar la fotosíntesi.

- **Protozous:** són protists unicel·lulars generalment dotats de mobilitat. Obtenen nutrients mitjançant la ingestió de matèria orgànica o d'altres microbis.

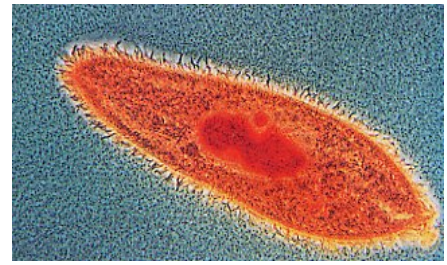


Fig. 1

Protozou.

- **Mucoses:** es tracta de protists que s'assemblen als protozous i als fongs en diferents fases del seu cicle vital.

- **Florits aquàtics:** viuen a les aigües superficials de fonts i sobre la terra humida. S'alimenten de la vegetació en descomposició.



Fig. 2 Imatge microscòpica d'un florit aquàtic.

- **Fongs:** són un grup de microorganismes que inclouen formes unicel·lulars com els llevats, i multicel·lulars com les floridures i els bolets. Gràcies al seu ampli metabolisme, molts fongs fan funcions beneficioses com la fermentació del pa, la producció d'antibiòtics i la descomposició d'organismes morts.

La diferència fonamental entre els grups *Bacteria*, *Archaea* i *Eucarya* és el tipus de cèl·lules que formen els microorganismes corresponents, per aquesta raó, a continuació s'exposen de manera sintètica els principals trets distintius entre cèl·lules procariotes i eucariotes.

Cèl·lula PROCARIOTA		Cèl·lula EUCARIOTA	
Genòfor⁵	Un sol cromosoma	Nucleoplasma	Més d'un cromosoma
	DNA bicatenari ⁶ i circular (part inicial unida amb la terminal)		DNA bicatenari i lineal
	No presenta membrana nuclear (nucli no definit: nucleoide)		Presenta membrana nuclear (nucli definit)
	No conté histones ⁷		Conté histones
Replicació del material genètic: Sense mitosi		Replicació del material genètic: Mitjançant mitosi	
Organització del citoplasma		Organització del citoplasma	
	<u>Orgànuls:</u> - ribosomes		<u>Orgànuls:</u> - mitocondris - cloroplasts (cèl·lules vegetals) - reticle endoplasmàtic - complex de Golgi - lisosomes - vacúols - citoesquelet - ribosomes
	<u>Estructures externes:</u> - Paret cel·lular - Càpsula		
	Mesosoma ⁸		

Fig. 3

⁵ Estructura constituïda per un àcid nucleic (DNA o RNA) que forma el cromosoma d'un bacteri o un virus.

⁶ Format per dues cadenes.

⁷ Proteïnes que permeten la condensació del DNA, en les quals aquest s'enrotlla.

⁸ Invaginació de la membrana cel·lular.

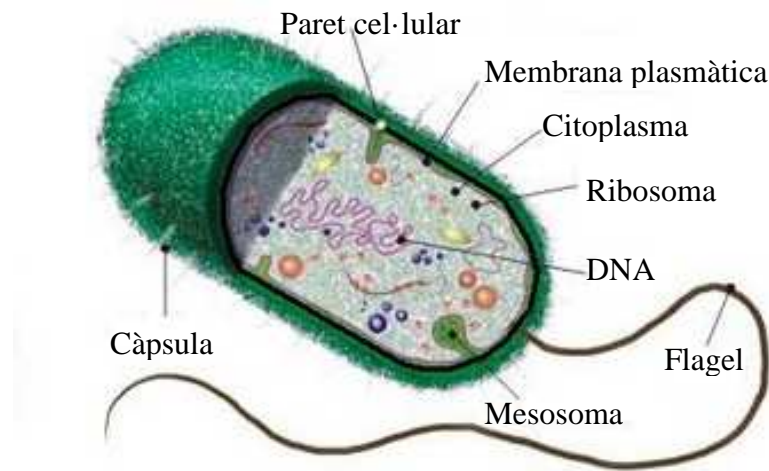


Fig. 4

Cèl·lula procariota.

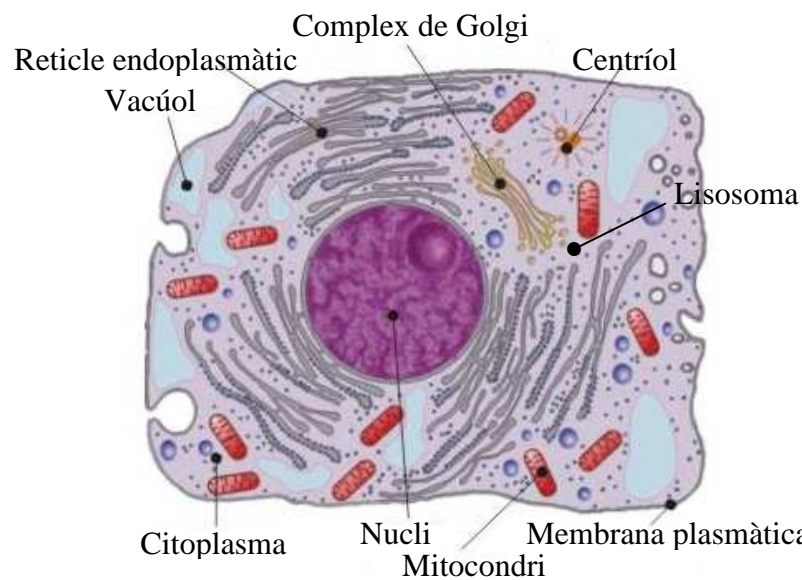


Fig. 5

Cèl·lula eucariota.

Existeix un altre gran grup, el dels virus, que inclou estructures no considerades organismes vius però que indiscutiblement formen part del món microscòpic a causa de la seva inapreciable dimensió.

- **Virus:** són entitats acel·lulars que necessiten envair una cèl·lula hoste per a poder replicar-se. Es tracta dels microbis més minúsculs ja que poden arribar a ser 10000 vegades més petits que un bacteri típic, però la seva mida no és proporcional al seu poder: produeixen

multitud de malalties i han causat epidèmies que han transformat la història humana.

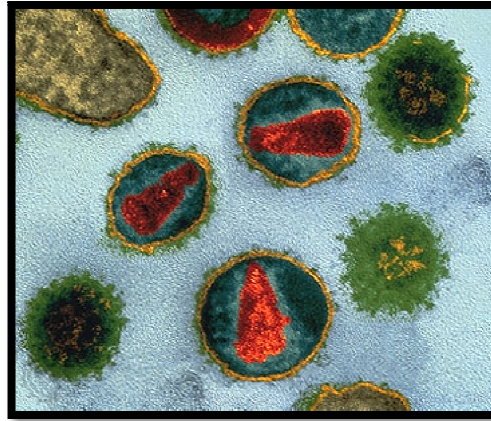


Fig. 6 Virus HIV causant de la SIDA.

3. Bacteris

Els bacteris són organismes unicel·lulars que es distingeixen de tots els altres per l'estructura procariòtica de les seves cèl·lules i per la seva mida diminuta que oscil·la entre 0,5 i 5 micròmetres (μm).

Es poden considerar els pobladors més antics de la Terra i actualment constitueixen el grup més nombrós en comparació amb altres regnes, ja que poden sobreviure en condicions extremes ($< 0^{\circ}\text{C}$ - 200°C) i es troben a tots els indrets: aigua, aire, terra, fluids interns d'altres éssers vius...

Com a font d'energia utilitzen glucosa, que és obtinguda a través de diversos processos com són els quimiosintètics, consistents en oxidar la matèria orgànica i inorgànica; o els fotosintètics, característics perquè no requereixen clorofil·la com les cèl·lules eucariotes, sinó que són realitzats a partir d'uns pigments fotosintètics (anomenats bacterioclòròfil·la) localitzats en granulacions citoplasmàtiques.

Existeixen dos tipus de bacteris: els arqueobacteris (bacteris ancestrals) i els eubacteris (bacteris vertaders). Ambdós grups presenten una història evolutiva independent que els ha atorgat formes, composicions químiques i estructures oposades, per això es classifiquen en dominis diferents.

Una peculiaritat dels bacteris és la seva capacitat per formar espores, formes de vida que poden resistir anys i quan troben les condicions aptes tornen a desenvolupar l'organisme.

En la creença general, els bacteris s'associen amb les malalties -com la intoxicació alimentària, la sífilis o la febre tifoide- perquè els més coneguts són de caràcter patogen o parasitari, però tot i així, la major part d'aquests microorganismes són inofensius i no tan sols això, una gran part realitza tasques beneficioses, com fer possible l'existència de les plantes, els animals i els humans perquè mantenen l'atmosfera dins un balanç apte per a la vida, donen lloc a la flora bacteriana i permeten desenvolupar importants progressos per a la investigació i la biotecnologia.

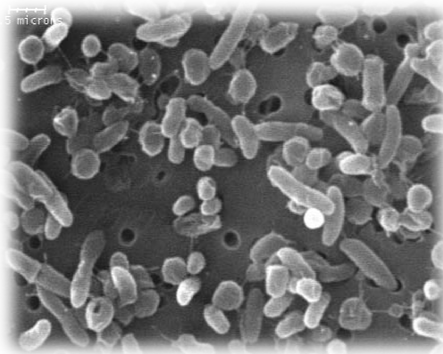


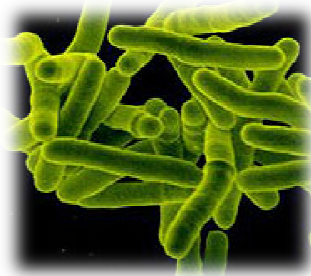
Fig. 7 Colònia de bacteris *Herminiimonas glaciei*.

3.1 Morfologia

Els bacteris presenten una àmplia varietat de mides i formes. La majoria té una mida compresa entre 10 i 15 μm . No obstant això, algunes espècies com la *Thiomargarita namibiensis* i la *Epulopiscium fishelsoni* arriben a assolir els 0,5 mm, la qual cosa les

fa visibles a l'ull nu. Per altra banda les varietats més petites conegudes, entre les quals cal destacar les que pertanyen al gènere *Mycoplasma*, arriben a mesurar només 0,1 μm , és a dir, són tan petites com els virus més grans. De manera que es pot determinar que la mida dels bacteris oscil·la entre 0,1 i 1000 μm . La forma dels bacteris és molt variada i, sovint, una mateixa espècie adopta diferents tipus morfològics, el que es coneix com a pleomorfisme. La seva morfologia en determina la classificació:

- **BACILS:** Tenen forma de bastó. En dividir-se originen un filament que els fa



adquirir forma de fong. Per aquesta raó, el nom científic d'aquests microorganismes va precedir de la paraula *myco* (en grec significa fong).

Exemple:

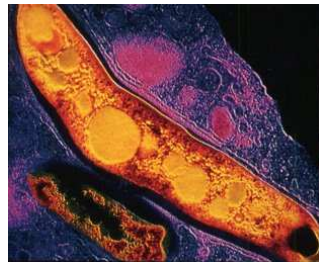


Fig. 9 *Mycobacterium tuberculosis*

- **COCS:** Tenen forma esfèrica. S'agrupen una vegada s'han dividit.



- si queden de dos en dos s'anomenen diplococs,
- si formen llargues cadenes s'anomenen estreptococs,
- si queden en grups adquirint una forma de ram s'anomenen estafilococs.

Exemple:

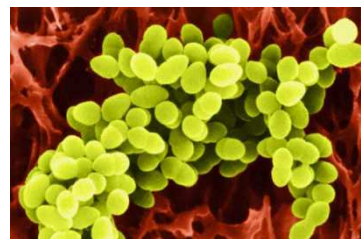
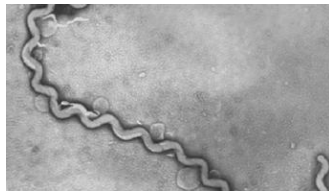


Fig. 10 *Staphylococcus aureus*

- **ESPIRILS:** Tenen forma helicoïdal i acostumen a trobar-se individualment.



Exemple:

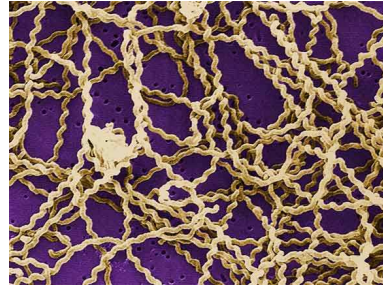


Fig. 11 Leptospira

- **VIBRIONS:** Són corbats i tenen flagels⁹.



Exemple:

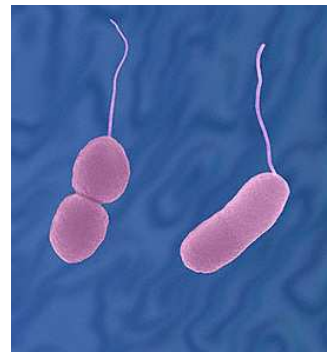


Fig. 12 Vibrio parahaemolyticus

3.2 Estructura

En l'estructura bacteriana es distingeixen dues parts: els embolcalls i apèndixs a la part externa; i el citoplasma a la part interna. Cadascuna d'elles està formada per elements diferents.

⁹ Prolongació citoplasmàtica llarga i contràctil que serveix com a òrgan de la locomoció.

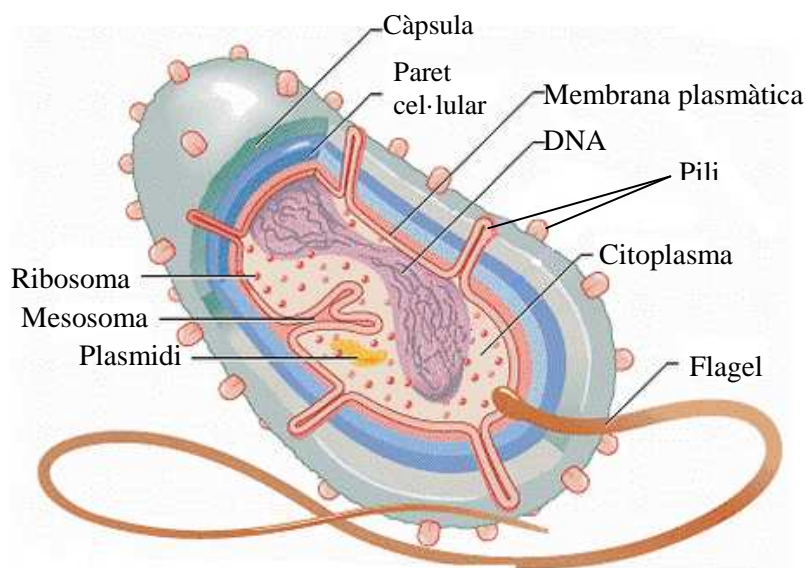


Fig. 13

Estructura bacteriana.

3.2.1 Part externa

L'estructura externa o embolcall es basa en la presència de la membrana cel·lular o plasmàtica, la paret cel·lular que la cobreix, la càpsula (que no es troba en tots els casos) i els apèndixs com els pilis i els flagels. Aquesta part de l'estructura bacteriana conté les zones de transport de nutrients, intervé en la relació hoste¹⁰-paràsit, és causant de les reaccions del sistema immunitari i pot contenir estructures tòxiques per a l'organisme afectat.

– Apèndixs

Flagels: són filaments proteics, helicoidals, prims i rígids responsables de la mobilitat del bacteri, que es dona quan el flagel gira de manera similar a l'hèlix d'un vaixell. Els flagels poden variar quant a la quantitat, és a dir, un sol bacteri en pot presentar des d'un fins a centenars.

Pilis: són estructures filamentoses, proteiques, tubulars i molt nombroses que envolten uniformement la membrana. La seva funció consisteix en l'intercanvi de molècules amb el medi extern i el traspàs d'informació genètica amb un altre bacteri. A més a més, de vegades poden constituir una

¹⁰ Organisme sobre el qual o a costa del qual viu un paràsit.

via de penetració de virus bacteriòfags¹¹. Existeixen unes altres estructures denominades pilis sexuals que són més llargues però menys nombroses en la cèl·lula (hi ha dos o tres per cèl·lula). Aquestes intervenen en l'intercanvi genètic entre bacteris, que té lloc per mitjà d'un procés anomenat conjugació, esmentat i esquematitzat a la figura 19.

- Càpsula: quan existeix, està ubicada fora de la paret cel·lular. És segregada pels bacteris, que extreuen un material capsular (generalment de naturalesa polisacàrida¹²) que s'associa a la superfícies cel·lulars. Té un gruix important i pot envoltar a més d'un bacteri a la vegada, quan es dona aquesta situació, es parla d'una capa amorfa¹³ anomenada "slime" que inclou tots els bacteris d'una població. En els ecosistemes naturals, algunes espècies utilitzen la càpsula com a reserva externa de nutrients o bé aquesta és emprada per conservar la humitat. Els "slimes" són útils per adherir-se a les superfícies llises i una vegada enganxats, els bacteris es reproduïxen formant microcolònies. Així, s'originen les biopel·lícules, hàbitats rics en nutrients que protegeixen diferents espècies bacterianes (un exemple d'aquest cas és la placa bacteriana de les nostres dents). La càpsula no és una estructura vital per la cèl·lula però la seva pèrdua comporta canvis en la morfologia i la desaparició de la virulència del microorganisme. De fet, la virulència d'alguns patògens es correlaciona amb la presència de la càpsula, com és el cas de *Streptococcus pneumoniae* i *Haemophilus influenzae*. La càpsula protegeix el microorganisme de la fagocitosi¹⁴, principal mecanisme de

¹¹ Tipus de virus que tenen la capacitat d'infectar bacteris.

¹² Polímer format per cadenes llargues de molècules de glúcid (sucre).

¹³ Sense forma determinada.

¹⁴ Acte que permet, a determinades cèl·lules o a determinats organismes unicel·lulars, de copsar, englobar i generalment destruir o digerir elements molt diversos.

defensa que utilitza l'hoste davant la presència de bacteris capsulats. Una resposta efectiva dels organismes infectats per atacar a aquest tipus de bacteris (amb càpsula) implica la producció d'anticossos que s'uneixen a la càpsula facilitant l'opsonització¹⁵. D'aquesta capacitat antigènica¹⁶ es determina l'ús de la càpsula per a la producció de diferents vacunes que estimulen la formació d'anticossos específics per part del cos de l'organisme afectat. La producció o no de la càpsula està regulada genèticament, de manera que els bacteris en presenten quan és necessària per a la supervivència dins l'hoste.

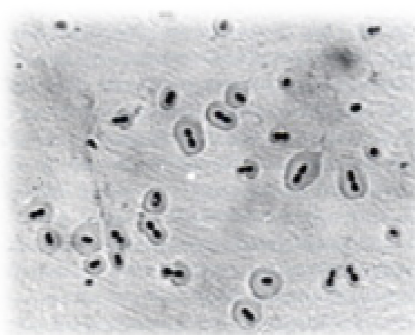


Fig. 14 Càpsules de *Streptococcus pneumoniae*.

- Paret cel·lular: és una capa rígida, dura i elàstica externa a la membrana que cobreix i protegeix el bacteri i serveix per mantenir la forma i l'estructura cel·lulars. Es tracta d'una coberta vital per a aquells microorganismes que la contenen. És l'element sobre el qual els fàrmacs actuen per a destruir el bacteri, ja que aquests bloquegen la formació de la paret provocant la lisi¹⁷ i la conseqüent mort de la cèl·lula. Exceptuant els *Mycoplasmes*, tots els bacteris tenen paret cel·lular que els protegeix de la lisi osmòtica. Aquesta també conté components que contribueixen a la patogenicitat de determinats

¹⁵ Fer sensible les cèl·lules a la fagocitosi.

¹⁶ Indueix a la formació d'anticossos, que reaccionen contra la càpsula.

¹⁷ Fenomen consistent en la destrucció total o parcial del contorn de la cèl·lula i en la dispersió del citoplasma.

microorganismes i a més pot protegir a la cèl·lula de les substàncies tòxiques. Està constituïda bàsicament per un mucopolisacàrid¹⁸ exclusiu de les cèl·lules procariotes: la mureïna o peptidoglicà. En els bacteris es poden trobar dos tipus principals de paret que es corresponen amb les propietats de la tinció Gram. Aquest mecanisme selectiu es basa en posar de manifest les característiques i la diferent estructura de les parets segons el contingut de peptidoglicà. Es distingeixen dos grans grups, els bacteris **gram-positius**, que adquireixen una coloració blavosa-violeta; i els **gram-negatius**, que passen a ser de color rosat o vermell una vegada tintats.

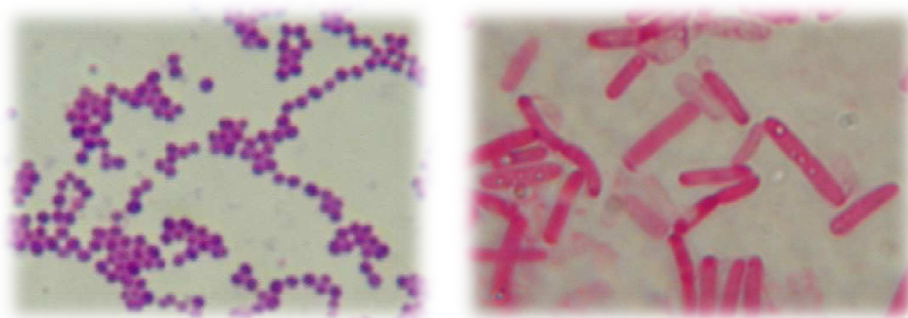


Fig. 15 Cocs gram-positius (esquerre) i bacils gram-negatius (dreta).

Paret gram-positiva

És una paret gruixuda que conté peptidoglicà (com a component fonamental) i àcids teicoics i lipoteicoics. És biològicament estable i resisteix a l'atac dels enzims de mamífers, excepte dels lisozims¹⁹, que la degraden. La síntesi de la paret pot estar afectada pels antibiòtics (com la penicil·lina), i els àcids teicoics són el principal determinant antigènic dels bacteris grampositius i per tant conformen la seva individualitat immunològica. Els bacteris gram-

¹⁸ Cadena llarga formada per glúcids. S'acostuma a localitzar a les mucositats i al líquid que es troba al voltant de les articulacions.

¹⁹ Enzims mucolítics amb propietats antibiòtiques que hidrolitzen els polisacàrids (glúcids) complexos de la paret cel·lular d'alguns bacteris i en produeixen la lisi.

positius són més resistents a l'acció d'agents oxidants, però per altra banda, són més sensibles als àcids, detergents i sulfamides²⁰.

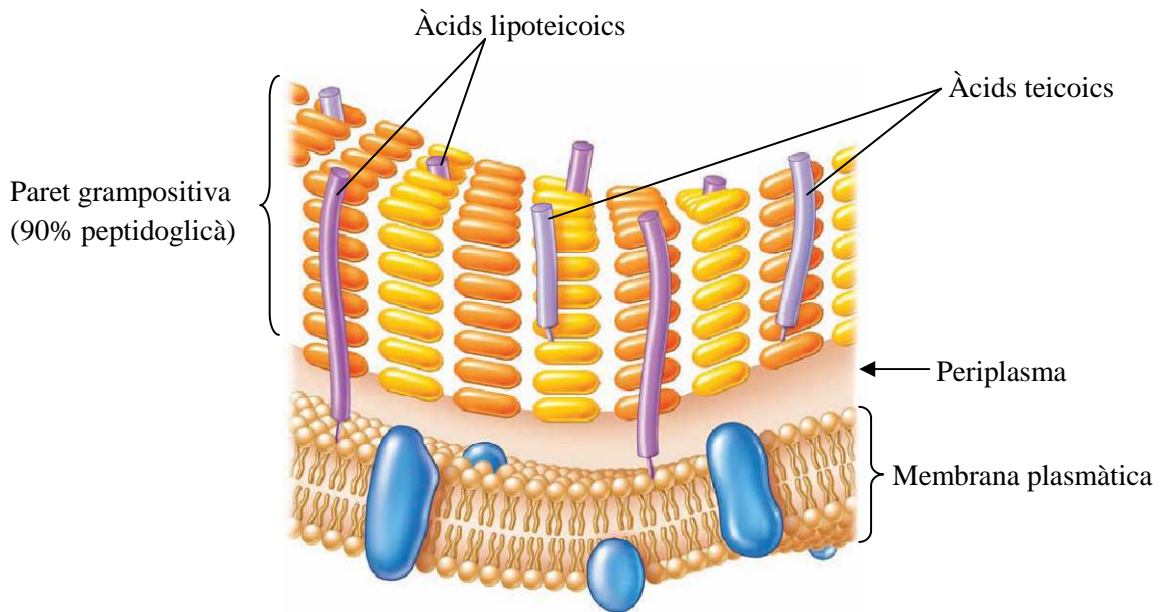


Fig. 16 Estructura de la paret grampositiva.

Paret gram-negativa

El gruix de la paret cel·lular d'un bacteri gram-negatiu és considerablement inferior que en el cas dels gram-positius. La quantitat de peptidoglicà és molt menor i els àcids teicoics són inexistents. La fina paret de mureïna està envoltada d'un gel periplasmàtic (compost per un enzim anomenat betalactamasa) que forma el periplasma²¹. A la part externa d'aquest, hi ha una estructura exclusiva de les parets gramnegatives, que rep el nom de membrana externa. Estructuralment és similar a una bicapa lipídica, però pel que fa a la composició és diferent a la d'altres membranes biològiques ja que la part externa està formada per lipopolisacàrids (LPS)²² o també anomenats

²⁰ Substància formada bàsicament per àcid sulfúric.

²¹ Compartiment subcel·lular que conté proteïnes essencials per l'adaptació bacteriana al medi ambient.

²² Substància complexa formada per lípids i polisacàrids (glúcids).

endotoxines (altament tòxics per als éssers humans). A més a més, la membrana externa conté fosfolípids i proteïnes que la uneixen al peptidoglicà. Es pot afirmar que els bacteris gram-negatius tenen una barrera de permeabilitat selectiva addicional i per aquest motiu són més resistent que els bacteris gram-positius davant d'algunes substàncies desinfectants de l'entorn.

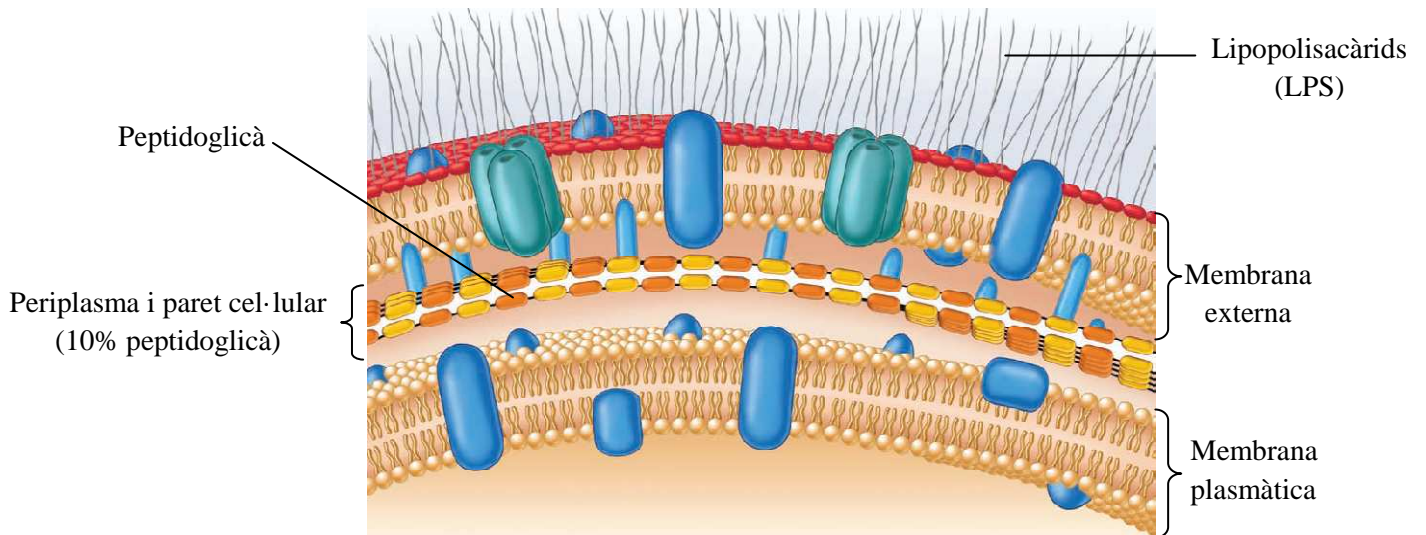


Fig. 17 Estructura trilaminar de la paret gramnegativa.

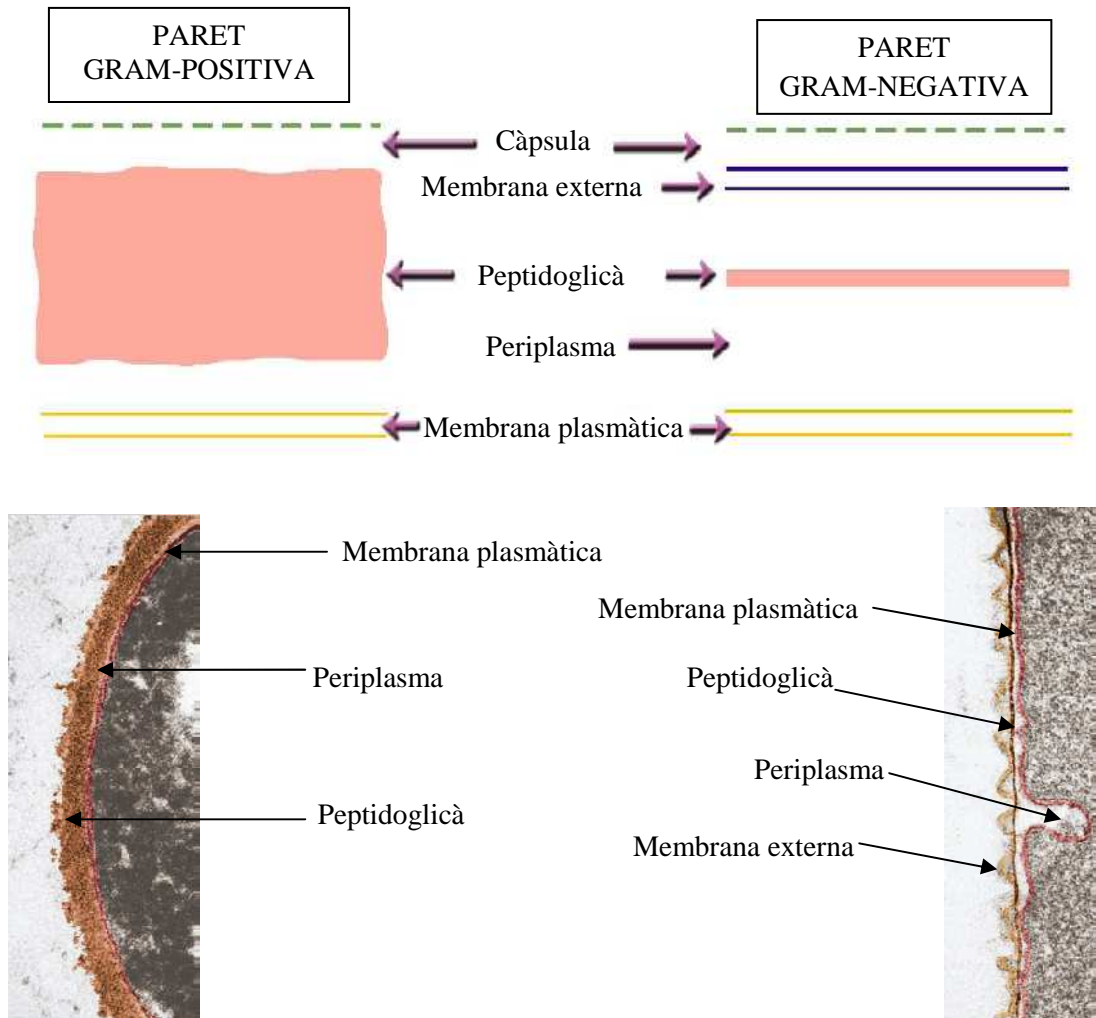


Fig. 18 Diferències entre la paret gram-positiva i la gram-negativa.

- Membrana cel·lular o plasmàtica: és una estructura vital pel bacteri i representa el límit de separació entre l'interior i l'exterior de la cèl·lula. Es tracta d'una bicapa lipídica (formada per lípids) similar a altres membranes biològiques, composta per fosfolípids amfipàtics²³ i que a diferència de les membranes eucariotes no presenta esterols²⁴. Inserides en ella, hi ha moltes proteïnes transmembrana que faciliten el transport de substàncies hidrofíliques a través d'aquesta. Com que no existeixen orgànuls

²³ Molècules lipídiques que tenen un extrem polar o hidrofílic (soluble en aigua) i un altre extrem hidrofòbic (amb rebuig l'aigua).

²⁴ Tipus d'esteroides (lípid) amb un o més d'un grup alcohol (OH).

membranosos en el citoplasma, la respiració aeròbica²⁵, el transport d'electrons i altres processos relacionats amb l'obtenció d'energia en els bacteris van lligats a la membrana cel·lular (mesosomes). La seva funció bàsica és la de barrera osmòtica²⁶ ja que té permeabilitat selectiva i permet l'entrada de nutrients i la sortida de residus gràcies a mecanismes de transport passiu (no requereix energia pel transport) i actiu (requereix energia pel transport). També conté els enzims necessaris per a la síntesi de lípids, de la paret cel·lular i la càpsula entre d'altres compostos, i destaca l'alt contingut en molècules receptores que ajuden als bacteris a detectar i respondre a substàncies químiques del medi extern.

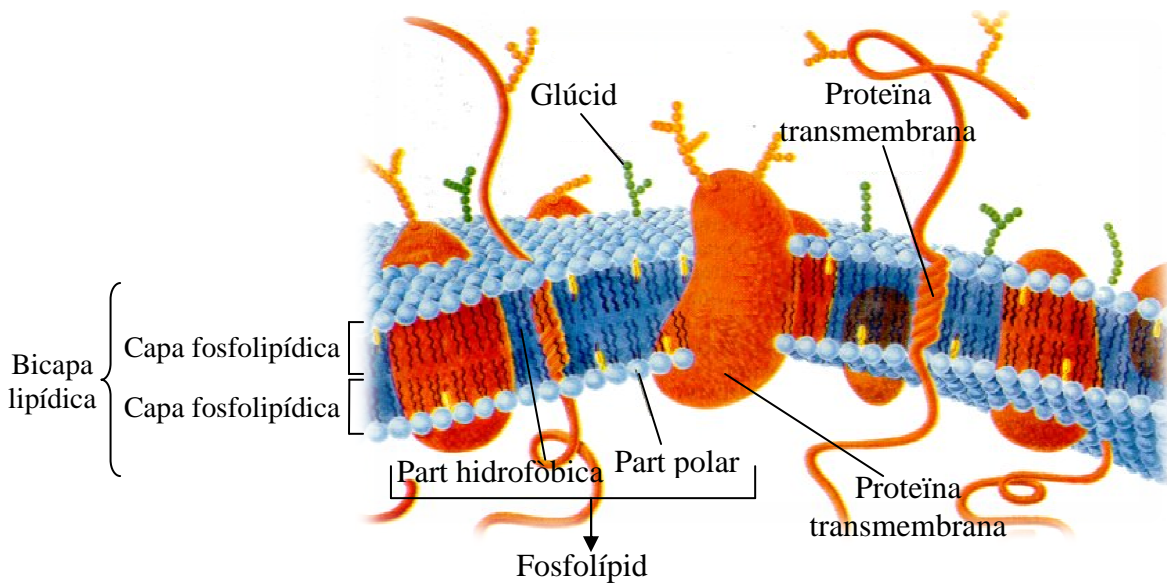


Fig. 19 Estructura de la membrana cel·lular.

²⁵ Metabolisme energètic mitjançant el qual els éssers vius obtenen energia de les molècules orgàniques a partir d'un procés de combustió en el qual l'oxigen procedent de l'aire és l'element emprat.

²⁶ En un sistema format per dues dissolucions de concentracions diferents, l'osmosi representa la tendència a passar dissolvent de la dissolució menys concentrada a la que ho és més.

3.2.2 Part interna

L'estructura del citoplasma bacterià és molt simple i no es distingeixen sistemes de membranes independents que el divideixin en compartiments funcionals (orgànuls). Tot i així, sí és possible trobar ribosomes procariòtics (de mides molt petites) o bé petits orgànuls com els vacúols o les inclusions, a més del material genètic, indispensable per a la cèl·lula.

- Material genètic: constitueix un dels elements més fonamentals presents en el citoplasma ja que conté la informació imprescindible per a la supervivència del bacteri. S'organitza en un cromosoma dispers pel citoplasma per l'absència de membrana nuclear. Està format per una estructura fibril·lar composta per una molècula de DNA circular i de doble cadena (bicatenari), que presenta longituds considerables (aproximadament 1 mm) i està enrotllada i estretament empaquetada. Tot i així, en els cromosomes procariotes no hi ha histones, de manera que la funció d'estabilitzar i condensar la fibra de DNA la duen a terme altres proteïnes, com les poliamines, i el magnesi. La mitosi²⁷ és inexistent de manera que el procés de replicació del material genètic és diferent (no es fa a partir d'un fus mitòtic²⁸) i té lloc gràcies als mesosomes, invaginacions de la membrana plasmàtica que s'encarreguen de repartir les còpies del cromosoma entre les dues cèl·lules filles.
- Ribosomes: són orgànuls cel·lulars formats per proteïnes ribosòmiques que tradueixen la informació genètica per tal de sintetitzar proteïnes.

²⁷ Procés de divisió de les cèl·lules en què, a partir d'una prèvia duplicació del material genètic, s'obtenen dues cèl·lules filles amb una dotació cromosòmica idèntica.

²⁸ Estructura citoplasmàtica composta per fines fibres proteïques que s'estén al llarg dels dos pols de la cèl·lula durant la mitosi i s'uneix als cromosomes arrossegant-los cap als extrems abans de la divisió del citoplasma.

- Mesosomes: són invaginacions que presenta la membrana plasmàtica, de manera que fan augmentar la superfície d'aquesta. És on es troben els enzims que intervenen en la síntesi d'ATP²⁹, per tant, tenen funció energètica i també permeten la subjecció del cromosoma bacterià.
- Plasmidis: són molècules de DNA extracromosòmic en forma circular que es repliquen de manera autònoma ja que ho fan independentment del cromosoma. Un bacteri pot contenir fins a 50 còpies d'un mateix plasmidi. Funcionalment són elements accessoris, és a dir, la cèl·lula pot viure sense aquests, tot i així, la informació que contenen pot contribuir a l'adaptació del bacteri al medi o bé a la seva evolució. Poden portar gens que codifiquen factors patogènics (com les toxines) i factors de resistència a antibiòtics (plasmidis R). Aquesta informació pot transferir-se a altres bacteris de la mateixa o de diferent espècie a través de diversos mecanismes genètics (parasexuals).

* El mecanismes parasexuals s'expliquen al punt 3.3.6 *Reproducció* d'aquest treball.

3.3 Fisiologia

Al llarg de milions d'anys d'evolució, els procariotes no han donat lloc a una diversitat morfològica i estructural tan gran com la que trobem en els eucariotes. En canvi, sobresurten amb escreix pel que fa al nombre d'adaptacions fisiològiques i metabòliques a tota mena d'hàbitats apareguts sobre el planeta des de la seva formació. La diversitat nutricional dels bacteris fa que els dividim en grups diferents en funció de la font de carboni, la font d'energia, la respiració cel·lular que realitzen i les diverses reaccions metabòliques que tenen lloc en el seu interior. De la mateixa manera, la importància de la seva adaptació a condicions adverses recau

²⁹ Component químic que emmagatzema energia.

principalment en la seva capacitat de relació amb el medi, que és una de les funcions que els defineixen com a éssers vius, i en la rapidesa del seu creixement o proliferació.

3.3.1 Nutrició

Els bacteris, com qualsevol altre ésser viu, necessiten una font de carboni per poder sobreviure. Del carboni o d'altres elements procedents de l'ambient l'organisme obté els nutrients, compostos químics que permeten la captació d'energia, el desenvolupament de processos biosintètics³⁰ i la continuïtat del funcionament cel·lular. Els bacteris tenen una gran capacitat per utilitzar una àmplia gamma de nutrients, que va des dels compostos inorgànics simples als compostos orgànics més complexos.

El carboni és el major constituent de la cèl·lula bacteriana, per tant és el nutrient principal que requereix. D'acord amb la forma en què l'utilitzen, s'estableix una nova categorització dels bacteris, que els distingeix entre autòtrofs i heteròtrofs.

- **Autòtrofs:** utilitzen com a principal font de carboni el CO₂ que és transformat en matèria orgànica. Aquest tipus de nutrició consisteix en la realització de la fotosíntesi, gràcies a la presència de bacteriofil·la (exclusiva dels bacteris fotosintètics), procés durant el qual l'organisme duu a terme un seguit de reaccions químiques per fabricar les seves pròpies molècules orgàniques a partir de l'energia provinent dels rajos solars i de substàncies inorgàniques senzilles com són les sals minerals, l'aigua i el diòxid de carboni.

³⁰ Síntesi de substàncies complexes a partir d'altres de més simples, amb despesa d'energia, efectuada per éssers vius.

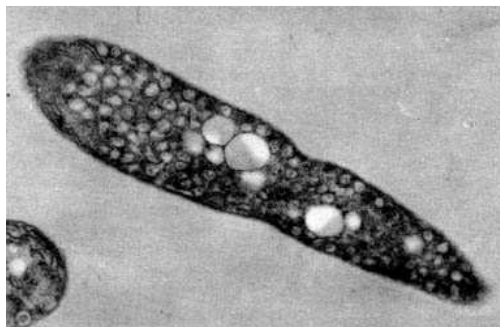


Fig. 20 Bacteri fotosintètic. En el seu interior es poden observar cromatòfors³¹.

- **Heteròtrofs:** utilitzen molècules orgàniques ja elaborades per altres organismes com a font d'energia. Aquesta matèria orgànica l'obtenen en alimentar-se d'organismes autòtrofs.

3.3.2 Font d'energia

Segons la font d'energia necessària per transformar els nutrients captats en energia aprofitable amb la qual es construiran les pròpies molècules, s'estableix un nou criteri que jerarquitzava els bacteris en dos grups:

- Si l'energia prové de les **radiacions** (llum), es parla de bacteris fotòtrofs, que alhora poden ser:

- **Fotolitòtrofs** (autòtrof): capten energia llumínica en presència de substàncies inorgàniques. En són exemples les tiorrodàcies i les clorobacteriàcies.
- **Fotoorganòtrofs** (heteròtrof): capten energia llumínica amb requeriment de substàncies orgàniques. Destaquen les atiorrodàcies.

- Si l'energia es desprèn a partir de **molècules químiques** en les reaccions biològiques d'oxidoreducció³², es parla de bacteris quimiòtrofs, que poden classificar-se en:

³¹ Orgànuls arrodonits on es concentren els pigments que absorbeixen la llum.

³² Reaccions en què un dels compostos es redueix i l'altre s'oxida. L'element oxidat ha perdut els electrons que són agafats pel reactiu reduït.

- **Quimiolitòtrofs** (autòtrof): capten l'energia química a partir de substàncies inorgàniques.

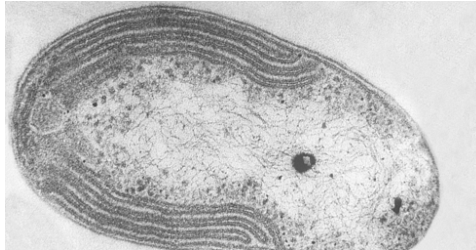


Fig. 21 *Nitrobacter winogradsky*

- **Quimioorganòtrofs** (heteròtrof): capten l'energia química mitjançant substàncies orgàniques.



Fig. 22 *Beggiatoa alba*

FONT D'ENERGIA \ FONT DE CARBONI	INORGÀNICA (AUTÒTROFS)	ORGÀNICA (HETERÒTROFS)
LLUM (FOTÒTROFS)	<p>Fotolitòtrofs</p>	<p>Fotoorganòtrofs</p>
ENERGIA QUÍMICA (QUIMIÒTROFS)	<p>Quimiolitòtrofs</p>	<p>Quimioorganòtrofs</p>

Fig. 23 Taula que estableix els diferents tipus de bacteris segons la font de carboni i d'energia que utilitzin.

3.3.3 Metabolisme

El terme “metabolisme” fa referència al conjunt de reaccions químiques que es donen a la cèl·lula i són realitzades per unes proteïnes conegudes com a enzims. Té tres funcions específiques:

- Obtenir energia química de l'entorn i emmagatzemar-la per després utilitzar-la en diferents funcions cel·lulars.
- Convertir els nutrients exògens en unitats estructurals dels components macromoleculars de la cèl·lula bacteriana.
- Formar i degradar molècules necessàries per funcions cel·lulars específiques, com per exemple la mobilitat i la captació de nutrients.

El metabolisme es pot dividir en dues parts: el catabolisme i l'anabolisme.

La fase del metabolisme que descompon les molècules grans en petites és el **catabolisme**. Les molècules grans com les proteïnes o els lípids, que provenen dels nutrients del medi ambient, es descomponen enzimàticament. El producte d'aquesta descomposició o degradació el formen molècules més senzilles com per exemple, l'àcid làctic, l'amoniac i l'energia química continguda en les estructures de les grans molècules. Aquesta energia es conserva en forma de molècula coneguda amb el nom de trifosfat d'adenosina (ATP), la qual és de vital importància en el metabolisme de qualsevol altre organisme viu.

Per altra banda, l'**anabolisme** és la fase del metabolisme durant la qual se sintetitzen les molècules que el bacteri necessita per regenerar-se, mantenir-se o dividir-se. Aquestes molècules, que formen la part funcional i estructural dels organismes, són: els lípids, les proteïnes, els glúcids i els àcids nucleics (DNA i RNA). Tals processos de síntesi requereixen energia, que és proporcionada per l'ATP generat durant el catabolisme.

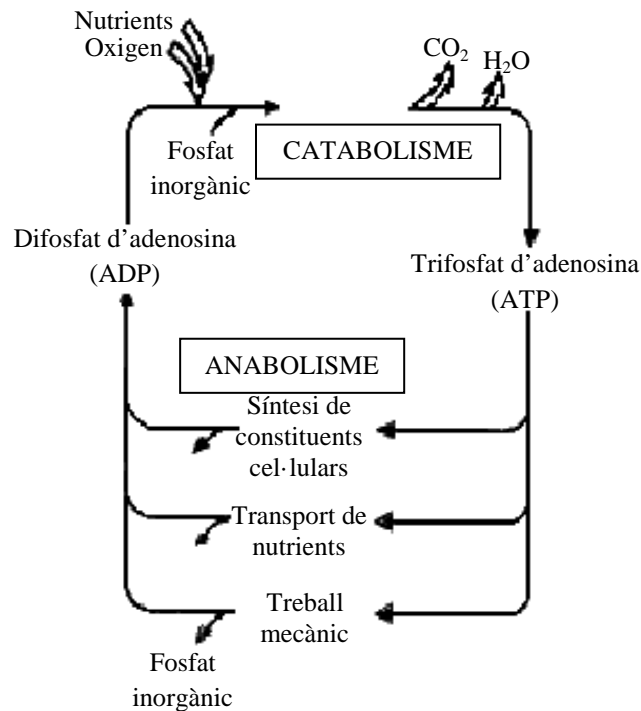


Fig. 24 Anabolisme, catabolisme i formació d'ATP a partir de fosfat inorgànic i ADP.

3.3.4 Respiració

En els éssers vius, l'ús de l'energia continguda en els nutrients té lloc mitjançant reaccions d'oxidoreducció. Químicament l'oxidació es defineix com la pèrdua d'electrons i la reducció com el guany dels mateixos. Tot i així, des del punt de vista bioquímic, les reaccions d'oxidoreducció inclouen no només la transferència d'electrons, sinó també d'àtoms d'hidrogen, per la qual cosa es coneixen amb el nom de reaccions de deshidrogenació. En reaccions d'aquest tipus, hi ha substàncies que cedeixen electrons (donadores) i altres que els accepten (acceptores). De manera que es distingeixen bacteris amb diferents categories metabòliques:

- **Aerobis:** són bacteris que poden utilitzar l'oxigen com a molècula oxidant (acceptor final). Duen a terme una respiració de tipus aeròbic en la qual la matèria orgànica és oxidada completament en CO_2 i aigua amb la intervenció

d'una cadena d'electrons situada a la membrana plasmàtica i un acceptor final que és l'oxigen molecular (O₂).



Fig. 25 Reacció que té lloc en la respiració aeròbica

- **Anaerobis:** són bacteris que no utilitzen l'oxigen molecular en la seva activitat biològica. L'obtenció de l'energia la realitzen mitjançant el catabolisme fermentatiu (conjunt de reaccions de degradació dels nutrients per obtenir energia o convertir-los en nou material cel·lular en el qual es produeix una reordenació dels electrons de la molècula donadora). Aquests tipus de bacteris poden utilitzar com a element oxidatiu (acceptor final d'electrons) una gran varietat de compostos inorgànics com, per exemple, els nitrats o els sulfats. Dins d'aquest grup, es diferencien dues varietats:
 - **Anaerobis facultatius:** poden viure en ambients amb oxigen o sense ell.
 - **Anaerobis estrictes:** únicament poden sobreviure en ambients on manca l'oxigen.

3.3.5 Relació

Els bacteris es relacionen directament amb el medi i són capaços de donar resposta als estímuls que reben. Aquells que són mòbils (tenen la capacitat de desplaçar-se), poden apropar-se o allunyar-se d'un determinat espai en funció dels seus interessos fisiològics. Ho fan mitjançant moviments flagel·lars, de reptació, contracció, i dilatació. Pel que fa a aquells que no poden desplaçar-se, es caracteritzen perquè presenten una càpsula més o menys gruixuda i resistent i el citoplasma del seu interior es troba parcialment deshidratat formant una espora o endòspora. Les càpsules bacterianes, tal com s'ha explicat detalladament a l'apartat 3.2.1 *Part externa*, compleixen moltes funcions que fan dels bacteris un dels microorganismes

més adaptables i més àmpliament distribuïts. Poden actuar, per exemple, com a protecció davant un canvi sobtat en les condicions ambientals; i són útils en la fixació sobre diversos substrats on l'organisme pot viure (aparell digestiu, pedres, fustes...). La resistència a les condicions adverses pot prolongar-se durant molt de temps i una vegada aquestes s'estabilitzen, l'esporeja pot tornar a rehidratar-se, germinar i activar el metabolisme bacterià immediatament.

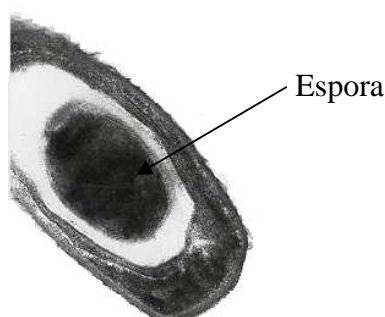


Fig. 26 Espora continguda en un bacteri.

3.3.6 Reproducció

En la major part dels organismes unicel·lulars, l'augment de la mida de les cèl·lules (creixement) juntament amb la seva reproducció, són conceptes que es troben íntimament relacionats. Els bacteris creixen fins a obtenir una mida concreta i més tard es reproduïxen. La reproducció que té lloc pot ser asexual (no es fusionen els gàmetes sexuals) o parasexual.

- Reproducció asexual: el mecanisme reproductiu asexual més habitual és la bipartició o també anomenat fissió binària. A partir d'aquest procés, s'obtenen dues cèl·lules filles amb idèntica informació, entre sí i a la cèl·lula mare, al DNA circular i amb un contingut citoplasmàtic similar. De fet, es pot considerar les cèl·lules filles com a "clons" de la progenitora. Amb aquest sistema de reproducció es pot originar una colònia de cèl·lules el material genètic de les quals és idèntic; tot i així, aquesta

situació es dona amb poca freqüència per l'elevat índex de mutacions que es produeixen en els bacteris per l'enorme quantitat de descendència que s'obté en poc temps. La bipartició té lloc quan la cèl·lula ha augmentat la seva mida i ha duplicat la cadena de DNA. Aquesta cadena s'adjunta a un mesosoma, que separa el citoplasma en dues parts i reparteix cada còpia del DNA duplicat.

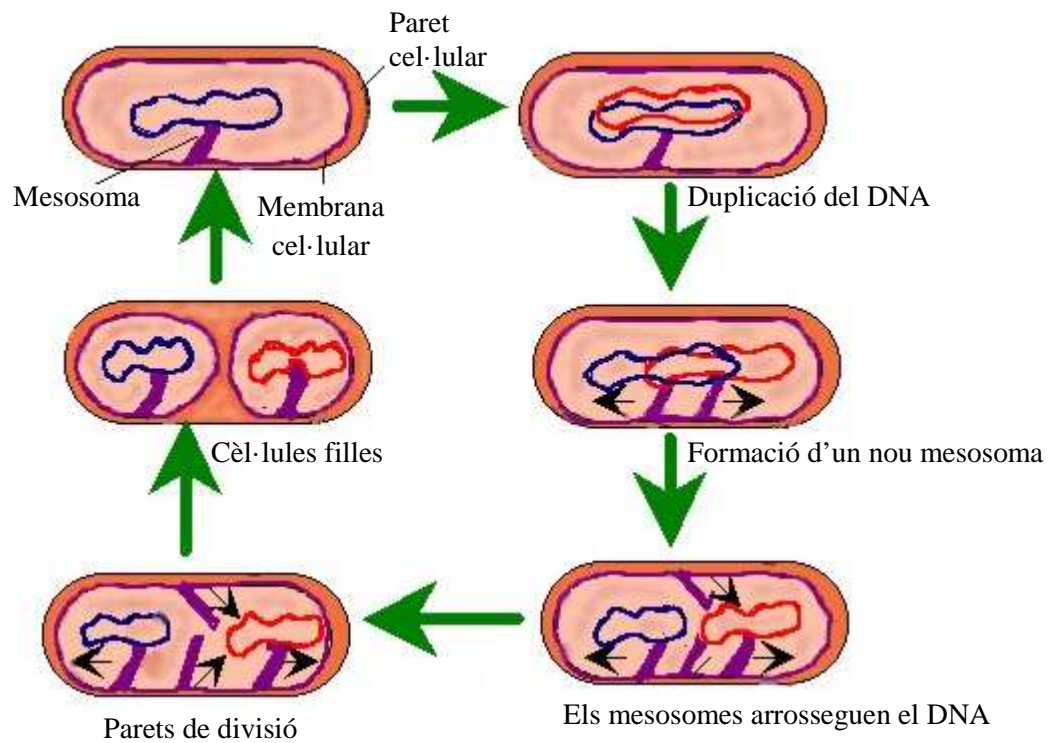


Fig. 27 Esquema del procés de bipartició bacteriana.

- Reproducció parasexual: de vegades, la cèl·lula bacteriana pot intercanviar informació genètica mitjançant processos de recombinació, els quals es coneixen amb el terme de mecanismes parasexuals. En aquests, no es produeix la formació de cap tipus de gàmeta per tant, no es tracta de reproducció sexual. Bàsicament els mecanismes parasexuals bacterians són tres:

- **Transformació**: Consisteix en un intercanvi de material genètic produït quan una bacteri és capaç de captar fragments de DNA que pertanyen a cèl·lules

lisades (trencades). Aquest DNA extern es recombina amb el DNA de la cèl·lula receptora, provocant canvis en la informació genètica d'aquesta.

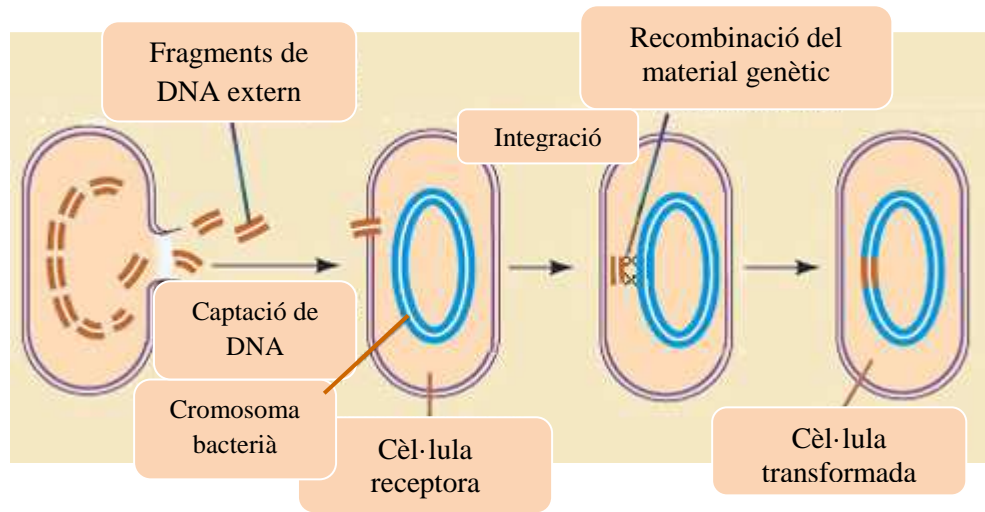


Fig. 28 Esquema del procés de transformació.

- **Transducció:** En aquest cas la transferència de material genètic entre bacteris es realitza a través d'un virus bacteriòfag, que per atzar conté un fragment de DNA bacterià a la càpsida obtingut després d'haver infectat un bacteri. Aquests nous virus, en infectar altres bacteris, transmetran part del genoma del bacteri anteriorment infectat.

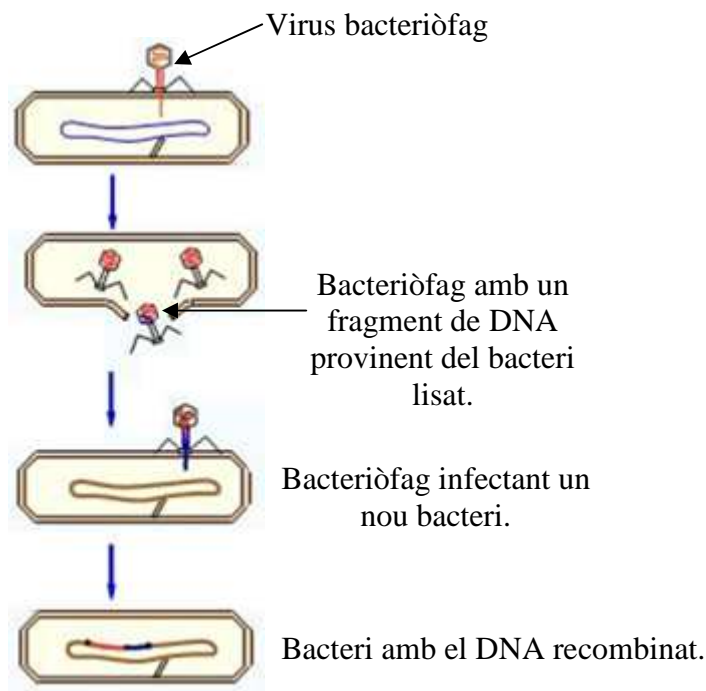
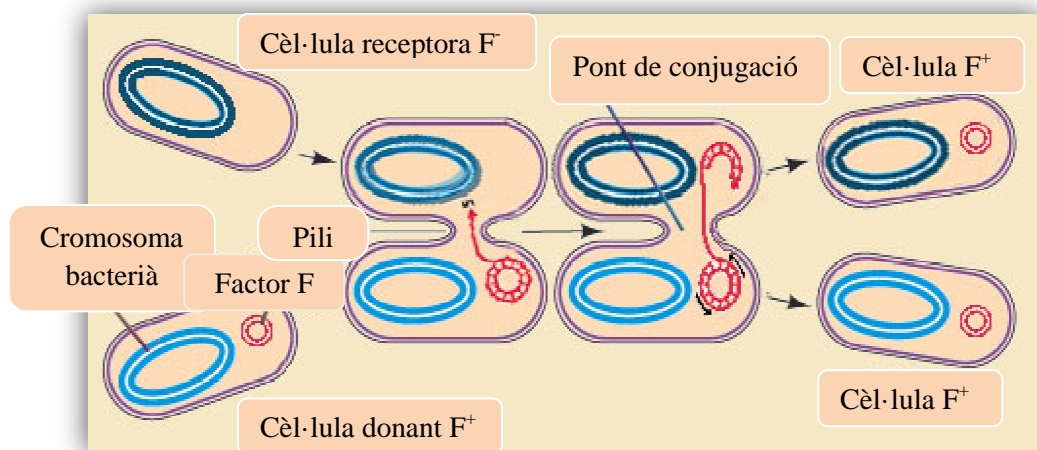


Fig. 29 Esquema del procés de transducció.

- **Conjugació:** Aquest procés té lloc si la cèl·lula presenta el plasmidi F, que conté la informació genètica per formar els pilis. Aquesta cèl·lula, doncs, s'anomena F^+ , i la cèl·lula que no en presenta rep el nom de F^- . El bacteri F^+ (donador d'informació) s'uneix amb el bacteri F^- (receptor) per mitjà d'un dels seus pilis. A través d'aquest, introdueix un petit fragment del plasmidi F, de manera que el bacteri F^- es transforma en bacteri F^+ .

Es pot donar el cas que el plasmidi s'introdueixi a l'anell del DNA bacterià. El bacteri donador d'informació, llavors, es denomina Hfr (High frequency of recombination) i així aquest bacteri pot donar a altres cèl·lules qualsevol gen del seu DNA.



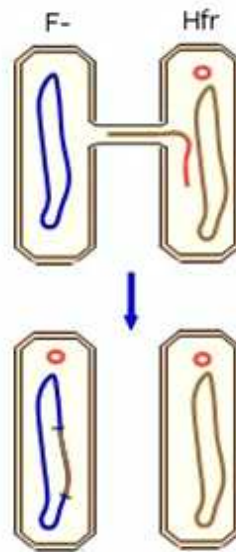


Fig. 30 Esquema dels dos processos de conjugació.

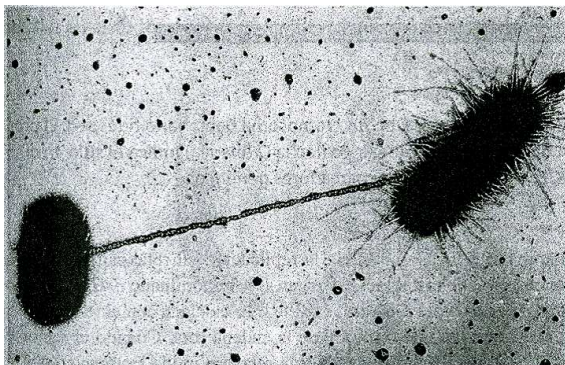


Fig. 31 Microfotografia electrònica de dues cèl·lules *E. coli*. Al centre s'observa el pili sexual connectant ambdós bacteris.

3.3.7 Creixement

El creixement bacterià consisteix en un increment del nombre de cèl·lules que formen una colònia. En el cas dels organismes unicel·lulars, aquesta creixuda té lloc majoritàriament gràcies al procés de fissió binària, que produeix un “doblatge” progressiu de la població bacteriana. En condicions apropiades, un bacteri gram-positiu pot dividir-se cada 20-30 minuts i un de gram-negatiu, cada 15-20 minuts, de manera que al cap de 16 hores la quantitat de cèl·lules pot arribar al voltant d'uns 5.000 milions (aproximadament el nombre d'éssers humans que habiten el planeta Terra).

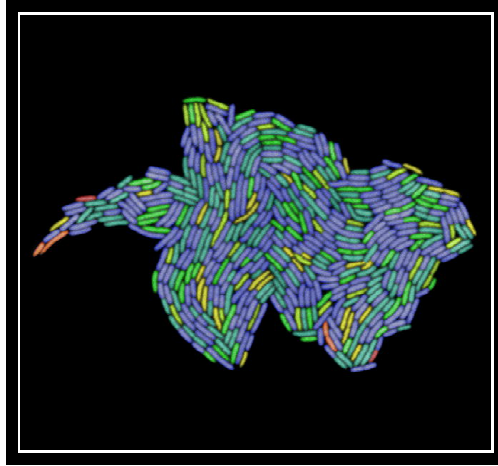
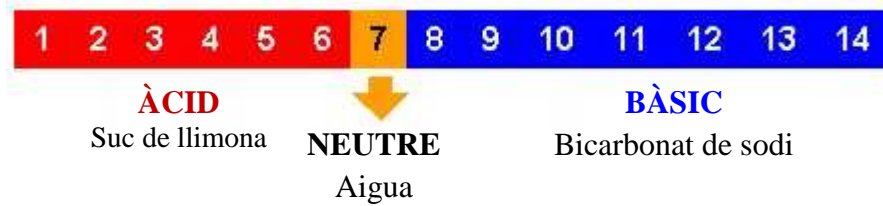


Fig. 32 Colònia de cèl·lules *Escherichia coli* en creixement.

Per a un bon desenvolupament, els bacteris necessiten diversos factors essencials com:

- **Temperatura idònia:** En funció de l'espècie bacteriana, es coneixen diferents rangs de temperatura apropiada pel creixement (reben el nom de zones de perill), però tot i així, es poden determinar amb certesa alguns valors en els quals la capacitat reproductora de les cèl·lules es veu afectada. A 100°C (ebullició), els bacteris comencen a morir i per sota dels 5°C (refrigeració) el seu creixement es va alentint fins arribar als 0°C (congelació), en què queden en un estat latent però no moren. De manera que la temperatura més escaient i favorable pel desenvolupament d'aquests microorganismes gira entorn els 37°C.
- **Nutrients:** Els bacteris, com tots els éssers vius, necessiten de l'alimentació per poder desenvolupar-se. Aquests, prefereixen productes amb un alt contingut de proteïnes i humitat.
- **Acidesa (pH):** El pH d'un aliment representa la mesura del seu grau d'acidesa o basicitat. La majoria d'aliments presenta un pH neutre o bé àcid.



Molts dels bacteris patògens creixen en medis alimentaris de pH neutre o bàsic, per això, quan un producte té un pH de 7 o superior, és molt susceptible a la contaminació bacteriana.

- **Temps:** La major part dels bacteris són capaços de duplicar-se en tan sols 10 o 20 minuts sempre i quan les condicions esmentades anteriorment siguin òptimes.

Per poder estudiar el creixement bacterià o bé conèixer en profunditat una soca concreta, es preparen cultius artificials als laboratoris que simulen les condicions (treballades anteriorment) que podria presentar un medi natural. Per **cultiu**, entenem el procés de propagació dels microorganismes al laboratori. Quan una cèl·lula bacteriana es col·loca en un medi de cultiu nutricionalment apte, augmenta la seva mida i amb el temps es divideix per a formar colònies. Tanmateix, el creixement de les poblacions bacterianes en un sistema de cultiu tancat, està limitat per l'esgotament de nutrients o bé per l'acumulació de productes tòxics procedents del metabolisme.

Quan es fan sèbres al laboratori, els medis de cultiu poden ser líquids (quan és necessari mesurar el creixement o calen grans quantitats de cèl·lules) o sòlids (com les plaques d'agar³³, que serveixen per aïllar cultius d'una soca bacteriana).

³³ Substància de textura gelatinosa que s'extreu d'algunes algues i s'utilitza com a medi de cultiu en diversos camps experimentals com la farmàcia i la bacteriologia.

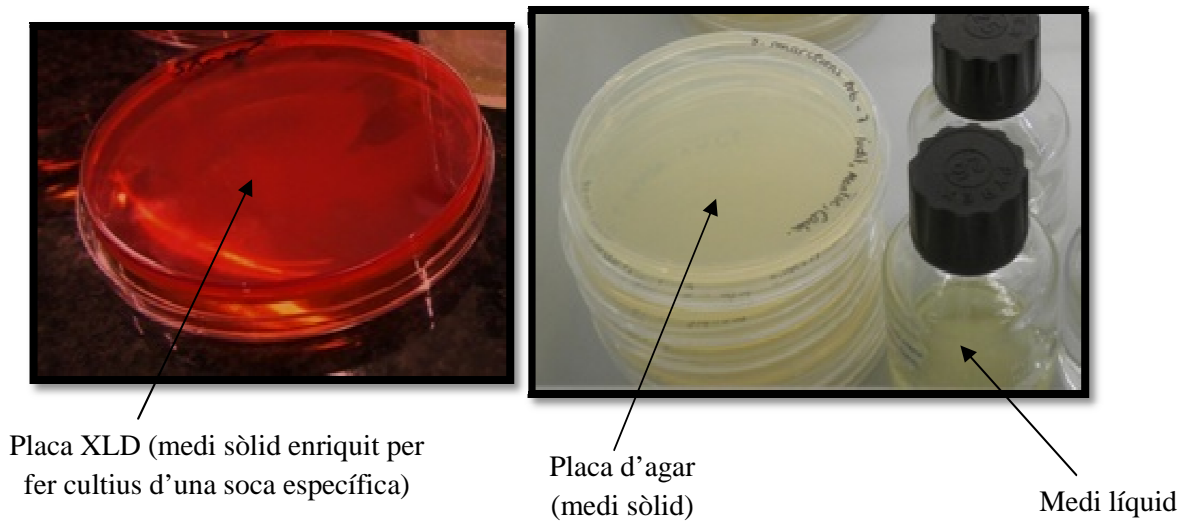


Fig. 34 Medis de cultiu bacterians.

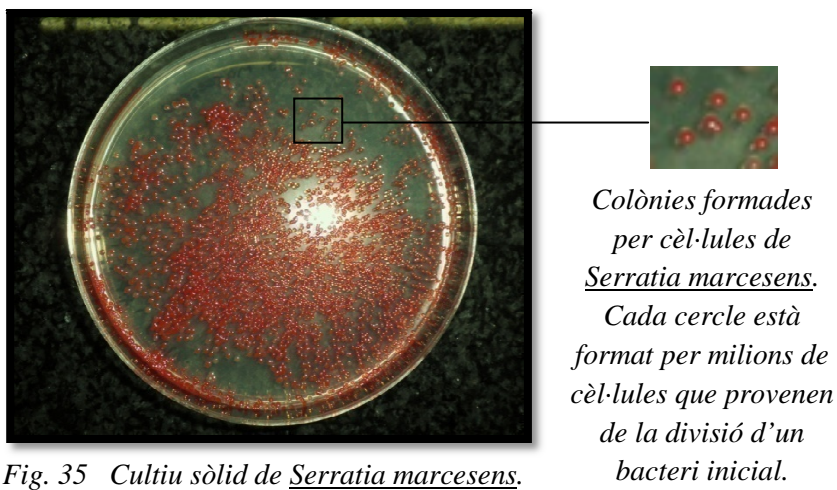


Fig. 35 Cultiu sòlid de *Serratia marcescens*.

Una vegada es fa la sembra en un medi líquid i el cultiu s'incuba durant un període de 24 hores a 37°C de temperatura, es prenen mostres al llarg d'interval·ls regulars i la representació gràfica de les dades (recompte de cèl·lules viables al llarg del temps) formarà la corba de creixement característica que consta de quatre fases.

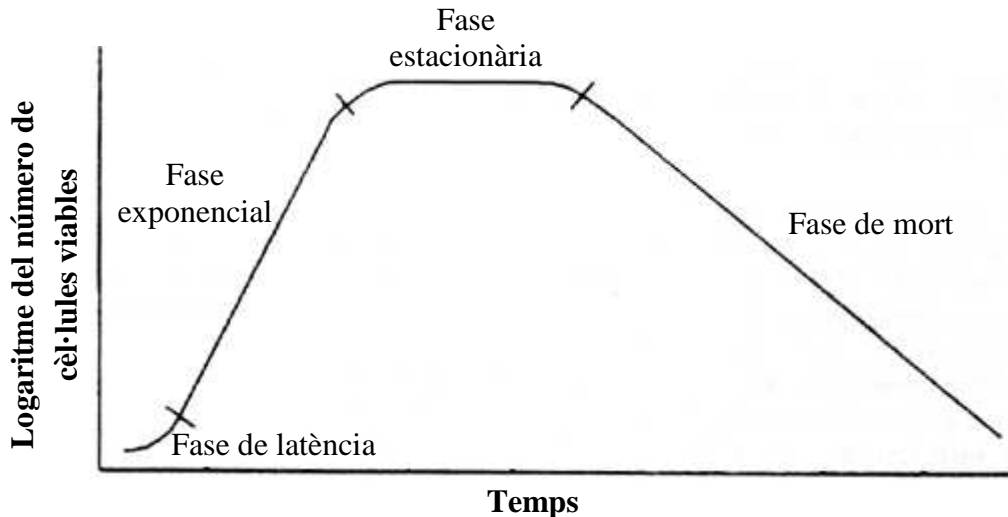


Fig. 36 Corba del creixement microbià.

- **FASE DE LATÈNCIA:** És el període inicial en el qual en introduir els bacteris en un medi de cultiu ric en nutrients, no es produeix un augment immediat del nombre de cèl·lules. Aquest fet es dona a conseqüència de la síntesi dels nous components per part de la cèl·lula que impedeix que la divisió sigui imminent. La duració d'aquesta primera fase pot variar considerablement en funció de l'estat dels microorganismes (si provenen d'un cultiu vell, refrigerat...) i de la naturalesa del medi. Independentment del temps, al llarg de l'etapa les cèl·lules es reorganitzen, repliquen el seu DNA, comencen a incrementar la seva massa fins que finalment es divideixen, donant lloc a la fase exponencial.

- **FASE EXPONENCIAL:** Durant la fase exponencial o logarítmica els bacteris creixen i es divideixen a la velocitat màxima possible que els permet la seva genètica, la naturalesa del medi i les condicions del cultiu. La velocitat de proliferació és constant, és a dir, les cèl·lules es divideixen i el seu nombre es duplica en intervals regulats. Cal destacar que es tracta d'un moment en què la població es manifesta de manera considerablement uniforme quant a propietats químiques i fisiològiques.

- **FASE ESTACIONÀRIA:** És típica de sistemes tancats (no hi entren nous nutrients), en els quals el creixement de la població s'atura i la corba passa a ser horitzontal. Pel que fa als cultius bacterians, aquests assoleixen la fase estacionària quan la població ascendeix a unes 10^9 cèl·lules per mil·lilitre, valor que es manté constant al llarg de tot aquest període. Un factor evident que justifica l'existència d'aquesta fase en els cultius microbians és la limitació de nutrients, de manera que si la concentració d'un nutrient essencial disminueix, l'aprovisionament d'energia i per tant l'augment de la població es veuran afectats.

- **FASE DE MORT:** La disminució del número de cèl·lules viables que segueix a la fase estacionària rep el nom de "fase de mort". Els canvis ambientals perjudicials com la manca de nutrients i l'acumulació de residus tòxics generats durant les fases anteriors donen lloc a la pèrdua de viabilitat en les cèl·lules.

4. Antimicrobians

Els antimicrobians o també anomenats substàncies biocides constitueixen la base fonamental pel tractament de microorganismes a partir d'agents físics i químics. Estan presents constantment a la nostra vida quotidiana ja que s'afegeixen a molts béns de consum com els productes cosmètics i els detergents, amb la finalitat de suprimir els bacteris o inhibir el seu creixement. Són biocides els desinfectants³⁴, els conservants i els antisèptics³⁵, que alhora s'utilitzen de forma freqüent en la cria d'animals, la producció alimentària i l'atenció mèdica. La colonització microbiana pot causar malalties, incapacitat i mort en un ésser viu, de manera que el control microbiològic és de suma importància.

³⁴ Substàncies que impedeixen la infecció mitjançant la destrucció dels agents patògens en superfícies d'objectes inanimats. Acostumen a presentar efectes tòxics sobre teixits vius, de manera que només s'utilitzen en materials inerts.

³⁵ Substàncies químiques que destrueixen els microorganismes o impedeixen el seu creixement en ser aplicades sobre teixits vius.

4.1 Definició

Els antimicrobians es defineixen com a substàncies químiques que eviten el creixement o destrueixen els microorganismes invasors de qualsevol cos o agent, sigui animat o inanimat, produint una toxicitat selectiva (no malmet l'hoste) sobre aquest. Poden ser naturals, sintètics o semisintètics.

4.2 Actuació

Hi ha un àmplia varietat de famílies i grups d'antimicrobians. Els mecanismes a partir dels quals els compostos amb activitat antibacteriana inhibeixen el creixement o causen la mort dels bacteris són molt diversos i depenen de la **diana** que s'ha d'atacar. Exceptuant la paret cel·lular, les dianes restants de qualsevol substància biocida es troben també a les cèl·lules eucariotes, per tant l'ús d'aquest tipus de productes pot comportar de vegades efectes negatius per als teixits vius sobre els quals el microorganisme actua.

Per tal que els antimicrobians puguin actuar favorablement amb l'objectiu d'eliminar les cèl·lules invasores, han de travessar la coberta bacteriana (la càpsula, en cas de tenir-ne) fins arribar a la diana en qüestió. Aquesta pot ser:

- Paret cel·lular: que es veu afectada per l'acció dels antimicrobians en:

- la síntesi dels components que la formen.
- el transport d'aquests components.
- la seva organització estructural.

- Producció d'àcid fòlic (vitamina necessària per a la replicació del DNA).

- Síntesi proteica: pot bloquejar-se a causa de molts compostos que afecten alguna de les fases d'aquest procés.

- Metabolisme dels àcids nucleics: es veu perjudicada en:

- la proteïna RNA polimerasa encarregada de sintetitzar una molècula de RNA missatger durant el procés de transcripció.

- el procés de condensació o descondensació del DNA.
- directament en la molècula de DNA.

Alguns compostos biocides no poden dur a terme la funció de destruir els microorganismes, però pel contrari, tenen la capacitat de bloquejar els mecanismes de resistència que aquests generen així que, si es combinen amb altres productes antimicrobians, s'aconsegueix potenciar el seu efecte.

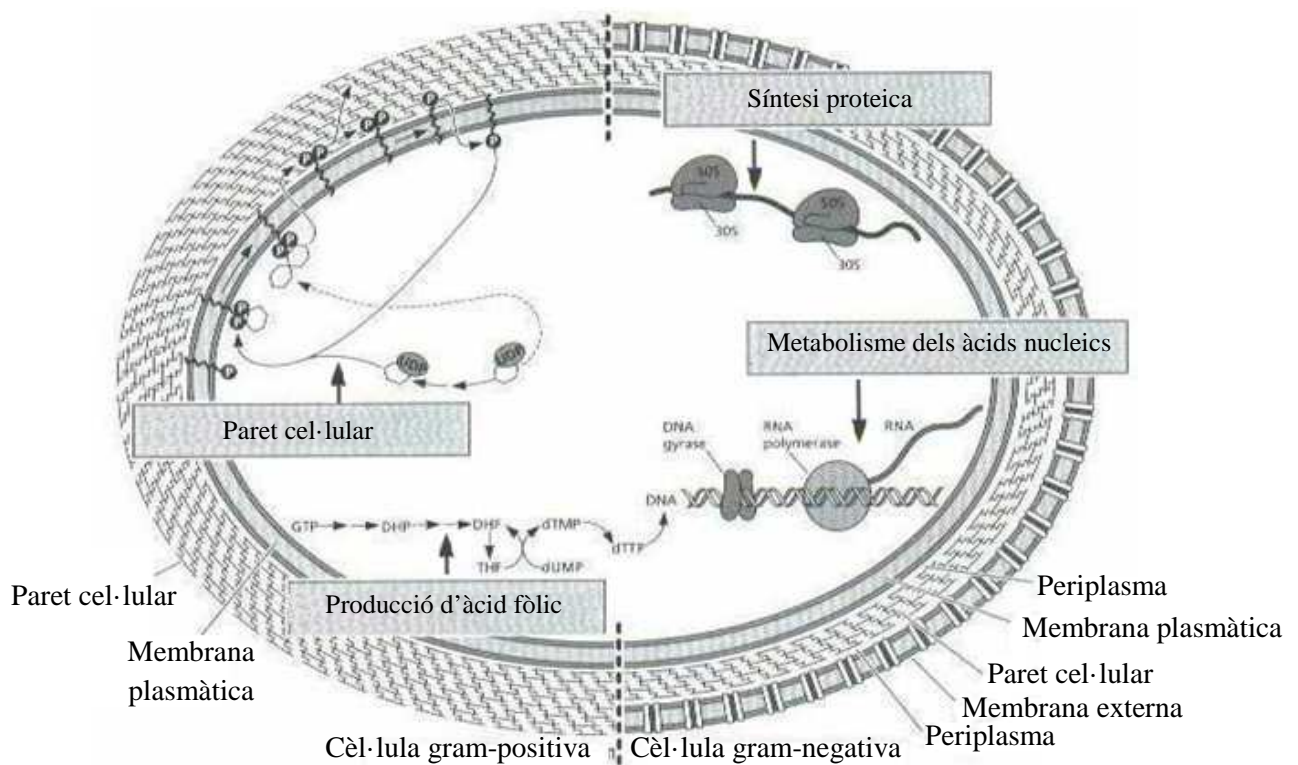


Fig. 37 Il·lustració dels mecanismes d'acció dels antimicrobians en un bacteri.

Pel que fa al seu efecte antibacterià, les substàncies biocides s'han classificat com a:

- **Bactericides** (són letals pel bacteri): actuen inhibint la síntesi de la paret cel·lular alterant la membrana plasmàtica i interferint en aspectes relacionats amb el metabolisme del DNA.
- **Bacteriostàtics** (únicament inhibeixen el creixement bacterià): eviten la síntesi de proteïnes.

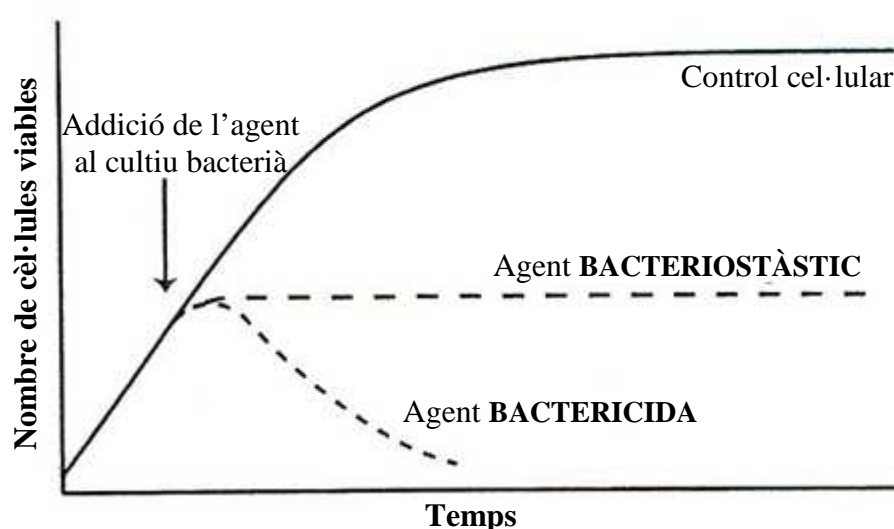


Fig. 38 Efectes de l'acció d'un agent antimicrobià bacteriostàtic en comparació amb un de bactericida.

Encara que cada grup tingui un mode d'actuació diferent, un mateix producte antibacterià pot comportar-se seguint ambdós models depenent del tipus de microorganisme o de la concentració que presenti en arribar a la diana.

4.3 Usos i aplicacions

- A les **instal·lacions sanitàries**, els biocides són indispensables per prevenir i controlar infeccions:
 - Els desinfectants s'utilitzen per a descontaminar superfícies, instruments i la pell del pacients i del personal sanitari. De fet, a

mesura que el risc d'infecció s'incrementa el mètode de desinfecció utilitzat és més ferm.

- Els antisèptics es destinen al tractament d'infeccions en ferides superficials.
- Els **béns de consum** contenen substàncies biocides en quantitats regulades per evitar que creixin microorganismes que els deteriorin. Es troben habitualment als cosmètics, als productes de neteja, als detergents i als desinfectants.
- A la **indústria alimentària**, els antimicrobians són utilitzats de manera freqüent per desinfectar instal·lacions i qualsevol material que estigui en contacte amb els aliments, així com per descontaminar productes carnis. A més a més, s'afegeixen com a conservants per als productes alimentaris i com a desinfectants per a l'aigua potable.
- A la **ramaderia**, els animals, els recintes i el material utilitzat es tracta amb substàncies biocides per ser descontaminat, així s'evita el possible desenvolupament de microorganismes potencialment perjudicials per a la formació de malalties.
- Les **plantes dedicades al tractament de les aigües** utilitzen productes de caràcter antibacterià amb l'objectiu de prevenir que l'aigua alliberi organismes nocius pel medi ambient o que es propaguin determinats microorganismes infecciosos per a l'espècie humana, com la *Legionella pneumophila* causant de la legionel·losi³⁶.

³⁶ Malaltia caracteritzada per febre alta, dolors abdominals i pneumònia.

GRUPS	FINALITAT DEL PRODUCTE
Desinfectants	Higiene humana
	Àrea de salut pública i privada
	Higiene veterinària
	Àrea alimentària
	Aigua potable
Conservants	Productes envasats i pinsos
	Protectors de fibres, cuir, cautxú, fustes i materials polimeritzats
	Maçoneria ³⁷
	Líquids utilitzats en sistemes de refrigeració
	Productes que eviten l'aparició de floridures
Control de plagues	Protectors de líquids per treballar el metall
	Rodenticides (destinat a ratolins, rates i altres rosegadors)
	Mol·lusquicida (destinat a mol·luscs)
	Piscícoles (destinat a peixos)
	Insecticides, acaricides i productes per controlar altres artròpodes
Quimioteràpic	Repel·lents i atraients ³⁸
	Antibiòtics
Altres substàncies biocides	Líquids per l'embalsamament i la taxidèrmia ³⁹
	Control d'altres vertebrats

Fig. 39 Taula de classificació dels diferents grups d'antimicrobians segons el seu àmbit d'aplicació.

4.4 Propietats dels agents antimicrobians

Tal com s'ha descrit a l'apartat anterior, existeixen molts compostos químics la funció dels quals és esterilitzar superfícies colonitzades per microbis o bé eliminar agents infecciosos perjudicials per als organismes vius. Encara que suposen un avenç significatiu en la disciplina de la microbiologia, alhora tenen els seus propis avantatges i desavantatges. Si més no, qualsevol substància de caràcter biocida ha de caracteritzar-se per:

³⁷ Obra feta amb pedres o maons.

³⁸ Agent que per l'olor, el color, etc., exerceix una atracció sobre determinats insectes.

³⁹ Acció de preparar els animals morts de manera que presentin al més exactament possible l'aparença dels animals vius.

- Ser actiu contra una àmplia varietat d'agents infecciosos (bacteris gram-positius i gram-negatius, endòspores bacterianes, fongs i virus) a concentracions baixes i en presència de matèria orgànica.
- Ser tòxic pels agents infecciosos però no per a les persones ni tampoc pot corroir materials comuns.
- Ser inodor o amb un aroma agradable.
- Ser soluble amb aigua i lípids perquè així pugui introduir-se a les cèl·lules.
- Tenir una baixa tensió superficial de manera que pugui entrar per les esquerdes de les superfícies.

El major inconvenient dels agents químics amb aquestes característiques és que l'ús excessiu dona lloc a l'aparició de bacteris resistents al producte, que esdevé innocu i per tant queda absolt de la seva funció.

4.5 Quimioteràpia antimicrobiana

La medicina moderna depèn d'agents quimioteràpics, productes químics utilitzats per tractar malalties generades per microorganismes patògens. Una gran part d'aquests agents són antibiòtics (del grec *anti*, contra i *bios*, vida) que, una vegada han atacat el microorganisme infecciós, redueixen la seva concentració fins assolir nivells suficientment baixos per no resultar perjudicials per a l'hoste. Es poden considerar antibacterians o antifúngics segons el microorganismes que ataquin, però aquest apartat es centrarà únicament en aquells fàrmacs perjudicials per als bacteris.

4.5.1 Obtenció de fàrmacs

Els antibiòtics, agents “contra la vida”, es poden fabricar de manera natural o també s'obtenen artificialment a partir de processos químics humans. Molts dels antibiòtics utilitzats clínicament per tractar malalties infeccioses durant la dècada dels 60, eren

productes **naturals** elaborats per microorganismes (tant bacteris com fongs) crescuts en hàbitats específics.



Fig. 40 Secreció d'antibiòtic en un cultiu bacterià d'Actinomyces.

Les cèl·lules més properes al fong es lisen.

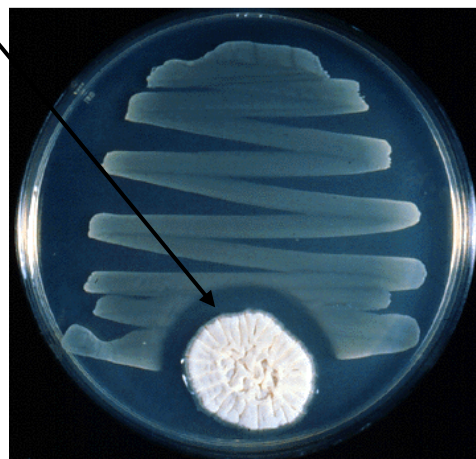


Fig. 41 La colònia del fong Penicillium segrega penicil·lina que destrueix el bacteri Staphylococcus aureus sembrat.

MICROORGANISME	ANTIBIÒTIC
Bacteris	
<u>Streptomyces</u> spp. ⁴⁰	Cloramfenicol (també pot ser sintètic)
	Estreptomina
	Tetraciclina
	Kanamicina
<u>Bacillus</u> spp.	Bacitracina
	Polimixina
Fongs	
<u>Penicillium</u> spp.	Griseofulvina
	Penicil·lina
<u>Cephalosporium</u> spp.	Cefalosporina

Fig. 42 Origen microbià d'alguns antibiòtics.

⁴⁰ L'abreviació "spp" fa referència a totes les espècies que pertanyen a un mateix gènere.

Encara que la majoria d'antibiòtics aplicats terapèuticament són naturals, existeixen també tres classes d'antibiòtics d'ús clínic obtinguts **sintèticament**: les sulfonamides, les quinolones i les oxazolidinones.

El descobriment d'aquests dos tipus d'antibiòtic ha donat lloc a la introducció de derivats **semisintètics** (com l'ampicil·lina, la meticil·lina i l'amoxicil·lina) provinents de macròlids⁴¹ i antibiòtics β -lactàmics⁴² els quals han patit una modificació estructural mitjançant l'addició d'elements químics. A partir dels fàrmacs semisintètics s'han dissenyat noves propietats com la biodisponibilitat oral, la creació d'un espectre més ampli i una major validesa contra bacteris resistents per ser aplicades a nous antibiòtics.

4.5.2 Característiques generals dels fàrmacs antibacterians

Per tal que qualsevol agent quimioteràpic realitzi la seva funció exitosament, ha de presentar un seguit de propietats fonamentals com:

- **Toxicitat selectiva**: consisteix en destruir o inhibir el patògen microbià causant el menor perjudici possible a l'hoste. El grau de toxicitat selectiva pot expressar-se segons:

- la dosi terapèutica, és a dir, el nivell de fàrmac necessari pel tractament clínic d'una infecció concreta,
- la dosi tòxica, que indica els nivells de fàrmac en què l'agent esdevé massa tòxic per l'hoste.

- **Índex terapèutic (IT)**: és el quocient entre la dosi tòxica i la dosi terapèutica. Com més gran és el valor de l'índex terapèutic, els efectes de l'agent quimioteràpic són alhora més òptims.

⁴¹ Nom genèric d'un grup d'antibiòtics aïllats de diferents soques del gènere *Streptomyces*, com l'eritromicina i l'espíramicina.

⁴² Es tracta d'una extensa varietat d'antibiòtics, incloent derivats de la penicil·lina, que es caracteritzen per inhibir l'enzim betalactamasa de les parets gram-negatives bacterianes.

$$IT = \frac{\text{dosi tòxica}}{\text{dosi terapèutica}} = \begin{cases} > 1 \rightarrow \text{Apte pel consum}^* \\ \leq 1 \rightarrow \text{Perillós pel consum}^\circ \end{cases}$$

* Un fàrmac que altera una funció microbiana que no es troba a les cèl·lules eucariotes acostuma a tenir una toxicitat selectiva elevada i un índex terapèutic més alt. Un exemple és la penicil·lina, que inhibeix la síntesi de peptidoglicà de la paret cel·lular bacteriana i, per tant, té un efecte nul sobre les cèl·lules de l'hoste ja que aquestes no estan cobertes per paret cel·lular.

° Un fàrmac amb l'índex terapèutic baix danya les cèl·lules de l'hoste mitjançant el mateix procés a partir del qual perjudica a les cèl·lules procariotes. Aquest fet es coneix com a **efecte secundari**, que pot esdevenir de molts tipus i alterar a qualsevol sistema orgànic. Per tant, com que els efectes secundaris poden ser greus els agents quimioteràpics s'han d'administrar amb molt de compte.

- **Espectre d'eficiència:** es tracta d'una propietat que es presenta de maneres oposades ja que els antibiòtics poden ser:

- d'espectre reduït, que indica que només són eficaços contra una gamma limitada de patògens,
- d'ampli espectre, els quals poden atacar una extensa diversitat de patògens.

- **Concentració mínima inhibidora (CMI):** és la concentració més baixa d'un fàrmac que inhibeix el creixement d'un patògen concret.

- **Concentració mínima letal (CML):** és la concentració més baixa d'un fàrmac que destrueix un patògen.

Les darreres característiques (CMI i CML) que han de formar part d'un antibiòtic proporcionen una idea relativa de l'eficàcia que té un agent quimioteràpic contra un

microorganisme patogen, així que es pot determinar que un fàrmac bactericida destrueix els bacteris a concentracions de 2 a 4 vegades superiors a la CMI (concentració mínima inhibidora) estàndard, mentre que un agent bacteriostàtic, quan els destrueix, ho fa a concentracions molt més elevades⁴³.

4.5.3 Factors que influeixen en l'eficàcia dels fàrmacs

Els fàrmacs poden administrar-se de maneres diferents i no sempre es propaguen ràpidament pel cos o destrueixen els patògens invasors a l'acte. Tots i cadascun dels agents quimioteràpics es veuen afectats per una extensa varietat de factors que influeixen en la seva eficàcia.

° En primer lloc, el fàrmac ha de ser capaç d'arribar al lloc de la infecció. Per tant, és essencial tenir en compte tots aquells elements que controlen l'activitat, l'estabilitat i el metabolisme dels antibiòtics. A tall d'exemple, s'esmenten les vies d'administració les quals juguen un paper fonamental.

- **Via oral:** és apropiada per aquells antibiòtics que s'absorbeixin fàcilment al tracte intestinal o bé siguin estables en contacte amb l'àcid de l'estómac.
- **Via intravenosa:** es recorre a aquesta forma quan els antibiòtics no presenten les propietats anteriors.
- **Via tòpica:** pel seu elevat índex de toxicitat, hi ha alguns antibiòtics que només poden aplicar-se de forma tòpica sobre lesions cutànies.

Tot i així, s'han donat casos que tot i havent administrat correctament l'agent, aquest ha estat exclòs de la zona infecciosa mitjançant un coàgul sanguini que

⁴³ A l'annex de la pàgina 109 s'adjunta un quadre-resum de les propietats d'alguns fàrmacs bacterians comuns amb els seus corresponents mecanismes d'actuació.

protegeix els bacteris del fàrmac o perquè ha estat absorbit per substàncies que l'envolten.

° En segon lloc, el patogen ha de ser susceptible al fàrmac. Els bacteris que es troben a les biopel·lícules poden reproduir-se lentament i per tant adquirir resistències a la quimioteràpia ja que molts agents afecten als patògens tan sols si aquests s'estan dividint de forma activa, per tant, aquests patògens poden simplement no ser sensibles a un agent determinat. Per exemple, les penicil·lines i les cefalosporines, que inhibeixen la formació de la paret cel·lular, no són actives contra els micoplasmes perquè manquen d'aquesta estructura.

° En tercer lloc, l'agent quimioteràpic ha d'excedir el valor de la CMI del patogen per ser eficaç. La concentració assolida dependrà de la quantitat d'antibiòtic incorporada, la via d'administració, la velocitat d'assimilació i la rapidesa amb què el fàrmac és eliminat de l'organisme. El fàrmac romandrà a una concentració més elevada durant més temps si és absorbit i secretat lentament.

° Finalment, l'expansió de **gens de resistència** als antibiòtics ha desembocat a una disminució de l'eficàcia i un augment de la complexitat de la quimioteràpia.

5. Resistències a substàncies antimicrobianes

Al llarg de les dècades, els compostos antimicrobians han estat aplicats en un ventall cada vegada més ampli de situacions de desinfecció microbiana però, pel contrari, el desenvolupament de resistències ha anat augmentant progressivament a un ritme molt superior. Estudis clínics demostren que quan un antibiòtic d'ampli espectre derivat d'un ja preexistent o una nova classe de fàrmac es destina al tractament generalitzat de pacients, apareixen soques bacterianes resistents que són immunes al nou compost. Aquestes es concentren en zones on la quantitat de substàncies

biocides és abundant, el que deriva en una supervivència selectiva pels bacteris resistents ja que han d'aconseguir mantenir la població. De fet, en un conjunt de bacteris exposats a agents químics existeix la possibilitat que tots els microorganismes acabin morint o bé que desenvolupin mutacions anòmales que els permetin sobreviure. Per cada període de replicació (20 o 30 minuts), es forma una població de 100 milions de bacteris dels quals 10 són mutants. Si la mutació ha afectat a un dels gens sensibles a l'acció antibacteriana, el bacteri corresponent desenvolupa una resistència i esdevé menys susceptible, el que suposa que tindrà un avantatge alhora de sobreviure de manera que quan les altres cèl·lules moren, aquest persistirà i disposarà de més espai per créixer i fer augmentar el cultiu de la nova soca.

Gen	Proteïna que es tradueix	Antibiòtic al qual és resistent
bleO	Proteïna resistent a la bleomicina	Bleomicina
blaZ	β -Lactamasa	β -Lactàmic
ermA	RNAr ⁴⁴ metilasa	Eritromicina
aacA-aphD	Acetil-fosfotransferasa	Aminoglicòsid
qacA	QacA	Antisèptics

Fig. 43 Gens de resistència antibiòtica localitzats a una soca de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistent a la meticil·lina).

5.1 Mecanismes de resistència

Els bacteris sovint esdevenen resistents degut a l'acció de diversos mecanismes. Desafortunadament, un mecanisme de resistència concret no està associat a un únic tipus de substància biocida, el que indica que dos bacteris diferents poden utilitzar mecanismes desiguals per resistir al mateix agent antibacterià. Aquests mecanismes conformen el que s'anomena "resistència adquirida", que es produeix per la modificació de la càrrega genètica del bacteri i pot aparèixer per mutacions

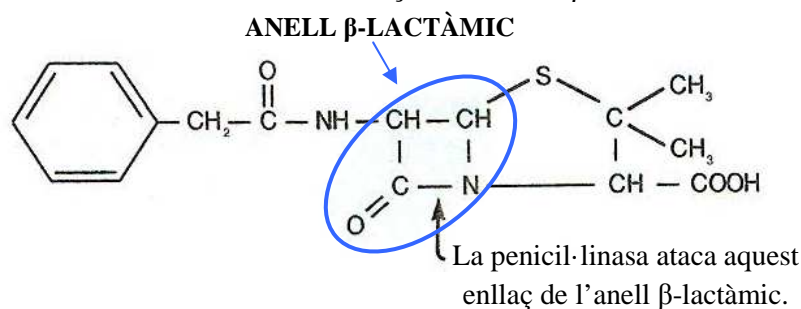
⁴⁴ RNA ribosòmic (RNAr): tipus de RNA que forma part dels ribosomes.

cromosòmiques (tal com s'ha detallat en la introducció de l'apartat 5) o per mecanismes de transferència genètica.

Fins al moment es coneixen quatre mecanismes que permeten l'adquisició de resistències:

- **Alteració del punt diana de manera que no sigui susceptible a l'agent però que al mateix temps conservi la seva funció cel·lular.** Hi ha diversos casos que exemplifiquen aquest enunciat i tots ells tenen origen en l'aparició de mutacions a la cadena de DNA. Cal destacar com a primer exemple que l'afinitat dels ribosomes per l'eritromicina i el cloramfenicol pot veure's afectada per un canvi en l'RNAr al qual s'uneix. De la mateixa manera, els enterococs es tornen resistents a la vancomicina modificant els extrems del peptidoglicà evitant així la unió de l'antibiòtic a la paret cel·lular.
- **Evitar l'entrada de l'agent.** Les mutacions que tenen lloc al material genètic bacterià provoquen canvis estructurals en les proteïnes de membrana, el que dificulta l'accés de determinades substàncies. Un altre mètode utilitzat per impedir la introducció d'aquests compostos i que es classifica com un tipus de "resistència intrínseca", és propi del gènere *Mycobacterium*. Molts micobacteris resisteixen a un gran nombre d'antibacterians a causa de l'alt contingut en àcids micòlics presents en una capa lipídica (situada a l'exterior de la membrana cel·lular) impermeable a la majoria d'agents solubles en aigua.
- **Inactivació de l'agent modificant-lo químicament.** El bacteri genera enzims que desactiven el producte antimicrobià. L'exemple més conegut es dona en el grup dels antibiòtics β -lactàmics (en el què s'inclouen les penicil·lines i les cefalosporines). La característica més important de les

molècules que formen aquests compostos és l'anell β -lactàmic, essencial per a la seva activitat biològica. Els bacteris resistents produeixen penicil·linasa (o també anomenada β -lactamasa), un enzim que inactiva aquests antibiòtics per mitjà de la hidròlisi⁴⁵ d'un dels enllaços de l'anell β -lactàmic.



Estructura de la Penicil·lina G.

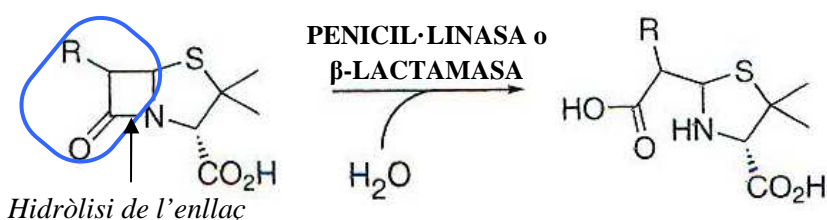


Fig. 44 Desactivació de l'antibiòtic per mitjà de la hidròlisi de l'anell β -lactàmic.

- **Bombejar l'agent cap a l'exterior de la cèl·lula una vegada aquest ha entrat.** Alguns patògens contenen enzims (concretament del tipus translocasa⁴⁶) a la membrana plasmàtica que sovint es coneixen amb el nom de “bombes de reflux” i poden expulsar els productes antimicrobians en condicions contra gradient⁴⁷. Gràcies al fet que són relativament inespecífiques i bombegen moltes substàncies diferents, aquestes proteïnes de transport es consideren multiresistents. El següent mecanisme de resistència bacteriana fa disminuir l'acumulació d'agents químics a l'interior de la cèl·lula i per tant d'aquesta manera es redueixen considerablement els nivells de

⁴⁵ Descomposició d'una substància química per l'acció de l'aigua.

⁴⁶ Enzim que té per objecte l'expulsió de l'ATP.

⁴⁷ El transport de les substàncies es dona des del medi on la concentració és baixa (hipotònic) al medi on la concentració és alta (hipertònic).

toxicitat. A continuació s'exposa esquemàticament l'origen d'aquest mecanisme de resistència adquirida.

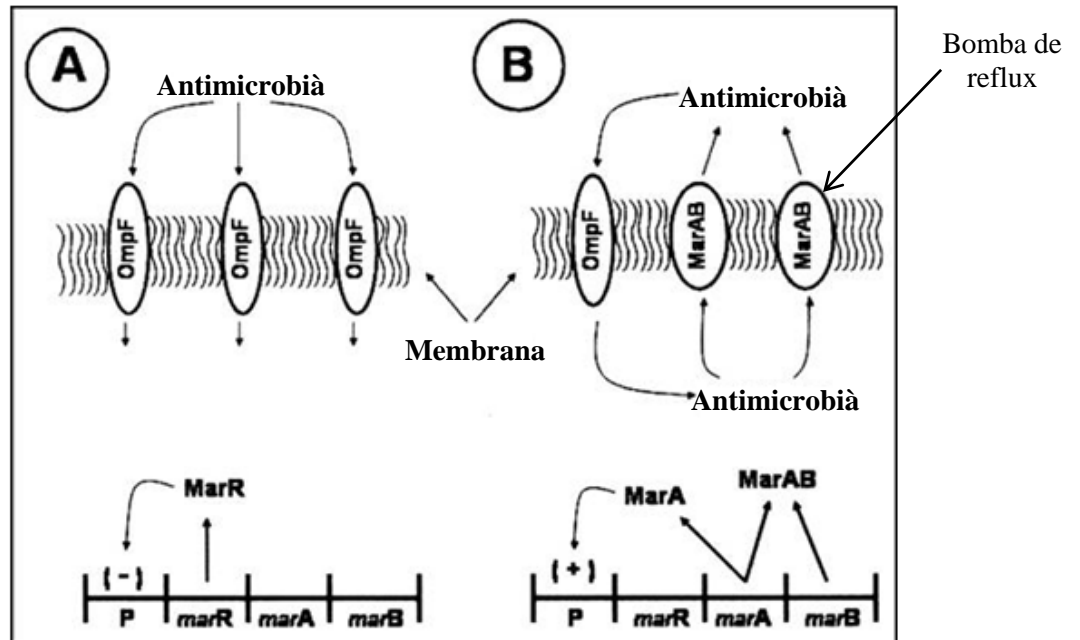


Fig. 45 Formació d'una bomba de reflux a conseqüència d'una mutació.

- (A) Bacteri sensible als antimicrobians.** Aquests entren a la cèl·lula a través de les proteïnes *OmpF*. L'expressió del gen *marR* produeix la proteïna *MarR*, que s'uneix al gen *P* inhibint l'expressió de les seqüències *marA* i *marB*.
- (B) Bacteri resistent als antimicrobians.** Una mutació al gen *marR* redueix l'activitat de la proteïna *MarR* i possibilita el funcionament del gen *P*, de manera que *marA* i *marB* es poden expressar formant proteïnes que constituïran les bombes de reflux.

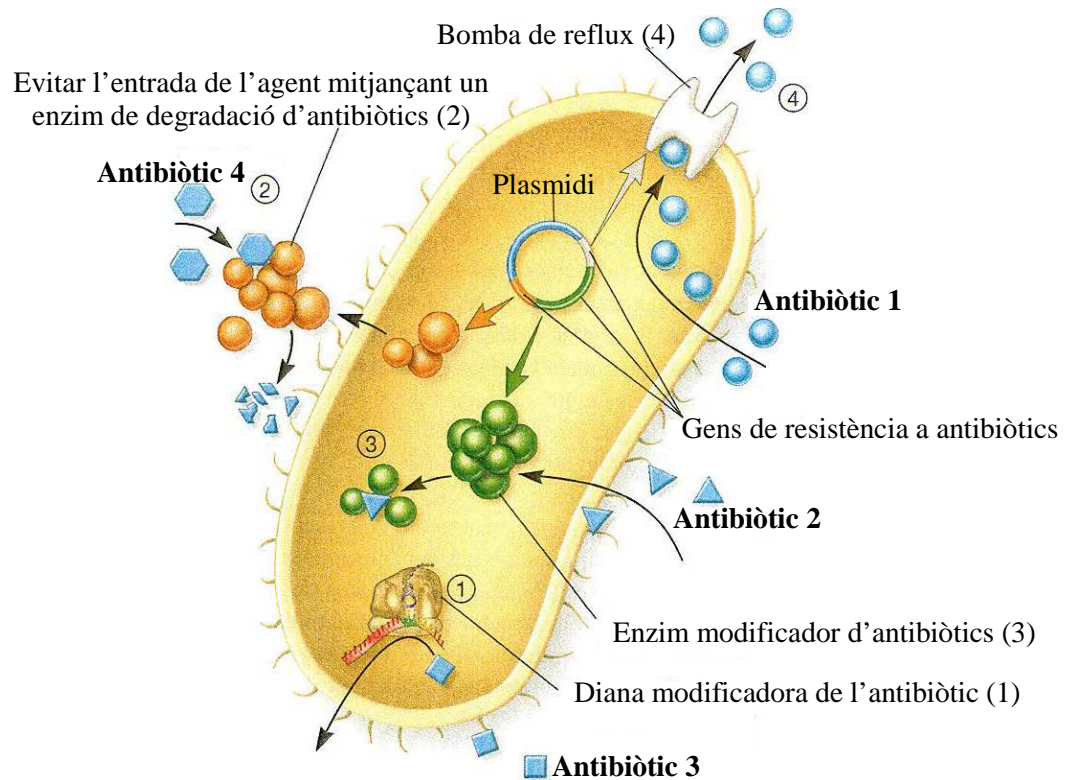


Fig. 46 Mecanismes de resistència als antibiòtics.

5.2 Origen i transmissió de les resistències

Els mecanismes d'acció dels diferents agents antibacterians (secció 4.2) segueixen mètodes diferents per aconseguir un objectiu comú, però malgrat això, els bacteris han aconseguit desenvolupar resistències a tots ells a través de diversos mitjans. Tot això suscita inquietuds en relació amb l'ús desmesurat, i sovint inadequat, de les substàncies biocides en situacions en què no són necessàries ja que poden contribuir a la difusió i la persistència de les resistències. Diversos estudis teòrics han responsabilitzat els components antimicrobians de l'existència d'aquestes resistències les quals suposen greus problemes majoritàriament per a l'àmbit mèdic, però des del punt de vista pràctic, encara és complicat establir de forma concloent i concisa si l'ús de biocides condueix a l'aparició i proliferació de bacteris resistents.

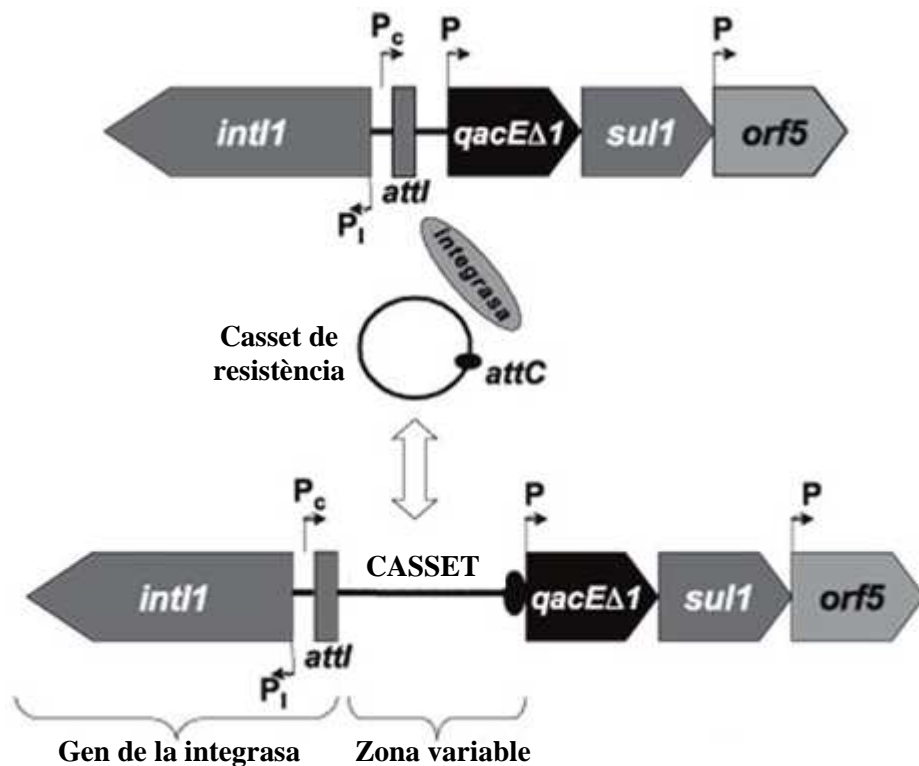
5.2.1 Gens de resistència

Els gens de resistència bacteriana poden estar presents al cromosoma cel·lular, als plasmidis, als transposons i als integrons. A causa del fet que totes aquestes parts constitueixen elements genètics mòbils, els gens es poden intercanviar lliurement entre els bacteris.

- **Cromosoma:** conté gens formats per mutacions espontànies, encara que aquestes no són molt freqüents. En general, donen lloc a canvis en la diana del compost antibacterià.
- **Plasmidi:** es tracta d'una estructura molecular que posseeix un o més gens de resistència i s'acostuma a denominar plasmidi R (plasmidi de resistència). Aquests gens de resistència codifiquen enzims que destrueixen o modifiquen determinades substàncies. En relació amb la quimioteràpia, s'han equiparat a la resistència plasmídica molts fàrmacs d'ús habitual com el cloramfenicol, la penicil·lina, l'eritromicina o la tetraciclina. Com que un sol plasmidi té la capacitat de transportar i transferir gens de resistència per a diferents antimicrobians, una població de patògens pot tornar-se resistent a diversos agents químics de manera simultània.
- **Transposó:** és una seqüència de DNA en la qual és possible localitzar diversos gens de resistència que poden integrar-se fàcilment als plasmidis i estendre's per la població bacteriana gràcies a la seva capacitat de translocació⁴⁸. Alguns exemples de transposons i els seus marcadors de resistència antibiòtica són el Tn5 (kanamicina, bleomicina, estreptomicina), el Tn9 (cloramfenicol) i el Tn10 (tetraciclina).

⁴⁸ Alteració genètica que consisteix en un canvi de posició d'un segment cromosòmic dins del genoma.

- **Integró:** està format pel gen integrasa i una seqüència de recombinació específica que permet la incorporació de cassets de resistència. Aquests últims contenen un o dos gens de resistència i un extrem de recombinació i poden trobar-se com a fragments de DNA circular no replicatiu quan es desplacen lliurement per la cèl·lula o, en la majoria de casos, constitueixen una part lineal d'un transposó, un plasmidi o el cromosoma bacterià.



int1: gen que codifica la integrasa; *attI*: seqüència de recombinació de l'integró; P_i : promotor que transcriu la integrasa; P_c : promotor que transcriu els cassets integrats; *attC*: extrem de recombinació del casset; P : promotor que transcriu els altres gens; *qac*: gen de resistència a l'amiòlic; *sul*: gen de resistència a les sulfonamides.

Fig. 47 Representació esquemàtica de l'estructura bàsica d'un integró i de l'adquisició d'un casset de resistència.

5.2.2 Adquisició de resistències per mitjà d'intercanvi genètic

L'aparició de resistències bacterianes és conseqüència dels canvis estructurals que tenen lloc a la seqüència de DNA. Aquests canvis es donen a causa de dos mecanismes genètics principals: les mutacions i la transmissió d'aquestes mutacions

entre la població bacteriana. De fet, el segon mecanisme esmentat és més freqüent que el mutagènic ja que es pot difondre ràpidament entre diferents espècies bacterianes, pot conferir resistència a diversos agents antimicrobians alhora i a diferència de l'anterior, no genera un desavantatge adaptatiu, és a dir, no fa disminuir la taxa de creixement del microorganisme.

L'adquisició per part del bacteri de gens de resistència té lloc mitjançant transferència vertical, en transmetre el genoma a la descendència, o bé a partir d'intercanvi genètic horitzontal que consisteix en fer ús dels següents mecanismes parasexuals (consultar apartat 3.3.6 *Reproducció*):

- **Conjugació** (recepció de plasmidis R).
- **Transducció** (transmissió de gens de resistència per la infecció de bacteriòfags).
- **Transformació** (obtenció de fragments de DNA exògens provinents de cèl·lules mortes).

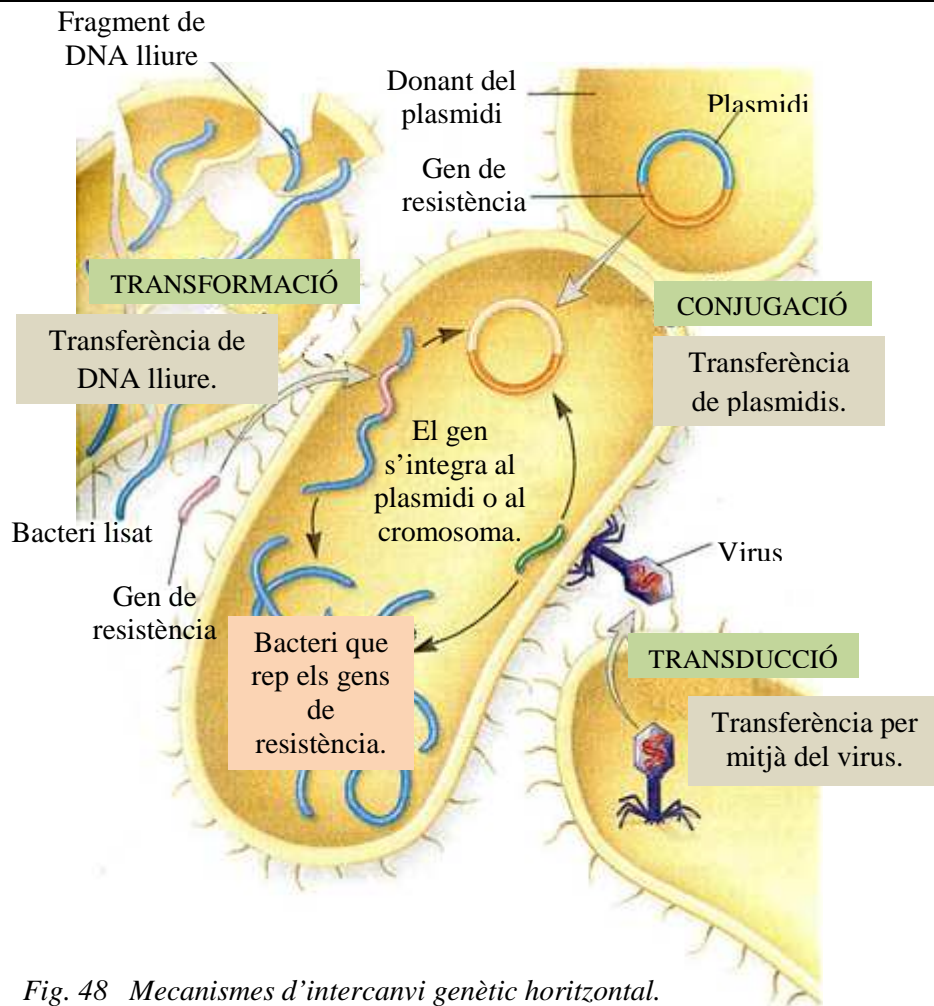


Fig. 48 Mecanismes d'intercanvi genètic horitzontal.

6. Fagoteràpia

Malgrat els esforços per controlar l'aparició i la propagació de les resistències bacterianes, la situació actual continua empitjorant. No obstant això, existeixen un seguit d'estratègies que s'estan emprant per afrontar aquesta nova amenaça. Les més innovadores es basen en la creació de nous compostos mitjançant el disseny estructural d'agents antibacterians que encaixin específicament amb la molècula diana o bé parteixen de la recerca d'antibiòtics naturals desconeguts pels microorganismes. Una resposta molt interessant que contribueix a combatre l'alarmant situació és la **fagoteràpia**. Des de fa uns anys, s'ha pensat novament en els bacteriòfags (o també anomenats fags) com a una alternativa terapèutica a l'ús dels antimicrobians actuals. També s'han proposat pels entorns alimentaris i hospitalaris amb la finalitat d'evitar el creixement bacterià en aquests productes. La

línea de desenvolupament que obria les portes de la fagoteràpia podria donar lloc a la síntesi d'agents microbians més potents i específics que obligarien d'alguna manera els bacteris a desenvolupar en un futur sistemes capaços de repel·lir l'acció dels virus, però molts experts ho consideren una tasca difícil d'aconseguir ja que s'ha demostrat que els bacteriòfags porten milions d'anys destruint els seus hostes sense que aquests hagin adquirit cap resistència.

6.1 Bacteriòfags

Els virus bacterians són molt diversos. Conformen un dels grups biològics més importants dels ecosistemes terrestres i aquàtics i de fet, se'ls considera la forma de vida més abundant del planeta a més de tenir un paper decisiu en l'evolució microbiana. Els bacteriòfags, per la seva capacitat destructiva de cèl·lules bacterianes, es relacionen amb el camp de la medicina, la indústria i l'enginyeria genètica. Tot i així, no tot el que envolta aquesta família vírica és beneficiós per a l'espècie humana: en la seva vessant més nociva, els fags poden transportar diversos factors de virulència que transformen els hostes bacterians en patògens potents.

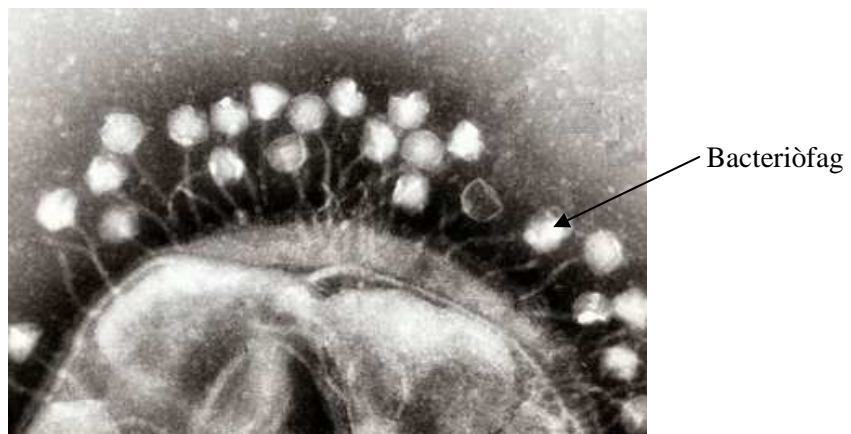


Fig. 49 Bacteriòfags infectant una cèl·lula procariota.

6.1.1 Composició i estructura dels bacteriòfags

- **Composició:** els materials que els formen poden ser molt diversos, però fonamentalment estan compostos per àcids nucleics i proteïnes.

- Àcids nucleics: depenent del fag, el material genètic pot ser DNA o RNA. Sovint, aquestes molècules contenen bases modificades i poden ser circulars o lineals. La majoria de bacteriòfags presenta genomes de DNA de doble cadena (T3, T7, lambda, T2...), però també s'han estudiat fags amb DNA de cadena simple (fd, M13...), RNA de cadena doble (phi 6...) i RNA de cadena simple (MS2...).
- Proteïnes: el nombre de proteïnes de diferents tipus i la quantitat de cadascuna d'elles a la partícula del fag variarà segons la família vírica que es tracti. El bacteriòfag més simple conté diverses còpies d'una o dues classes de proteïnes, mentre que el més complex pot arribar a sintetitzar diversos tipus de proteïnes diferents a nivells elevats.

- **Estructura:** els bacteriòfags poden presentar formes i mides diferents.

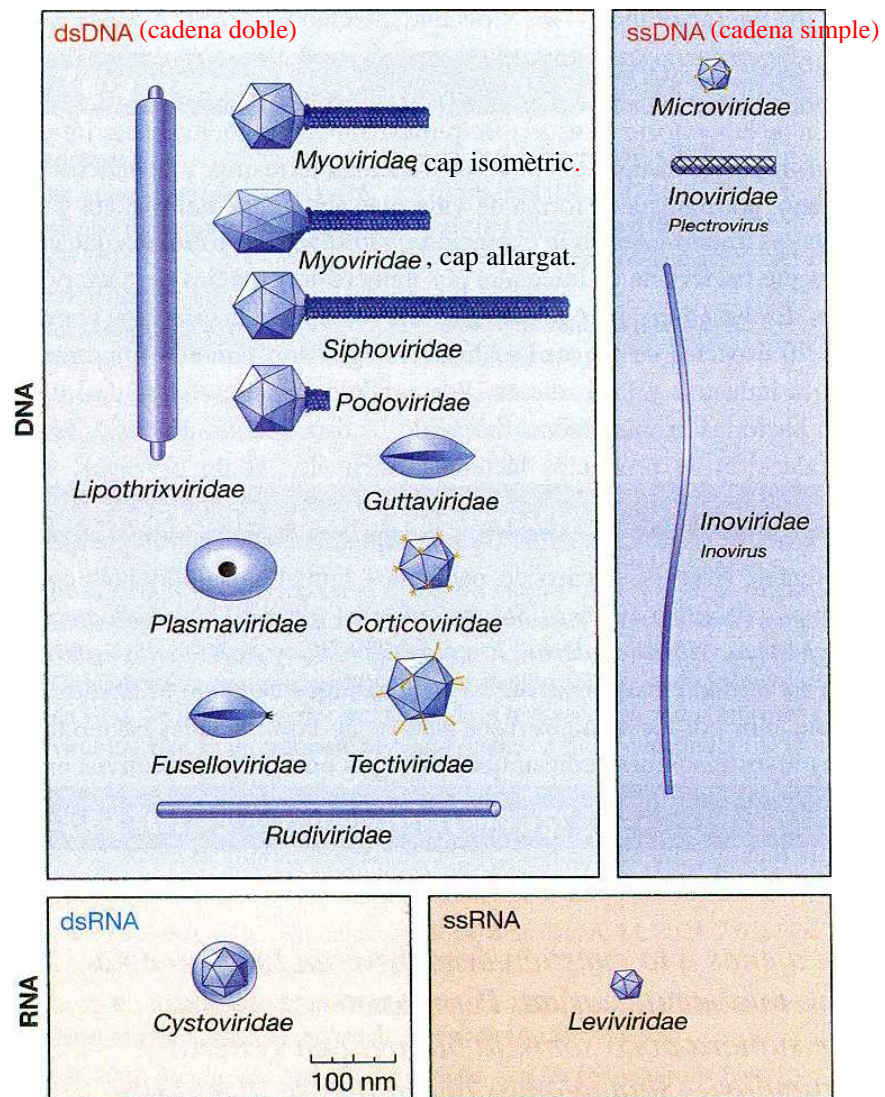


Fig. 50 Famílies i gèneres dels virus procariòtics.

Les característiques estructurals bàsiques dels virus procariòtics poden variar segons la família, tal i com s'observa a la figura 50. Per aquest motiu a continuació només s'exposaran els elements que componen els membres del gènere *Myoviridae*, que conformen un dels grups de bacteriòfags més complexos però alhora són objecte d'estudi gràcies a la rigorosa disposició de les seves parts.

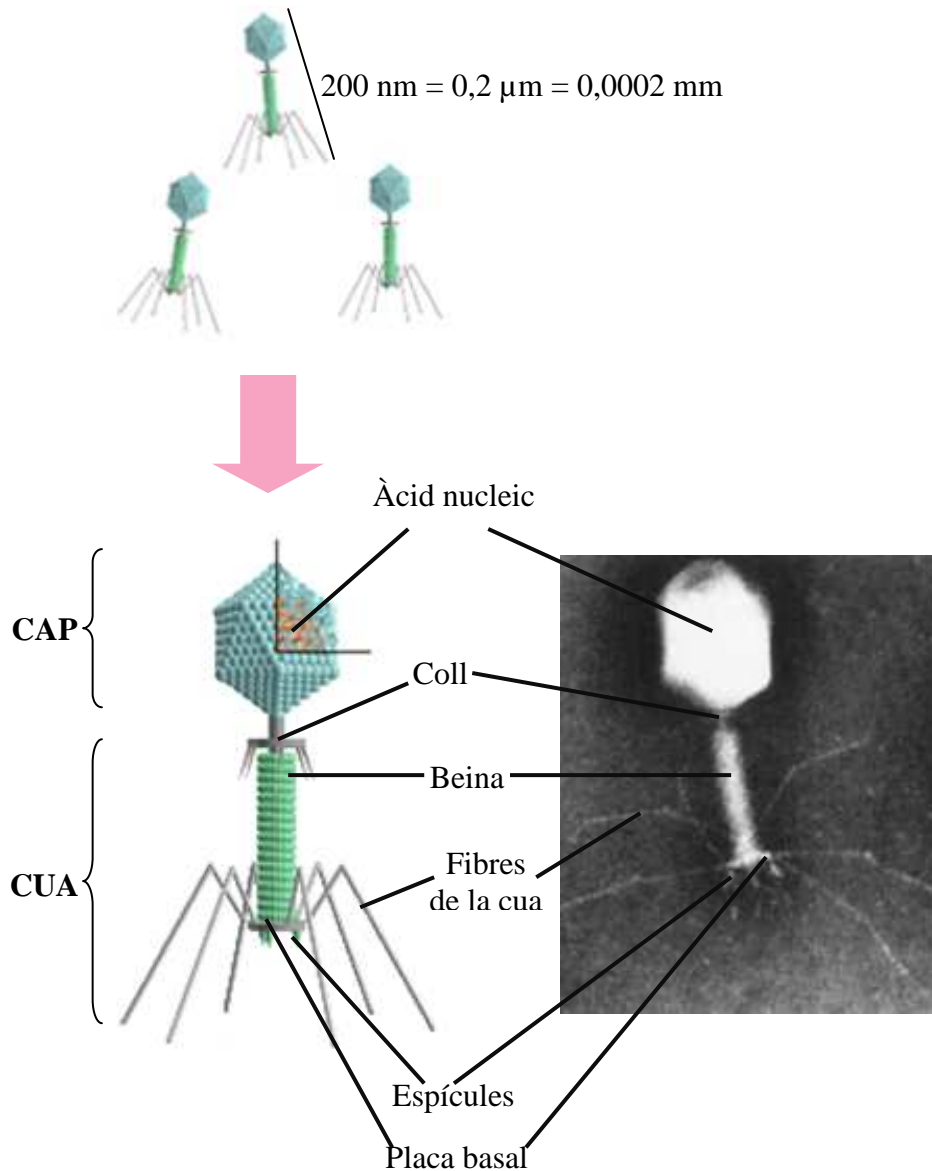


Fig. 51 Estructura d'un bacteriòfag de la família *Myoviridae*.

- **Mida:** la major part de bacteriòfags presenta mides compreses entre 24 i 200 nm⁴⁹ de longitud i 80 i 100 nm d'amplada.
- **Cap:** tots els virus clàssics es configuren al voltant d'un cap o càpsida. Aquesta part està composta per DNA o RNA contingut en una coberta proteica que el protegeix i ajuda a transferir-lo entre les cèl·lules hoste. Es coneixen diferents tipus morfològics que resulten de la combinació simètrica

⁴⁹ Nanòmetre: unitat de longitud equivalent a 1000 μm i 1000000 mm.

de les proteïnes dotant a la càpside de formes helicoidals i icosaèdriques (20 cares).

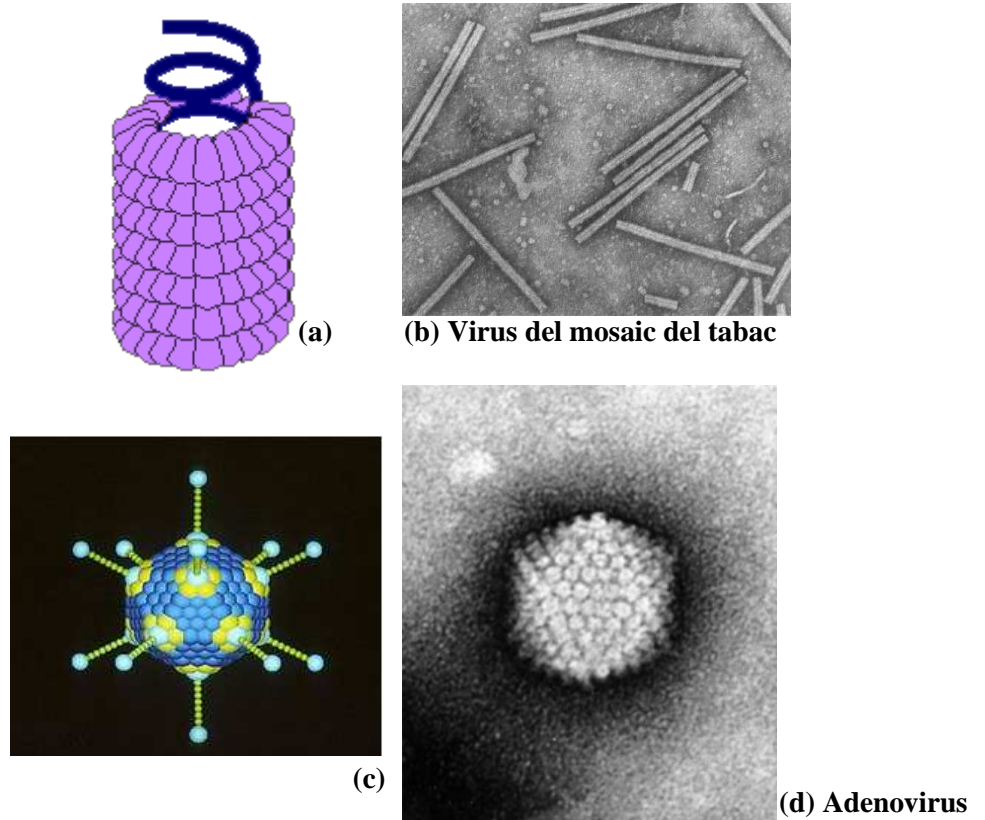


Fig. 52 Exemples de càpsides helicoidals (a i b) i icosaèdriques (c i d).

- **Cua:** molts fags encara que no tots, presenten una cua de magnituds variables associada a la càpside. Es tracta d'un tub buit a través del qual l'àcid nucleic es desplaça durant la infecció. Pel que es refereix a la família *Myoviridae*, la cua està envoltada per una cortina contràctil que li permet encongir-se en el procés d'infecció. A més a més es caracteritza per tenir una placa a la base amb fibres unides a aquesta que també participen en d'adherència del virus a la cèl·lula bacteriana.

6.1.2 Infecció

A continuació s'exposarà el procés d'infecció d'un bacteriòfag T-parell (per exemple T2, T4...) ja que tal i com s'ha esmentat a l'inici de l'apartat *6.1.1 Composició i estructura dels bacteriòfags*, les següents seccions se centren en els components de la família *Myoviridae* l'estructura dels quals condiciona els processos relacionats amb l'acció de parasitar les cèl·lules bacterianes.

Com tots els altres virus, els bacteriòfags no s'uneixen per atzar a la cèl·lula hoste, sinó que s'adhereixen a unes estructures superficials específiques anomenades receptors que poden ser lipopolisacàrids de la paret cel·lular, àcids teicoics, pilis... Així que la infecció s'inicia quan la partícula vírica entra en contacte amb qualsevol part de la cèl·lula susceptible (adsorció) i finalitza amb la introducció del seu material genètic (penetració).

- **ADSORCIÓ:** al llarg de l'adsorció participen diverses estructures de la cua. La unió del bacteriòfag comença quan una fibra de la cua es plega de manera que l'extrem pot contactar amb la superfície bacteriana. Una vegada ha transcorregut l'adhesió, la partícula viral s'aproxima a la cèl·lula deixant que la placa basal s'hi assenti. Alhora, es produeixen un seguit de canvis a la beina que fan que aquesta es reorganitzi i passi a ser més curta i més ampla.

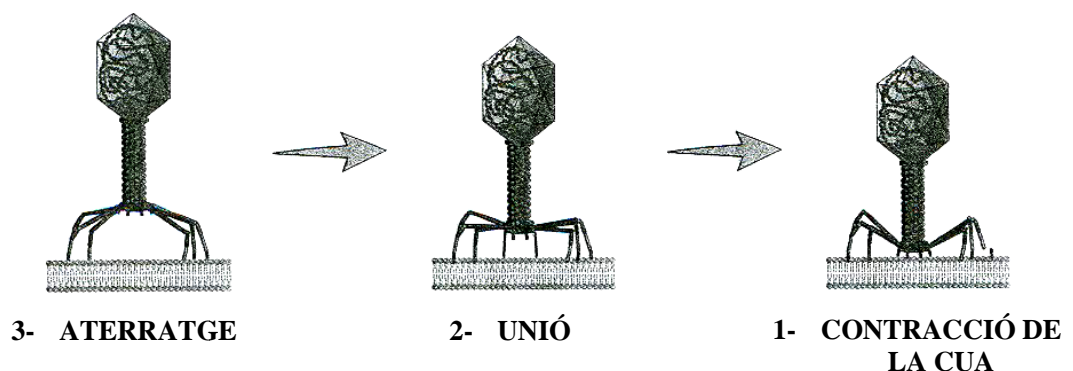


Fig. 53 Procés d'adsorció.

- **PENETRACIÓ:** després de l'adsorció del fag a la cèl·lula, la cua es contrau. Aquest fet permet la penetració del tub a través de la paret bacteriana. Tot seguit, el cap del virus s'encongeix i fa que el DNA s'injecti a l'interior de la cèl·lula hoste. Aquest procés final és facilitat probablement per la presència de l'enzim lisozim, situat a la cua del bacteriòfag, que té la capacitat de digerir les proteïnes de la coberta bacteriana.

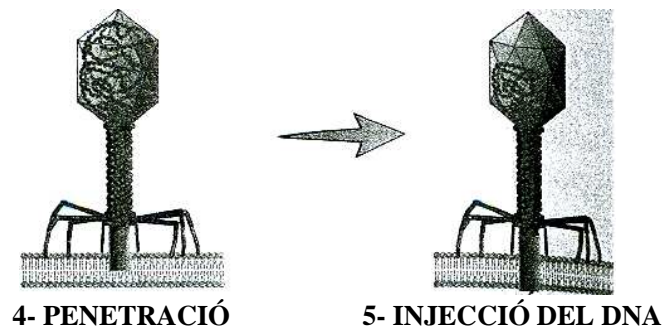


Fig. 54 Procés de penetració.

En acabar l'etapa d'infecció, s'inicien els processos de replicació vírica que definitivament destruiran la cèl·lula o bé desencadenaran en la formació de nous bacteris amb el DNA modificat. Els diferents mètodes de reproducció exposats seguidament definiran la identitat del bacteriòfag.

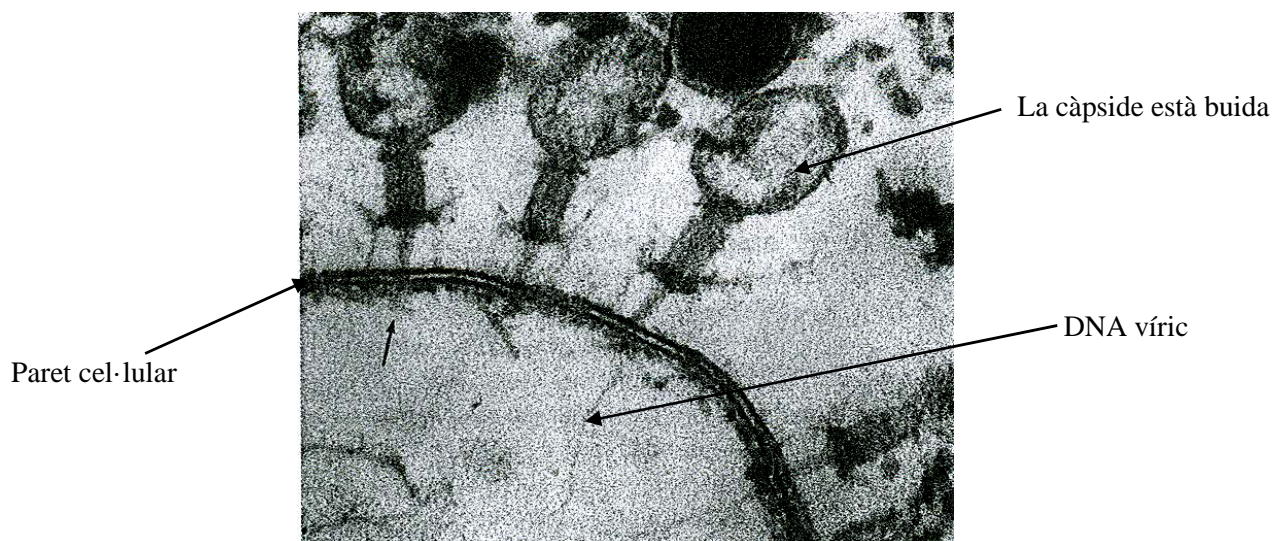


Fig. 55 Micrografia electrònica del procés d'infecció en una cèl·lula *E. coli*.

6.1.3 Replicació vírica

6.1.3.1 Cicle lític

L'essència de la replicació dels bacteriòfags es pot definir de manera simple: el DNA víric ha d'induir a la cèl·lula hoste a sintetitzar tots els components necessaris per fabricar noves partícules fàgiques. Aquestes partícules s'acoblaran seguint l'estructura apropiada i els nous virions que en resultin sortiran del bacteri per infectar altres cèl·lules. Les diferents fases d'aquest procés es recullen en el que s'anomenen **cicles lítics** i tots aquells fags que es reproduïxen únicament d'aquesta manera s'identifiquen com a **virus virulents**. La duració del cicle de replicació lític comprèn un període d'entre 20 i 60 minuts i al llarg d'aquest es pot elaborar una gràfica, anomenada **corba de multiplicació d'un sol pas**, que mostra de manera detallada els esdeveniments moleculars que hi tenen lloc.

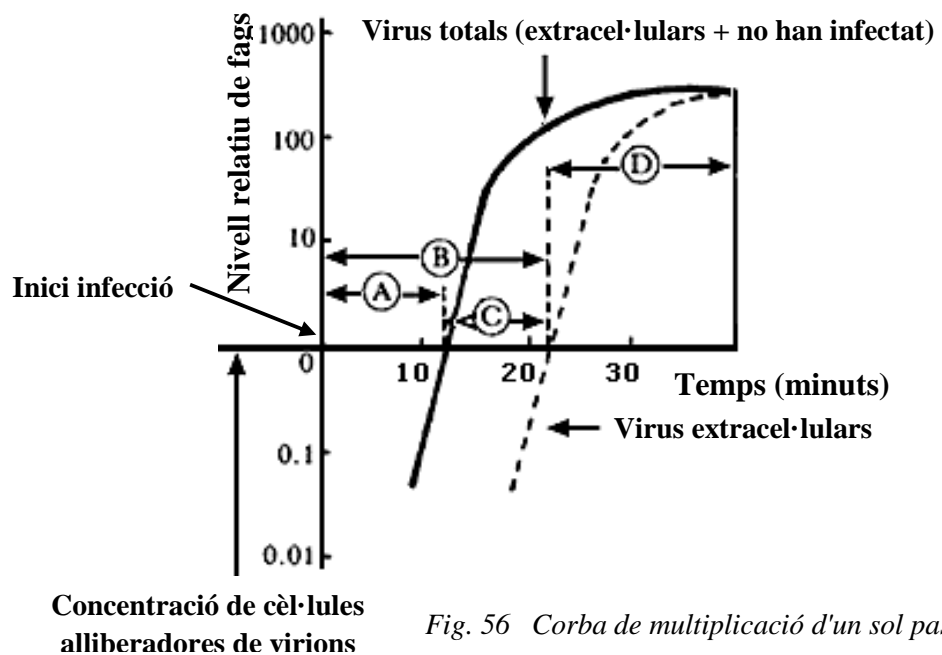
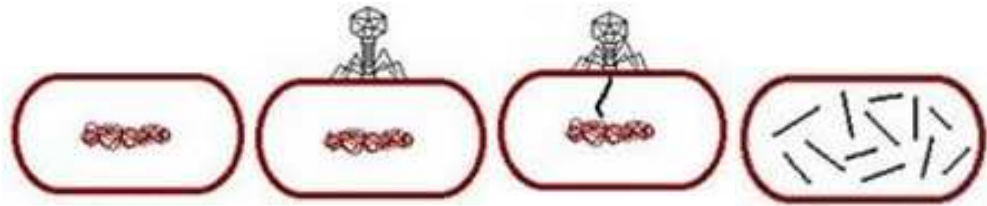


Fig. 56 Corba de multiplicació d'un sol pas.

A. Període d'ECLIPSI: és la part inicial del període de latència en què les cèl·lules bacterianes no contenen cap virus. Al final d'aquesta etapa té lloc el procés d'infecció i per tant l'adsorció i la penetració del DNA del paràsit. La quantitat de partícules d'àcid nucleic dins l'hoste es replica fins al final d'aquesta etapa.



B. Període de LATÈNCIA: comprèn el temps necessari per a la reproducció del virus. Durant els 20 minuts de duració de l'etapa la cèl·lula hoste sintetitza tots els components del nous paràsits sota la direcció del DNA víric.



C. Període d'ACUMULACIÓ INTRACEL·LULAR: els elements que compondran els nous bacteriòfags s'acoblen de manera que es produeix una acumulació de virions que exerciran pressió a les parets cel·lulars. Per tant, en aquesta fase hi ha un nombre creixent de virus infectius però cap s'allibera.



D. Període d'ALLIBERAMENT: la quantitat de bacteriòfags s'incrementa notablement diversos centenars de vegades a causa de l'alliberament de les partícules fàgiques per la lisi cel·lular. El número total de fags lliures facilita el càlcul de la **mida d'explosió**, que representa la mitjana de virus expulsats per cada cèl·lula infectada.



6.1.3.2 Cicle lisogènic

Molts bacteriòfags són virulents però d'altres, encara que poden destruir la cèl·lula, tenen l'opció de realitzar un cicle de vida diferent amb efectes més subtils sobre l'hoste. Es tracta dels **fags atemperats**, és a dir, aquells que es reproduïxen a partir de **cicles lisogènics**. Una vegada superades les fases d'adsorció i penetració, el genoma fàgic s'integra al DNA del cromosoma cel·lular. D'aquesta manera, el virus opta per seguir una de les dues possibles vies reproductives: replicar el seu material genètic sincrònicament amb el de l'hoste entrant així en fase de **profag** (el virus s'ha integrat a l'interior del genoma cel·lular) i donant lloc a **bacteris lisògens** (que són immunes a la infecció d'altres bacteriòfags) o bé reproduir-se de manera ràpida culminant amb la formació de virions madurs i la lisi cel·lular en el moment en què les condicions internes de la cèl·lula indueixin a la separació del profag.

Els esdeveniments que es donen de manera general en un cicle lisogènic són els següents:

- **Adquisició de la forma circular per part del cromosoma víric.** El DNA del bacteriòfag es caracteritza per presentar una estructura lineal de doble cadena amb

dues petites regions de cadena simple als extrems. Aquestes dues cadenes senzilles són complementàries i se les denomina “extrems cohesius”, el que indica que poden aparellar-se i formar una molècula circular (apartat **a** de la figura 56).

- **Integració del DNA víric.** La recombinació de materials genètics té lloc en una seqüència específica del DNA fàgic (que ha adquirit la forma circular) i un tros concret de la cadena del cromosoma de l'hoste.

- **Opressió del genoma víric.** Una proteïna (repressor) codificada pel bacteriòfag s'uneix a una zona particular del DNA fàgic i reprimeix la transcripció de la majoria del gens vírics, exceptuant aquell gen que codifica el repressor.

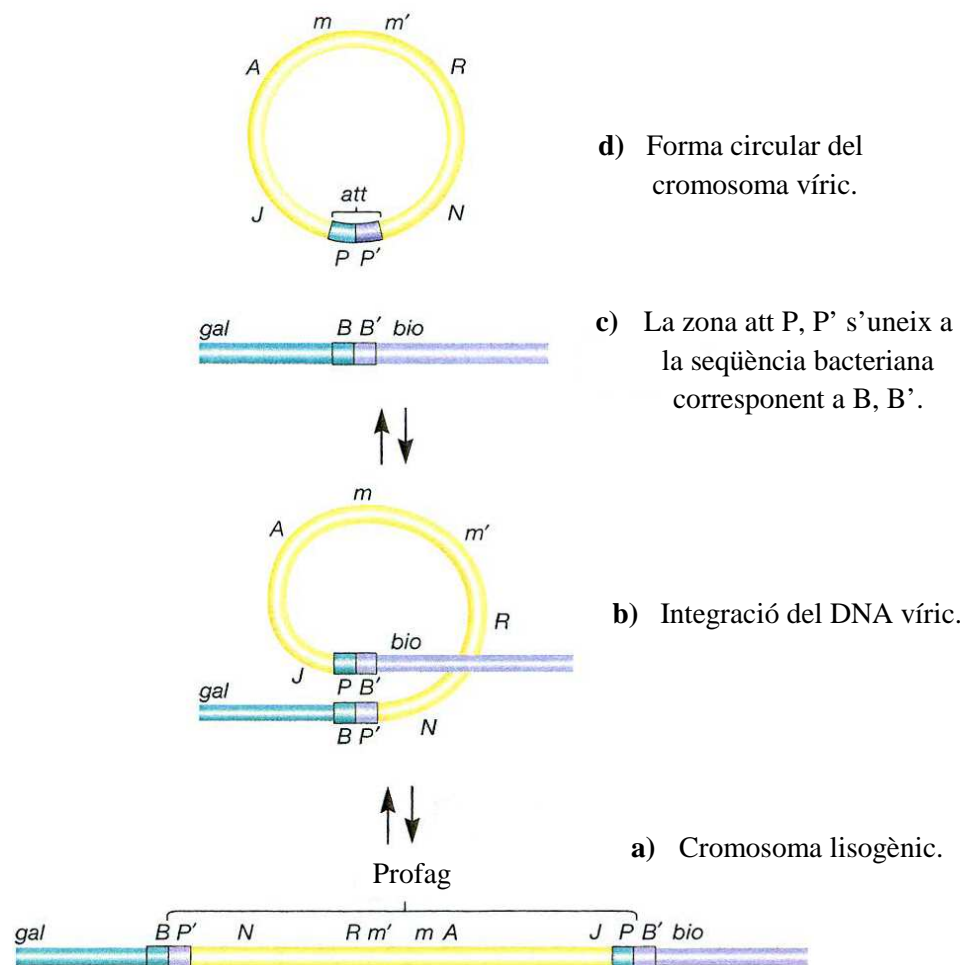


Fig. 57 Inserció reversible del cromosoma fàgic.

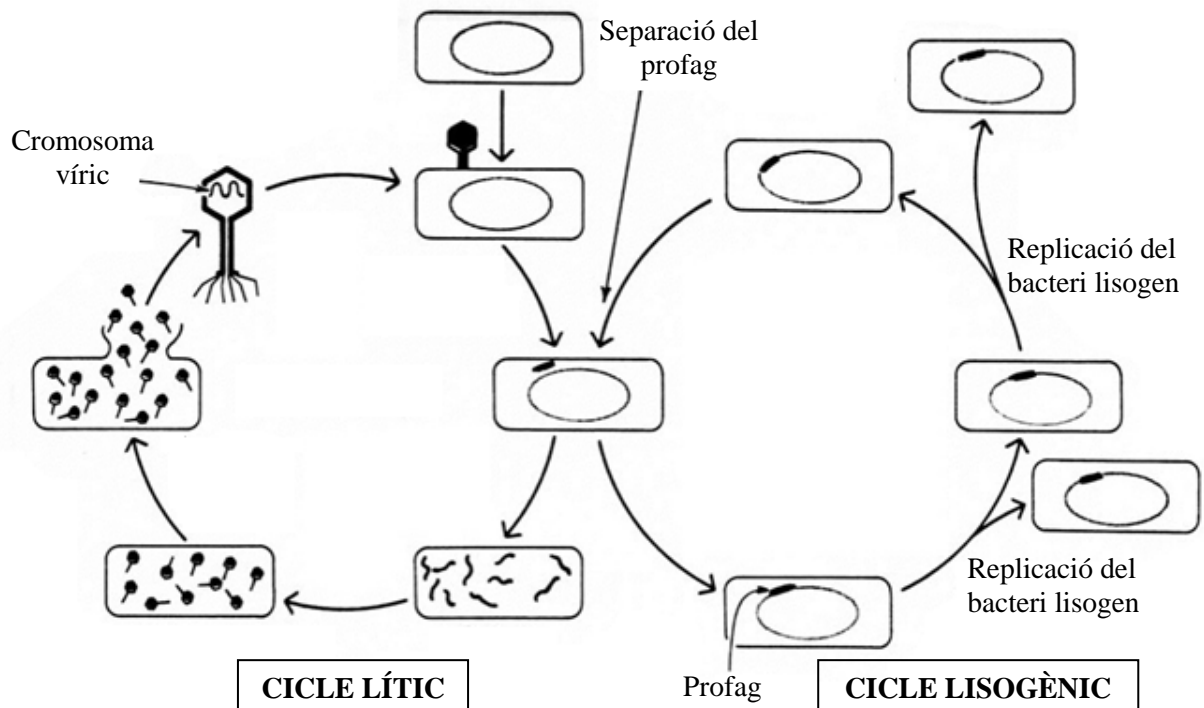


Fig. 58 Cicle reproductiu d'un bacteriòfag atemperat.

6.2 Avantatges i desavantatges de la fagoteràpia

El concepte de fagoteràpia s'ha considerat una de les alternatives pel tractament de malalties infeccioses. Encara que la idea d'utilitzar partícules víriques no és nova, el seu àmbit d'aplicació així com els beneficis que suposen utilitzats com agents antimicrobians es troba en els darrers anys en fase de "recreixement".

– En comparació amb les tècniques quimioteràpiques, els virus bacteriòfags ofereixen múltiples avantatges, com:

- **L'elevada capacitat de replicació** que els permet que una única dosi de fags pugui ser suficient per eradicar una infecció. Pel que fa a totes aquelles partícules que no aconsegueixen atacar les cèl·lules bacterianes, no podran multiplicar-se de manera que a conseqüència la seva dosi minvarà i, per tant, aquest fet farà possible l'aplicació de teràpies combinades.

- L'**extrema especificitat**, és a dir, cada bacteriòfag només pot parasitar un tipus concret de bacteri mentre que els antibiòtics ataquen a partir d'espectres molt més amplis. Aquesta propietat de vegades es considera un inconvenient perquè implica un coneixement complet tant de totes les espècies fàgiques com dels símptomes i característiques de les diferents soques bacterianes existents. Evidentment, es tracta d'una situació impossible d'assolir ja que obliga a saber contínuament per cada soca clínica quins són els fags als que són susceptibles, però afortunadament s'ha trobat una solució per aquest problema que consisteix en utilitzar els anomenats "còctels", barreges de bacteriòfags específics que actuen contra bacteris que generen efectes similars.

- No causen **efectes secundaris** ja que són innocus per a les cèl·lules eucariotes.

- No es veuen afectats per les **possibles mutacions** que es puguin donar al patogen. Qualsevol cèl·lula bacteriana pot mutar diverses vegades amb una freqüència mitjana de 10^{-8} . En canvi, els bacteriòfags tenen la capacitat de modificar el seu material genètic amb una freqüència superior, el que permet que es puguin elaborar còctels amb fags específics que presentin mutacions i per tant infectin les soques que també han mutat.

– Malgrat aquesta suma considerable de privilegis, la fagoteràpia com qualsevol altra tècnica, també té certes limitacions o inconvenients que demostren que encara ens trobem davant un tractament complicat i poc viable. Algunes d'elles són:

- Alguns bacteriòfags no desenvolupen el cicle lític després de la infecció, sinó que una part de la població pot **romandre en la fase lisogènica** transformant així els bacteris lisògens en resistents a la infecció per altres fags. Qualsevol virió atemperat s'ha d'evitar en la fagoteràpia.

- Els bacteriòfags poden quedar inactivats per l'acció dels **anticossos** del pacient.
- Poden ser portadors de **cassets de resistència** (figura 47) a antibiòtics o contenir gens codificadors de toxines.

En termes generals i concloents, es pot afirmar que la teràpia fàgica té moltes probabilitats de ser exitosa sempre i quan es donin les condicions que afavoreixin la interacció del bacteriòfag amb el bacteri patogen, així com la seva ràpida dispersió i replicació.

7. Part experimental

7.1 Objectiu

L'objectiu del present projecte és estudiar el creixement d'un cultiu bacterià modificat genèticament, després de la infecció amb diferents tipus de bacteriòfags (fagoteràpia) i comparar-lo amb el que s'obté després del tractament amb compostos antimicrobians (quimioteràpia).

7.2 Hipòtesi

Es creu que les tècniques fagoteràpiques seran més eficaces per eliminar els bacteris que han adquirit resistències.

7.3 Procediment

El procediment a seguir s'inicia amb la realització de dues proves microbiològiques que exemplificaran de manera general el mètode bàsic que cadascuna de les dues teràpies utilitza pel tractament de soques bacterianes salvatges (és a dir, que no han estat modificades genèticament i per tant no acostumen a presentar cassets de resistència).

Tot seguit, i després d'haver analitzat amb detall els resultats de les mostres anteriors, es procedeix a l'alteració del material genètic bacterià per mitjà del procés de transducció que permetrà traspasar un casset de resistència a un antibiòtic específic. Com a aclariment, cal esmentar que en aquest experiment es mostraran els efectes dels compostos antimicrobians a partir de l'acció d'antibiòtics ja que l'objectiu perseguit es basa en la posterior aplicació d'una de les teràpies sobre organismes vius.

Per finalitzar, s'efectua pròpiament el mètode que diferenciarà ambdues teràpies (s'anomena corba d'infecció) atès que la soca resistent s'infectarà amb diferents classes de bacteriòfags i alhora amb diversos antibiòtics.

7.3.1 Metodologia bàsica de la teràpia amb antibiòtics: Antibiograma

D'entre els diferents mètodes que es poden emprar per a determinar la sensibilitat dels microorganismes als antibiòtics, en aquesta pràctica només s'inclou el de la **tècnica de difusió en placa (mètode de Kirby-Bauer) o antibiograma.**

El principi en el qual es basa aquest assaig és molt simple. Quan es col·loca un disc impregnat amb antibiòtic sobre una placa d'agar prèviament cultivada amb el bacteri que es vol estudiar, l'antibiòtic es difon de forma radial a través del medi produint un gradient de concentració.

Material necessari:

- Plaques de petri estèrils amb agar nutritiu.
- Escovillons (bastons amb cotó estèril als extrems).
- Tubs d'assaig.
- Dissolució Ringer (9g NaCl⁵⁰ + 1L H₂O).
- Nansa de Kolle.
- Micropipeta.
- Bec Bunsen.
- Vòrtex⁵¹.
- Discs d'antibiòtics:
 - Ampicil·lina (AMP 10)
 - Tetraciclina (TE 30)
 - Eritromicina (E 15)
 - Cloramfenicol (C 30)
 - Àcid nalidíxic (NA 30)
 - Gentamicina (CN 10)
- *Salmonella typhimurium* (salvatge)

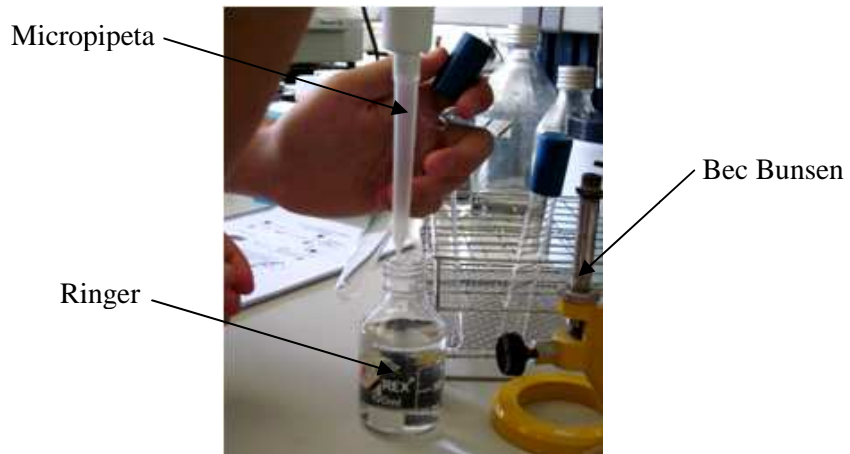
Procediment:

- I. S'encén el Bunsen per treballar al seu voltant, creant així una zona d'esterilitat.

⁵⁰ Clorur de sodi: popularment es coneix com a sal comuna.

⁵¹ Aparell que té la funció d'homogeneïtzar solucions líquides.

2. Afegim 5ml de Ringer amb una micropipeta estèril a un tub d'assaig.



3. Amb una nansa de Kolle⁵² agafem una petita quantitat del bacteri (del que prèviament s'ha fet una sembra en agar que ha crescut a 37°C durant la nit) i la posem al tub d'assaig corresponent on tenim el Ringer.

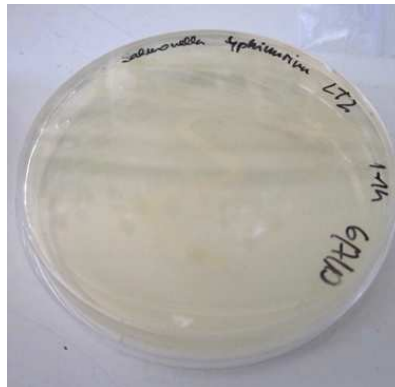
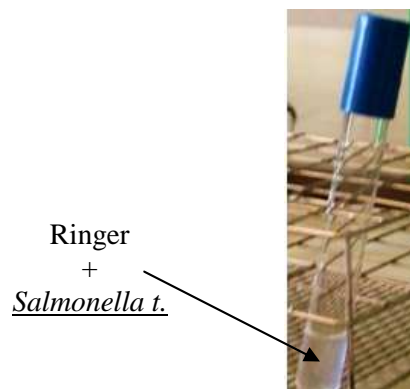


Fig. 59 Cultiu de *Salmonella typhimurium*.

4. Es barreja la dissolució amb el vòrtex fins a assolir un determinat grau de terbolesa.



5. Amb la suspensió aconseguida, es mulla un escovilló a la dissolució eliminant l'excés de líquid a les parets del tub per agafar menys quantitat de cèl·lules.

⁵² Estri format per un mànec de metall amb un portaagulles circular en el seu extrem.

6. Amb l'escovilló es frega la superfície de les plaques del medi nutritiu estèril. Per tal que els bacteris quedin repartits homogèniament, es gira la placa 60° repetint l'acció diverses vegades tot tornant a sucra l'escovilló.
7. Es deixa assecar la placa durant uns 10 minuts amb la tapa una mica oberta.
8. Amb unes pinces, es col·loquen els discs d'antibiòtic de manera que estiguin a la perifèria de la placa i equidistants. Cal pressionar suaument l'antibiòtic perquè contacti bé amb la superfície del medi de cultiu.

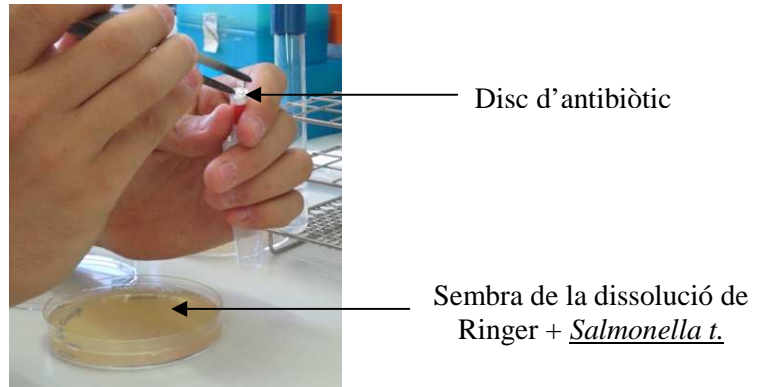


Fig. 60 Preparació del disc d'antibiòtic.

9. La placa roman 20 minuts a temperatura ambient i després s'incuba a 37°C de 18 a 24 hores perquè els bacteris creixin.



Fig. 61 L'antibiograma ja es pot incubar.

Lectura:

Es duu a terme mesurant el diàmetre dels halos d'inhibició (espais que no permeten el creixement del bacteri) formats per l'expansió de cada antibiòtic.

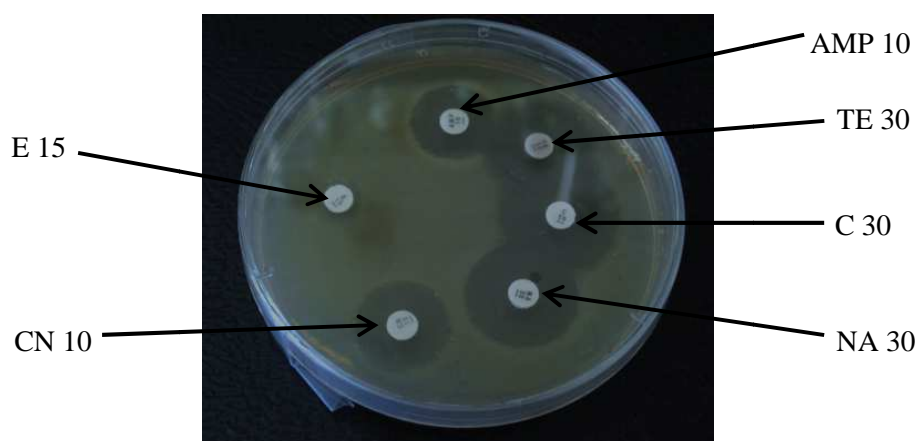


Fig. 62 Halos d'inhibició.

Els resultats s'interpreten partint d'una taula (Fig. 63) que relaciona el diàmetre de la zona d'inhibició amb el grau de resistència microbiana.

Antibiòtic	Contingut/disc	Diàmetre de l'halo (en mm)		
		Resistent	Sensibilitat intermèdia	Sensible
Ampicil·lina	10 µg	≤ 18	19-21	≥ 22
Tetraciclina	30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19
Eritromicina	15 µg	≤ 13	14-17	≥ 18
Cloramfenicol	30 µg	≤ 12	13-17	≥ 18
Àcid nalidíxic	30 µg	≤ 13	14-18	≥ 19
Gentamicina	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15

Fig. 63

RESULTATS:

DISC	ANTIBIÒTIC	DIÀMETRE DELS HALOS D'INHIBICIÓ	SUSCEPTIBILITAT
AMP 10	Ampicil·lina	11 mm	RESISTENT
TE 30	Tetraciclina	24 mm	SENSIBLE
E 15	Eritromicina	9 mm	RESISTENT
C 30	Cloramfenicol	25 mm	SENSIBLE
NA 30	Àcid nalidíxic	23 mm	SENSIBLE
CN 10	Gentamicina	13 mm	INTERMÈDIA

Resultats de l'antibiograma.

Fig. 64

Segons els resultats de la taula elaborada es pot concloure que *Salmonella typhimurium* és una espècie bacteriana que presenta sensibilitat davant el 50% dels fàrmacs testats. Aquest fet demostra que recórrer a la quimioteràpia per afrontar infeccions provocades per aquesta soca microbiana, sempre i quan sigui salvatge, seria una bona opció.

Tot i així, no tots els antibiòtics s'expandeixen. L'antibiograma mostra que quan el diàmetre de l'halo d'inhibició és massa petit el patògen continua creixent (resistent)

ja que l'agent no li provoca cap efecte advers. Una possible causa d'aquest fet té relació amb la quantitat d'antibiòtic continguda en el disc, que normalment acostuma a representar la concentració del fàrmac que s'assoleix a l'organisme. De manera que en augmentar la dosi subministrada, s'evitaria la proliferació de la colònia bacteriana però en contraposició suposaria un conjunt d'efectes detractors pel cos.

7.3.2 Metodologia bàsica de la teràpia fàgica: Titulació

Es tracta d'una de les tècniques més emprades per a l'aïllament de bacteriòfags i alhora és útil per a poder observar els efectes de la infecció d'una soca bacteriana sembrada en un medi nutritiu. Consisteix en l'obtenció de calbes (àrees de lisi cel·lular) aïllades que es puguin comptar. Per això és necessari barrejar una petita quantitat de mostra (bacteriòfags) amb un volum d'una dissolució estèril (diluent). De vegades també es coneix amb el nom de "**Banc de dilucions**".

Material necessari:

- ON (over night)⁵³ *Salmonella typhimurium* (ATCC).
- Diluent: MgSO₄ 10mM (sulfat de magnesi).
- Fag L1 (lític).
- Plaques de petri estèrils amb agar nutritiu.
- Micropipeta.
- Pipeta Pasteur.
- Eppendorfs⁵⁴.
- Agitador.
- LB tou⁵⁵.

Procediment:

- En primer lloc cal obtenir el fag amb el qual s'infectarà el patogen.

- I. Amb una pipeta Pasteur es recupera una calba formada en un cultiu sòlid prèviament infectat.

⁵³ Medi líquid de cultiu bacterià incubat durant 24 hores a 37°C.

⁵⁴ Petits tubs cilíndrics de plàstic amb un fons en forma cònica i una tapa adherida al cos tubular per evitar el despreniment del líquid.

⁵⁵ Medi sòlid utilitzat per a l'obtenció i titulació de lisats fàgics.

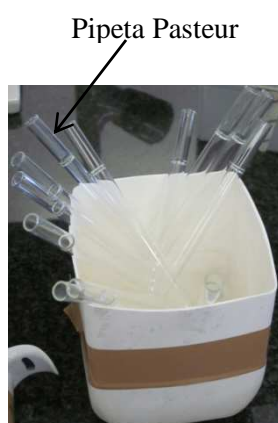


Fig. 65

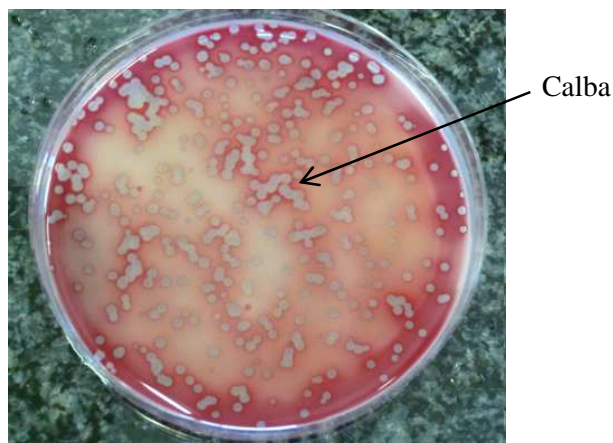


Fig. 66

2. Es diposita la calba extreta en un eppendorf que contingui 1 ml de $MgSO_4$.
3. La mescla es deixa en agitació suau durant 20-30 minuts.
4. Per obtenir els bacteriòfags, cal centrifugar la solució 1 minut a 13.000 RPM⁵⁶ i d'aquesta manera els elements que formen la calba (virions i fragments cel·lulars) se separaran per pes. A la part més profunda de l'eppendorf sedimentaran tots aquells components bacterians productes de la lisi cel·lular, i a la superfície emergirà el sobrenedant, que en aquest cas estarà format pels fags L1.
5. Es recupera el sobrenedant en un eppendorf nou (mostra de L1).

- Titulació o banc de dilucions.

Una dilució simple es calcula a partir de la següent fórmula:

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

Per exemple, la dilució de 1ml de mostra (fag L1) en 9ml de diluent ($MgSO_4$) equival a:

$$Dilució = \frac{\text{Volum de mostra}}{\text{Volum total (mostra+diluent)}} = \frac{1}{1+9} = \frac{1}{10} \text{ i s'escriu } 1/10, 1:10, 10^{-1} \text{ o } -1.$$

En comptes de fer una sola dilució utilitzant volums desmesurats i que podrien fer perdre precisió així com alterar els resultats finals, es realitzarà una dilució seriada formada per un conjunt de dilucions petites (-1 i -2) el producte de les quals donarà lloc a una dilució final.

⁵⁶ Revolucions per minut.

La titulació seriada constarà de 4 dilucions: la -2, la -4, la -5 i la -6 que posteriorment es sembraran en plaques. Cadascuna d'elles tindrà un volum final de 1000µl⁵⁷ (1ml). Les dilucions -2 i -4 contindran 10µl fag + 990µl de MgSO₄ atès que es formaran a partir del factor de dilució -2 (1:100), i les dues restants resultaran de la mescla de 100µl fag + 900µl MgSO₄ derivada del factor de dilució -1 (1:10).

$$\text{Dilució - 2} \rightarrow \frac{1}{100} = \frac{1\text{ml mostra}}{100\text{ml finals}} = \frac{1000\mu\text{l mostra}}{100.000\mu\text{l finals}} = \frac{10\mu\text{l mostra}}{1000\mu\text{l finals}}$$

$$1000\mu\text{l finals} = 10\mu\text{l fag} + X\mu\text{l MgSO}_4$$

$$X = 1000\mu\text{l finals} - 10\mu\text{l fag}$$

$$X = 990\mu\text{l MgSO}_4$$

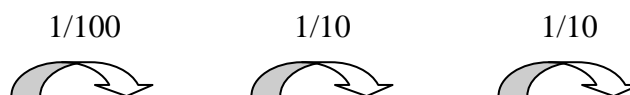
$$\text{Dilució - 1} \rightarrow \frac{1}{10} = \frac{1\text{ml mostra}}{10\text{ml finals}} = \frac{1000\mu\text{l mostra}}{10.000\mu\text{l finals}} = \frac{100\mu\text{l mostra}}{1000\mu\text{l finals}}$$

$$1000\mu\text{l finals} = 100\mu\text{l fag} + X\mu\text{l MgSO}_4$$

$$X = 1000\mu\text{l finals} - 100\mu\text{l fag}$$

$$X = 900\mu\text{l MgSO}_4$$

Cal esmentar que es tracta d'un procés l'objectiu del qual és diluir al màxim la mostra a testar, de manera que el volum de fags que es pipetejaren per cada dilució provindran de la dilució anterior, és a dir, la quantitat de mostra de la dilució -4 s'ha d'agafar de la solució -2.



DILUCIÓ (FDA ⁵⁸)	-2 (1:100)	-4 (1:10.000)	-5 (1:100.000)	-6 (1:1.000.000)
FACTOR DE DILUCIÓ (FD)	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻¹
VOLUM FINAL	1000µl	1000µl	1000µl	1000µl
VOLUM FAG	10µl (de l ON)	10µl (de la -2)	100µl (de la -4)	100µl (de la -5)
VOLUM MgSO ₄	990µl	990µl	900µl	900µl

⁵⁷ µl: microlitres.

⁵⁸ Factor de dilució acumulat.

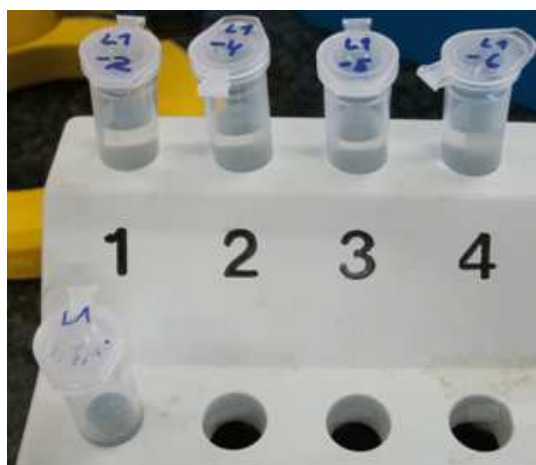


Fig. 67 Dilucions preparades als eppendorfs i mostra del fag L1.

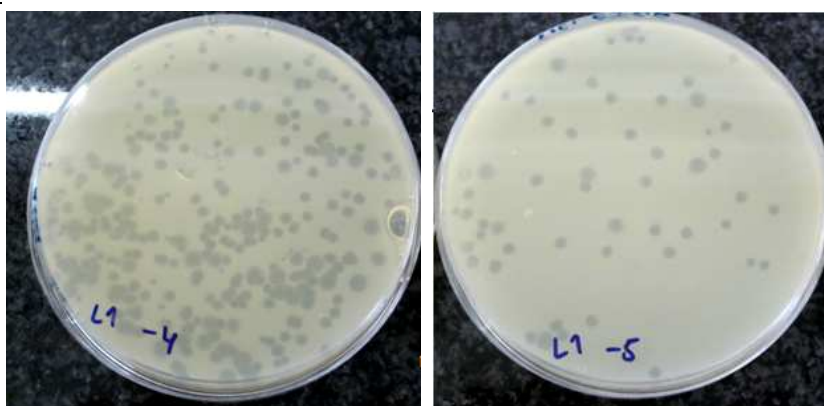
Tot seguit s'infectarà la soca ATCC amb les dilucions escaients per tal de poder observar el nombre de calbes que es formen segons la concentració de cada dilució. Únicament es cultivaran les dilucions -4, -5 i -6 ja que la dilució -2, pel fet de presentar una concentració fàgica molt elevada, no permet realitzar el comptatge de calbes (hi haurà massa).

- Infecció:

Consisteix en la preparació de confluents que es sembraran en plaques amb agar i es posaran a incubar.

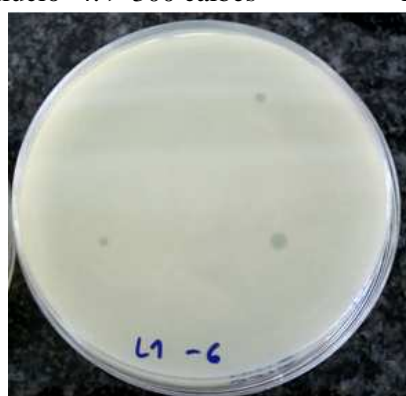
Confluent = LB tou + 100µl ATCC +
100µl dilució (-4, -5 i -6)

RESULTATS:



Dilució -4: > 300 calbes

Dilució -5: 56 calbes



Dilució -6: 3 calbes

Fig. 68 Plaques corresponents a cada dilució.

Els resultats de la infecció s'expressen a partir del recompte de plaques, és a dir, cal fer el comptatge de pfu/ml⁵⁹ per tal de poder determinar d'una manera aproximada el nombre de virions que han lisat les cèl·lules i així quantificar la capacitat infectiva del bacteriòfag L1 per aquesta soca concreta.

⁵⁹ Unitats formadores de plaques o calbes/ml.

El valor de pfu/ml només es calcularà a les dilucions -5 i -6 perquè el nombre de calbes formades a cada placa s'ha de trobar entre 30 i 300 i com es pot apreciar a la Fig. 68, a la primera la quantitat s'excedeix notablement per l'elevada concentració de mostra vírica.

$$pfu/ml = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ calbes}}{\text{volum sembrat (ml)} \cdot \text{FDA}} \left\{ \begin{array}{l} - V \text{ sembrat (víric)} = V \text{ dilució (víric)} = 100\mu\text{l} = 0,1\text{ml} \\ - \text{FDA: } 10^{-5}; 10^{-6} \end{array} \right.$$

$$\left. \begin{array}{l} \bullet \text{ Dilució -5:} \\ pfu/ml = \frac{56}{0,1 \cdot 10^{-5}} = 5,6 \cdot 10^7 \\ \\ \bullet \text{ Dilució -6:} \\ pfu/ml = \frac{3}{0,1 \cdot 10^{-6}} = 3 \cdot 10^7 \end{array} \right\} \bar{x} = \frac{5,6 \cdot 10^7 + 3 \cdot 10^7}{2} = 4,3 \cdot 10^7 pfu/ml$$

Els càlculs mostren que com més petit és el valor de la dilució (-6) el volum víric sembrat està més diluït i per tant la quantitat de virions infectius és menor ja que hi ha menys calbes (cada calba ha estat formada per un sol fag). En obtenir la mitjana aritmètica de pfu/ml dels valors de les dilucions -5 i -6 es pot determinar la concentració original d'unitats formadores de plaques que hi havia a la mostra abans de fer la titulació. En aquest cas la concentració és d'unes $4,3 \cdot 10^7$ pfu/ml el que indica que en un volum ínfim de mostra (1ml), el nombre de bacteriòfags L1 és molt elevat. Considerant aquests resultats en termes mèdics, es pot demostrar segons aquesta metodologia que la concentració de virions i per tant l'eficàcia del tractament no està condicionada per la quantitat de mostra subministrada. No obstant, si s'hagués produït una variació en qualsevol de les dues variables tractades (el bacteri ATCC o el fag L1) els resultats de la titulació no haurien estat els esperats ja que el fag L1 és específic per a la infecció de *Salmonella typhimurium* (o ATCC).

7.3.3 Transducció

Aquest procés constarà de dues parts:

– A la primera, la finalitat és obtenir un lisat fàgic (lisogènic) a partir de la infecció d'una soca d'ATCC la qual porti incorporat un casset de resistència a cloramfenicol, de manera que en finalitzar el procés d'infecció els profags formats es desprendran emportant-se fragments del genoma bacterià.

Material necessari:

- ON ATCC IRΩCm⁶⁰.
- Fag P22 salvatge (lisogènic): específic per a *Salmonella typhimurium* (ATCC)
- Ringer⁶¹.
- Espectrofotòmetre⁶².

Procediment:

1. El cultiu ON ATCC IRΩCm es posa a incubar (les cèl·lules es reproduïxen i augmenta la concentració per mil·lilitre), i cada 30 minuts es van prenent mostres per mesurar la DO (550nm)⁶³ a l'espectrofotòmetre. Amb aquest procés es pretén assolir una DO (550nm) aproximadament de 0,3, el que simbolitza que la concentració de cèl·lules de la dilució és de 10⁸ cfu⁶⁴/ml. La DO (550nm) calculada per l'espectrofotòmetre determina la diferència entre la llum que s'emet a la mostra que es vol testar i la llum que en surt (per tant, ja ha travessat el cultiu). Si el valor de la DO (550nm) és molt elevat, indica que la quantitat de llum que s'ha filtrat és alta i que, per tant, el cultiu cel·lular encara està massa concentrat.
2. Una vegada el cultiu es troba a una DO (550nm) de 0,3, s'infecta amb el lisat de P22 salvatge.

⁶⁰ Over night d'ATCC amb cassets de resistència a cloramfenicol (Cm).

⁶¹ Solució salina per fer bancs de dilucions amb cultius bacterians.

⁶² Instrument emprat per a mesurar la intensitat de l'adsorció de l'energia en funció de la longitud d'ona d'una mostra de matèria. La seva finalitat és determinar la variació de la concentració cel·lular amb el temps.

⁶³ Densitat òptica.

⁶⁴ Unitats formadores de cèl·lules.



Fig. 69 Material per fer la transducció.

3. Després de tres hores, la mescla es centrifuga i es filtra el lisat (sobrenedant).

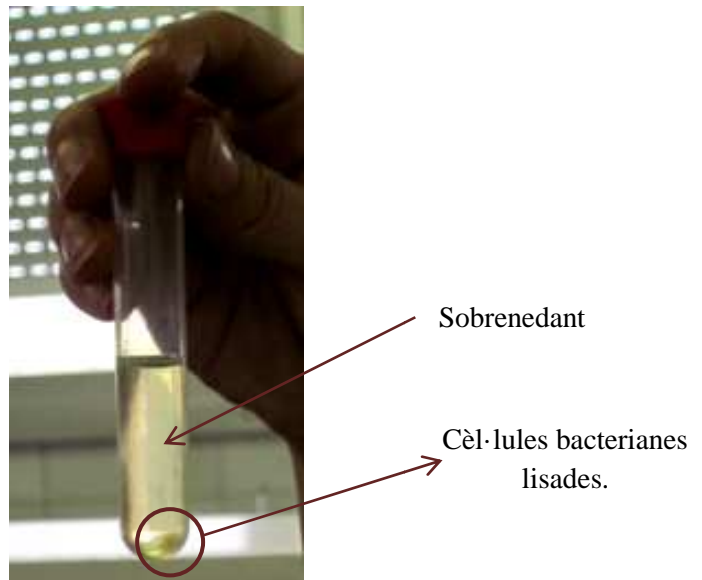


Fig. 70 Centrifugació d'ATCC IRΩCm infectat amb P22 salvatge.



Fig. 71 Obtenció del sobrenedant (fags P22 amb cassets de resistència a Cm).

El bacteriòfag lisogènic P22 en iniciar el cicle lític per abandonar el bacteri dona lloc a processos d'intercanvi genètic. Concretament, en el moment de la formació de la càpside, aquest fag té la capacitat d'empaquetar qualsevol fragment del genoma bacterià ja que aquest últim conté seqüències que poden ser reconegudes pel virus. Conseqüentment, es van encapsidant fins a esgotar la capacitat d'emmagatzematge de DNA de la càpside.

– A la segona part, té lloc la infecció d'una soca d'ATCC salvatge per part dels bacteriòfags P22 transductants que s'han obtingut inicialment. El propòsit d'aquesta nova infecció és obtenir una mostra bacteriana modificada genèticament que posteriorment serà sotmesa a nous tractaments fagoteràpics i quimioteràpics. Per tal de poder analitzar els resultats de manera correcta, el cultiu infectat es sembrarà en plaques impregnades de cloramfenicol. Alhora, també es farà una altra ressembla en plaques LB per conèixer la freqüència de transducció.

Material necessari:

- ON ATCC (salvatge).
- Lisat P22 (transductants).
- Plaques de petri amb cloramfenicol.
- Medi LB tou (líquid).
- Ringer.

Procediment:

1. En primer lloc es fan dilucions seriades (0, -2, -4, -6 i -8) del lisat P22 en MgSO_4 10mM. Per treballar els resultats, les mostres es sembraran en plaques utilitzant: medi LB + 100µl ATCC + 100µl de la dilució escaient. A partir del recompte de calbes de la dilució -8 es coneixerà la concentració de bacteriòfags de la mostra original del lisat, valor que tindrà ús en el punt 4 d'aquest procediment.

Dilució -8: 65 calbes.

$$pfu/ml = \frac{n^{\circ} \text{ calbes}}{\text{volum sembrat (ml)} \cdot \text{FDA}} = \frac{65}{0,1 \cdot 10^{-8}} = 6,5 \cdot 10^{10}$$

- Amb l'ON ATCC, es fa una ressebra en medi líquid del cultiu barrejant 400µl ATCC + 10ml LB tou.



Fig. 72 ON ATCC salvatge.



Fig. 73 Ressebra: 400µl ATCC + 10ml LB tou.

- El nou cultiu es posa a incubar a 37°C durant 30 minuts. Simultàniament es mesura la DO (550nm) fins que aquesta sigui de 0,4 (hi ha una concentració estimada de 10^8 cfu/ml), quan la soca ja es podrà infectar. Tot i això, prèviament cal sembrar 5ml d'aquest cultiu en una placa amb cloramfenicol per així verificar que es tracta d'una soca que no conté cap casset de resistència a l'antibiòtic. Aquesta placa rebrà el nom de Control.
- A continuació, es fan dilucions seriades (0, -2, -4, -6) del cultiu restant utilitzant en cada cas 990µl de Ringer i 990µl del cultiu seguint el mateix procediment esmentat en el punt 6.3.2.
- Per a la infecció, els fags P22 transductants s'han d'afegir a raó de MOI 10. El mot MOI representa l'acrònim de *multiplicitat d'infecció*. Aquest terme relaciona la proporció de partícules víriques infeccioses amb el número de cèl·lules infectades. Per exemple, si es tracta d'una MOI de 1, les cèl·lules es veuran afectades per un sol bacteriòfag (1 virus per bacteri). En aquesta situació, la MOI és de 10 així que la infecció serà de 10 virions per cada cèl·lula.

El valor de la MOI es determina dividint el nombre de fags que infectaran el cultiu entre la quantitat bacteriana a testar.

$$MOI = \frac{pfu/ml \cdot \text{volum (ml)}}{cfu/ml \cdot \text{volum (ml)}}$$

Partint de les dades que es disposen (pfu/ml, cfu/ml i volum cel·lular) es buscarà el volum víric que s'haurà d'aplicar al cultiu amb la següent equació:

Dades:

MOI = 10

pfu/ml (mostra original) = $6,5 \cdot 10^{10} \approx 10^{10}$

cfu/ml = DO de 0,4 (cultiu) $\approx 10^8$

volum bacterià = 0,1ml (que es sembrarà a les plaques)

$$10 = \frac{10^{10} \cdot V}{10^8 \cdot 0,1}$$

$$10 \cdot 10^7 = 10^{10} \cdot V$$

$$\frac{10^8}{10^{10}} = V$$

$$V = 0,01\text{ml} = 10\mu\text{l volum P22}$$

6. Tot seguit, es preparen les mostres que posteriorment es cultivaran en medis sòlids. Es pipeteja 0,1ml de la dilució 0 del cultiu crescut i es diposita en un tub amb LB tou, a continuació s'afegeixen els 10 μ l de P22 per a la infecció. La mescla s'aboca en 1 placa amb cloramfenicol per poder observar la quantitat de cèl·lules transductants que s'han format. Per tal de conèixer la concentració de cèl·lules viables (no s'han lisat) resultants de la infecció, es sembrarà una altra placa (que només porti medi LB) utilitzant els mateixos volums vírics i bacterians, però en aquest cas, els ml de soca es prendran de la dilució -6. Les dues plaques es deixen reposar 3 hores, durant les quals tindrà lloc la infecció i consegüentment el procés de transducció. Passat aquest temps, es posen a incubar a 37° durant la nit.

RESULTATS:



Fig. 74

Placa Control.

La placa mostra que la superfície del medi de cultiu és totalment homogènia, és a dir, no s'aprecia cap indicatiu que suggereixi el desenvolupament de colònies. Aquest fet permet verificar que el cultiu d'ATCC salvatge és sensible a cloramfenicol (Cm) ja que les cèl·lules no han crescut i, per tant, no presenten cap resistència que modifiqui la seva naturalesa.

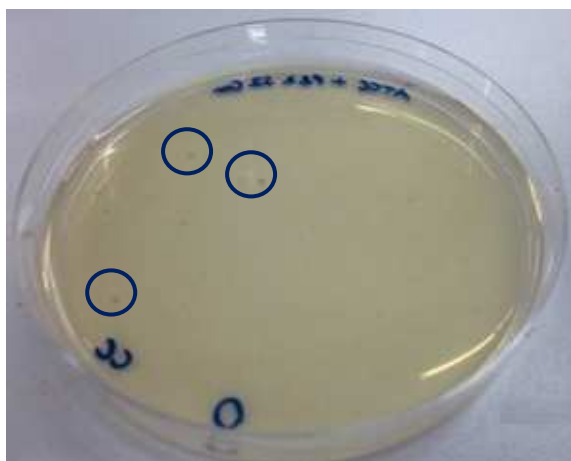


Fig. 75 Cultiu infectat sembrat en plaques amb cloramfenicol.

La sembra de la mostra infectada en plaques amb cloramfenicol donarà lloc al creixement únicament de les cèl·lules que hagin adquirit el casset de resistència. Per altra banda, tots els altres bacteris que no han format colònies, pot ser per dues causes: o bé han patit la transducció d'un fag que no incorporava el casset, i per tant continuen essent sensibles al cloramfenicol; o bé, s'han lissat després de la infecció. En aquesta imatge es pot apreciar lleugerament la formació de 3 colònies transductants per la infecció d'una dilució 0, el que indica que la concentració bacteriana és relativament alta. No obstant això, el nombre de transductants obtinguts és baix, per tant si la dilució hagués estat menys concentrada (com la -4 o la -6) no s'hagués pogut apreciar cap colònia. L'experiència s'ha realitzat en 2 ocasions més amb la intenció de comparar els resultats i poder estimar la freqüència de transducció del bacteriòfag P22 en aquesta experiència.

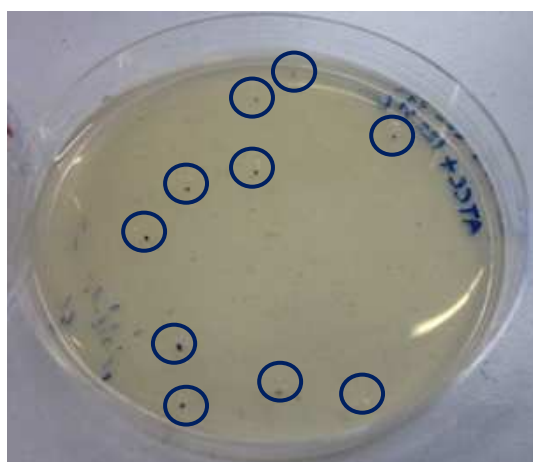


Fig. 76 Cultiu infectat sembrat en plaques LB. Han crescut un total de 10 viables.

La darrera fase de la transducció consisteix en analitzar la concentració de cèl·lules viables després de la infecció del cultiu. Entre aquestes, s'inclouen totes les que no han patit la lisi i que per tant s'han convertit en lisògenes havent o no incorporat el casset de resistència a cloramfenicol. Per aquest motiu, la sembra s'ha fet en plaques amb medis únicament de LB ja que sinó, no haurien crescut totes les viables. Com en la situació anterior, s'han sembrat 2 plaques més amb nous confluents per tal d'obtenir resultats més fiables.

Per finalitzar, a continuació es presenta una taula que recull els resultats de les altres transduccions elaborades.

Transducció	Nº viables (colònies)	Concentració de viables (cfu/ml)*	Transductants	Concentració de transductants (cfu/ml)•	Freqüència [□] (%)	Control (Cm)
1	10	$1 \cdot 10^8$	3	30	$3 \cdot 10^{-5}$	0 colònies
2	22	$2,2 \cdot 10^8$	2	20	$9,1 \cdot 10^{-6}$	0 colònies
3	67	$6,7 \cdot 10^8$	1	10	$1,5 \cdot 10^{-6}$	0 colònies

Fig. 77

$$\text{*Concentració de viables: cfu/ml} = \frac{\text{nº colònies}}{\text{volum sembra (0,1ml)} \cdot \text{FDA (10}^0\text{)}}$$

$$\text{•Concentració de transductants: cfu/ml} = \frac{\text{nº transductants}}{\text{volum sembra (0,1ml)} \cdot \text{FDA (10}^{-6}\text{)}}$$

$$\text{□Freqüència} = \frac{\text{concentració de transductants}}{\text{concentració de viables}} \cdot 100$$

Segons les dades representades a la figura 77, es pot demostrar que tot i que les freqüències de transducció hagin estat de valors molt mínims, la transducció és un dels principals mecanismes d'adquisició de resistències bacterianes ja que s'ha de tenir en compte que les cèl·lules transductants que s'hagin format, en un breu període de temps es replicaran donant lloc a una nova població microbiana.

7.3.4 Corba d'infecció

Una vegada s'ha obtingut el cultiu bacterià alterat genèticament, es posaran a prova les dues teràpies estudiades a partir de l'elaboració d'una corba d'infecció. Aquesta, és una tècnica que consisteix en sotmetre el cultiu bacterià a un seguit de circumstàncies perjudicials pel creixement cel·lular de manera que fent un control periòdic sobre la soca testada, es podran avaluar les diferents variables treballades i així definir, mitjançant un mètode comparatiu, quina de les dues tècniques

antibacterianes és més efectiva davant la proliferació d'un bacteri mutant o amb la informació hereditària manipulada.

Paràmetres a estudiar

Els paràmetres fixats que caldrà valorar són identificatius de cada teràpia i a més a més, presenten característiques distintives entre sí que permetran jutjar-los a partir de l'anàlisi dels resultats experimentals. Es tindran en compte les següents variables:

1. Variables independents

- **Tractament quimioteràpic.** Partint de l'estudi dels antimicrobians a nivell teòric, es pressuposa que els diferents agents utilitzats actuaran de la següent manera:

- Ampicil·lina: tot i que es classifica com un antibiòtic bactericida, es creu que no farà minvar notablement la concentració bacteriana inicial per la poca sensibilitat que *Salmonella typhimurium* presenta davant l'ampicil·lina (l'antibiograma ha demostrat que és resistent) independentment que el cultiu ja no sigui salvatge.
- Espectinomicina: l'addició d'aquest antibiòtic no tindrà un efecte rellevant quant a la destrucció del patogen atès que es tracta d'un agent bacteriostàtic i per tant el creixement cel·lular s'estancarà però no disminuirà.
- Estreptomycinina: a diferència de l'ampicil·lina, l'estreptomycinina a la qual la soca presenta una lleugera sensibilitat i a més és bactericida, provocarà un decreixement bacterià més pronunciat que el del primer antibiòtic.

- **Tractament fagoteràpic.** Es comprovarà l'acció dels bacteriòfags lítics envers els de caràcter lisogènic conjecturant prèviament els següents resultats:

- L1: aquest bacteriòfag, que és lític, donarà lloc a un important declivi en el cultiu cel·lular al cap de pocs minuts després de la infecció. En comparació

amb l'efecte que tindran els antibiòtics, es pensa que el del virió serà més perjudicial per als bacteris.

- LS: pel que fa a la infecció a partir de la mostra vírica lisogènica, es preveu que els resultats s'assimilin als de l'espectinomicina ja que ambdós components actuen de la mateixa manera: inhibeixen el creixement exponencial del cultiu.

2. Variable dependent

- **El creixement bacterià**, que és l'objecte d'estudi i dependrà de l'actuació de les diferents variables independents establertes.

Control

Com en qualsevol treball experimental, s'ha establert un blanc o control que servirà de referència per comparar i validar els resultats obtinguts. En aquest cas, amb l'objectiu de distingir correctament els efectes de les diverses infeccions, s'ha preparat una ampolla amb la qual no s'experimentarà, és a dir, no s'infectarà ni amb antibiòtics ni amb fags.

Material necessari:

- 9 ON ATCC IRΩCm.
- Antibiòtics (mostres líquides):
 - Ampicil·lina (Ap 200).
 - Espectinomicina (Spc 200).
 - Estreptomomicina (Str 200).
- Bacteriòfags:
 - Lisat L1.
 - Lisat LS.
- Espectrofotòmetre.
- Plaques amb agar nutritiu esterilitzat.
- Ringer.

Procediment:

- 1.** En primer lloc es prepara l'ampolla control que estarà formada per 10ml LB tou (com a medi de cultiu líquid) i 400µl ATCC IRΩCm. Tot seguit es posa a

incubar a 37°C i cada 60 minuts es mesura la DO (550nm). Tot i així després de la primera mitja hora i quan hagin transcorregut 150 minuts, caldrà fer una sembra en placa per comptabilitzar les cfu/ml de les dilucions -5 i -6.



Fig. 78 Ampolla control: 10ml LB + 400µl ATCC IRΩCm.

2. Els 8 ON restants s'utilitzaran per dur a terme les dues teràpies. Primerament, s'incubaran tots els cultius d'ATCC IRΩCm durant 30 minuts. Simultàniament, es van prenent mostres per mesurar la DO (550nm) a l'espectrofotòmetre.



Fig. 79 1000µl d'ATCC IRΩCm per mesurar la DO.

3. Quan els cultius estiguin a una DO (550nm) aproximada de 0,2, s'afegiran les respectives substàncies infectives. En el cas dels antibiòtics s'utilitzaran 50µl de cada tipus per infectar les corresponents ampolles (3) i pel que fa als exemplars fàgics, es partirà d'una MOI de 1 per calcular el volum víric que s'ha d'incorporar.

Dades:

MOI = 1

pfu/ml (mostres) $\approx 10^{10}$

cfu/ml = DO de 0,2 $\approx 10^8$

volum bacterià = 8ml

volum fàgic = ?

$$MOI = \frac{\text{pfu/ml} \cdot \text{volum (ml)}}{\text{cfu/ml} \cdot \text{volum (ml)}}$$

$$1 = \frac{10^{10} \cdot V \text{ fàgic}}{10^8 \cdot 8}$$

$$10^8 \cdot 8 = 10^{10} \cdot V \text{ fàgic}$$

$$V \text{ fàgic} = \frac{10^8 \cdot 8}{10^{10}}$$

$$V \text{ fàgic} = 8 \cdot 10^{-2} = 0,08\text{ml} = 80\mu\text{l}$$



Fig. 80 Ampolles infectades amb antibiòtic.



Fig. 81 Ampolles infectades amb LS (fag lisogènic).



Fig. 82 Ampolles infectades amb L1 (fag lític).

4. Una vegada s'hagin fet les infeccions, es deixen reposar els ON a temperatura ambient i al cap d'uns 5 minuts es mesura la DO (550nm) i es fan sembres en plaques amb agar per tal de comparar les colònies que forma la soca en iniciar-se la infecció i després de la mateixa.

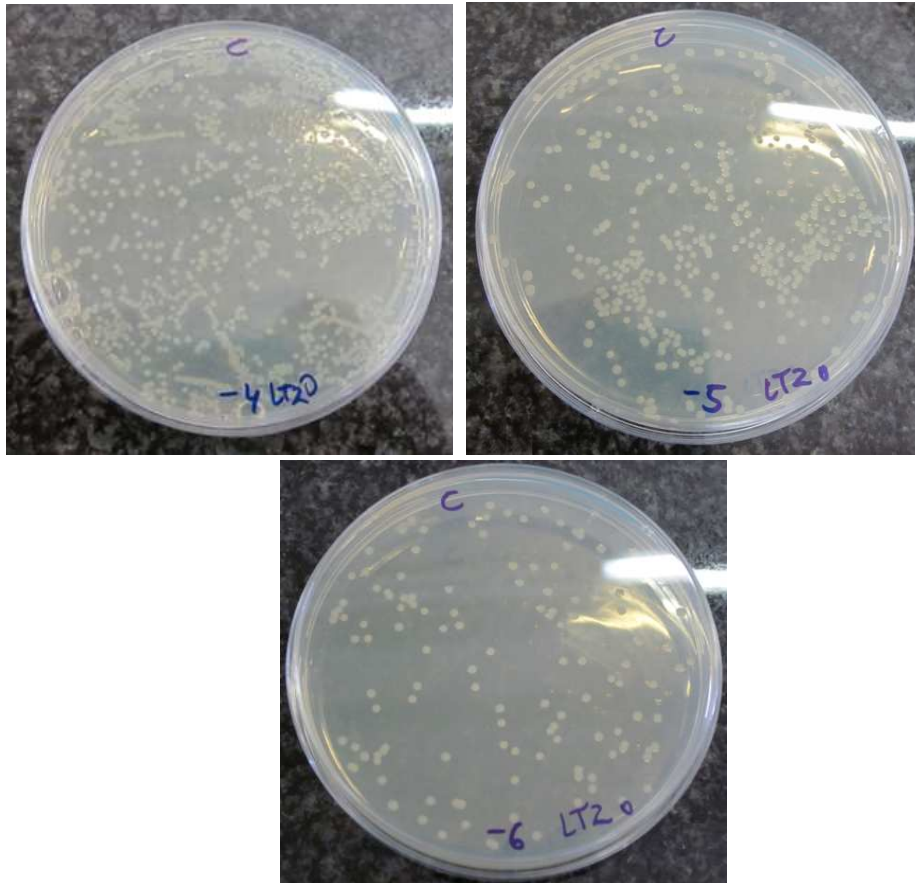
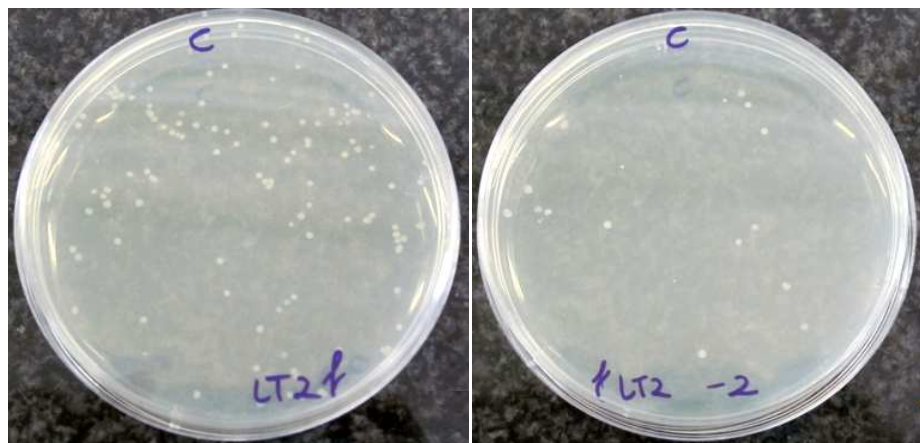


Fig. 83 Colònies formades en iniciar-se la infecció pel fag L1 (dilucions -4, -5 i -6).

5. A continuació, es tornen a incubar les ampolles observant la DO periòdicament cada 60 minuts.
6. En haver transcorregut 120 minuts després de l'inici de la infecció, l'experiment es considera finalitzat però prèviament es torna a fer una nova ressebra de cada cultiu.



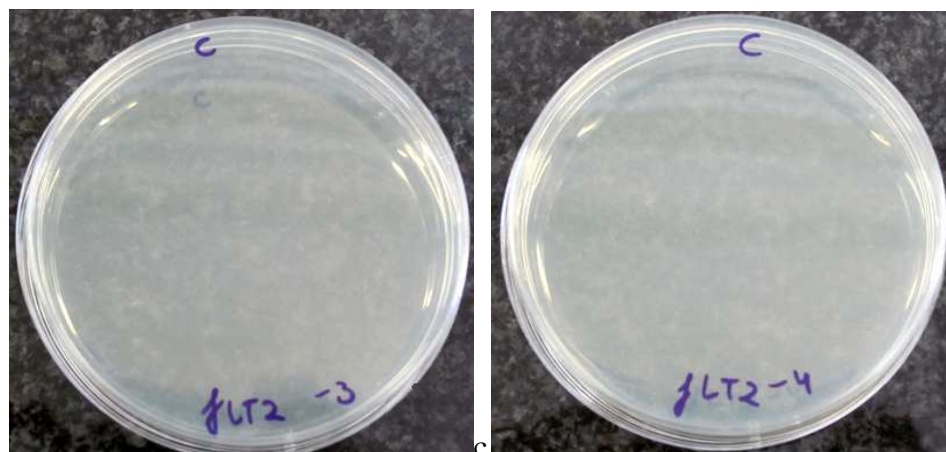


Fig. 84 Colònies formades en acabar la infecció pel fag L1 (dilucions 0, -2, -3 i -4).

RESULTATS:

L'extrapolació dels resultats es farà segons el seguiment de la DO (550nm), tal i com s'ha explicat en el procediment anterior, i el recompte directe de les colònies formades (viables) a les plaques que s'han sembrat a l'inici i al final de l'experiment.

En principi, les conclusions dels dos seguiments han de ser les mateixes ja que es tracta de processos que aporten informació paral·lela però amb la diferència que aquesta s'expressa de manera desigual. Si es verifica que els resultats en ambdós casos són similars, s'haurà demostrat que el procés experimental dut a terme en aquest treball és veraç.

Seguiment de la DO (550nm)

Els resultats obtinguts a partir de l'observació de la DO (550nm) s'exposen a la taula següent:

Temps real (min)	Temps després de la infecció (min)	Control	Antibiòtics			Fags lítics	Fags lisogènics
			Bactericides		Spc 200	L1	LS
			Ap 200	Str 200			
0		0,181	0,291	0,196	0,191	0,178	0,177
30	0	0,465	0,563	0,495	0,451	0,586	0,545
90	60	1,262	0,755	0,732	0,792	0,074	0,467
150	120	1,753	0,811	0,714	0,927	0,085	0,300

Fig. 85 Evolució de la DO (550nm).

Pel que fa als valors corresponents a la DO (550nm) dels bacteriòfags L1 i LS, aquests representen el nombre mitjà dels resultats obtinguts a les diferents repeticions realitzades, els quals es mostren a continuació:

Temps real (min)	Temps després de la infecció (min)	Fags lítics			
		L1	L1 (rèplica 1)	L1 (rèplica 2)	\bar{X}
0		0,175	0,172	0,187	0,178
30	0	0,616	0,517	0,624	0,586
90	60	0,067	0,072	0,083	0,074
150	120	0,077	0,086	0,091	0,085

Fig. 86 Evolució de la DO (550nm) en les repliques de la infecció pel fag L1.

Temps real (min)	Temps després de la infecció (min)	Fags lisogènics		
		LS	LS (rèplica 1)	\bar{X}
0		0,174	0,179	0,177
30	0	0,550	0,540	0,545
90	60	0,489	0,445	0,467
150	120	0,330	0,270	0,300

Fig. 87 Evolució de la DO (550nm) en les repliques de la infecció pel fag LS.

La taula permet observar de manera clara i distintiva com la infecció per un agent antibacterià afecta el creixement d'un cultiu microbià alterat. Tot i així, s'han confeccionat diversos gràfics que presenten les dades de forma visual per així interpretar amb més rigor les xifres obtingudes.

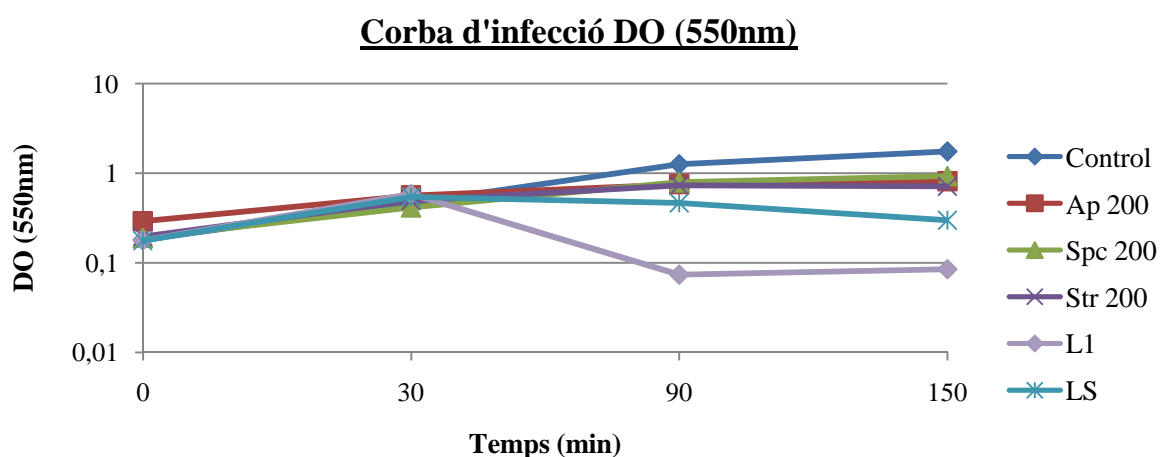


Fig. 88 Evolució de la DO (550nm).

Tenint com a punt de referència el desenvolupament que ha experimentat el control, es pot contemplar com per cada variable independent emprada la soca ha evolucionat de manera diferent. Alhora, l'observació del gràfic permet ratificar que les diferents infeccions dutes a terme s'han fet de manera correcta, ja que és a partir dels 30 minuts (inici de la infecció) quan la concentració bacteriana es modifica respecte la del control.

Primerament es farà la descripció del creixement del control per així poder comparar les diferents corbes i determinar quin és l'agent més eficaç.

Control: l'augment de la concentració cel·lular és gradual amb el temps ja que no se li ha aplicat cap element infectiu que interfereixi en el seu desenvolupament natural. S'intueix que la gràfica dibuixa una corba similar a la de qualsevol creixement microbià normal (*Fig. 36*), distingint una lleu fase de latència (compresa entre els 0 i els 30 minuts), una etapa exponencial amb pendent poc pronunciat (situada entre els 30 i els 90 minuts), culminant amb un llarg període de creixement estacionari (dels 90 als 150 minuts) que s'estabilitza entorn a una DO de 2.

Tot seguit, es diferenciaran el efectes dels agents que formen part del tractament quimioteràpic i el fagoteràpic adjuntant alhora les corresponents gràfiques que representen les corbes d'infecció segons l'anàlisi de la DO (550nm).

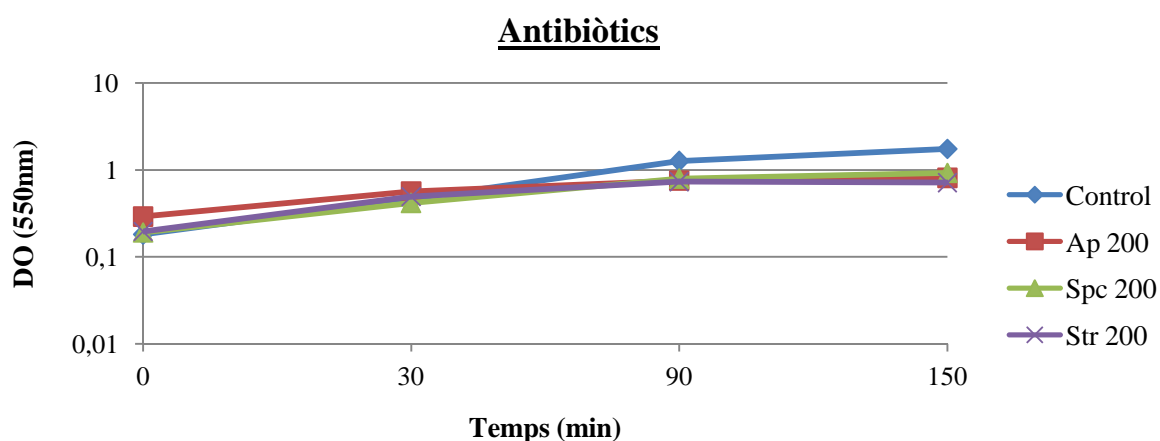


Fig. 89 Corba d'infecció (segons la DO) del tractament quimioteràpic.

Ampicil·lina (Ap 200): els valors de la DO (550nm) d'aquest antibiòtic bactericida han anat augmentant progressivament, és a dir, la infecció (produïda als 30 minuts) no ha provocat una disminució en la concentració bacteriana, sinó que el que ha fet és evitar que el creixement cel·lular es multipliqui de manera exponencial com en el cas del control. Cal esmentar, però, que encara que l'acció de l'ampicil·lina no s'ha basat en provocar la mort cel·lular, sí que ha tingut un efecte de reducció bacteriana ja que en el seu corresponent gràfic el valor de la DO en la fase estacionària és d'1 (aproximadament), quan en el control és de 2.

Espectinomicina (Sp 200): en el cas de l'espectinomicina, antibiòtic bacteriostàtic, es pot fer un balanç molt similar al de l'ampicil·lina ja que la corba d'infecció pràcticament segueix el mateix recorregut. Per tant es pot afirmar que aquest antibiòtic bacteriostàtic, com a tal, tampoc és letal per a la soca de *Salmonella typhimurium* genèticament modificada.

Estreptomicina (Str 200): la gràfica que formen els valors de la DO (550nm) de l'estreptomicina (antibiòtic bactericida) també és la mateixa que en els dos casos anteriors, però amb la petita diferència que entre els 90 i els 150 minuts, el cultiu experimenta un lleuger declivi que pot ser a causa del caràcter bactericida d'aquest agent, el qual es caracteritza per aturar el creixement produint la mort bacteriana.

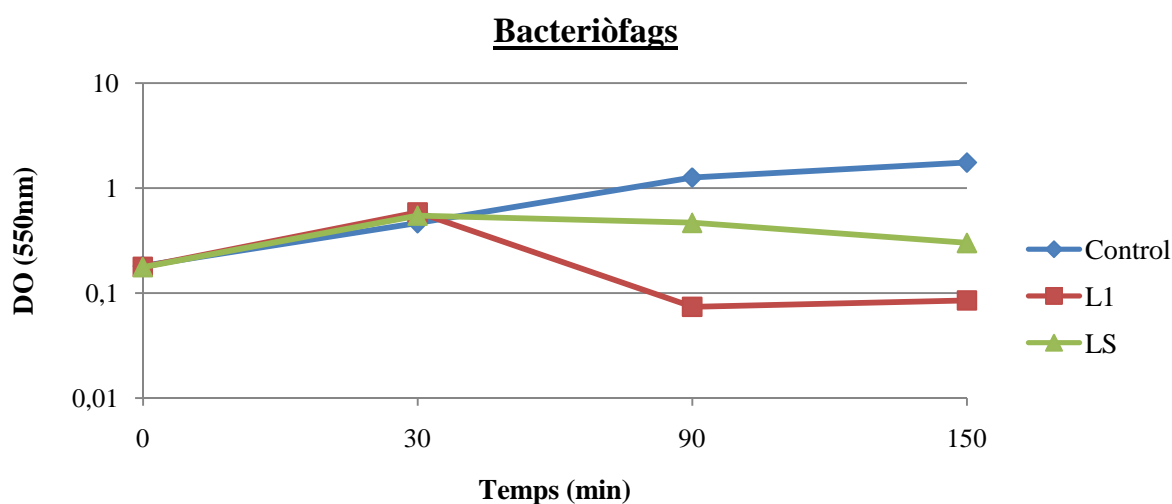


Fig. 90 Corba d'infecció (segons la DO) del tractament fagoteràpic.

L1: la corba d'infecció que forma aquest bacteriòfag lític és notablement diferent a les descrites anteriorment. En aquest cas s'aprecia notablement l'efecte de la infecció, en què a partir dels 30 minuts la DO descendeix en picat. L'explicació a aquest fet és que el caràcter lític d'aquest virus provoca que les cèl·lules es lisen i per tant la concentració bacteriana disminueixi. Finalment (dels 90 als 150 minuts) s'observa una fase d'estancament en què s'ha incrementat lleugerament la concentració. La DO assolida és aproximadament d'1, que en comparació amb la del control, és 20 vegades més petita.

LS: en el cas de la corba originada per aquest bacteriòfag lisogènic, es pot observar que respecte el control, els resultats de la infecció són positius ja que la DO final és de 0,3 (7 vegades més petita). Tot i així, la gràfica mostra que la disminució cel·lular no és tan ràpida ni tan acusada com en la situació del fag L1, sinó que els valors de la DO són molt similars i van disminuint successivament. Per tant, es pot corroborar que la infecció per bacteriòfags lisogènics no produeix la mort cel·lular de manera immediata.

Seguiment de les viables (recompte directe de les colònies)

Per facilitar l'extracció de conclusions, és de gran utilitat partir de l'anàlisi de les plaques sembrades en l'experiment, que permeten comptabilitzar el nombre de colònies que formen els bacteris al llarg de la infecció. Per tant, en aquest apartat la importància recaurà en observar els efectes destructius d'aquests agents antibacterians més que no pas en descriure el recorregut de cada infecció en particular, com s'ha fet anteriorment (DO). Aquests resultats diferiran lleugerament respecte els de la DO (550nm) ja que en deixar incubar els cultius 24 hores, no es podrà determinar exactament que la concentració cel·lular pertanyi als 30 o als 150 minuts de manera que en deixar un interval de temps més gran per mesurar el nivell de la infecció (en el cas de la DO eren segons i amb les viables són 24 hores), la variable pot finalitzar la infecció del bacteri i així, la quantitat de colònies obtingudes (cèl·lules que no s'han lisat) representarà un valor més real i rigorós.

La taula següent conté el nombre de colònies formades per cada dilució i a més a més, s'indica la concentració bacteriana (cfu/ml) assolida en haver transcorregut 120 minuts després de l'inici de la infecció.

Temps real (min)	Temps després de la infecció (min)	Control	Antibiòtics			Fags lítics			Fags lisogènics	
			Bactericides		Spc 200	L1	L1 (rèplica1)	L1 (rèplica2)	LS	LS (rèplica1)
			Ap 200	Str 200						
30	0	19 (-6) 142 (-5)	9 (-6) 98 (-5)	13 (-6) 101 (-5)	14 (-6) 105 (-5)	6 (-6) 89 (-5)	26 (-6) 242 (-5)	118 (-6)	19 (-6) 155 (-5)	19 (-6) 164 (-5)
150	120	193 (-6) $\approx 10^9$ cfu/ml	6 (-4) $\approx 10^5$ cfu/ml	24 (-4) $\approx 10^6$ cfu/ml	40 (-6) $\approx 10^8$ cfu/ml	20 (-4) 244 (-3) $\approx 10^6$ cfu/ml	21 (-4) 237 (-3) $\approx 10^6$ cfu/ml	114 (0) 19 (-2) $\approx 10^4$ cfu/ml	$\approx 10^7$ cfu/ml	$\approx 10^7$ cfu/ml

Fig. 91 Evolució de les viables durant la infecció.

De la mateixa manera que en el seguiment de la DO (550nm), s'han elaborat un seguit de gràfics per estimar els resultats de la manera més correcta possible. Aquests, en el seu eix d'abscisses (horitzontal) indicaran el període comprès entre els 30 i els 150 minuts (fase de la infecció) i en el corresponent eix d'ordenades (vertical), presentaran una escala basada en la numeració científica 1,00E+01 (el número que es troba davant la lletra E està multiplicat per 10, el qual s'ha d'elevat al valor que hi ha després de la lletra. En aquest exemple és $1 \cdot 10^1$). Així que per tal d'elaborar els gràfics esmentats, cal reformular la taula utilitzant la corresponent notació científica.

Temps real (min)	Temps després de la infecció (min)	Control	Antibiòtics			Fags lítics	Fags lisogènics
			Bactericides		Spc 200	L1	LS
			Ap 200	Str 200			
30	0	1,66E+08	9,40E+07	1,16E+08	1,23E+08	2,98E+08	1,75E+08
150	120	1,93E+09	6,00E+05	2,40E+06	4,00E+08	3,69E+05	1,00E+07

Fig. 92 Evolució de les viables expressada amb notació científica.

Els valors de la infecció per bacteriòfags sorgeixen de la mitjana efectuada a partir de les diferents rèpliques.

Temps real (min)	Temps després de la infecció (min)	Fags lítics			
		L1	L1 (rèplica 1)	L1 (rèplica 2)	\bar{X}
30	0	8,90E+07	2,51E+08	1,18E+09	2,98E+08
150	120	2,22E+06	2,24E+06	1,01E+04	3,69E+05

Fig. 93 Evolució de les viables de les rèpliques del fag L1.

Temps real (min)	Temps després de la infecció (min)	Fags lisogènics		
		LS	LS (rèplica 1)	\bar{x}
30	0	1,73E+08	1,77E+08	1,75E+08
150	120	1,00E+07	1,00E+07	1,00E+07

Fig. 94 Evolució de les viables de les repliques del fag LS.

Els gràfics que representen l'evolució de les colònies, a diferència dels que exemplifiquen la DO, es caracteritzen per presentar una forma lineal que denota clarament com es desenvolupa el procés infectiu. Es fan més visibles les desigualtats entre els compostos ja que s'aprecien les petites distincions que amb les corbes de la DO passen desapercibudes.

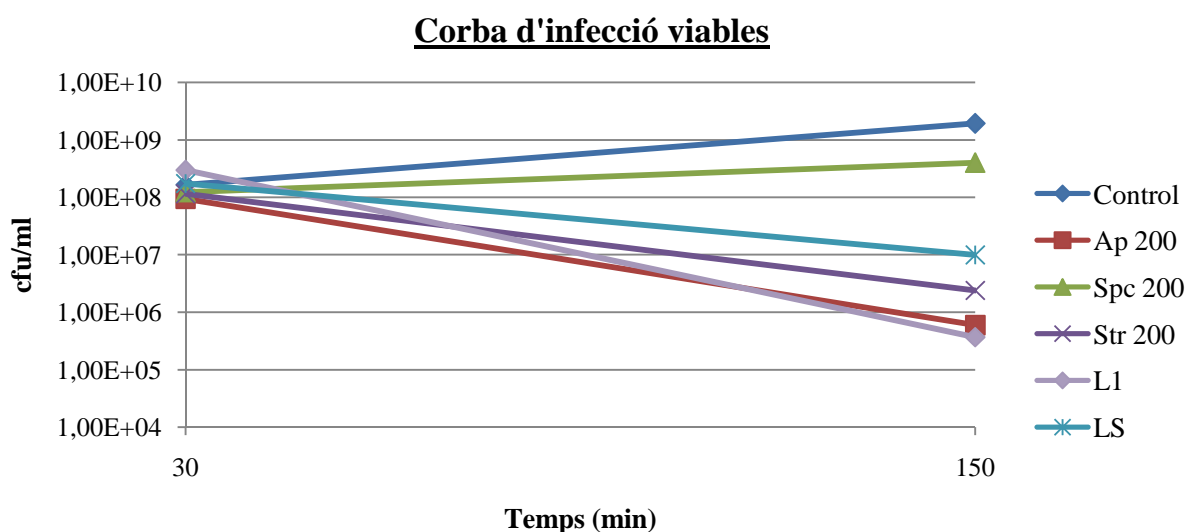


Fig. 95 Evolució de les viables.

Fent una observació general dels resultats obtinguts, s'aprecia clarament que en els diferents gràfics disminueix progressivament la concentració cel·lular en passar dels 30 als 150 minuts, aquest fet ratifica que totes les variables independents són compostos infectius per la soca bacteriana testada. Malgrat aquest tret comú, també hi ha dues situacions en què no es compleix aquesta tendència reductora. Una d'elles fa referència al volum control, que evidentment experimenta l'efecte contrari al que

es produeix en els altres cultius. A continuació es comentaran breument les corbes d'infecció obtingudes destacant les diferències més notòries que hi ha entre elles.

Control: el gràfic que representa l'evolució de la concentració bacteriana no infectada es caracteritza per créixer a mesura que passa el temps. Aquest resultat és el propi del creixement de qualsevol soca bacteriana ja que s'ha de tenir en compte que són organismes que augmenten exponencialment la concentració cel·lular pel mecanisme reproductiu que utilitzen (bipartició). A part de la forma que adquireix la corba, el nombre de colònies comptabilitzades al final (193) de l'experiment és notablement superior al de l'inici (19), el que verifica l'evolució anteriorment comentada.

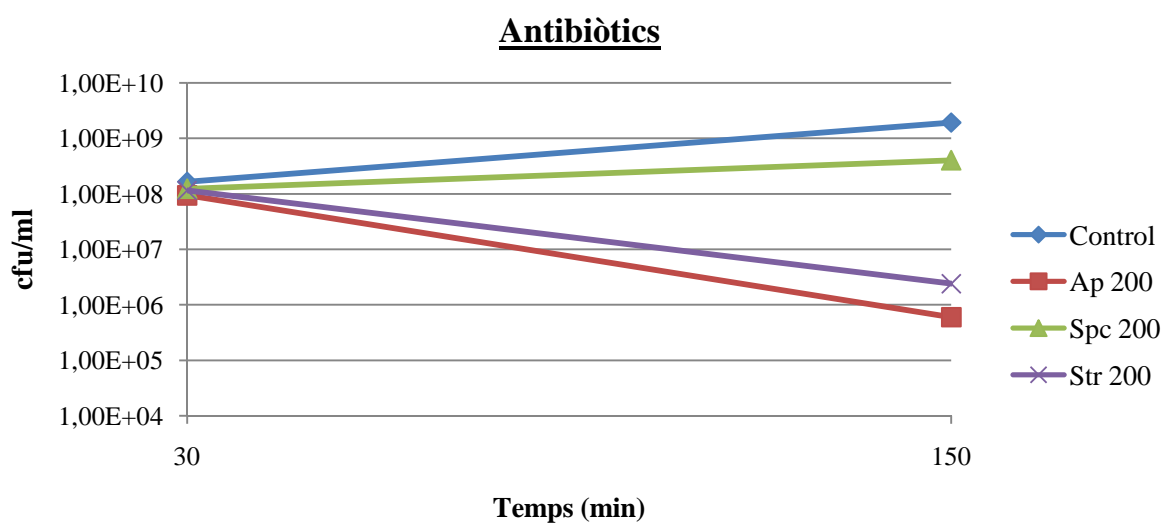


Fig. 96 Corba d'infecció (referida a l'evolució de les viables) del tractament quimioteràpic.

Ampicil·lina (Ap 200): les dades referents a la infecció per ampicil·lina, confirmen que aquest és un agent capaç de fer disminuir la concentració bacteriana ja que el cultiu testat passa de formar unes 9 colònies (dilució -6) a unes 6 (dilució -4) en finalitzar l'experiment. Tot i així, en contrastar aquests resultats amb els corresponents valors de la DO(550nm) s'observa que s'arriben a conclusions diferents segons es faci la valoració a partir de la DO o del comptatge de viables

perquè en el primer gràfic analitzat (DO), la corba que forma la infecció per ampil·lina queda per dalt de la corresponent a la de l'estreptomina i en aquest cas (viables) la gràfica de l'ampil·lina se situa per sota de la de l'estreptomina.

Una de les possibles causes que explicaria aquesta contradicció exemplifica el que s'ha esclarit a la primera part d'aquest apartat (pàgina 99). Des del punt de vista lògic, es podria deduir que segons els resultats de la DO(550nm) referents a aquests antibiòtics, el cultiu amb estreptomina per arribar a assolir una concentració bacteriana més baixa (0,714) que el d'ampil·lina (0,811) hauria de formar menys colònies i per tant donar lloc a una gràfica situada sota de la de l'ampil·lina però els resultats del comptatge de viables demostren que aquesta suposició no es compleix. Segons les afirmacions anteriors, en deixar els cultius incubar durant 24 hores, les infeccions respectives de cada antibiòtic finalitzen i s'aprecia quin dels dos destrueix una quantitat superior de cèl·lules. En aquest cas és l'ampil·lina i, per tant, es pot determinar que les diferències respecte la DO (550nm) són a causa de la rapidesa de la infecció la qual no és proporcional a l'eficàcia d'aquesta, fet que es veu reflectit en els dos antibiòtics testats ja que l'estreptomina duu a terme un procés infectiu més ràpid que el de l'ampil·lina (per això els valors de la DO són més baixos) però pel contrari lisa menys cèl·lules bacterianes.

Espectinomicina (Spc 200): en aquest gràfic es fa remarcable la condició bacteriostàtica de l'antibiòtic en qüestió, ja que tot i que la concentració bacteriana disminueix en relació amb el control, no se l'aconsegueix fer créixer sinó que es produeix la situació inversa, per aquest motiu la infecció comença amb unes 14 colònies (dilució -6) i finalitza amb 40 colònies (dilució -4). Per tant, de la mateixa manera que en la corresponent corba referida a la DO (550nm), un cultiu infectat per espectinomicina evoluciona paral·lelament al d'un sense alterar (control).

Estreptomicina (Str 200): l'evolució de la soca en haver estat infectada per aquest antibiòtic bactericida és l'esperada atès que s'aprecia com la corba redueix considerablement el seu pendent des dels 30 als 150 minuts. Es pot afirmar que l'evolució de la infecció per aquest antibiòtic és molt similar a la de l'ampicil·lina però en aquest cas, les concentracions cel·lulars són superiors (el cultiu d'estreptomicina forma 24 colònies al final, i el d'ampicil·lina en forma 6, que representa 4 vegades menys).

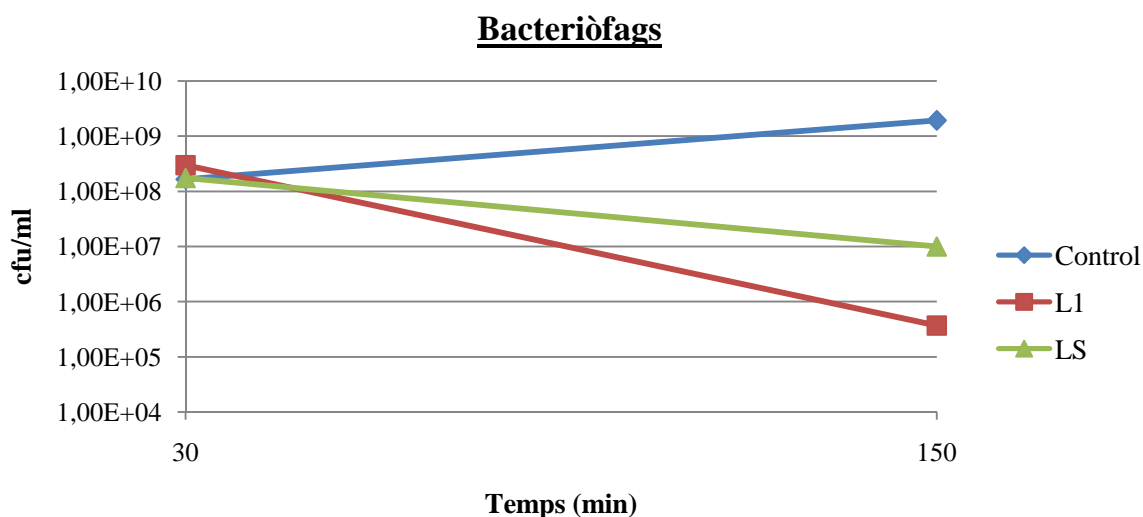


Fig. 97 Corba d'infecció (referida a l'evolució de les viables) del tractament fagoteràpic.

L1: les viables del cultiu infectat per aquest bacteriòfag donen lloc a una corba amb un pendent negatiu. És el factor més eficaç ja que aconsegueix fer disminuir la concentració 10^3 vegades (inicialment és de l'ordre de 10^8 i al final és de 10^5). Segons la imatge representada al gràfic, es pot afirmar que la seva evolució és molt semblant a la de l'ampicil·lina.

LS: la gràfica de la infecció per aquest bacteriòfag denota que la concentració final (10^7) es redueix respecte la concentració inicial (10^8), amb la diferència que aquesta disminució no és tan intensa en comparació amb la que experimenta el cultiu que conté fags L1. De fet, la seva evolució es pot equiparar amb la corresponent a

l'estreptomina (passa d'una concentració de 10^8 a 10^6) ja que ambdues segueixen trams equidistants. Aquesta igualtat no té lloc entre bacteriòfags lisogènics i antibiòtics bacteriostàtics perquè les partícules víriques d'aquesta índole acaben provocant la destrucció de la cèl·lula (sempre tenint en compte l'espècie de fag, la qual morirà més aviat o més tard) en etapes avançades de la infecció, en canvi, els antibiòtics bacteriostàtics només es limiten a mantenir una determinada concentració cel·lular sense fer-la minvar.

8. Conclusions

Una vegada s'ha dut a terme la part pràctica d'aquest treball i s'han analitzat detingudament els resultats obtinguts, es poden extreure les conclusions finals que verifiquen o falsegen les tesis inicialment plantejades.

Recordem, a grans trets, que el propòsit principal en què s'ha basat la recerca ha estat comparar el creixement d'una soca bacteriana resistent tractada, per una banda, amb antibiòtics i, per l'altra, amb virus bacteriòfags per així poder determinar quina de les dues teràpies és més eficaç alhora de combatre bacteris multiresistents.

Aquest apartat s'estructurarà en dues parts: en primer lloc es contrastaran les variables estudiades a la corba d'infecció amb les suposicions fetes abans d'infectar el cultiu i en segon lloc, s'especificarà i detallarà a nivell general el tractament més òptim responnent així la hipòtesi que sustenta l'eix d'aquest projecte.

Pel que fa a la utilització d'antibiòtics, les hipòtesis que no s'han verificat són les corresponents a l'ampicil·lina i l'estreptomicina. En el cas de l'ampicil·lina, els resultats obtinguts a partir del comptatge de viables (figura 95) demostren que és l'agent quimioteràpic més efectiu davant el creixement exponencial del bacteri i la resistència que aquest presenta a l'ampicil·lina no interfereix considerablement en la destrucció microbiana. Quant a l'estreptomicina, s'observa que el decreixement cel·lular no ha estat tant destacat com s'esperava malgrat que es tracta d'un compost de caràcter bactericida (figura 95). El darrer supòsit per contrastar, corresponent a l'espectinomicina, no es pot verificar completament ja que d'acord amb els resultats, el cultiu infectat s'estanca però la corba mostra que amb el pas dels minuts la concentració bacteriana continua augmentant lentament (figura 95).

Pel que fa a l'estudi dels virus bacteriòfags, la primera tesi (en la qual es remarca l'efecte destructiu del fag lític) s'ha verificat ja que en el cas de l'espècie lítica (L1) el cultiu cel·lular decreix accentuadament fins a arribar als nivells més baixos de concentració bacteriana (figura 96), però pel que fa a la segona (s'afirma que l'evolució de la infecció pel fag lisogènic serà semblant a la de l'espectinomicina), s'observa que l'evolució del creixement amb la variable lisogènica (LS) és diferent a la de l'antibiòtic bacteriostàtic atès que amb el component víric la concentració cel·lular s'acaba mantenint constant i a un nivell inferior (figura 94).

Segons aquestes constatacions, s'arriba a la conclusió que la teràpia fàgica és més eficient que la quimioteràpia pel tractament d'espècies bacterianes que han adquirit resistències antibiòtiques. Tot i així, en aquesta experiència la diferència entre les dues no es manifesta de manera molt determinant ja que segons els resultats del seguiment de viables (figura 94), l'ampicil·lina aconsegueix reduir els nivells bacterians a una concentració lleugerament superior a la del bacteriòfag lític. S'ha atribuït aquesta notòria similitud al fet que el procés infectiu d'un bacteriòfag lític equival al d'un antibiòtic bacteriostàtic ja que ambdós es basen en la lisi cel·lular.

L'aplicació de la fagoteràpia a més a més suposa un seguit d'avantatges a nivell social que l'afavoreixen en relació amb l'ús de nous antibiòtics com per exemple:

- L'elevada accessibilitat dels bacteriòfags els quals es localitzen allà on hi hagi poblacions bacterianes, per tant a llocs tan variats com el sòl, la flora intestinal dels animals, el clavegueram o l'aigua de mar.
- La rendibilitat econòmica, ja que la seva obtenció representa un baix cost.
- El perjudici nul per a la salut de l'organisme que pateix la infecció bacteriana gràcies a la seva especificitat que evita que malmeti altres cèl·lules.

- La rapidesa amb què té lloc el procés de curació perquè segons s’ha observat als gràfics de les diferents corbes d’infecció, la concentració de bacteris eradicada pel fag lític és superior a la de l’antibiòtic en el mateix interval de temps.
- La reducció del nombre de víctimes mortals causades per epidèmies bacterianes en països en vies de desenvolupament ja que si s’arribés a poder comercialitzar aquests virus en forma de medicament, per l’escàs finançament que es necessita, podria subministrar-se a un major percentatge de població afectada en comparació amb l’antibiòtic convencional.
- La baixa probabilitat de les cèl·lules bacterianes per desenvolupar mutacions.

Des del meu punt de vista actualment ens trobem davant d’una adversitat potencial perquè cada dia es fa més latent la quantitat de resistències en espècies bacterianes responsables de malalties tan comunes com la pneumònia, al primer món, o el còlera, al tercer món. Aquest estudi demostra, encara que sigui a petita escala, que una de les possibles solucions a aquesta situació ofereix un ampli ventall d’avantatges que s’haurien de tenir en compte per impulsar aquest tipus d’investigació, fins ara poc representativa. Per això, crec fermament en la viabilitat de traslladar aquest senzill projecte a un àmbit d’estudi més ampli i complex utilitzant la tecnologia i l’equip científic adequat.

Annex

GRUP ANTIBIÒTIC	EFFECTE PRIMARI	MECANISME D'ACCIÓ	ANTIBIÒTICS DERIVATS	ESPECTRE	EFFECTES SECUNDARIS
Inhibició de la síntesi de la paret cel·lular					
Penicil·lina	Bactericida	Impedeixen la formació d'enzims que participen en l'encreuament de cadenes de peptidoglicà.	▪Penicil·lina ▪Meticil·lina	Reduït (idoni contra gram-positius)	Reaccions al·lèrgiques (diarrea, anèmia, urticària, nàusees)
			▪Ampicil·lina	Ampli (idoni contra gram-positius i alguns gram-negatius)	
Cefalosporina	Bactericida	Igual que l'anterior.	▪Cefalotina ▪Cefoxitina	Ampli (idoni contra gram-positius i alguns gram-negatius)	Reaccions al·lèrgiques, tromboflebitis ⁶⁵ , lesions renals
Inhibició de la síntesi de proteïnes					
Tetraciclina	Bacteriostàtic	S'adhereixen a la subunitat petita ⁶⁶ del ribosoma interferint directament en la producció de proteïnes i causant la lectura errònia del RNA missatger.	▪Oxitetraciclina	Ampli (idoni contra gram-positius i gram-negatius)	Sordesa, mareig, nàusees, reaccions al·lèrgiques

⁶⁵ Inflamació al·lèrgica o química de la paret venosa, seguida de la formació d'un trombe adherit a aquesta.

⁶⁶ Els ribosomes estan formats per dues parts: la subunitat gran i la subunitat petita. Ambdues en unir-se permeten la traducció de la cadena de RNA missatger i, per tant, la formació de proteïnes.

Macròlid	Bacteriostàtic	S'uneixen a la subunitat gran del ribosoma per inhibir la prolongació de la cadena peptídica ⁶⁷ durant la síntesi de la proteïna.	<ul style="list-style-type: none"> ▪Eritromicina ▪Clindamicina 	Ampli (idoni contra gram-positius aerobis i anaerobis i alguns gram-negatius)	Irritació gastrointestinal, decoloració dental, lesions hepàtiques i renals
Cloramfenicol	Bacteriostàtic	Igual que l'anterior.	Cloramfenicol	Ampli (gram-positius i gram-negatius)	Disminució de l'acció de la medul·la òssia, reaccions al·lèrgiques
Inhibició de la síntesi d'àcids nucleics					
Quinolona	Bactericida	Inhibeix la DNA girasa i la topoisomerasa ⁶⁸ , bloquejant la replicació del DNA i el procés de transcripció ⁶⁹ .	<ul style="list-style-type: none"> ▪Norfloxacina 	Reduït (idoni contra gram-negatius)	Tendinitis, convulsions, reaccions al·lèrgiques
Rifampicina	Bactericida	Inhibeix la RNA polimerasa ⁷⁰ .	<ul style="list-style-type: none"> ▪Rifampicina ▪Rimpin 	Reduït (idoni contra el gènere <i>Mycobacterium</i> i alguns gram-positius)	Nàusees, vòmits, diarrea, fatiga, anèmia, somnolència

⁶⁷ Polímer format per una seqüència d'aminoàcids que formaran la proteïna.

⁶⁸ La DNA girasa i la topoisomerasa són enzims que actuen per replicar el DNA.

⁶⁹ Moment de l'expressió gènica en què les seqüències de DNA són copiades a una cadena de RNA missatger per poder obtenir les proteïnes.

⁷⁰ Enzim capaç de polimeritzar les cadenes de RNA missatger a partir de la lectura de la molècula de DNA.

10. Bibliografia

Llibres

- INGRAHAM, John L.; INGRAHAM, Catherine A.: *Introducció a la Microbiologia*, Editorial Reverté, S.A., Barcelona, 1999.
- MADRID, Cristina; FRIAS, Jorge; GRIFOLL, Magdalena; MERINO, Susana; PINTÓ, Rosa M.; SOLANAS, Anna M.: *Guia per a les pràctiques de microbiologia*, Edicions de la Universitat de Barcelona, Barcelona, 1997.
- WALSH, Christopher: *Antibiotics (actions, origins, resistance)*, ASM Press, Washington, DC, 2003.
- WILLEY, Joanne M.; SHERWOOD, Linda M.; WOOLVERTON, Christopher J.: *Microbiología de Prescott, Harley y Klein, séptima edición*, The McGraw-Hill Companies, Madrid, 2008.

Articles

- ARIZA, Luis Miguel: “Enzibióticos, los últimos bactericidas”, El País, 10 de noviembre de 2007, pàg. 7.
- GARCÍA LÓPEZ, Rubén: “Las enzimas líticas fágicas (enzibióticos) como agentes antimicrobianos”, Revista Española de Quimioterapia, número 1, 2005, pàg. 84.
- HERMOSO, Juan A.; GARCÍA, José L.; GARCÍA, Pedro: “Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics”, Current Opinion in Microbiology, número 10, 1 de desembre de 2007, pàg. 1-12.
- THIEL, Karl: “Old dogma, new tricks – 21st Century phage therapy”, Nature biotechnology, número 1, gener del 2004, pàg. 31-36.

Webgrafia

- <http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/programa.htm#biblio>
- http://issuu.com/jcarmonaespinoza/docs/maquetat_-_la_cel_lula_10-9-06
- http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Virologia/Documentos/Cd/Virologia%20%20Univ%20%20Sevilla/Leccion4_0708.pdf
- <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>
- http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/43/html/sec_6.html
- <http://www.scribd.com/doc/15488418/Aislamiento-de-bacteriofagos-microbiologia>
- <http://pathmicro.med.sc.edu/Spanish/chapter6.htm>
- <http://copublications.greenfacts.org/es/biocidas-resistencia-antibioticos/index.htm#il1>