

La resistència als antibiòtics i altres substàncies antimicrobianes per part dels bacteris.



Primer agrair a la meva professora de treball de recerca Lourdes Salis, per ajudar-me en la recerca bibliogràfica en el marc teòric i per orientar-me, aconsellar-me en el procés del treball de camp. També donar les gràcies al CDECT per proporcionar-me tot el material necessari i orientació per dur a terme la part pràctica al laboratori.

*“La ciència és l'ànima de la prosperitat
de les nacions i la font de
vida de tot progrés”.*

(Louis Pasteur)

ÍNDEX

MARC TEÒRIC:

0. INTRODUCCIÓ	pàg7 i 8.
1. HISTÒRIA	pàg9.
2. QUÈ SÓN ELS BACTERIS	pàg10.
2.1 ARQUEOBACTERIS	pàg10.
2.2 EUBACTERIS	pàg10, 11 i 12.
3. L'ESTRUCTURA BACTERIANA	pàg13.
3.1 PART EXTERNA	pàg13.
3.1.1 Càpsula bacteriana	pàg13 i 14.
3.1.2 Paret bacteriana	pàg14 i 15.
3.1.3 Membrana plasmàtica	pàg16.
3.2 PART INTERNA	pàg17.
3.2.1 Ribosomes	pàg17.
3.2.2 Inclusions	pàg17.
3.2.3 Vesícules gasoses	pàg17.
3.2.4 ADN bacterià	pàg18.
3.3 ATRES ESTRUCTURES EXTERNES DELS BACTERIS	pàg18.
3.3.1 Els flagels	pàg18 i 19.
3.3.2 Pèls i fimbries	pàg19.
4. FISIOLOGIA BACTERIANA	pàg20.
4.1.FUNCIÓ DE NUTRICIÓ	pàg20.
4.2.DIFERENTS VIES METABÒLIQUES DELS BACTERIS	pàg21.
4.3.FUNCIÓ DE RELACIÓ	pàg21.

4.4. FUNCIO DE REPRODUCCIO	pàg21.
4.5. FENOMENS DE PARASEXUALITAT	pàg22 i 23.
5. SERRATIA MARCESCENTS	pàg24.
6. MICORCOCCUS LUTEUS	pàg25.
7. RESISTÈNCIA DELS BACTERIS ALS ANTIBIÒTICS	pàg26.
7.1. QUÈ SÓN ELS ANTIBIÒTICS?	pàg26.
7.2. ANTIBIÒTICS BETA LACTÀMICS	pàg27 i 28.
8. QUE SÓN LES SUBSTÀNCIES BIOCIDES?	pàg29.
8.1. TIPUS DE BIOCIDES	pàg29.
8.2. CARACTERÍSTIQUES DELS BIOCIDES	pàg29 i 30.
9. QUÈ SÓN ELS ANTISÈPTICS I DESINFECTANTS?	pàg31.
9.1. FACTORS QUE INTERFEREIXEN EN LA POTÈNCIA D'UN DESINFECTANT	pàg31.
9.2. TIPUS DE DESINFECTANTS	pàg31 i 32.
10. QUÈ SÓN I COM ACTUEN EL TRICLOSAN, ETANOL I ELS ANTIBIÒTICS D'AMPLI ESPECTRE?	pàg33 i 34.
11. CAUSA DE LA RESITÈNCIA DELS BACTERIS ALS ANTIBIÒTICS	pàg35, 36, 37 i 38.
12.COM FER UN BON ÚS D'UN ANTIBIÒTIC?	pàg39.

TREBALL DE CAMP:

13. INTRODUCCIÓ	pàg40.
14. OBJECTIUS	pàg40.
15. MATERIAL I EQUIPAMENT	pàg41 i 42.
16. PREPARACIONS PRÈVIES A L'INICI	pàg43.
16.1. DISSOLUCIONS.....	pàg4.
16.1.1. Dissolució de Triclosan	pàg43 i 44.
16.1.2. Dissolució alcohol etílic	pàg44.
17. PROCEDIMENT I EXECUSIÓ DE L'EXPERIÈNCIA.....pàg45, 46, 47, 48, 49 i 50.
18. PAUTES PER REDUIR EL RISC DE CONTAMINACIÓ	pàg51.
19. RECOLLIDA DE DADES I GRÀFICS	pàg52, 53, 54, 55, 56, 57 i 58.
20. CONCLUSIONS I ANÀLISIS DE DADES	pàg59, 60, i 61.
19. BIBLIOGRAFIA	pàg62, 63 i 64.
20. GLOSSARI	pàg65.

0. INTRODUCCIÓ:

La resistència dels bacteris al antibiòtics i altres substàncies antimicrobianes és un problema d'actualitat que ens pot arribar a afectar d'una manera molt greu, ja que la rapidesa en que sorgeixen els microorganismes multi resistents no és igual a la velocitat en que sorgeixen nous antibiòtics i això provocarà a la llarga que no hi hagi nous antibiòtics per tractar a pacients amb malalties infeccioses greus.

Aquest treball era una de les opcions proposades per el Centre de Documentació i Experimentació en Ciències i Tecnologia (CDECT) i suggerit com un treball de recerca per la meva tutora Lourdes Salis.

La motivació per la qual vaig escollir aquest treball és perquè està dins d'un dels temaris de biologia de segon de batxillerat i és una de les assignatures que més m'agrada. A part d'això, vaig escollir aquest treball perquè la recerca d'informació em sembla interessant i d'actualitat ja que es un fet que podria afectar-nos amb el pas del temps. També em va semblar una bona proposta perquè la part pràctica es basa en el treball al laboratori i és una experiència didàctica i entretinguda ja que em permetrà familiaritzar-me amb el material i funcionament del laboratori.

El treball està estructurat en tres parts en les quals dues formen part del marc teòric i l'última forma part del treball de camp. En primer lloc s'expliquen els diferents tipus de bacteris, les seves parts i fisiologia i en segon lloc s'explica què són els antibiòtics, agents antimicrobians i la resistència bacteriana. Finalment en tercer lloc es troba el treball de camp, que és la demostració de l'

hipòtesi “pot ser que els bacteris desenvolupin resistència a mesura que es van posant en contacte amb antibiòtics o biocides” a partir de la pregunta, augmenta la probabilitat d’obtenir bacteris amb el gen de resistència a mesura que es van posant en contacte amb antibiòtics o altres substàncies antimicrobianes com l’alcohol o el Triclosan?.

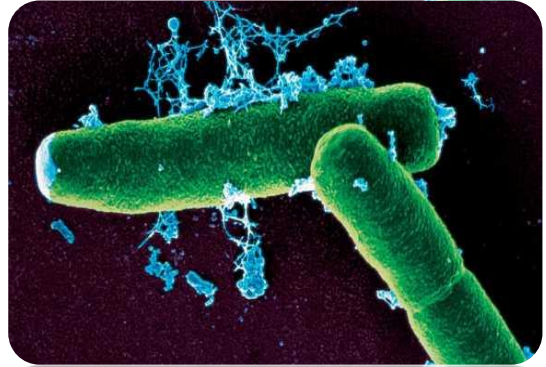
El treball de camp consisteix en una pràctica on es demostra la resistència del *Micrococcus luteus* i *Serratia marcescens* a l’antibiòtic d’ampli espectre CIPROFLOXACIN i dos agents antimicrobians, el Triclosan un potent biocida i l’alcohol o etanol, un antisèptic. Això es fa a partir d’un cultiu mare i unes plaques de Petri mesurant la zona d’inhibició que s’obté aplicant els diferents tractaments amb discos de paper de filtre de 6mm.

Un dels primers problemes que he tingut en la part pràctica del treball, és que els materials, en concret els discos de paper de 6mm per a realitzar l’experiència van arribar massa tard i no he acabat de realitzar el meu treball com m’agradaria perquè hagués volgut fer moltes més proves al laboratori, es a dir, realitzar més sèmbres dels dos tipus de bacteris, però això hagués requerit molts més dies de treball al laboratori i per falta de temps només he fet les suficients sèmbres de *Serratia marcescens* i *Micrococcus luteus* com per constatar que la zona d’inhibició disminueix i que per tant existeix una resistència.

Els segon problema que he tingut en la part pràctica del treball és que la bàscula de precisió no podia mesurar quantitats de producte molt petites i així em vaig haver d’adaptar al material que hi havia al laboratori.

1. HISTÒRIA:

Antony van Leeuwenhoek al 1.623 va ser un dels primers descobridors dels bacteris i el primer en observar-los utilitzant un microscopi format per una lent i dissenyat per ell mateix



↑ Imatge d'un bacteri. Font:granplaneta.com

Al 1.828 *Ehrenberg* va anomenar a aquells

éssers amb una paraula grega, bacteris, que en català vol dir petit bastó.

Més tard *Louis Pasteur* i *Robert Koch* van relacionar els bacteris amb diferents malalties considerant-los com a patògens. Així els bacteris van ser classificats com un grup totalment separat a la resta dels altres organismes i *Woese* finalment els va classificar en dos tipus de bacteris, els *Eubacteris* i els *Arqueobacteris*.

2. QUÈ SÓN ELS BACTERIS?

Els bacteris són uns organismes unicel·lulars¹, procariotes² que no tenen un nucli diferenciat i en els quals l'ADN està situat en el citoplasma³.

Es classifiquen en dos tipus, els Eubacteris i els Arqueobacteris.

2.1. Els Arqueobacteris:

Els Arqueobacteris són bacteris primitius que viuen en hàbitats semblants als de la terra primitiva, com ambients amb temperatures més elevades que el punt d'ebullició de l'aigua o medis amb una concentració de sal molt elevada. Els Arqueobacteris són més antics que els Eubacteris, dos exemples d'aquest tipus de bacteris són el *Pyrococcus furiosus* i l'*Halobacterium*.



2 Imatge arqueobacteris Font: es.wikipedia.org

2.2. Els eubacteris:

Els Eubacteris són organismes procariotes molt simples ja que tenen poques estructures internes i quatre formes externes i mesuren entre 1 i 10 micres⁴.



3 Imatge Eubacteris. Font: tecnicoenfermeria.com

¹ que consta d'una sola cèl·lula, la qual fa totes les funcions dels éssers vius.

² cèl·lula sense nucli diferenciat, de manera que el material genètic no és separat de la resta del citoplasma per una membrana.

³ espai que delimita la membrana plasmàtica.

⁴ $1 \mu\text{m} = 10^{-6} \text{m} = 10^{-3} \text{mm}$

Es diu que són uns organismes molt antics perquè s'han trobat bacteris de fa 3.500 milions anys i dels quals podem trobar més de 2.000 espècies diferents.

Els bacteris són els organismes més petits que tenen tots els elements necessaris i dispositius metabòlics per a l'obtenció i transformació de matèria en qualsevol medi (terrestre o aquàtic). Són organismes indispensables per al manteniment i equilibri ecològic ja que participen en els cicles biogeoquímics⁵ que permeten el reciclatge de la matèria a la biosfera gràcies a les seves diferents funcions de nutrició.

Hi ha quatre tipus de bacteris a nivell morfològic: Els bacils, els cocs, els espirils i els vibrions.

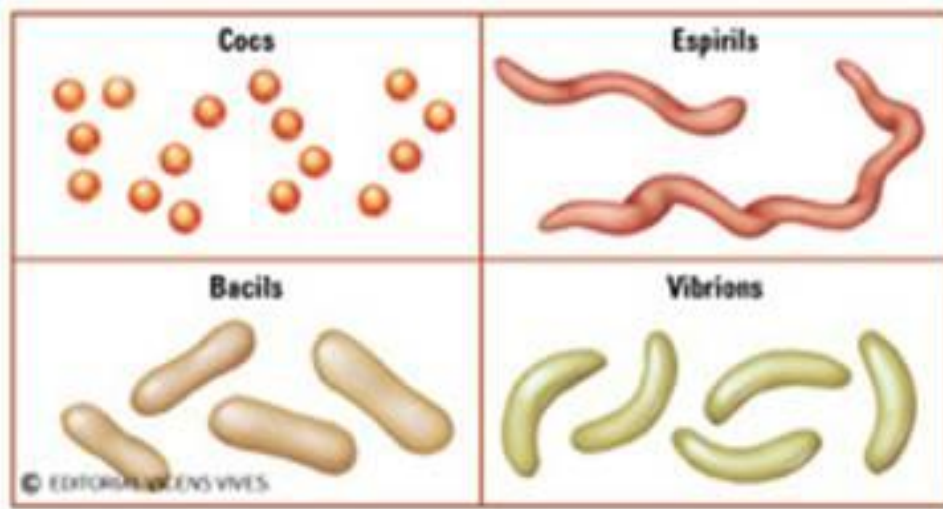
Els bacils són els bacteris amb forma allargada i que viuen en medis amb un nivell baix de nutrients.

Els cocs són organismes amb una forma esfèrica que tenen poca relació amb l'exterior i viuen en medis rics en nutrients. Aquests tipus de bacteris són molt resistents ja que es transmeten a través de l'aire i poden ser patògens⁶.

Els espirils i vibrions tenen forma d'hèlix i viuen en medis viscosos. La majoria tenen un diàmetre petit, travessen fàcilment les mucoses i són patògens en contacte directe.

⁵ és un circuit o ruta per la qual un element químic o molècula es mou a través d'un ecosistema i és recicla.

⁶ bacteris que provoquen malalties.

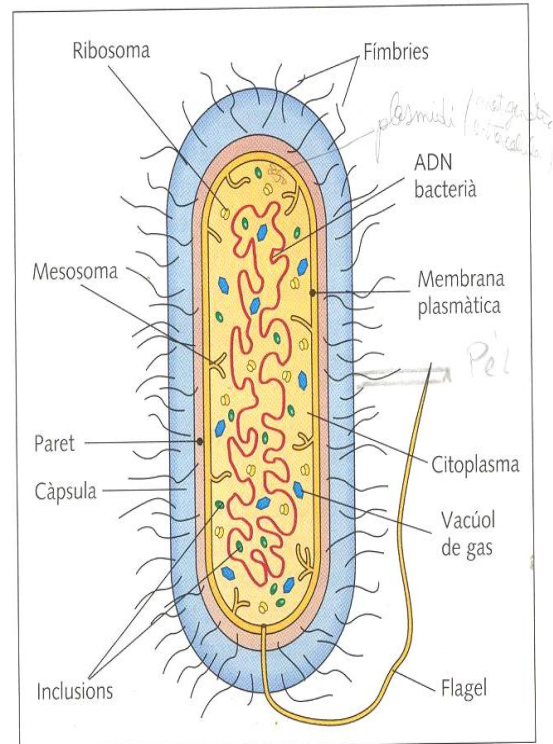


4 Imatge bacils, cocs, espirils i vibrions. Font: apuntesauxiliarinfermeria.blogspot.com

3. L'ESTRUCTURA BACTERIANA:

Els bacteris estan formats per les següents parts:

- La part externa que està formada per una paret bacteriana, una membrana plasmàtica i quan es troben en formes infectives també poden formar una càpsula bacteriana.
- La part interna està formada per un citoplasma en el qual es troba el hialoplasma o citosol⁷ on estan immersos els ribosomes i inclusions i finalment per l'ADN bacterià.



3 Morfologia general d'un bacteri.

5 Dibuix parts d'un bacteri. Font: diapositives de classe "Els microorganismes"

3.1. Part externa:

3.1.1. Càpsula bacteriana:

És una capa gelatinosa d'un gruix d'uns 100 a 400 Å⁸ rica en glúcids⁹ com l'àcid urònic, l'àcid glucurònic, l'acetilglucosamina i glicoproteïnes, que es forma en els bacteris patògens.



6 Imatge bacteri encapsulat. Font: diapositives de classe "Els microorganismes"

⁷ porció líquida del citoplasma

⁸ angstrom: $1\text{Å}^0 = 1 \times 10^{-10} \text{m}$

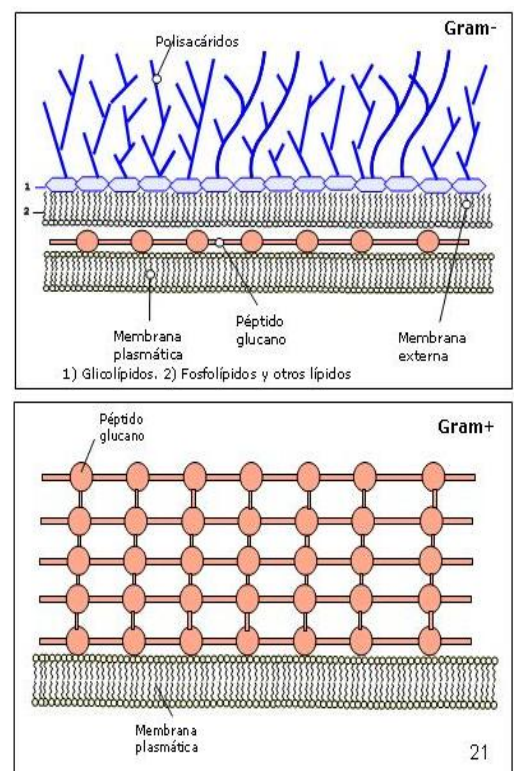
⁹ biomolècules orgàniques formades per carboni hidrogen i oxigen, formats per monòmers anomenats monosacàrids de fórmula empírica $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O}_n$.

Les diferents funcions de la càpsula bacteriana són la regulació d'intercanvi d'aigua, ions¹⁰ i substàncies nutritives amb el medi extern.

Aquesta capa és rica en aigua i protegeix al bacteri de la deshidratació creant-li una resistència en cas de dessecació del medi i a més permet la formació de colònies. També és un mitjà de defensa front a bacteriòfags¹¹, anticossos¹² i la fagocitosi¹³ que poden reconèixer el bacteri per destruir-lo.

3.1.2. Paret bacteriana:

La paret bacteriana recobreix el bacteri donant-li rigidesa i forma davant les variacions de pressió osmòtica¹⁴, regula el pas dels ions com a membrana semipermeable¹⁵, té un gruix entre uns 50 a 100 Å⁰ i és molt resistent als antibiòtics. Els components fonamentals d'aquesta paret són peptidoglicans o mureïnes, formades per anells de polisacàrids enllaçats amb oligopèptids. Segons l'estructura d'aquesta paret i un procés anomenat tinció de Gram



7 Dibuix paret bacteri Gram+ i -. Font: diapositives de classe "Els microorganismes"

¹⁰ àtom o grup d'àtoms que tenen una càrrega elèctrica deguda a la pèrdua (ió positiu) o a la captura (ió negatiu) d'electrons.

¹¹ virus paràsit específic de bacteris als quals causa la lisi en multiplicar-se en llur citoplasma.

¹² glicoproteïnes de tipus globular solubles a la sang o altres fluids corporals i que són utilitzats pel sistema immunitari per identificar i neutralitzar elements estranys al cos, com ara bacteris, virus o paràsits.

¹³ globus blancs que protegeixen el cos ingerint bacteris o cossos nocius.

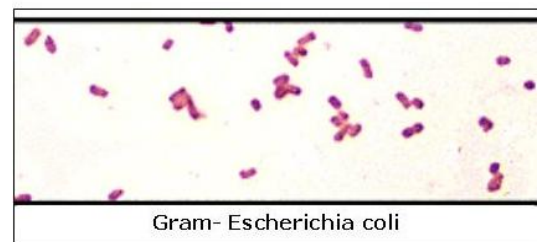
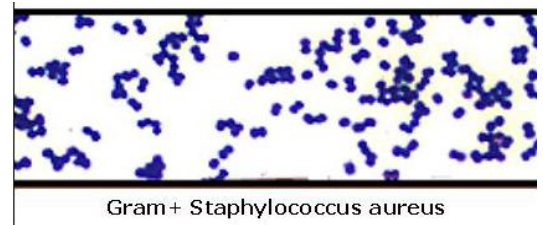
¹⁴ diferència de pressió que hi ha entre dues dissolucions de concentracions diferents separades per una membrana semipermeable i que assoleixen finalment un equilibri entre elles, ja que es deixa passar més o menys dissolvent per la membrana semipermeable d'una dissolució a l'altre fins que les dues assoleixen la mateixa concentració.

¹⁵ membrana formada per una bicapa lipídica que delimita la cèl·lula i que només deixa passar certes substàncies segons la pressió osmòtica, la concentració i la temperatura.

podem diferenciar dos tipus de bacteris:

- Els Gram positius, els quals la seva paret és monostratificada i està formada per una capa gruixuda de peptidoglicans anomenats mureïna, a la qual s'uneixen proteïnes,¹⁶ polisacàrids¹⁷ i àcids teïcoics¹⁸.
- Els Gram negatius són els que tenen una paret biestratificada, amb una capa basal fina de peptidoglicans en la qual hi ha una membrana externa constituïda per una doble capa lipídica¹⁹ amb proteïnes situades cap a l'exterior.

La tinció de gram és un mètode per distingir els bacteris gram positius i negatius. És un procés en el qual els bacteris es tenyeixen amb un complex cristall violeta/iode, després es descoloreixen amb alcohol i mes tard es tenyeixen amb safranina, quedant els gram negatius tenyits de color vermell ja que el complex cristall violeta a l'hora de la decoloració no queda retingut en la paret bacteriana i els grams positius tenyits de color blau perquè retenen el color violeta.



8 Imatge tinció de gram. Font: diapositives de classe "els microorganismes "

¹⁶ compostos orgànics fets per aminoàcids, unes molècules que contenen el grup amino, un grup carboxil i un radical que formen una cadena lineal i s'uneixen per un enllaç peptídic.

¹⁷ glúcids formats per molts monosacàrids.

¹⁸ polímers de glicerol units mitjançant enllaços fosfodièster.

¹⁹ estructura que formen els lípids quan orienten els caps hidròfils cap a l'exterior i les cues hidròfobes cap a l'interior quan es troben en un medi aquós.

3.1.3. Membrana plasmàtica:

La membrana plasmàtica és una capa que envolta el citoplasma, té uns 75 Å⁰ de gruix i és molt semblant a la de les cèl·lules eucariotes però sense esteroides²⁰. Aquesta membrana conté uns mesosomes que són uns replecs interns que tenen com a funció subjectar el cromosoma bacterià, dirigir la duplicació del DNA per mitjà ADN-polimerases²¹ i fer la respiració²², ja que tenen una estructura semblant als complexos ATP-sintetases²³ dels mitocondris²⁴. Aquests mesosomes també s'encarreguen de la fotosíntesi (en els bacteris fotosintètics) perquè s'hi troben les molècules del fotosistema I (PSI) i assimilar NO₃⁻ o NO₂⁻ i N₂ en els bacteris nitrificants.

Altres funcions que té la membrana plasmàtica és limitar el bacteri i regular el pas de les substàncies nutritives.

²⁰ lípid format per anells de carboni units entre si.

²¹ proteïna enzimàtica que s'encarrega de duplicar l'ADN d'una cèl·lula.

²² procés en el qual les cèl·lules degraden les molècules orgàniques per obtenir energia.

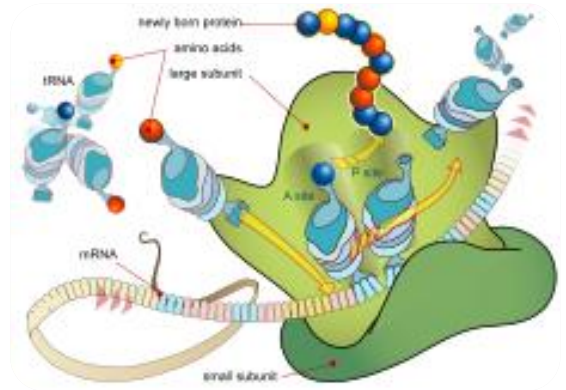
²³ enzims responsables de subministrar energia a la cèl·lula sintetitzant adenosina trifosfat (ATP).

²⁴ orgànuls cel·lulars que contenen una matriu i uns replecs anomenats crestes. Són els encarregats de dur a terme la funció de respiració cel·lular un procés que proporciona a la cèl·lula l'energia necessària per realitzar diverses activitats.

3.2. Part interna:

3.2.1. Els Ribosomes:

Els ribosomes són partícules formades per dues subunitats, una subunitat petita i una subunitat gran encarregades de la síntesi de proteïnes les quals es troben disperses per el citoplasma.



9 Dibuix d'un ribosoma i la síntesi de proteïnes.
Font:es.wikipedia.org

La subunitat petita té una velocitat de sedimentació 30S i està constituïda per una molècula d'ARN i 21 proteïnes diferents.

La subunitat gran té una velocitat de sedimentació de velocitat 50S i està formada per dues molècules ARN²⁵ i 34 proteïnes.

3.2.2. Inclusions:

Són grànuls sense membrana que es troben dispersos per el citoplasma i que serveixen de mecanisme de reserva de diferents substàncies nutritives o de residus del seu metabolisme.

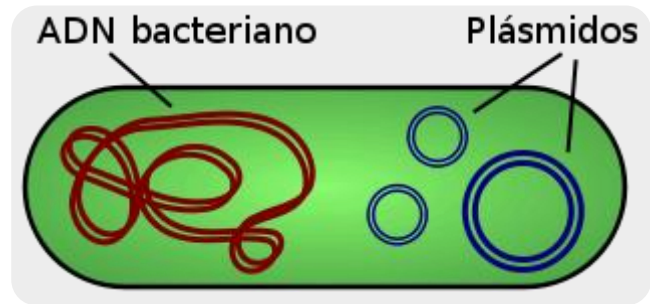
3.2.3. Vesícules gasoses:

Les vesícules gasoses són estructures que contenen gas, de forma cilíndrica i que permeten la flotabilitat del bacteri, per exemple en els bacteris fotosintètics.

²⁵ (àcid ribonucleic): cadena de nucleòtids units entre ells, conté les bases nitrogenades adenina, citocina, guanina i uracil en lloc de timina.

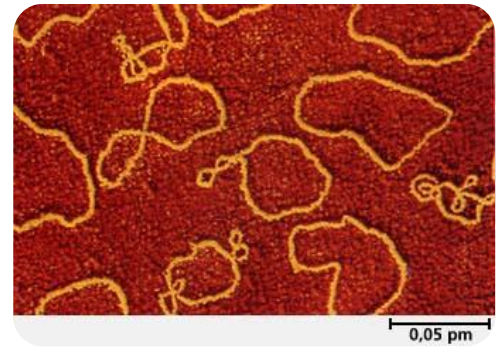
3.2.4. ADN bacterià:

L'ADN bacterià és la informació genètica del bacteri, està format per una sola molècula llarga i circular amb una cadena doble hèlix amb superenrotllaments. L'ADN es situa unit als mesosomes i la seva funció és dirigir el funcionament del metabolisme bacterià.



10 Dibuix ADN bacterià i els plasmidis. Font:es.wikipedia.org

La regió condensada de l'ADN s'anomena nucleoide. Dins dels bacteris també apareixen varies molècules d'ADN de menor massa que un cromosoma anomenades plasmidis. Aquests plasmidis poden tenir gens de resistència als antibiòtics o gens que intervenen en els processos de reproducció.

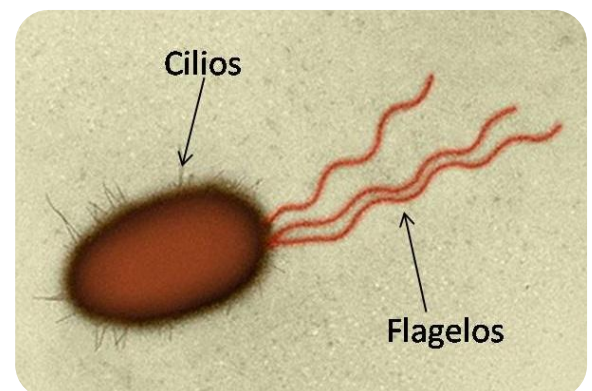


11 Imatge d'uns plasmidis. Font: uc.cl

3.3. Altres estructures externes dels bacteris:

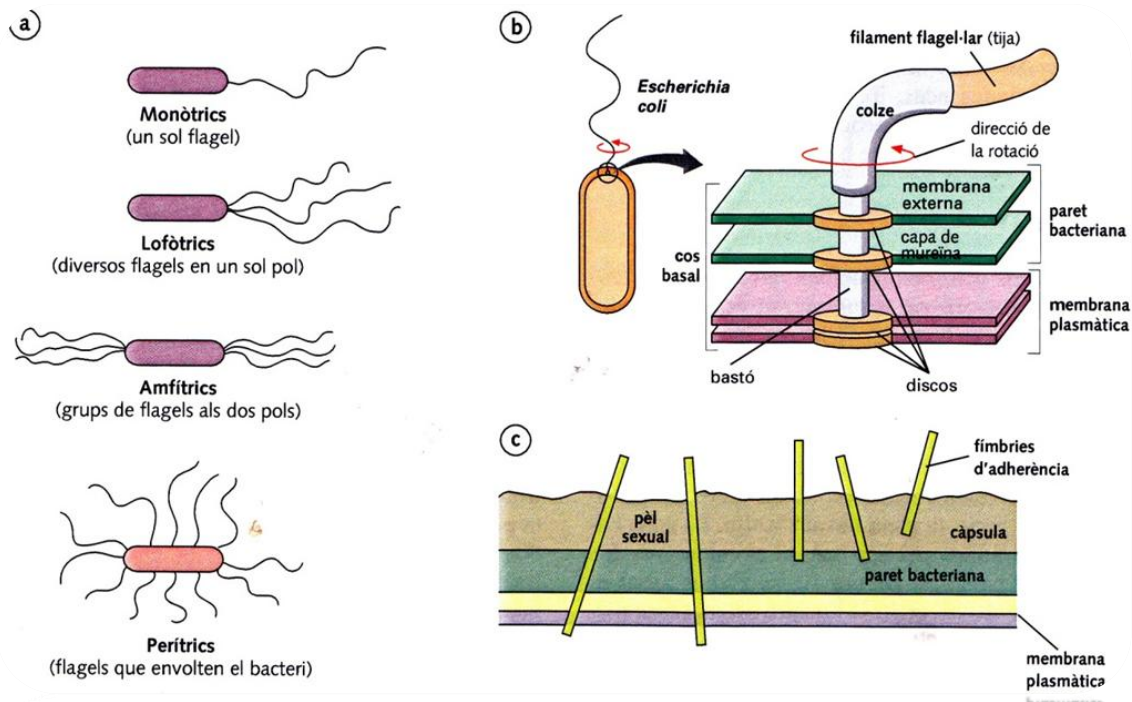
3.3.1. Els Flagels:

Són prolongacions dels bacteris que estan formats per dues parts, la zona basal i la tija, tenen funció locomotora i que permeten que els bacteris es moguin lliurement.



12 Imatge d'un bacteri amb tres flagels i cilis. Font: biologiabi.blogspot.com

La zona basal està formada per el colze i el cos basal, que està format per un bastó central i quatre estructures discoïdals on els dos discos interns giren sobre si mateixos i transmeten moviment a la resta del flagel.



13 Dibuix del funcionament d'un flagel. Font: Biologia I Santillana.



3.3.2. Pèls i fimbries:

Es troben a la superfície externa dels bacteris i són estructures buides i tubulars formades per proteïnes, amb un gruix de 40 a 80 Å.

Els pèls són llargs i participen en el intercanvi de material genètic amb altres bacteris mentre que les fimbries són curtes i permeten al bacteri fixar-se al substrat, cap dels dos té funció locomotora.



14 Imatge de dos bacteris connectats mitjançant els pèls. Font: diapositives de classe "els microorganismes"

4. FISIOLOGIA BACTERIANA:

Funcions de nutrició, relació i reproducció:

4.1 Funció de nutrició:

Els organismes autòtrofs²⁶ utilitzen compostos²⁷ inorgànics per sintetitzar els seus propis compostos orgànics, hi ha diferents tipus d'organismes autòtrofs:

- Els autòtrofs fotosintètics que són els bacteris sulfurosos, verds i porpres que no utilitzen aigua com a donador d'electrons en la fotosíntesi, sinó altres compostos com el sulfur d'hidrogen. No produeixen oxigen, absorbeixen la llum infraroja i poden realitzar la fotosíntesi sense llum visible
- Els autòtrofs quimiosintètics que són els bacteris que utilitzen l'energia que desprenen certs compostos inorgànics quan s'oxiden.

Els bacteris heteròtrofs són els que utilitzen compostos orgànics per sintetitzar els seus propis compostos orgànics, n'hi ha de diferents tipus:

- Els sapròfits són els bacteris que viuen sobre la matèria morta.
- Comensals o paràsits que són els bacteris que viuen conjuntament amb altres organismes. Els comensals són els que no perjudiquen ni beneficien a l'altre organisme i els paràsits són els que produeixen malalties en l'altre organisme.

²⁶ organisme que capaç d'elaborar la seva pròpia matèria orgànica a partir de substàncies inorgàniques.

²⁷ substància formada per dos o més elements químics.

4.2. Diferents vies metabòliques dels bacteris:

- Els bacteris aeròbics que són els poden utilitzar oxigen .
- Els bacteris anaeròbics que són els que no poden utilitzar oxigen. Aquests poden ser, *estrictes* que són els no admeten oxigen perquè el consideren un verí o *facultatius* que si que utilitzen oxigen quan n'hi ha.

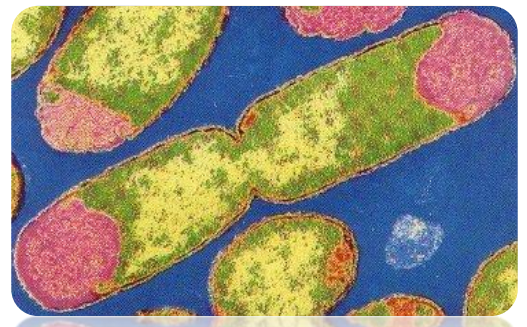
4.3. Funció de relació:

Els bacteris es relacionen a partir del moviment, ja sigui per moviment flagel·lar o per contracció o dilatació.

També responen a canvis mediambientals formant espores o mecanismes de resistència que suporten temperatures molt elevades, altes concentracions de sal i l'acció d'agents químics o radiacions.

4.4. Funció de reproducció:

Els bacteris es multipliquen mitjançant una reproducció asexual²⁸, es a dir, a partir de la bipartició. En aquest procés l'ADN es duplica i la paret bacteriana creix formant una separació on finalment es creen dues cèl·lules o dos bacteris fills idèntics. Aquest, és un procés creat per els mesosomes.



15 Imatge de la bipartició dels bacteris. Font: recursos.cnice.mec.es

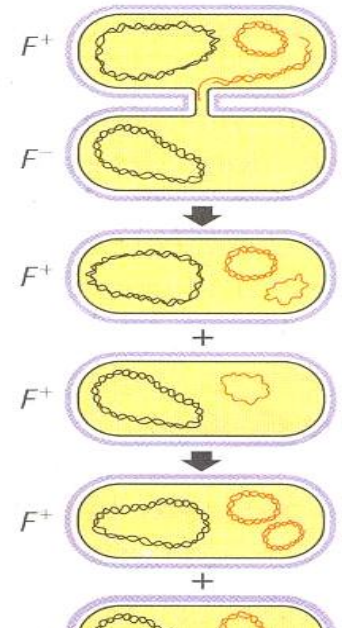
²⁸ reproducció en la qual no intervenen els dos sexes.

4.5. Fenòmens de parasexualitat:

Hi ha tres processos d'intercanvi genètic:

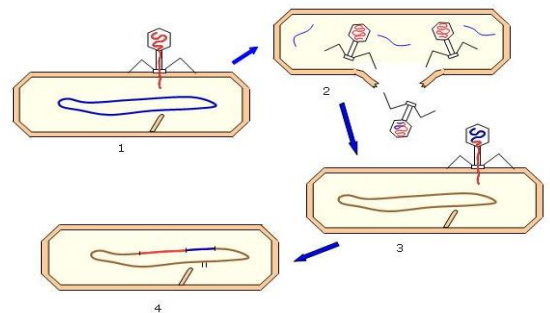
-La conjugació es un procés en el qual el bacteri transmet un plasmidi per mitjà de les fímbries (donador F+) a un bacteri receptor (receptor F- que finalment es convertirà en F+ quan obtingui el plasmidi F).

Conjugació I: F+ conté còpies de plasmidis i és el donador mentre que F- no conté plasmidis i és el receptor. En aquest procés es transmet un dels plasmidis a través del pèl sexual o fímbries, després es replica la cadena formant dos plasmidis idèntics i així els F- es convertiran en F+.



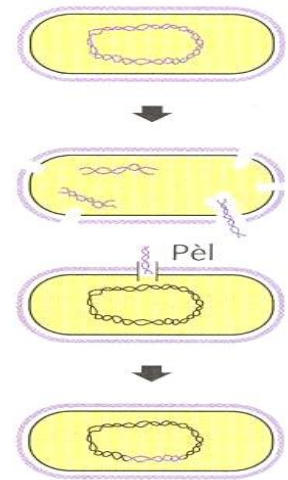
16 Dibuix del procés de la conjugació. Font: diapositives de classe "Els microorganismes".

-La transducció és un intercanvi genètic que es produeix gràcies a un virus bacteriòfag, el qual parasita un bacteri amb fragments d'ADN d'un altre bacteri que ja havia parasitat darrerament.



17 Dibuix del procés de la transducció. Font: diapositives de classe "Els microorganismes"

- La transformació es un procés en el qual el bacteri s'introdueix ADN d'un altre bacteri que es troba dispers per el medi on viu, aquets tipus de bacteris s'anomenen competents.



18 Dibuix del procés de la transformació. Font: diapositives de classe "els microorganismes".

Gràcies a aquests processos d'intercanvi genètic la població de bacteris obté variabilitat genètica és a dir, tots els bacteris no tenen un mateix genotip ja que s'intercanvien entre ells diferents gens de resistència.

Així s'assegura la supervivència de l'espècie front a canvis ambientals o substàncies nocives com els antibiòtics o biocides.

5. SERRATIA MARCESCENS:

Classificació científica:

Regne: *Bacteris*

Fílum: *Proteobacteri*

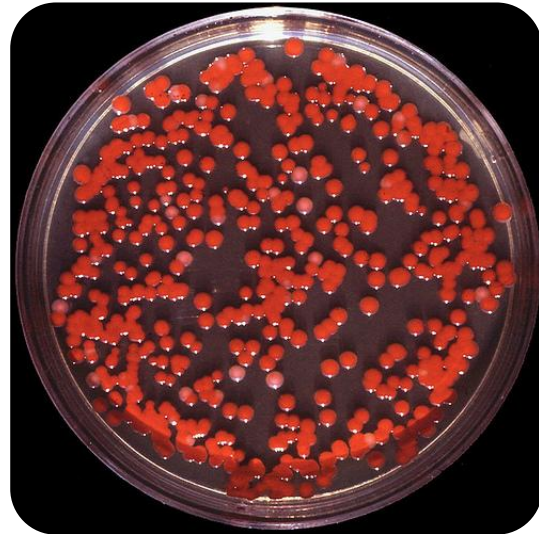
Classe: *Gamma Proteobacteri*

Ordre: *Enterobacterial*

Família: *Enterobacteriaceae*

Gènere: *Serratia*

Espècie: *Serratia marcescens*



19 Imatge d'una placa de petri amb el bacteri *Serratia marcescens*. Font: edenprairieweblogs.org

El bacteri *Serratia marcescens* és un bacil Gram negatiu del fílum dels *Enterobacteriaceae* que viu en àmbits amb una humitat elevada i en un Ph²⁹ entre 5 i 9. Aquest tipus de bacteri el podem trobar fàcilment en els serveis públics "lavabo" i a les clavegueres.

Les diferents malalties que pot produir el *Serratia marcescens* són infeccions en els ronyons, vies urinàries i respiratòries, conjuntivitis i queratitis.

És un bacteri resistent a molts antibiòtics a causa dels factors R, uns plasmidis que creen enzims amb resistència als antibiòtics, concretament a totes les penicil·lines.

²⁹ és un índex de la mesura de l'acidesa o alcalinitat d'una solució, que és donada per l'activitat dels ions en una solució.

6. MICROCOCCUS LUTEUS:

Classificació científica:

Regne: bacteris

Fílum: *Actinobacteria*

Classe: *Actinobacteria*

Ordre: *Actinomycetales*

Família: *Micrococcaceae*



20 Placa de petri amb bacteris *Micrococcus luteus*. Font: faculty.ccbcmd.edu

El *Micrococcus luteus* és un bacteri del fílum *Actinobacteria* i és un Gram-positiu. Aquest bacteri conté una paret cel·lular molt gruixuda, un ADN ric en citosina i guanina³⁰ 75% i plasmidis. Té un metabolisme aeròbic (utilitzen oxigen) i poden viure en àmbits amb una baixa concentració de diòxid de carboni.

Aquests organismes viuen a una temperatura de 37°C, mes o menys a la temperatura del cos humà. Es poden trobar a les cavitats nasals, les vies respiratòries superiors, a la mucosa de la boca i a la pell humana, on transformen la suor en compostos d'olor desagradable. En general aquests bacteris provoquen infeccions a la pell humana.

El *Micrococcus luteus* és molt sensible als antibiòtics beta lactàmics, que són uns antibiòtics que contenen un nucli amb l'anell β -lactam en la seva estructura molecular i poden créixer en productes làctics i fins i tot en medis tòxics.

³⁰ bases nitrogenades que formen l'ADN.

7. RESISTÈNCIA DELS BACTERIS ALS ANTIBIÒTIC:

7.1. Què són els antibiòtics ?

Els antibiòtics són medicaments que s'utilitzen tant en medicina humana com veterinària per a la profilaxi i tractament de les malalties infeccioses, ja que aquests poden eliminar els microorganismes o inhibir el seu creixement.

Són substàncies de baix pes molecular produïdes per éssers vius, poden ser antibiòtics naturals, que són els que no han estat modificats químicament o semi sintètics que han estat modificats a partir de la substància natural.

La majoria dels antibiòtics procedeixen del metabolisme de microorganismes procariotes o eucariotes³¹. Hi ha diferents antibiòtics segons la zona on actuen:

- **Antibiòtics que interfereixen a la biosíntesis de la paret cel·lular** (es canvien els components intracel·lulars del microorganisme mitjançant la pressió osmòtica produint-li la mort).
- **Antibiòtics que actuen sobre la membrana cel·lular.**
- **Antibiòtics que inhibeixen la síntesi de proteïnes.**
- **Antibiòtics que inhibeixen la síntesi d'àcids nucleics³².**

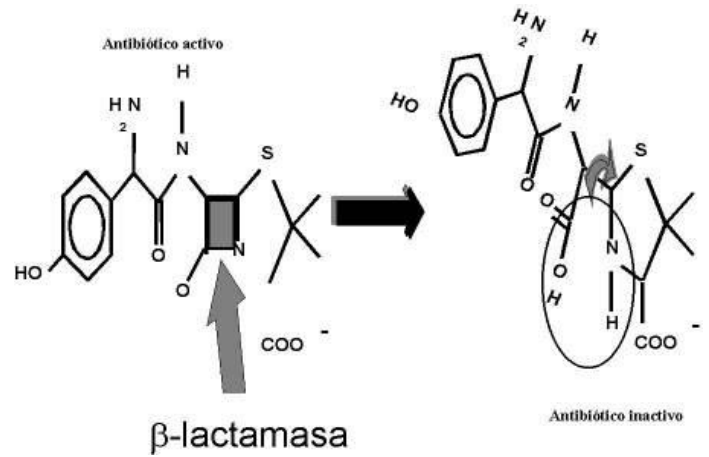
Els antibiòtics més produïts són els que interfereixen en els enzims de síntesi de peptidoglicans en els Eubacteris.

³¹ organismes cel·lulars amb nucli diferenciat.

³² biomolècules orgàniques encarregades d'emmagatzemar i difondre la informació genètica

7.2. Antibiótics beta lactàmics:

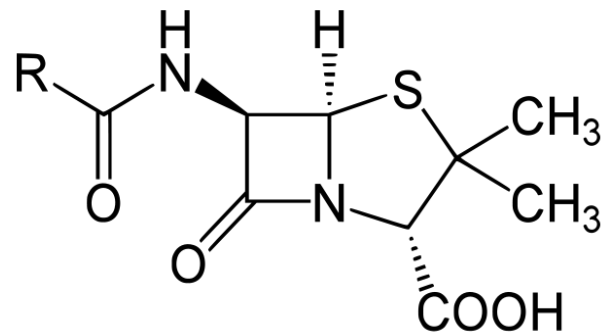
Els antibiòtics beta lactàmics són els que contenen un nucli amb l'anell β -lactam en la seva estructura molecular.



21 Dibuix d'un antibiòtic beta lactam. Font: www.2.udec.cl

Tipus d'antibiòtics beta lactàmics:

La penicil·lina és un antibiòtic beta lactàmic i va ser un dels primers antibiòtics naturals en descobrir-se. Aquest antibiòtic té un espectre molt reduït, es a dir, només actua en front els estreptococs³³ del grup A i els cocs Gram-positius. No afecta a cap bacteri gram-negatiu i és susceptible als enzims desactivadors que creen molts bacteris.



22 Dibuix de l'estructura de la penicil·lina. Font: perubiotec.org

La penicil·lina s'administra per via oral, és molt sensible als àcids (àcids de l'estómac), s'elimina ràpidament per l'orina i en alguns casos provoquen respostes d'hipersensibilitat en un individu (al·lèrgia a la penicil·lina).

³³ (*Streptococcus*): són un gènere d'eubacteris gram-positius

Per resoldre aquests problemes es van fabricar penicil·lines semi sintètiques amb propietats millorades com: un espectre més ampli d'acció, més temps de permanència als fluids del corporals (no s'eliminen fàcilment per l'orina i així l'antibiòtic té més duració), resistència a enzims desactivadors, resistents als Ph àcids. Aquestes penicil·lines es poden classificar en tres grups:

- **resistents a penicil·linases** (enzims desactivadors de l'antibiòtic).
- **d'ampli espectre** (actuen en front una gran varietat de bacteris).
- **penicil·lines anti-pseudomones (un bacteri patogen perillós quan infecta ferides).**

Els mecanismes d'acció de penicil·lines i altres antibiòtics beta lactàmics consisteixen en inhibir la producció de petidoglicans sobre els bacteris en creixement.

La producció industrial dels antibiòtics s'ha incrementat molt gràcies a la recerca d'espècies microbianes capaces de produir antibiòtics i poden produir-ne més quantitats. També, gràcies a una millora en els medis de cultiu i una selecció de les soques mutants dels microbis que tenen més capacitats per produir-ne.

8. QUÈ SÓN LES SUBSTÀNCIES BIOCIDES?

Un biocida és una substància química sintètica o d'origen natural tòxica pels bacteris que serveixen per destruir, matar o inhibir el creixement de qualsevol organisme nociu mitjançant medis químics o biològics.

Els mecanismes d'acció dels biocides són a la zona de la membrana cel·lular, provocant-li una lisi.

8.1. Tipus de biocides:

- **Els biocides biològics** que són enzims o substàncies d'autodefensa produïdes per un organisme.
- **Els biocides físics** que són radiacions amb una elevada energia que oxiden la paret proteica i destrueixen el bacteri.
- **Els biocides químics inorgànics o de síntesi orgànica** com el diòxid de clor (ClO₂), cloramines etc.

8.2. Característiques dels biocides:

- Ampli espectre d'activitat (inhibeix el creixement d'una elevada varietat de bacteris).
- Solubles en aigua.
- Efectius en un ampli rang de Ph.
- Efectius en baixes concentracions.

- Baixa toxicitat humana.

- Fàcils de neutralitzar (mecanismes desactivadors per a la seva posterior neutralització).

Les substàncies al·lògenes són uns biocides molt potents i útils, el clor s'utilitza per desinfectar i tractar l'aigua perquè quedi lliure de bacteris i sigui potable.

Els biocides són nocius i tòxics poden produir intoxicacions si no s'utilitzen adequadament.

Sovint s'utilitzen en agricultura, medicina, control de plagues i per a l'ús domèstic.

9. Què són els antisèptics i desinfectants?

Els desinfectants o germicides són agents químics antimicrobians capaços de matar o inhibir el creixement bacterià.

Els antisèptics també són substàncies químiques antimicrobianes que eviten la putrefacció dels materials vius. Es consideren desinfectants amb baixa activitat tòxica per els teixits vius.

Un agent esterilitzant és aquell que produeix la inactivació total de totes les formes de vida microbiana (pèrdua irreversible de la capacitat de divisió cel·lular).

9.1. Factors que afecten a la potència d'un desinfectant:

- La concentració i el temps d'actuació.
- El tipus de Ph on aplicar el desinfectant (els desinfectants aniònics són més efectius en Ph àcids i els catiònics tenen més eficàcia en Ph alcalins).
- La temperatura (amb un augment de la temperatura augmenta la potència dels desinfectants).

9.2. Tipus de desinfectants:

- Els detergents que són sabons que contenen una porció hidrofòbica i una porció hidròfila que permeten formar micel·les ³⁴en una solució aquosa. Hi ha

³⁴ és un conglomerat de molècules que formen una monocapa biològica.

detergents catiónics³⁵, aniònics³⁶ i no iònics (no iònics no tenen capacitat antimicrobiana) segons la proporció hidròfila.

- Els alcohols que desorganitzen les bicapes lipídiques de les membranes i no afecten a les espores, per això no tenen efecte esterilitzant. Són substàncies líquides, incolores, de baix pes molecular i solubles en aigua (H₂O). S'utilitzen dos tipus d'alcohols l'etanol i isopropanol.

- Alguns al·lògens tenen funció antisèptica, el iode que es un bon antisèptic per a la pell i té major efectivitat en un Ph àcid.

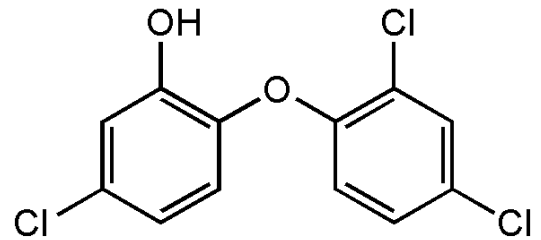
Aquests tres tipus de desinfectants desorganitzen o destrueixen la membrana cel·lular del bacteri produint-li la mort.

³⁵ ió amb càrrega positiva

³⁶ ió amb càrrega negativa.

10. QUÈ SÓN I COM ACTUEN EL TRICLOSAN, L'ETANOL I ELS ANTIBIÒTICS D'AMPLI ESPECTRE?

El Triclosan (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol) és un potent fungicida³⁷ i agent antibacterià. En condicions normals es troba en estat sòlid i és soluble en substàncies orgàniques.

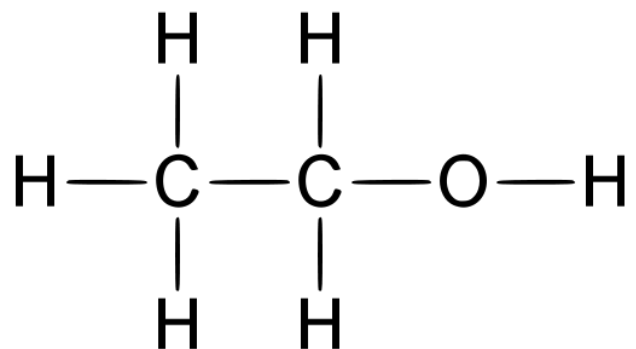


23 Dibuix de l'estructura del Trilosan. Font: en.wikipedia.org

Aquest tipus de substància es encarregada de destruir bacteris Gram-positius i Gram-negatius, ja que es transfereix a través de la membrana citoplasmàtica bacteriana i interfereix en el seu metabolisme lipídic.

El podem trobar en diferents productes d'ús personal com desodorants, la pasta de dents, sabons i inclús introduït en dispositius i material mèdic.

L'etanol és un alcohol i es classifica com una substància antisèptica i desinfectant gràcies a la seva acció dissolvent que afecta als cultius de microorganismes. Sovint s'utilitza per ús cutani per desinfectar la pell amb una concentració (60-90%) i s'anomenen alcohols quirúrgics.



24 Dibuix de l'estructura de l'etanol. Font: genboot.com

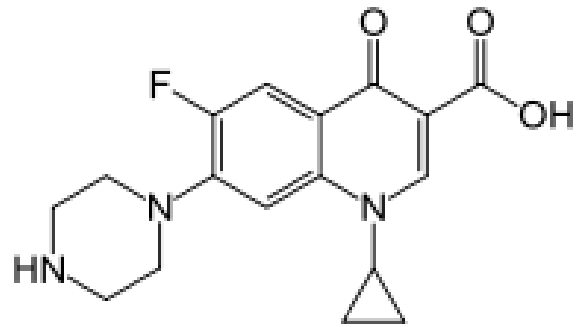
Els antibiòtics d'ampli espectre són aquells antibiòtics que actuen contra una gran varietat de bacteris.

³⁷ és la substància utilitzada per prevenir, inhibir o eliminar els fongs o les seves espores.

Els aminoglicòsids són antibiòtics d'ampli espectre produïts per diverses espècies de bacteris *Streptomyces*. Mecanismes d'acció:

- Provoquen danys a la membrana.
- Distorsionen l'estructura del ribosoma.
- Causen errors en la lectura de l'ARNm.
- Síntesi de proteïnes defectuoses.

El Ciprofloxacín és l'antibiòtic d'ampli espectre que s'ha utilitzat per dur a terme l'experiència al laboratori. Aquest antibiòtic actua bloquejant la replicació de l'ADN (inhibeix l'enzim ADN-girasa) produint el trencament de la doble hèlix de l'ADN i és actiu contra els bacteris gram-positiu i gram-negatiu.



25 Dibuix de l'estructura del antibiòtic d'ampli espectre Ciprofloxacín. Font: en.wikipedia.org

11. CAUSA DE LA RESISTÈNCIA DELS BACTERIS ALS ANTIBIÒTICS I LA SELECCIÓ NATURAL:

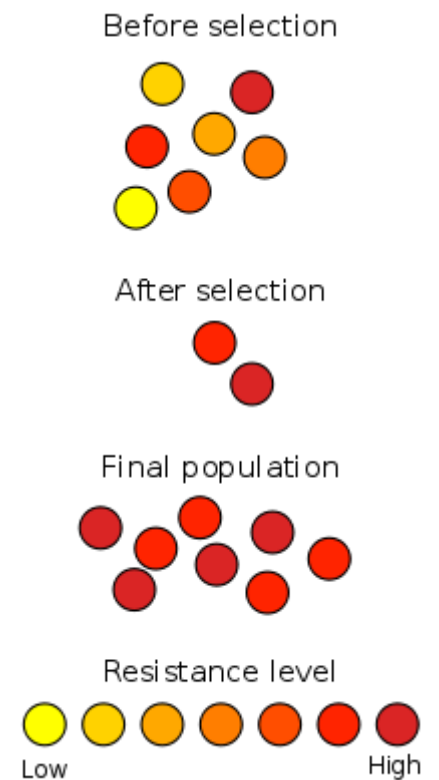
La resistència als antibiòtics per part dels bacteris és un fenomen produït per l'evolució i la selecció natural.

Una població de bacteris no és genèticament igual ja que presenten una variabilitat genètica. La resistència als antibiòtics és un fenomen causat per les mutacions³⁸ en el material genètic d'un bacteri, o per la inserció de gens extra cromosòmics anomenats transposons³⁹ al cromosoma bacterià o per la introducció de plasmidis, que es poden transferir als bacteris per mitjà de la conjugació, un procés parasexual on els bacteris per mitjà d'un pèl sexual introdueixen a un altre bacteri un plasmidi. També hi ha un intercanvi genètic a partir d'uns

altres dos processos explicats anteriorment, la transducció i la transformació. En aquests processos l'ADN bacterià es recombina amb l'ADN d'un altre bacteri i així poden aconseguir nous gens que poden contenir la

resistència als antibiòtics o a altres agents desinfectants, antisèptics o biocides. Dit això, hi ha dos tipus de resistència:

- La resistència adquirida: una resistència provocada per la modificació o mutacions del material genètic d'un bacteri.



26 Dibuix del procés d'la resistència dels bacteris als antibiòtics. Font: es.wikipedia.org

³⁸ és el canvi de d'informació genètica (genotip) d'un ésser viu que produeix un canvi de les seves característiques, que es presenten espontàniament i que pot transmetre a la descendència .

³⁹ segments de ADN.

- La resistència transmissible: la resistència causada per els plasmidis que poden passar d'un bacteri a un altre.

Característiques dels plasmidis amb el gen de resistència:

- Estan capacitats per transferir resistències simultànies als bacteris que els adquireixen.
- Tenen la capacitat de reproduir-se epidèmicament⁴⁰ de manera horitzontal entre cèl·lules de diferents espècies.
- No tenen efectes negatius sobre el material genètic del bacteri.

Mecanismes implicats en la resistència dels antibiòtics:

- **Disminució de la permeabilitat de l'antibiòtic:** produït gràcies a barreres naturals com la membrana dels bacteris gram-negatius que són insensibles a molts antibiòtics i també la modificació de les càpsules bacterianes.
- **Desactivació enzimàtica de l'antibiòtic:** mecanisme format pels plasmidis i que dona resistència en front antibiòtics beta lactàmics i els aminoglicòsids.
- **Modificació química de la zona on actua l'antibiòtic (diana).**
- **Síntesi d'enzims resistents.**

Aquests plasmidis han pogut sorgir a causa d'un intercanvi de material genètic amb una espècie mutant, es a dir, una espècie que ha experimentat un error en

⁴⁰ malaltia que es propaga en poc temps en una població i que afecta a gran nombre de persones.

els seu material genètic i que ha produït per equivocació gens que puguin contenir la resistència.

També aquests plasmidis poden aparèixer per la transmissió de material genètic amb espècies de bacteris estranyes, ja que els plasmidis i material genètic es poden transferir entre espècies diferents.

La selecció natural:

En un cultiu de bacteris sensible a un tipus d'antibiòtic quan es posa en contacte amb aquest s'observen bacteris resistents en la població. Aquest fet no és causat perquè l'antibiòtic produeixi els canvis genètics sobre els bacteris, sinó que només selecciona els bacteris resistents que sorgeixen espontàniament en la població, es a dir, la resistència no és adquirida per mitjà de l'antibiòtic, sinó que ja era present abans del contacte amb l'antibiòtic. Aquest és un procés produït per la selecció natural.

Els bacteris sensibles a l'antibiòtic moren i els que contenen el gen de resistència seleccionats per l'antibiòtic sobreviuen i poden multiplicar-se transmetent la resistència als seus descendents o altres espècies bacterianes.

Aquests tipus de fenomen és causat per l'ús abusiu i incorrecte dels antibiòtics en el tractament d'infeccions humanes, l'administració de fàrmacs poc actius, de dosis petites o de tractaments massa curts.

En la actualitat han aparegut bacteris multiresistents, que són soques de bacteris resistents a diversos antimicrobians a l'hora.

Hi ha dos tipus de soques diferents:

- La soca insensible és aquella que gràcies al seu genotip natural li permet resistir d'una forma natural a un determinat antibiòtic o substància antimicrobiana. Per exemple l'estructura de la paret bacteriana dels bacteris Gram-negatiu que dificulta el pas de molts agents antimicrobians
- La soca resistent que és la que a sofert canvis genètics a partir d'un genotip anteriorment sensible a aquest tipus de substàncies.

11.3. Dades informatives: Font: www.biologia.edu.ar

- Després de 6 anys d'haver introduït la penicil·lina la freqüència de soques de *Staphylococcus aureus* resistents en els hospitals anglesos va passar del 10% a un 60%. Actualment és d'un valor del 90%.
- Amb els nous antibiòtic beta lactàmics també han sorgit soques resistents però amb una freqüència baixa.
- Actualment existeixen problemes de tractament amb els enterobacteris i amb el el gonococ i el meningococ, que tradicionalment havien estat molt sensibles a les penicil·lines.
- La capacitat dels bacteris per obtenir resistència provoca un problema per l'ús dels antibiòtics en un futur i això fa que s'hagin d'invertir grans quantitats de diner en investigacions per intentar solucionar aquest problema.

12. Com fer un bon ús dels antibiòtics?

L'aparició de resistències bacterianes als antibiòtics més habitualment utilitzats suposa una amenaça per la salut pública degut a què, en deixar de ser eficaços cal variar les estratègies de tractament utilitzant nous antibiòtics cada vegada més selectius. Aquesta situació no és sostenible, ja que per al descobriment i comercialització de noves molècules amb poder antibiòtic són necessaris entre 15 i 20 anys de recerca,



27 Imatge. Font: laincubadora.blogspot.com

mentre que el ritme d'aparició de resistències és molt més ràpid. Per això es molt important fer un bon ús dels antibiòtics, diferents pautes a seguir:

- Els antibiòtics no s'han d'utilitzar per tractar gripes ni refredats, ja que són malalties causades per virus i no per bacteris.
- Han de ser receptats per un metge, no ens hem d'auto medicar.
- S'ha de complir tot el temps de tractament i amb les dosis correctes.
- S'ha de complir l'horari a l'hora de prendre la dosi d'antibiòtic, sempre cada 8 hores.

TREBALL DE CAMP:

13. INTRODUCCIÓ:

La part pràctica d'aquest treball s'ha dut a terme al laboratori amb el protocol estàndard del Centre de Documentació i Experimentació en Ciències i Tecnologia (CDECT) que permet demostrar, de forma quantitativa, la rapidesa amb que les soques resistents passen a ser les espècies dominants en poblacions de bacteris exposats a diferents compostos ja siguin antibiòtics o agents biocides com el Triclosan.

14. OBJECTIUS:

- Comprovar l'aparició de soques de *Micrococcus luteus* i *Serratia marcescens* resistents a determinats antibiòtics o altres compostos antimicrobians com el Triclosan.
- El risc que comporta el mal ús de les substàncies antimicrobianes i el consegüent increment de les soques bacterianes resistents.
- Presa de contacte amb la tècnica de cultiu bacterià, tècnica rutinària en els laboratoris de microbiologia.
- Prendre consciència del paper dels antibiòtics i del seu ús racional.

15. MATERIAL I EQUIPAMENT:

Per fer possible aquesta experiència al laboratori necessitem el següent material i equipament:

- Una incubadora que permeti assolir una temperatura de 35-37⁰C.
- Cultius mare de les soques bacterianes *Serratia marcescens* i *Micrococcus luteus*.
- Medi de cultiu líquid (sense bacteris) 8 ml per tub d'assaig.
- Triclosan en pols.
- Discos de paper de 6mm impregnats amb un antibiòtic d'ampli espectre (CIPROFLOXACIN 5 mil·ligrams)
- Aigua destil·lada.
- Alcohol etílic.
- Material fungible.
- Plaques de petri amb agar (esterilitzades).
- Tubs d'assaig amb rosca.
- Bastonets de cotó esterilitzats.
- Discos de paper sense impregnar de 6 mm.
- Una gradeta per als tubs de cultiu.

- Parafilm.
- Provetes de 250 ml.
- Retoladors indelebles per retolar els tubs i les càpsules de petri.
- Pipeta i pera (de 2ml).



29 Imatge d'uns cultius mare de *Serratia marcescens* i *Micrococcus luteus*. Font: Elena Marín.



28 Imatge d'uns discos de paper de filtre impregnats amb antibiòtic i sense impregnar. Font: Elena Marín.



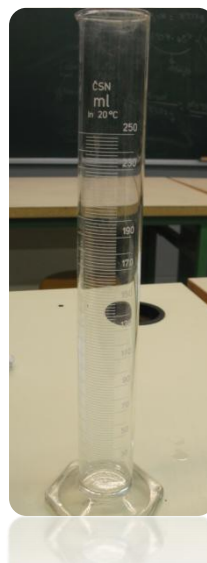
30 Imatge d'una flama amb un cremador d'alcohol. Font: Elena Marín.



33 Imatge d'una pipeta (de 2ml) i una pera. Font: Elena Marín.



32 Imatge del PARAFILM (segellador). Font: Elena Marín.



34 Imatge d'una proveta (de 250 ml). Font: Elena Marín.



31 Imatge de l'aigua destil·lada i l'alcohol. Font: Elena Marín.

16. PREPARACIONS PRÈVIES A L'INICI:

16.1. Dissolucions del treball:

Les tres substàncies que s'utilitzaran en aquesta experiència per demostrar la resistència dels bacteris a aquests són l'alcohol etílic, l'antibiòtic d'ampli espectre CIPROFLOXACIN i el Triclosan, de les quals només s'haurà de fer una dissolució amb el Triclosan i l'alcohol etílic ja que disposem de discos de paper de filtre de 6mm els quals estan impregnats amb l'antibiòtic d'ampli espectre.

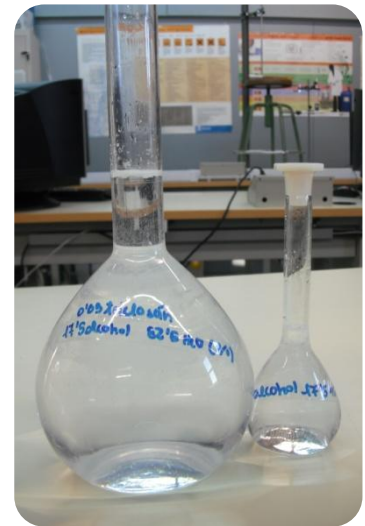
16.1.1. Dissolució del Triclosán :

Triclosan concertació final: 0,5gr/l (dissolt amb 17,5% alcohol i 85% aigua destil·lada).

Fem una dissolució d'un litre on diluïrem 0,05 gr de Triclosan en pols amb 170 ml d'alcohol etílic i 830 ml d'aigua destil·lada.

1) Mesurem en una balança de precisió 0,05 grams de Triclosan amb un vidre de rellotge.

2) Agafem i mesurem amb una proveta 170 ml d'alcohol i 830 ml d'aigua destil·lada (4 provetes de 250 ml)



35 Imatge de dos metrès aforats amb una dissolució de Triclosan (1L) i d'alcohol (100ml). Font: Elena Marín.



36 Imatge d'una dissolució de Triclosan en un metrès aforat (1L). Font: Elena Marín.

3) Diluïm els 0,05 gr de Triclosan amb una part de la dissolució d'aigua destil·lada i alcohol etílic.

4) Ho aboquem tot en un metràs aforat d'un litre.

5) Enrasem amb un comptagotes fins arribar a la línia del coll del metràs aforat.



37 Imatge de la barreja de Triclosan i la dissolució (alcohol i aigua destil·lada) en un vas de precipitats. Font: Elena Marín.

16.1.2. Dissolució d'alcohol etílic:

Alcohol al 17,5% aigua destil·lada.

Fem una dissolució en la qual diluïm 17,5 ml l'alcohol etílic amb 82,5 ml d'aigua destil·lada per formar 100 ml de dissolució.

1) Mesurem en una proveta de 50 ml 17,5 ml d'alcohol etílic i 82,5 ml d'aigua destil·lada en una proveta de 250 ml.

2) Ho aboquem tot en un metràs aforat de 100 ml.

3) Enrasem amb un comptagotes fins a la línia del coll del metràs aforat.



38 Imatge de la dissolució amb Triclosan, afegint amb un comptagotes la dissolució per arribar a la línia coll. Font: Elena Marín.

17. PROCEDIMENT I EXECUCIÓ DE L'EXPERIÈNCIA:

Aquest experiment consta de 6 passos:

1) La sembra dels bacteris

Transferència dels cultius líquids mare a les plaques de Petri⁴¹ amb l'agar⁴² esterilitzat, agafant amb una pipeta unida a una pera 1 ml de cultiu escampant-lo uniformement per tota la zona de la placa de petri.

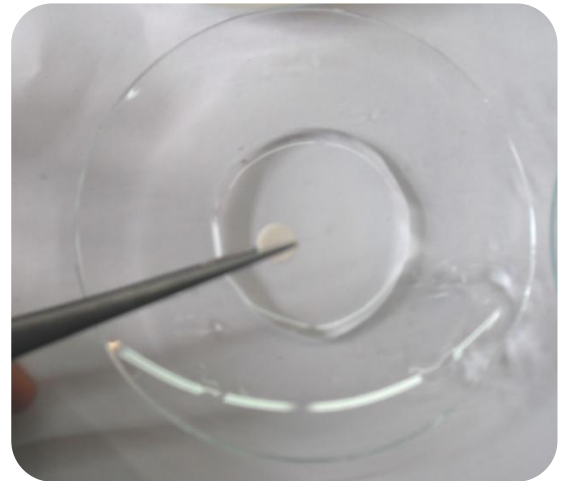
Es tapa immediatament la placa per no contaminar el medi i es mou la placa suaument perquè la superfície amb l'agar quedi amb una capa uniforme de bacteris.



39 Imatge de la sembra de bacteris amb una pipeta (1ml). Font: Elena Marín.

2) Aplicació dels diferents tractaments:

S'impregnen els discos de paper de filtre de 6mm amb cada producte a testar, en aquest cas només impregnem els discos que han de portar les dissolucions de Triclosan i alcohol etílic ja que disposem de discos de paper

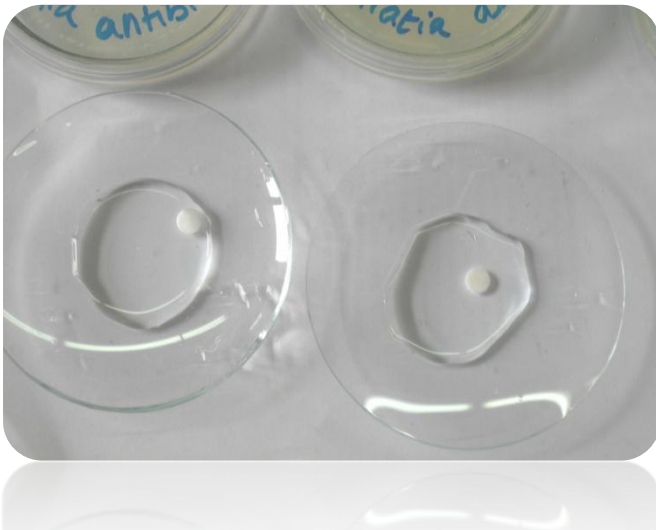


40 Imatge d'un Vidre de rellotge amb un tractament, pinces i un filtre de paper de 6mm. Font: Elena Marín.

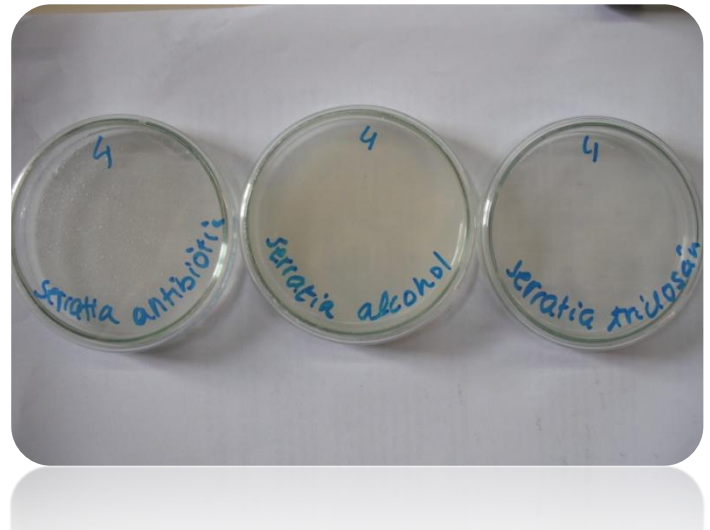
⁴¹ és un recipient de vidre o plàstic de diferents diàmetres (al voltant de 10cm) amb na coberta de la mateixa forma que la placa perquè es pugui col·locar a sobre per tancar el recipient.

⁴² és una substància que s'extreu de les algues dels gèneres *Gellidium* i *Gracillaria*. S'utilitza per al cultiu cel·lular i microbiologia.

impregnats amb l'antibiòtic d'ampli espectre. Fem aquest procés ajudats amb unes pinces (diferents per a cada tractament) desinfectades amb alcohol deixant que s'evapori mes tard. Quan el disc de paper ja està ben impregnat el col·loquem al centre de la superfície d'agar de cada una de les plaques. Esperem un minut per permetre l'adhesió dels discs a l'agar i segellem les plaques amb Parafilm per tal de no contaminar el medi amb altres bacteris i identifiquem les plaques de petri amb el nom del tractament aplicat amb un retolador indeleble.



42 Imatge de la impregnació dels discos de paper de filtre en diferents tractaments. Font: Elena Marín.



41 Imatge de les plaques de petri identificades amb cada tipus de tractament. Font: Elena Marín.

En aquests dos primers passos és molt important treballar amb condicions d'esterilitat per tal de no contaminar les plaques de Petri amb altres bacteris del medi i evitar riscos d'infecció. Per això s'han d'esterilitzar les pipetes amb lleixiu i esbandir-les amb aigua abans i després de ser utilitzades. Les pinces per aplicar els tractaments es poden esterilitzar amb alcohol o lleixiu, si és amb alcohol s'ha de deixar que s'evapori abans d'utilitzar-les. Per manipular les

plaques amb les mans utilitzem guants de làtex també esterilitzats amb lleixiu. A més, durant el procediment de sembra i aplicació del tractament obrim el mínim possible les plaques de Petri i col·loquem al costat una flama amb un cremador d'alcohol per evitar que entrin bacteris de l'aire que contaminin el medi de cultiu.

3) Incubar durant 24h:

Els cultius (plaques de Petri o suspensions al tub d'assaig) s'han d'incubar durant 24h, el bacteri *Micrococcus luteus* a 37⁰C de temperatura obtenint un color groguenc després de la incubació i el bacteri *Serratia marcescens* a uns 25⁰C obtenint un color rosat vermellós després de les 24h incubació.

És un procés que és important perquè els bacteris deixen d'estar en un estat latent ja que abans estaven al frigorífic i és el període de temps en el qual fan efecte els diferents tractaments, per després mesurar la zona d'inhibició.

4) Mesurar la zona d'amplada de la zona d'inhibició del creixement bacterià:

Després de les 24h d'incubació apareixen unes zones lliures de color transparent al voltant dels discos de paper perquè el tractament amb el qual hem impregnat els discos es difon per tot el medi de cultiu bacterià eliminant els bacteris, això s'anomena zona d'inhibició.

En aquest procés es mesura la distància des del límit del disc de paper de filtre fins al límit interior del cultiu bacterià, es a dir, fins al final de la zona de la placa de petri que forma un halo del color de l'agar on no hi ha bacteris o zona d'inhibició.

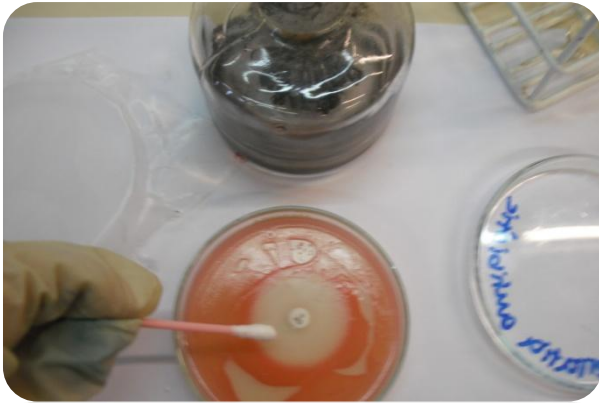
Mesurem aquesta zona d'inhibició amb un peu de rei mil·limetrat per obtenir una mesura més exacte.



43 Imatge d'un peu de rei mesurant una zona d'inhibició d'una placa de petri amb antibiòtic. Font: Elena Marín.

5) Isolar, de cada una de les plaques els bacteris que tenen més possibilitat de ser resistents per cada un dels tractaments.

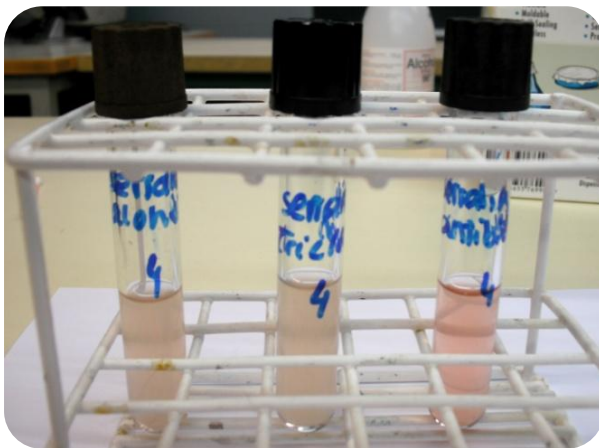
Es trien els bacteris més resistents de cada tractament fregant un bastonet de cotó estèril per la superfície més propera a la zona d'inhibició del cultiu bacterià o s'escullen les colònies que hagin sobreviscut dins de aquesta zona. Amb aquest procediment tenim més possibilitat de trobar bacteris amb el gen de resistència. Seguidament, es transfereixen els bacteris a un tub d'assaig amb 5ml de cultiu sense bacteris (net), submergint els cotonets en cada tub d'assaig marcat amb el nom de cada tractament. Es deixen a la incubadora a la temperatura adient col·locats en una gradeta durant 24h.



45 Imatge de la tria dels bacteris de la zona d'inhibició amb un cotó. Font: Elena Marín.



44 Imatge d'un cotó submergit dins del líquid de cultiu net (5ml). Font: Elena Marín.



46 Imatge dels tubs d'assaig amb els bacteris resistents en una gradeta. Font: Elena Marín.

Aquest procediment és un dels més importants ja que hem agafat els bacteris que són més resistents, perquè es troben al voltant de la zona d'inhibició. Durant el temps que estaran a la incubadora els bacteris es multiplicaran i els bacteris resistents transferiran els gens de resistència als altres fent que augmenti la resistència a la majoria de la població.

6) Sembra d'una nova placa de petri amb el medi de cultiu líquid amb els bacteris resistents:

Després de les 24h sembrem una placa de petri amb 1 ml de cultiu amb bacteris per cada un dels tubs d'assaig de bacteris resistents de cada tractament, (repetim els passos 1 i 2) movem suaument la placa per distribuir els bacteris per tota la zona d'agar, impregnem els discos de paper amb cada tractament, amb les pinces els col·loquem a la part central i després d'un minut (perquè s'adhereixin els discos de paper a l'agar) segellem amb Parafilm. Anomenem cada placa de petri amb el tractament el nombre de la sembra a la qual pertanyen i el nom del bacteri.

Repetim aquest protocol tantes vegades com sembres de bacteris resistents vulguem obtenir.

18. PAUTES PER REDUIR EL RISC DE CONTAMINACIÓ:

- No permetre que els bastonets de cotó, entrin en contacte amb cap superfície o solució que no sigui la pròpia dels bacteris. No tocar l'agar o el medi de cultiu amb els dits o altra cosa que no sigui els bastonets de cotó.

- Deixar les plaques de Petri tancades durant tota l'experiència, excepte el moment de transferir els bacteris.

- Els cotonets utilitzats, els líquids de cultiu i les plaques ja utilitzades s'han de posar en contenidors prèviament designats per aquest ús, amb lleixiu diluït durant 24h per destruir tots els bacteris. Cal rentar-se les mans amb sabó, preferible que no contingui Triclosan, després de la transferència de cultius.

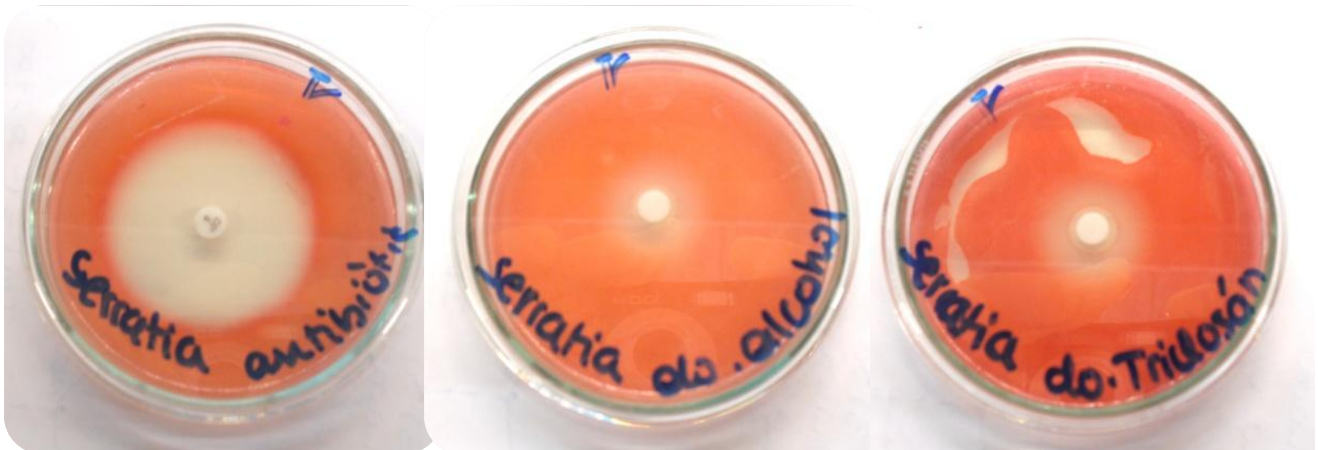
19. RECOLLIDA DE DADES I GRÀFICS:

Taula 1: Mesura de la zona d'inhibició *Serratia marcescens*.

	1a sembra	2a sembra	3a sembra	4a sembra
Antibiòtic	17 mm	11 mm	11 mm	8 mm
Alcohol	5 mm	3 mm	3 mm	3 mm
Triclosan	7 mm	7 mm	6 mm	3 mm

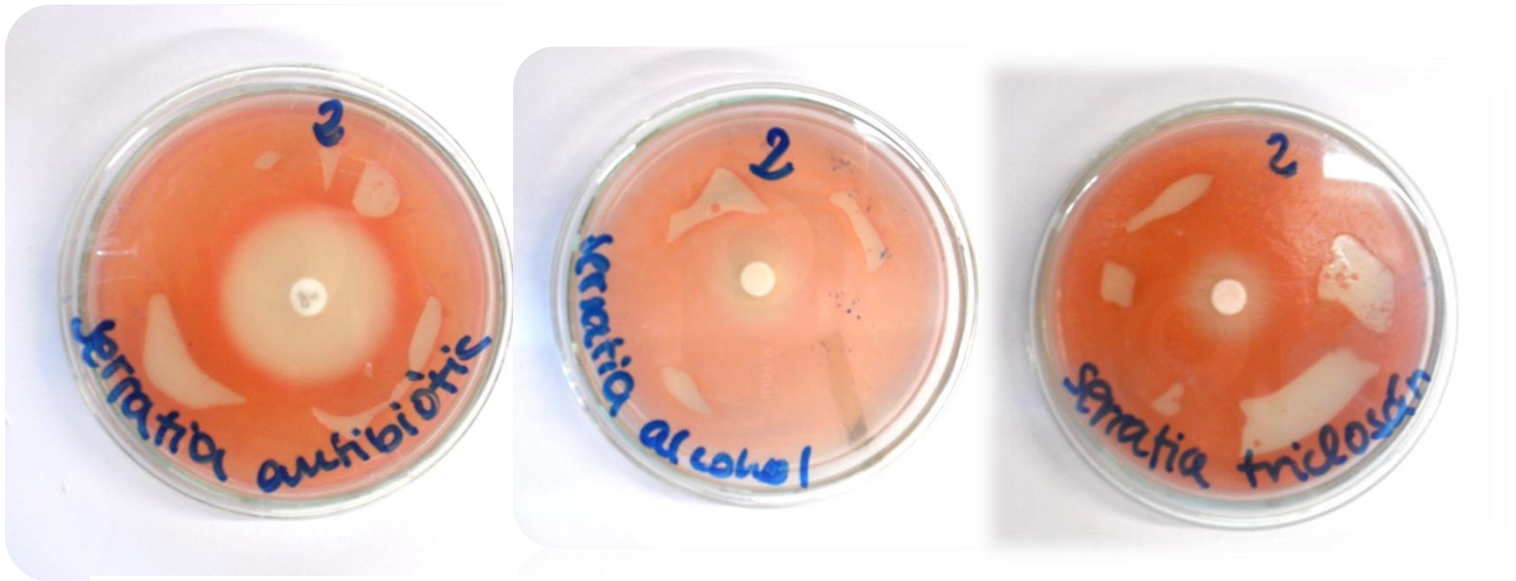
Fotografies:

- Primera sembra:



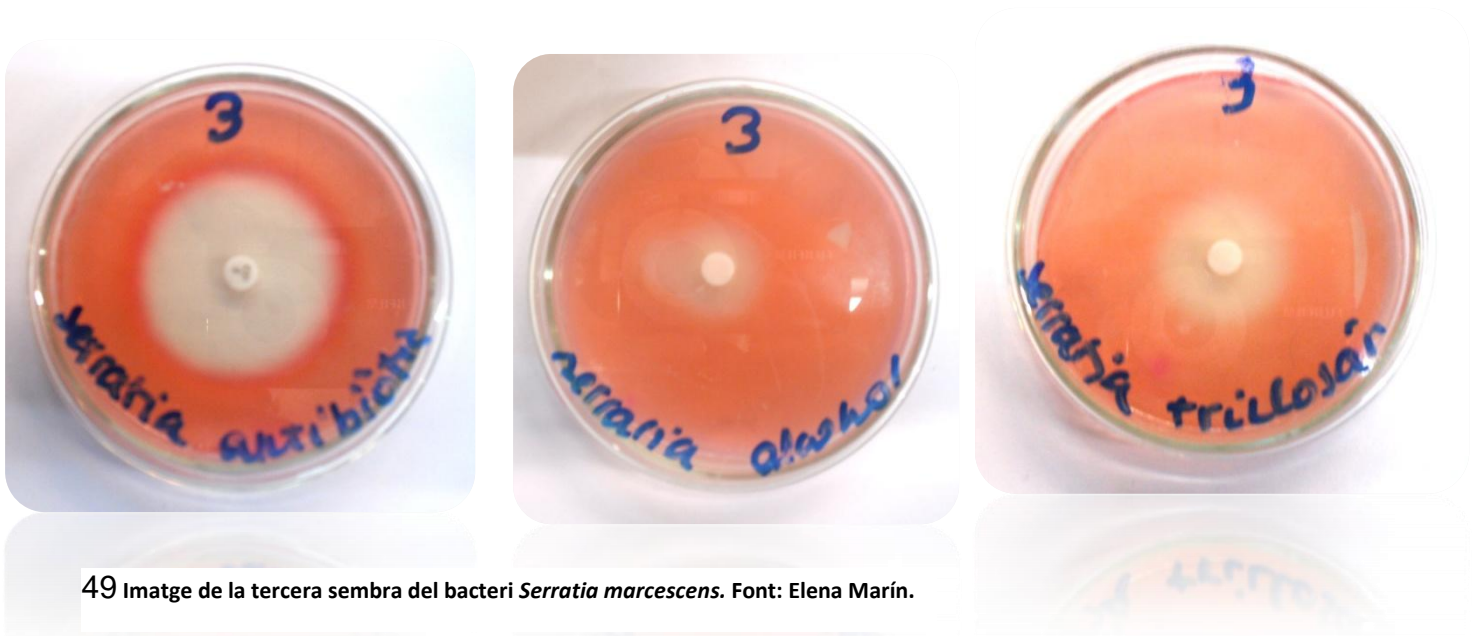
47 Imatges de la primera sembra de *Serratia marcescens* amb els tractaments d'antibiòtic, Triclosan i alcohol.
Font: Elena Marín.

- Segona sembra:



48 Imatge de la segona sembra de *Serratia marcescens*. Font: Elena Marín

- Tercera sembra:



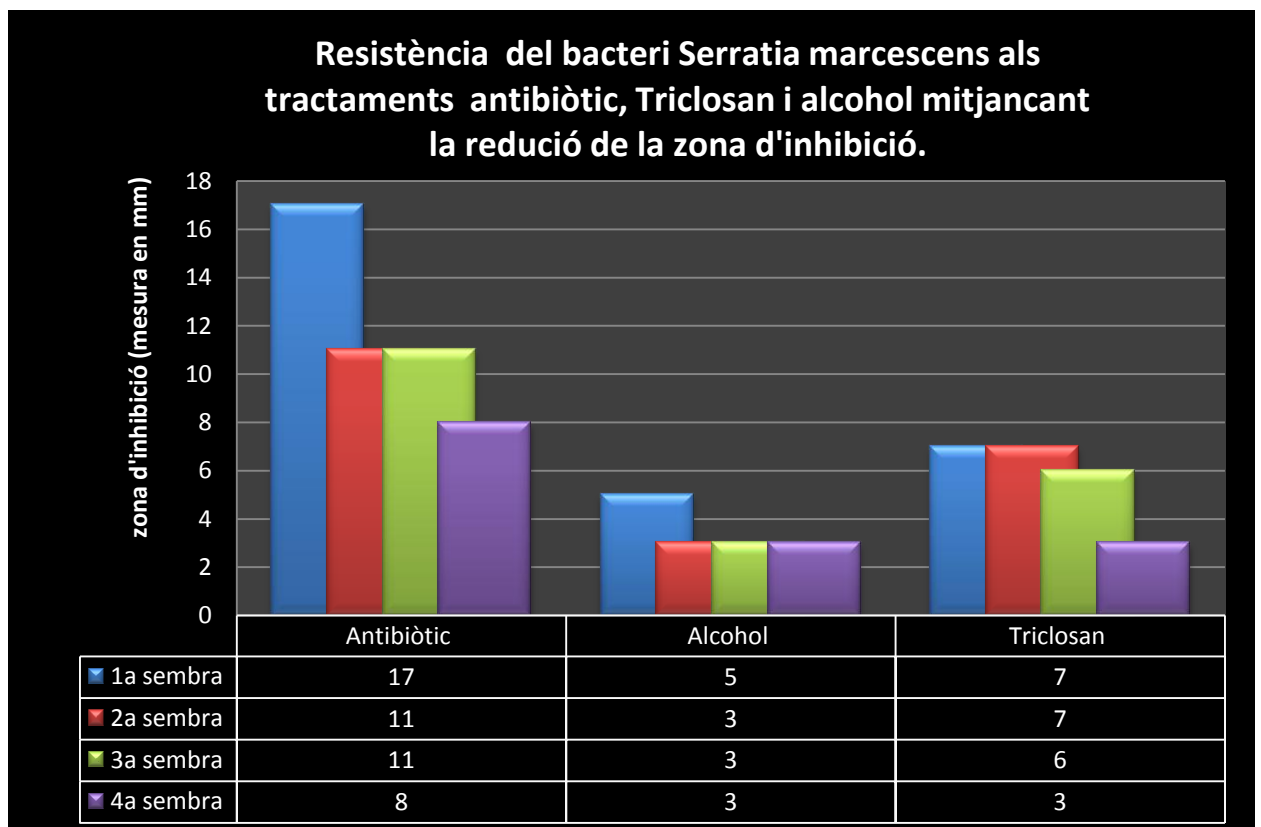
49 Imatge de la tercera sembra del bacteri *Serratia marcescens*. Font: Elena Marín.

- Quarta sembra:



50 Imatge de la quarta sembra del bacteri *Serratia Marcescens*. Font: Elena Mrín.

Gràfic:

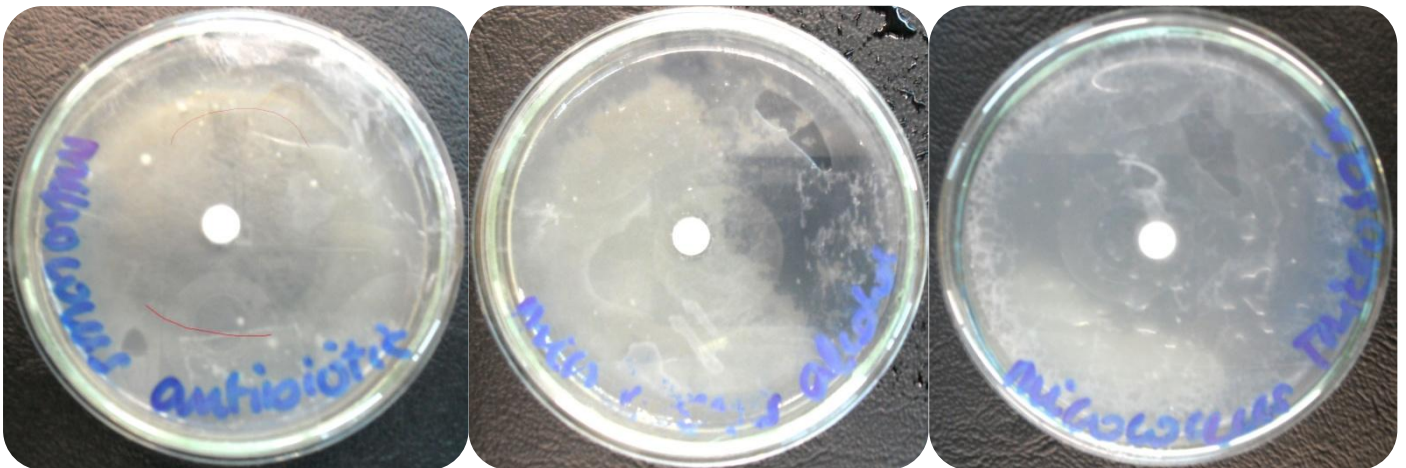


Taula 2: Mesura de la zona d'inhibició *Micrococcus luteus*.

	1a sembra	2a sembra	3a sembra
Antibiòtic	15mm	9 mm	6 mm
Alcohol	2mm	0 mm	0 mm
Triclosan	2mm	2 mm	0 mm

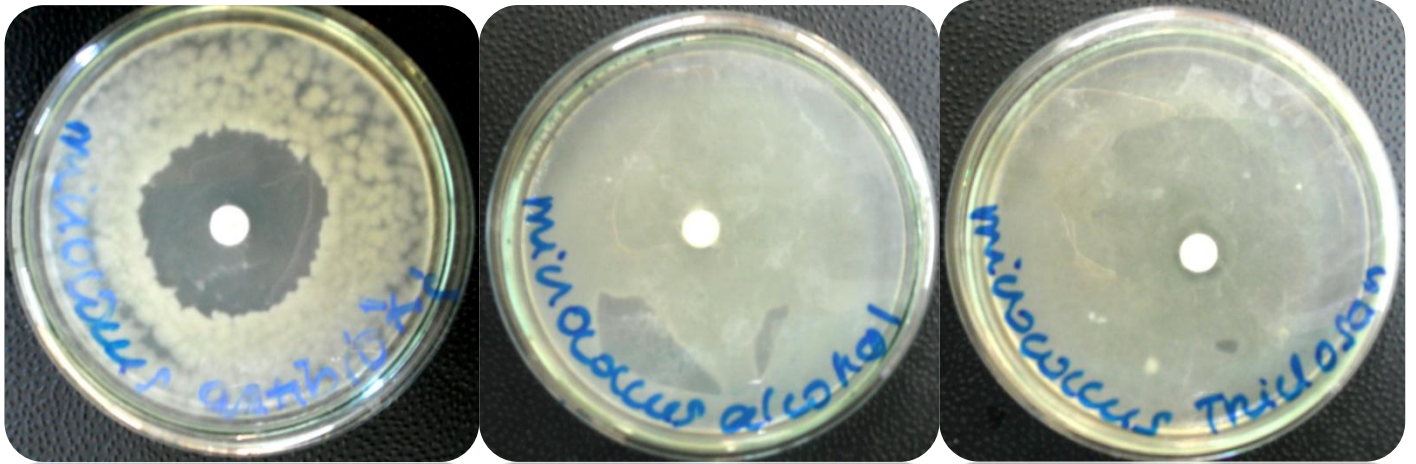
Fotografies:

- Primera sembra:



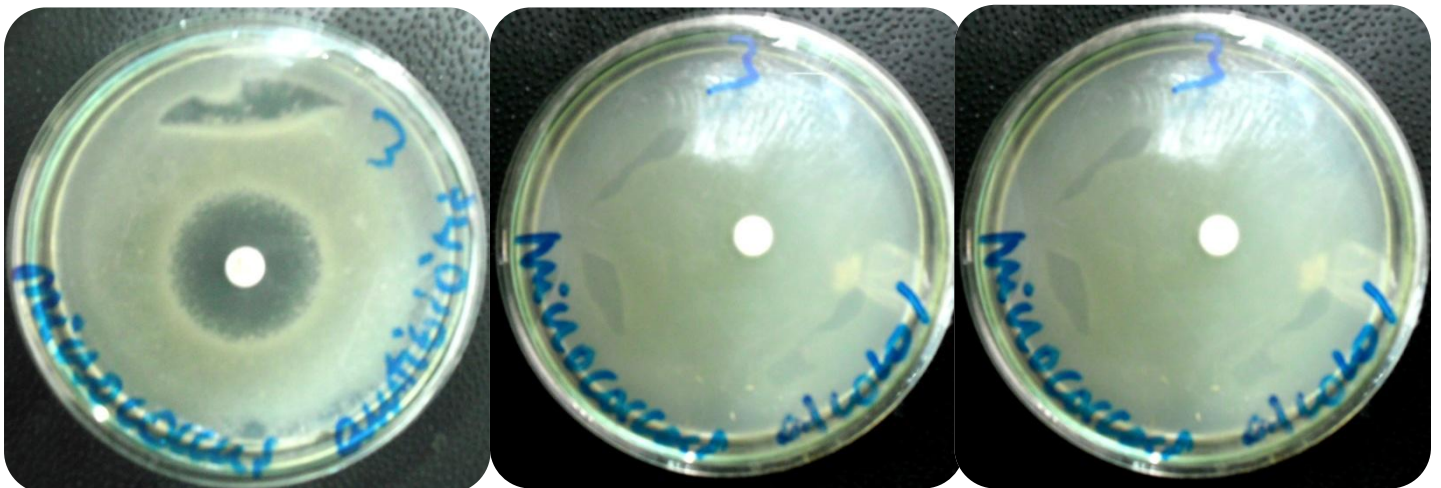
51 Imatge de la primera sembra del bacteri *Micrococcus luteus*. Font: Elena Mrín.

- Segona sembra:



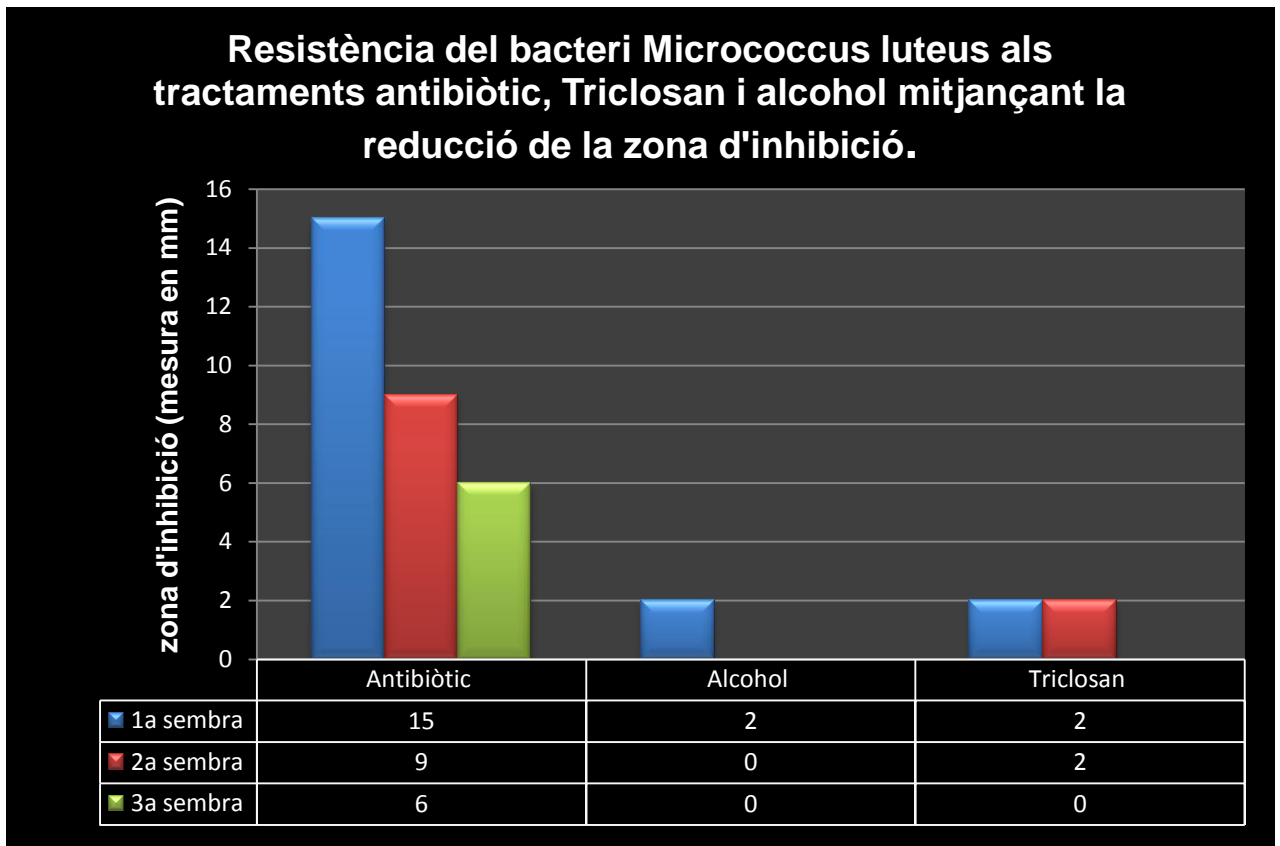
52 Imatge de la segona sembra del bacteri *Micrococcus luteus*. Font: Elena Marín.

- Tercera sembra:

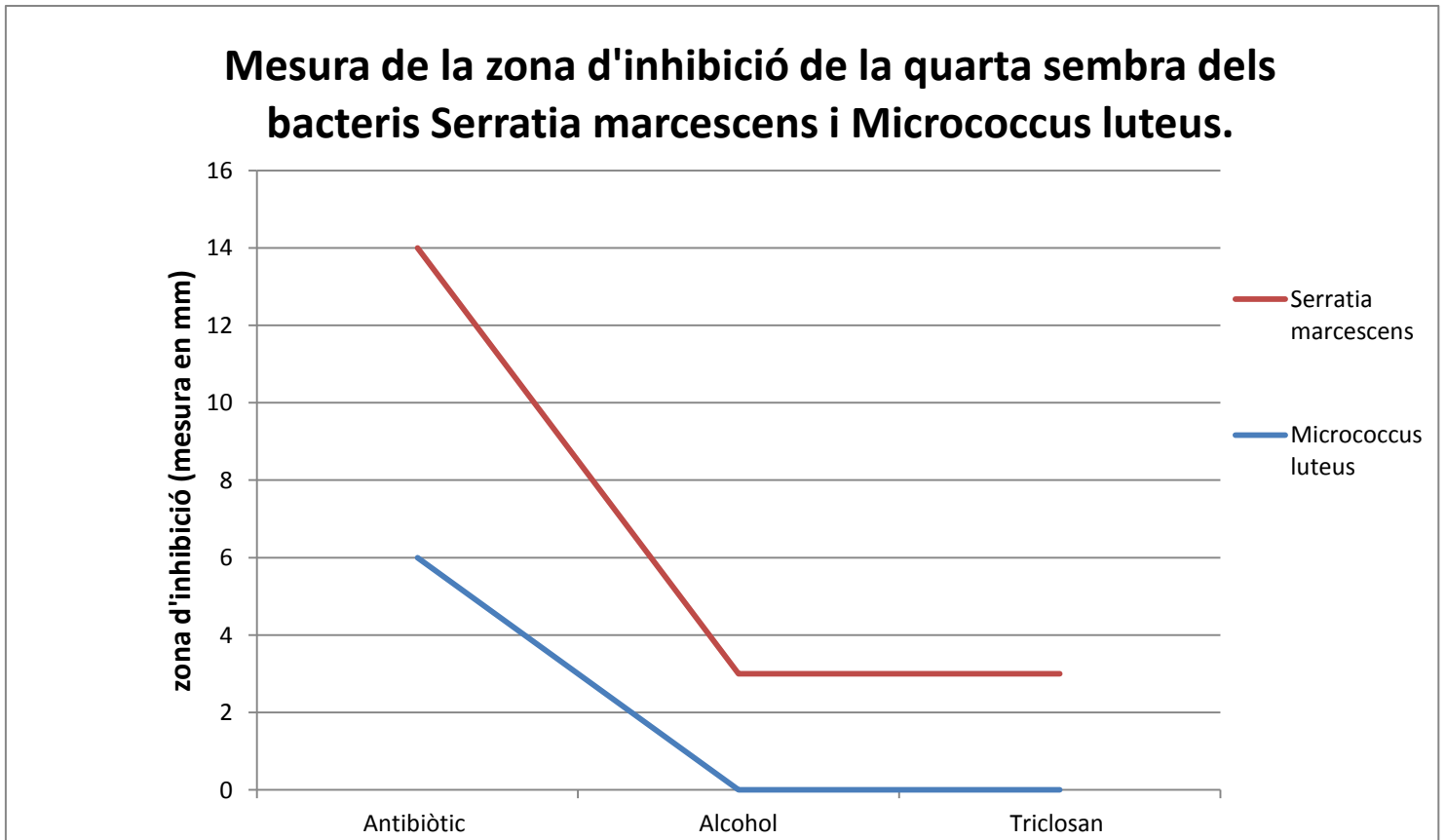


53 Imatge de la tercera sembra del bacteri *Micrococcus luteus*. Font: Elena Marín.

Gràfic:



Gràfic Micrococcus luteus i Serratia marcescens:



20. CONCLUSIONS I ANÀLISIS DE LES DADES:

Durant aquesta experiència al laboratori hem pogut comprovar que hi ha una petita disminució de la zona d'inhibició, això vol dir que cada cop que repetim el protocol, es a dir, seleccionem els bacteris del marge de la zona d'inhibició augmentem el nombre de bacteris resistents.

Respecte a l' hipòtesi inicial "pot ser que els bacteris desenvolupin resistència a mesura que es van posant en contacte amb antibiòtics o biocides" podem dir que és certa ja que a l'inici de la pràctica tots els bacteris no són genèticament iguals, n'hi ha que tenen el gen de resistència i a altres que no, ja que hi ha una variabilitat genètica en la població. Quan s'aplica el tractament o l'antibiòtic, aquest només selecciona els bacteris amb el gen de resistència per selecció natural i així els bacteris resistents transmetran els seus gens a la seva descendència formant una població bacteriana resistent.

Aquest és un procés que porta molts problemes en el món actual a l'hora de curar malalties, ja que quan prenem un antibiòtic cada sis hores sabem que durant aquest temps la concentració d'antibiòtic a la sang és perjudicial per els bacteris i queden eradicats. Ara bé, si deixem de prendre el tractament la concentració mortífera pels bacteris disminuirà i els més resistents per selecció natural sobreviuran passant els seus gens de resistència als altres bacteris, fent una malaltia infecciosa molt difícil de curar i tractar. Per això és molt important seguir les pautes d'un metge i prendre els antibiòtics com cal, per no patir una infecció amb bacteris resistents.

Cada any a Europa més de 25.000 persones moren per infeccions amb bacteris multiresistents també es produeixen 440.000 casos de tuberculosi multiresistent causant més de 150.000 morts en tot el món.

El fet de que cada any apareguin més bacteris resistents no només succeeix a causa dels antibiòtics, sinó també amb biocides com el Triclosan.

L'ús de productes comercials com sabons antibacterians o productes d'higiene personal que contenen aquests tipus de substàncies com el Triclosan, poden produir un augment dels bacteris resistents, perquè el que fem quan els estem utilitzant és seleccionar els bacteris resistents tal i com fem durant la pràctica. Llavors, aquests tipus de productes no són només perjudicials per a la nostra salut sinó que també són nocius per al medi ambient.



54 Dibuix. Font: google imatges.

Hi ha molts productes amb Triclosan que es poden adquirir fàcilment al mercat:

- Els productes d'higiene personal com els cosmètics, per exemple la pasta de dents Eucryl, desodorants i sabons per les mans.



55 Imatge de la pasta de dents Eucryl. Font: farmaciaencasa.com

- Els productes de neteja de l'habitatge com detergents i sabons.



56 Imatge de productes que contenen Triclosan. Font: bacteriasactuaciencia.blogspot.com

Els diferents problemes que he tingut durant la pràctica del treball són que els materials, els filtres de paper de 6mm van arribar massa tard i llavors no he pogut dedicar molt temps en fer més de quatre sembres per bacteri, ja que només amb fer quatre sembres del bacteri *Serratia marcescens* he trigat quasi deu dies en els quals dedicava una hora cada dia en fer la pràctica.

Els segon problema que he tingut és que la bàscula de precisió del laboratori de l' institut no podia mesurar un pes molt petit, ja que per fer una dissolució de Triclosan necessitava 0'0005 gr, així em vaig haver d'adaptar al material del laboratori i vaig fer una dissolució més concentrada amb 0'05 gr de Triclosan.

21. BIBLIOGRAFIA:

Llibres:

- *John.L. Ingraham, Catherine A. Ingraham. Introducción a la microbiología 1. Editorial Reverté S.A.*
- *John.L. Ingraham, Catherine A. Ingraham. Introducción a la microbiología 2. Editorial Reverté S.A.*
- *Antonio Jimeno, Manuel Ballesteros i altres. Biología 1: Grupo Santillana de Ediciones S.A any d'edició 1998.*

Documents electrònics:

Pàgines web:

- *Otto alberto Sussmann P. Resistencia bacteriana [PDF].*
<http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v43n1/0026%20Resistencia.PDF>. [26-9-2011].
- *Resistència a los antibiòtics*
http://es.wikipedia.org/wiki/Resistencia_a_antibi%C3%B3ticos[10-10-2011].
- *Alfredo Embid. Resistencia de las bacterias a los antibiòtics [PDF].*
<http://www.amcmh.org/PagAMC/medicina/articulospdf/53ResistenciaBacterias.pdf> [17-10-2011]
- *Biocidas. <http://es.wikipedia.org/wiki/Biocida> [20-10-2011]*

- *Enrique láñez. Resistencia bacteriana a los antibiòticos.*
http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/21_micro.htm. [3-11-2011]
- *El Triclosán.* <http://es.wikipedia.org/wiki/Triclos%C3%A1n>. [3-11-2011]
- *El alcohol.* <http://es.wikipedia.org/wiki/Alcohol>. [3-11-2011]
- *Kevin L. Anderson, Ph. D. La resistencia de las bacterias a los antibiòticos ¿una resupuesta o un cambio evolutivo?.*
<http://www.sendin.org/ID/resistencia.htm>. [10-11-2011]
- *Serratia marcescens* http://es.wikipedia.org/wiki/Serratia_marcescens. [10-11-2011]
- *Micrococcus luteus* <http://es.wikipedia.org/wiki/Micrococcus>. [10-11-2011]
- *Enrique láñez. Selección de mutantes resistentes.*
<http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/21micro.htm>. [15-12-2011]
- *Enrique láñez. Disminución de la permeabilidad hacia un antibiòtico.*
http://biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/21_micro.htm. [15-12-2011]
- *Enrique láñez. Inactivación enzimática de un antibiòtico.*
http://biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/21_micro.htm. [29-12-2011]
- *Enrique láñez. Modificación química de la diana.*
http://biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/21_micro.htm. [12-11-2012]

- *Enrique Iáñez. Antisépticos y desinfectantes.*
http://biologia.edu.ar/microgeneral/micro-iañez/21_micro.htm. [3-01-2012]
- *Antisépticos.* *<http://es.wikipedia.org/wiki/antis%C3%A9ptico>. [3-01-2012]*
- *Claves para el buen uso de los antibióticos.*
<http://farmacovigilancia.tv/blog/claves-para-el-buen-uso-de-los-antibioticos/>. [6-01-2012]
- *Los productos con Triclosán podrían estar dañando tu salud.*
<http://www.lainx.com/ciencia/3-know/460-los-productos-con-troclosan-podrian-estar-dañando-tu-salud>. [6-01-2012]

22.GLOSSARI:

Biomolècules: molècules que formen part de la matèria viva.

Glicoproteïnes: biomolècula formada per una proteïna i un carbohidrat .

Oligosacàrids: glúcids formats per una cadena curta de monosacàrids.

Monosacàrid: glúcids molt senzills formats de tres a vuit àtoms de carboni, un grup aldehyd o cetona i àtoms d'hidrogen.

Lípid: biomolècules insolubles en aigua i solubles en dissolvents apolars o orgànics que estan formades per dues parts, el cap que és la part hidròfila que té afinitat per l'aigua i la cua que es hidròfoba, es a dir, repel·leix l'aigua.

Enzim: biomolècules o catalitzadors naturals, són molècules que s'encarreguen d'augmentar la velocitat de les reaccions químiques i reduir l'energia d'activació.

Espora: estructura reproductora.