

CIENTÍFICS DE REPARTIMENT

Vigència d'aportacions realitzades pels "Científics de repartiment" per al coneixement de Escherichia coli

Abril del 2012

Autor: Autor 1

Tutor: Tutor 1

Col·legi Bell-lloc del Pla



**"En Microbiologia les coses són molt petites i els noms
són molt grans"**

Gerard Frigola
Presentació del treball "Del 606 a la PCR"
Premi menció especial del Jurat
Certamen Joves Investigadors
Mollina 2005

ÍNDEX

BLOC INICIAL

1. Índex	III-V
2. Presentació	VI y VII

CAPÍTOL 1

BLOC 1: EL LLEGAT DE JULIUS RICHARD PETRI I DE ROBERT WILHELM BUNSEN

1. Introducció	3-8
1.1. Cronologia dels descobriments fonamentals en bacteriologia	3-7
1.2. Cronologia dels descobriments fonamentals en biologia cel·lular.....	8
2. Julius Richard Petri: biografia	9 i 10
3. Les plaques de Petri	10 i 11
3.1. Les plaques d'Agar: tipus de placa de Petri	11
4. Disseny de la placa de Petri	11 i 12
5. Galeria d'imatges	12 i 13
6. Robert Wilhelm Bunsen.....	14

BLOC 2: EL LLEGAT DE HANS CHRISTIAN GRAM

1. Introducció	16 i 17
1.1. Cronologia dels descobriments de bacteris	16
1.2. Origen i evolució dels bacteris	16 i 17
2. Hans Christian Gram: biografia	17 i 18
3. La tinció de Gram	19-21
3.1. Mètode de la tinció de Gram.....	20
3.2. Què passa durant la tinció de Gram?	20
3.3. Teories per explicar la tinció de Gram	21
3.4. Bacteris que resisteixen la tinció i causes que la alteren	21
4. Bacteri Gram-positiu	22
5. Bacteri Gram-negatiu	22-24
6. Realització d'una tinció de Gram	24-28
7. Antibiòtics	28 i 29
8. Galeria de prospectes d'antibiòtics	30-35

BLOC 3: EL LLEGAT DE THEODOR ESCHERICH

1. Introducció	37
2. Biografia	37 i 38
3. Què es la <i>E. coli</i> ?.....	38-43
3.1. La <i>E. coli</i> en la història	39 i 40
3.2. Patogènia.....	41
3.2. Brots de <i>E. coli</i>	41-44
3.2.1. Només contamina carn, la <i>E. coli</i> ?	42
3.2.2. Suc de poma	44
3.2.3. Granges de mascotes	44
3.2.4. Aigua	44
3.2.5. La <i>E. coli</i> està aquí per... quedar-se?.....	43-45
4. Genètica comparativa i ADN en soques de <i>E. coli</i>	46-53
5. Genètica comparativa <i>E. coli</i> CFT073 i <i>E. coli</i> EDL933	53-54
6. Genètica comparativa <i>E. coli</i> K12 i <i>E. coli</i> O157:H7.....	54-56
7. Comparació <i>E. coli</i> O157:H7 i <i>E. coli</i> K12	59-61

CAPÍTOL 2

BLOC 1: TREBALL EXPERIMENTAL

1. Introducció	63
2. Medis de cultiu	63-67
2.1. Agar nutritiu	63-65
2.2. Agar McConkey	65
2.3. Agar manitol sal	66 i 67
3. Cultiu de bacteris	67-69
4. Recompte de microorganismes d'una mostra natural	69-72
5. Determinació d'individus portadors de <i>S. aureus</i>	73
6. Sensibilitat de diferents soques de <i>E. coli</i> a antibiòtics d'ús comercial	73-80
6.1. Introducció	73
6.2. Material i mètode	73-80
6.2.1. Soques bacterianes	73 i 74
6.2.2. Antibiòtics	75 i 76
6.2.3. Antibiogrames	76-78
6.2.4. Variació de la sensibilitat durant el creixement	79 i 80

BLOC 2: RESULTATS I CONCLUSIONS

1. Cultiu de bacteris	82-84
2. Recompte de microorganismes d'una mostra natural	85
3. Determinació d'individus portadors de <i>S. aureus</i>	85-87
4. Sensibilitat de diferents soques de <i>E. coli</i> a antibiòtics d'ús comercial	88-96
4.1. Sensibilitat durant el creixement	90-95
4.2. Resultats de las comparacions dels halos d'inhibició	95 i 96
5. Conclusions	97

BLOC 3: BIBLIOGRAFIA, APÈNDIX I AGRAÏEMENTS

2. Bibliografia	99-101
3. Apèndix	102-123
3.1 Més informació	102
3.1 Deltalab, preparadora de càpsules de Petri	102-104
3.2 Relació entre <i>E. coli</i> i l'aigua de consum humà	104-108
3.3 Articles de premsa	109-112
3.4 Soques de <i>E. coli</i> en la CECT i la DSMZ	112-120
3.5. Obtenció de la imatge de Julius Richard Petri	121-123
4. Anotacions	124
5. Agraïments	125 i 126

PRESENTACIÓ

Fa cinc anys que vaig experimentar una gran sorpresa. Vaig descobrir, al laboratori de biologia de la meua escola, un objecte anomenat "Càpsula de Petri". Jo ja coneixia el material científic però al creador de les càpsules, no. En conclusió, aquest senyor va descobrir un gran objecte de la ciència, per a la ciència, que encara s'usa avui dia.

Dins dels límits d'un petit treball estudiaré la ciència experimental, passant amb parada per Julius Richard Petri i les famoses càpsules de Petri que s'usen encara avui, donant un salt al passat per donar detalls sobre els precursors, els antecessors de les càpsules.

En segon lloc, el meu tutor va proposar afegir al treball la tinció de Gram i al seu creador. Jo em vaig quedar bastant sorprès perquè del nom que vaig rebre només coneixia "tinció de". Gram, vaig pensar, qui seràs? Havia de buscar una resposta a la meua pregunta, i vaig decidir interessar-me pel senyor Hans Christian Gram. Per sobre d'això, consta en aquest projecte de recerca, és a dir, que anem a descobrir coses sobre el senyor Gram que segur seran fantàstiques de conèixer i de donar a conèixer.

Quan s'acostava l'estiu, va tenir lloc un succés que em va cridar l'atenció: els cogombres contaminats, segons deia Alemanya, per una soca del bacteri *E. coli*. Tenia l'oportunitat perfecta per fer constar un tema de molta actualitat i d'importància mundial en el meu treball. No només parlaré d'*E. coli*, sinó també del seu descobridor, Theodor Escherich.

Estic segur que la part més difícil del treball és escollir el tema. A mi no em va costar molt, la veritat. Ho tenia clar des de feia temps. Només em feia falta el tutor per posar-me mans a l'obra. Manel Montoliu, el meu tutor, em va precisar de ser conscient que necessitaria unes hores, però que no em dediquéss més a la feina que als estudis. Tot i així m'ha costat, perquè el tema és original i té potència en el nivell de treball de recerca.

Anem ara a l'important. El perquè del títol, "Científics de repartiment". Vostès es preguntessin el motiu de "repartiment". Això ho desvetllament ara, tot i que la majoria de vostès ja sabran el perquè. Científics "de repartiment", com els actors de repartiment, són personatges, en el nostre cas científics, que són molt importants en la història de la ciència, més en aquest treball en la història de la microbiologia. Però aquesta història no és passada, sinó que és passada, present i futura. La microbiologia és l'única ciència que té una metodologia pròpia, una forma de treballar autènticament desenvolupada per aquesta ciència. Per exemple, la genètica fa servir tècniques d'una altra ciència, de la química, per a separar les cadenes d'ADN. Tot i així, no saben a hores d'ara del tot qui eren, ni què van fer, però els puc assegurar que s'aprèn molt d'ells i descobreixes que haurien d'existir uns Nobel, o qui sap si uns Oscar, per als científics de repartiment que sembla al món que juguen un paper secundari però estem equivocats: són clars caps d'aquest món de la ciència i, especialment, de la microbiologia.

És veritat que és molt difícil i que ha estat molt difícil trobar un punt de contacte entre Gram i Petri, i fins i tot Escherich. Però si enfoquem aquest treball cap a la tècnica microbiològica que com acabo de dir és l'única ciència que té la seva pròpia tècnica, perfeccionada al llarg dels anys, trobem constants relacions. Ja veurem relacions d'ara endavant, però la més clara té a

veure amb la *E. coli*, de la qual aquest treball té uns punts a tractar des enfocament estàtic, és a dir més teòrics, i des enfocament dinàmic a través d'una sèrie d'experiments que podrem contemplar en el segon capítol del meu treball.

Però es pot donar aquí una breu introducció. Hi ha una relació clara que passa per la *I. coli* que es podria explicar com si d'una endevinalla es tractés: on cultivem la *I. coli* en un laboratori? Com sabem si és un bacteri Gram-positiu o negatiu? A què es deu *Escherichia* ja què, *coli*?

Però cal dir que els científics de repartiment, com veurem més endavant, són els que han donat unes aportacions que segueixen vigents. En el cas de Petri s'ha fet un canvi de vidre a plàstic. S'han desenvolupat plaques més noves, quadrades i de diferents diàmetres però l'essència Petri segueix mantenint. Un altre exemple és el de la tinció de Gram. És la mateixa, amb alguna modificació per perfeccionar la tècnica. Seguim mantenint unes tècniques desenvolupades fa més de dos segles. ¡Increïble! Visca els científics de repartiment! Així concloco la presentació a aquest treball.

Salt, 10 d'agost del 2011

CAPÍTOL 1

Qui són els Científics de repartiment?

TREBALL DE RECERCA

BLOC 1

EL LLEGAT DE JULIUS RICHARD PETRI I
DE ROBERT WILHELM BUNSEN

1. INTRODUCCIÓ

1.1 CRONOLOGIA DELS DESCOBRIMENTS DE BACTERIS¹

Ja en l'Edat Mitjana es va arribar a la hipòtesi de l'existència d'una sèrie de microorganismes. En el *Cànon de Medicina*² es va plantejar que les secrecions corporals estaven contaminades per una multitud de cossos estranys i infecciosos, abans que una persona caigués malalta. Tot i això, no es va arribar a la identificació d'aquests cossos com a causants de les malalties.

Quan la pesta negra va arribar a terres d'al-Andalus, al segle XVI, dos poetes i escriptors d'al-Andalus, Ibn Khatima i Ibn al-Jatib van manifestar que les malalties infeccioses eren causades per entitats de contagi, que entraven en el cos humà.

Vegem ara aquest quadre dels "Caçadors de microbis", ordenats respectivament per ordre de naixement, no de defunció. Després donaré breus notes biogràfiques de cada caçador de microbis, que apareixen en el llibre "Caçadors de microbis" de Paul de Kruif.



¹ Informació, cites i biografies extretes i modificades de: KRUIF, Paul de. *Los cazadores de microbios*. Editorial Porrúa S.A. Méjico. 2006.

² Enciclopèdia mèdica de 14 volums escrita pel científic i metge musulmà persa Avicena, al voltant de l'any 1020. El llibre es basava en una combinació de la seva pròpia experiència personal, de medicina islàmica medieval, dels escrits de Galè, així com de l'antiga medicina persa i àrab.

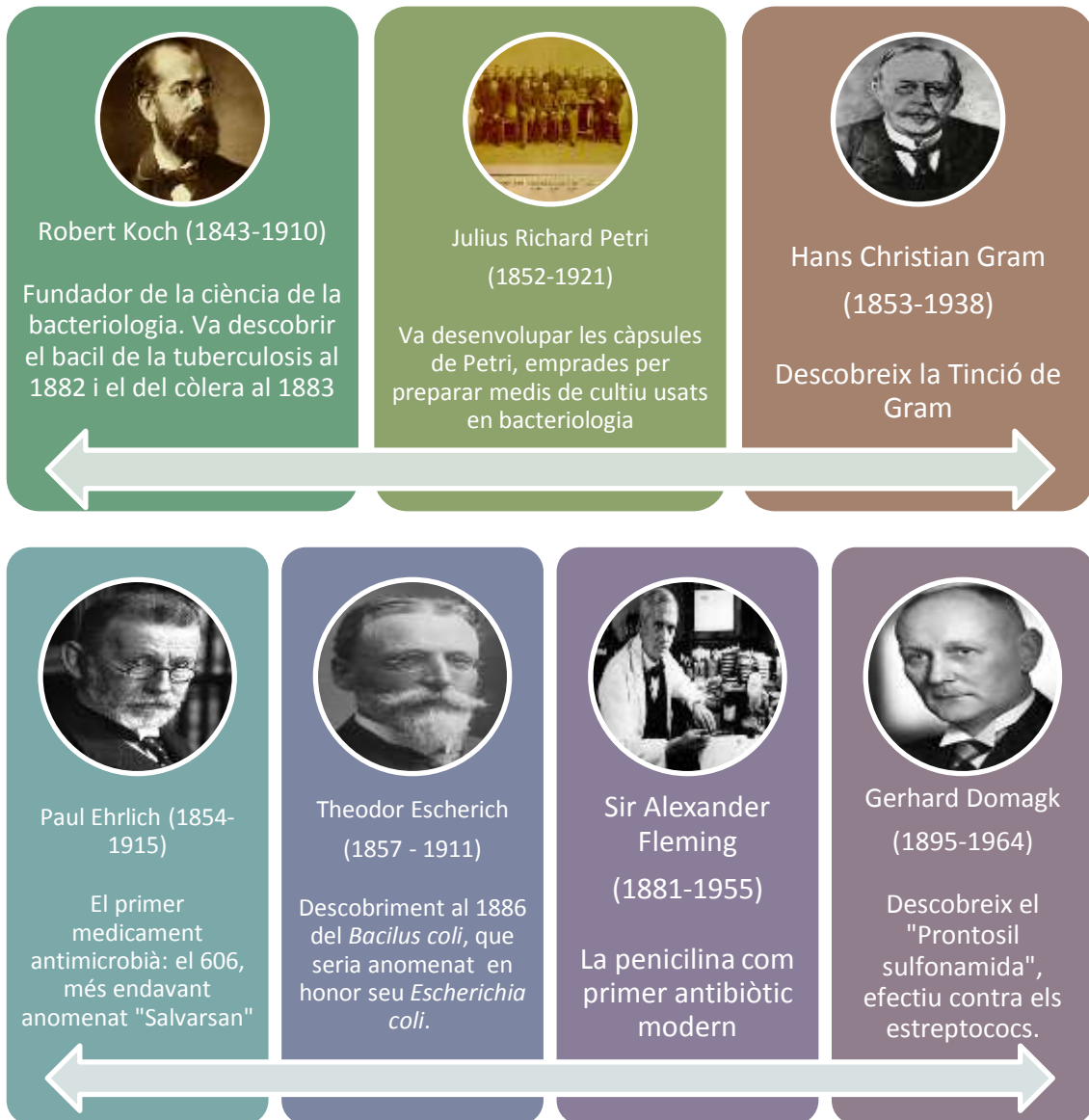


Figura 1.1. Quadre dels caçadors de microbis més importants i coneguts. Inclou un breu resum de les seves fites més destacades. A1'11

Més endavant, al 1676, Anton van Leeuwenhoek va usar un microscopi de lent simple, que ell mateix va dissenyar gràcies al qual van ser observades els primers bacteris. Al principi les va denominar "animalícules" i va publicar fins i tot les seves observacions en unes cartes que va enviar a la Royal Society³, datades el 7 de setembre de 1674, carta en la qual evoca per primera vegada les minúscules formes de vida que va observar en les aigües d'un llac prop de Delft, una altra del 20 de desembre del 1675 i una altra del 22 de gener de 1676.

³ La *Royal Society of London for Improving Natural Knowledge* és la més antiga societat científica del Regne Unit i una de les més antigues d'Europa.

Més tard, el 1828, va ser introduït el nom de bacteri per Christian Gottfried Ehrenberg⁴. Bacteri deriva del grec bacterion-a, que significa "bastó petit".

Anton van Leeuwenhoek va observar aquests microorganismes mentre ell, completament abstret, agafava un tubet de vidre, que escalfava roent i l'estirava fins donar-li el gruix d'un cabell. Ara, el nostre distret home, amb ulls dilatats, trenca el tub en trossets, surt al jardí i s'inclina sobre un atuell de fang que hi ha allí per mesurar la quantitat de pluja caiguda. Torna al laboratori, enfila el tubet de vidre a l'agulla del microscopi. Llavors crida la seva filla Maria, de 19 anys, i li diu: Vine aquí! Ràpid! A l'aigua de pluja hi ha uns animalons! Neden! Donen voltes! Són mil vegades més petits que qualsevol de les bestioles que podem veure a simple vista! Mira què he descobert!

Van Leeuwenhoek va treure el cap per primera vegada a un món nou i misteriós poblat per milers de diferents espècies d'éssers diminuts, alguns molt ferotges i mortífers, altres estris i benèfics, i fins i tot molts la troballa ha estat més importantíssim per a la Humanitat que el descobriment de qualsevol continent o arxipèlag. Aquesta és la vida del primer caçador de microbis. És la història de l'audàcia i la tenacitat que el van caracteritzar, i que són atributs d'aquells que moguts per una infatigable curiositat exploren i penetren un món nou i meravellós⁵.

"S'aturen; queden immòbils, com en equilibri sobre un punt, després giren amb la rapidesa d'una baldufa, descrivint una circumferència no més gran que un granet de sorra". Així els va definir Leeuwenhoek, com ens explica el llibre "Els caçadors de microbis", de Paul de Kruif.

És important recordar a Lazzaro Spallanzani, nascut a Scandiano, poble del nord d'Itàlia, al 1729. És un altre caçador de microbis. Lazzaro Spallanzani era un nen estrany que recitava versos al mateix temps que feia coques de fang, que va oblidar aquests passatemps per realitzar experiments cruels i infantils amb escarabats, mosques i cucs, i que, en lloc d'assetjar a preguntes als seus pares, examinava atentament els éssers vius de la naturalesa, els arrencava potes i ales i tractava després de tornar-les a posar en el seu primitiu lloc: estava decidit a saber tots els secrets que amagava la natura. Spallanzani demostra la falsedat de la doctrina de la generació espontània⁶.

Trenta-dos anys després de la mort del gran Spallanzani, al 1831, la caça de microbis es trobava estacionada. Els animals microscòpics es trobaven sumits en el menyspreu i l'oblit, mentre que altres ciències aconseguien ràpids progressos. Es dissenyaven nous microscopis, es va inventar el telègraf, però a ningú se li acudia fer servir els microscopis per demostrar que certs animalons posseïen capacitats. Ni s'insinuava la possibilitat que aquests menyspreables microbis fossin capaços de matar misteriosa i sigilosament a milions d'éssers humans.

⁴ Christian Gottfried Ehrenberg (19 d'abril del 1795 – 27 de juny del 1876) va ser un naturalista, zoòleg i microscopista alemany, dels més famosos de la seva època.

⁵ Cita del llibre "Caçadors de microbis".

⁶ La Generació espontània suggeria que a partir de matèria inerta podia néixer vida animal y vegetal.

Un dia d'octubre de 1831, un nen de nou anys s'apartava, horroritzat, de la gentada aglomerat a la porta de la ferreria d'un petit poble situat entre les muntanyes de l'est de França. Enmig de les exclamacions de por de la multitud, el nen percebia el grinyol que brollava de la carn humana en ser cremada pel ferro escalfat al vermell blanc, i els gemecs de la víctima. El nen era Louis Pasteur.

En el transcurs de diverses setmanes, vuit víctimes més del llop rabiós van morir amb les goles resseques pels sufocants turments de la hidrofòbia. Els seus xiscles ressonaven a les orelles d'aquesta criatura tímida. El 1831 ningú coneixia la causa de la mort de les persones mossegades per gossos rabiosos, doncs l'origen de totes les malalties era un misteri.

Pasteur és un dels grans científics de tots els temps i és considerat el pare de la bacteriologia moderna. L'avanç científic de Louis Pasteur va avançar i va millorar la qualitat de vida de l'ésser humà. Ha permès que productes bàsics per a l'ésser humà, com la llet i el formatge, puguin ser transportats sense descompondre. En la pasteurització, una part important en el seu llegat, es vol disminuir la presència d'agents patògens capaços de provocar intoxicacions alimentàries a l'ésser humà. La primera pasteurització realitzada va tenir lloc el 20 d'abril de 1864 per Louis Pasteur i el seu col·lega Claude Bernard.



Figura 1.2. Un conjunt d'imatges on podem veure els matrassos de coll de cigne de Louis Pasteur així com el quadre de Lazzaro Spallanzani que Pasteur tenia a casa seva, perquè per Pasteur Spalanzani era un exemple a seguir. Imatges del meu tutor de treball de recerca, Tutor 1, en la seva visita a l'Institut Pasteur.

Mentre Pasteur treia el cap a la Societat amb els seus descobriments, un jove alemany anomenat Robert Koch nascut el 11 de desembre 1843 a Clauthal (Hannover, Alemanya) estudiava ja a la universitat.

Koch, després de casar-se amb Emmy Fratz es va dedicar a la medicina rural, sense vocació d'això. La seva dona, el dia del seu vintè aniversari li va regalar un microscopi, amb el que va observar les primeres gotes de sang, concretament de cadàvers d'ovelles. En aquestes observacions, Koch veia filaments vius que no estaven en la sang: es trobaven en l'àntrax⁷. Llavors sabia que estaven vius i fins i tot que es multiplicaven.

El 24 març 1882 va presentar una sèrie de descobriments. Aquesta presentació va ser un gran èxit. Koch havia descobert el bacil de la tuberculosi, i en poques hores ja es coneixia la notícia en gran part del món. Però després va començar una cursa entre Pasteur i Koch, o França i Alemanya, per descobrir el microbi del còlera, descobert per Robert Koch.

Koch ha contribuït a la societat per descobrir els bacils del còlera i de la tuberculosi, però també per establir les bases de la microbiologia clínica en establir els postulats de Robert Koch, unes regles per saber si un microorganisme és o no causant d'una malaltia determinada. Diuen que un determinat microorganisme pot només ser considerat responsable d'una malaltia específica quan es constati la seva presència sempre que es doni aquesta malaltia i no altres. El microorganisme en qüestió s'ha de poder cultivar fora de l'organisme i separat de qualsevol altre bacteri. La implantació de cultius purs en animals experimentals ha de produir-hi la mateixa malaltia. El patogen ha de poder ser aïllat, en cultiu pur, a partir d'un animal de laboratori infectat experimentalment.

Robert Koch va morir el 27 de maig de 1910 a Baden-Baden (Gran Ducat de Baden, Alemanya).

Paul Ehrlich també té el seu lloc en aquestes pàgines. Ehrlich va néixer el 14 de març de 1854 a Silèsia (antiga Alemanya, actual Polònia). Ehrlich era una mica diferent, i va destacar a l'institut de Bresla i a les facultats de medicina de les universitats de Breslau, Estrasburg, Friburg i Liepzig. En una ocasió, Ehrlich va distingir el bacil de la tuberculosi en una observació de fetge malalt, sense saber que era el bacil i, per aquest motiu no li va donar cap importància.

Uns anys després va començar a caçar microbis amb gran entusiasme fins contreure la tuberculosi als seus trenta-quatre anys d'edat. En tornar a la feina, va exercir la medicina, tenint sempre el cap en els resultats dels seus experiments. Poc després se'n va anar a treballar amb Koch a l'Institut que aquest dirigia a Berlín.

La contribució principal d'Ehrlich a la medicina va ser la teoria de la immunitat de cadena lateral, que establia la base química a les respostes immunològiques del cos humà. Defensa que les cèl·lules tenen receptors units a grups químics. També va descobrir al 1901 el 606, el salvarsán, fruit de 606 experiments. El 1908 va rebre el Premi Nobel de Fisiologia i Medicina amb el bacteriòleg rus Ilya Mechnikov en reconeixement als seus respectius grans treballs. Paul Ehrlich ens va deixar el 20 d'agost de 1915 a la ciutat alemanya d'Hamburg.

⁷ Una enfermetat capaç d'afectar l'home i altres homeòterms (éssers que mantenen la seva temperatura corporal).

Catorze anys abans de la mort de Paul Ehrlich, un jove va néixer al 20 de febrer de 1901 a Saint Brice (França). Aquest jove era René Jules Dubos. Jules Dubos va estudiar al Collège Chaptal, i després a l'Institut Agronòmic de París i, posteriorment, a l'escola d'Agricultura Colonial. Va emigrar a EUA el 1924, on es va doctorar en medicina per la Universitat de Rutgers. Dubos ha aportat moltes coses a la bacteriologia, però especialment l'aïllament de substàncies antibacterianes, contribuint així al desenvolupament d'antibiòtics.

Dubos va descobrir la seva vocació i es va posar a estudiar microbiologia. Mentre estudiava, també exercia com a guia turístic. Poc temps després, en la seva tesi doctoral, Dubos va investigar els microorganismes que degradaven la cel·lulosa present en la terra. L'any 1930 va aïllar un bacteri que contenia un enzim capaç de descompondre la paret bacteriana d'un bacil.

Al 30 d'octubre 1895 va néixer Gerhard Johannes Paul Domagk, a Lagow (Brandenburg, Alemanya). Va estudiar a Sommerfeld i més endavant en la facultat de medicina de la Universitat de Kiel. A l'esclatar l'any 1914 la Primera Guerra Mundial va exercir serveis en l'exèrcit. Durant aquest temps va quedar sorprès pel desemparament dels metges davant del còlera.

L'any 1918, ja acabada la Primera Guerra Mundial, Domagk va continuar els seus estudis fins graduar-se en Kiel el 1921. Vuit anys més tard, es va construir un nou institut per a la investigació sobre patogènia. Va trobar que la sulfonamida prontosil⁸, un fàrmac capaç de provocar la mort d'un bacteri, era efectiva contra les infeccions causades per estreptococs, tractant la seva pròpia filla amb ella, amb el que va aconseguir evitar l'amputació d'un dels seus braços. Aquest descobriment li va fer guanyar al 1939 el Nobel de Medicina i Fisiologia. Al final es va retirar a la universitat de Münster, on es va dedicar a l'estudi experimental del càncer. Domagk va morir el 4 d'abril de 1964, a Burgberg (Alemanya).

Ja l'últim caçador de microbis: Alexander Fleming. Fleming va néixer el 6 d'agost de 1881 a Lochfield (Gran Bretanya). Fleming va treballar com a metge a l'hospital St. Mary de Londres fins a principis de la Primera Guerra Mundial. Durant aquesta guerra, va ser metge en els fronts de França. Aleshores, després de la guerra, va tornar a l'hospital.

S'atribueixen actualment dos descobriments a sir Alexander Fleming: en primer lloc, va descobrir la lisiozoma⁹, un enzim capaç de malmetre les cèl·lules bacterianes, després de contaminar accidentalment amb un esternut un cultiu de bacteris en una placa Petri.

El seu següent descobriment va tenir lloc el 22 de setembre de 1928. Aquest dia Fleming inspeccionava els seus cultius i va veure que una colònia bacteriana es trobava al voltant del fong, la *Penicillium notatum*. Aquesta és una floridura que produeix una substància natural amb efectes antibacterians: la penicilina. Aquest descobriment va ser comunicat el 1929, després que els seus col·legues i la mateixa comunitat científica va subestimar les seves troballes.

⁸ Fàrmac capaç de provocar la mort a una cèl·lula bacteriana.

⁹ Enzim capaç de malmetre les cèl·lules bacterianes.

1.2 CRONOLOGIA DELS DESCOBRIMENTS DE CÈL·LULES

La història de la biologia cel·lular pertany als entorns d'un possible desenvolupament tecnològic per sustentar l'estudi de les cèl·lules Així doncs, la primera manifestació d'això s'inicia amb la popularització de microscopis de lents, compostos al segle XVII. Es va arribar a unes aproximacions a l'estudi mòbil. Així fins al segle XX en el qual s'aconsegueix un millor i major nivell de resolució gràcies al microscopi electrònic, invenció d'Ernst Ruska.



Figura 1.3. Fris cronològica sobre l'evolució dels descobriments de cèl·lules. A1'11

2. JULIUS RICHARD PETRI: BIOGRAFIA



Figura 1.4. Una imatge de grup en què apareix J.R. Petri. La imatge la he rebut del museu Robert-Koch de Berlín. © Robert Koch Museum, Berlin.

Julius Richard Petri va néixer un 31 de maig de 1852, a la ciutat de Bremen. En un posterior 20 desembre del 1921, J.R. Petri va morir a Zeitz. Les dues ciutats esmentades pertanyen a la República Alemanya. La imatge que han pogut veure és de grup¹⁰.

És conegut per ser un gran bacteriòleg alemany, a qui a més se li atribueix la invenció de la placa de Petri, quan es trobava treballant com a ajudant de Robert Koch, l'any 1877. Això va tenir lloc quan exercia com a metge militar assignat al *Kaiserliches Gesundheitsamt*¹¹, on precisament va estar com ajudant de Robert Koch, entre 1876 i 1882. Més tard, entre 1882 i 1885, va ser director del sanatori antituberculós de Göbersdorf, que depenia del *Kaiserliches Gesundheitsamt*.

Després de realitzar els seus estudis primaris i secundaris, va estudiar medicina a la *Kaiser Wilhelm-Akademie für des militärärztliche Bildungswesen* per a metges militars entre 1871 i 1875. Va realitzar el doctorat com a metge a la *Charité de Berlín*¹², grau que va obtenir el 1876.

L'any 1877 va inventar la placa Petri. Aquesta s'utilitza en els laboratoris principalment per al cultiu de microorganismes. Llavors se solia cobrir el fons amb diferents mitjans sòlids de cultiu, segons el microorganisme que es volia cultivar. Per aquesta època i gràcies a la invenció de les plaques s'aïllen la majoria dels microorganismes, responsables de les malalties contagioses. Tot gràcies al senyor Petri i el seu model de placa de Petri que ha anat evolucionant des del vidre fins a les plaques un sol ús.

Seguint una mica la biografia, dir que l'any 1886, Julius Richard Petri va ser Kurator, és a dir, curador, del "Museu d'Higiene de Berlín". Des 1889 va ser membre del *Kaiserliches Gesundheitsamt*. Es va jubilar al 1900, amb el títol de Geheime Regierungsrat, director general.

3. LES PLAQUES DE PETRI

Una placa de Petri és en l'actualitat un platet de plàstic que s'usa en laboratoris, tant de biologia, com de química. Especialment es fa servir per al cultiu de cèl·lules, de bacteris i d'altres petits organismes. Les plaques, com he dit amb anterioritat, deuen el seu nom al seu inventor, el senyor Julius Richard Petri, qui les va inventar quan treballava com a ajudant de Robert Koch.

Les plaques de Petri les podem trobar de diferents materials. Per exemple, les de vidre, que caldrà esterilitzar per a la seva reutilització. Les més comunes ara són les plaques un sol ús, ja esterilitzades i fabricades en plàstic. Les modernes plaques de Petri tenen uns anells a les tapes i en les bases per així poder apilar les plaques i evitar que unes llisquin amb altres. Llavors, es poden ajuntar diverses plaques en un recipient. Així tenim una placa "multi-bé".

¹⁰ Veure apèndix 6 (Capítol 2, bloc 6, punt 6).

¹¹ És la oficina imperial de la salut, a Alemanya.

¹² La *Charité - Universitätsmedizin* de Berlín es la facultat de medicina de la Universidad Libre de Berlín y la Universidad Humboldt de Berlín. Es el hospital universitario más grande de Europa.

Una placa de Petri té també la accepció de placa de Agar¹³, en estudis de microbiologia. Aquesta placa està parcialment plena amb líquid calent, agar¹⁴ i una mescla d'ingredients, que contenen per exemple sang i nutrients. Després es deixa que l'agar es refredi i es solidifiqui estant la placa preparada per rebre una mostra de microbis o de bacteris.

Ara podrien estar preguntant-se si la placa de Petri segueix sent l'eina més utilitzada i la bàsica per fer cultius de bacteris o en la microbiologia. La resposta és que ha patit alguns canvis, escassos però existents com els canvis de material, de vidre a plàstic, o els de forma, de circular a molts altres tipus i mides, per adequar-se més i millor a les necessitats dels diferents cultius. Aquesta informació ha estat cedida per Deltalab, una empresa que prepara càpsules de Petri i molts altres més materials de laboratori. A l'apèndix trobarem un escrit breu sobre què és i què fa aquesta empresa, amb seu a Rubí (Barcelona).

3.1 LAS PLAQUES AGAR: TIPUS DE PLACA DE PETRI

La placa d'Agar és un tipus de placa de Petri que conté un mitjà de cultiu. Aquesta s'usa en microbiologia per el cultiu de microorganismes i fins i tot es poden afegir antibiòtics perquè el medi sigui selectiu. Després, els microorganismes col·locats a la placa creixeran en colònies individuals. Així es pot utilitzar la placa per estimar la concentració de microorganismes en un cultiu, si fem servir un comptador de colònies.

4. **DISSENY DE LA PLACA DE PETRI**

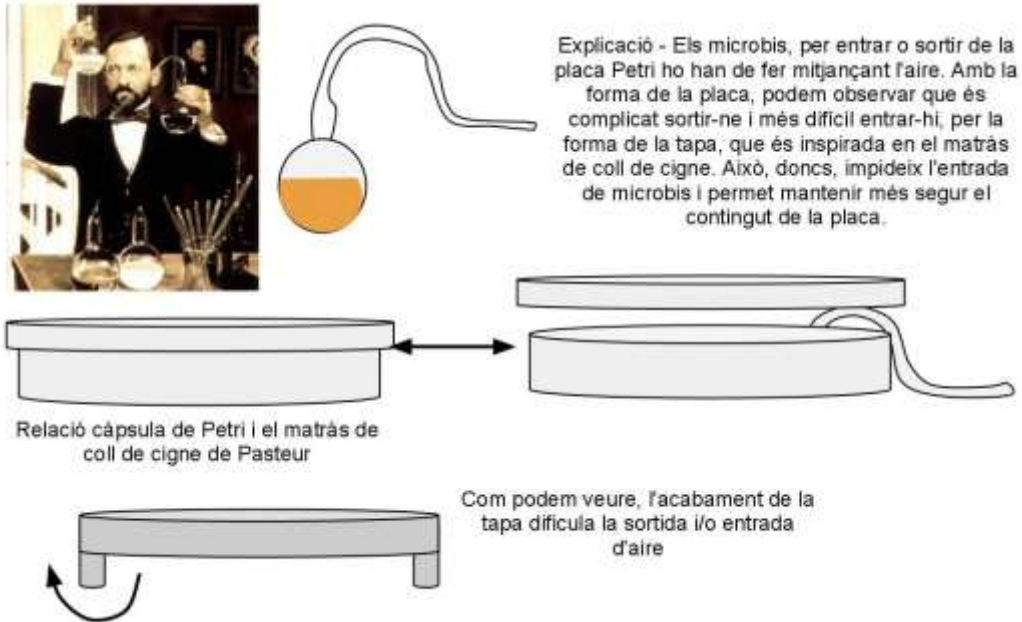
En l'experiment de Pasteur, van ser usats colls llargs i corbs on va col·locar un brou prèviament bullit. La part interessant és que l'aire entrava però no feien el mateix els microbis, com volia el Dr. Petri que passés. Per aquest motiu, la placa de Petri està "inspirada" en el matràs de coll de cigne de Louis Pasteur.

L'experiment seguia d'aquesta manera: es conserva el líquid o contingut estèril indefinidament, només contaminant-se el mateix en trencar el coll del matràs. D'aquesta manera no sorgeix vida a partir de matèria inerta, ja que no poden entrar els microbis, tal com defensava la Teoria de la Generació Espontània.

Gràcies a aquest fet és com Pasteur va aconseguir també, com el gran Lazzaro Spallanzani, mostrar l'equivocació de la teoria de Generació Espontània. En podem veure una figura descriptiva a la següent pàgina.

¹³ Una placa de agar és una placa Petri, que conté un medi de cultiu, que es fa servir en microbiologia.

¹⁴ Agar-agar o agar és una substància gelatinosa derivada d'algues. Té origen als mars del sud d'Àfrica. És incolor, insípid i absorbeix molta aigua, formant una gelatina.



5. GALERIA D'IMATGES



Figura 1.5. Placa Petri, tres compartiments 90 x 14 mm

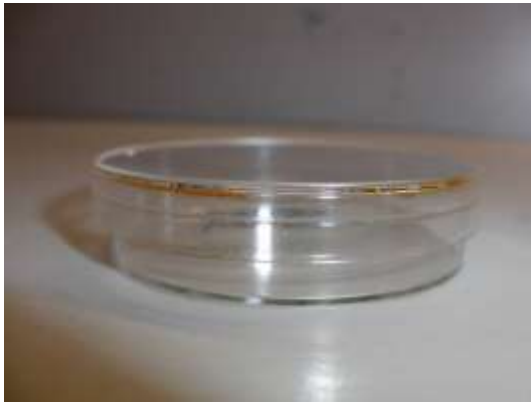
Figura 1.6. Placa Petri quadrada. Mides de la placa: 120 x 120 mm



Figura 1.7. Placa Petri de 90 x 14 mm. Aquesta és la placa estàndar



Figura 1.8. Un cultiu en una placa Petri de mides 55 x 14 mm



Figures 1.9, 1.10 i 1.11. Plaques de Petri "reliquia". Aquestes plaques estan fabricades en vidre i abans d'usarles cal esterilitzarles, a diferència de les de plàstic, que ja vénen esterilitzades

6. ROBERT WILHELM BUNSEN

Robert Wilhelm Bunsen va ser un químic alemany que va destacar per desenvolupar, amb l'ajuda del seu assistent Peter Desaga, l'encenedor Bunsen. A nivell biogràfic dir que va néixer a Göttingen el 31 març 1811 i que va morir el 16 d'agost del 1899 en Heidelberg.

L'encenedor Bunsen va ser inventat al 1857 per Robert Wilhelm Bunsen, amb l'ajuda de Peter Desaga, com acabem de veure. Aquest encenedor proveeix una transmissió rapidíssima de calor intensa, cremant gas, sent la flama una barreja de gas i aire. Es fa servir per escalfar o esterilitzar mostres o reactius químics.



Robert
Wilhelm
Bunsen
(1811-1899)

Un Bunsen (figura 1.12) té una base pesada on s'introdueix el subministrament de gas. Consta d'una entrada de gas sense regulador, una entrada d'aire (unes perforacions laterals que permeten l'entrada d'aire en el flux de gas) i un tub de combustió.

La quantitat de gas es pot controlar mitjançant un ajust de la mida del forat a la base del tub. Si permetem que passi més aire, la flama cremarà a major temperatura. Si tanquem les perforacions laterals, l'eficàcia del foc és menor.

En el cas d'experiments de laboratori, com de cultius de bacteris o qualsevol altre tipus de pràctiques relacionades amb matèria viva, el científic treballa sempre amb el Bunsen al seu costat i el fa servir per esterilitzar ja que és molt important treballar en condicions estèrils per controlar el creixement microbià que involucra l'eliminació de totes les formes de vida.

És molt important, diríem vital, utilitzar el Bunsen durant els experiments, especialment de biologia o microbiologia. Si no es treballa a prop del Bunsen l'objecte esterilitzat s'haurà contaminat altra vegada amb microorganismes. La flama de l'encenedor és comunament usada per matar aquests microorganismes, usant un mètode tèrmic d'esterilització.



Figura 1.12. A1'11

TREBALL DE RECERCA

BLOC 2

EL LLEGAT DE HANS CHRISTIAN
GRAM: DESCOBRIMENT I
APLICACIONS DE LA TINCIÓ DE GRAM

1. INTRODUCCIÓ

1.1 CRONOLOGIA DELS DESCOBRIMENTS DE BACTERIS

Aquest apartat de l'evolució dels descobriments de bacteris ja ha estat redactat en el bloc 1, dedicat a Julius Richard Petri. Tot i així, portaré a terme una breu explicació del que interessa, és a dir, l'origen i l'evolució dels bacteris. Per cert, si es pregunten el perquè de l'explicació dels bacteris, la resposta és senzilla: la tinció de Gram, que deu el seu nom a Hans Christian Gram, és un tipus de tinció diferencial empleat en microbiologia per a la visualització de bacteris, sobretot en mostres clíniques. Per aquesta raó, parlaré dels bacteris.

1.2 ORIGEN I EVOLUCIÓ DELS BACTERIS

El terme "bacteri" és aplicat tradicionalment als microorganismes procariotes. Recordar que significa "bastó petit". Tot i això, aquests microorganismes es divideixen en dos grups, *Eubacteria* i *Archaeobacteria*. Els dos grups van evolucionar independentment des d'un ancestre comú. Aquests dos dominis, juntament amb el domini *Eukarya*, constitueixen la base del sistema de classificació, més àmpliament utilitzat en bacteriologia.

Els avantpassats dels éssers procariotes van ser els primers organismes que es van desenvolupar sobre la terra, fa uns 3800-4000 milions anys. En el nostre present es discuteix quins van ser els primers. Uns creuen que *Bacteria* és el domini més antic amb *Archaea* i *Eukarya* derivant a partir d'ell, mentre que altres consideren que el domini més antic és *Archaea*.

En darrer lloc, els bacteris han estat també implicades en la divisió evolutiva, que va separar *Archaea* de *Eukarya*. El avantpassat dels eucariotes va ingerir una proteobacteri¹ que es va desenvolupar en el citoplasma², donant lloc a les mitocondries. Més endavant una segona endosimbiosis³ per part d'algun eucariota va conduir als cloroplasts⁴ d'algues i plantes.

¹ Els proteobacteris formen un dels grups més nombrosos de bacteris. Aquest grup es defineix principalment per les seqüències de l'ARN ribosòmic.

² Part del protoplasma ("la substància viva de la cèl·lula") que, en una cèl·lula eucariota, es troba entre el nucli cel·lular i la membrana plasmàtica.

³ Associació entre espècies en què els individus d'una espècie viuen dins les cèl·lules de l'altra, i es beneficien d'ella. Lynn Margulis exposa aquesta teoria.

⁴ Orgànuls cel·lulars que s'ocupen de la fotosíntesis en organismes eucariotes.

FILOGÈNIA DE BACTERIS

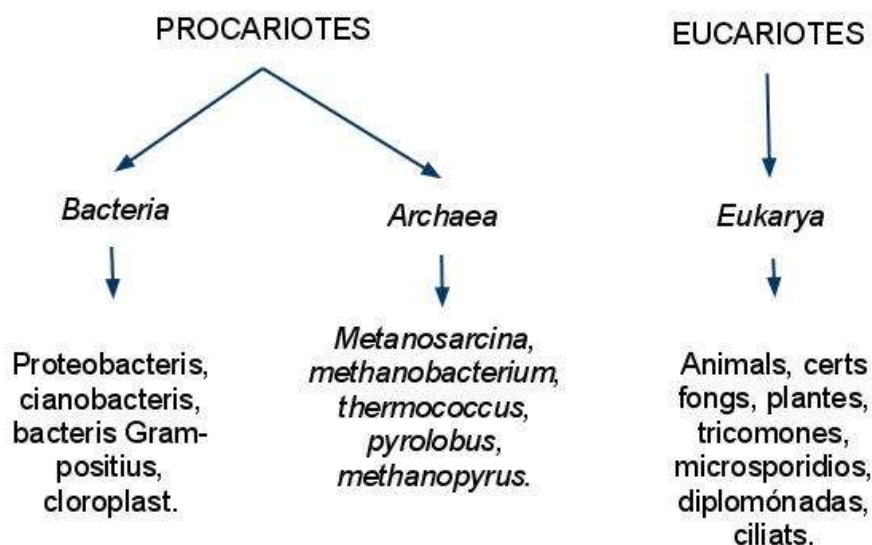


Figura 1.13. Classificació dels bacteris. A1'11

2. HANS CHRISTIAN GRAM: BIOGRAFIA

Hans Christian Joachim Gram va néixer el 13 setembre de 1853 a la capital danesa, Copenhaguen. En el 14 novembre de 1938, en la seva mateixa ciutat natal, ens va deixar. Gram va ser un dels millors bacteriològics de l'època, passada i present. És el fill de Frederik Terkel Julius Gram i Louise Christiane Roulund.

Gram estudià botànica a la Universitat de Copenhaguen i va ser assistent en botànica per al zoòleg Japetus Steenstrup. Les seves plantes el van introduir en els fonaments de la farmacologia i de l'ús del microscopi.

Gram va entrar a l'escola de medicina el 1878 i es va graduar en la mateixa el 1883. Va viatjar per tot Europa entre 1878 i 1885, formant-se en bacteriologia i farmacologia. A Berlín, el 1884, va desenvolupar un mètode per distingir entre dues classes principals dels bacteris. Aquesta tècnica, la tinció de Gram, és un procediment estàndard en la microbiologia mèdica. En 1891, va ser nomenat professor de Farmacologia de la Universitat de Copenhaguen. El 1900 va renunciar al seu Càtedra de Farmacologia per esdevenir professor de Medicina.

Va ser metge practicant durant tota la seva vida, President de la Comissió de Pharmacopeia entre 1901 i 1921, i director del departament de Medicina Interna de l'Hospital Frederick de Copenhaguen, fins al seu retir el 1923.

Al 1882 Paul Ehrlich va publicar un mètode per tenyir el bacil de la tuberculosi: aquesta publicació va ajudar a que Gram comencés els seus experiments amb la coloració dels bacteris. Mentre es trobava en un dels seus viatges a Berlín, va intentar establir la diferència entre dos bacteris, causants de pneumònia: la *Klebsiella pneumonia*⁵ i la *Pneumococ*⁶.



Figura 1.14. Hans Christian Joachim Gram. FONT: Viquipèdia.

És important dir, encara que no toca en aquest apartat biogràfic que, uns anys més tard, un científic alemany, Carl Weigert, va ampliar aquest descobriment afegint safranina després del procediment de Gram, i va observar que alguns bacteris que no es tenyien de morat, es tenyien de vermell. Aquests últims van ser anomenats "Bacteris Gram-negatius".

Aquest descobriment ha tingut i té una rellevant importància, ja que permet diferenciar els bacteris en dos blocs: bacteris Gram-positius i bacteris Gram-negatius, que és de gran utilitat per triar, per exemple, un determinat tractament antibiòtic.

⁵ Espècie dins del gènere bacterià *Klebsiella* compost per bacteris Gram-negatius de la família *Enterobacteriaceae* que realitzen un paper important com a causa de les malalties infeccioses.

⁶ Patogen quasi exclusivament humà causa d'un gran nombre d'infeccions i de processos invasius severos.

3. LA TINCIÓ DE GRAM

La tinció de Gram és una tinció diferencial⁷ que s'empra en microbiologia per a la visualització de diferents estructures bacterianes, freqüentment per a distingir en bacteris amb paret bacteriana o sense paret. Es considera Bacteri Gram-positiu als bacteris que es visualitzen de color morat blau i Bacteri Gram-negatiu als que es visualitzen de color rosa o vermell.

Al 1884, Hans Christian Gram va descobrir empíricament una tinció de gran valor pràctic. Encara que existeixen moltes modificacions, aquesta tinció es basa en una sèrie de coloracions successives amb un colorant bàsic, cristall violeta i una solució diluïda de iode, el lugol⁸. Després de la preparació es tracta lleugerament amb alcohol. Els bacteris Gram-positius resisteixen aquest pas de decoloració i romanen tenyides de color blau. Els bacteris Gram-negatius, en canvi, es descoloreixen ràpidament: per això cal tenyir després amb un colorant de contrast vermell, com la safranina o la fucsina.

Parlant de la tinció de Gram, és important conèixer que segueix sent la tècnica bàsica per caracteritzar una espècie bacteriana. És possible que hi hagi un altre tipus de tincions que s'utilitzin en el seu lloc, però aquesta és la bàsica i més usada.

Des de la seva disseny primitiu, ha experimentat algun canvi. La tècnica original està formada per un nombre concret de passos, segons fonts de la Universitat de Girona, vuit són els passos a seguir. Però alguns d'ells han estat suprimits o canviats per accelerar i millorar la metodologia de la tinció i el procediment de la mateixa. Es retoquen coses, però l'essència de Hans Christian Gram segueix aquí. Gram va fer la seva tècnica en ús de cristall violeta, lugol i alcohol.

Tota aquesta informació ha estat prestada pel professor Rafael Giraldo Suárez, cap del laboratori sintètic d'assemblea microbiana macromolecular, del departament de química i física biològica, del Centre d'Investigacions Biològiques (CIB), Consolat Espanyol d'Investigacions Científiques, per les seves sigles en anglès (CSIC), que em va respondre des de Boston.

Les seves paraules textuais van ser les següents: "La tinció de Gram segueix sent una primera opció de rutina en la caracterització dels microorganismes en laboratoris, sobretot d'anàlisis clíniques i de qualitat alimentària i mediambiental. Juntament amb tècniques bioquímico-metabòliques han format la columna vertebral del coneixement de bacteris. No obstant això, avui en dia estan més que superades per tècniques d'anàlisi molecular basades, sobretot, en la reacció en cadena de la polimerasa (PCR per les seves sigles en anglès) i en l'ús de microratilles amb seqüències d'ADN específiques del genoma de cada bacteri que es sospiti pugui estar present en la mostra. Pel seu elevat preu, aquestes anàlisis s'utilitzen, principalment, en laboratoris de microbiologia clínica ". En resum, segueix sent la tècnica bàsica.

⁷ Tincions que es fan servir per diferenciar explícitament microorganismes. S'usen tintes que contenen més d'una substància tintòria.

⁸ El lugol és una dissolució de I₂ (iode) y KI (iodur potàssic) en aigua destil·lada.

3.1 METODOLOGIA DE LA TINCIÓ DE GRAM

- a) Fer un frotis de la suspensió bacteriana i fixar a la flama.
- b) Tenyir amb cristall violeta durant un minut.
- c) Rentar amb aigua i deixar que perdi l'aigua sobrant.
- d) Tenyir amb lugol durant un minut.
- e) Rentar de nou amb aigua.
- f) Rentar amb alcohol 96°C per descolorir.
- g) Tenyir amb safranina o fucsina durant 30-60 segons.
- h) Rentar amb aigua i assecar a la flama.

3.2 QUÈ SUCCEIX DURANT LA TINCIÓ DE GRAM?

Els bacteris Gram-positius tenen la paret cel·lular més gruixuda que els Gram-negatius. Aquesta paret, feta de peptidoglicà (en un 50-90% de la paret cel·lular), els deixa de color púrpura durant la tinció de Gram, mentre que els bacteris Gram-negatius tenen una capa més prima (10% de la paret cel·lular). Els bacteris Gram-negatius tenen una membrana externa addicional que conté lípids, i està separada de la paret cel·lular per l'espai periplasmàtic⁹.

El cristall violeta (CV) es dissocia en solució aquosa i el clorur (Cl⁻) en ions. Aquests ions penetren per la paret cel·lular i la membrana cel·lular de les cèl·lules Gram-positives i Gram-negatives. L'ió interactua amb el CV amb components carregats negativament de les cèl·lules bacterianes i les deixa porpra, de color morat. Aleshores el iode (I⁻) interactua amb el CV⁺. El iode és un agent de captura que impedeix l'eliminació del CVI⁺ (el complex cristall violeta i iode) i, per tant, el color de la cèl·lula. Per tant, no es perd el tint de la cèl·lula.

Quan un decolorant, com l'alcohol, s'afegeix s'interactua amb els lípids de la membrana cel·lular. Una cèl·lula Gram-negativa, perd el seu lipopolisacàrid de membrana externa. En contrast, una cèl·lula Gram-positiva es deshidrata en un tractament amb etanol.

Després d'aquest procés, s'afegeix safranina o fucsina per descolorir els bacteris Gram-negatius, que quedaran amb color rosat o vermell. Recordeu que els bacteris Gram-positius, amb l'alcohol afegit, queden de color morat o blau.

És important recordar que la resposta a la tinció de Gram depèn més de l'estructura física i no tant de la composició química de la paret cel·lular. Llavors, podem veure cèl·lules eucariotes respondre negativament a la tinció de Gram i per exemple els llevats, també eucariotes però amb estructura de paret molt diferent, fer-ho com Gram-positius.

⁹ Aquest espai és el compartiment que rodeja el citoplasma en algunes cèl·lules procariotes com per exemple en els bacteris Gram-negatius.

3.3 TEORIES QUE SORGEIXEN PER DONAR RESPOSTA A LA TINCIÓ DE GRAM

Podem deduir que el microorganisme Gram-positiu presenta una paret cel·lular. Si aquesta pateix cap dany, ja no serà Gram-positiu: serà Gram-negatiu. Llavors hi ha una gran importància a la paret, perquè si està danyada, la tinció que volem dur a terme la farem malament. Buscant en fonts d'informació, he vist diferents teories per a la tinció:

- a) Stearn l'any 1923 es va basar en la combinació química colorant-proteïnes. Les proteïnes tenen facilitat per a la reacció amb àcids i amb bases, gràcies als seus grups amino i carboxil. La combinació amb ambdós tipus de colorant no es produeix en el "punt isoelèctric". Com els microorganismes contenen més d'una proteïna, aquest punt no té un valor precís i definit, sinó que constitueix més aviat una escala de diverses unitats de pH. Segons Stearn els Gram-positius tenen una escala isoelèctrica de pH inferior a la dels Gram-negatius.
- b) Gianni al 1952 va demostrar que els microorganismes Gram-positius (concretament *B. subtilis* y *B. anthracis*) semblaven Gram-negatius quan els cultius eren de fa dues a tres hores. Aleshores es desenvolupava la substància Gram-positiva sota la paret cel·lular, per invertir la reacció.
- c) Libenson i McLlroy expliquen que si la reacció Gram-positiva és una combinació entre components de la tinció de Gram i les proteïnes de la paret cel·lular, els bacteris desintegrats per medis físics retinguessin el tint perquè no es podria canviar el component químic del material. Però, els gèrmens Gram-positius desintegrats no retenen colorant primari i resulten Gram-negatius.

3.4 BACTERIS QUE RESISTEIXEN A LA TINCIÓ I CAUSES QUE ALTEREN LA TINCIÓ

He buscat si hi ha bacteris que resisteixen a la tinció de Gram, i sí: n'hi ha quatre que són de naturalesa Gram-positiu i tenyeixen com Gram-negatius. Són els microbacteris (que es resisteixen perquè estan encapsulades), els protoplasts i esferoplasts (que no tenen paret, l'eliminen), els micoplasmes (que no tenen paret) i les formes L¹⁰.

Les causes que alteren la tinció de Gram són majoritàriament tres: l'edat del bacteri, els errors experimentals i l'ús d'antibiòtics.

¹⁰ Variants bacterianes que o no formen una paret cel·lular completa o la formen d'una manera defectuosa.

4. BACTERIS GRAM-POSITIUS

Els bacteris Gram-positius són els que es tenyeixen de color blau o morat en la tinció de Gram. Els organismes Gram-positius són capaços de retenir el cristall violeta, a causa de la gran quantitat de peptidoglicà en la paret cel·lular. A més no tenen membrana externa, és a dir, tenen una zona menys per cobrir amb el tint.

Els bacteris Gram-positius presenten una membrana citoplasmàtica i una paret cel·lular, que presenta el peptidoglicà. Ambdues s'uneixen mitjançant molècules d'àcid lipoteicoic¹¹. Cal recordar que els bacteris Gram-positius no presenten una segona membrana lipídica externa a la paret cel·lular. En resum, tipus de cèl·lula procariòtica la paret cel·lular està composta per peptidoglicà, i no té membrana externa.

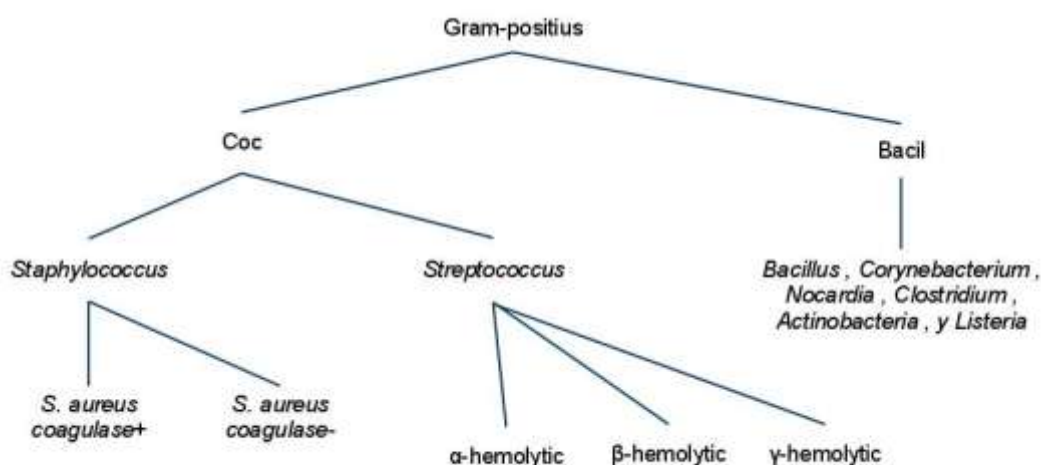


Figura 1.15 Classificació dels organismes Gram-positius. A1'11

5. BACTERIS GRAM-NEGATIUS

Els bacteris Gram-negatius són bacteris que no retenen el cristall violeta del tint en la tinció de Gram, com hem vist recentment.

Les següents són característiques que apareixen en els bacteris Gram-negatius: la membrana citoplasmàtica, una molt prima capa de peptidoglicà, la membrana externa que conté lipopolisacàrids, flagels, porus extra membranosos, un espai entre les capes de peptidoglicà i la membrana cel·lular secundària anomenat espai periplasmàtic i lipoproteïnes que s'uneixen a la columna vertebral de polisacàrids.

¹¹ Polímers de glicerol, alcohol amb tres grups -OH, units mitjançant enllaços fosfodiéster que podem trobar en bacteris Gram-positius.

La membrana externa dels bacteris Gram-negatius protegeix als bacteris de diversos antibiòtics, colorants i detergents que normalment danyarien la membrana interna o la paret cel·lular.

En resum, tipus de cèl·lula procariòtica amb una paret cel·lular que conté relativament poc peptidoglicà i presenta una membrana externa composta per lipopolisacàrids, lipoproteïnes i altres macromolècules complexes.

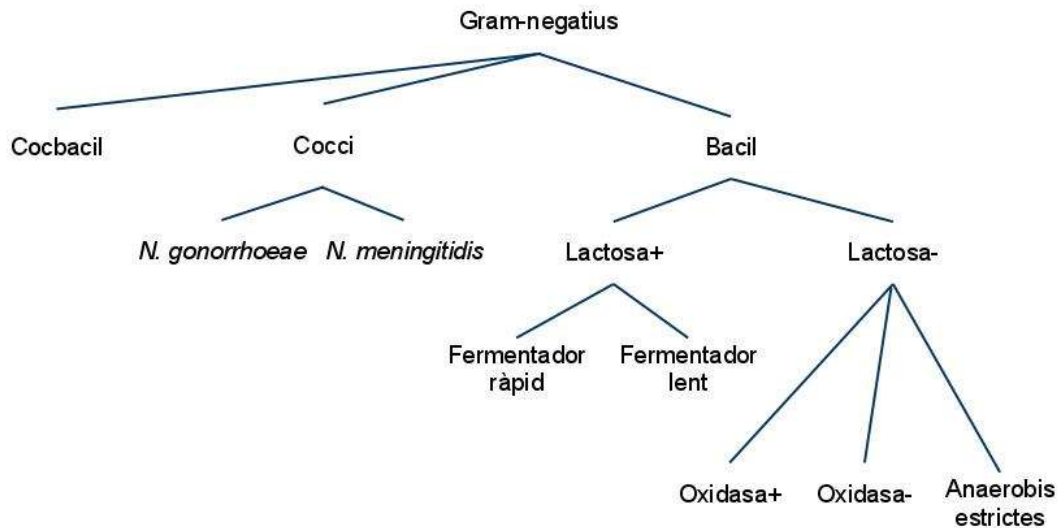


Figura 1.16. Classificació dels organismes Gram-negatius. A1'11

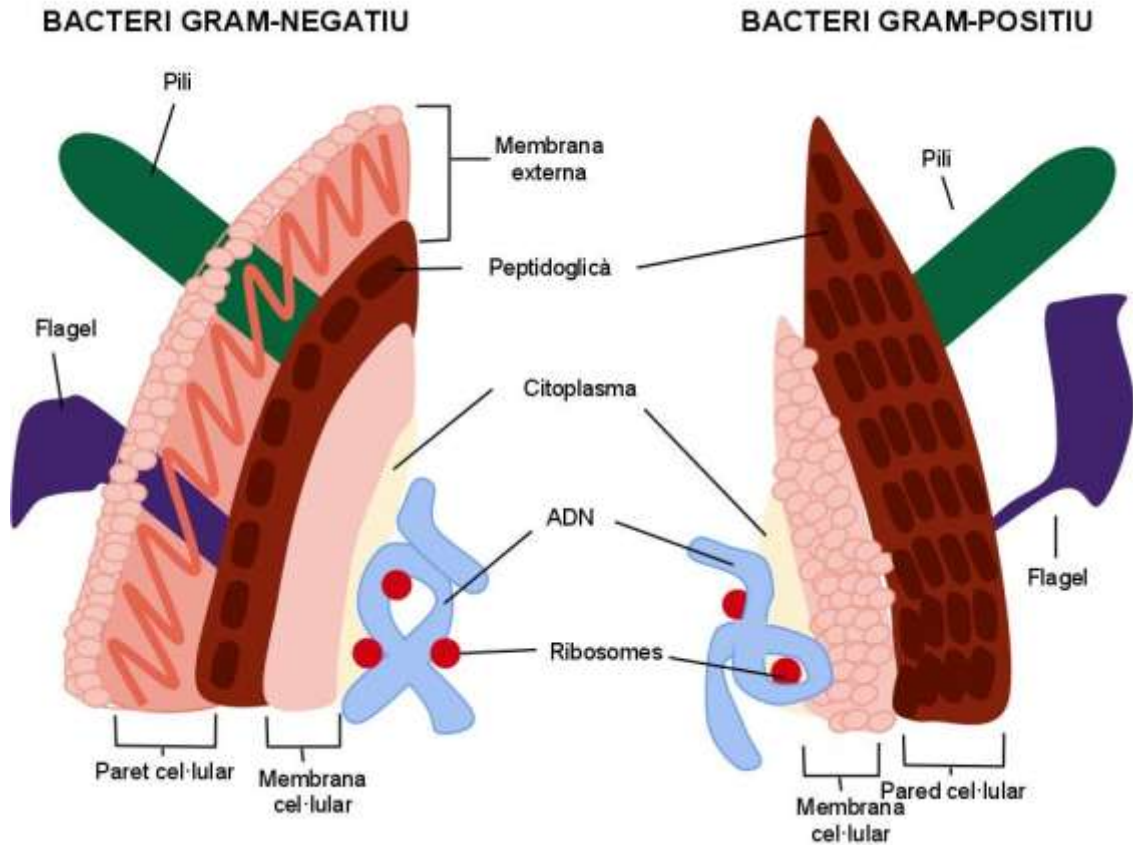


Figura 1.17. Diferències estructurals dels dos tipus de parets cel·lulars dels bacteris. A1'11

6. REALITZACIÓ D'UNA TINCIÓ DE GRAM

Es realitzarà una tinció de Gram, concretament de sis microorganismes dels cultivats anteriorment. *Serratia marcescens* serà l'únic cultivat dues vegades, una en format de crioboles i una altra en format líquid, descartat per a la tinció de Gram.

Es treballarà en un augment de 1000x amb oli d'immersió en un microscopi òptic, és a dir un microscopi que treballa amb lents òptics. A l'usar un augment gran teníem una distància focal molt petita. En el seu ús, es dirigeixen els raigs des de la mostra a l'objectiu travessant el vidre del cobreobjectes arribant només una part de la llum que part de la mostra. En afegir una gota d'oli d'immersió a la mostra els raigs emergents no es desvien i arriben tots a l'objectiu, millorant la visió notablement.

Aquest punt es troba aquí inclòs ja que no forma part dels resultats dels experiments. S'ha dut a terme la tinció de Gram per a il·lustrar-la en el treball. Podeu trobar un enllaç a un vídeo que he pujat a YouTube a l'Apèndix 1 (Capítol 2, bloc 6) d'aquest treball.

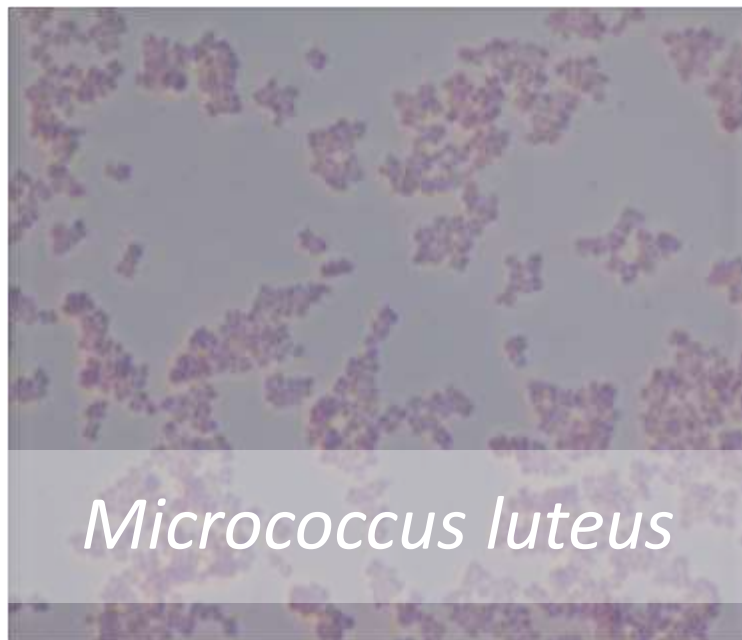
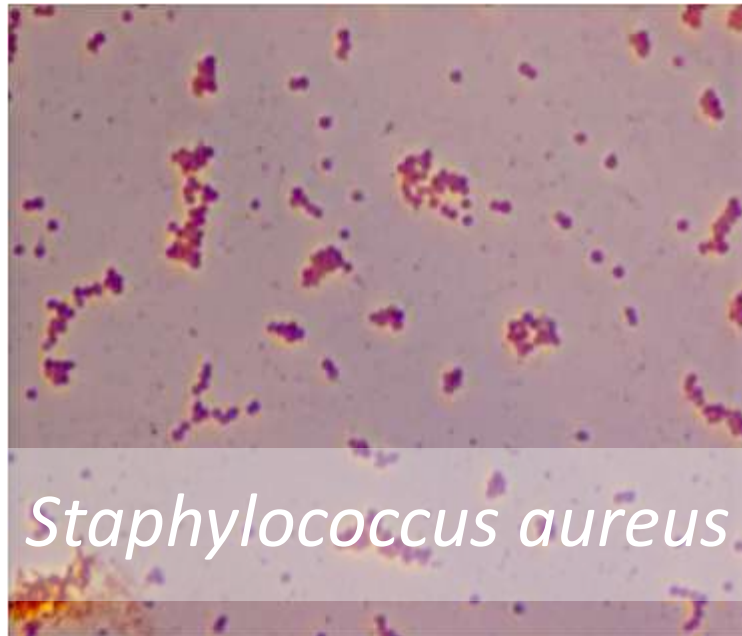


Figura 1.18. Imatges de la tinció de Gram realitzada. A1'11

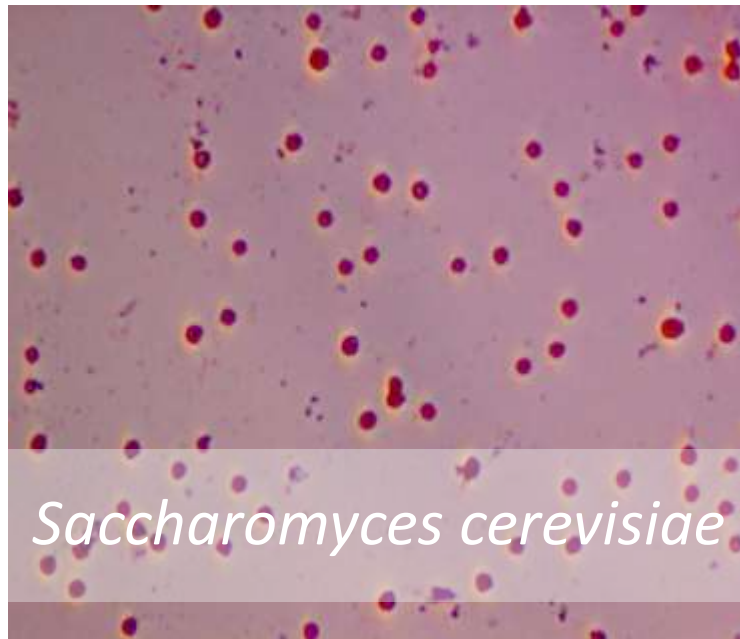


Figura 1.19. Imatges de la tinció de Gram realitzada. **A1'11**

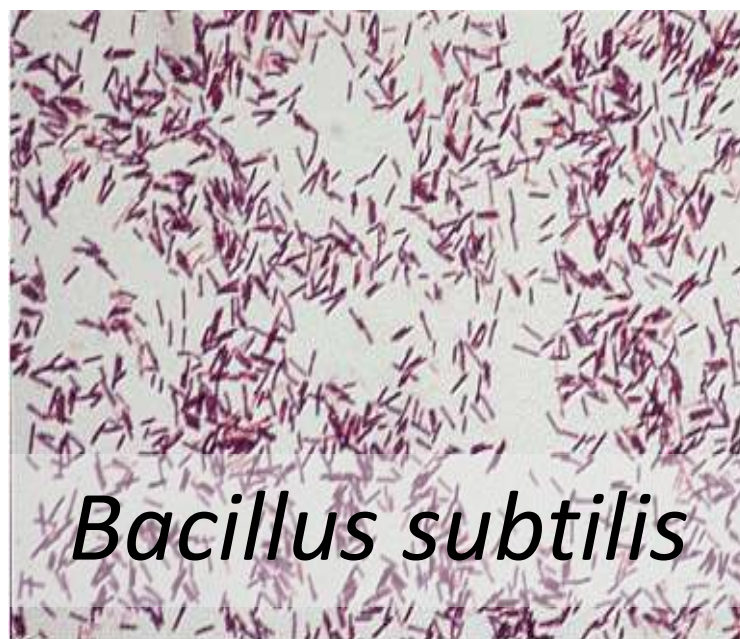
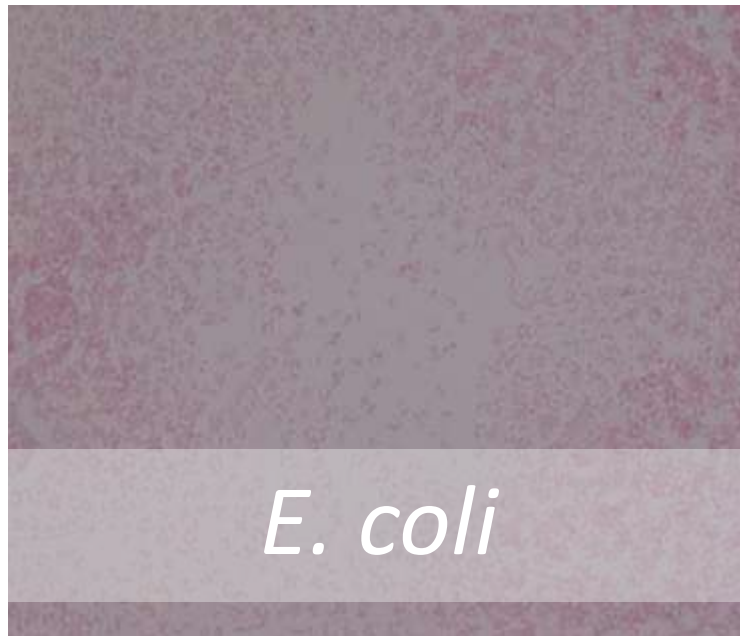


Figura 1.20. Imatges de la tinció de Gram realitzada. A1'11

La imatge posterior a la tinció de Gram de *B. subtilis* no va poder ser realitzada per problemes amb el microscopi òptic del laboratori 109-111 de microbiologia de la Universitat de Girona. La imatge que han pogut veure és un retoc de la imatge que apareix en la següent FONT: <http://mbmac3.biologie.uni-konstanz.de/Bacillus/Gram.gif>

Després dels resultats obtinguts, podem afirmar que *E. coli* i *Salmonella LT2* són bacteris Gram-negatius, ja que tenyeixen de color rosat a la tinció de Gram. Els microorganismes restants, és a dir *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Micrococcus luteus* i *Bacillus subtilis*, tenyeixen de color blau fosc o violeta i, aleshores, són bacteris Gram-positius.

7. ANTIBIÒTICS

Un antibiòtic és una substància química que desenvolupa un ésser viu que en certes concentracions mata o inhibeix el creixement de microorganismes sensibles. Els antibiòtics es fan servir en medicina per combatre infeccions provocades per gèrmens. Tenen aleshores capacitat per afectar a altres microorganismes.

Clarament un antibiòtic és més tòxic per a l'organisme invasor que per al hoste. De fet, pot ajudar a les nostres defenses per controlar l'inquilí, impedit el seu creixement i fins i tot matant-los. L'objectiu d'un antibiòtic és arribar a aquesta concentració per inhibir al microorganisme. Aquesta és una de les raons per la qual es diu que és perillós automedicar-se.

Per atacar bacteris Gram-positius, disposem de: penicil·lina, amoxicilina, eritrocimina, teicoplanina, vancomicina, lincomicina i clindamicina.

Per atacar bacteris Gram-negatius tenim: aminoglicòsids, aminopenicil·lines, gentamicina, tobramicina, netilmicina, quinolomas, amoxicilina, ampilina, estreptomina i tetraciclina, entre molts altres possibles antibiòtics.

Els antibiòtics per inhibir o matar bacteris Gram-positius i Gram-negatius són els següents: tetraciclina, cloramfenicol, enrofloxacina, sulfamides, cefalosporines, quinolones, alguna penicil·lina i amoxicilina.

Antibiòtics contra
bacteris Gram-
positius

- Penicil·lina
- Amoxicilina
- Eritrocimina
- Teicoplanina
- Vancomicina
- Lincomicina
- Clindamicina

Antibiòtics contra
bacteris Gram-
negatiu

- Aminoglucòsids
- Aminopenicil·lines
- Gentamicina
- Tobramicina
- Netilmicina
- Quinolomas
- Amoxicilina
- Ampicilina
- Estreptomina
- Tetraciclina

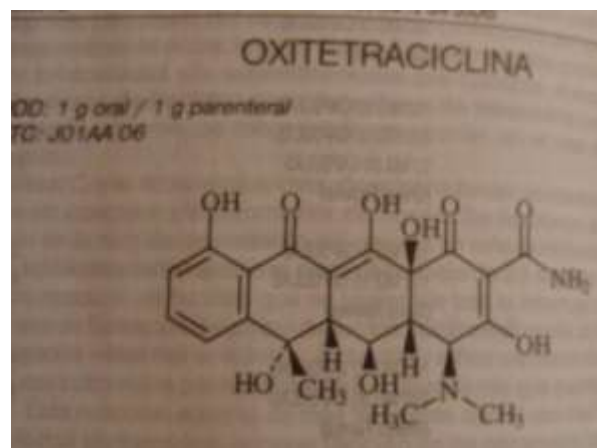
Antibiòtics contra
bacteris Gram-positius
i Gram-negatiu

- Tetraciclina
- Cloranfenicol
- Enrofloxacina
- Sulfamidas
- Cefalosporinas
- Quinolonas
- Algunes penicil·lines
- Amoxicilina



... pneumoniae, Ureoplasma urealyticum, ...
 La producción de beta-lactamasas no debe tener efecto en la actividad de Diacetil-midecamicina.
 Un porcentaje elevado de cepas que presentan resistencia de tipo inducible a la eritromicina son sensibles a la Diacetil-midecamicina.
 - Bacterias moderadamente sensibles (CMI90 2-8 mg/L)
 Microorganismos aerobios Gram-negativos: Campylobacter jejuni, H. influenzae, N. gonorrhoeae.
 Microorganismos anaerobios: B. fragilis, Clostridium perfringens, Pectotrep-tococcus sp.
 Otros microorganismos: Mycoplasma hominis.
 - Bacterias resistentes (CMI90 > 8 mg/L)
 Microorganismos Gram-negativos de las enterobacteriaceas: Salmonella, Shigella, Escherichia.
 Cepas de Gram-positivos con resistencia a eritromicina de tipo constitutivo, como **Staphylococcus aureus y Staphylococcus epidermidis** resistentes de tipo constitutivo pero no de tipo inducible.
 Se han descrito para los macrólidos resistencias en distinto grado para gérmenes habitualmente implicados en las infecciones del tracto respiratorio incluyendo faringoamigdalitis, bronquitis y neumonia.
Farmacocinética: - Absorción: La midecamicina tiene una biodisponibilidad oral del 80%, alcanzando los niveles plasmáticos máximos a 1/2-1 h; siendo estos aproximadamente de 1,8 mcg/ml y de 2,6 mcg/ml con dosis...

...
CEFALOTINA




Acido [6R-[6a,7b(Z)]]-7-[(2-Tienilacetil)amino]-3-[[acetilamino]n]l]-8-oxo-5-[[a-1-azabicyclo[4,2,0]oct-2-eno-2-carboxilo. C₁₆H₁₆N₂O₈S₂ PM = 396.44

Acción y mecanismo: La cefalotina es un antibiótico beta-lactámico del grupo de las cefalosporinas, con acción bactericida. Inhibe la síntesis y reparación de la pared bacteriana. Presenta un espectro de acción de amplitud media. Actúa preferentemente sobre bacterias Gram-positivas aeróbicas, especialmente cocos. También son sensibles las especies *Neisseria* (incluyendo algunas cepas productoras de penicilinas) y *Morphillus*.

Farmacocinética: Tiene una buena biodisponibilidad IM, alcanzando el nivel plasmático máximo al cabo de 0.5 horas. Es ampliamente distribuido en el organismo, alcanzando concentraciones elevadas en los líquidos sinoviales, urinario, respiratorio y digestivo, así como en corazón y tejidos blandos. Difunde moderadamente a través de las barreras placentarias y la leche.

OMTETRAICICLINA

DDD: 2 mg oral
ATC: J04AB02



RIFAMPICINA

Sinónimos: RIFALDACINA; RIFAMPINA
DDD: 600 mg oral
ATC: J04AB02



TETRACICLINAS

Amplio espectro antibacteriano, incluyendo especies Gram-positivas y Gram-negativas, aeróbicas y anaeróbicas, espiroquetas, micoplasmas, clamidias, rickettsias y algunos grandes virus.

Farmacocinética: La oxitetraciclina presenta una biodisponibilidad oral del 80%, alcanzando sus niveles plasmáticos máximos al cabo de 2.5 horas. Los alimentos reducen en un 55% su absorción intestinal. Se une en un 80% a las proteínas plasmáticas. Se distribuye prácticamente por todos los líquidos, encontrándose especialmente en los fluidos ascítico, pleural y sinovial, así como vaginal. Se alcanzan concentraciones muy elevadas en la leche. Difunde a través de las barreras placentaria y mamaria, pero muy poco a través de la meningea (en ausencia de inflamación). Se metaboliza menos del 20% de la dosis, eliminándose fundamentalmente con la orina, un 70% en forma inalterada. Su semivida de eliminación es de 8 horas (56 horas en pacientes con insuficiencia renal grave).

Indicaciones: - Infección de piel y de tejidos blandos como acné o granu-

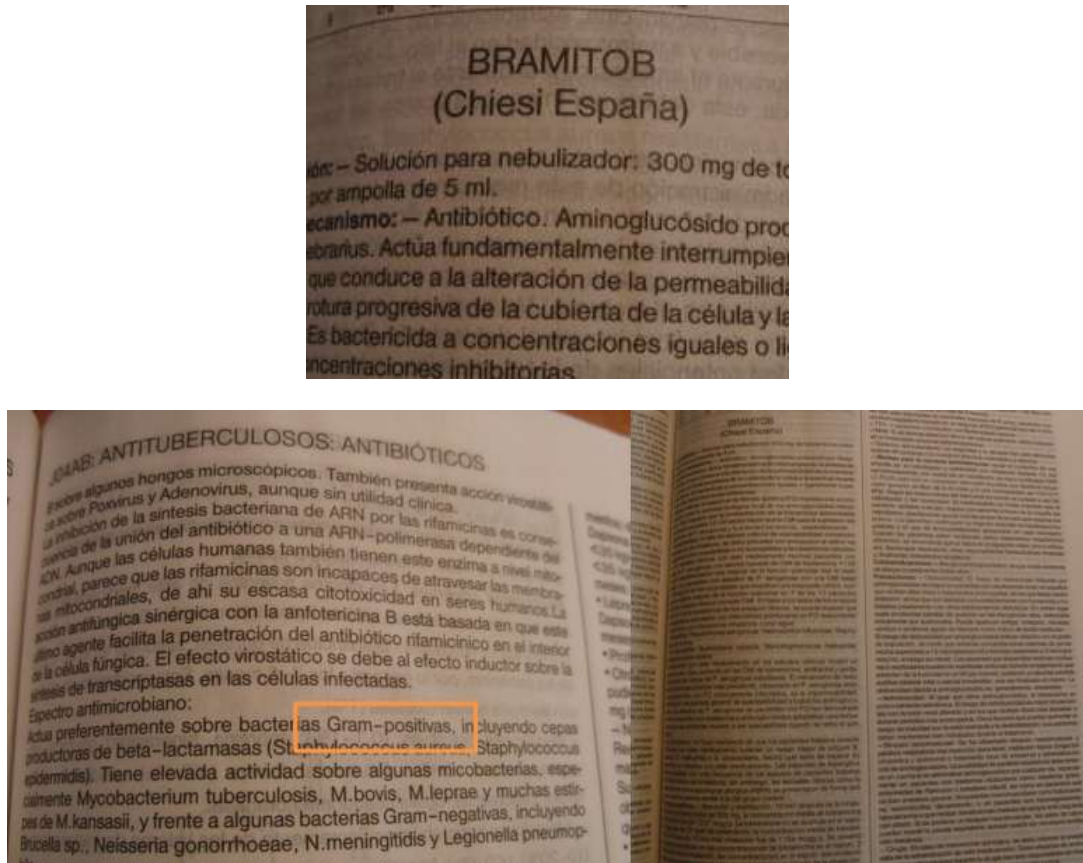


Figura 1.21. En totes aquestes imatges podem veure prospectes d'antibiòtics. Els quadres de color taronja destaquen les paraules "Gram", en certes ocasions en minúscula pel seu tant freqüent ús. Quelcom petit com un prospecte parla d'un nom i d'un home molt grans.

A1'11

TREBALL DE RECERCA

BLOC 3

EL LLEGAT DE THEODOR ESCHERICH:
E.coli. ACTUALITAT DEL BACTERI AMB
ELS ALIMENTS

1. INTRODUCCIÓ

Com veiem la relació entre aquests tres personatges, Petri, Gram i Escherich (ara ho comentaré) i les seves aportacions al món de la ciència és enorme. No podem parlar d'un sense, com a mínim, esmentar a l'altre. Per això, la introducció ha estat donada en certa manera.

2. BIOGRAFIA

Theodor Escherich va néixer en un 29 de novembre de 1857, a Ansbach (Regne de Baviera¹, actual Alemanya). Escherich va ser un pediatre alhora alemany i austríac² qui a més va impartir classes a les universitats de Munic, Graz (com a docent entre 1890 i 1902) i Viena. El seu major assoliment en el món de la ciència va ser descobrir el bacteri que porta el seu nom, *Escherichia coli* (*E. coli*) al 1885, tot i anomenar-lo *Bacterium coli*.

No només la va descobrir, sinó que a més va determinar les seves propietats. Anys després, va morir, en un 15 de febrer de 1911, a Viena. Vuit anys després es va batejar el bacteri amb el nom d'*E. coli*, sent "Escherichia" en honor a Theodor Escherich i "coli" pel fet d'estar present al còlon, l'última porció de l'aparell digestiu a la majoria de vertebrats.



Figura 1.22. Imatge de Theodor Escherich. FONT: Viquipèdia

Escherich estava molt compromès amb la pediatria, servint com a president de diversos departaments, inclosos el Departament de Pediatria de la Universitat de Viena i l'hospital Santa Ana dels Nens de Viena. Podem deduir, a partir de les informacions que he donat, la gran preocupació de Theodor Escherich per la gent, essencialment per la salut i les malalties dels nens.

Ell era el fill més jove de Kreismedizinalrat Fernando Escherich, un expert en estadística mèdica, i Maria Sophie Frieder, filla d'un coronel de l'exèrcit bavarès. Va començar la seva formació acadèmica i el servei militar a Estrasburg. En aquest moment, va començar a estudiar medicina a Würzburg el 1876 i, seguint el costum alemany va seguir els estudis en centres

¹ El Regne de Baviera va ser un estat, geogràficament situat en l'actual Alemanya, que va existir des de 1806 fins al 1918. El regne es va dissoldre després de la Primera Guerra Mundial.

² T. Escherich va néixer a Baviera, Alemanya, i va morir a Viena, Àustria. Llavors, es pot afirmar que és alemany i austríac a la vegada.

mèdics, a destacar a Estrasburg (Àustria), Berlín, Munic i Kiel (Alemanya). Així va arribar a obtenir una de les millors qualificacions en medicina.

Més endavant, sis mesos després, en els quals va estar exercint com a metge a l'hospital de Munic-Oberwiesenfeld, es va convertir en assistent del doctor Karl Gerhardt (1833-1902), al Departament de Medicina Interna Würzburg. Theodor es va formar com a metge internista, es va veure influït pel doctor Gerhardt i en aquesta ocasió va desenvolupar una tesi doctoral al 1882 sent aquesta la seva primera publicació, supervisada pel doctor Gerhardt. Un any després va publicar sis temes o articles sobre la medicina no pediàtrica. Des d'aquestes publicacions va viatjar per Europa, convertint-se ràpidament en expert en tècniques bacteriològiques. Escherich va fer una presentació sobre el còlera a Nàpols el 3 de desembre de 1884 a Munic, i l'informe va ser publicat el mateix any.

3. QUÈ ÉS *Escherichia coli*?

La *Escherichia coli* o *E. coli* és un dels bacteris més estudiats de l'ésser humà. En general, aquesta bacteri, es troba en els intestins dels animals. Com hem vist, Escherich la va descriure el 1885 amb el nom de *Bacterium coli*, tot i portar el seu nom a partir de 1919, donant honor al seu descobridor. Considero important destacar que es tracta d'un bacteri Gram-negatiu³.

Respecte a la seva funció, el bacteri actua com a convidat o comensal en l'ésser. Per exemple, en els humans colonitza la zona gastrointestinal adherint-se a les mucositats de l'intestí gruixut després d'unes 48 hores del primer àpat, en un nadó que té 27 dies o menys des del seu naixement, és a dir, un noutat. El bacteri menja de la flora intestinal i ens ajuda a absorbir els nutrients dels aliments.

Escherichia coli presenta centenars de soques, unes innòcues que ajuden al ésser del qual s'alimenten i altres que són capaços de produir toxines capaces de provocar malalties. La soca *E. coli* O157:H7⁴ va ser reconeguda al 1982 com a causa de malaltia en una intoxicació deguda a hamburgueses contaminades als EUA. Una situació molt semblant es va viure aquest estiu, a Alemanya, amb la famosa "crisi del cogombre"⁵.

Va ser aïllada per primera vegada el 1922 d'un pacient que havia patit diftèria i es va convertir en important com a organisme objecte d'experiments el 1945 quan va ser utilitzada per descobrir, la transferència genètica espontània que permet la reproducció als bacteris. En els últims anys, s'ha utilitzat com a fàbrica de productes de biotecnologia, per produir insulina humana i altres fàrmacs després de la seva manipulació per enginyeria genètica.

³ Cal recordar que els bacteris Gram-negatius són aquells que no es tenyeixen de blau fosc o violeta per la tinció de Gram, i ho fan d'un color rosat o vermellós.

⁴ La combinació de lletres i números en el nom del bacteri es refereix als marcadors específics que es troben en la seva superfície i la distingeix d'altres tipus d'*E. coli*.

⁵ Parlaré d'aquesta situació viscuda a Alemanya i altres zones d'Europa més endavant, en profunditat.

3.1 LA E. coli EN LA HISTÒRIA

A finals del mes de juliol, em vaig proposar realitzar una recerca sobre esdeveniments similars al de la "crisi del cogombre". Per a aquesta recerca, vaig considerar pobre parlar només d'Espanya i per això, em vaig posar en contacte amb les ambaixades espanyoles a Europa mitjançant correu electrònic. La pregunta que els feia era la següent: hi ha hagut algun cas similar al país de la seva ambaixada a qui hem vist recentment en relació a la *E. coli*?

La veritat, vaig quedar sorprès perquè la majoria de les ambaixades em van contestar molt aviat, però amb poques respostes. Unes em suggerien posar-me en contacte amb els ministeris, escoles i/o facultats relacionades a aquest tema. Altres, que no disposaven de temps i, les bones respostes: dades. Un cas, el de l'ambaixada de Noruega.

Amb les respostes que he anat acumulant, he fet una taula per veure quins països s'han vist més afectats i amb quins casos. Ho podem veure a continuació, després del gràfic amb les respostes de la taula:

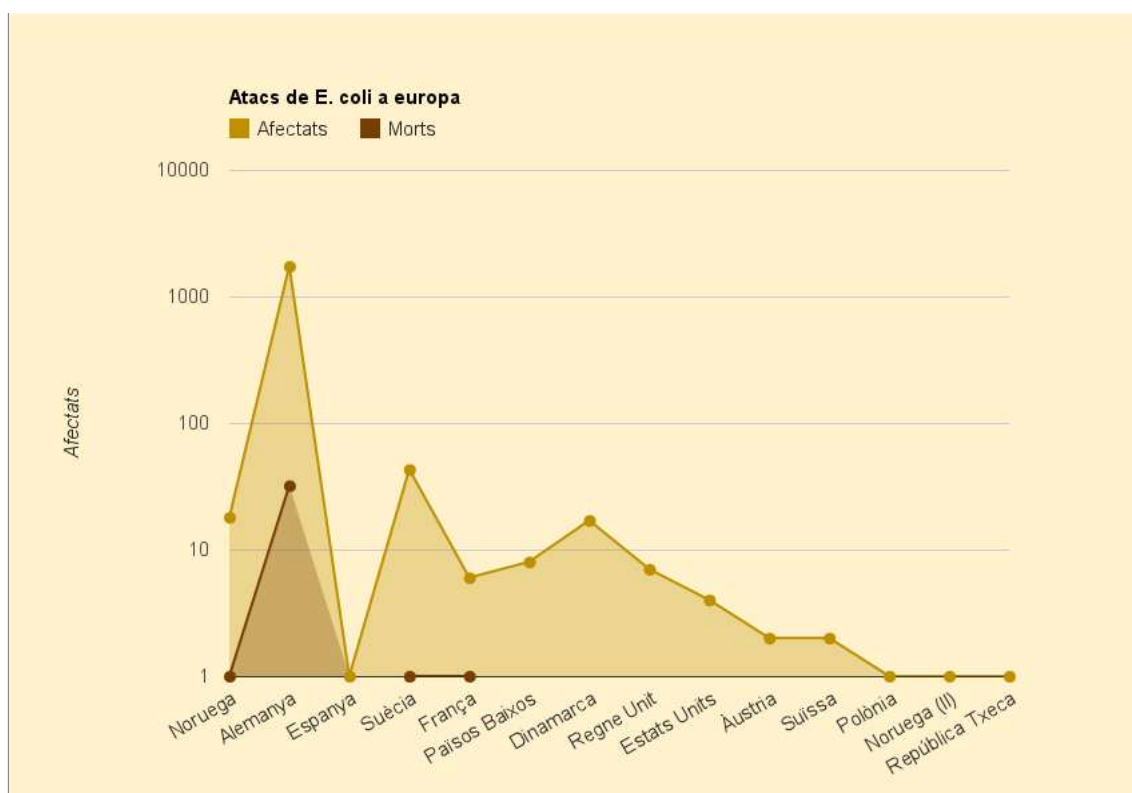


Figura 1.23. Gràfic de dades el-laborat a partir de les respostes a les preguntes que vaig realitzar a les embaixades espanyoles als països de la següent taula. A1'11

TAULA 1: Respostes de les ambaixades				
Nom del país	Any de l'esdeveniment	Què va passar?	Número aproximat d'afectats	Morts?
Noruega	2006	Epidèmia produïda per ingerir carn d'un tipus de fuet norueg.	18	1
Alemanya	2011	Indicis de possible intoxicació d'una explotació alemanya de brots de soja. No obstant això el govern alemany va assenyalar a Espanya i Holanda com a origen de la infecció.	1733	32
Espanya	2011	Possible cas d'infecció pel consum de verdures fresques a Alemanya.	1	0
Suècia	2011	País afectat per <i>E. coli</i> alemanya.	43	1
França	2011	País afectat per <i>E. coli</i> alemanya.	6	1
Païss Baixos	2011	País afectat per <i>E. coli</i> alemanya.	8	0
Dinamarca	2011	País afectat per <i>E. coli</i> alemanya.	17	0
Regne Unit	2011	País afectat per <i>E. coli</i> alemanya.	7	0
Estats Units	2011	País afectat per <i>E. coli</i> alemanya.	4	0
Àustria	2011	País afectat per <i>E. coli</i> alemanya.	2	0
Suïssa	2011	País afectat per <i>E. coli</i> alemanya.	2	0
Polònia	2011	País afectat per <i>E. coli</i> alemanya.	1	0
Noruega ⁶	2011	País afectat per <i>E. coli</i> alemanya.	1	0
República Txeca	2011	País afectat per <i>E. coli</i> alemanya.	1	0

⁶ Noruega apareix repetit perquè hi han hagut dos casos diferents.

3.2 SOQUES PATÒGENES

És important saber que *E. coli* pot causar infeccions a l'intestí i en altres llocs, com pot ser l'aparell excretor, i malalties com la meningitis⁷. El grup de risc comprèn pràcticament a totes les persones, en especial als nens menors de 5 anys d'edat amb problemes d'alimentació, així com la gent gran. Això és causat generalment per la contaminació d'aliments, i posterior mala cocció dels mateixos. *E. coli* també pot provocar el conegut síndrome urèmic hemolític, una malaltia caracteritzada per mal funcionament dels ronyons, anèmia hemolítica⁸, defectes en la coagulació i trombocitopènia⁹.

La *E. coli* pot provocar també infeccions urinàries, quan és acompanyada d'uns mals hàbits sanitaris, més comuns en dones que en homes, per la diferent longitud de la uretra, més curta en dones (uns 30 a 40 mm) que en els homes (12 a 15 cm).

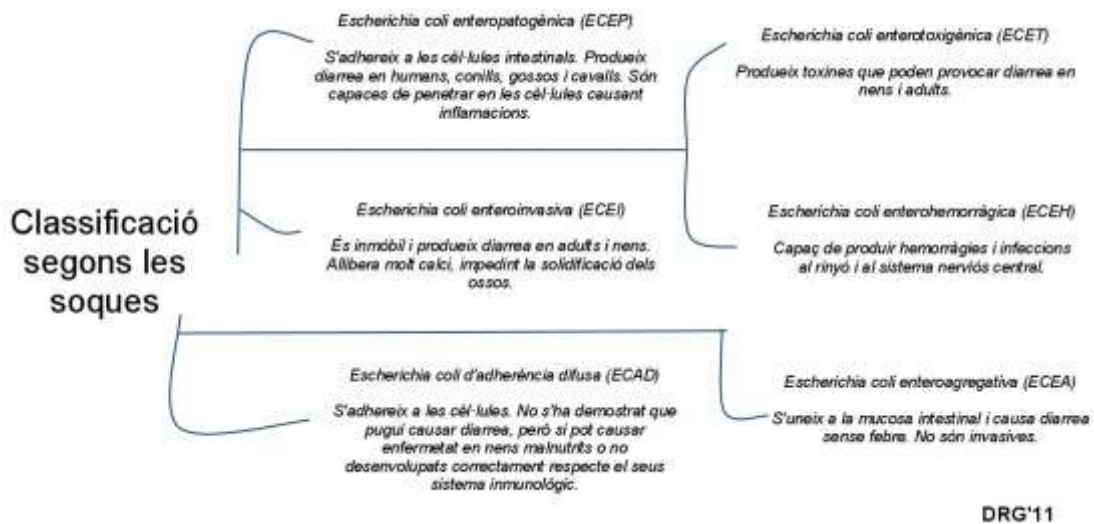


Figura 1.24. La classificació de *E. coli* segons les soques de les mateixes. A1'11

3.3 BROTS DE *E. coli*¹⁰

A principis de 1982, aproximadament 47 adults i nens que vivien a Oregon i Michigan van desenvolupar una malaltia greu amb símptomes de mal de panxa i rampes seguides d'episodis de sagnant diarrea. En un primer moment, la causa d'aquesta malaltia era un misteri, perquè totes les proves de laboratori de rutina van ser negatives a les causes conegudes en aquells temps de les malalties diarreiques. El resultat: ningú sabia com tractar els pacients malalts. El culpable: un tipus de bacteri anomenat *Escherichia coli* O157: H7.

⁷ Enfermetat caracteritzada per inflamació de les meninges, unes membranes de teixit conjuntiu orgànic que cobreixen tot el sistema nerviós central.

⁸ Disminució de la massa de glòbuls vermells.

⁹ Disminució de les plaquetes presents en el flux sanguini.

¹⁰ FONT: diferents notícies i articles que poden trovar a la bibliografia.

La troballa que *E. coli* va causar el brot de diarrea va causar una sorpresa ja que aquest bacteri és molt comú i és present al nostre cos sense causar malaltia. A més a més, la *E. coli* O157:H7 era rara i ja havia estat implicada en un sol cas en 1975 a una dona coreana. Com a resultat es va dur a terme una investigació extensa, per arribar a la conclusió que *E. coli* va ser adquirida en els afectats a partir d'hamburgueses poc cuites en alguns restaurants d'una cadena alimentària de "fast-food".

Llavors, en donar a conèixer l'origen, el públic va culpar el restaurant, aquest al proveïdor de carn, aquest a la planta que processar la carn, aquesta als agricultors i així podem seguir hores. Després de molta culpa als altres, no estava clar qui era definitivament el culpable. Després de tot, el brot no va causar morts però sí malaltia a 47 persones.

Dos anys després van tornar a ser identificats altres casos i un nou brot. Aquest va ser també associat a la mateixa cadena de restaurants. El gener de 1993, l'associació entre hamburgueses i *E. coli* O157:H7 es va confirmar de nou i al mes d'abril d'aquest mateix any, més de 700 persones havien desenvolupat diarrea i 56 d'ells, a més síndrome urèmica hemolítica (SUH).

En certs casos el SUH pot causar un mal funcionament i fins i tot una parada del ronyó, especialment en nens. En aquest brot, 4 dels afectats van morir, 3 dels 4 nens. L'origen del brot va ser descobert: una hamburguesa "Monster Burger" que formava part d'una promoció que la venia a un preu molt reduït. Hi havia molta demanda d'aquesta hamburguesa i la cadena volia vendre, sense poder mantenir-se al dia amb ella. El resultat: fer més hamburgueses en menys temps, però com?. Disminuint el temps de cocció, temps insuficient per matar la *E. coli*. A partir d'aquest moment, la justícia es va encarregar de tot el tema legal.

La cadena va demandar als proveïdors, i aquests als seus propis proveïdors. La pena legal econòmica més gran va ser per a una família amb una filla de 9 anys qui va estar en coma durant 42 dies. La pena econòmica va ser de 15,6 milions de \$. En el present, la jove segueix patint lesions com a resultat de la infecció.

3.3.1 NOMÉS CONTAMINA CARN, LA *E. coli*?

El brot de 1993 als EUA va portar alguna cosa positiva: més controls sanitaris de la carn i dels restaurants per assegurar que el subministrament alimentari era segur. Però el món de la ciència es va equivocar creient que *E. coli* era només capaç de viure en altres aliments .

Un nou brot més potent va tornar a néixer, aquesta vegada a la ciutat de Sakai (Japó) afectant a més de 8000 persones, 6000 d'elles nens. L'origen del brot d'aquesta vegada es va trobar en uns brots de rave que es van servir en un dinar escolar un dilluns. Aquest brot és el primer associat a productes frescos i va donar grans preocupacions al món. Com es va contaminar aquest cop tot? No hi ha respostes.

3.3.2 SUC DE POMA I *E. coli*

La Pasteurització mata fàcilment a les bactèries presents en substàncies com la llet. Si un producte com la llet es troba sense pasteuritzar el percentatge de possible contaminació ascendeix significativament. Hi ha casos de diarrea atribuïts a prendre aliments sense pasteuritzar.

Existeix un cas de suc de poma el 1996 als estats del nord-oest que va provocar malalties diarreiques en més de 60 persones, 12 de les quals van patir SUH i un mort, de 16 mesos d'edat. Aquest fet demostrà *E. coli* viu en més aliments dels que creïem.

3.3.3 GRANGES DE MASCOTES

51 persones es van emmalaltir amb la *E. coli* O157:H7 a Pennsylvania. 15 d'elles van patir SUH, sent la majoria nens. Cada pacient va ser sotmès a preguntes per buscar el brot que va resultar ser en una visita escolar a una granja de productes làctics. 28 de 216 vaques van donar positiu a les anàlisis.

A més els nens que es menjaven les ungles tenien un percentatge més elevat per poder agafar la malaltia. Es van seguir fent més proves fins a descobrir que l'origen era l'animal en si o la font del bacteri. No hi ha més informació al meu abast sobre aquest succés.

3.3.4 AIGUA

A més dels aliments esmentats i molts més, la *E. coli* també sobreviu a l'aigua i diversos brots s'han relacionat amb l'aigua contaminada usada per a fins diferents. Hi ha exemples en casos com nedar en llacs contaminats, beure aigua contaminada, visitar parcs aquàtics infectats ...

3.3.5 ESTÀ AQUÍ LA *E. coli* PER ... QUEDAR-SE?

Des del brot de 1982 hem vist aparèixer més de 400 nous brots sent la *E. coli* O157:H7 una de les principals causes de diarrees. Només als és responsable de més de 73.000 casos. Al 2006 i 2007 hi va haver casos relacionats amb productes frescos com els espinacs i l'enciam.

És clar que la *E. coli* O157:H7 té capacitat de mutar, de fer nous ceps més forts, resultant ser un problema per a la salut pública i necessitem noves pràctiques de prevenció per donar un "stop" a tot això i mantenir tot sota cert control.

Encara que la *E. coli* O157:H7 rep molta atenció dels mitjans, hi ha moltes altres soques que causen malaltia, de fet un total de veï que podem comprovar en el quadre de classificació de les soques que es troba en aquest mateix bloc.

Aquest any s'ha informat des d'Alemanya d'un gran brot epidèmic produït per *E. coli* O104:H4. Segons informa RTVE (Radio Televisión Española) hi ha 3082 casos, amb ja 38 morts. El govern alemany va assenyalar el cogombre espanyol com provocador de la intoxicació: els cogombres almerienses i malaguenys. Al final, viatgers fins i tot espanyols, que han trepitjat sòl alemany, s'han vist afectats per la soca. Llavors, és Alemanya la font d'intoxicació? Cal dir, segons font d'informació l'Institut de Genòmica de Pequín, desxifrador del genoma de l'organisme, que el cep és resistent a vuit diferents tipus d'antibiòtics.

Al realitzar anàlisis en recerca de l'origen del brot, es van realitzar proves amb quatre cogombres escollits aleatòriament del mercat d'Hamburg. Tres dels cogombres contaminats van resultar ser espanyols i l'altre, holandès, segons van apuntar mitjans alemanys. Però el bacteri espanyol era diferent¹¹ del trobat en els afectats.

Surfejant una mica per la xarxa, he llegit que els experts diuen que la font de contaminació està en l'origen, en el cas d'*E. coli*, vaques o remugants. El contagi prové de les defecacions dels animals que poden arribar als cultius i l'home: als cultius com la soja i l'home, com la carn picada de la cadena de supermercats Lidl, que va afectar nens francesos.

Al 2006, als EUA, un brot de malaltia associada amb *E. coli* O157:H7, relacionat amb el consum d'espínacs frescos llistes per menjar i rentades ja tres vegades, produïdes en una fàbrica de processats de Califòrnia, va causar 199 infeccions de les quals 102 van acabar amb hospitalització i de la resta, 32 van acabar amb síndrome urèmica hemolític. El brot va causar com a mínim tres morts. Però, com pot arribar el bacteri als aliments? En el cas exposat de les espínacs, per a sorpresa dels científics, el bacteri usava els mateixos mecanismes per adherir-se a les fulles dels espínacs que per adherir-se al intestí. És present en l'aigua i eliminada en els processos posteriors a les anàlisis químiques¹².

Finalment, és important posar sobre la taula aquesta informació: després de 75 anys d'estudis, la carta genètica completa del bacteri més estudiat i utilitzat del món, la *E. coli*, ja està desxifrada. Científics dels EUA i Mèxic van publicar el 5 de setembre de 1977, a la revista Science, la seqüència completa del genoma de l'*Escherichia coli* amb un total de 4639221 parells de bases d'ADN.

La representació del genoma ocupava un desplegable de 12 pàgines a la revista. L'informe representa la totalitat dels gens de l'organisme i l'establiment, quan és possible, de la seva funció. La *E. coli*, una causa comú d'intoxicacions alimentàries, és també l'organisme unicel·lular més conegut de la biologia moderna i es considera un model per al genoma humà. Aquest bacteri viu a l'intestí gros dels animals, inclòs l'home.

Parlant de la crisi del cogombre, el cep fa referència a la *E. coli* O104:H4, una soca poc comuna. Aquesta soca és diferent: no és innòcua i a més a més produeix una toxina capaç de produir el síndrome urèmic hemolític.

¹¹ Les anàlisis realitzades a cogombres espanyols han demostrat que el cogombre espanyol no té el tipus d'*E. coli* O104:H4, present en els pacients afectats.

¹² Ho veurem al bloc 5, a l'apèndix 3.

Només un cas anterior al brot d'Alemanya al 2011 ha estat documentat, en una dona coreana al 2005. Com a curiositat hi ha una altra soca similar, la *E. coli* O104:H7 descoberta al 1982, en un brot d'enteritis¹³ causat en carn picada d'hamburgueses com hem vist. Aquestes soques produeixen la toxina Shiga que inhibeix la síntesi de proteïnes dins de les cèl·lules. Si el brot és sever és difícil atacar-lo. Eliminar una *E. coli* és molt difícil perquè està protegida per tres capes, a diferència d'altres bacteris protegits per dues capes. Les estirps O d'*E. coli* mostren tenir gens de resistència als antibiòtics i fins i tot poden augmentar la producció de toxina en presència d'antibiòtics. En conclusió, l'antibiòtic lluny de guarir pot agreujar el problema.

El dia 2 de maig del 2011 ja es coneixia que hi havia afectats, però la notícia no va sortir a la llum fins al 22 del mateix mes. Quin és el motiu? Mentre els metges investigaven, les autoritats van acusar els cogombres espanyols com a causa del brot, perquè entre els afectats es va identificar el cosnum de cogombres, tomàquets i enciam.

El cogombre espanyol és diferent al que es ven a Hamburg perquè el d'allà és més llarg, més dolç i té una pell més llisa i fina.

Segons fonts de mitjans de comunicació, després de l'enquesta epidemiològica, en què es van preguntar sobre el consum de verdures crues o amanides, sense preguntar pels aliments en separat, li van tirar al cogombre tota la culpa. Aquesta alterta parlava de cogombres de cultiu ecològic, és a dir, amb abonaments animals.

Les hipòtesis apuntaven com a possibles brots als cogombres espanyols i holandesos, una granja de brots germinats i alguns restaurants a Lübeck. Les autoritats alemanyes van donar notícia de verdures només, però per què no van informar d'aliments com la carn, la llet, l'aigua embotellada ...?

Uns dies després, en donar noves notícies el 26 de maig, la ministra (senadora) de Sanitat de Hamburg, Cornelia Prüfer-Storcksque va demostrar com fer les coses malament, tot tirant la pedra i amagant la mà.

¹³ Diarrea.

4. GENÈTICA COMPARATIVA¹⁴

Amb vista a observar l'estudi de diferències genètiques entre diferents soques d'*E. coli*, vaig creure convenient buscar i trobar diferents genomes de el màxim nombre possible de soques d'*E. coli*. La pàgina web del GenBank va ser de molt gran ajuda.

Primerament, les soques escollides les trobem en el següent quadre, amb la informació necessària sobre cada soca i en especial atenció als parells de bases en tots els casos de diferent nombre però propers entre ells, sempre entre 4'5 milions i 5'6 milions.

TAULA 2: Genètica comparativa i les dades que s'empren					
SOCA	DATA	PARELLS DE BASES	PUBLICADOR	CIENTÍFICS	GENS PREDITS
<i>E. coli</i> O157:H7	29/03/2000	5'59 milions	Osaka University	Hayashi T, Makino K, Ohnishi M, Kurokawa K, Ishii K	5459
<i>E. coli</i> W3110	2006	4'65 milions	Coli Genetics Stock Center	-	4333
<i>E. coli</i> 536	13/07/2006	4'94 milions	Universitat de Goettingen	-	4685
<i>E. coli</i> CFT073	10/12/2002	5'23 milions	Universitat de Wisconsin-Madison	Welch RA, Burland V, Plunkett G 3rd, Redford P, Roesch P	5548
<i>E. coli</i> APEC 01	04/10/2006	5'5 milions	Universitat de Iowa State	Johnson TJ, Wannemeuhler YM, Scaccianoce JA, Johnson SJ, Nolan LK	4965
<i>E. coli</i> K12	2006	4'64 milions	Científics esmentats, i altres, a la dreta d'aquesta cel·la	Riley M, Abe T, Arnaud MB, Berlyn MK, Blattner FR	4466
<i>E. coli</i> UT189	05/04/2006	5'18 milions	Universitat de Washington	Chen SL, Hung CS, Xu J, Reigstad CS, Magrini V	5299

El motiu pel qual les soques diferents d'*E. coli* tenen un nombre de parells de bases és senzill i el podem deduir gràcies a aquesta frase: "Qui porta amb si més material i més especialitzat, un soldat que va a la guerra o un pescador de cap de setmana?" La resposta és clara, el soldat.

El meu exemple per explicar millor la frase es basa en dues soques, la *E. coli* O157: H7 i la *E. coli* K-12. La primera té 5'59 milions de parells de bases i la segona, 4'64 milions. Motiu? Perquè la soca patògena exposada té molts gens extra que li donen aspectes específics com la virulència, gens incorporats per transferència horitzontal o per virus, etc ... Aquests gens extra, que poden arribar a ser molts, són la raó de les diferències que podem trobar. Llavors arribem

¹⁴ Dades, gràfics, imatges i informació extreta i modificada de: A. WELCH, R. *Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic Escherichia coli*.

a la conclusió que a menys gens, la soca és menys patògena i fins i tot no patògena, i com hem vist, pot arribar a beneficiar de l'ésser que habiten.

Deixant de banda aquest tema, torno a les diferències entre les soques. Primerament, la *E. coli* APEC01 està composta per 3 molècules d'ADN amb un total de 5'5 milions de parells de bases. Un total de 4888 gens o bé 4965 gens predits. 215 gens d'aquests són hipotètics.

També tenim la *E. coli* O157: H7 del brot de Sakai amb una sola molècula d'ADN i 5'59 milions de parells de bases. Té 5459 gens predits dels quals 503 són hipotètics.

En tercer lloc la *E. coli* 536 té una sola molècula d'ADN i 4'94 milions de parells de bases i 4685 gens, dels quals 238 són hipotètics. La *E. coli* CFT073 és també d'una sola molècula d'ADN i 5'23 milions de parells de bases. A més té 316 gens hipotètics inclosos en 5548 gens d'aquest bacteri.

Una altre bacteri és la *E. coli* K12 amb també una sola molècula d'ADN i 4'64 milions de parells de bases, amb un total de 4466 gens dels quals un 15'71% és a dir 674 gens, són hipotètics.

També la *E. coli* W3110 d'una sola molècula d'ADN i, en aquest cas, 4'65 milions de parells de bases, amb un total de 4333 gens dels quals 161 són hipotètics.

L'últim bacteri que he estudiat és la *E. coli* UT189 amb un total de dues molècules d'ADN i 5'18 milions de parells de bases. El seu total de gens és de 5299 dels quals 556 són hipotètics.

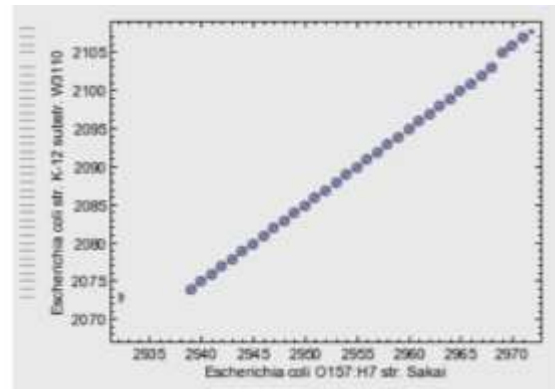
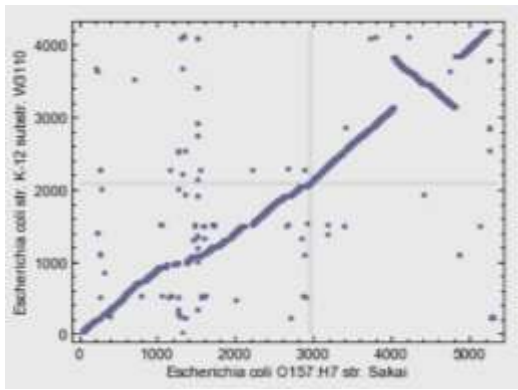
En segon lloc, observem les diferències a nivell proteic. En aquest cas, les diferències entre la soca *E. coli* O157: H7, de la qual vaig parlar en el bloc 2, amb altres soques. És veritat que la diferència de proteïnes és brutal, però a què es deu aquesta diferència en nombre de proteïnes?

El motiu d'aquest succés té una raó: és probable que encara que el genoma estigui seqüenciat hi hagi zones o regions en les quals no s'ha pogut realitzar una bona anotació, és a dir, saber exactament per a què codifica cada "ORF" (Open Reading Frame). Això explicaria que no estiguessin totes les proteïnes resoltes.

És important en primer lloc explicar què és tot això. Un marc obert de lectura, per les seves sigles en anglès ORF, és una seqüència d'ADN que conté un codó d'inici i un d'aturada. Aquests ORF 's són comunament usats com una sola peça per a realitzar certes prediccions de gens.

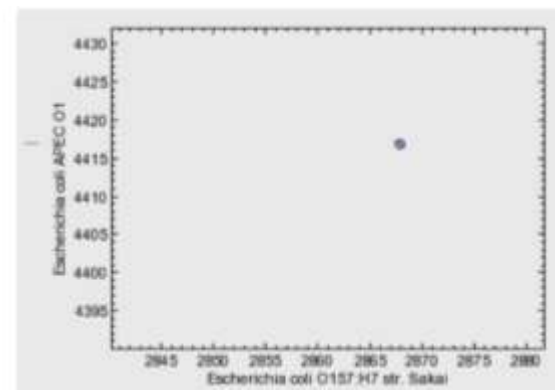
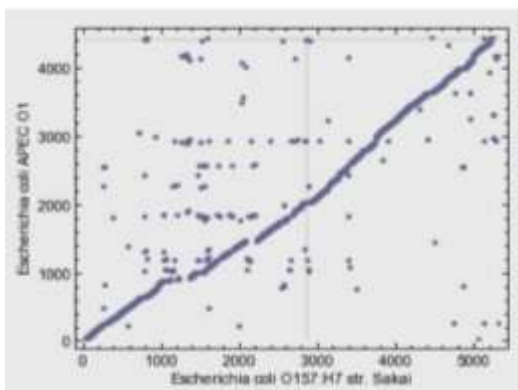
En una seqüència d'ADN hi ha 6 possibles sentits per a aparèixer ORF's. Un codó pren 3 nucleòtids i per això existeixen 3 possibles llocs d'inici. Si a més l'ADN és traduït, cal afegir altres tres possibles marcs oberts de lectura, donant el sentit oposat de lectura.

Cal tenir present que encara que totes siguin *E. coli* no hi ha cap motiu per tenir la mateixa dotació gènica i per tant, codificar les mateixes proteïnes. Em vaig quedar sorprès en saber que comparteixen escassos gens, hi ha sempre un "core", la marca de la casa, de gens compartits. Tot i així, molts dels altres gens són específics per a una soca en concret i això explica també el motiu de les soques patogèniques. Moltes de les regions del genoma d'una *E. coli* provenen d'altres bacteris, com la *Shigella* o la *Salmonella*.



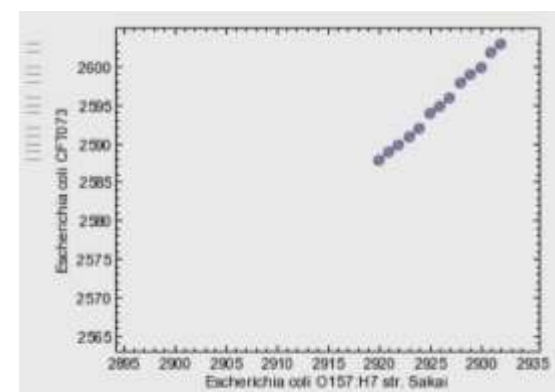
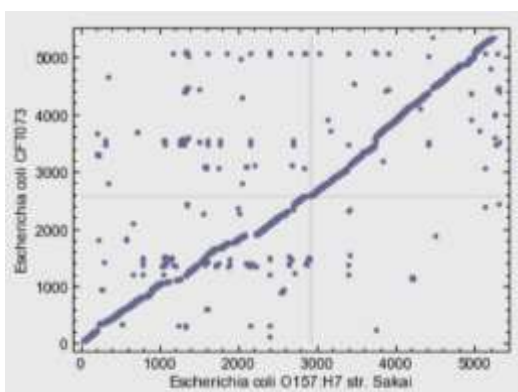
E. coli O157:H7 en comparació amb *E. Coli* W3110

Total de 4227 proteïnes



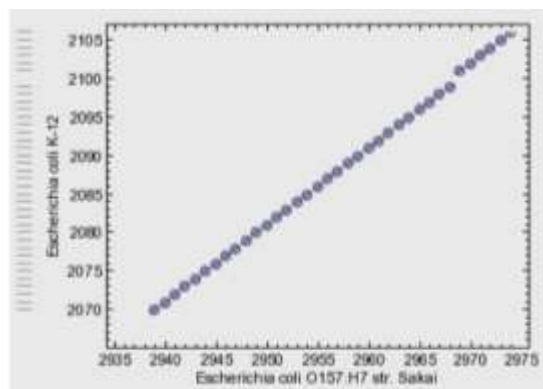
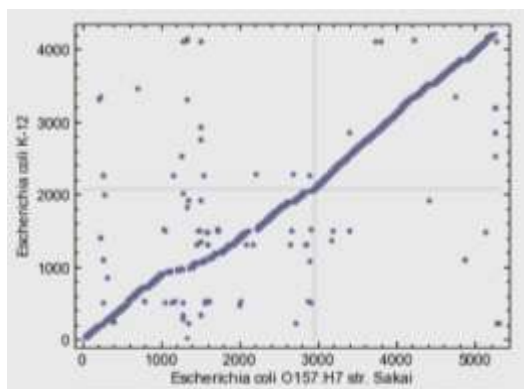
E. coli O157:H7 en comparació amb *E. coli* APEC 01

Total de 4467 proteïnes



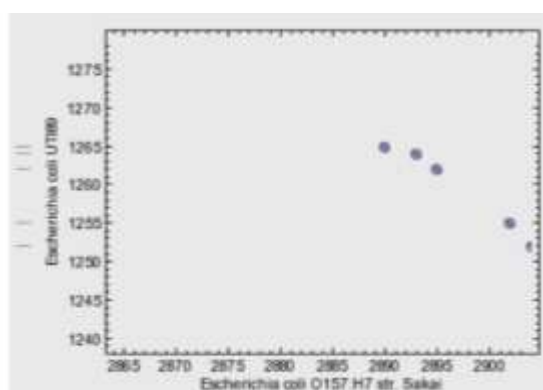
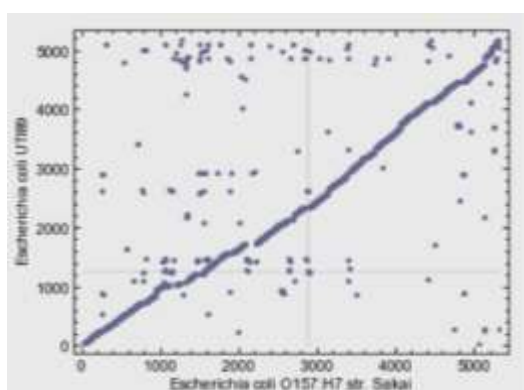
E. coli O157:H7 en comparació amb *E. coli* CFT073

Total de 5379 proteïnes



E. coli O157:H7 en comparació amb *E. coli* K12

Total de 4243 proteïnes



E. coli O157:H7 en comparació amb *E. coli* UT189

Total de 5211 proteïnes

FONT DELS GRÀFICS: BLAST, GenBank i les obres citades a la nota 9 d'aquest bloc 3.

Les imatges que podran veure en aquest apartat han estat realitzades mitjançant la tecnologia que ofereix la pàgina web del BLAST (GenBank).

En el següent quadre, extret de BLAST, podem veure diferents gèneres de bacteris i les seves similituds amb la *E. coli* O157: H7. Els colors més foscos presenten menys similituds i les clarianes, viceversa.

Amb el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del GenBank vaig poder realitzar comparacions entre diferents organismes. En aquest cas, la *E. coli* O157: H7 ha estat comparada per trobar similituds amb aquests: *Shigella flexneri* 5 str. 8401, *Shigella flexneri* 2.002.017 complete genome, *Shigella flexneri* 2a str. 2457T complete genome, *Shigella sonnei* Ss046 complete genome, *Shigella boydii* Sb227 complete genome, *Shigella boydii* CDC 3083-94 complete genome, *Shigella dysenteriae* Sd197 complete genome, *Shigella flexneri* 2a str. 301

complete genome, *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar paratyphi A str. AKU_12601 complete genome, *Salmonella enterica* subsp. Enterica serovar paratyphi A str. ATCC 9150 complete genome, *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Agon str. SL483 complete genome, *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Dublin str. CT_02021853 complete genome, *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Typhimurium str. ST4/74 complete genome, *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Typhimurium SL1344 genome, *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Typhimurium str. UK-1 complete genome, *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Newport str. SL254 complete genome, *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Choleraesuis str. SC-B67 complete genome, *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Enteritidis str. P125109 complete genome, *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2 complete genome, *Salmonella typhimurium* fragment STMD1, *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Weltevreden str. 2007-60-3289-1 complete genome, *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Schwarzengrund str. CVM19633 complete genome, *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Typhi Ty2 complete genome, *Salmonella enterica* serovar Typhi (*Salmonella typhi*) strain CT18 complete Chromosome, *Salmonella enterica* serovar Typhi (*Salmonella typhi*) strain CT18 complete Chromosome (diferents regions del cromosoma: 12, 16, 18, 2 i 14), *Salmonella enterica* subsp. arizonae serovar 62: z4, Z23: -, complete genome, *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar paratyphi B str. SPB7 complete genome, *Salmonella enterica* subsp. Enterica serovar gallinarum str. 287/91 complete genome, *Salmonella typhimurium* fragment STMF1, *Salmonella bongori* NCTC 12.419, culture collection SGSC SARC11 complete genome, *Salmonella paratyphi* strain A7, *Salmonella paratyphi* strain A6, *Salmonella paratyphi* strain A3, *Shigella sonnei* strain FBD065, , *Shigella sonnei* strain FBD063, *Shigella sonnei* strain FBD062, *Shigella sonnei* strain FBD061, *Shigella sonnei* strain FBD048, *Shigella sonnei* strain 14, i moltes altres *Salmonella* i *Shigella*.

Amb les descrites anteriorment, hi havia certes similituds més especialment amb les que descriu aquest quadre donant les anotacions o informacions essencials:

<u>TABLA 3: E. coli O157:H7</u>	
ORGANISME	PERCENTATGE
<i>Shigella flexneri</i> 5	100%
<i>Shigella flexneri</i> 2 ^a str. 2457T	100%
<i>Shigella flexneri</i> 2002017	100%
<i>Shigella flexneri</i> 2 ^a str. 301 genome	100%
<i>Shigella sonnei</i> Ss046	99%
<i>Shigella boydii</i> Sb227	100%
<i>Salmonella enterica</i>	100%
<i>Shigella boydii</i> CDC 3083-94	100%

La resta dels organismes esmentats es troba en unes similituds entre un 93% i un 98%. Però com veiem, tots els organismes esmentats són *Salmonella* o *Shigella*. La *E. coli* i la *Salmonella* són parents propers però molt diferents. La *E. coli* en molts casos és inofensiva a diferència de la *Salmonella*. No obstant això com acabem de comprovar comparteixen més del 90% dels gens. Considerant aquesta similitud genètica, el seu antecessor comú les diferencia en una ser considerablement inofensiva i patògena.

El Brock: *Biología de los microorganismos* defensa que es creu que l'ancestre comú era un organisme comensal en rèptils. Això implica dos fets: la *Salmonella* a passa a ser més patògena i *E. coli* actua de comensal. Aproximadament 50 gens de virulència existeixen en ambdós organismes, que per exemple són capaços de proporcionar-los una excel·lent defensa davant antibiòtics, com ja hem vist en més d'una ocasió. Però un es va convertir en una espècie d'àngel i un altre al dimoni i de vegades, l'àngel es pot semblar a un dimoni. Una frase que em passa ara pel cap per explicar una última cosa en relació a la *Salmonella*: aquesta la vam adquirir en beure aigua contaminada i ha de ser capaç de resistir el pH del nostre estómac per sobreviure.

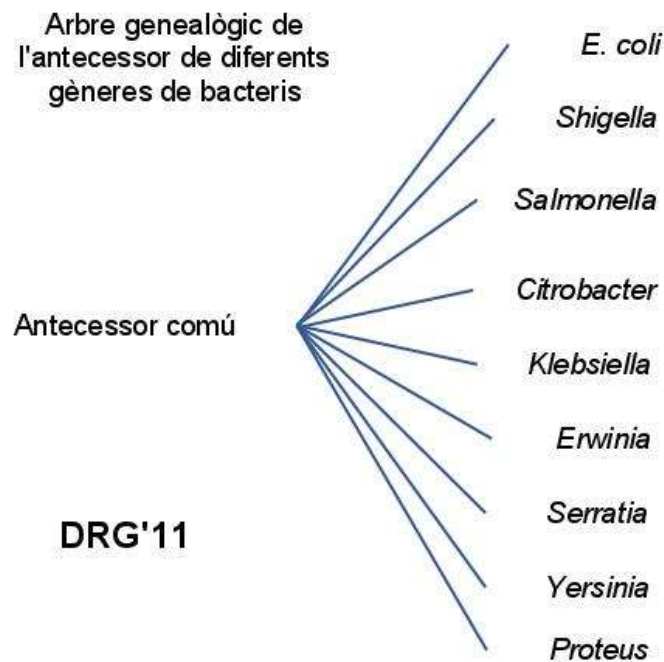
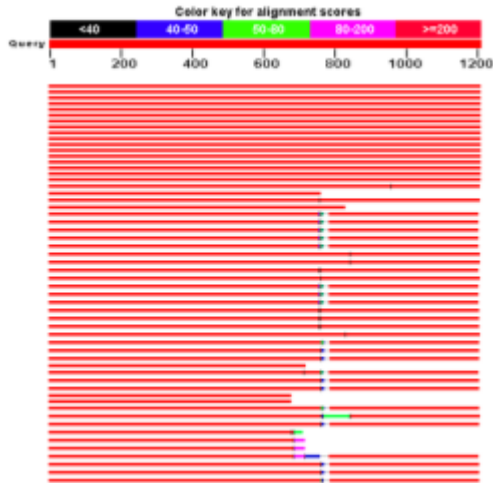


Figura 1.25. En aquesta imatge veiem una relació entre uns gèneres de bacteris que procedeixen d'un antecessor comú

També hi ha una relació entre *E. coli* i *Shigella*. Els ceps de *Shigella* produeixen la toxina Shiga (toxina que inhibeix la síntesis de proteïnes), mateixa toxina produïda per la *E. coli* O157: H7. Aquesta mateixa a més desenvolupa un paper en el síndrome urèmic hemolític.

Un cas semblant amb la *Salmonella*, ja que *Shigella* i *E. coli* comparteixen més del 90% dels gens i com hem vist en l'anterior figura, procedeixen d'un mateix antecessor. En aquest altre quadre, podem veure

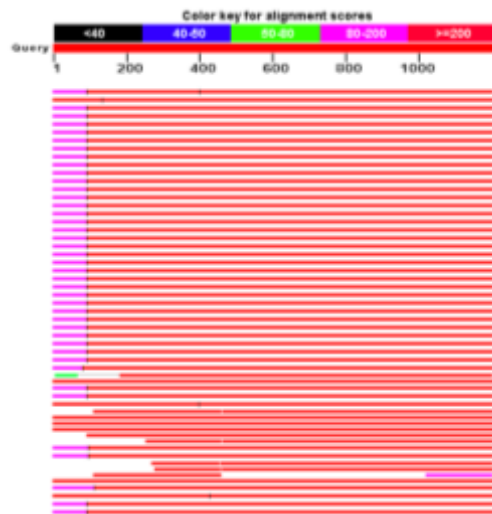


que hi ha moltes més similituds entre les comparacions realitzades: la *E. coli* O157: H7 i tot allò relacionat amb el terme *Escherichia* al GenBank i BLAST. En aquest cas, el percentatge és superior en tots els casos al 97%. La raó és molt clara: una mateixa bacteri té els mateixos gens en certs casos i semblants gens en altres en tot el gènere del bacteri, és a dir, en totes les soques.

Si comparem la seqüència escollida de la *E. coli* O157: H7 amb la soca d'*E. coli* O157: H7 O127: H6 veiem que hi ha diferències, encara que pràcticament escasses.

Com podem veure, 330 parells de bases dels 339 de les seqüències són idèntics. Per tant, hi ha 18 bases, diferents. I d'aquestes 18 bases, 3 de les quals són diferents, pertanyen a espais, reduint a 15 bases la dissemblança pràctica. Un 3% de diferències entre dues soques d'una mateixa bacteri.

La *Escherichia coli* O104: H4 comparteix un 100% dels gens amb les soques de la mateixa i amb la *Shigella dysenteriae* Sd197, *Shigella flexneri* 2a str. 2457T, *Shigella boydii* CDC 3083-94.



Com veiem tenim un cas exactament igual al de la *E. coli* O157: H7 ja que ambdues comparteixen més d'un 80% del seu genoma amb organismes similars com ara la *Shigella*, la *Salmonella* i altres soques d'*E. coli*.

Fixem-nos ara en el lipopolisacàrid del bacteri Gram-negatiu *Escherichia coli* O104: H4. Es tracta de molècules grans localitzades a la membrana externa, format pel lípid (A), el polisacàrid i el polisacàrid específic (O).

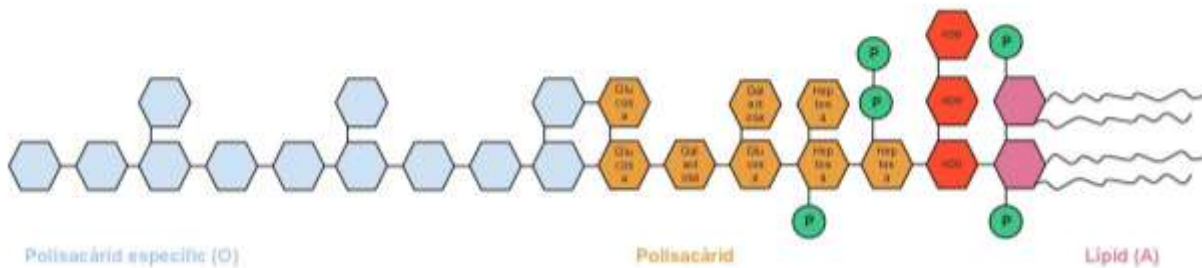


Figura 1.26. L'estructura de lipopolisacàrid de la *E. coli*. A1'11

Primerament, tenim un lípid (A) present en els bacteris Gram-negatius que és un disacàrid (amb grups-OH) units a un àcid gras (-COOH). Aquest lípid és essencial per formar la membrana externa. Aquest lípid és unit a un polisacàrid format per una regió externa i una interna, formades respectivament per hexoses i heptoses en un cas, i en l'altre per 2-ceto-3-desoxioctònic. Al final trobem el polisacàrid específic (O) que és una repetició de tetra-unitats ramificades. Aquesta lletra O fa referència al fet que és molt activa en el sistema immune, i això és un motiu de "serotip".

Potser es pregunten: per què fa vostè aquesta introducció? El motiu, per poder dir que ambdues soques d'*E. coli* (O104: H4 i O157: H7) pertanyen a dos tipus diferents de lipopolisacàrids i per això es va descobrir que els gens que codifiquen per a aquests lipopolisacàrids són de transmissió fàcil per als ceps d'aquesta bacteri. En altres paraules, captar aquests gens pot implicar una transformació a un altre tipus de serotip.

A la taula a continuació, trio una sèrie d'estudis del genoma per veure aquesta constant relació.

TABLA 4: Comparació <i>E. coli</i> O104:H4 i <i>E. coli</i> O145:H7			
Estudio	ID Similars	ID Diferents	Percentatge
Proteïnes hipotètiques	18	19	95
Proteïnes hipotètiques	94	94	100
Proteïnes hipotètiques	16	16	100
Proteïnes hipotètiques	19	20	95
Proteïnes hipotètiques	19	21	90
Operó, 19 pb en 5'	32	35	91
Aspartoquinasa II	36	45	80
Heptosiltransferasa	22	24	92
Elongació cadena proteica	18	19	95

5. GENÈTICA COMPARATIVA *E. coli* CFT073 I *E. coli* EDL933¹⁵

En una comparació entre altres soques *E. coli*, en aquest cas a tres bandes el genoma en una comparació de CFT073 amb *E. coli* enter hemorràgica EDL933 revela que, sorprenentment, només el 39,2% del seu combinat conjunt de proteïnes en realitat són comuns en el genoma de les tres soques.

Els genomes de patògens són tan diferents entre si perquè que cada agent es reflecteix en la absència de gens per al sistema de secreció. El genoma CFT073 és particularment ric en gens.

Una mostra d'*E. coli* CFT073 va ser aïllada a la Universitat de Maryland Hospital. De tot el genoma en les biblioteques s'han preparat a partir ADN genòmic uns clons, seqüenciats a l'atzar, mitjançant l'ús de tint terminador de la química i la recollida de dades a Applied Biosystems ABI377 i 3700, seqüenciadors automàtics.

En acabar la seqüència utilitzada dels extrems oposats de la vinculació clons, diverses tècniques basades en PCR, se'ns permet ordenar l'estructura de durant el procés de muntatge així com proporcionar un mapa físic independent de tota genoma.

Aquest sistema utilitza llum tènue per definir ORF 's. A més es van realitzar recerques en contra de la redundància en la base de dades de BLAST. Així construïm una base de dades per a la presentació de GenBank. La nostra base de dades supera el 90% d'identitat, inclosos si més no les alineacions en un 90% dels gens.

El principi de la seqüència correspon a 0 minuts sobre la *E. coli* K-12 amb l'origen i el terme de la replicació del corresponent a les identificades en MG1655. La seqüència de la qual s'informa en aquest document ha estat dipositada a la base de dades del GenBank.

El genoma de CFT073 és de 590.209 parells de bases, més que MG1655 i similar en grandària a EDL933. Les comparacions van revelar que un 70% dels ORF 's identificats prèviament com a únic bé MG1655 o EDL933 són reemplaçats per nous gens específics.

Les illes CFT073 específiques contenen 2004 gens, dels quals només 204 també es produeixen entre els gens EDL933 específics. Dues terceres parts d'aquests gens realitzen funcions desconegudes o que estan associats amb el fag o la inserció d'elements en la seqüència.

La seqüència CFT073 del genoma ha revelat molts possibles factors que poden contribuir a la colonització dels teixits del tracte urinari i la malaltia . En CFT073, aquestes proteïnes són molt divergents dels de MG1655 i EDL933, amb la seqüència d'identitats d'aminoàcids que van des de 53% a 81%, el que suggereix que ha variat entre els llinatges de la *E. coli*. Hi ha gens per a la codificació de la secretina, una proteïna d'unió a nucleòtids necessaris per crispar la motilitat.

E. coli CFT073 codifica almenys set porta vehicles, unes proteïnes capaces d'exportar uns fragments de grans dimensions a través de la membrana externa o a través d'un porus. Per

¹⁵ Dades, gràfics, imatges i informació extreta i modificada de: J. JOHNSON, Timothy et al. *Comparison of Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli Strains from Human and Avian Sources Reveals a Mixed Subset Representing Potential Zoonotic Pathogens.*

exemple, en CFT073, es produeixen efectes psicopàtics sobre la bufeta, els ronyons i les cèl·lules epitelials. Tots dos tipus de patògens i no patògens *d'E. coli* s'han desenvolupat a través d'un procés complex.

La columna vertebral de gens ancestrals que defineixen la *E. coli* han estat sotmesos a una lenta acumulació de canvis en la seqüència, però els gens en la resta de la cromosomes són, en un sentit relatiu, recentment introduïts a través de nombroses i independents transferències horitzontals de gens.

L'anàlisi d'ús de codons dóna suport a la conclusió que hi ha un conjunt de columna vertebral, causat per certs gens en la *E. coli* que tenen un codó compartit que no es veu en els gens en cada un dels tres genomes. El resultat net és un mosaic en el qual es pot observar que recentment cadascuna de les soques va adquirir els gens del seu parents més propers, com ara *S. enterica*.

Les comparacions de CFT073 amb els d'altres extra intestinals aïllats *d'E. coli* indiquen que els gens de virulència similars comparteixen proteïnes. La comparació de les proteïnes de les tres soques *d'E. coli* mostra el nombre de soques específiques de les proteïnes. Nombre de proteïnes comptat: K-12, 4288; CFT073, 5016; EDL933, 5063.

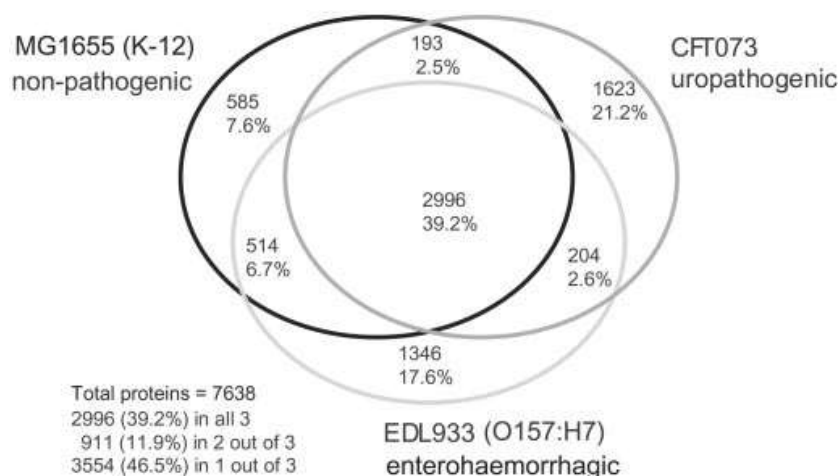


Figura 1.27. E. coli comparteix proteïnes. La comparació de les proteïnes previst de les tres soques, com hem comentat en l'anterior paràgraf

La seva observació proporciona evidència que la *E. coli* extra intestinal pot establir unes relacions de vinculació aparent a partir d'un grapat de gens de virulència i suggereix que *E. coli* uropatògens pot ser tan diversa com les soques intestinals.

Els últims anàlisis epidemiològics donen suport a la proposta que grups específics de gens són característics de cada un dels subtipus. El cromosoma nucli comú dels genomes *d'E. coli* s'ha conservat al llarg de la seva evolució vertical, amb certes reorganitzacions limitades, el que resulta en la conservació evident avui en dia. La columna vertebral també proporciona un gran

6. GENÈTICA COMPARATIVA *E. coli* K-12 I *E. coli* O157:H7¹⁶

En aquesta altra genètica comparativa, en aquest cas entre *E. coli* K-12 i *E. coli* O157: H7, tenim uns antecedents: la seqüència d'inserció (IS, per les seves sigles en anglès). Les seves activitats causen mutacions, la promoció de la diversitat genètica i, de vegades adaptació. Els estudis anteriors han examinat el seu nombre de còpies i la seva distribució en *Escherichia coli* K-12 i els aïllaments naturals.

Després de les dades que aniré desvetllant en el seu moment, podem arribar a una idea: les dues soques d'*E. coli* deriven d'un ancestre comú. En general, els elements són petits, entre uns 700-2500 parells de bases que contenen la informació genètica relacionada amb la seva transposició i regulació. La inserció d'un element es pot portar a la inactivació de gens i la mutació polar forta. El nombre de còpies i la distribució dels elements varien entre els aïllaments naturals d'*E. coli*.

El mapatge dels elements en *E. coli* K-12 suggereix una distribució dels cromosomes de forma no aleatòria amb les regions d'alta i baixa densitat. Alguns elements s'han vist importants en el desenvolupament per a la transferència horitzontal de gens, incloent el moviment de gens extra cromosòmics. Com tenim disponible els genomes complets de les soques, és més fàcil trobar algunes característiques de semblança o diferència.

La *E. coli* O157: H7 és una de les soques més estudiades i conegudes, així com la *E. coli* K-12. L'experiment pot ser llarg i alhora curt però, per exemple, la seqüenciació del genoma va trigar a fer-se i ara és fàcil de trobar. Seqüències adjacents a aquestes soques i els seus genomes s'han seqüenciat comparant amb soques d'*E. coli* K-12 i *E. coli* O157: H7. Comparant *E. coli* B amb el genoma d'*E. coli* K-12 es pronuncien diferències. Una diferència és l'absència de IS5 a la *E. coli* B.

Es desconeix si aquesta diferència reflecteix la selecció en contra d'aquest element en B, la manca d'oportunitat històrica per envair a B, o algun altre factor. El nombre de còpies dels altres elements és també molt variable: en K-12 i B, respectivament, trobem 6 i 20 còpies de IS1, IS2 té 11 còpies i IS3 té 5 còpies de cada cep. Després de realitzar els experiments necessaris, els contribuents a aquest projecte de genètica comparativa, van arribar a unes conclusions:

1. Col·locació en mapa de molts elements en els genomes d'*E. coli* B, *E. coli* K-12 i *E. coli* O157: H7. No van trobar elements presents de IS5. Es van comparar les dades obtingudes amb altres dues *E. coli* K-12 i O157: H7, els genomes són completament seqüenciats, amb els següents resultats principals.

¹⁶ Dades, gràfics, imatges i informació extreta i modificada de: SCHNEIDER, Dominique et al. *Genomic comparisons among Escherichia coli strains B, K-12, and O157:H7 using IS elements as molecular markers*.

2. Molts dels llocs d'inserció d'elements IS en *E. coli* B i K-12 corresponen a l'ADN del fag en *E. coli* O157: H7. Aquesta associació indica que aquestes regions del cromosoma es van sotmetre a re-ordenaments cromosòmics, en particular, ja sigui la inserció o supressió de regions d'ADN que distingeixen les diferents soques. En el cas de les insercions, les diferències a gran escala també implica la transferència horitzontal.
3. Poques seqüències revelen regions cromosòmiques que estan absents de K-12, O157: H7, o ambdues. Malgrat les marcades diferències en el nombre i llocs entre *E. coli* B i K-12, també s'indica que l'ordre dels gens locals al llarg dels dos cromosomes és bàsicament el mateix.
4. Algunes de les característiques fenotípiques d'*E. coli* B s'expliquen per inactivació dels gens rellevants per elements.
5. Aquestes observacions, en conjunt, indiquen un alt nivell d'activitat ja que les soques d'*E. coli* B, K-12 i O157: H7 es van separar del seu avantpassat comú, incloent les transposicions i la transferència horitzontal.

7. COMPARACIÓ *E. coli* O157:H7 y *E. coli* K-12¹⁷

Escherichia coli O157: H7 és una dels principals bacteris transmesos pels aliments patògens infectats que causa diarrea, hemorràgia colitis i la síndrome urèmica hemolítica. Aquí es presenta la seqüència completa d'un cromosoma O157: H7, soca aïllada del brot de Sakai, i els resultats de la comparació genòmica amb un cep de laboratori de la *E. coli* K-12 MG1655. El cromosoma és de 5,5 Mb de grandària, 859 Kb major que el de K-12.

Es van identificar 4,1 Mb de seqüència altament conservada entre les dues soques, el que pot representar la columna vertebral fonamental del cromosoma d'*E. coli*. La resta 1,4 Mb de la seqüència es compon d'altres seqüències específiques, la majoria de les quals són transferides horitzontalment mitjançant ADN estranger.

Les funcions predominants dels bacteriòfags és evident per la presència de 24 profags, com a elements que ocupen més de la meitat de la O157: H7. El seu cromosoma codifica les proteïnes. Hem determinat la seqüència del genoma d'un O157: H7 aïllat a partir de l'esclat de Sakai. La seqüència del genoma de la soca de laboratori benigna K-12 MG1655 ja s'ha determinat,, però al nostre coneixement, aquesta soca (anomenada O157 Sakai) és la primera soca d'*E. coli* el genoma de la qual ha estat seqüenciat en la seva totalitat.

En comparar les dues soques, es van identificar tots els components cromosòmics específics per a cada soca així com els conservats en ambdues soques. Aquests resultats proporcionen una àmplia gamma de tot el genoma a nivell de la informació no només per obtenir un conjunt complet de gens potencialment relacionats amb la seva patogènia.

En aquest estudi fem servir una soca d'*E. coli* O157: H7 aïllada del brot de Sakai i la comparem (el seu genoma) amb el de la *E. coli* K-12, en aquest cas d'una soca de laboratori. L'etapa inicial de la seqüència es va dur a terme pel conjunt del genoma a l'atzar. Es va construir una biblioteca basada en pUC18 que conté entre 1 y 2 Kb inserits. Després de muntar la seqüència de dades es van seleccionar dos grups dels clons.

Un total de 19, 969 clons que van ser seleccionats d'acord amb aquests criteris van ser seqüenciats utilitzant l'encebador invers. Aquesta estratègia va ser molt eficaç en la reducció del nombre de clons a l'atzar per ser seqüenciats, així com en la millora de la qualitat de la seqüència. Hem seleccionat 86 clons que contenen les seqüències no homòlogues a la seqüència de K-12 en ambdós extrems dels inserits, i va determinar les seqüències completes de cada inserit per l'atzar estratègia. Posteriorment, es va realitzar un tancament de bretxa per PCR.

La longitud dels cromosomes és més gran en 859 Kb que la de K-12 MG1655. En comparar les dues seqüències del cromosoma, hem identificat una seqüència d'aproximadament 4,1 Mb conservat en les dues soques. El nivell de conservació de la seqüència de nucleòtids en l'ordre de 4,1 Mb és notable, en un 98.31% amb 2,027 espais. Atès que les dues soques se sap que pertanyen a diferents llinatges de *E. coli*, la seqüència probablement representa la columna

¹⁷ Informació, gràfics i imatges modificats i extrets de: A. WELCH, R. *Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic Escherichia coli.*

vertebral dels cromosomes que es conserva en la majoria de soques *d'E. coli*, encara que pot contenir alguns segments excepcionalment comuns a les dues soques.

La columna vertebral és, però, interrompuda per nombrosos segments d'ADN de diferents mides que depenen de cada tensió. Aquests segments es distribueixen al llarg de la columna vertebral, però entre aquests, 203 loops es troben en llocs anàlegs en els dos cromosomes.

En un estudi de les bases, trobem que el contingut de G + C en el fag del cep de *E. coli* O157: H7 és més atípic, mentre que els bucles de fags tenen una mitjana de contingut de G + C més similar a la de

la columna vertebral. Això és perquè la majoria de les regions que codifiquen els gens són generalment similars a la columna vertebral sobre la base de la composició. Regions en el genoma del fag que pel que sembla no són essencials presenten sovint composicions atípiques respecte a les bases. O157 Sakai conté set operons *rrn* (ARNr-H) i les seves ubicacions i adreces en el cromosoma són els mateixos que en K-12 encara que alguns estan presents entre els dos ceps. Per contra, les composicions de gens ARNt difereixen notablement entre les dues soques. Dels 102 gens ARNt de O157 Sakai, 82 anys es conserven en K-12, però 20 estan absents en la mateixa.

Altres 18 ARNt que estan presents només en O157 Sakai resideixen en els genomes de set fags. No obstant això, tres gens han sofert grans canvis a la base i s'han convertit en pseudogens. Com a conseqüència d'això, O157 Sakai conté set còpies d'un anticodó CAU, quatre còpies de UCG i set còpies de UCU. Aquestes tres espècies d'ARNt s'han proposat per reconèixer la un subconjunt d'una família de codons.

Es pot, per tant, reconèixer els cinc codons que s'utilitzen més rarament en els gens en una conservació de la columna vertebral, però s'utilitza amb un espectacular augment de la freqüència dels gens ATA, CGA, CGG, AGA i AGG. Entre els 5361 ORFs identificats en el Sakai O157, 729 es conserven en K-12 (i la resta dels 1632 no són presents en K-12. Les funcions dels 873 ORF's específics es preveu per la similitud de seqüències de proteïnes conegudes i 369 són similars a les proteïnes de funcions desconegudes.

Gens amb funcions relacionades amb la virulència, incloent per a la biosíntesi de les fimbries, també representen un gran grup funcional (15%). Molts gens implicats en transport i metabolisme van ser identificats. Entre els gens en el cromosoma O157 Sakai, total de 2292 ORF's constitueixen 630 famílies de gens. L'adhesió a la superfície del teixit és el primer pas perquè els bacteris puguin establir la infecció. Algunes proteïnes de la superfície també s'utilitzen com substàncies d'adhesió.

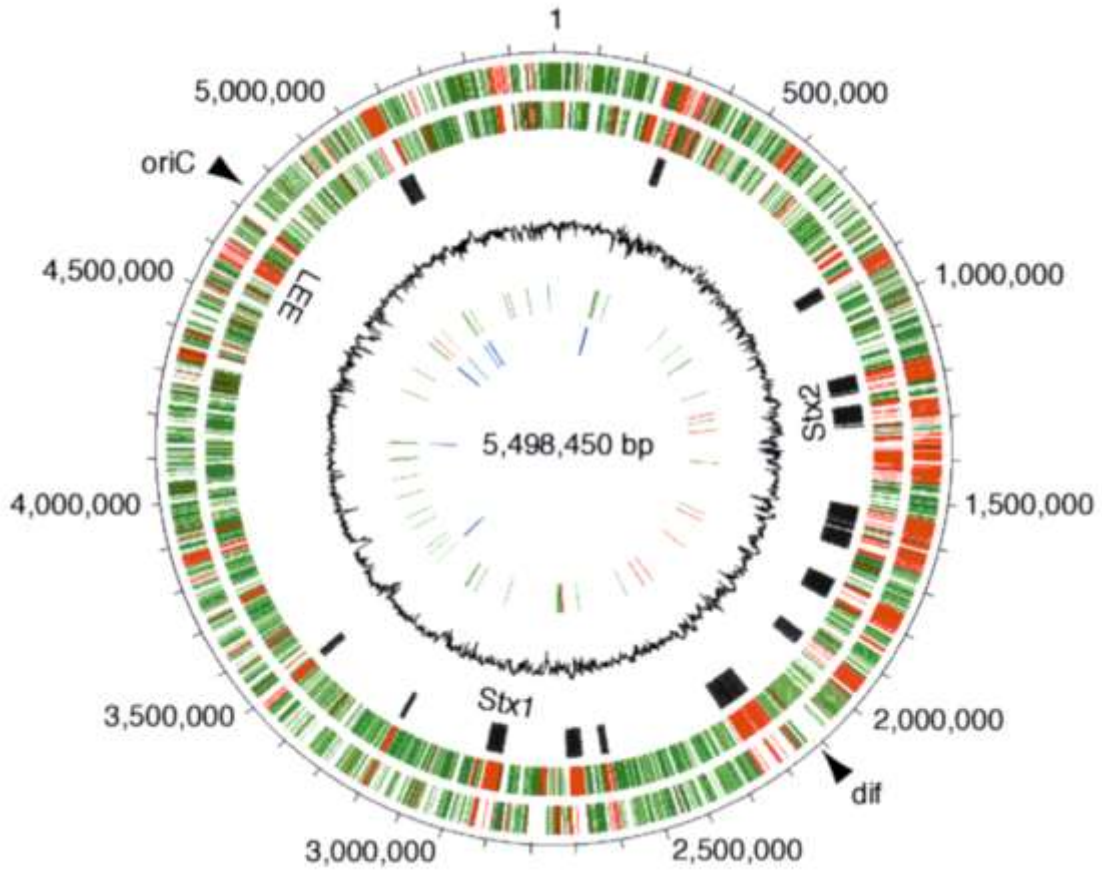


Figura 1.30. Representació circular d'E coli O157: H7. El cercle exterior indica les localitzacions cromosòmiques en parells de bases. El segon cercle i el tercer, els ORF 's predits. Les localitzacions de l'ARnT i l'ARNr en els altres cercles

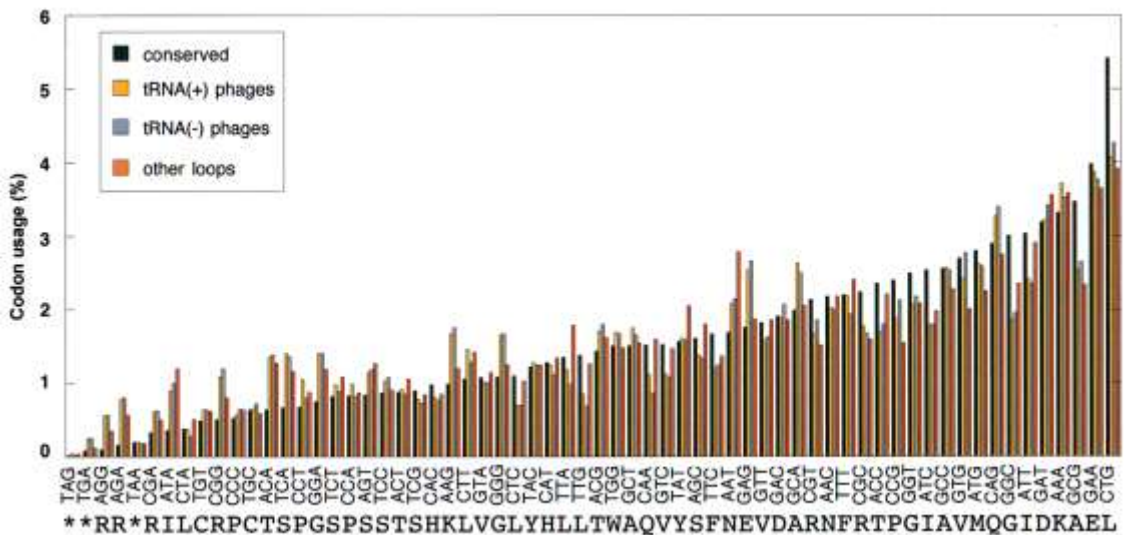


Figura 1.31. Ús dels codons en la E. coli O157: H7. Veiem els gens dividits en grups. Els gens en ordre de presència o conservació a la columna vertebral de la E. coli

CAPÍTOL 2

Científics de repartiment en acció

TREBALL DE RECERCA

BLOC 1

TREBALL EXPERIMENTAL

1. INTRODUCCIÓ

Aquest capítol és dedicat a "els científics de repartiment" en acció. És dedicat plenament a aquests científics, grans de la ciència, grans de la microbiologia. Aquests i altres elaboren i perfeccionen, al llarg dels temps passats, presents i futurs, aquesta tècnica. Per això són tan importants els científics de repartiment, els creadors de la tècnica pròpia, d'una tècnica que s'ha mantingut durant més de 300 anys, començant amb Anton van Leeuwenhoek i amb una finalitat que encara no arribarà.

Després del primer capítol d'aquest treball, centrat en un estudi bibliogràfic sobre alguns científics era important al meu parer afegir una part experimental per complementar el que a nivell teòric havia après de Petri, Gram i Escherich.

L'objectiu d'aquest segon capítol és clar: trobar un punt de partida de constants relacions entre els científics de repartiment. A partir del succés de l'estiu de 2011, el brot d' *Escherichia coli* enter hemorràgic es va veure que es podria tractar el tema de la *E. coli* per veure com es comporta aquest bacteri al laboratori: com creix, com es reproduïx i com mor, quan posem el bacteri en contacte substàncies antimicrobianes.

Per abordar el treball experimental amb garanties vaig sol·licitar una beca de la Universitat de Girona, dins el programa "Botet i Sisó" gràcies a la qual vaig poder realitzar un treball pràctic en els laboratoris de microbiologia sota la supervisió del Dr. Doctor 1 (per evitar incloure noms de tutors externs), titular de microbiologia d'aquesta universitat. En aquest treball experimental s'han realitzat uns experiments: un cultiu de bacteris, una observació de la sensibilitat de la *E. coli* a antibiòtics ...

Finalment, un petit aclariment: hi ha aquests dos capítols que estan separats ja que són diferents. De fet, les anotacions, els peus d'imatge i la numeració segueixen un ordre nou i diferent en cada un dels capítols i, en algun cas, dins del mateix bloc.

2. MEDIS DE CULTIU

En les dues setmanes del "Jove Campus de Recerca", vaig realitzar una sèrie d'activitats relacionades amb el meu treball de recerca. Vaig rebre l'ajuda de Doctor 1 i de Doctor 2, professors titulars de microbiologia de la Universitat de Girona.

Es prepararan tres mitjans: agar nutritiu, agar mannitol sal i agar McConkey. Els medis de cultiu que utilitzarem han de satisfer els requeriments nutritius dels microorganismes que volem conrear. Tot medi de cultiu ha d'incloure una font de fòsfor, nitrogen, sofre i carboni. Ha de mantenir alhora un pH i una força iònica. El medi de cultiu sempre pot ser líquid o sòlid.

2.1 AGAR NUTRITIU

L'agar nutritiu (figura 2.1) és un mitjà de cultiu microbiològic. Aquest agar és molt útil perquè roman sòlid fins i tot a altes temperatures. Els bacteris que creixen en aquest agar creixen a la superfície, permetent diferenciar amb facilitat.

És un mitjà de desenvolupament utilitzat per determinar les propietats fisiològiques i bioquímiques dels bacteris.

Aquest agar conté 1 g/l d'extracte de carn, 2g/l de llevat, 5 g / l de peptona (pols amb olor de carn rostida), 15g/l d'agar i 5g/l de clorur sòdic. L'agar nutritiu és un mitjà no selectiu.

L'agar usat en les pràctiques de laboratori realitzades era pols, que barrejem amb mig litre d'aigua destil·lada. Afegim una quantitat de 14 grams d'agar nutritiu en pols. El pH que vam obtenir a 25°C era 6'74, quan el normal del producte usat és de $6'8 \pm 0'2$.

Després de preparar aquesta barreja i barrejar fins completa homogeneïtat, en un matràs Erlenmeyer, esterilitzem les tres mesclres realitzades, en una màquina d'esterilització anomenada autoclau, a 121°C i més d'1 atmosfera de pressió. Per saber que era estèril, la cinta usada per tancar el Erlenmeyer, va quedar a ratlles negres.



Figura 2.1. A1'11

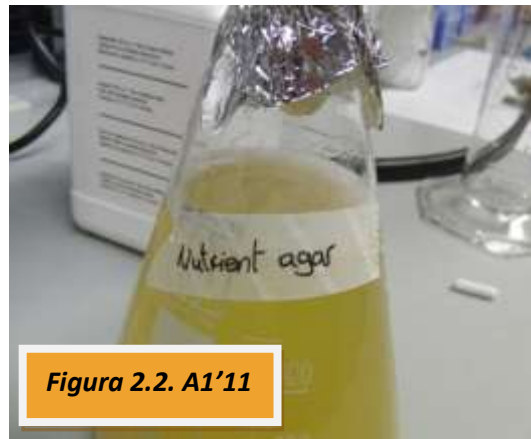


Figura 2.2. A1'11

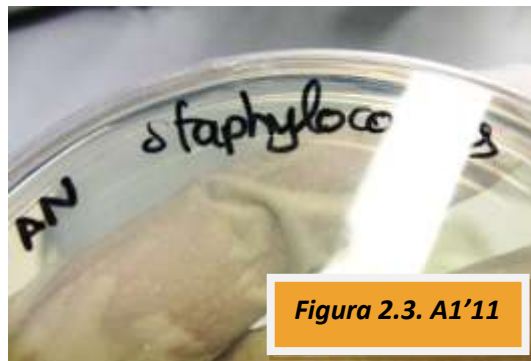


Figura 2.3. A1'11



A1'11

Més endavant, després d'una hora aproximadament, l'agar obtingut líquid, va ser introduït en plaques Petri de mida estàndard, concretament a 22. Després deixem reposar els mitjans aproximadament vint minuts, fins a obtenir un mitjà de cultiu sòlid. En aquest mitjà és on després faré el cultiu de bacteris, com veiem a la figura 2.3: un cultiu de *Staphylococcus aureus*.

Figura 2.4. Per saber que estava estèril, la cinta emprada per tancar l'Erlenmeyer, havia de quedar a ratlles negres, com en la imatge



*Figures 2.5 i 2.6. L'autoclau començant el procés a 39°C i quasi acabant-lo, a 117°C. Després, esperem fins que l'autoclau torna a pressió d'una atmosfera i 25°C. **A1'11***

2.2 AGAR McCONKEY

L'agar McConkey és un mitjà de cultiu desenvolupat per cultivar bacteris Gram-negatius. L'agar McConkey usat (figura 2.7) està compost per 17g/l de peptona, 10g/l de lactosa, 5g/l de clorur sòdic, 13.5g/l d'agar i 1.5g/l d'àcid biliar (àcid produït per la bilis). Per realitzar el medi de cultiu, en aquest barregem 55.5 g d'agar McConkey amb mig litre d'aigua destil·lada. La barreja també ha estat barrejada fins a la completa homogeneïtat. Es tracta d'un mitjà de cultiu selectiu i diferencial, perquè conté substàncies que afavoreixen el creixement dels microorganismes que volem aïllar i fins i tot és capaç d'inhibir el creixement dels Gram-positius.

En aquest cas, el pH que vam obtenir era de 7.2 quan el pH normal a 25 ° C era de $7.1 \pm 0,2$. Després de preparar la barreja i esterilitzar-juntament amb les altres dues, vam obtenir l'agar i també vaig realitzar la introducció de l'agar en les plaques Petri, en aquest cas en 20 plaques Petri.

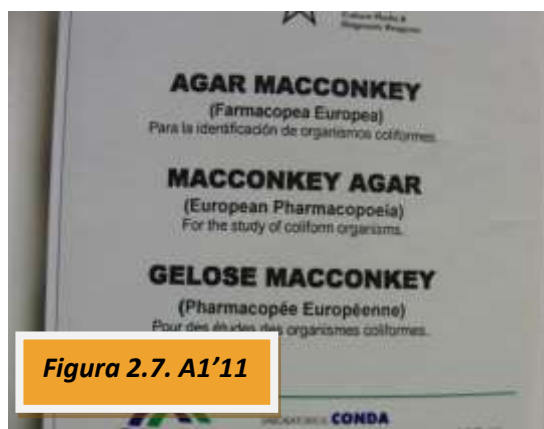


Figura 2.7. A1'11

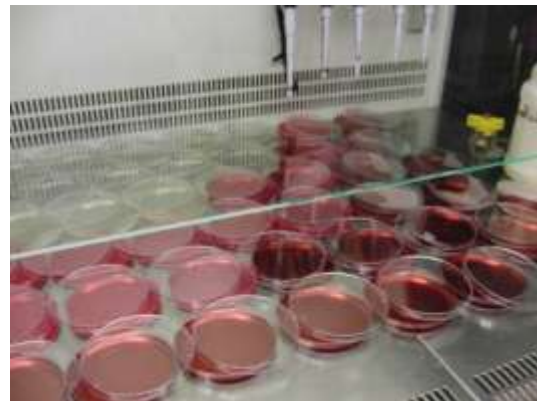
2.3 AGAR MANNITOL SALAT

L'agar manitol salat és un mitjà de cultiu usat en microbiologia que permet el creixement de certs bacteris impedit el creixement d'altres. És important per diferenciar microorganismes patògens en poc temps. És especial per al creixement de Staphylococcus. Per tant, és també un mitjà de cultiu selectiu i diferencial, ja que conté substàncies que afavoreixen el creixement dels microorganismes que volem aïllar.

L'agar manitol salat que he fet servir (figura 2.8) conté 1g/l d'extracte de carn, 75g/l de clorur sòdic, 10g/l de manitol (edulcorant), 15g/l d'agar, 10g/l d'enzim digestiu de caseïna (proteïna), 5g/l d'enzim digestiva de teixit animal, 0'025g/l de roig de fenol (compost indicador de pH). El pH obtingut a 25 °C era 7'3, quan el normal a aquesta temperatura és de $7'4 \pm 0'2$.



Com en els altres mitjans de cultiu, en aquest cas, 55g d'agar manitol salat han estat barrejats amb mig litre d'aigua destil·lada. La barreja obtinguda també ha estat esterilitzada. Després, 20 plaques Petri han rebut mostres en petites dosis de la barreja d'agar manitol salat i aigua destil·lada.



Figures 2.9 i 2.10. En aquestes fotografies podem observar les tres mesclures en l'autoclau i les 62 plaques de Petri, solidificant-se. A1'11



Figura 2.11. L'autor d'aquest treball, als laboratoris de microbiologia de la Universitat de Girona, preparant els medis de cultiu. A1'11

3. CULTIU DE BACTERIS

Es realitzaran uns cultius de bacteris, seguint una metodologia determinada. Es van usar agar en placa i diferents tècniques de sembra, les següents són les que comprenen la metodologia a seguir:

- Per estria fins esgotament (Streak-plate)

S'utilitza la nansa de Kolle que anomenem per esterilitzar i deixem refredar prop la flama per evitar que tingui microorganismes, és a dir, per evitar una contaminació del medi de cultiu.

Per realitzar el cultiu llisquem en ziga-zaga la nansa fins a cobrir tota la placa. El nostre objectiu és esgotar tot el contingut de microorganismes en la nansa, per finalment poder aconseguir alguna colònia ben diferenciada.

- Per estria escocesa (Streak-plate)

S'utilitza per aconseguir colònies aïllades quan es parteix d'altres concentracions. Es segueixen línies paral·leles. Es flameja la nansa i girant la placa es segueixen una altra sèrie de línies començant on les altres van acabar. Es repeteix el procés fins a completar la placa, tenint cura de no connectar el final de les últimes estries amb les primeres estries.

- Sembra homogènia en superfície (Spread-plate)

0'1 ml de la suspensió microbiana són col·locats a la superfície de la placa. Es reparteix per tota la placa amb una nansa de Digralsky, destapant la tapa només l'espai just perquè pugui passar la nansa de Digralsky, sense tocar mai qualsevol superfície no estèril. Si la nansa és de vidre, s'esterilitza en alcohol i es flameja prèviament.

- Sembra per abocament (Pour-plate)

En una placa Petri buida dipositem 1 ml de la dilució desitjada i cobrim amb 15-20 ml de medi de cultiu. Homogeneïtzem amb suaus moviments circulars i deixem que solidifiqui.

En tots els casos, els cultius es van realitzar a partir de les soques de referència de la col·lecció de l'àrea de microbiologia de la Universitat de Girona. Els cultius es van incubar a 37 ° C durant 24 hores i passat aquest interval de temps, ja estaven disponibles per a un estudi i caracterització, com veurem en l'apartat de resultats.

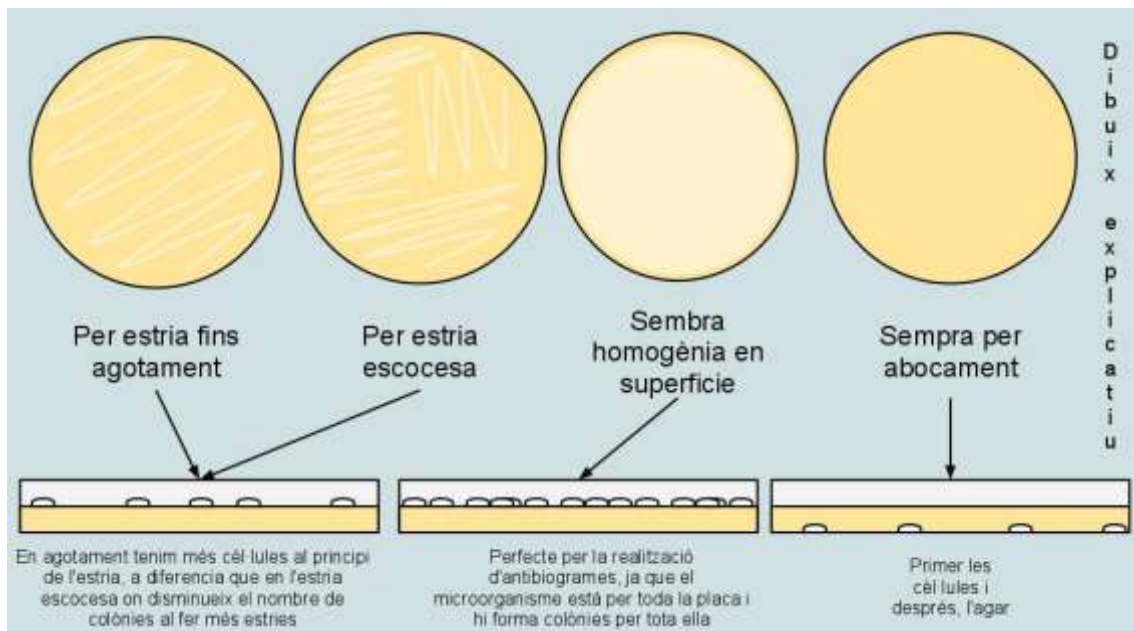


Figura 2.12. Dibuix que ens mostra les diferències entre les metodologies de cultiu. A1'11

En retirar les plaques de l'estufa de cultiu, es porta a terme el recompte de les colònies amb un comptador de colònies, que veurem en imatge més endavant, de forma tradicional, és a dir, marcar les colònies comptades amb un retolador.

Això és de vital importància, ja que més endavant es realitzarà un nou cultiu, amb les mostres analitzades. En el cultiu, aquesta vegada prendrem una alíquota¹ de les mostres de microorganismes dels conreus anteriorment, arrossegant colònies separades amb una nansa de Kolle, prèvia trucada per esterilitzar-la. La colònia escollida serà conreada de nou en una nova placa Petri amb agar nutritiu.

Cada colònia es posarà en plaques Petri diferents. Després de prendre una alíquota de la mostra, amb la mateixa nansa de Kolle es sembla la mostra a la placa Petri mitjançant una estria escocesa. Després es torna a flamejar la nansa de Kolle i es pren una alíquota d'una mostra de les acabades de conrear, girem la placa Petri i tornem a traçar estries per les zones



de la placa sense conrear. Després es repeteix el procés amb la segona mostra, realitzant llavors tres diferents estries a la placa Petri. Llavors, s'incuba a 37°C durant 24 hores.

A més aïllats enmig de cultiu les colònies crescudes al primer dia, en els mitjans de cultiu següents: agar manitol sal, agar nutritiu i agar McConkey.

Figura 2.13. La estufa de cultivo utilizada, (laboratorio E3, Facultad de Ciencias, Universidad de Girona). A1'11

4. RECOMPTE DE MICROORGANISMES D'UNA MOSTRA NATURAL

Per treballar amb cultius no purs, vaig anar a l'estanyol Cisó, a Banyoles. Vaig poder acompanyar a un grup de l'institut ecològic de l'aigua de la Universitat de Girona a l'estanyol, per aprofitar i així poder recollir una mostra de la mateixa i fer una comparació entre una mostra de cultiu pur i una mostra de cultiu natural.

El Cisó es troba a uns 200 metres de l'estany de Banyoles. Es troba protegit per abundant vegetació i només es pot accedir a ell per un estret camí que té una entrada per la carretera que envolta el llac principal.

Durant el període d'estratificació el epilimnion s'oxigena i es produeix un contrast entre el epilimnion aeròbic i el hipolimnion ric en àcid sulfhídric (H₂S). El període d'oxigenació permet el creixement d'alguns eucariotes. En la seva superfície hi ha bacteris fototròfics que han cridat l'atenció des de 1976 a molts investigadors que l'han escollit com a objecte d'estudi. La

¹ Part que es pren d'una massa o d'un volum.

característica més destacable de la estanyol Cisó és que durant el període de holomixis és totalment anòxica, presentant concentracions considerables d'àcid sulfhídric.

Amb les mostres obtingudes, d'una profunditat de mig metro, es durà a terme un banc de dilucions en solució de ringer i després es realitzarà un recompte de colònies emprant AN. El banc de dilucions serà de 10^0 a 10^{-5} .



Per a començar suposem que en 1ml de la mostra hi ha 10^6 cèl·lules. Las dilucions 10^{-1} y 10^{-3} , amb oxigen s'han descartat perquè ambdues estaven contaminades, tal com veurem en els resultats. Com las anaeròbiques, guardades en una gerra d'anaerobiosis també estaven contaminades, podem deduir que la pipeta usada estava contaminada durant la manipulació dels instruments.

Figura 2.14. Fotografia de l'estanyol Cisó. A1'11

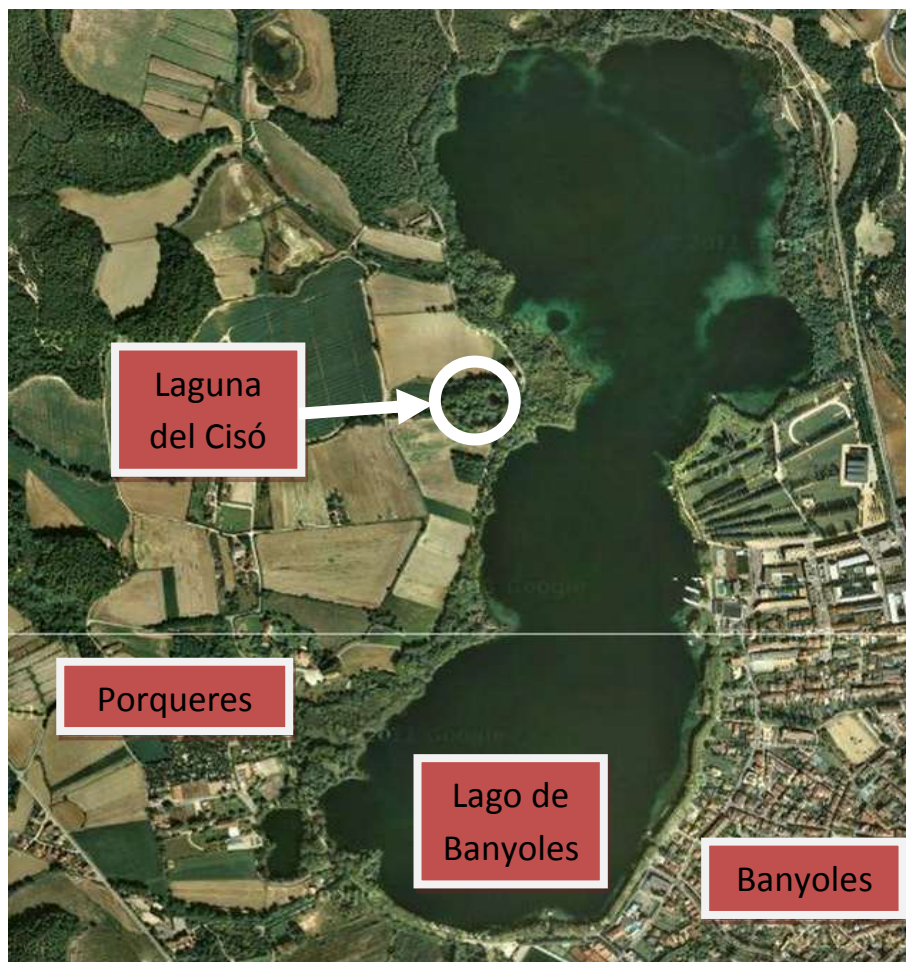


Figura 2.15. Mapa de la localització de l'estanyol Cisó. FONT: Google Maps

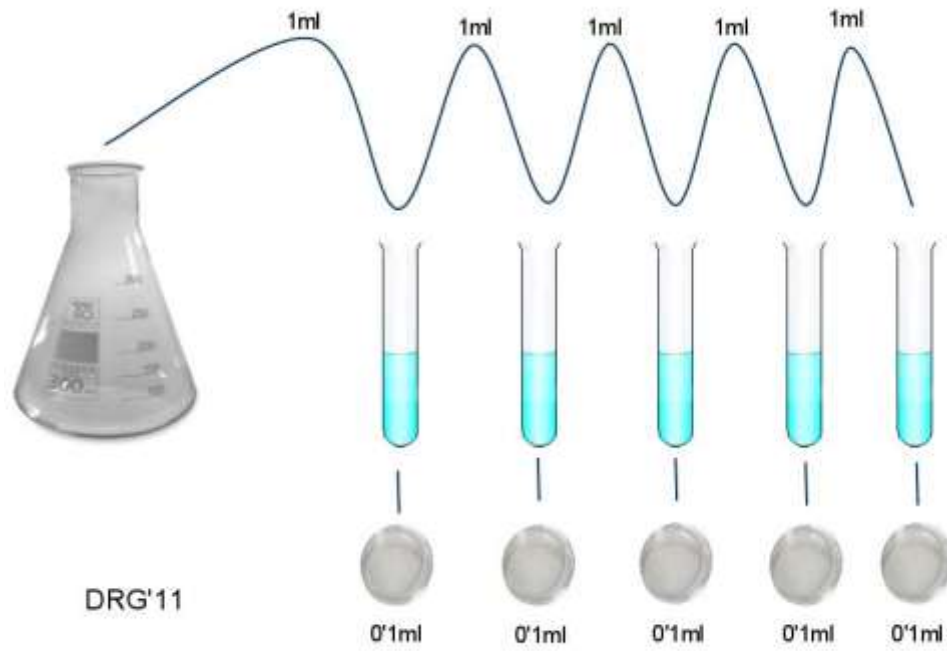


Figures 2.16 y 2.17. Imatges de l'estanyol Cisó, cedides pel Dr. Doctor 1

El banc de dilucions és una tècnica que consisteix a obtenir una mostra de microorganismes i fer una sèrie de dilucions, que amb una pipeta automàtica seleccionem, i després s'aboquen amb la mateixa en una placa Petri. Després deixem a la incubadora a 37°C durant unes 24 hores.

En primer lloc, col·loquem un tubets a la pipeta automàtica i truquem el mateix, treballant així en condicions estèrils. Llavors prenem una mostra d'1 ml del cultiu mixt i la dipositem en un tub amb 9 ml de Ringer estèril. Després agitem aquesta solució fins a aconseguir que sigui homogènia. Ara cal prendre 0,1 ml del tub i dipositar-los en la placa Petri amb medi de cultiu agar nutritiu. La mostra s'escampa per la superfície amb una nansa de Kolle d'un sol ús, per evitar la constant esterilització si fos una nansa de vidre. Després deixem a la incubadora a 37°C fins a aconseguir colònies aïllades. Aquesta seria la 10^0 .

Repetim el procés unes quantes vegades més, sempre prenent 1ml del tub de la solució anterior, agitant tot i prenent després 0.1ml de la solució que acabem d'agitar. Es col·loca en la placa Petri, en aquest cas obtenint la dilució 10^{-1} . Després de la incubació corresponent, obtenim colònies aïllades. El recompte de les mateixes ens ho mostra la següent taula.



*Figura 2.18. Un banc de dilucions. Cada tub representa la dilució corresponent, des de 10^{-1} fins a la dilució 10^{-5} . **A1'11***

5. DETERMINACIÓ D'INDIVIDUS PORTADORS DE *Staphylococcus aureus*

Durant la meua estada al "Jove Campus de Recerca", vaig realitzar un experiment a 12 persones del campus i a mi mateix. Aquest experiment consistia a prendre alíquotes de microbis corrents dels voluntaris, i conrear aquests microorganismes en medis de cultiu agar manitol salat i agar McConkey.

L'experiment és senzill: prenem una placa Petri per a cada individu participant. Aquesta persona passa un dit per una placa Petri amb agar McConkey (AM). En aquest mitjà, es tractarà de saber si aquesta persona és portadora d'*E. coli* o d'altres bacteris Gram-negatius. Llavors, la mateixa persona introdueix en un orifici nasal un bastonet d'orelles i refrega el mateix per les parets del nas. Llavors, s'escampa la mostra per una placa Petri, per saber si és portadora de *Staphylococcus aureus*, amb medi de cultiu agar manitol sal (AMS). Més endavant podrem observar com s'han desenvolupat aquestes mostres obtingudes.

Per aquests motius consisteix a determinar portadors de *S. aureus* mitjançant un aïllament d'aquest, a partir de les fosses nasals. *S. aureus* és un bacteri causant d'importantes infeccions: intoxicacions alimentàries i en hospitals (infecció nosocomial). En aquest últim cas més perillós ja que estarà en contacte freqüent als antibiòtics i presentarà resistència als mateixos. La majoria de soques no presenten símptomes de malaltia i, per això, un no sap si és portador. És per això que és de vital importància conèixer quines persones són realment portadores per evitar riscos innecessaris, per exemple, en manipular i processar aliments.

6. SENSIBILITAT DE DIFERENTS SOQUES DE *E. coli* AL TRACTAMENT ANTIBIÒTIC

6.1. INTRODUCCIÓ

El nostre objectiu és el de comprovar la sensibilitat de unes soques de *E. coli* davant antibiòtics diferents d'ús comercial. També es determinarà si aquesta sensibilitat varia al llarg del creixement.

6.2. MATERIAL I MÈTODE

6.2.1. SOQUES BACTERIANES

Les diferents soques de *E. coli* emprades en aquest treball es mostren a la taula 1. Totes les soques, a excepció de la soca lisògena per al bacteriòfag lambda, són soques de referència comprades en les col·leccions de microorganismes i disponibles a l'àrea de microbiologia de la Universitat de Girona.

En tots els casos, el medi de cultiu per al seu creixement en placa fou AN² mentre que el creixement en cultiu líquid es realitzarà en medi Luria-Bertani³.

² Veure la seva composició al capítol 2, bloc 1, apartat 2.1.

³ El Medi LB està compost per 10 g de triptona, 15 g de extracte de llevat i 5 g de clorur de sodi. S'usa per al manteniment i cultiu de soques de *E. coli* recombinant en els procediments de biologia molecular.

TAULA 1: Soques bacterianes que emprarem		
SOCA	CODI⁴	CARACTERÍSTICAS
<i>E. coli</i> 100	ATCC-12407	Mutant resistent a la radiació de la soca B.
<i>E. coli</i> 105	ATCC-23231	Resistent als raigs X i UV.
<i>E. coli</i> B	ATCC-23226, CECT-831	-
<i>E. coli</i> 405	ATCC-10536, CECT-405	Condicions de Cultivo: 37 ° C.
<i>E. coli</i> QD-supIII	CECT-4084	Supressor de color àmbar per créixer T4 amb una mutació en el gen 2.
<i>E. coli</i> 613	DSMZ-613	Pares de varis derivats. Gran quantitat de fags T1. Produeix la L-Asparaginasa.
<i>E. coli</i> 4230	DSMZ-4230	Bon indicador de la tensió lambda. Mutacions de color àmbar. Supressor de tensió positiva.
<i>E. coli</i> 13127	DSMZ-13127	Amfitrió de fags. Lambda.
<i>E. coli</i> 12242	DSMZ-12242	Resistent a 60g d'àcid Nalidíxico.
<i>E. coli</i> lisògena λ	-	Infectada por un bacteriòfag - Lisògena

6.2.2. ANTIBIÒTICS

Els antibiòtics utilitzats en l'assaig realitzat es trobaven disponibles en l'inventari de l'Àrea de Microbiologia de la Universitat de Girona. Els antibiòtics assajats, la seva concentració i la seva manera d'acció es mostren a la taula 2.

TAULA 2: Agrupació d'antibiòtics analitzats per cada placa de tractament. Es mostra també la concentració de cada antibiòtic per disquet i el mode d'acció de cadascun d'ells			
PLACA	NOM	CONCENTRACIÓ (µg)	MODO DE ACCIÓN
1	Penicil·lina	10	Afecta la síntesis de la paret cel·lular bacteriana
	Vancomicina	30	Afecta la síntesis de la paret cel·lular bacteriana
	Ampicil·lina	10	Afecta la síntesis de la paret cel·lular bacteriana
	Cefoxitina	30	Afecta la síntesis de la paret cel·lular bacteriana
2	Trimetroprim	30	Metabolisme de l'àcid fòlic
	Sulfamidina	30	Metabolisme de l'àcid fòlic
	Àcid Nalidíxico	0.5	ADN girasa
	Rifampicina	2.5	RNA pol DNA dep
3	Amikacina	30	Síntesis proteïnes (subunitat 30S ribosoma)
	Gentamicina	10	Síntesis proteïnes (subunitat 30S ribosoma)
	Eritromicina	15	Síntesis proteïnes (subunitat 50S ribosoma)
	Cloramfenicol	30	Síntesis proteïnes (subunitat 50S ribosoma)

Els antibiòtics tenen diversos efectes sobre els bacteris. Aquests mecanismes d'acció difereixen depenent de les característiques de cada organisme.

Depenent del mecanisme d'acció, poden afectar a diferents regions:

⁴ Les soques tenen un codi de referència amb una col·lecció determinada.

- Paret cel·lular: bloquejar la síntesi, exportació, organització o formació de la paret cel·lular, especialment els enllaços del principal component de la paret cel·lular: el peptidoglicà. Exemples: penicil·lina i bacitracina.
- Membrana cel·lular: lesionar la membrana cel·lular dels bacteris i de certs fongs. Exemple: gramicidina A.
- Ribosomes: inhibició dels ribosomes bacterians. Exemple: aminoglicòsids.
- ADN, ARN i proteïnes: es bloqueja la síntesi de l'ADN, ARN i altres enzims que participen en la síntesi de les proteïnes. Exemples: eritromicina i doxicilina.

6.2.3. ANTIBIOGRAMES

La realització de diversos test de susceptibilitat a diferents compostos antimicrobians és una pràctica rutinària en anàlisis clíniques, especialment a causa de l'aparició de resistències a diferents antibiòtics en hospitals. Per la seva senzillesa, el mètode més utilitzat és el de la difusió en placa (Disk Diffusion susceptibility test). Aquest mètode es coneix també amb el nom de test de Kirby-Bauer, ja que van ser aquests investigadors els que van establir les condicions adequades d'anàlisi. El mètode es realitza d'acord amb les especificacions recollides al National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

Per a l'anàlisi, els cultius es van realitzar en plaques de medi de cultiu Muller-Hinton⁵. La sembra de la soca en estudi es va realitzar mitjançant la tècnica de "swabbing", que consisteix a aplicar una o diverses capes d'un cultiu actiu del microorganisme d'interès mitjançant un hisop prèviament submergit en aquest cultiu. L'objectiu és el d'aconseguir un creixement homogeni en la superfície de la placa sobre el qual s'observen els halos d'inhibició causats per la difusió de l'antibiòtic des del disc (veure figura 2.19). Una vegada inoculada la placa es deixa assecar durant 5 minuts i passat aquest interval es col·loquen en la superfície d'aquesta, a una distància equidistant, quatre discos dels antibiòtics seleccionats (vegeu taula 2). Aquest procés es va repetir per a les 9 soques seleccionades i els 12 antibiòtics en estudi. En total es van sembrar 27 plaques (3 per a cada soca) amb 4 antibiòtics en cadascuna d'elles, agrupats d'acord a la seva manera d'acció.

Un cop dipositats els discos de tractament, les plaques de tractament es van incubar durant 18 hores a 37°C. Passat aquest interval de temps es van realitzar les mesures dels diàmetres dels halos d'inhibició (en cas d'haver-los). S'ha de tenir en compte que aquest diàmetre és més gran com més gran sigui la sensibilitat del bacteri a l'antibiòtic en qüestió ja que aquest va difonent des de la perifèria del disc cap al agar circumdant inhibint el creixement del microorganisme inoculat en cas de ser sensible a aquest antibiòtic.

⁵ L'agar Mueller Hinton és un medi de cultiu emprat per realitzar les proves de susceptibilitat antimicrobiana en microorganismes aeròbics pel mètode de Kirby-Bauer. Està compost per: infusió de Carn (300 g), midó (1,5 g), peptona de Caseïna (17,5 g) i agar Bacteriològic (17 g).

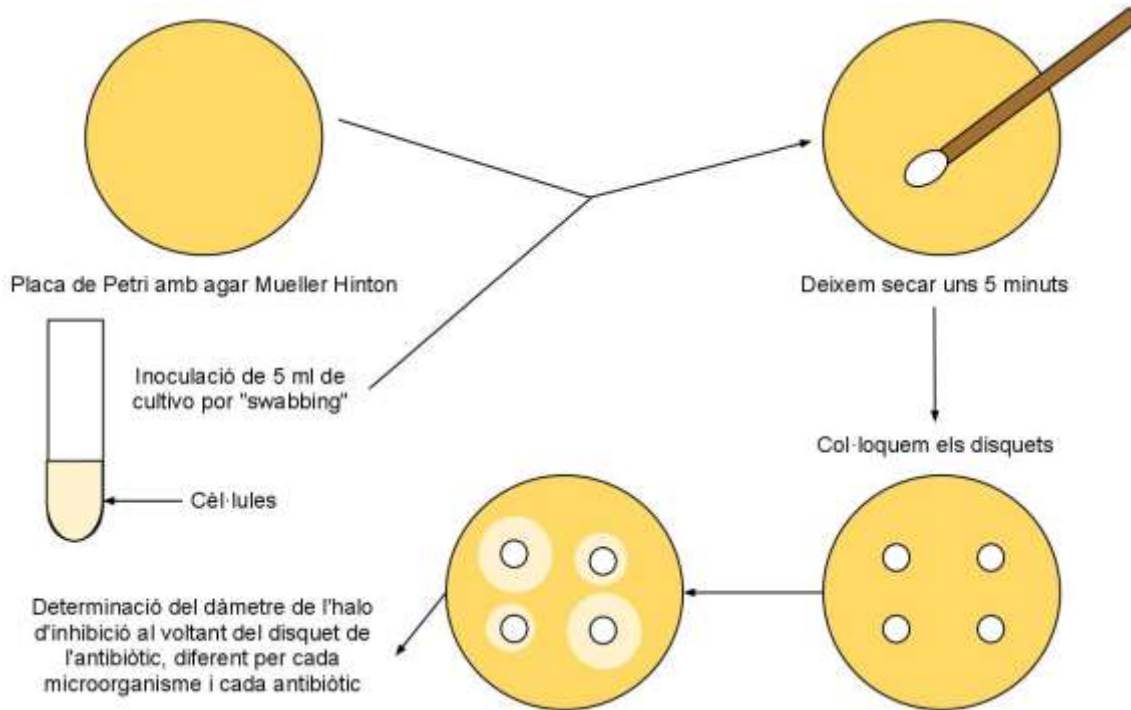


Figura 2.19. Procediment del test de susceptibilitat als compostos antimicrobians. **A1'11**

	<p>PLACA 1</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antibiòtics: Penicil·lina G 10, Vancomicina 30, Ampicil·lina 10, Cefoxitina 30.
	<p>PLACA 2</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antibiòtics: Rifampicina 30, àcid Nalidíxic 30, Sulfamidina 0'5, Trimetroprim 2.5.
	<p>PLACA 3</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antibiòtics: Amikacina 30, Gentamicina 10, Eritromicina 15, Cloramfenicol 30.
	<p>Anotació: els valors (30, 10...) fan referència a la concentració (en µg) de cada disquet del corresponent antibiòtic.</p>

Figura 2.20. Gràfic Smart-Art que mostra unes imatges del mètode, en cada cas amb una imatge d'una placa Petri amb els quatre disquets d'antibiòtics que es detallen en el mateix gràfic. **A1'11**



Les plaques de Petri i el material



Material: nansa de Kolle, Bunsen, vórtex i bastonets esterilitzats



Els antibiòtics en una de les plaques



Una de les plaques de Petri



Les plaques amb els antibiòtics



Els 12 antibiòtics emprats

Figura 2.21. Grup d'imatges. A1'11

6.2.4. VARIACIÓ DE LA SENSIBILITAT A ANTIBIÒTICS DURANT EL CREIXEMENT

En aquest cas es pretenia comprovar si la sensibilitat (o resistència) a diferents antibiòtics variava al llarg del creixement, especialment durant la fase estacionària i d'envelliment del cultiu on tant l'estructura com el metabolisme bacterià es troben ja deteriorats. En aquest cas es van seleccionar dues de les soques estudiades en l'apartat anterior, en concret les soques d' *E. coli* B i *E. coli* 100 i quatre dels antibiòtics estudiats. La selecció d'aquests últims es va realitzar atenent a la seva manera d'acció (el més variat possible) i al seu efecte sobre les soques en estudi, en concret es van seleccionar la Ampicil·lina (síntesi paret cel·lular), el Trimetoprim (metabolisme àcid fòlic) i la Rifampicina (inhibidor de la RNAdep DNAPol) i la Amikacina (síntesi proteïnes).

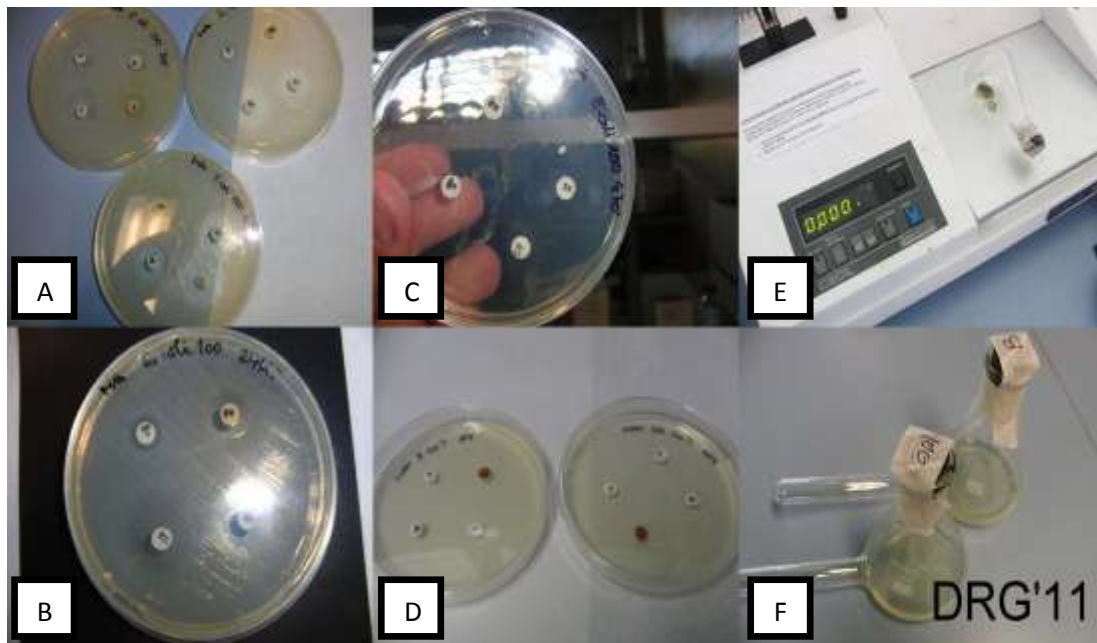
El creixement de les dues soques es va realitzar inoculant dos Erlenmeyer Monod que contenien 20 mL de medi de cultiu LB (veure nota 3) amb 1 mL d'un cultiu de nit d' *E. coli* B i *E. coli* 100. La monitorització del creixement es va realitzar determinant la densitat òptica a 550 nm (DO_{550}) a intervals regulars de 30 minuts durant les primeres 8 hores i més espaiades durant els tres dies següents, en un espectrofotòmetre⁶ i utilitzant mitjans LB com a referència.

La taxa de creixement (k) i el temps de generació (tg) es van calcular utilitzant les fórmules adequades d'acord amb el model exponencial de creixement en microorganismes. Per a aquest càlcul, es van utilitzar els valors de DO_{550} com estima del nombre de cèl·lules inicial i final (N_0 i N_t) en l'interval adequat del creixement exponencial.

$$k = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2 \times t}$$
$$tg = \frac{1}{k}$$

Els antibiogrames amb els quatre antibiòtics seleccionats es van dur a terme en diferents moments al llarg del creixement. El test de sensibilitat (antibiograma) es va realitzar de forma idèntica al que especifica l'experiment detallat en l'apartat anterior.

⁶ Instrument que serveix per mesurar la relació entre dos o més valors en funció de la seva longitud d'ona. En microbiologia s'usa per la quantificació de substàncies, en funció de la seva densitat òptica.



*Figura 2.22. Imatges: A (halos d'inhibició d'E coli 100), B (halo d'inhibició d'E coli 100 (24 hores)), C (halo d'inhibició d'E coli 100 (48h)), D (plaques Petri conreades amb els 4 antibiòtics), E (l'espectrofotòmetre usat) i F (els matrassos Erlenmeyer Monod amb dos cultius). **A1'11***

TREBALL DE RECERCA

BLOC 2

RESULTATS I CONCLUSIONS

RESULTATS

1. CULTIU DE BACTERIS

TAULA 3: Característiques de las soques estudiades					
ESPÈCIE	SOCA	FORMAT	MORFOLOGIA CEL·LULAR	MORFOLOGIA COLONIAL	MEDI
<i>Escherichia coli</i>	CECT 831	Criobolas	Coco-Bacil	Circular	AN
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	Líquid	Ninguna (Llevat)	Puntiforme	AN
<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT	Líquid	Coco	Circular	AN
<i>Bacillus subtilis</i>	CECT 482	Líquid	Bacil	Fusiforme	AN
<i>Salmonella LT2</i>	-	Líquid	Coco-Bacil	Fusiforme	AN
<i>Micrococcus luteus</i>	CECT 245	Líquid	Coco	Puntiforme	AN



Figura 2.21. Els 6 cultius d'aquest primer experiment. A1'11

TAULA 4: Microorganismes Cultivats

MICROORGANISME	FORMA	ELEVACIÓ ¹	MARGE ²
<i>E. coli</i> CECT 831	Granular	Llana	Lobulat
<i>Micrococcus luteus</i>	Puntiforme	Llana	Sencer
<i>Salmonella</i> LT2	Puntiforme	Umbilicada	Ondulat
<i>Staphylococcus aureus</i> CECT	Puntiforme	Llana	Ondulat
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> CECT 482	Filamentosa	Llana	Filamentós

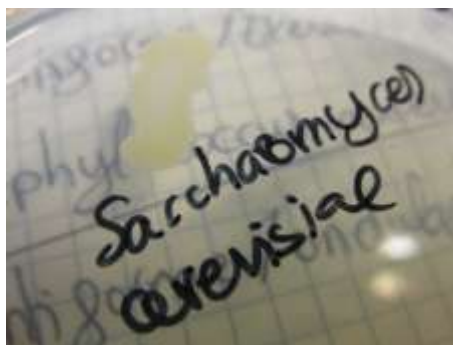


Figura 2.22. El microorganisme, *Saccharomyces cerevisiae*, només va produir una colònia. Com podem veure, és difícil diferenciar la forma, l'elevació i el marge. **A1'11**



Figura 2.23. Imatges sobre la part experimental. **A1'11**

¹ L'elevació, diferenciada o no, de com a mínim una de les colònies.

² La forma exterior de la colònia.



Figura 2.24. Plaques de Petri amb AMS i agar McConkey on es pot apreciar el creixement de les estries realitzades. El color groguenc indica una variació del pH, com a conseqüència d'una fermentació. **A1'11**

2. RECOMPTE DE MICROORGANISMES D'UNA MOSTRA NATURAL

TAULA 5: Estanyol Cisó, Banyoles – Banc de dilucions

MOSTRES AMB OXIGEN (O ₂)					
10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
86 colònies	Contaminada	1 colònia ³	Contaminada	0 colònies	0 colònies

MOSTRES SENSE OXIGEN (No O ₂)					
10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
77 colònies	Contaminada	1 colònia ⁴	Contaminada	0 colònies	0 colònies

Els resultats d'aquesta taula fan referència al banc de dilucions que es va dur a terme a partir de les mostres recollides a l'estanyol Cisó.

Es pot veure que hi ha diferències entre el creixement en condicions anaeròbiques (sense oxigen) i aeròbiques (amb oxigen), a causa del menor rendiment energètic dels metabolismes anaeròbics respecte els aeròbics.

En l'actualitat les condicions de anaeròbics s'aconsegueixen col·locant les plaques de cultius sembrats en una gerra d'anaerobiosi. Aquest instrument consisteix en una gerra de tancament hermètic que es fabrica, el tancament, gràcies a un sobre generador d'atmosfera reductora (ANAEROGEN). En els temps de Pasteur, una espelma era introduïda en una gerra i era aquesta vela la que donava les condicions d'anaerobiosi.

3. DETERMINACIÓ D'INDIVIDUS PORTADORS DE *S. aureus*

TAULA 6: Resultats de l'experiment realitzat al Jove Campus d'Investigació

PERSONA	PORTADOR/A (AMS)	PERSONA	PORTADOR/A (AM)
Individu 1	No	Individu 1	No
Individu 2	Si	Individu 2	No
Individu 3	No	Individu 3	No
Individu 4	No	Individu 4	No
Individu 5	No	Individu 5	No
Individu 6	No	Individu 6	No
Individu 7	Si	Individu 7	No
Individu 8	No	Individu 8	Si
Individu 9	Si	Individu 9	No
Individu 10	No	Individu 10	No
Individu 11	No	Individu 11	No

³ En aquest cas, en teoria deuria haver-hi 0.86 colònies, ja que hi ha 10⁶ cèl·lules/ml, i en el banc fins al 10⁻² dividim tres vegades per 10 per arribar a aquest 10⁻², amb una colònia.

⁴ En aquest cas, teòricament deuria haver-hi 0.77 colònies, ja que hi ha 10⁶ cèl·lules/ml, i en el banc fins al 10⁻² dividim tres vegades per 10 per arribar a aquest 10⁻², amb una colònia.

Individu 12	No	Individu 12	No
Individu 13	No	Individu 13	No

Com podem veure en aquesta taula, en el cas de ser portador/a de *Staphylococcus aureus*, hi ha només 3 casos de 13 possibles portadors. En canvi, quan es tracta de portadors de *E. coli* o de bacteris Gram-negatius, només existeix un cas. Per tant, es poden confirmar les dades que un 10-15% de la població, en aquest cas un 23%, és portadora de *Staphylococcus aureus* i que poques persones transporten amb si bacteris del tipus *E. coli*. Resultats en gràfics:

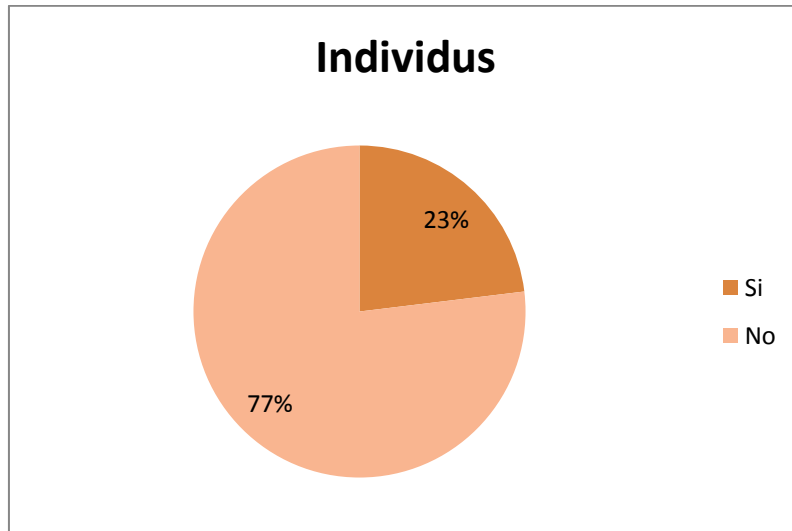


Figura 2.25. Percentatge d'individus portadores de *S. aureus* del total analitzat. **A1'11**

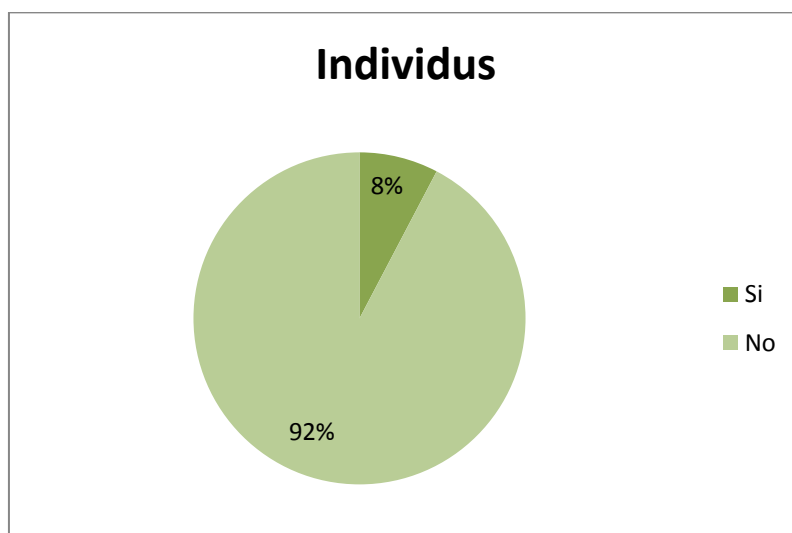


Figura 2.26. Percentatge d'individus portadors de Gram-negatius del total estudiat. **A1'11**



Figura 2.27. Unes imatges sobre el procediment d'aquest experiment. A1'11

4. SENSIBILITAT DE DIFERENTS SOQUES DE *Escherichia coli* A ANTIBIÒTICS D'ÚS COMERCIAL

TAULA 7: diàmetres (en mm) dels halos d'inhibició registrats per a les diferents soques de *E. coli* i els respectius antibiòtics

PLACA 1				
SOCA	<u>Cefoxitina 30</u>	<u>Penicil·lina 10</u>	<u>Ampicil·lina 10</u>	<u>Vancomicina 30</u>
<i>E. coli</i> 100	21	0	13	0
<i>E. coli</i> 105	24	0	14	0
<i>E. coli</i> B	23	6	17	0
<i>E. coli</i> 405	24	0	15	0
<i>E. coli</i> QD-supIII	23	0	16	0
<i>E. coli</i> 613	21	8	17	4
<i>E. coli</i> 4230	25	0	15	0
<i>E. coli</i> 13127	27	0	14	0
<i>E. coli</i> 12242	25	0	14	0
<i>E. coli</i> λ	25	10	17	0

PLACA 2				
SOCA	<u>Trimetroprim 2.5</u>	<u>Àcid nalidíxico 30</u>	<u>Rifampicina 30</u>	<u>Sulfamidina 42</u>
<i>E. coli</i> 100	20	26	12	0
<i>E. coli</i> 105	21	22	11	0
<i>E. coli</i> B	21	25	21	0
<i>E. coli</i> 405	22	26	14	0
<i>E. coli</i> QD-supIII	29	22	15	0
<i>E. coli</i> 613	21	27	10	0
<i>E. coli</i> 4230	27	25	11	0
<i>E. coli</i> 13127	20	19	12	0
<i>E. coli</i> 12242	18	0	9	0
<i>E. coli</i> λ	21	29	12	0

PLACA 3				
SOCA	<u>Gentamicina 10</u>	<u>Cloramfenicol 30</u>	<u>Amikacina 30</u>	<u>Eritromicina 15</u>
<i>E. coli</i> 100	13	23	16	6
<i>E. coli</i> 105	14	22	15	0
<i>E. coli</i> B	15	27	15	7
<i>E. coli</i> 405	15	27	20	7
<i>E. coli</i> QD-supIII	19	21	20	11
<i>E. coli</i> 613	15	27	19	6
<i>E. coli</i> 4230	11	30	12	6
<i>E. coli</i> 13127	16	19	20	6
<i>E. coli</i> 12242	12	19	13	7
<i>E. coli</i> λ	15	30	12	10

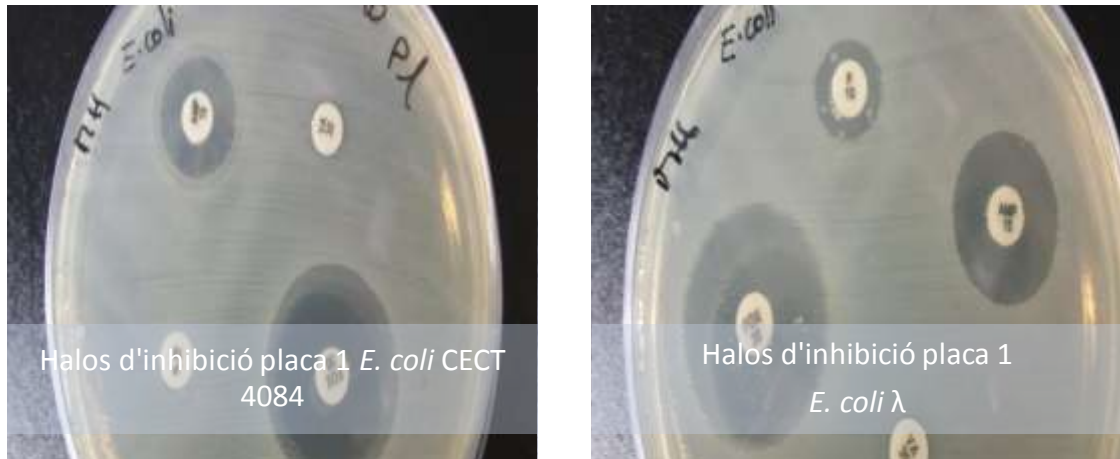


Figura 2.28. Halos d'inhibició observats (I). A1'11

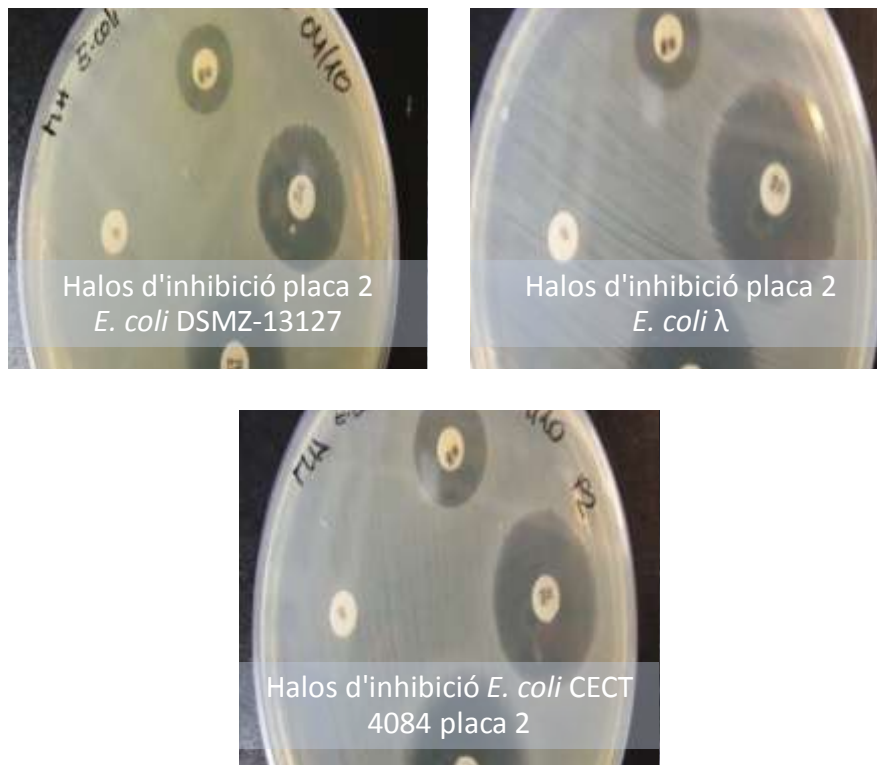


Figura 2.31. Halos d'inhibició observats (II). A1'11

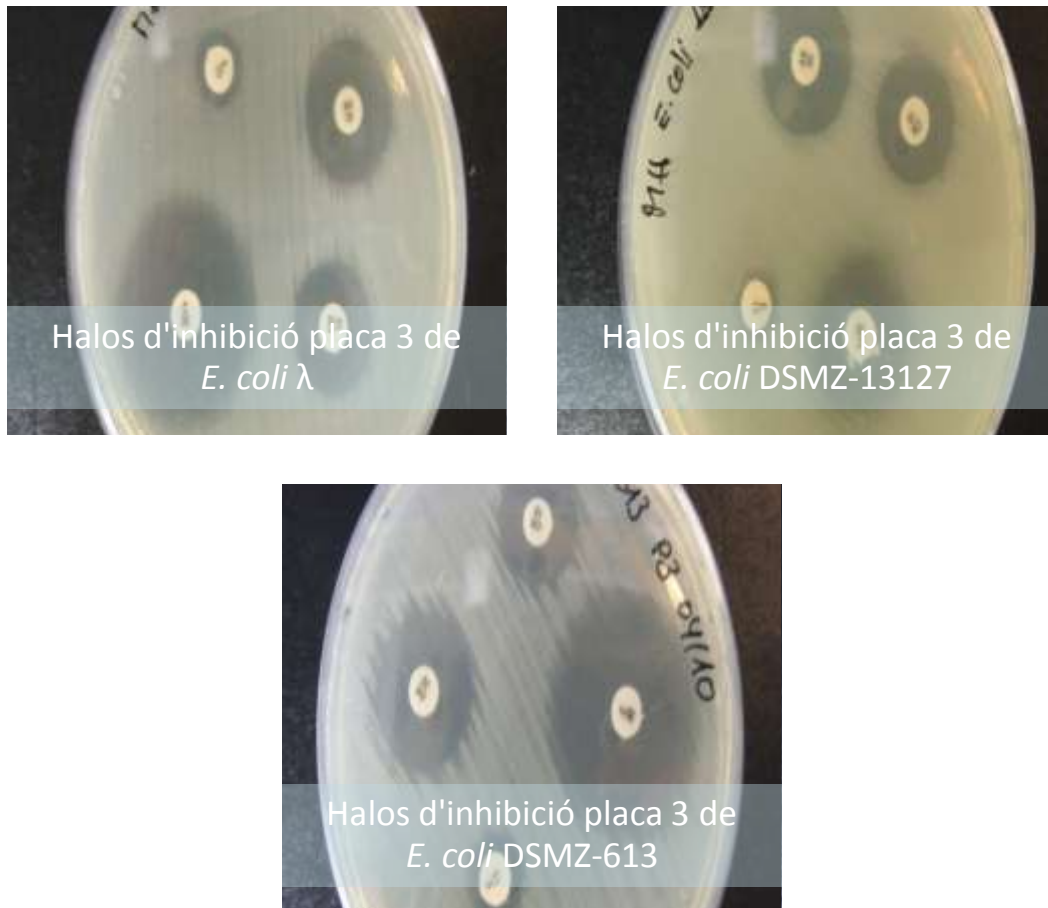


Figura 2.32. Halos d'inhibició observats (III). A1'11

4.1. SENSIBILITAT DURANT EL CREIXEMENT

En els intervals descrits anteriorment es va estudiar la densitat òptica i en alguns d'aquests, a més, es van realitzar una sèrie de antibiogrames, per a més endavant estudiar la variació dels halos d'inhibició amb els mateixos antibiòtics que en el primer apartat, per veure si hi ha variació alguna de sensibilitat dels cultius davant els antibiòtics, comparant els resultats del primer i el segon experiment.

S'escolliran 4 antibiòtics, en funció de dos factors:

- La disponibilitat en l'estoc de la Universitat de Girona.
- Depenent del seu mode d'acció:
 - o Antibiòtic que afecti la síntesi de la paret cel·lular: ampil·lina.
 - o Antibiòtic que afecti la síntesi de la subunitat proteica 30S: amikacina.
 - o Antibiòtic que afecti la síntesi de la subunitat proteica 50S: rifampicina.
 - o Antibiòtic que afecti el metabolisme (àcid fòlic): trimetoprim.

TAULA 8: Resultats de la densitat òptica i les hores escollies per realitzar els antibiogrames

DATA	HORA	TEMPS	<i>Escherichia coli B</i>	<i>Escherichia coli 100</i>	ANTIBIOGRAMA
25/10/11	10:45:00	0	0,006	0,004	X
25/10/11	11:15:00	30	0,015	0,016	
25/10/11	11:45:00	60	0,056	0,058	X
25/10/11	12:15:00	90	0,114	0,109	
25/10/11	12:45:00	120	0,203	0,24	X
25/10/11	13:15:00	150	0,3	0,33	
25/10/11	14:00:00	235	0,44	0,452	
25/10/11	14:30:00	265	0,518	0,509	
25/10/11	15:15:00	310	0,62	0,607	X
25/10/11	15:45:00	340	0,653	0,628	
25/10/11	16:15:00	370	0,646	0,675	
25/10/11	16:45:00	410	0,64	0,662	
25/10/11	17:15:00	440	0,651	0,658	X
25/10/11	18:15:00	470	0,794	0,827	
26/10/11	14:45:00	1440	0,98	0,975	X
26/10/11	17:45:00	1620	1,236	1,202	
27/10/11	9:45:00	2580	1,094	1,05	
27/10/11	15:45:00	2895	1,178	1,078	X

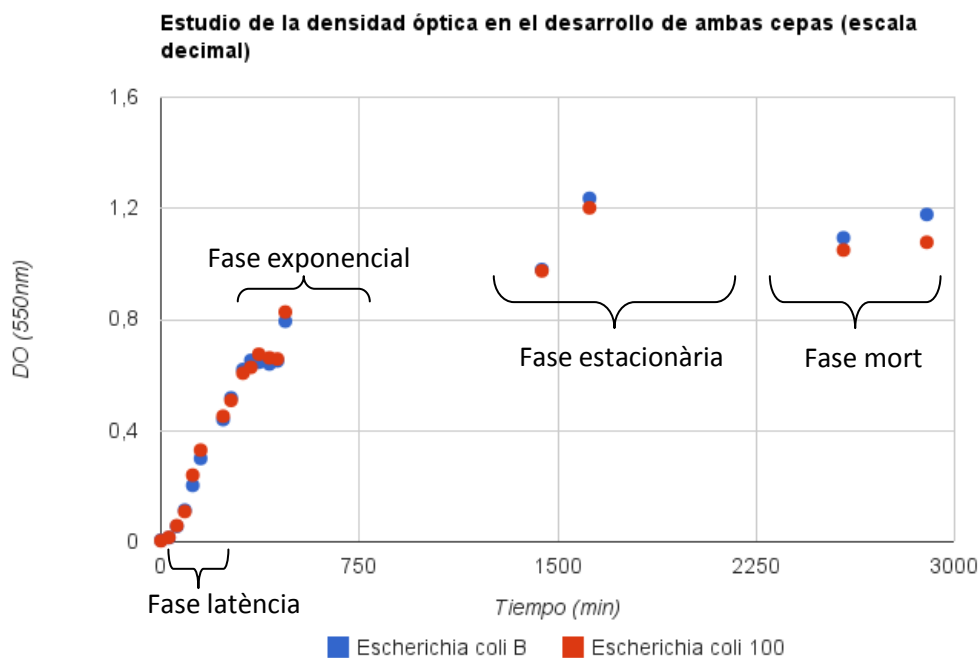


Figura 2.31. Gràfic amb els resultats del creixement de les soques estudiades. A1'11

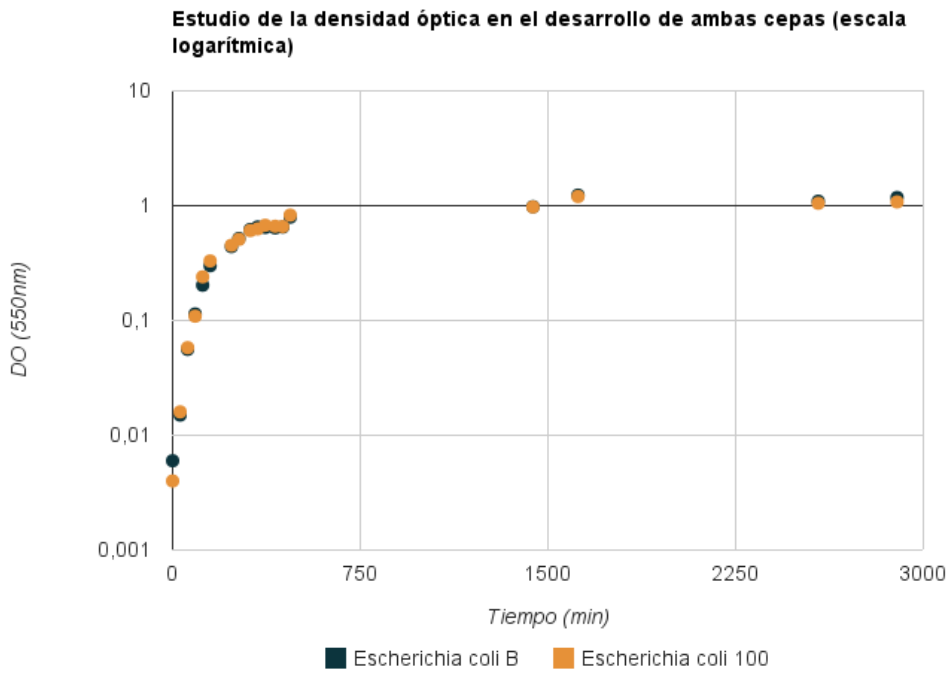


Figura 2.32. Gràfic amb els resultats del creixement de les soques de *E. coli*. **A1'11**

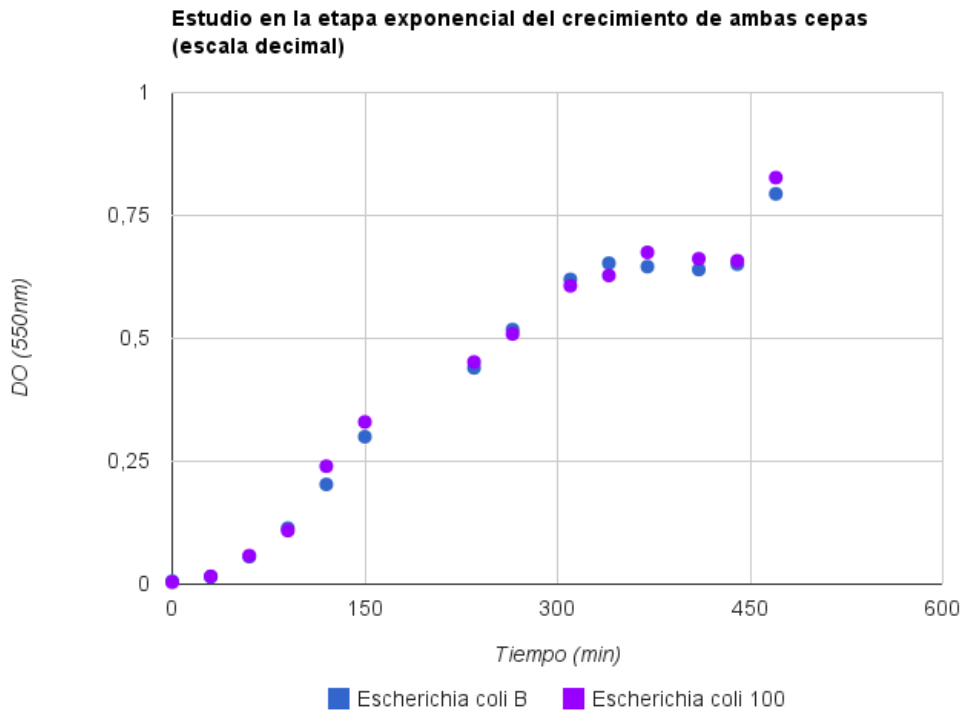


Figura 2.33. Gràfic amb els resultats del creixement de les soques de *E. coli* durant l'etapa exponencial. **A1'11**

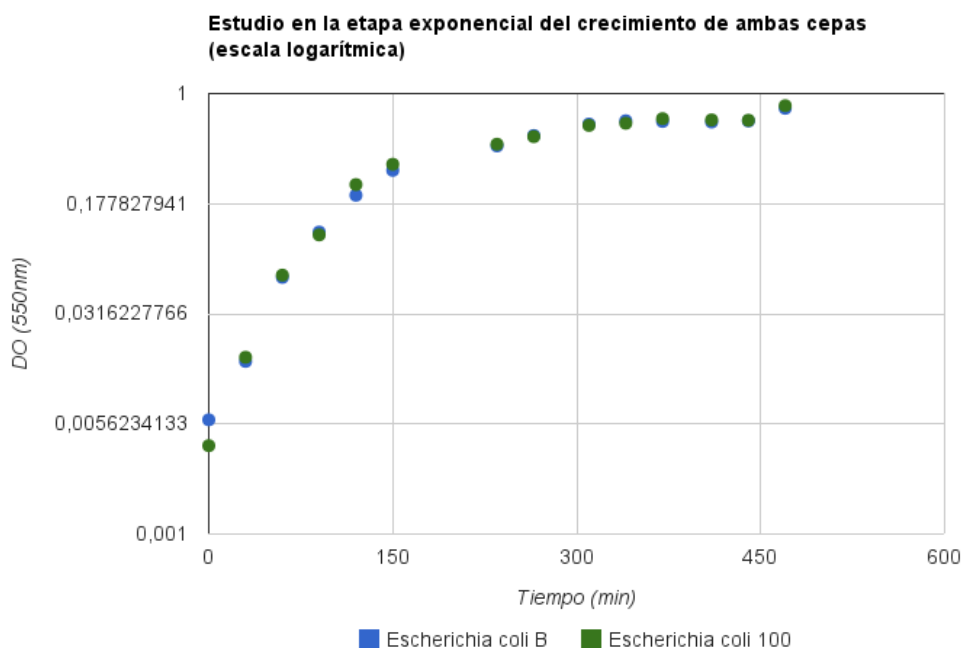


Figura 2.34. Gràfic amb els resultats del creixement de les soques de *E. coli* durant l'etapa exponencial. A1'11

TAULA 9: Taxes de creixement i generació en funció del temps		
SOCA	Taxa de creixement (min ⁻¹):k	Taxa de generació (min): tg
<i>Escherichia coli B</i>	0.042	23.8
<i>Escherichia coli 100</i>	0.049	20.4

Els resultats obtinguts dels halos d'inhibició dels antibiograms realitzats en les respectives fases del creixement són els següents:

TAULA 10: Sensibilitat dels antibiòtics d'ús comercial en <i>E. coli B</i> en les seves fases de creixement				
t (min)	Trimetoprim 2.5	Ampicil·lina 10	Amikacina 30	Rifampicina 30
0	14	0	19	11
60	29	19	22	14
120	26	19	18	11
310	20	14	17	12
440	21	13	14	12
1440	22	11	13	13
2895	21	11	14	12

TAULA 11: Sensibilitat dels antibiòtics d'ús comercial en <i>E. coli 100</i> en les seves fases de creixement				
t (min)	Trimetoprim 2.5	Ampicil·lina 10	Amikacina 30	Rifampicina 30
0	19	15	14	12
60	21	14	12	12

120	20	15	16	13
310	21	13	15	11
440	20	17	15	12
1440	19	8	7	17
2895	21	14	11	16

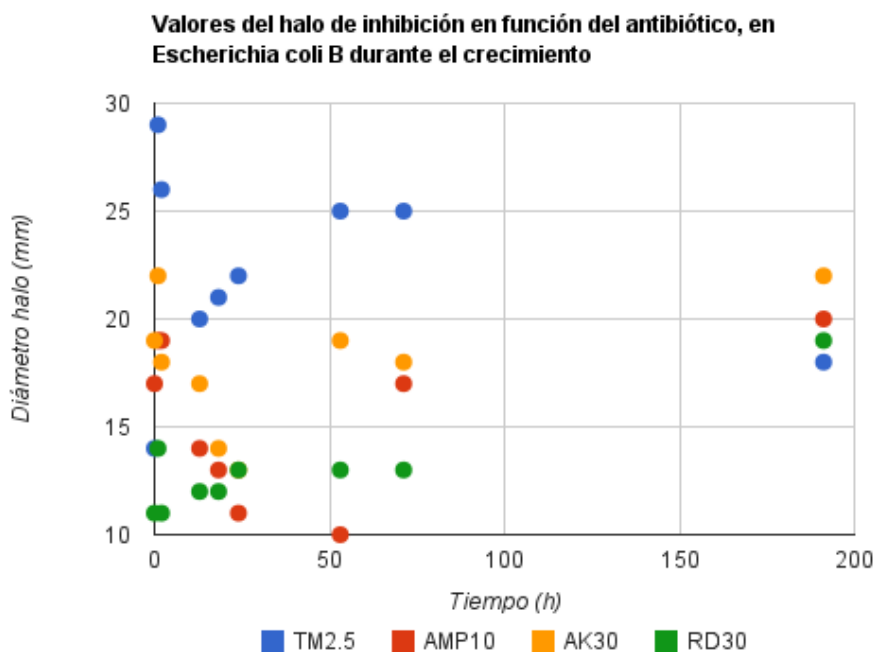


Figura 2.35. Gràfic amb els resultats de les variacions dels halos d'inhibició, depenent de l'antibiòtic que fem servir. **A1'11**

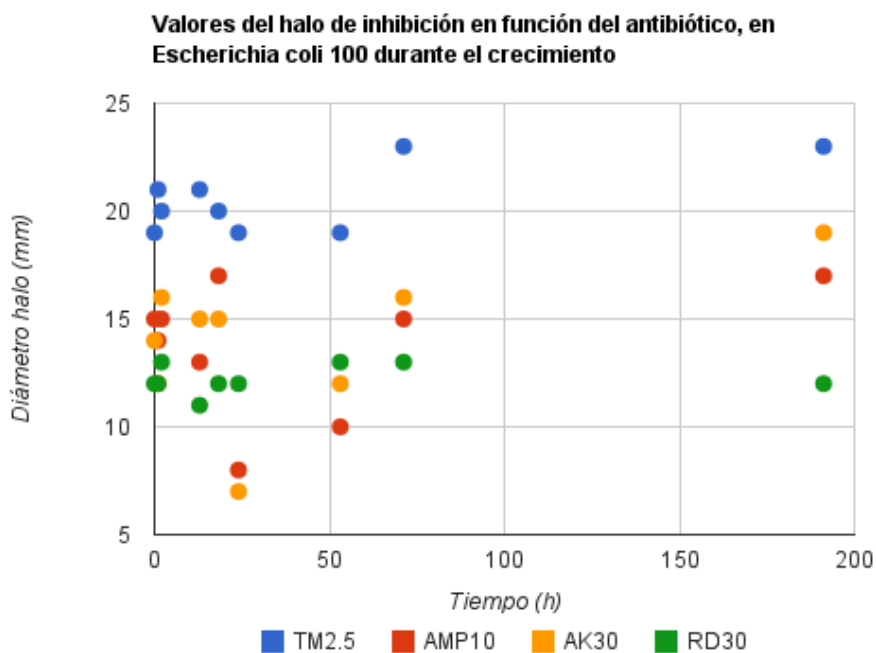


Figura 2.36. Gràfic amb els resultats de les variacions dels halos d'inhibició, depenent de l'antibiòtic que fem servir. **A1'11**

Els resultats d'aquest experiment semblen indicar que la sensibilitat de les dues soques estudiades als antibiòtics analitzats no és constant, sinó que varia al llarg de les diferents fases per les quals passa el bacteri durant el seu creixement (fase de latència, fase exponencial, fase estacionària i fase mort).

És probable que aquestes variacions siguin degudes als canvis fisiològics que experimenten les cèl·lules al llarg del seu creixement, especialment en la seva fase exponencial i l'entrada en fase estacionària, ja que és en aquestes on es registren importants variacions en tots els processos cel·lulars, és a dir, en el mecanisme d'acció dels antibiòtics davant els bacteris (síntesi de proteïnes, síntesi de la paret cel·lular, replicació ADN).

4.2. RESULTADOS DE LAS COMPARACIONES DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN

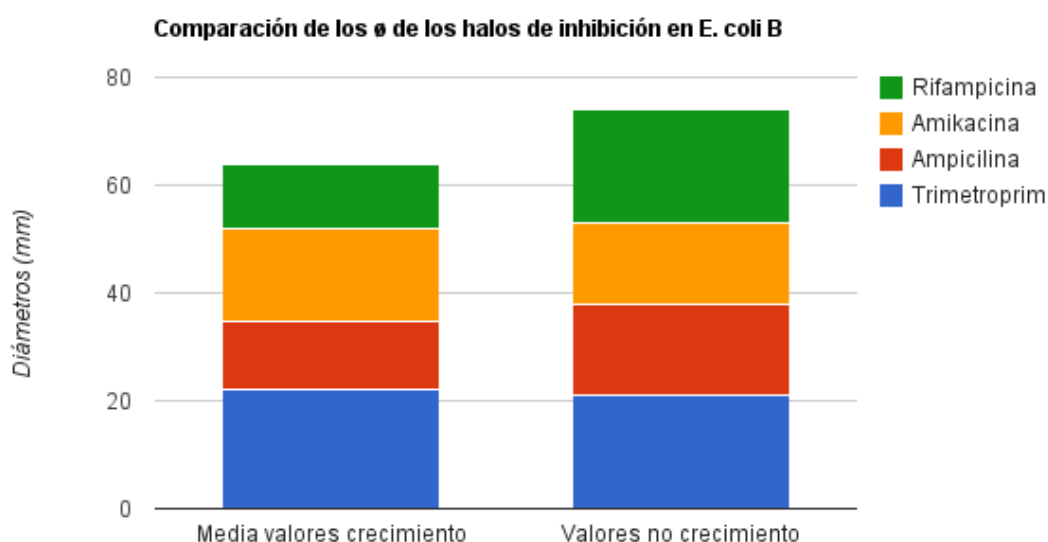


Figura 2.37. Gràfic que mostra els resultats de les comparacions dels halos d'inhibició del cep d'E. coli B. A1'11

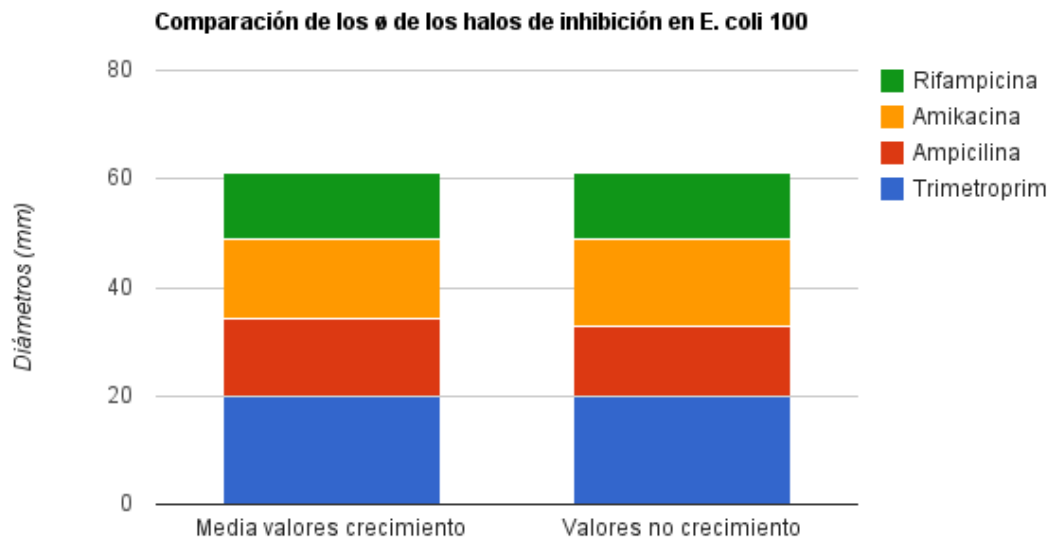


Figura 2.38. Gràfic que mostra els resultats de les comparacions dels halos d'inhibició del cep d'*E. coli* 100. **A1'11**

Com podem veure, no hi ha pràcticament diferències entre els halos d'inhibició dels ceps, quan les comparem entre elles mateixes. En el primer cas, *E. coli* B, veiem que són molt semblants els halos en tots els antibiòtics, a excepció de la rifampicina. En el segon, en canvi, són molt semblants.

CONCLUSIONS

Després de la realització d'aquest treball de recerca, puc afirmar que les parts experimentals i teòriques d'aquest treball han resultat ser un èxit. He complert el meu principal objectiu: saber qui és l'inventor de la placa Petri, i saber com era.

En primer lloc, discutir la originalitat del treball és important. Aquest treball de recerca es va pensar per connectar uns científics bàsics en la ciència però certament no gaire coneguts. El motiu de donar-los a conèixer és un dels punts més originals del projecte. A més, se'ls relaciona per la seva petita semblança als actors de repartiment, necessaris en una pel·lícula, per exemple, i també mereixedors d'uns premis, com ara els Oscar.

Com hem vist al llarg del treball, el major objectiu del mateix i de les expectatives d'aquest s'han vist realitzades: s'han establert les corresponents relacions entre els científics de repartiment, mitjançant un bacteri molt estudiat que, avui en dia⁵ segueix jugant males passades a la població humana. Com ens indica el mateix títol, les aportacions dels científics de repartiment segueixen en peu, segueixen vigents, i han estat usades per l'autor d'aquest treball per a l'estudi de la *Escherichia coli*.

Gràcies a les activitats experimentals realitzades, podem arribar a aquestes conclusions:

- 1) La *Escherichia coli*, localitzada en el colon humà, presenta un grau de resistència als antibiòtics usats comunament, és a dir, aquells d'ús comercial.
- 2) La prescripció d'antibiòtics determina la capacitat de resistència d'*Escherichia coli* presents en la població en relació a aquest antibiòtic.
- 3) Cada antibiòtic afecta d'una manera determinada al bacteri i en un punt en concret. Són específics, pel que fa referència a la seva manera d'acció.

Deixant a part les conclusions experimentals, a nivell personal, la veritat, no sé si he descobert la meua vocació, però he gaudit un munt realitzant els experiments. Veure en un laboratori i amb la bata blanca em va agradar més del que creia en un principi.

Sempre s'ha treballat en els mateixos laboratoris, o el 109-111 o bé l'I3, ambdós de la Universitat de Girona. Així ajudem a que factors externs no incideixin en els resultats. També s'ha treballat usant la cabina de flux laminar i l'encenedor Bunsen per evitar al màxim possibles contaminacions de les plaques Petri.

En una segona fase d'aquest projecte d'investigació, es realitzaran discussions dels resultats, a partir de la informació de la que actualment disposem.

⁵ Hi ha nous brots produïts al 2011 i al 2012: al novembre del 2011, dos nadons moren a Gales per *E. coli* i, al febrer del 2012 mor un nen de 6 anys a Alemanya.

TREBALL DE RECERCA

BLOC 3

BIBLIOGRAFIA, APÈNDIX I
AGRAÏMENTS

BIBLIOGRAFIA

La informació per realitzar aquest treball ha estat buscada, extreta i optimitzada en les meves paraules dels següents llocs d'informació.

BIBLIOGRAFIA

- Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. *Catálogo de medicamentos*. Consejo general de colegios oficiales de farmacéuticos. Madrid. 2010
- FRIGOLA, Gerard. *Del 606 a la PCR*. Bell-lloc del Pla. Girona. 2005.
- HAYASHI, Tetsuya et al. *Complete Genome Sequence of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 and Genomic Comparison with a Laboratory Strain K-12*. RIKEN Genomic Sciences Center. Kanagawa. 2001.
- J. JOHNSON, Timothy et al. *Comparison of Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli Strains from Human and Avian Sources Reveals a Mixed Subset Representing Potential Zoonotic Pathogens*. Academic Medical Center. Amsterdam. 2008.
- KRUIF, Paul de. *Los cazadores de microbios*. Editorial Porrúa S.A. Méjico. 2006.
- L. INGRAHAM, John; A. INGRAHAM, Catherine. *Introducción a la microbiología*. Editorial Reverté S.A. Barcelona. 1988.
- LÜLLMANN H. et al. *Tratado de microbiología*. Editorial Masson. Barcelona. 2002.
- M. JANDA, William. et al. *Diagnóstico microbiológico*. Editorial médica Paramericana. Madrid. 2008.
- MADIGAN, Michael. et al. *Brock: Biología de los microorganismos*. Editorial Pearson. Madrid. 2009.
- O'LEARY, William. *Practical handbook of microbiology*. CRC Press. Boston. 1989.
- PELCZAR, MJ. et al. *Microbiology: concepts and applications*. McGraw-Hill Inc. New York. 1993.
- SCHNEIDER, Dominique et al. *Genomic comparisons among Escherichia coli strains B, K-12, and O157:H7 using IS elements as molecular markers*. Michigan State University. Michigan. 2002.
- SEELY JR, HW. et al. *Microbes in action*. W.H. Freeman and company. New York. 1991.
- A. VOLK, Wesley; C. BROWN, Jay. *Basic microbiology*. Addison Wesley Longman Inc. New York. 1977.
- A. WELCH, R. *Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic Escherichia coli*. Harvard Medical School. Bosotn. 2002.

WEBGRAFIA

- <http://1.bp.blogspot.com/tPQ4ewDTE8I/TbyPM7dcEjl/AAAAAAAAABQ/Sitb1rNU6tY/s1600/image.jpg> (Consultada el 28 de juny del 2011 a les 16:21h).
- http://studentcus.wikispaces.com/file/view/John_Tyndall.jpg/176928691/John_Tyndall.jpg (Consultada el 29 de maig del 2011 a les 13:14h).
- <http://www.lavanguardia.com/salud/20110531/54163027568/alemania-asegura-que-la-bacteria-e-coli-no-procede-de-pepinos-espanoles.html> (Consultada el 19 de juny del 2011 a les 11:44h).
- <http://www.rtve.es/noticias/20110601/todo-hay-saber-crisis-pepinos/435576.shtml> (Consultada el 19 de juny del 2011, a les 11:45h).
- <http://www.rtve.es/noticias/20110607/muerte-dos-personas-mas-bacteria-coli-deja-total-25-muertos/437919.shtml> (Consultada el 15 de juny del 2011 a les 20:15h).
- <http://lta.reuters.com/article/worldNews/idLTASIE75T1GO20110630?pageNumber=2&virtualBrandChannel=0> (Consultada l'1 de juliol del 2011 a les 9:24h).
- http://en.wikipedia.org/wiki/Louis_Pasteur (Consultada el 26 de juny del 2011 a les 19:32h)
- <http://microilustres.blogspot.com/2007/11/petri-julius-richard-1852-1921.html> (Consultada el 4 de juliol del 2011 a les 19:56h).
- http://en.wikipedia.org/wiki/Julius_Richard_Petri (Consultada l'1 de juliol del 2011 a les 11:34h).
- http://en.wikipedia.org/wiki/John_Tyndall (Consultada el 2 de juliol del 2011 a les 12:34h).
- http://en.wikipedia.org/wiki/Robert_Bunsen (Consultada el 2 de juliol del 2011 a les 13:11h).
- http://es.wikipedia.org/wiki/Mechero_Bunsen (Consultada el 7 de juliol del 2011 a les 18:23h).
- http://es.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli (Consultada el 25 de juny del 2011 a les 10:31h).
- <http://www.biografiasyvidas.com/biografia/e/escherich.htm> (Consultada el 20 de juny del 2011 a les 9:54h).
- http://es.wikipedia.org/wiki/Bacteria_Gram_negativa (Consultada el 22 de maig del 2011 a les 13:21h).
- http://es.wikipedia.org/wiki/Bacteria_Gram_positiva (Consultada el 22 de maig del 2011 a les 14:34h).
- http://en.wikipedia.org/wiki/Hans_Christian_Gram (Consultada el 22 de maig del 2011 a les 17:11h).
- http://www.zelian.com.ar/zelian/imagenes_productos/4EA16BBCA9E14A11AF9F7FDA4FF7B86.JPG (Consultada l'1 de juliol del 2011 a les 12:14h).
- http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/71/Institut_Pasteur%2C_Paris_1.jpg (Consultada l'1 de juliol del 2011 a les 9:40h).
- http://es.wikipedia.org/wiki/Tinci%C3%B3n_de_Gram (Consultada el 22 de maig del 2011 a les 11:14h).

- <http://http://www.cect.org/busqb.php?val1=348&orig=1&limit=100000> (Consultada el 26 de juliol del 2011 a les 10:20h).
- <http://http://www.dsmz.de/microorganisms/html/bacteria.genus/escherichia.html> (Consultada el 26 de juliol del 2011 a les 10:40h).
- <http://www.elalmeria.es/article/finanzasyagricultura/1027482/casi/otra/cooperativa/se/resiente/por/la/crisis/e/coli.html> (Consultada el 26 de juliol a les 12:53h).
- http://www.eltiempo.com/vida-de-hoy/salud/ARTICULO-WEB-NEW_NOTA_INTERIOR-9987624.html (Consultada el 26 de juliol a les 12:56h).
- <http://www.kaosenlared.net/noticia/176179/bacterias-mutantes-crisis-coli> (Consultada el 26 de juliol a les 12:59h).
- <http://www.ideal.es/almeria/v/20110723/agricultura/crisis-coli-frena-seco-20110723.html> (Consultada el 26 de juliol a les 13:53h).
- http://microbes.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?db=eschColi_UTI89 (Consultada el 21 d'agost del 2011 a les 11:45h).
- <http://biocyc.org/ECOL362663/organism-summary?object=ECOL362663> (Consultada el 21 d'agost del 2011 a les 11:53h).
- http://microbes.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?db=eschColi_536 (consultada el 21 d'agost del 2011 a les 12:00h).
- http://microbes.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?db=eschColi_CFT073 (Consultada el 21 d'agost del 2011 a les 12:02h).
- <http://microbes.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?hgsid=686225&clade=bacteria-gammaproteobacteria&org=Escherichia+coli+APEC+O1&db=0> (Consultada el 21 d'agost del 2011 a les 12:09h).
- <http://microbes.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?hgsid=686225&clade=bacteria-gammaproteobacteria&org=Escherichia+coli+K12&db=0> (Consultada el 21 d'agost del 2011 a les 12:15h).
- http://www.uv.es/metode/anuario2000/178_2000.html (Consultada l'1 de setembre a les 16:36h).
- Moltes pàgines web relacionades amb el Genbank i BLAST.

APÈNDIX

1. MÉS INFORMACIÓ

Durant la realització del treball he fet alguns vídeos interessants que estan a la seva disposició als següents links de YouTube:

- http://www.youtube.com/watch?feature=player_detailpage&v=sShSNrkYpv4
- http://www.youtube.com/watch?feature=player_detailpage&v=egHfArbWZ4c

2. DELTALAB, PREPARADORA DE CÁPSULAS

Deltalab és una empresa amb seu a Rubí (Barcelona), amb una superfície de 11500m². Porten més de trenta anys treballant i fabricant materials diversos, per anàlisis clíniques, químics i industrials i productes per a altres sectors. És una empresa espanyola, important a nivell internacional, amb exportacions a més de 128 països, a destacar: França, Turquia, Geòrgia, Japó, Itàlia...



Figura 1. La icona de Deltalab. © Deltalab S.L.U.



Figura 2. El catàleg de càpsules de Petri de la empresa Deltalab. © Deltalab S.L.U.

Dir que Deltalab és el guanyador del "Concurs de material sol ús" d'aquest any. Deltalab fabrica i comercialitza material per a laboratori. Són líders a Espanya gràcies al seu constant creixement a nivell internacional. Les plaques de Petri estàndard, es venen a un preu recomanat de 74 € cada 1000 unitats. Poden ser preparades en vidre i plàstic.

L'empresa Deltalab ven 15 milions de càpsules de Petri, de 90 x 14 mm, a l'any. A aquesta xifra, també cal sumar-li altres milions de plaques d'altres materials i d'altres mides que també venen. M'han comunicat que a gran part del món exporten càpsules de Petri de plàstic, excepte als Països de l'Est d'Europa, que les compren de vidre.



Figura 3. Vista exterior de las oficinas de Deltalab. © Deltalab S.L.U.

Deltalab realitza venda a distribuïdor i altres empreses. Majoritàriament participen en concursos, per a empreses i altres, competint amb empreses de tot el món. El seu major competidor és francès, Plàstiques Guseelen, d'un grup americà. En aquest sector, a més, l'Índia i la Xina afecten el negoci. El producte final asiàtic, en passar les duanes i els corresponents transports, resulten més cars que el producte nacional.



Placa Petri 90 x 14 mm
Fabricadas en poliestireno.
Presentadas en bolsas cerradas por calor de 20 unidades.
Código **200200** **aséptico**.
Código **200209** **estéril por radiación**.
Aptas para la dosificación en aparatos de llenado.

código	características	estéril	cantidad caja	peso caja	volumen caja	cantidad palet
Placas con tres vientos.						
200200	Ø 90 x 14 mm	no	25 x 20	7,92	0,071	14.000
200209	Ø 90 x 14 mm	RADIACIÓN	25 x 20	7,92	0,071	14.000
Placa sin vientos, para el cultivo de anaerobios						
200200.4	Ø 90 x 14 mm	no	25 x 20	7,92	0,071	14.000

Figura 4. La placa de Petri estàndard, la de 90 x 14 mm. © Deltalab S.L.U.

Com a informació addicional, Deltalab SLU va guanyar els premis "Cambra Terrassa 2006" en la categoria d'internacionalització. En aquesta categoria van ser guardonades les empreses de Rubí (Barcelona) Deltalab SL i Procoat Tecnologies SL.



Figura 5. Tots els guanyadors dels premis

Finalment, dir que les plaques de Petri es produeixen en un entorn net, estèril. Mitjançant una màquina s'injecta el material i es produeix la corresponent placa i tapa. Després de sortir de la màquina, una altra màquina les empaqueta. Les plaques de Deltalab poden ser estèrils (aquest procés té lloc en una altra empresa) o no. Llavors, com hem vist, ningú toca la placa.

Tota aquesta informació ha estat prestada pel director Comercial de Deltalab, amb qui vaig contactar durant el mes de maig, especialment el dia que vaig parlar en persona amb Deltalab, 26 de maig de 2011 a les 18:00 h. Per afirmar aquesta informació, poden contactar amb Deltalab SLU, amb domicili a Plaça de la Verneda n^o 1, Polígon Industrial La Llana 195 08191 Rubí (Barcelona), Espanya.

3. RELACIÓN ENTRE *E. coli* Y EL AGUA DE CONSUMO HUMANO

a) LABORATORIS DR. OLIVER RODÉS

El dia 9 d'agost del 2011, vaig contactar amb els laboratoris del Dr Oliver Rodés, amb el departament d'atenció al client fet aquesta pregunta: Quina és la relació de la *E. coli* amb les aigües de consum humà¹? Hi ha controls o anàlisi? Alguna marca comercial fa explícita la

¹ Totes aquelles aigües, ja sigui en el seu estat original, ja sigui després del tractament, utilitzades per beure, cuinar, preparar aliments, higiene personal i per a altres usos domèstics, sigui quin sigui el seu origen i independentment que se subministrin al consumidor, a través de xarxes de distribució públiques o privades, de cisternes, de dipòsits públics o privats. Totes les aigües utilitzades en la indústria alimentària per a fins de fabricació, tractament, conservació o comercialització de productes o substàncies destinades al consum humà, així com a les utilitzades en la neteja de les superfícies,

presència, no física, en l'anàlisi, d'*E. coli*? La resposta va ser gairebé immediata a la pregunta, per part de Maria Cinta Pastor. La veritat, una bona resposta per part d'algú atent al seu treball i al món de l'aigua.

En primer lloc, aquestes breus definicions del Butlletí Oficial de l'Estat², Article 2 del Reial decret 1798/2010 i 1799/2010. Les aigües minerals naturals són aquelles microbiològicament sanes que tinguin l'origen en un estrat o jaciment subterrani i que brollin d'una deu o puguin ser captades artificialment mitjançant sondeig, pou, rasa o galeria, o bé, la combinació de qualsevol d'ells.

Aquestes poden distingir clarament de la resta aigües de beguda ordinàries: per la seva naturalesa, caracteritzada pel seu contingut en minerals, oligoelements i altres components i, de vegades, per determinats efectes, per la seva constància química i per la seva puresa original.

La resposta és literalment aquesta: "Bon dia Autor 1, pots trobar en el reial decret 140/2003 tot el relatiu al que ha de complir una aigua de xarxa i d'altra banda en els Reials decrets 1798/2010 i el 1799/2010 tot el referent als diferents tipus d'aigües envasades. Per descomptat que en aquestes legislacions es prohibeix la presència d'*E. coli* per tant els controls exhaustius inclouen el compliment de que estiguin exempts de la presència d'*E. coli*, per això aquesta especificació ja no surt a l'etiqueta però si indirectament al definir-se com un dels tipus d'aigües que es troben al mercat, són aigües que es sotmeten a continu control microbiològic per assegurar la seva absència. Celebro el teu interès pel món de l'aigua que és tan important des de molts punts de vista, és un tema apassionant. Moltes disciplines són necessàries per protegir i millorar aquest bé tan necessari per a tots. "

Parámetros y valores paramétricos

Parte A

Parámetros microbiológicos

Parámetro	Valor paramétrico (UFC)
Escherichia coli (E-coli)	0/250 ml
Enterococos	0/250 ml
Pseudomonas aeruginosa	0/250 ml
Recuento de colonias a 22 °C	100/ml
Recuento de colonias a 37 °C	20/ml

objectes i materials que puguin estar en contacte amb els aliments . Totes les aigües subministrades per a consum humà com a part d'una activitat comercial o pública, amb independència del volum mitjà diari d'aigua subministrat.

² BOE núm. 16 dimecres 19 de gener del 2011 secció 1 pàgina 6113.

Figura 6. Els paràmetres microbiològics dels Reials decrets 1798/2010 y 1799/ 2010 en referència a la presència de *E. coli* en aigües de consum humà

ANEXO I
Parámetros y valores paramétricos
A. Parámetros microbiológicos

Parámetro	Valor paramétrico	Notas
1. Escherichia coli	0 UFC en 100 ml	
2. Enterococo	0 UFC en 100 ml	
3. Clostridium perfringens (incluidas las esporas) ..	0 UFC en 100 ml	1 y 2

Figura 7. Els paràmetres microbiològics del Reial decret 140/2003 en referència a la presència de *E. coli* en aigües de consum humà. Un canvi es molt fàcil d'observar: al 2003 0 UFC³/100 ml i recentment, al 2010, 0 UFC/250 ml

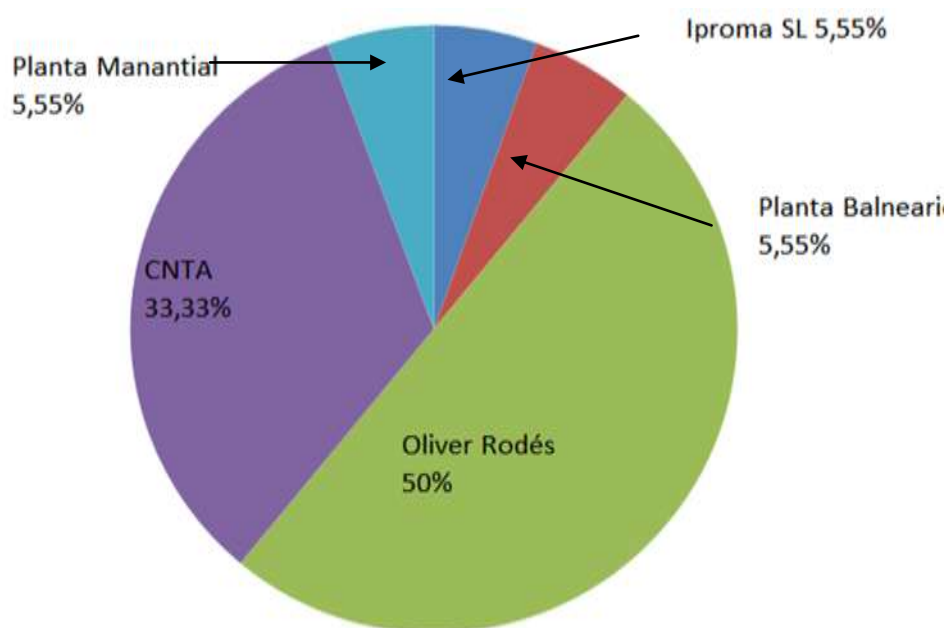
Durant l'agost del 2011 he passat un temps en cinc cadenes de supermercats a Girona. La meua visita ha estat per recollir informació sobre marques d'aigua, les anàlisis als laboratoris i el laboratori que efectua aquesta anàlisi per poder contactar amb el mateix, com acabem de veure amb el cas dels laboratoris del Dr Oliver Rodés. Vegem ara un quadre i un gràfic que recullen aquesta informació:

MARCA AIGUA	LABORATORI ANÀLISIS QUÍMIC
Cortes	Oliver Rodés
Solan de Cabras	Laboratorio en el balneario
Agua San Narciso	Oliver Rodés
Ribes	Laboratorio en la planta
Nestlé Aquarel	Oliver Rodés
Font Vella	Centro nacional de tecnología y seguridad alimentaria (CNTA)
Viladrau	Oliver Rodés
Consum	Iproma SL
Aquabona	Oliver Rodés
Sant Aniol	Oliver Rodés
Fuente Primavera	Oliver Rodés
Bezoya	Centro nacional de tecnología y seguridad alimentaria (CNTA)

³ Unidad formadora de colonias, es decir, el grado de contaminación microbiológica de un ambiente.

Lanjarón	Centro nacional de tecnología y seguridad alimentaria (CNTA)
Bronchales	Centro nacional de tecnología y seguridad alimentaria (CNTA)
Veri	Centro nacional de tecnología y seguridad alimentaria (CNTA)
Fonter	Centro nacional de tecnología y seguridad alimentaria (CNTA)
Font del Regàs	Oliver Rodés
Font Agudes	Oliver Rodés

MARCA AIGUA	BICARBONATS	CALCI	MAGNESSI	SODI	RESIDU SEC
Cortes	274	90	7,4	7,2	261
Solan de Cabras	262	56,9	25,5	5,3	262
Agua San Narciso	2132 (con gas)	51,4	-	10,8	-
Ribes	146	46,6	7	5,6	179
Nestlé Aquarel	120	30,2	6,4	9,5	150
Font Vella	144	35,5	8,6	11,9	-
Viladrau	113	27,3	4,5	11,9	139
Consum	183	19	27	6	155
Aquabona	150	42,1	7,6	9,8	195
Sant Aniol	360	90,7	16,5	12,1	320
Fuente Primavera	297,2	88,7	23,4	18,6	-
Bezoya	18	4	1,8	1,3	26
Lanjarón	107	29,7	9,4	6	-
Veri	197	69	1,5	0,6	195
Fonter	104	21,9	7,2	7,8	-
Font del Regàs	111	26,6	1,3	28,2	167
Font Agudes	258	54,4	15,9	33,9	305
Bronchales	18	3	3	1	35



Figures 8 i 9. Quadre i gràfic que fan referència a les marques d'aigua i als diferents laboratoris encarregats de l'anàlisi química de les aigües. A1'11

Seria interessant veure com es combat la presència d'*E. coli* en aigües de consum humà. De nou, he contactat amb el departament d'atenció al client dels laboratoris Oliver Rodés. Aquesta vegada, la meua pregunta feia referència a, què es fa per combatre la presència d'*E. coli*? Quins són els productes químics es fan servir?

La resposta va trigar poc de nou a arribar, donant-me una clara referència: el clor i les combinacions d'aquest amb altres productes. De nou, vaig mirar al BOE, concretament l'ordre SAS/1915/2009 / BOE 172 - 17 juliol de 2009 Pàgina 60.038 i següents.

Aquesta disposició del BOE té per objecte protegir la salut de la població garantint l'ús adequat de les substàncies emprades per al tractament de l'aigua destinada a la producció d'aigua de consum humà, per al qual s'actualitza l'annex II del Reial decret 140/2003 , de 7 de febrer, pel qual s'estableixen els criteris sanitaris de la qualitat de l'aigua de consum humà mitjançant l'annex I d'aquesta ordre.

Aquests productes, com indica el BOE poden ser l'àcid clorhídric (HCl), el clorat sòdic (NaClO₃). Aquests i altres productes s'usen per a la correcció del pH, per a la regeneració de resines⁴. Altres exemples de productes usats són també: el clorit de sodi (NaClO₂), clor líquid (Cl), polihidroxiclòrid d'alumini i polihidroxiclòrid sulfat d'alumini, clorur d'alumini, clorosulfat de ferro (III), clorur de ferro (III) i clorur de amoni.

Una llarga llista hi ha, tots amb similars funcions. La majoria contenen el clor, però altres compostos poden ser els permanganats de sodi i de potassi, la pedra tosca...

La presència de *E. coli* afecta l'aigua per al consum humà perquè la fa no potable, ja que és un indicador de contaminació fecal.

Per detectar la presència de la bactèria, es fan filtracions en medi selectiu⁵, emprant el mètode "Nombre Més Probable"⁶ per les seves sigles NMP. Aquestes tècniques i altres són establertes per les normes UNE-EN-ISO⁷. Per combatre aquesta presència, la cloració⁸, l'ozonització⁹ i la radiació UV¹⁰ són emprades.

⁴ Resines d'intercanvi iònic s'utilitzen àmpliament en la purificació, en processos d'estovament i els processos de descontaminació d'aigües.

⁵ Es realitza un filtrat per unes membranes fabricades en acetat o nitrat de cel·lulosa, en un medi de cultiu tractat amb substàncies que impedeixen el creixement del bacteri.

⁶ Mètode per obtenir dades quantitatives en concentracions dels elements que s'estudien. S'usa quan una avaluació d'elements individuals no és viable.

⁷ Normes realitzades per AENOR (Associació Espanyola de Normalització i Certificació) que són agafades i editades per Europa, que a més passen a ser normes estàndard en la ISO (Organització Internacional de la normalització).

⁸ Desinfectar aigües mitjançant l'ús de clor.

⁹ Desinfectar aigües mitjançant l'ús d'ozó.

¹⁰ Combinació de camps elèctrics i magnètics la longitud d'ona dels quals es troba entre els 400 nm i els 15 nm.

4. ARTICLES DE PREMSA

Vegem ara un recull d'articles de diferents mitjans de comunicació. Dir que aquests no són els articles complets, sinó una selecció d'allò que m'ha semblat més interessant. Són els següents:

LA VANGUARDIA

Alemanya assegura que el bacteri *E.coli* no procedeix de cogombres espanyols

El bacteri trobat a les hortalisses procedents d'Espanya no coincideix amb la trobada en la femta dels pacients. La senadora de Sanitat de Hamburg defensa la denúncia de la setmana passada argumentant que els cogombres presentaven altres patògens de risc que havia de fer públics

RADIO TELEVISIÓN ESPAÑOLA

La crisi sanitària del bacteri *E. coli* va començar a Alemanya després de detectar un augment molt significatiu de malalts amb diarrea sanguinolenta. Després d'apuntar en diverses direccions, Berlín ha confirmat que l'origen està en els brots germinats de soia trobats en una granja de Baixa Saxònia.

El brot, atribuït a la variant O104H4, més agressiva del bacteri, ha causat ja 31 morts i més de 3.000 **afectats**, segons les dades del Centre Europeu de Control de Malalties. En un primer **moment**, les autoritats d'Hamburg van apuntar a una contaminació en cogombres espanyols, que posteriorment va quedar descartada, encara que el dany als productors ja estava fet.

Després d'Alemanya, Suècia és el país amb més casos (47), un d'ells mortal. El segueix Dinamarca amb 20. S'han registrat afectats també a Àustria, República Txeca, França, Grècia, Luxemburg, Holanda, Noruega, Polònia, Suècia i Regne Unit.

Alemanya ha confirmat ja l'origen del brot, que es troba en llavors germinades d'una granja de Baixa Saxònia. Per aquest motiu les autoritats d'aquest país mantenen la recomanació de no menjar aquest tipus d'aliments i ha aixecat la recomanació al cogombre, el tomàquet i les amanides.

KATE KELLAND I ERIC KELSEY

Llavors de fenigrec importades des d'Egipte podrien ser la font dels brots del bacteri *E. coli* que van causar la mort d'almenys 48 persones a Alemanya i França, segons investigacions inicials dutes a terme per científics europeus.

Experts del Centre Europeu per a la Prevenció i el Control de Malalties i l'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària van dir que les investigacions inicials suggerien que "el consum de brots germinats és el vehicle sospitós d'infecció tant en la soca francesa com en el brot alemany". "El

rastreig està progressant i fins al moment s'ha demostrat que llavors de fenigrec importades d'Egipte el 2009 i / o 2010 estan implicades en els dos brots".

El comerciant alemany de llavors orgàniques va dir a Reuters que va distribuir llavors a Thomson & Morgan, un comerciant britànic de llavors citat com una possible font del brot a França, però que va ser absolt per autoritats de la salut.

CASI NO S'ALLIBERA DE LA CRISI DEL COGOMBRE

La Cooperativa Agrícola Sant Isidre (CASI) no s'ha lliurat de la crisi del *E. coli* igual que les seves homòlogues en del sector hortofructícola, s'ha vist obligada a suprimir multitud de plantacions en perfecte estat.

Les pèrdues han estat molt grans. Alemanya és un client molt fort d'aquesta societat agrícola, igual que Rússia. Des que va esclatar l'alarma d'*E coli* , s'han ressentit les exportacions de la cooperativa agrícola d'Almeria cap a aquests països i, sobretot, s'han ressentit les seves exportacions a nivell internacional.

"Molts agricultors han hagut de arrencar les seves plantacions en perfecte estat abans de finalitzar la campanya", va declarar Miguel García, trabador de la cooperativa des de fa més de 31 anys i actual administrador d'aquesta. Més del 95% dels productes de la campanya que acaba de finalitzar han estat tomàquets. Entre la resta, hi ha el meló i la síndria, va comentar Miquel. No obstant això, tot i ser una cooperativa on abunda el tomàquet, s'ha vist ressentida per la crisi del cogombre ja que tots els seus clients han deixat d'exportar productes agrícoles Almeria, sobretot a nivell europeu.

EL BENESTAR: PRODUCTE DE LA PACÍFICA CONVIVÈNCIA AMB ELS BACTERIS

Cent milions: aquest és, més o menys, el nombre de bacteris que habiten de manera permanent en l'organisme humà. És més, des que naixem, el cos és colonitzat per microorganismes que s'allotgen a la pell, en el tracte digestiu, en les vies respiratòries, a la boca i fins i tot als ulls.

Són tantes, explica Alfredo Torres- professor de la Universitat de Texas i coordinador de la Xarxa Latinoamericana d'Investigació en *E. coli* , que "si prenguéss part del cos d'algú i el dividís entre teixits i bacteris, gairebé les dues terceres parts serien bacteris".

Cada espècie de bacteris (n'hi ha més de 400) tria per viure al lloc que li resulti més còmode, i mentre hi són no només són innòcues, sinó que ajuden a l'organisme a complir algunes funcions. Si alguna cosa les afecta o surten del seu entorn, poden causar infeccions. Per exemple: el *Staphylococcus aureus*¹¹ viu a les vies nasals i en la pell, però és capaç de generar infeccions intrahospitalàries i greus intoxicacions alimentàries.

¹¹ Ho hem vist al capítol 2 i al seu 1r bloc, en un experiment realitzat al "Jove Campus de Recerca".

EPIDÈMIA PROVOCADA PER UNA MUTACIÓ

L'epidèmia de gastroenteritis aguda desencadenada a Hamburg (Alemanya) a finals del mes de maig, fou provocada per un bacteri patògen molt agressiu, variant de l'*Escherichia coli*, que actua adherint-se a les parets de l'intestí des d'on bombeja toxines i que ha provocat una cinquantena de morts i prop de 3.000 persones afectades dins i fora d'Alemanya.

Al que es va afegir una inadequada gestió, declaracions errònies, irresponsables i sense base de les institucions alemanyes, una alarma decretada pel govern local hamburguès sense avisar el Govern central i sense respectar el protocol d'alerta alimentària de la Xarxa d'Alerta Alimentària Comunitària (Organisme europeu encarregat de vigilar i comunicar qualsevol risc relacionat amb la seguretat alimentària).

Aquest còctel ha provocat nombrosos perjudicis econòmics i laborals en el sector agroalimentari europeu, així com en moltes de les seves indústries associades, especialment les hortofructícoles espanyoles, que han vist impotents com s'ensorrava de manera immediata el prestigi i reputació dels seus productes, desacreditats de un cop de ploma i de forma injusta.

Espanya exporta anualment 10 milions de tones de fruites i hortalisses amb un valor de gairebé 9.000 M €. Alemanya és el nostre major client en fruites i hortalisses amb el 25% de la demanda. Al 2010, les exportacions totals espanyoles amb destinació a Alemanya van ser de 19.500 M €, amb un augment significatiu en relació amb l'any anterior, mentre que Alemanya va exportar a Espanya per valor de 28.000 M €, amb tendència a la baixa.

No deixa de resultar paradoxal que aquesta crisi s'hagi produït a la Unió Europea, on comptem amb un dels sistemes de vigilància i control d'aliments més avançats a nivell mundial, la finalitat és la de garantir la seguretat alimentària i preservar la salut del consumidor .

LA CRISI DE LA *E. coli* FRENA EN SEC LES EXPORTACIONS AGRÍCOLES D'ALMERIA

Ja es tenen dades referents al mes de maig que confirmen que *E. coli* va suposar un desastre al sector hortofructícola d'Almeria. Al maig les empreses de la província van realitzar 1734 operacions comercials, 160 menys que un any abans, i van exportar 88.039 tones d'hortalisses fresques, el que va suposar un 24 per cent menys que en el mateix mes de l'any precedent, per un valor de gairebé 59 milions d'euros.

Almeria suposa, per valor del producte exportat, el 41,7 per cent del total de les exportacions d'hortalisses i llegums fresques d'Espanya entre gener i maig, seguida per Múrcia i València, amb el 24,3 i el 8 per cent, respectivament .

5. SOQUES DE *E. coli* EN LA DSMZ I LA CECT

Als quadres que podem veure a continuació incloc un resum de les col·leccions de *E. coli* que he pogut trobar als catàlegs de les respectives col·leccions de cultiu, en aquest cas la CECT i la DSMZ, en els seus catàlegs en la xarxa.

DSMZ	ESPÈCIE
301 ¹²	<i>Escherichia coli</i>
308	<i>Escherichia coli</i>
423	<i>Escherichia coli</i>
426	<i>Escherichia coli</i>
429	<i>Escherichia coli</i>
498	<i>Escherichia coli</i>
499	<i>Escherichia coli</i>
500	<i>Escherichia coli</i>
501	<i>Escherichia coli</i>
502	<i>Escherichia coli</i>
613	<i>Escherichia coli</i>
682	<i>Escherichia coli</i>
787	<i>Escherichia coli</i>
1058	<i>Escherichia coli</i>
1077	<i>Escherichia coli</i>
1099	<i>Escherichia coli</i>
1103	<i>Escherichia coli</i>
1116	<i>Escherichia coli</i>
1328	<i>Escherichia coli</i>
1329	<i>Escherichia coli</i>
1392	<i>Escherichia coli</i>
1562	<i>Escherichia coli</i>
1563	<i>Escherichia coli</i>
1576	<i>Escherichia coli</i>
1607	<i>Escherichia coli</i>
1900	<i>Escherichia coli</i>
1936	<i>Escherichia coli</i>
2304	<i>Escherichia coli</i>
2607	<i>Escherichia coli</i>
2670	<i>Escherichia coli</i>
2679	<i>Escherichia coli</i>
2829	<i>Escherichia coli</i>
2840	<i>Escherichia coli</i>
3413	<i>Escherichia coli</i>
3414	<i>Escherichia coli</i>
3415	<i>Escherichia coli</i>
3417	<i>Escherichia coli</i>
3419	<i>Escherichia coli</i>

¹² Aquests números fan referència a la col·lecció, assignats a cada soca.

3420	<i>Escherichia coli</i>
3421	<i>Escherichia coli</i>
3422	<i>Escherichia coli</i>
3423	<i>Escherichia coli</i>
3424	<i>Escherichia coli</i>
3425	<i>Escherichia coli</i>
3438	<i>Escherichia coli</i>
3804	<i>Escherichia coli</i>
3863	<i>Escherichia coli</i>

CECT	ESPÈCIE
4558	<i>Escherichia coli</i>
4559	<i>Escherichia coli</i>
4560	<i>Escherichia coli</i>
4561	<i>Escherichia coli</i>
4562	<i>Escherichia coli</i>
4563	<i>Escherichia coli</i>
4940	<i>Escherichia coli</i>
4941	<i>Escherichia coli</i>
4942	<i>Escherichia coli</i>
4943	<i>Escherichia coli</i>
4944	<i>Escherichia coli</i>
4945	<i>Escherichia coli</i>
4946	<i>Escherichia coli</i>
4947	<i>Escherichia coli</i>
4948	<i>Escherichia coli</i>
4949	<i>Escherichia coli</i>
4950	<i>Escherichia coli</i>
4951	<i>Escherichia coli</i>
4952	<i>Escherichia coli</i>
4953	<i>Escherichia coli</i>
4954	<i>Escherichia coli</i>
4955	<i>Escherichia coli</i>
4956	<i>Escherichia coli</i>
4957	<i>Escherichia coli</i>
4958	<i>Escherichia coli</i>
4959	<i>Escherichia coli</i>
4960	<i>Escherichia coli</i>
4961	<i>Escherichia coli</i>
4962	<i>Escherichia coli</i>
4963	<i>Escherichia coli</i>
4964	<i>Escherichia coli</i>
4056	<i>Escherichia coli</i> AMC ¹³ 198; ATCC 11229; CCRC 11549; CCTM La 2109; CCUG 17931;

¹³ Les sigles fan referència a les col·leccions. Per exemple, les sigles ATCC es refereixen a la American Type Culture Collection.

	CNCTC Ec 377/79; DSM 787; LMD 70.12; LMD 72.44; LMG 9007; NCIMB 9517
363	<i>Escherichia coli</i> Andrewes strain Towne; ATCC 19413; CIP 53.29; CN 1327; CNCTC Sha 4/49; Kauffmann 5; NCTC 1601
106	<i>Escherichia coli</i> Appleyard C600; Appleyard CR34; ATCC 23724; Blanco GY 36; Campbell Q0A; CGSC 3004; CIP 75.17; Cloves & Hayes EMG10; DSM 3925; Ferrer BIE28; Jacob Q0; Lederberg W3338; LMG 3041; NCIMB 10222
379	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10799; CCM 2260; CCTM La 568; CIP 54.6; Davis 113-3; DSM 4261; IAW 22; LMD 52.29; NCFB 744; NCIMB 8134; strain C181
4201	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11303; CCRC 10674; CCRC 13055; CCUG 2468; CNCTC Ec 323/69; DSM 613; HER 1024; Luria B; NCIMB 11595; NRC 745
515 T	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775; BTCC U5/41; CAPM 6101; CCM 5172; CCRC 10675; CCTM La 2067; CCUG 24; CIP 54.8; CN 4382; CNCTC Eck 58/59; CNCTC Eck 206/59; DSM 30083; FIRDI 675; GISK 240001; IAM 12119; JCM 1649; Kauffmann U 5/41; LMD 54.8; LMG 2092; NCFB 1989; NCIMB 11943; NCTC 9001; PCM 172; PCM 321; SSIC U 5/41; USCC 2054; WDCM 00090
423	<i>Escherichia coli</i> ATCC 12435; CCRC 12570; CGSC 5024; CGSC 5083; CNCTC Ec 474/86; Devoret BY13; DSM 5695; IFO 3302; Lederberg W1485; NCIMB 9481; Rorsch LBE100; strain P 2731
348	<i>Escherichia coli</i> ATCC 12806; CDC 3303-51; CN 6763; NCTC 9706
877	<i>Escherichia coli</i> ATCC 13005; Chas. Pfizer Co. 82-28-2617
568	<i>Escherichia coli</i> ATCC 13027; Barry K235; NCIMB 10582; NCTC 10487
4622	<i>Escherichia coli</i> ATCC 13706; ATCC 25312; CCRC 13082; CECT 4177; CIP 104337; CNCTC Ec 427/82; DSM 4860; HER 1036; IFO 13898; LMD 73.23; NCIMB 10544; NCIMB 12416; Sinsheimer C
4177	<i>Escherichia coli</i> ATCC 13706; ATCC 25312; CECT 4622; NCIB 12416; strain Sinshelmer C
459	<i>Escherichia coli</i> ATCC 15144; DSM 50902; ICPB 2262; LMD 72.5; NCIMB 9527; Stolp strain B; Stolp 109
428	<i>Escherichia coli</i> ATCC 15224; CCRC 12554; Kepes ML308; NCIMB 9553
4535	<i>Escherichia coli</i> ATCC 19110; BTCC Su 4411/41; CAPM 5185; CCUG 11320; CN 4395; CNCTC Eck 71/59; GISK 240057; Kauffmann Su 4411-41; NCTC 9014; PCM 185
432	<i>Escherichia coli</i> ATCC 21026; KY 8213

105	<i>Escherichia coli</i> ATCC 23231; Blanco GY 4054; CCRC 13803; CGSC 5379; Hill B/r-WP2; strain AC5379
4537	<i>Escherichia coli</i> ATCC 23506; CAPM 5181; CCUG 11316; CN 4391; CNCTC Eck 67/59; GISK 240052; NCTC 9010; PCM 181; PCM 366; strain Bi 8337/41
731	<i>Escherichia coli</i> ATCC 23513; CCTM La 2000; CDC 3219-54; NCTC 10863; SSIC 3219/54; strain Sc 385A
736	<i>Escherichia coli</i> ATCC 23520; CAPM 5363; CCUG 11335; CDC 909-51; GISK 240083; NCTC 6999; PCM 431; Scholtens strain Kattwijk
728	<i>Escherichia coli</i> ATCC 23540; CCUG 11415; CN 4496; GISK 240176; NCTC 9114; PCM 281; PCM 447; strain w26; strain K10; strain HW34
426	<i>Escherichia coli</i> ATCC 23589; CCRC 12556; CGSC 4406; CIP 54.121; Cloves & Hayes EMG21; Lederberg W6; Lederberg 58-161; NCIMB 9950; NCIMB 10233
4624	<i>Escherichia coli</i> ATCC 23631; CIP 104130; CNCTC Ec 556/89; DSM 5210; Jacob Hfr 3000 U432; NCIMB 11288; NCTC 12486
431	<i>Escherichia coli</i> ATCC 23725; CCRC 11744; Cloves EMG11; NCIMB 10223; strain A'327
743	<i>Escherichia coli</i> ATCC 23985; BTCC C771; CAPM 5369; CCTM La 2057; CCUG 11442; CECT 818; CNCTC Eck 199/65; Kauffmann C 771; PCM 307; PCM 443; SSIC C771
434	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922; CCM 3954; CCRC 14902; CCTM La 2184; CCUG 7736; CCUG 17620; CCUG 21456; CIP 76.24; CNCTC Ec 327/73; DSM 1103; FDA Seattle 1946; GISK 240533; HER 1176; IFO 15034; JCM 5491; LMG 8223; NCIMB 12210; PCM 2057; WDCM 00013
888	<i>Escherichia coli</i> ATCC 27195; Pardee pncH9; Young Y1088
470	<i>Escherichia coli</i> ATCC 27257; NCIMB 10616; Schlesinger CW3747
416	<i>Escherichia coli</i> ATCC 27325; CCRC 12238; CCTM La 2010; CGSC 4474; CNCTC Ec 463/85; DSM 5911; Ferrer BIE1; IFO 12713; IMUL W 3110; Lederberg W3110; Liu Eco711; NCIMB 11296; Pugsley PAP 308
670	<i>Escherichia coli</i> ATCC 33694; NCTC 50237; strain HB101
727	<i>Escherichia coli</i> ATCC 33780; Brenner strain Stoke W; BTCC Stoke W; CAPM 6120; CCRC 14918; CCTM La 1991; CCUG 11412; CECT 832; CIP 52.167; CN 4493; CNCTC Eck 168/59; GISK 240170; NCTC 9111; PCM 277; PCM 418
832	<i>Escherichia coli</i> ATCC 33780; CCUG 11412; CECT 727; CN 4493; NCTC 9111; strain

BLOQUE 3. Bibliografia, apèndix i agraïments

	Stoke W
4267	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35150; CCTM La 2947; CDC EDL 931; CIP 103571; Morris EDL 931
943	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218; CCM 4225; CCTM La 3631; CCUG 30600; CIP 102181; DSM 5923; NCIMB 11954; NCTC 11954; PCM 2604; strain 1532
429	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35695; DSM 6574; Ferrer BIE7; Weinstock MC4100
887	<i>Escherichia coli</i> ATCC 37194; Young BNN97
889	<i>Escherichia coli</i> ATCC 37196; Young Y1089
890	<i>Escherichia coli</i> ATCC 37197; Young Y1090
45	<i>Escherichia coli</i> ATCC 4157; CIP 61.11; DSM 301; IAW 21; NCFB 1439; NCIMB 86; NCTC 86
4782	<i>Escherichia coli</i> ATCC 43894; CCTM La 2948; CDC EDL 932
4783	<i>Escherichia coli</i> ATCC 43895; CCRC 14824; CCTM La 2949; CDC EDL 933
7326	<i>Escherichia coli</i> ATCC 49980; DSM 9494; NCIMB 11187; WP2
5055	<i>Escherichia coli</i> ATCC 53338; Hoffmann-La Roche Inc(MC1061); DSM 7140
516	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739; CCRC 11634; CCTM La 2194; CCUG 10979; CIP 53.126; DSM 1576; Gunsalus strain Crookes; IFO 3972; IMET 11121; LMG 8063; NCFB 904; NCIMB 8545; PCM 2561; VTT E-76039; WDCM 00012
99	<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637; BUCSAV 472; CCM 2024; CCRC 10954; CCTM La 407; CCUG 1640; CECT 4099; CIP 2.83; CNCTC Ec 302/62; DSM 1116; IAW 23; IFO 13500; LMD 50.28; LMG 11080; NCIMB 8666; NRRL B-766; PCM 1951; strain 397E; Waksman strain W
4099	<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637; CCM 2024; DSM 1116; IFO 13500; NCIB 8666; NRRL-B766; strain 397E; strain W
364	<i>Escherichia coli</i> ATCC 9723h; BUCSAV 383; NCIMB 8583; Roepke 70-462
430	<i>Escherichia coli</i> BIE16
104	<i>Escherichia coli</i> Blanco GY 1
418	<i>Escherichia coli</i> Brammer ED8654; CGSC 6512; Ferrer BIE5; strain LE392; Vicente NEM259
730	<i>Escherichia coli</i> BTCC 3912/41; CAPM 5224; CCTM La 1992; CCUG 11359; CN 4436;

	CNCTC Eck 112/59; NCTC 9055; PCM 224; SSIC 972; strain Su 3912/41
742	<i>Escherichia coli</i> BTCC Cigleris; CAPM 6129; CCTM La 1998; CCUG 11427; CNCTC Ec 38/56; CNCTC Eck 185/59; GISK 240193; NCTC 9708; PCM 293; SSIC Cigleris; strain 56-54; strain Cigleris
735	<i>Escherichia coli</i> BTCC E611; CAPM 6127; CCTM La 2001; CCUG 11425; CECT 819; CN 4507; CNCTC Ec 36/56; CNCTC Eck 183/59; GISK 240190; Kauffmann E611; NCTC 8622; Orskov E611; PCM 291; PCM 429; SSIC E611
739	<i>Escherichia coli</i> BTCC Ewing 227; CCUG 11423; CNCTC Eck 181/59; Ewing 227; GISK 240187; PCM 430
4555	<i>Escherichia coli</i> BTCC H 320a; CAPM 5263; CCUG 11398; CN 4478; CNCTC Eck 154/59; GISK 240159; Kauffmann H 320a; NCTC 9097; PCM 263
504	<i>Escherichia coli</i> BTCC RVC 2907; CAPM 6134; CCUG 11441; CNCTC Eck 198/59; GISK 240207; NCTC 10674; PCM 306; PCM 442; strain RVC 2907
816	<i>Escherichia coli</i> CAMP 5359; CCTM La 1994; CIP 62.21; CNCTC Ec 33/56; GISK 240144; NCTC 8621; PCM 421; SSIC E 990
744	<i>Escherichia coli</i> CAMP 6005; CNCTC Eck 268/75; IW 1381; NCTC 10974; strain E 1020-72
732	<i>Escherichia coli</i> CAPM 5358; CCTM La 1993; CIP 52.171; CNCTC Ec 26/52; GISK 240079; NCTC 8960; PCM 420; SSIC F 41; strain Hall
740	<i>Escherichia coli</i> CAPM 6126; CCTM La 1997; CCUG 11424; CECT 349; CIP 62.24; CN 4508; CNCTC Ec 35/56; CNCTC Eck 182/59; GISK 240188; NCTC 8623; PCM 290; PCM 428; SSIC Canioni; strain Vincent; Taylor strain Canioni
352	<i>Escherichia coli</i> CAPM 6128; CCTM La 1995; CCUG 11426; CDC 4932-53; CECT 733; CIP 61.12; CN 4509; CNCTC Eck 184/59; Ewing 4932-53; GISK 24019; NCTC 9707; PCM 292; PCM 423; SSIC 4932-53
817	<i>Escherichia coli</i> CCTM La 1996; SSIC C881-62
819	<i>Escherichia coli</i> CCTM La 2001; CECT 735; SSIC E611
818	<i>Escherichia coli</i> CCTM La 2057; CECT 743; SSIC C771
738	<i>Escherichia coli</i> CCTM La 2059; CDC 2292-55; NCTC 10865; strain Sc432
533	<i>Escherichia coli</i> CCTM La 2107; CNCTC Ec 324/70; NCFB 745; NCIMB 8277; NCTC 8196; PCM 2268; strain C3; VTT E-81094
433	<i>Escherichia coli</i> CCTM La 2193; CIP 54.117; IFO 3301; Lederberg K12; NCIMB 10083;

	NCTC 10538; PCM 2560; strain K12
101	<i>Escherichia coli</i> CCTM La 3639; CIP 54.125; Delbruck strain B; DSM 2840; LMG 2093; NCIMB 9484; NCTC 10537
503	<i>Escherichia coli</i> CCUG 11350; CN 4426; GISK 240101; NCTC 9045; Orskov H 61; PCM 215
726	<i>Escherichia coli</i> CCUG 11414; GISK 240174; PCM 279; PCM 424; strain Guanabara
4076	<i>Escherichia coli</i> CCUG 20570; LCDC 86-51
5947	<i>Escherichia coli</i> CCUG 44857; Schmidt 3538/96
734	<i>Escherichia coli</i> CDC 5306-56
733	<i>Escherichia coli</i> CECT 352; CDC 4932-53
4574	<i>Escherichia coli</i> CGSC 4507; PC 1517; Taylor AT2457
4575	<i>Escherichia coli</i> CGSC 4521; PC 1528; Taylor AT2681
4456	<i>Escherichia coli</i> CGSC 5730; Matney UTH6406
4457	<i>Escherichia coli</i> CGSC 5732; Coutright W945T1-2
5649	<i>Escherichia coli</i> CIP 105543; KS 52
543	<i>Escherichia coli</i> CIP 55.30; Guelin 36
102	<i>Escherichia coli</i> CIP 65.33; CNCTC Ec 334/77; NCIMB 9483
351	<i>Escherichia coli</i> CN 4407; NCTC 9026; strain H311G
737	<i>Escherichia coli</i> CN 4425; NCTC 9044; strain H702c
4098	<i>Escherichia coli</i> Davis 159-2; DSM 2607; NCIMB 8743
381	<i>Escherichia coli</i> Devoret GY 335; strain C
7619	<i>Escherichia coli</i> DSM 498
4167	<i>Escherichia coli</i> DSM 423; Pons 2170; strain H61
678	<i>Escherichia coli</i> DSM 8872; NCTC 50193; strain ECO; strain v517
103	<i>Escherichia coli</i> Ferrer BIE12; strain C600
419	<i>Escherichia coli</i> Ferrer BIE2; Vicente MV2
417	<i>Escherichia coli</i> Ferrer BIE3; Starlinger 1045

424	<i>Escherichia coli</i> Ferrer BIE40; NCIMB 9482; strain P678
107	<i>Escherichia coli</i> Ferrer BIE6; strain C600 λ 4
471	<i>Escherichia coli</i> LMG 9006; NCIMB 9132; NCTC 5934; Sykes 107
100	<i>Escherichia coli</i> NCIB 9485; ATCC 12407; B/r
961	<i>Escherichia coli</i> NCIMB 9472; strain C48
501	<i>Escherichia coli</i> NCTC 10650; Orskov CS 1483
4003	<i>Escherichia coli</i> NCTC 11560; strain 1077
4972	<i>Escherichia coli</i> NCTC 12900; WDCM 00014
679	<i>Escherichia coli</i> NCTC 50192; strain 39r861
663	<i>Escherichia coli</i> NCTC 50504; strain R721pilc
380	<i>Escherichia coli</i> NCTC 8603
349	<i>Escherichia coli</i> NCTC 8623
4576	<i>Escherichia coli</i> PC 1552; strain KA 290; strain N 14-4
5048	<i>Escherichia coli</i> pGEX-2T
685	<i>Escherichia coli</i> Rowe E8775-A
686	<i>Escherichia coli</i> Rowe E8775-C
425	<i>Escherichia coli</i> strain 185
5301	<i>Escherichia coli</i> strain 784
4083	<i>Escherichia coli</i> strain AB1157
729	<i>Escherichia coli</i> strain Aberdeen 1064; CAPM 5357; CECT 380; CIP 52.170; GISK 240111; NCTC 8603; NCTC 8959; PCM 419
831	<i>Escherichia coli</i> strain B
745	<i>Escherichia coli</i> strain BP 12665
7690	<i>Escherichia coli</i> strain C48a
4938	<i>Escherichia coli</i> strain DH5 alpha - pSP1-353
4939	<i>Escherichia coli</i> strain DH5 alpha - pSPE 353

674	<i>Escherichia coli</i> strain DH5 alpha YCplac 111
675	<i>Escherichia coli</i> strain DH5 alpha YEplac 181
741	<i>Escherichia coli</i> strain EW 2129-54
4567	<i>Escherichia coli</i> strain GM1
689	<i>Escherichia coli</i> strain HB101/739
405	<i>Escherichia coli</i> strain LP01
4084	<i>Escherichia coli</i> Villaverde QDsup III

6. OBTENCIÓ DE LA IMATGE DE JULIUS RICHARD PETRI

La imatge que hem pogut veure és de les poques fotografies de JR Petri. De fet, per aconseguir-la i com que no trobava cap, vaig decidir posar gran interès a trobar alguna. Vaig contactar mitjançant correu electrònic amb els ajuntaments de Bremen i Zeitz, ciutats de naixement i defunció de Petri per veure si disposaven d'alguna, però no hi va haver sort.

Lavors em vaig dir: “per què no contacto amb l'ambaixada alemanya a Madrid i l'ambaixada espanyola a Berlín?” I això és el que vaig fer i en poques setmanes vaig rebre-les després que l'ambaixador es posés en contacte amb mi explicant-me que ells no disposaven de cap i que mirarien de posar-se en contacte amb les facultats de Berlín i els seus museus relacionats amb la ciència fins que hi va haver sort i vaig rebre un correu amb molta il·lusió explicant que hi havia una foto i és la que vostès han pogut veure en el bloc 1.

En aquesta primera captura de pantalla del meu compte de correu de Google Mail tenim el correu original que vaig enviar a l'ambaixada el 24 de febrer de 2011. Estava amb tantes ganes d'aconseguir la imatge que vaig fer el possible per tenir-la.



Figura 2.47. Captura de pantalla d'un correu del 24 de febrer de 2011. Aquí demano la imatge o alguna via o contacte per arribar a la mateixa. A1'11

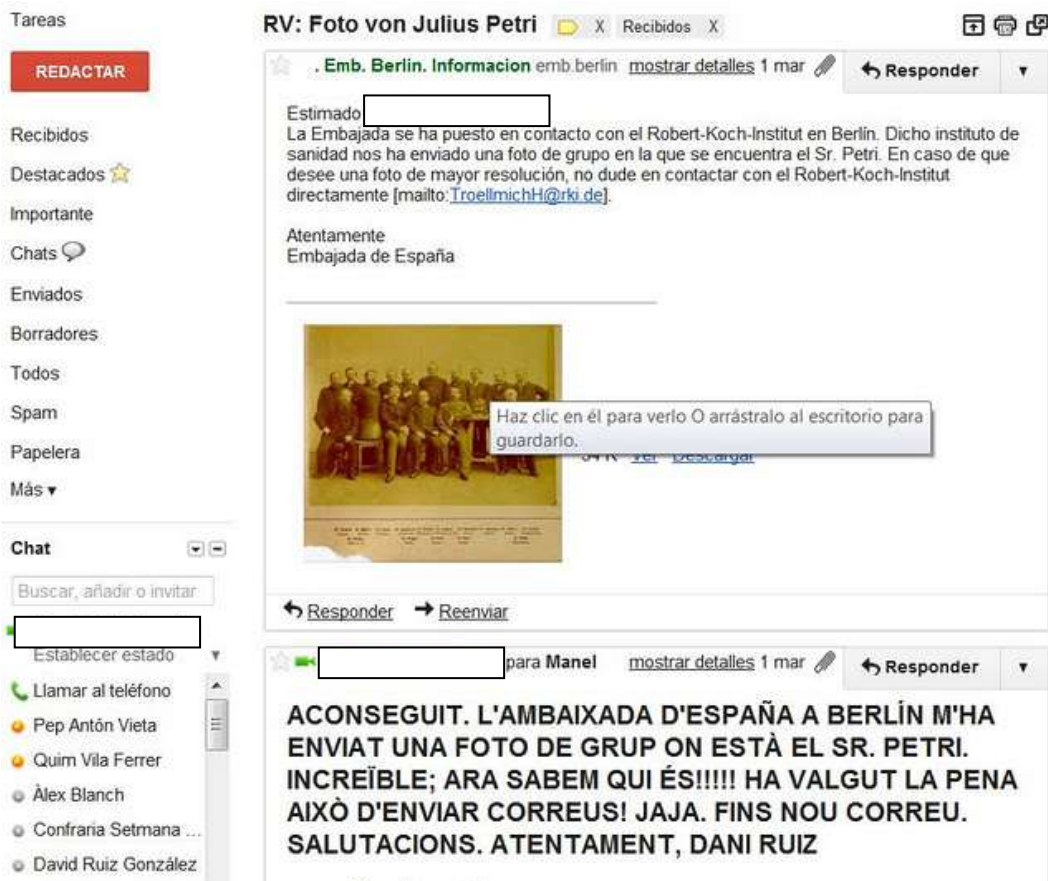


Figura 2.48. Captura de pantalla d'un correu del 1 de març del 2011. A1'11

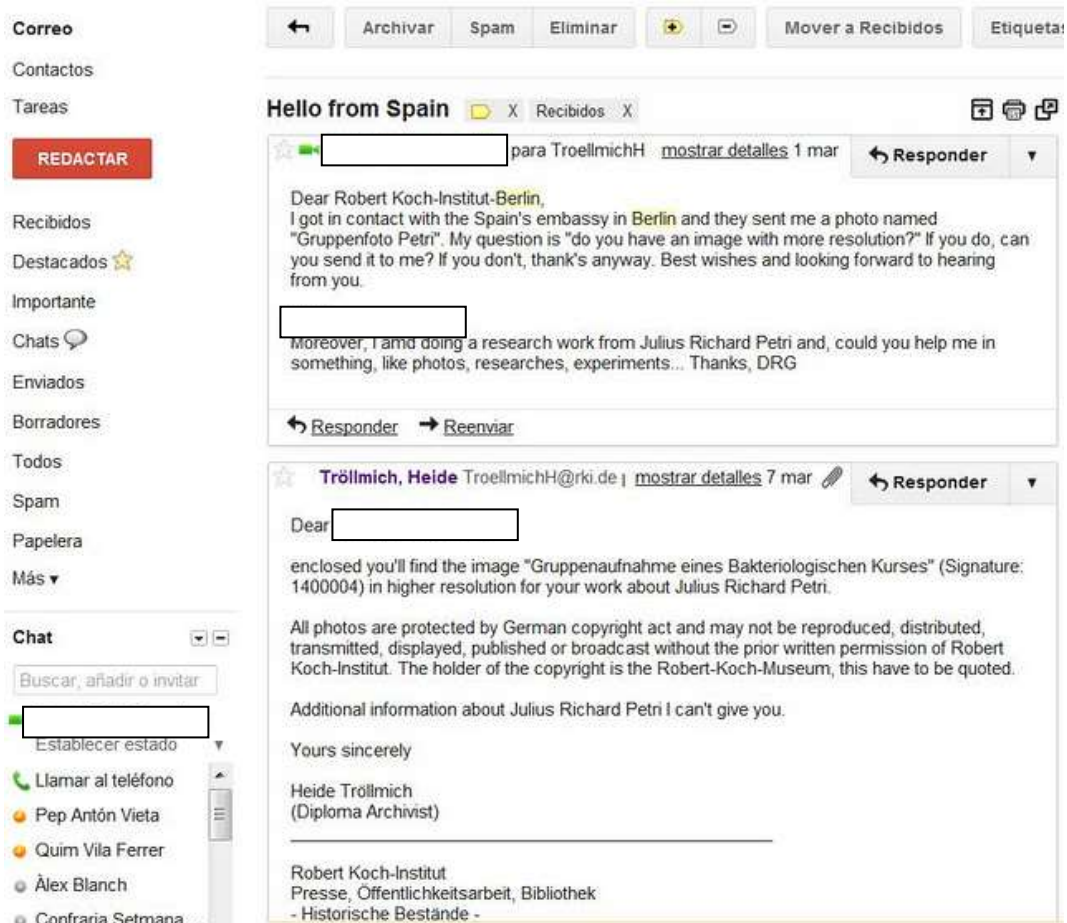


Figura 2.49. Captura de pantalla d'un correu del 1 i 7 de març del 2011. Aquí em poso en contacte per demanar una imatge de més resolució ja que en el correu anterior me notifiquen la existència d'una imatge de resolució major. **A1'11**

Més endavant em vaig posar en contacte amb la ambaixada i el Robert Koch Museum. Com podran veure, en menys d'una setmana tenia la resposta. És clar el motiu: com que no és quelcom molt important entenc que ho deixessin per quan tinguessin menys feina, però vaig tenir sort perquè pensava que mai arribaria. Molt bona tasca, la dels nostres ambaixadors. Des d'aquí, les meves sinceres felicitacions i gràcies.

ANOTACIONES

En les següents línies destaco un parell d'anotacions respecte aquest treball:

1. Especificacions de la càmera: CASIO FC100

- Captura d'imatges en sèrie d'alta velocitat
- Captura de vídeos d'alta velocitat
- Funció Slow View de càmera lenta
- Zoom òptic de 5 augments amb sistema mecànic d'estabilització de la imatge
- 9,1 megapíxels (efectius)
- EXILIM i BEST SHOT són marques registrades de CASIO COMPUTER CO., LTD.

2. Tots els dibuixos presents en aquest treball han estat realitzats per mi, amb la tecnologia de Google Docs i la funció "dibuix" que ofereix aquest servei de l'empresa Google. Els mateixos, porten a més un segell distintiu: "A1'11", que mostra que mostra la seva realització per l'autor d'aquest treball, és a dir, que no és extret de cap tipus de pàgina web.

3. Totes les imatges que porten també el segell de "A1'11" han estat preses mitjançant la càmera descrita en el punt 1, per mi. Alguns dels gràfics no inclouen el terme científic en cursiva perquè el programa (Google Docs Hoja de cálculo) no ho permet fer.

4. Algunes figures del treball estan en castellà perquè la versió original del projecte és en castellà. Per problemes informàtics no he pogut traduir-les per perdre els originals dibuixos.

© Autor 1, 2011 (A1'11)

AGRAÏMENTS

Vull agrair l'ajuda rebuda de les persones que han estat al meu costat durant la realització d'aquest treball, durant aquests gairebé dos anys.

En primer lloc als meus pares Juan i Dolores, al meu germà David i la meva àvia Salvadora, que són les persones més properes a mi. Sabeu que sense vosaltres no hagués pogut arribar fins aquí.

He dut a terme contínues visites a les biblioteques de Girona i Salt, on he trobat una part d'informació. Gràcies als laboratoris que m'han prestat informació i gràcies també a internet i als seus pàgines web.

Considero important donar les gràcies a la UdG per la seva ajuda, més encara al Dr. Jesús García Gil, director del departament de microbiologia de la UdG, per l'ajuda que m'ha prestat. També donar les gràcies als organitzadors del "Jove Campus de Recerca 2011", i als que em van ajudar en aquests 15 dies de campus: un conjunt de doctors i de becaris de la Universitat de Girona¹⁴. Moltes gràcies per ajudar-me en els experiments que vaig realitzar en aquestes setmanes de campus.



Figura 2.49. El diploma que certifica la meva assistència al "4t Jove Campus de Recerca", que va tenir lloc a la Universitat de Girona

Gràcies també a l'empresa Deltalab de Rubí, amb la qual vaig contactar el per recollir dades sobre les càpsules de Petri, la seva venda i els processos d'esterilització. Estic molt content per

¹⁴ No s'inclouen els seus noms per evitar la presència de noms de tutors externs que puguin fer variar la opinió del treball de recerca al respectiu jurat.

haver contactat amb ells, ja que em van respondre els meus correus electrònics, a diferència de moltes altres empreses.



Figura 2.50. Dia d'inici del "Jove Campus de Recerca", a la facultat de ciències de la UdG.

Donar molt especial i cordialment les gràcies a la gran ajuda que he rebut des de la Universitat de Girona, a la qual presento aquest treball de recerca, per moltes raons, entre d'altres: el "Jove Campus de Recerca", les "Beques Botet i Sisó" i a l'ajuda rebuda pel professor titular de microbiologia de la UdG, el Dr. Doctor 1, i altres professors del departament. Doncs, agrair moltíssim a la Universitat de Girona per la gran ajuda que m'ha prestat. He rebut l'ajuda d'una gran universitat, en la que un futur m'interessaria estudiar ja que m'ha donat de primera mà la mostra de treball que s'hi segueix i les ganes constants a innovar i fer recerca, amb el desenvolupament de constants projectes, entre d'altres, el Jove Campus de Recerca i les Beques "Botet i Sisó". Moltes gràcies!

Desitjo donar les gràcies molt especialment al meu tutor d'aquest projecte, el Tutor 1, per la seva atenció i disposició per ajudar-me durant la realització del treball de recerca. Donar-li, des d'aquí, les gràcies per la seva immensa ajuda.

Finalment, felicitar i agrair l'ajuda que he rebut des de l'ambaixada Espanyola a Berlín. El motiu del meu contacte amb ella va ser el no trobar cap foto de Julius Richard Petri. Ella em va posar en contacte amb les persones adequades i ara ja puc dir "ja sé quin aspecte físic tenia el Dr. Petri ". Donar-los també gràcies a l'ambaixada i les institucions (especialment el Robert Koch-Institut-Berlin) per haver respost als meus correus electrònics, no com algunes altres institucions que, molt al meu pesar no han tingut ni tan sols l'amabilitat per contestar-me.

Per últim, donar les gràcies a la Universitat de Vic, a la qual presento aquest treball de recerca, per la organització dels premis a treballs de recerca de la mateixa universitat.

Moltes gràcies a tots ells i a molts més.

Autor 1

Salt, 25 de febrer del 2012